

**Synthese und Untersuchung
Phthalidylphosphonat-modifizierter
Oligonucleotide**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

von

Wolfgang Fendrich

vorgelegt dem Fachbereich Chemie der
Universität Hamburg

Hamburg

2008

1. Gutachter: Prof. Dr. C. Meier
2. Gutachter: Prof. Dr. B. Meyer

meinen Eltern

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Chris Meier, in dessen Arbeitskreis im Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg von März 2001 bis Juli 2005 angefertigt wurde.

Ich danke Herrn Prof. Meier für das interessante und abwechslungsreiche Thema, für seine geduldige Betreuung der Arbeit, die vielen Anregungen und Diskussionen, und nicht zuletzt für die hervorragenden experimentellen Bedingungen, die mir zur Verfügung standen.

Ich danke Herrn Dr. V. Sinnwell und seinem Team, Frau E. Juhas, Frau V. Piegnitz und Frau S. Weidner für die Messung zahlreicher NMR-Spektren.

Dr. Mirco Lindner danke ich für die hervorragende Hilfestellung bei den Messungen der MALDI-TOF-Spektren.

Ich danke meinen Schwerpunktspraktikanten Stefanie Rades und Tobias Krämer, die mit ihrem Einsatz zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ferner gilt mein Dank allen aktiven und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises Meier und der Arbeitsgruppe Maison für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Meinen Laborkollegen Andreas Hohlfeld, Nicolas Böge und Nicolas Gisch danke ich für die zahlreichen Gespräche, die wir hatten.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, deren Unterstützung mich durch Höhen und Tiefen dieser Arbeit getragen hat.

ABKÜRZUNGEN

ATP	A denosin t riphosphat
ATT	6- A za-2- t hiothymidin
AZT	3'- A zido-2'-deoxy t hymidin
CCTLC	zirkulare, zentrifugale Dünnschichtchromatographie
CDCl ₃	Deuteriochloroform
CPG	C ontrolled P ore G las
CSP	C alf S pleen P hosphodiesterase
δ	chemische Verschiebung
d4T	2',3'- D idesoxy-2',3'-didehydrothymidin
d4TMP	2',3'- D idesoxy-2',3'-didehydrothymidin m onophosphate
d4TDP	2',3'- D idesoxy-2',3'-didehydrothymidin d iphosphate
d4TTP	2',3'- D idesoxy-2',3'-didehydrothymidin t riphosphate
d	D uplett, D ichte
dA	2'- D esoxy a denosin
DAT	D iammoniumtartrat
DBU	1,8- D iaza- b icyclo[5.4.0]-7- u ndecen
dC	2'- D esoxy c ytosin
dd	D uplett D uplett
dT	2'- D esoxy t hymidin
ddT	2',3'- D idesoxy-2',3'-didehydrothymidine
ddd	D uplett D uplett D uplett
DC	D ünnschicht c hromatographie
DCC	<i>N,N'</i> - D icyclohexylcarbodiimid
DCI	4,5- D icyanoimidazol
dG	2'- D esoxy g uanosine
DHP	3,5- D ihydroxyacetophenon
DIPA	D i- <i>i</i> so-propylamin
DIPEA	D i- <i>i</i> so-propylethylamin
DMAP	4- D imethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> - D imethylformamid
DMSO	D imethylsulfoxid
DMTr	4,4'- D imethoxytriphenylmethyl

DMTrCl	4,4'- Dimethoxy triphenylmethylchlorid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
ds-DNA	double strang Desoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI	electron spray ionasation
HEPES	4-(2- Hydroxyethyl)-1- piperazinethansulfonsäure
ΔH	Enthalpie
HNA	hexatol nucleic acid
3-HPA	3- Hydroxypicolinsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ΔS	Entropie
IR	Infrarot
J	skalare Kern-Kern Kopplungskonstante
kDa	kilo-Dalton
LCAA	long chain alkylamin
LNA	locked nucleic acid
m	Multiplett
M	molar
m^5K	<i>N</i> '-(β - <i>D</i> -2'-Desoxyribosyl)-5-methyl-pyrimidin-2-on
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
MNBA	<i>meta</i>-Nitrobenzylalkohol
NBS	<i>N</i>-Bromsuccinimid
nm	Nanometer
nmol	nanomol
NMP	Nucleotidmonophosphat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
<i>m</i> RNA	<i>messenger</i> Ribonucleic Acid
ns	Nanosekunde
MS	Massenspektrometrie
ODN	Oligonucleotid
PA	Picoline Acid

PivCl	Pivaloylchlorid
PLE	Pig Liver Esterase
PMO	Phosphorodiamidat-Morpholin-modifizierte ODN
pmol	picomol
ppm	parts per million
PTAD	4-Phenyl-1,2,4-triazol-3,5-dion
<i>p</i> -TSA	<i>para</i>-Toluolsulfone Acid
R _f	Retentionsfaktor
rRNA	ribosomale Ribonucleic Acid
RNA	transfer Ribonucleic Acid
ROESY	Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy
RP	reverse phase
Rt	Raumtemperatur
s	Singulett
SATE	S-Acylthioethyl
SG	Schutzgruppe
snRNA	small nuclear Ribonucleic Acid
SVP	Snake Venom Phosphodiesterase
t	Triplett
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i>-Butyldimethylsilyl
TBDPS	<i>tert</i>-Butyldiphenylsilyl
TBuOOH	<i>tert</i>-Butylhydroperoxid
TCA	Trichloressigsäure
THAP	Trihydroxyacetophenon
TES	Triethylsilyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TK	Thymidinkinase
TK ⁻	Thymidinkinase-defizient
T _m	Melting Temperature
TOCSY	Total Correlated Spectroscopy
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer Ribonucleic Acid

ddU 2',3'-**D**idesoxyuridine

UV **U**ltraviolett

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	KENNTNISSTAND	6
2.1	DAS <i>ANTISENSE</i> -KONZEPT	6
2.2.	MODIFIKATIONEN VON OLIGONUCLEOTIDEN	11
2.3	DAS <i>PRO-ANTISENSE-OLIGONUCLEOTID</i> -KONZEPT	14
2.4	DAS α -HYDROXYPHOSPHONAT- <i>PRO-ANTISENSE-OLIGONUCLEOTID</i> -KONZEPT	17
2.5	FLUORESZENZMARKER FÜR OLIGONUCLEOTIDE	20
3.	AUFGABENSTELLUNG	24
4.	RESULTATE UND DISKUSSION	26
4.1	SYNTHESE DES N^1 -(3'-O-(2-CYANOETHOXY- <i>N,N</i> -DIISOPROPYL-AMINOPHOSPHINO)-5'-O-(4,4'-DIMETHOXYTRIPHENYLMETHYL)- β -D-2'-DESOXYRIBOSYL)-5-METHYLPYRIMIDIN-2-ONS (31)	26
4.1.1	Retrosynthetische Analyse und Syntheseplanung	26
4.1.2.	Synthese von 3',5'-O-Bis(triethylsilyl)thymidin (38)	29
4.1.3	Synthese von 3',5'-O-Bis(<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)thymidin (39)	30
4.1.4	Synthese von 3',5'-O-Bis(triethylsilyl)-4-(1,2,4-triazol-1-yl)-thymidin (40)	31
4.1.5	Synthese von (3',5'-O-Bis(<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)-4-(1,2,4-triazol-1-yl)thymidin (41)	32
4.1.6	Synthese und Optimierung der 3',5'-O-Bis(TES/TBDMS) geschützten N^1 -(β -D-2'-Desoxyribosyl)-5-methylpyrimidin-2-on Derivate (44)/(45)	33
4.1.7	Synthese von N^1 -(β -D-2'-Desoxyribosyl)-5-methylpyrimidin-2-on (m^5K) (29)	38
4.1.8	Isolierung und Charakterisierung weiterer Substanzen aus der	

	3',5'-O-BisTBDMS-m ⁵ K-Synthese (45)	39
4.1.9	Synthese von N ¹ -(3',5'-O-Bis(triethylsilyl)-β-D-2'-desoxyribosyl)-4-(N',N'-dimethylhydrazinyl)-5-methylpyrimidin-2-on (61)	41
4.1.10	Synthese von N ¹ -(β-D-2'-desoxyribosyl)-4-(N',N'-dimethylhydrazinyl)-5-methylpyrimidin-2-on (62)	42
4.1.11	Synthese von N ¹ -(5'-(3-MethylcycloSal)-β-D-2'-desoxyribosyl)-5-methylpyrimidin-2-on-5'-O-monophosphat (63)	43
4.1.12	Synthese von 3-MethylcycloSal-2'-deoxy-2'-ara-fluoro-zebularinmonophosphat (65) und N ¹ -(5'-(3-MethylcycloSal)-β-D-2'-desoxyribosyl)-4-(N',N'-dimethylhydrazinyl)-5-methylpyrimidin-2-onmonophosphat (66)	45
4.1.13	Antivirale <i>in vitro</i> Aktivitäten von 3-MecycloSal-2'-Deoxy-2'-ara-fluoro-zebularin-MP (65) und 3-MecycloSal-4-DiMe-Hydrazinylthymidin-MP (66)	46
4.1.14	Fluoreszenzeigenschaften der drei Verbindungen: m ⁵ K (29), 3-MecycloSal-m ⁵ KMP (63) und 3',5'-O-BisTBDMS-4-Triazolylthymidin (41)	48
4.1.15	Synthese von N ¹ -(5'-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-β-D-2'-desoxyribosyl)-5-methylpyrimidin-2-on (46)	50
4.1.16	Synthese von N ¹ -(3'-O-(2-cyanoethoxy-N,N-diisopropylaminophosphino)-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-β-D-2'-desoxyribosyl)-5-methylpyrimidin-2-on (31)	50
4.1.17	Synthese von 4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion (PTAD) (37)	52
4.2	SYNTHESE DES R_P- UND S_P-5'-O-DMTr-PHTHALIDYLPHOSPHONAT-DIESTER-3'-O-AMIDITE (R_P)-30 UND (S_P)-30	53
4.2.1	Retrosynthetische Analyse und Synthesepanung	53
4.2.2	Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)thymidin (79)	57
4.2.3	Synthese von Triethylammonium-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)thymidyl-3'-H-phosphonat (81)	58
4.2.4	Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-(tert-butylidiphenylsilyl)thymidin (80)	59
4.2.5	Synthese von 3'-O-(tert-Butylidiphenylsilyl)thymidin (82)	60
4.2.6	Synthese von R _P /-und S _P -5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)thymidyl-[5'→3']-3'-O-(tert-butylidiphenylsilyl)thymidyl-	

	<i>H</i> -Phosphonate (R _P)- 83 und (S _P)- 83	60
4.2.7	Trennung der R _P - und S _P -3'-O-TBDMS-5'-O-DMTr- <i>H</i> -Phosphonatediester (R _P)- 83 und (S _P)- 83	61
4.2.8	Synthese von R _P - und S _P -5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidyl-[5'→3']-3'-O-(<i>tert</i> -butyldiphenylsilyl)thymidylphthalidylphosphonat (R _P)- 84 und (S _P)- 84 (α-C-Diastereomerenpaar)	62
4.2.9	Bestimmung der absoluten Konfiguration der α-C-Kohlenstoffatome der beiden R _P - und S _P -3'-O-TBDPS-5'-O-DMTr-Phthalidylphosphonatediester (R _P)- 84 und (S _P)- 84	65
4.2.10	Synthese von R _P - und S _P -5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidyl-[5'→3']-thymidylphthalidylphosphonat (R _P)- 85 und (S _P)- 85 (α-C-Diastereomerenpaare)	69
4.2.11	Synthese von R _P - und S _P -5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)thymidyl-[5'→3']-thymidylphthalidylphosphonat-3'-O-(diisopropyl-2-cyanoethyl)phosphoamidit (R _P)- 30 und (S _P)- 30 (α-C-Diastereomerenpaar)	72
4.2.12	Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)thymidyl-3'-O-(diisopropyl-2-cyanoethyl)phosphoamidit (87)	73
4.2.13	Synthese von (2-Cyanoethoxy)bis(<i>N,N</i> -diisopropylamino)phosphin (67)	74
4.3	SYNTHESE DER PHTHALIDYLPHOSPHONAT-MODIFIZIERTEN OLIGONUCLEOTIDE	74
4.3.1	Belegung des CPG-Trägers	74
4.3.2	Optimierung der Trägerbelegung	78
4.3.3	Messung der Trägerbelegung	80
4.3.4	Oligonucleotid-Festphasensynthese	80
4.3.5	Entschützung und Abspaltung der Phthalidylphosphonatmodifizierten Oligonucleotide von der Festphase	84
4.3.6	Isolierung der Oligonucleotide	87
4.3.7	Der Trityl-Assay	88
4.3.8	Die Bestimmung der optischen Dichte (O _D 260)	90
4.4	CHARAKTERISIERUNG DER OLIGONUCLEOTIDE MIT DER MALDI-TOF-SPEKTROMETRIE	90

4.4.1	Die MALDI-TOF-Spektrometrie	90
4.4.2	Präparation der MALDI-TOF-Proben	92
4.4.3	Optimierung der MALDI-TOF-Probenpräparation	93
4.4.4	Fragmentierung der Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide	100
4.5	UNTERSUCHUNG DER PHTHALIDYLPHOSPHONAT-MODIFIZIERTEN OLIGONUCLEOTIDE	103
4.5.1	Thermodynamische Daten der Phthalidylphosphonat- modifizierten Oligonucleotide	103
4.5.2	Tripelhelix vs. Doppelhelix	104
4.5.3	Bestimmung des T_m -Wert	106
4.5.4	Die Van't Hoff-Analyse	106
4.5.5	T_m -Werte der Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide	108
4.5.6	CD-Spektren der Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide	113
4.5.7	Exonucleasenstabilitäten der Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide	116
4.5.7.1	<i>Optimierung der Exonuclease-Assays</i>	117
4.5.7.2	<i>Stabilität der Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide gegenüber der 3'-Exonuclease</i>	121
4.5.7.3	<i>Stabilität der Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide gegenüber der 5'-Exonuclease</i>	122
4.5.8	Untersuchung der Demaskierung der Phthalidylphosphonat- modifizierten Oligonucleotide	123
4.6	SYNTHESE UND UNTERSUCHUNG VON m^5k-MODIFIZIERTEN OLIGONUCLEOTIDEN	124
5.	ZUSAMMENFASSUNG	128
6.	AUSBLICK	136
7.	EXPERIMENTELLER TEIL	139

7.1	ALLGEMEINES	139
7.1.1	Lösungsmittel	139
7.1.2	Verwendete Puffer und Reagenzien	140
7.1.2.1	<i>Kaltgesättigte methanolische Ammoniak-Lösung</i>	140
7.1.2.2	<i>Triethylammonium-Acetat-Puffer pH 6.8 (HPLC)</i>	140
7.1.2.3	<i>Phosphat-Puffer zur T_M-Wert Bestimmung pH 6.8</i>	140
7.1.2.4	<i>Phosphat-Puffer für den 5'-Exonuclease-Assay pH 6.8</i>	140
7.1.2.5	<i>TRIS-Puffer für den 3'-Exonuclease-Assay</i>	141
7.1.2.6	<i>NH₄-belegte und pH-neutrale Ionenaustauscher-Beans</i>	141
7.2	CHROMATOGRAPHIE	141
7.2.1	Dünnschichtchromatographie (DC)	141
7.2.2	Zirkulare, zentrifugale Dünnschichtchromatographie (CCTLC)	141
7.2.3	Präparative Säulenchromatographie (Flash-Chromatographie)	142
7.2.4	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	142
7.2.4.1	<i>HPLC-Methoden</i>	143
7.3	KERNRESONANZSPEKTROSKOPIE (NMR)	143
7.3.1	NMR-Nomenklatur	144
7.4	MALDI-TOF-SPEKTROMETIERE	144
7.4.1	MALDI-TOF-Probenpräparation	145
7.5	GERÄTE	145
7.5.1	UV-Spektrometrie	145
7.5.2	Gefriertrocknung	145
7.5.3	Thermomixer	145
7.5.4	DNA-Synthesizer	146
7.5.5	Speedvak (Vakuum-Probenkonzentrator)	146
7.5.6	CD-Spektrometrie	146
7.5.7	Infrarotspektrometrie	146
7.5.8	MALDI-TOF-Spektrometer	146
7.6	ENZYMATISCHE ARBEITSVORSCHRIFTEN	146
7.6.1	Hydrolysekinetik von <i>N</i> ¹ -(5'-(3-MethylcycloSal)- β -D-2'-desoxy-ribose)-5-methylpyrimidin-2-on X in Phosphatpuffer (pH 7.3)	146
7.6.2	3'-Exonuclease-Assay	147

7.6.3	5'-Exonuclease-Assay	148
7.6.4	Esterase-Assay	148
7.7	DARSTELLUNG VON m⁵K UND DESSEN DERIVATEN	149
7.7.1	Darstellung von 3',5'-O-Bis(triethylsilyl)thymidin 38	149
7.7.2	Darstellung von 3',5'-O-Bis(<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)thymidin 39	150
7.7.3	Darstellung von 3',5'-O-Bis(triethylsilyl)-4-(1,2,4-triazolyl)thymidin 40	152
7.7.4	Darstellung von 3',5'-O-Bis(<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)-4-(1,2,4-triazolyl)thymidin 41	153
7.7.5	Darstellung von 3',5'-O-Bis(triethylsilyl)-N ¹ -(β-D-2'-Desoxyribosyl)-5-methylpyrimidin-2-on 44	154
7.7.6	Darstellung von 3',5'-O-Bis(<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)-N ¹ -(β-D-2'-desoxyribosyl)-5-methylpyrimidin-2-on 45	156
7.7.7	Darstellung von N ¹ -(β-D-2'-Desoxyribosyl)-5-methylpyrimidin-2-on (m ⁵ K) 28	157
7.7.8	Darstellung von N ¹ -(5'-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-β-D-2'-desoxyribosyl)-5-methylpyrimidin-2-on 46	159
7.7.9	Darstellung von N ¹ -(3'-(R _P /S _P -(2-cyanoethoxy)-(N,N-diisopropylamino)phosphino)-5'-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-β-D-2'-desoxyribosyl)-5-methylpyrimidin-2-on 30	160
7.7.10	Darstellung von 3',5'-O-Bis(<i>tert</i> -butyldiethylsilyl)-N ¹ -(β-D-2'-desoxyribosyl)-4-(N',N'-dimethylhydrazinyl)-5-methylpyrimidin-2-on 43	161
7.7.11	N ¹ -(3',5'-O-Bis(triethylsilyl)-β-D-2'-desoxyribosyl)-4-(N',N'-dimethylhydrazinyl)-5-methylpyrimidin-2-on 42	163
7.7.12	Darstellung von N ¹ -(β-D-2'-desoxyribosyl)-4-(N',N'-dimethylhydrazinyl)-5-methylpyrimidin-2-on 62	164
7.7.13	Charakterisierung von von N,N'-Bis(3',5'-O-bis(<i>tert</i> -butyldimethylsilyl)-N ¹ -(β-D-2'-Desoxy-ribosyl)-5-methylpyrimidin-2-on-4-yl)hydrazin 60	165
7.8	DARSTELLUNG DER PHTHALIDYLPHOSPHONATAMIDITE	166
7.8.1	Darstellung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)thymidin 79	166
7.8.2	Darstellung von Triethylammonium-5'-O-(4,4'-dimethoxy-	

	triphenylmethyl)-thymidyl-3'- <i>H</i> -phosphonat 81	167
7.8.3	Darstellung von 5'- <i>O</i> -(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiphenylsilylthymidin 80	168
7.8.4	Darstellung von 3'- <i>O</i> - <i>tert</i> -Butyldiphenylsilylthymidin 82	169
7.8.5	Darstellung von 5'- <i>O</i> -(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)thymidyl-[5'→3']-3'- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiphenylsilylthymidyl- <i>H</i> -phosphonat 83	171
7.8.5.1	<i>Trennung der (R_P)-und (S_P)-Diastereomere von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)thymidyl-[5'→3']-3'-O-tert-butyl-diphenylsilylthymidyl-H-phosphonat (R_P)-83 und (S_P)-83</i>	171
7.8.5.2	<i>Charakterisierung von (R_P)-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)thymidyl-[5'→3']-3'-O-tert-butyl-diphenylsilyl-thymidyl-H-phosphonat (R_P)-83 (fast-Diastereomer)</i>	172
7.8.5.3	<i>Charakterisierung von (S_P)-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)thymidyl-[5'→3']-3'-O-tert-butyl-diphenylsilyl-thymidyl-H-phosphonat (S_P)-83 (slow-Diastereomer)</i>	173
7.8.6	Darstellung von (R _P)-5'- <i>O</i> -(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidyl-[5'→3']-3'- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiphenylsilylthymidylphthalidylphosphonat (R _P)- 84 (α -C-Diastereomerenpaar)	174
7.8.6.1	<i>Charakterisierung des R_P-α-C-R-Isomers</i>	174
7.8.6.2	<i>Charakterisierung des R_P-α-C-S-Isomers</i>	175
7.8.7	Darstellung von (S _P)-5'- <i>O</i> -(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidyl-[5'→3']-3'- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiphenylsilylthymidylphthalidylphosphonat (S _P)- 84 (α -C-Diastereomerenpaar)	176
7.8.7.1	<i>Charakterisierung des S_P-α-C-R-Isomers</i>	176
7.8.7.2	<i>Charakterisierung des S_P-α-C-S-Isomers</i>	177
7.8.8	Darstellung von (R _P)-5'- <i>O</i> -(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidyl-[5'→3']-thymidylphthalidylphosphonat (R _P)- 85 (α -C-Diastereomerenpaar)	178
7.8.9	Darstellung von (S _P)-5'- <i>O</i> -(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidyl-[5'→3']-thymidylphthalidylphosphonat (S _P)- 85 (α -C-Diastereomerenpaar)	189
7.8.10	Darstellung von (R _P)-5'- <i>O</i> -(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)thymidyl-[5'→3']-thymidylphthalidyl-3'- <i>O</i> -(diisopropyl- β -	

	cyanoethyl)phosphoamidit (R _P)- 29	181
7.8.11	Darstellung von (S _P)-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)thymidyl-[5'→3']-thymidylphthalidyl-3'-O-(diisopropyl-β-cyanoethyl)phosphoamidit (S _P)- 29	182
7.8.12	Darstellung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)thymidyl-3'-O-(diisopropyl-β-cyanoethyl)phosphoamidit 87	184
7.9	DARSTELLUNG DER 3-ME-CYCLOSAL-VERBINDUNGEN	185
7.9.1	Darstellung von 3-MethylcycloSal-2'-deoxy-2'- <i>ara</i> -fluoro-zebularinemonophosphat 65	185
7.9.2	Darstellung von N'-(5'-(3-MethylcycloSal)-β-D-2'-desoxyribosyl)-4-(N',N'-dimethylhydrazinyl)-5-methylpyrimidin-2-on-monophosphat 66	187
7.9.3	Darstellung von 3-MethylcycloSal-N'-(β-D-2'-desoxyribosyl)-5-methylpyrimidin-2-on 63	188
7.10	DARSTELLUNG EINZELNER REAGENZIEN	189
7.10.1	Darstellung von 4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion (PTAD) 37	189
7.10.2	Darstellung von Dichloro(2-cyanoethoxy)phosphin 88	190
7.10.3	Darstellung von 2-Cyanoethoxybis(N,N-diisopropylamino)phosphin 67	190
7.11	SYNTHESE DER OLIGONUCLEOTIDE	191
7.11.1	Synthetisierte Oligonucleotide	191
7.11.2	DNA-Syntheser-Protokoll	193
7.11.3	Belegung des Trägers	196
7.11.4	Messung der Trägerbelegung	196
7.11.5	Entschützung und Abspaltung des Oligonucleotids vom Träger	197
8.	ANHANG	198
8.1	Anhang A	198
8.2	Anhang B	199
9.	LITERATURVERZEICHNIS	201

10.	GEFAHRSTOFFE	217
11.	PUBLIKATIONSLISTE	219
12.	VERBINDUNGSLISTE	220

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Links: Watson-Crick- und Hoogsteen-Bindung; links 1 : A·TxT-Tripelhelix; links 2 : G·CxC ⁺ -Tripelhelix; rechts: Tertiärstruktur der DNA-Doppelhelix	2
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der Proteinbiosynthese	7
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der Wirkmechanismen von <i>antisense</i> -Oligonucleotiden	8
Abbildung 4:	Verschiedene Modifikationen von Oligonucleotiden	12
Abbildung 5:	<i>Pro-antisense</i> -Oligonucleotide-Konzept	14
Abbildung 6:	<i>Pro-antisense</i> -Oligonucleotid-Ansatz von IMBACH et al.	16
Abbildung 7:	<i>Pro-antisense</i> -Oligonucleotid-Ansatz von IYER et al.	16
Abbildung 8:	Abbauwege von α -Hydroxyphosphonaten unter basischen Bedingungen	17
Abbildung 9:	Abbauweg A : <i>H</i> -Phosphonat-Rückspaltung von α -Hydroxyphosphonat-5',5'-Dinucleotiden	19
Abbildung 10:	Abbauweg B : Phosphonat-Phosphat-Rückspaltung von α -Hydroxyphosphonat-5',5'-Dinucleotiden	19
Abbildung 11:	'Extrinsische' Fluoreszenzmarker; Carboxyfluorescein-markiertes dG 21 , dG mit N-Resorufin-4-carboxyl-piperidin-4-carbonsäure markiert 22	21
Abbildung 12:	'Intrinsische' Fluoreszenzmarker: 2-Aminpurin 23 , 7-Deazaisinosin 24 , Isoinosin 25 , Furo-[2,3-d]-pyrimidin 26 , ϵ -Adenosin 27 , 3- β -D-2'-Desoxyribofuranosyl-3,5-diaza-4-oxopheothiazin 28	22
Abbildung 13:	Das fluoreszente Thymidinanalogon <i>N</i> ¹ -(β -D-2'-Desoxyribosyl)-5-methylpyrimidin-2-on (<i>m</i> ⁵ K) 29	22
Abbildung 14:	Links: Phthalidylphosphonat-modifizierte Oligonucleotide ; rechts: 3'-O-DMTr-Phthalidylphosphonatdiester-5'-O-amidit 30	24
Abbildung 15:	Links: chimere (dT) ₁₅ -Oligomer mit <i>m</i> ⁵ K ODN- 10 ; rechts: 5'-O-DMTr-3'-O-Amidit- <i>m</i> ⁵ K 30	25
Abbildung 16:	Retrosynthetische Analyse des 5'-O-DMTr-3'-O-Amidit- <i>m</i> ⁵ K 31	26
Abbildung 17:	Syntheseplan des 5'-O-DMTr- <i>m</i> ⁵ K-3'-O-Amidits 31	28
Abbildung 18:	Synthese des 3',5'-O-BisTES-Thymidins 38	29

Abbildung 19:	Synthese des 3',5'-O-BisTBDMS-Thymidins 39	30
Abbildung 20:	Synthese des 3',5'-O-BisTES-4-Triazolylthymidins 40	31
Abbildung 21:	Mechanismus der Additions-/Eliminierungsreaktion von der Synthese des 3',5'-O-BisTES-4-Triazolylthymidins 40	31
Abbildung 22:	Synthese des 3',5'-O-BisTBDMS-4-Triazolylthymidins 41	32
Abbildung 23:	Synthese des 3',5'-O-BisTES-m ⁵ K 44 und des 3',5'-O- BisTBDMS-m ⁵ K 45	33
Abbildung 24:	Postulierter Reaktionsmechanismus der Oxidation mit PTAD	34
Abbildung 25:	Postsynthetische Substitution der Triazolylgruppe mit <i>N,N</i> -Dimethylhydrazin nach Y. Xu ^[86]	36
Abbildung 26:	Mögliche Methylierungen der Hydrazinylgruppe des 3',5'-O- BisTBDMS-4-Hydrazinylthymidins 43	37
Abbildung 27:	Entschützung der 3',5'-O-BisTES/TBDMS-geschützten m ⁵ K-Derivate 44 und 45	38
Abbildung 28:	Postulierte Dimere 59 und 60 des geschützten Hydrazin- 43 und des Iminoderivats 23	40
Abbildung 29:	MALDI-TOF-Spektrum des Dimers 59 von 3',5'-O- BisTBDMS-4-Hydrazinylthymidin 43	41
Abbildung 30:	Synthese des 3',5'-O-BisTES-4-Hydrazinylthymidins 61	41
Abbildung 31:	Synthese des 4-DiMe-Hydrazinylthymidins 62	42
Abbildung 32:	Synthese des 3-Me- <i>cycloSal</i> -m ⁵ KMP 63	43
Abbildung 33:	MALDI-TOF-Spektrum des 3-Me- <i>cycloSal</i> -m ⁵ KMP 63	44
Abbildung 34:	Synthese des 3-Me- <i>cycloSal</i> -Zebularine- MP 65 und des 3-Me- <i>cycloSal</i> -4-DiMe-HydrazinylTMP 66	45
Abbildung 35:	Schematische Darstellung des TK-Bypass-Konzepts	46
Abbildung 36:	UV-Spektren des m ⁵ K 29 , 3-Me <i>cycloSal</i> -m ⁵ KMP 63 und des 3',5'-O-BisTBDMS-4-Triazolylthymidins 41	48
Abbildung 37:	Fluoreszenzspektren des m ⁵ K 28 , 3-Me <i>cycloSal</i> -m ⁵ KMP 63 und des 3',5'-O-BisTBDMS-4-Triazolylthymidins 41	49
Abbildung 38:	Synthese des 3'-O-DMTr-m ⁵ K 46	50
Abbildung 39:	Synthese des 5'-O-DMTr-m ⁵ K-3'-O-Amidits 30	51
Abbildung 40:	Synthese des 4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dions (PTAD) 37	52
Abbildung 41:	Möglicher radikalischer Reaktionsmechanismus der PTAD 37	

	Synthese mit NBS 69	53
Abbildung 42:	Retrosynthese des Phthalidylphosphonatdiester- 3'-O-amidits 30	54
Abbildung 43:	Retrosynthese des <i>H</i> -Phosphonatdiesters 74	55
Abbildung 44:	Synthesepfad der R_P - und S_P -5'-O-DMTr-Phthalidyl- phosphonatdiester-3'-O-amidite (R_P)- 29 und (S_P)- 29	56
Abbildung 45:	Synthese des 5'-O-DMTr-Thymidins 79	58
Abbildung 46:	Synthese des 5'-O-DMTr-Thymidin-3'- <i>H</i> -Phosphonats 81	58
Abbildung 47:	Synthese des 3'-O-TBDPS-5'-O-DMTr-Thymidins 80	59
Abbildung 48:	Synthese des 3'-O-TBDPS-Thymidins 82	60
Abbildung 49:	Synthese des 3'-O-TBDPS-5'-O-DMTr- <i>H</i> -Phosphonatdiesters 83	61
Abbildung 50:	^1H -entkoppelte ^{31}P -NMR-Spektren des R_P - und des S_P -3'-O-TBDPS-5'-O-DMTr- <i>H</i> -Phosphonatdiesters (R_P)- 83 (links) und (S_P)- 83 (rechts)	62
Abbildung 51:	Synthese der R_P - und S_P -3'-O-TBDPS-5'-O-DMTr-Phthalidyl- phosphonatdiesters (R_P)- 84 und (S_P)- 84	63
Abbildung 52:	^1H -entkoppelte ^{31}P -NMR-Spektren der Trennung von (R_P)- 84 - α -C-slow und (R_P)- 84 - α -C-fast	64
Abbildung 53:	^1H -entkoppelte ^{31}P -NMR-Spektren der Trennung von (S_P)- 84 - α -C-slow und (S_P)- 84 - α -C-fast	64
Abbildung 54:	Erwartete NOE und TOCSY-Signale zwischen dem α -C-Proton (H_{Ph}) und den der Phthalidylprotonen ($H_{\text{Ph}}^{\text{cis}'}$, $H_{\text{Ph}}^{\text{cis}''}$, $H_{\text{Ph}}^{\text{trans}'}$, $H_{\text{Ph}}^{\text{trans}''}$)	65
Abbildung 55:	Ausschnitte aus den TOCSY- (links) und ROESY- (rechts) Spektren für die Zuordnung der Phthalidylprotonen	65
Abbildung 56:	Ausschnitt aus dem ROESY-Spektrum zur Bestimmung der Anordnung der Phthalidylprotonen gegenüber dem α -C-Proton	66
Abbildung 57:	Ausschnitte aus dem ROESY-Spektrum zur Bestimmung der Lage des α -C-Proton (links) und der relativen Orientierung der Phthalidylgruppe (rechts)	67
Abbildung 58:	NOE-Signale zwischen den Protonen der Phthalidylgruppe und den 2'-Deoxyribosegruppen in Abhängigkeit	

	der α -C-Konfiguration	68
Abbildung 59:	Entschützung des R _P - und des S _P -3'-O-TBDPS-5'-O-DMTr Phthalidylphosphonatdiesters (R _P)- 85 und (S _P)- 85	70
Abbildung 60:	Synthese des R _P - und des S _P -5'-O-Phthalidylphosphordiester-3'-O-amidits (R _P)- 30 und (S _P)- 30	72
Abbildung 61:	Synthese des 5'-O-DMTr-Thymidin-3'-O-amidits 88	73
Abbildung 62:	Synthese des 2-Cyanoethoxybis(<i>N,N</i> -diisopropylamino)-phosphins 67	74
Abbildung 63:	Struktur des LCAA-CPG-Trägers mit einem 3'-O-succinyl-gebundenem Nucleosid	75
Abbildung 64:	Aktivierung, Kupplung und Capping eines Nucleosids an den LCAA-CPG-Träger (nicht optimierte Reaktionsbedingungen)	76
Abbildung 65:	Schematische Darstellung der Oligonucleotid-Festphasensynthese	81
Abbildung 66:	Synthetisierte Phthalidylphosphonat-modifizierte Oligonucleotide ODN- 1 bis ODN- 9	83
Abbildung 67:	HPLC-Chromatogramm des unter feuchten Bedingungen abgespaltenen Oligonucleotids ODN- 1	85
Abbildung 68:	HPLC-Chromatogramm des unter trockenen Bedingungen Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotids ODN- 1	86
Abbildung 69:	Chromatogramm der Trennung des Rohprodukts von ODN- 3	87
Abbildung 70:	Analytisches HPLC-Chromatogramm nach zweifacher Trennung von ODN- 3	88
Abbildung 71:	UV/VIS-spektroskopische Verfolgung des Trityl-Assay einer (dT) ₁₅ -Oligomersynthese	89
Abbildung 72:	Schematische Darstellung des Bruker Refrlex III MALDI-TOF-Spektrometers	91
Abbildung 73:	THAP 100 , PA 101 , 3-HAP 102 , ATT 103 , (+)-DAT 104	93
Abbildung 74:	Flowchart zur Messreihe der sauren Matrices THAP 100 , PA 101 und 3-HPA 102	94
Abbildung 75:	MALDI-TOF-Spektrum des (dT) ₁₅ -Oligomers unter den in Abb. 74 hervorgehobenen Bedingungen	94
Abbildung 76:	MALDI-TOF-Spektrum des (dT) ₁₅ -Oligomers, Versuch E	96
Abbildung 77:	MALDI-TOF-Spektrum des (dT) ₁₅ -Oligomers, Versuch F	97

Abbildung 78:	MALDI-TOF-Spektrum des (dT) ₁₅ -Oligomers, Versuch C	97
Abbildung 79:	MALDI-TOF-Spektrum des ODN-1 (ATT und Beans)	99
Abbildung 80:	Die zwei möglichen Fragmentierungsrichtungen der H-Phosphonat-Rückspaltung	100
Abbildung 81:	MALDI-TOF-Spektrum und HPLC-Chromatogramm der beiden Abbauprodukte des ODN-2	101
Abbildung 82:	MALDI-TOF-Spektrum und HPLC-Chromatogramm des ODN-2, (dT) ₁₅ -Fraktion	102
Abbildung 83:	MALDI-TOF-Spektrum und HPLC-Chromatogramm des ODN-2, (dT) ₁₄ -Fraktion	102
Abbildung 84:	MALDI-TOF-Spektrum des ODN-3, (dT) ₁₃ -Fraktion	103
Abbildung 85:	Hoogsteen und reverse-Hoogsteen Tripelhelices, T•AxT 109 ; T•AxT 110 ; A•AxT 111	105
Abbildung 86:	Van't Hoff-Analyse; A) Schmelzkurve; B) α -Kurve; C) Van't Hoff-Graph	107
Abbildung 87:	Darstellung des Zip-Modells	11
Abbildung 88:	Schematische Darstellung der CD-Spektren der A-, B- und C(Z)-Form der DNA	113
Abbildung 89:	CD-Spektren des (dT) ₁₅ /(dA) ₁₅ -Hybrids (20 °C bis 60 °C)	114
Abbildung 90:	CD-Spektren des (dT) ₁₅ /(dA) ₁₅ ⁻ , ODN-4/(dA) ₁₅ ⁻ und des ODN-7/(dA) ₁₅ -Hybrids bei 10°C	115
Abbildung 91:	CD-Spektren des ODN-7/(dA) ₁₅ -Hybrids (blau) und des ODN-7/(rA) ₁₅ -Hybrids (rot) bei 10°C	115
Abbildung 92:	HPLC-Chromatogramme des 3'-Exonuclease-Assays des (dT) ₁₅ -Oligomers (0.01 u CSP)	118
Abbildung 93:	HPLC-Chromatogramme des 3'-Exonuclease-Assays des (dT) ₁₅ -Oligomers (0.05 u CSP)	118
Abbildung 94:	HPLC-Chromatogramme des 3'-Exonuclease-Assays des (dT) ₁₅ -Oligomers (0.1 u CSP)	119
Abbildung 95:	HPLC-Chromatogramme des 5'-Exonuclease-Assays eines (dT) ₁₅ -Oligomers (0.1 u SVP)	120
Abbildung 96:	HPLC-Chromatogramme des 3'-Exonuclease-Assays von ODN-1	121
Abbildung 97:	HPLC-Chromatogramme des 3'-Exonuclease-Assays	

	von ODN-4	122
Abbildung 98:	HPLC-Chromatogramme des 5'-Exonuclease-Assays von ODN-2	122
Abbildung 99:	HPLC-Chromatogramm des (R _P /S _P)-3',5'-Diphthalidylphosphonat-modifizierte Oligonucleotids ODN-3, links: Phosphatpuffer PLE (pH 7.3); rechts: Phosphatpuffer pH 7.3	123
Abbildung 100:	m ⁵ K-modifiziertes Oligonucleotid ODN-10	124
Abbildung 101:	HPLC-Chromatogramm des ODN-10	125
Abbildung 102:	Wasserstoffbücken der Basenpaare dT/dA 112 und m ₅ k/dA 113 und 114 „wobbel base pair“	126
Abbildung 103:	Synthetisierte chimere (R _P /S _P)-Phthalidylphosphonat- und m ⁵ K-modifizierte Oligonucleotide ODN-11, ODN-12 und ODN-13	126
Abbildung 104:	Synthese der (R _P)- und (S _P)-5'-O-DMTr-Phthalidylphosphonatediester-3'-O-amidite (R _P)- 29 und (S _P)- 29	129
Abbildung 105:	Synthetisierte Phthalidylphosphonat-modifizierte Oligonucleotide	131
Abbildung 106:	Synthese des 5'-O-DMTr-m ⁵ K-3'-O-Amidits 30	133
Abbildung 107:	ODN-10 mit dem fluoreszenten m ⁵ K 29	134
Abbildung 108:	Synthese der drei <i>cyclo</i> Sal-Monophosphattriester 63 , 65 und 66	135
Abbildung 109:	NPEOC-Imidazoliumchlorid 114 , N-(6-Nitroveratryloxy-carbonyl)-cytosin (NVOC) 115 , N-(2,2'-bis(2-nitrophenyl)-ethoxycarbonyl)adenosin (diNPEOC) 116	137
Abbildung 110:	Verschiedene <i>antisense</i> -Sequenzen	137
Abbildung 111:	Bezeichnung der Wasserstoff- und Kohlenstoffatome	144
Abbildung 112:	Erwartete NOE-Signale zwischen dem Methylphosphonat und der Ribosegruppe in Abhängigkeit der P-Konfiguration	198
Abbildung 113:	Ausschnitt aus dem ROE-Spektrum des (R _P)-Methylphosphonatediesters „fast“-Isomer	198
Abbildung 114:	Ausschnitt aus dem ROE-Spektrum des (S _P)-Methylphosphonatediesters „slow“-Isomer	199
Abbildung 115:	HPLC-Diagramme der 5'-O-DMTr-3'-O-TBDPS-Phthalidyl-	

	phosphonate (R _P)- 84 (rechts) und (S _P)- 84 (links)	199
Abbildung 116:	HPLC-Diagramme der 5'-O-DMTr-Phthalidylphosphonatdiester (R _P)- 85 (rechts) und (S _P)- 85 (links)	200
Tabelle 1:	Verschiedene <i>antisense</i> -Oligonucleotide, die zugelassen sind bzw. zurzeit klinischen Studien unterzogen werden.	4
Tabelle 2:	Abhängigkeit des Abbauweges vom Substituentenmuster des Aromaten	18
Tabelle 3:	Variationen der Reaktionsbedingungen der Oxidation mit PTAD	35
Tabelle 4:	Elementaranalyse des Dimers von 3',5'-O-BisTBDMS-4-Hydrazinylthymidin 43	40
Tabelle 5:	Varianten zur Deblockierung von 3',5'-BisTES-4-DiMe-Hydrazinylthymidins 61	43
Tabelle 6:	Anti-HIV-Aktivitäten und Zytotoxizitäten der beiden 3-Me- <i>cycloSal</i> -Verbindungen 65 und 66	47
Tabelle 7:	Relative Retention, absolute Konfiguration und der ³¹ P-NMR-Verschiebung der vier Diastereomere des Phthalidylphosphonats 84	69
Tabelle 8:	Optimierung der Entschützung der 3'-O-TBDMS-5'-O-DMTr-Phthalidylphosphonatdiester (R _P)- 85 und (S _P)- 85	70
Tabelle 9:	Variation der Reaktionsbedingungen für die Optimierung der Trägerbelegung	78
Tabelle 10:	Optimierung des Verhältnisses von THAP 100 und DAT 104	96
Tabelle 11:	Massen der Natrium- und Kaliumaddukte von ODN-1	99
Tabelle 12:	T _m -Werte und thermodynamische Daten der Oligonucleotide ODN-1 bis ODN-9 mit (dA) ₁₅ hybridisiert	109
Tabelle 13:	Berechnete und gemessene T _m -Werte des ODN-1/(dA) ₁₅ -, ODN-2/(dA) ₁₅ - und des ODN-3/(dA) ₁₅ -Hybrids	109
Tabelle 14:	T _m -Werte und thermodynamische Daten der Oligonucleotide ODN-1 bis ODN-9 mit (dA) ₁₅ hybridisiert	112
Tabelle 15:	Berechnete und gemessene T _m -Werte des ODN-1/(rA) ₁₅ -, ODN-2/(rA) ₁₅ - und des ODN-3/(rA) ₁₅ -Hybrids	112
Tabelle 16:	Bedingungen der Optimierung des CSP-Assays an (dT) ₁₅	117

Gleichung 1:	T_m -Wert-Näherung für Oligonucleotide zwischen 12 und 20 Basenpaaren (nach WALLACE ^[28])	10
Gleichung 2:	Berechnung der Trägerbelegung	80
Gleichung 3:	Berechnung der molaren Menge eines Oligonucleotids aus Der optischen Dichte	90
Gleichung 4:	Bestimmung des Dissoziationsgrads $\alpha(T)$	107
Gleichung 5:	Bestimmung der Gleichgewichtskonstante $K(T)$	108

1. EINLEITUNG

Bei vielen Krankheiten, zum Beispiel bei viralen oder bakteriellen Infektionen, Autoimmunerkrankungen, entzündlichen Prozessen oder Krebs, sind fehlerhafte, beziehungsweise körperfremde Proteine grundlegend beteiligt.

Viren benutzen den Syntheseapparat der Wirtszelle zu ihrer Reproduktion. Infolge der Blockierung des zelleigenen Stoffwechsels und der anschließenden Freisetzung der Viren tritt der Zelltod ein. Durch Beeinträchtigung der in diese Vorgänge involvierten Proteine kann letztlich die Vermehrung der Viren unterbunden und somit eine mögliche Heilung der Infektion erreicht werden.

Bei Krebserkrankungen spielen Onkogene eine wichtige Rolle. Diese Proteine sind an dem Wachstum von Tumoren, deren Versorgung mit Blutgefäßen und an der Migration von metastasenbildenden Zellen beteiligt. In gesunden Zellen liegen diese Proteine, welche der Steuerung des regulären Zellwachstums und der normalen Migration dienen, in ihrer natürlichen Form als Protoonkogene vor. Durch Mutation oder Überexpression bilden sich aus ihnen die Onkogene mit ihren für den Krebs essenziellen Eigenschaften. Hier könnte durch Blockierung der Onkogensynthese eine Heilung ermöglicht werden.

Durch die intensive Erforschung der intrazellulären Vorgänge in den letzten Jahrzehnten konnten zunehmend die molekularchemischen Grundlagen des Lebens verstanden werden. Einer der wichtigsten Schritte hierzu wurde durch die Entdeckung der Desoxyribonucleinsäure (DNA) als vermutete informationsübertragende Substanz in Bakterien durch O. T. AVERY 1944 getätigt.^{[1]-[3]} Weitere Arbeiten von A. E. MIRSKI, H. RIS und E. CHARGAFF^{[4],[5]} über die chemische Zusammensetzung der DNA sowie die Röntgenstrukturuntersuchungen von R. E. FRANKLIN^[6] und M. H. WILKINS^[7] führten schließlich 1953 zu der von J. WATSON und F. CRICK^[8] postulierten dreidimensionalen Doppelhelix-Struktur der DNA (Abb.1, rechts, S.2). Aus der Struktur der DNA-Doppelhelix konnte nun Schritt für Schritt direkt die Funktionsweise der Informationsübertragung abgeleitet werden.

Die Primärstruktur der DNA lässt sich durch den Aufbau aus drei Grundeinheiten beschreiben: Das linear aufgebaute Rückgrat der DNA besteht aus **2'-Desoxyribosezuckern**, welche über **Phosphatgruppen** verbrückt sind. An den anomeren Zentren der Desoxyribosen sind die vier **Nucleinsäuren** Adenin, Guanin,

Cytosin und Thymin gebunden, in deren unterschiedlicher Abfolge jeweils die genetische Information liegt. Durch gegenläufige Aneinanderlagerung zweier komplementärer Einzelstränge über die Wasserstoffbrücken der Watson-Crick-Bindung (Abb.1, links **A**) bildet sich die DNA-Doppelhelix (Abb.1, rechts).

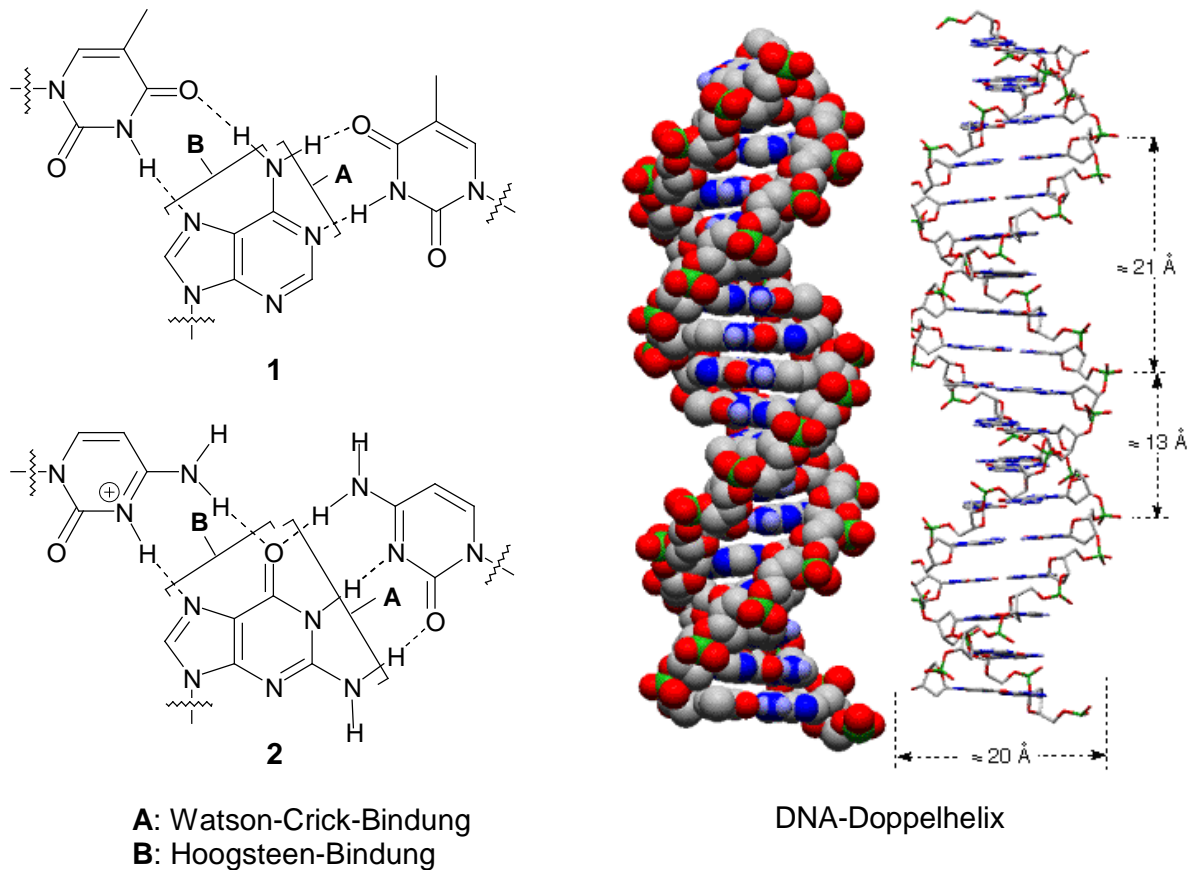


Abbildung 1: Links: Watson-Crick- und Hoogsteen-Bindung, **1**: A-TxT-Tripelhelix, **2**: G-CxC⁺-Tripelhelix; rechts: Tertiärstruktur der DNA-Doppelhelix

Zur Weitergabe der Information für die Proteinbiosynthese werden im Zellkern von Abschnitten verschiedener DNA-Einzelstränge Kopien, die *messenger*-RNAs (*mRNA*), angefertigt (Transkription). Diese Kopien dienen den ribosomalen Komplexen als Vorlage zur Synthese der entsprechenden Proteine (Translation). Dabei wird jede Aminosäure durch drei aufeinanderfolgende Nucleotide codiert. Die Transkription ermöglicht zum einen die Auslagerung der Proteinsynthese aus dem Zellkern. Zum anderen erhöht sie deren Effektivität, da zahlreiche identische *mRNAs* hergestellt werden, wobei jede einzelne als Vorlage vieler Proteine dient.

Die Wirkung der meisten herkömmlichen Medikamente beruht auf der direkten Wechselwirkung mit Proteinen. Durch unspezifische Wechselwirkungen und der

benötigten relativ hohen Wirkstoffkonzentration besteht die Gefahr unerwünschter Nebenwirkungen. Ein Eingreifen in die Proteinsynthese auf der Ebene der Nucleinsäuren würde hingegen viele Vorteile bieten. Durch das Verständnis der Informationsweitergabe konnten hierzu verschiedene Konzepte erarbeitet werden.

In der Antigen-therapie wird versucht, durch Einlagerung eines dritten DNA-Strangs in die große Furche der Doppelhelix eine Tripelhelix^{[9]-[11]} zu bilden (Hoogsteen-Bindung, Abb.1, S.2, links **B**), um die notwendige Entwindung der DNA-Doppelhelix zu verhindern, wodurch die Transkription unterbunden würde.

Ein Ansatz, welcher in die Translation eingreift, wurde 1978 von P. C. ZAMECNIK und M. L. STEPHENSON^[12] entwickelt und untersucht. Diesem *antisense*-Konzept liegt die Idee zugrunde, die Proteinbiosynthese durch ein der entsprechenden *mRNA* komplementäres *antisense*-Oligonucleotid zu inhibieren. Die Möglichkeit eines rationalen Wirkstoffdesigns und dem damit verbundenen gezielten Eingriff in die Proteinsynthese bietet viele Vorteile gegenüber der herkömmlichen Wirkstoffentwicklung.

Das *antisense*-Konzept ist ein neuer vielversprechender Ansatz zur Bekämpfung einer Vielzahl von Krankheiten. Sowohl virale als auch genetisch verursachte Erkrankungen werden durch diesen Ansatz der Krankheitsbekämpfung abgedeckt. Dank intensiver Forschung befinden sich viele *antisense*-Therapeutika in der klinischen Untersuchung (Tab.1, S.4).^{[13],[14]} Formivirsen, seit 1999 in Europa zugelassen und schon seit 1998 in den USA erhältlich, ist der erste *antisense*-Wirkstoff, der therapeutisch eingesetzt wurde. Dieses aus 21 Nucleotiden bestehende Phosphorothioat-modifizierte Oligonucleotid weist eine hohe Wirksamkeit gegen das Cytomegalie Virus (CMV) auf.^{[15],[16]} Nachteilig jedoch ist die sehr unangenehme für die Anwendung notwendige Injizierung des *antisense*-Oligonucleotids in den Glaskörper des Auges. Als zweites zugelassenes Präparat steht seit Oktober 2006 das von Genta entwickelte Genasence[®] (Oblimersen Natrium) als Therapeutikum gegen lymphotische Leukämie zur Verfügung. Auch werden zurzeit mehrere klinische Kombinationsstudien mit Oblimersen durchgeführt. Zu weiteren Thiophosphat-modifizierten Oligonucleotiden, die in der dritten klinischen Phase sind, zählt sowohl das von ISIS entwickelte Therapeutikum Alicaforfen[®] (ISIS 2302), welches das bei Morbus Crohn vermehrt auftretende Protein ICAM-1 unterdrückt, als auch das in Zusammenarbeit mit Lilly entwickelte Affinitac[®] (ISIS 3521), das gegen Lungenkrebs eingesetzt werden soll.

Status	Zielstruktur	Indikation	Name	Firmen
zugelassen	CMV-Protein	Retinitis Cytomegalievirus	Vitravene® Formivirsen	ISIS, Novatis
	<i>bcl-2</i>	lymphotische Leukämie	Genasence® Oblimersen	Genta
Phase II	<i>c-raf-1</i>	Ovarian Cancer	ISIS 5132	ISIS
	H-ras	Pankreaskrebs	ISIS 2503	ISIS
	<i>Cmy-b</i>	Myeloidleukämie	G-4460	Genta
	<i>R2-RNA</i>	Metastatic Renal Cell Carcinoma	GTI-2040	Lorus Therapeutics
	<i>R1-RNA</i>	kidney and breast cancers	GTI-2501	Lorus Therapeutics
	Adenosin A1	Asthma	EPI 2010	EpiGenesis
	<i>TNF-α</i>	Arthritis	ISIS 104838	ISIS
	<i>apoB-100</i>	cardiovascular disease	ISIS 301012	ISIS
	XIAP	Metastasen	AEG-35156	Aegera Therapeutics
	<i>bcl-2</i>	lymphotische Leukämie	SPC-2996	Santaris Pharma
	Clusterin	Prostatakrebs	OGX-011	University of British Columbia
	MYC-Protein	Restenosis	Resten-MP	AVI BioPharma
HCV-Protease	Hepatitis C	AVI-4065	AVI BioPharma	
Phase III	Protein Kinase C-α (PKC- α)	Lungenkrebs	ISIS 3521, Affinitac®	ISIS, Lilly
	ICAM-1	ulcerative colitis Crohn's disease	ISIS 2302, Alicaforsen®	ISIS

Tabelle 1: *Verschiedene antisense-Oligonucleotide, die zugelassen sind bzw. zurzeit klinischen Studien unterzogen werden.*

Neben den Thiophosphat-modifizierten *antisense*-Oligonucleotiden der ersten Generation sind auch die von C. R. NOE erforschten^[17] *antisense*-Oligonucleotide der

zweiten Generation in klinischer Untersuchung, welche - von der RNA abgeleitet - an der 2'-O-Position der Riboseeinheit O-Alkyl oder O-Aminoalkyl substituier sind. Hierzu zählt z.B. das in Zusammenarbeit von Aegera Therapeutics und Hybridon Inc. entwickelte AEG-35156/GEM-640, welches *in vivo* das XIA-Protein (XIAP: X-Chromosome-linked Inhibitor of Apoptosis Protein) zu über 80 % unterdrücken kann und die Sensitivität gegenüber den Chemotherapeutika Arabinosylcytosin (ara-C) und Idarubicin deutlich erhöht.

Komplexere Modifikationen des Ribosezuckers wurden mit dem von Santaris Pharma gegen lymphotische Leukämie entwickelten *locked*-Oligonucleotid (LNA) SPC-2996 verwirklicht. Diese LNA entstammt einer kleinen der Genasense[®]-Sequenz zugrundeliegenden kombinatorischen Bibliothek, und ist seit Juni 2005 in der zweiten klinischen Phase.

Bemerkenswert ist der Einsatz von *antisense*-Oligonucleotiden der dritten Generation, bei denen positiv geladene Gruppen in das DNA-Rückgrat eingebracht werden. Dazu zählen die beiden Phosphorodiamidat-Morpholin-modifizierten *antisense*-Oligonucleotide (PMO) der Firma AVI BioPharma, Resten-MP gegen Restenosis und AVI-4065 gegen Hepatitis C, welche in der zweiten klinischen Phase sind.

2. KENNTNISSTAND

Die grundlegenden Arbeiten zur Entwicklung des *antisense*-Konzepts wurden 1978 von P. C. ZAMECNIK und M. L. STEPHENSON gelegt, indem sie das Wachstum des Rous Sarcoma Virus durch ein der viralen RNA komplementäres DNA-13-mer-Oligonukleotid unterdrücken konnten.^[12] Schon ein Jahr zuvor konnte M. B. PATERSON et al. in einem zellfreien System die Expression einer *mRNA* durch einen komplementären DNA-Einzelstrang unterbinden.^[18] Diesen Arbeiten vorausgehend wurde schon 1969 von K. BOVRE und W. SZYBALSKI die Transkription beider komplementären Stränge einer bestimmten Region bei dem Lambda Phagen beobachtet.^[19] Dieser Befund konnte jedoch erst 1983 korrekt gedeutet werden, als R. W. SIMMONS und N. KLECKNER in Prokaryoten ein RNA-Fragment entdeckten, das komplementär zur ribosomalen Bindungsstelle des Tetracyclin-Resistenzgens (IS10) war und dessen Expression unterdrücken konnte.^[20]

2.1 DAS ANTISENSE-KONZEPT

Dem *antisense*-Konzept liegt die Idee zugrunde, dass durch Hybridisierung einer bestimmten RNA "sense-Strang" mit einem ihr komplementären künstlichen Oligonucleotid "antisense-Strang" die Expression des kodierten Protein unterdrückt werden kann. Deshalb sei noch einmal kurz auf die eukaryotische Proteinbiosynthese genauer eingegangen.

Im ersten Schritt der eukaryotischen Proteinbiosynthese wird ausgehend von der Promotorsequenz ein zu dem strukturiert kodierendes Gen komplementäres Primärtranskript (*hnRNA* = *heterogeneous-nuclear-RNA* bzw. *pre-mRNA*) durch die RNA-Polymerase II gebildet (Transkription) (Abb.2, S.7). Diesem Primärtranskript wird anschließend am 5'-Ende ein 5'-7-Methylguanylattriphosphat angehängt (5'-Capping), welches einerseits Schutz vor Nucleasen und Phosphatasen bietet und andererseits wichtig für den Transport der reifen *mRNA* in das Cytoplasma ist. Das 3'-Ende wird einer Polyadenylierung unterzogen, deren genauer Nutzen zurzeit noch nicht bekannt ist. Im folgenden Reifungsprozess der *pre-mRNA* werden durch das Spleißen nichtkodierende Abschnitte (Introns) herausgeschnitten und die verbleibenden kodierenden Abschnitte (Extrons) zusammengesetzt. Die nun gereifte

*m*RNA wird aus dem Zellkern in das Cytoplasma transportiert (Translokation). Zur Proteinsynthese (Translation) bildet sich dort aus der *m*RNA, der 60 S- und der 40 S-Untereinheit der ribosomale Komplex, welcher zumeist an das endoplasmatische Retikulum gebunden ist. Die benötigten Aminosäuren werden mit Hilfe von spezifischen *t*RNAs auf das sich bildende Protein übertragen.

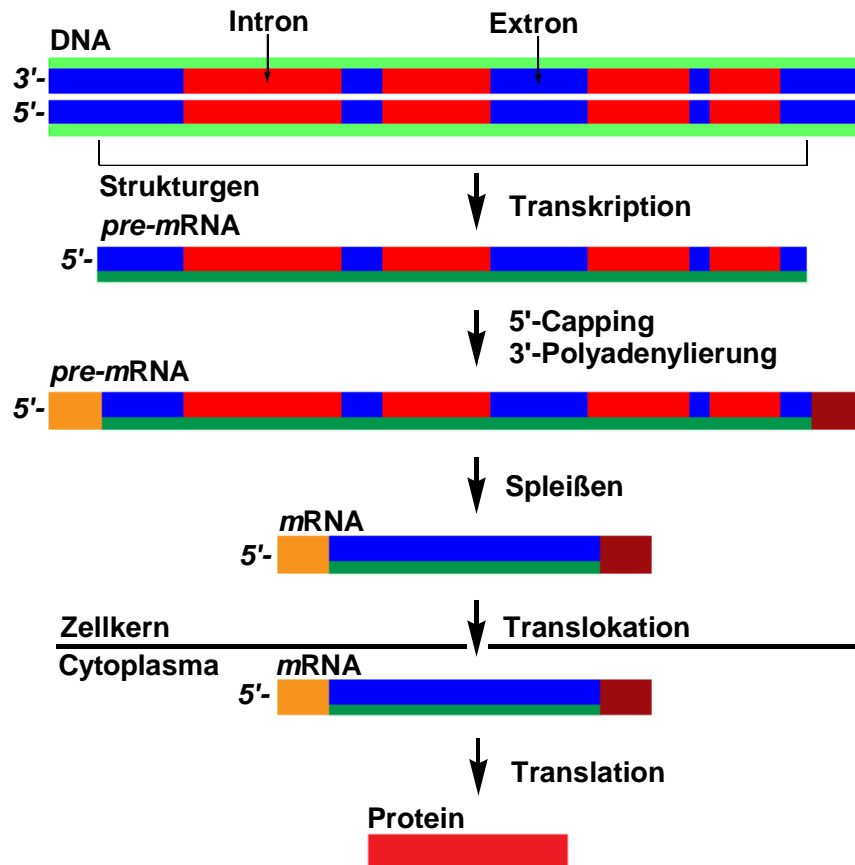


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Proteinbiosynthese

Im Prinzip bieten sich bei jedem der in Abb.2 schematisch gezeigten Schritte der Biosynthese von Proteinen sowohl innerhalb als auch außerhalb des Zellkerns Angriffspunkte für *antisense*-Oligonucleotide. Strategien wie z.B. Gentherapie oder Tripelhelixbildung, die die Proteinsynthese mittels Unterdrückung der Transkription zu verhindern suchen, gehören definitionsgemäß nicht zu dem eigentlichen *antisense*-Konzept, da hierbei keine RNA involviert ist. Sehr wenige Arbeiten beschäftigen sich mit dem Eingriff in die Proteinbiosynthese auf der Stufe des 5'-Cappings bzw. der Polyadenylierung. G. HOINKINS et al. konnten zeigen, dass ein *antisense*-Oligonucleotid mit einer Zielsequenz nahe des 5'-Endes die Synthese des SV40 T-Antigens unterdrücken kann.^[21] Als Wirkmechanismus wird angenommen,

dass die für das 5'-Capping notwendige Bindung von Proteinen an die *pre-mRNA* verhindert wird.

Da das Spleißen der *pre-mRNA* sequenzspezifisch ist, könnte hier durch geeignete *antisense*-Oligonucleotide die Bindung von notwendigen Faktoren an die Spleiß-Junktion unterdrückt werden.^[22]

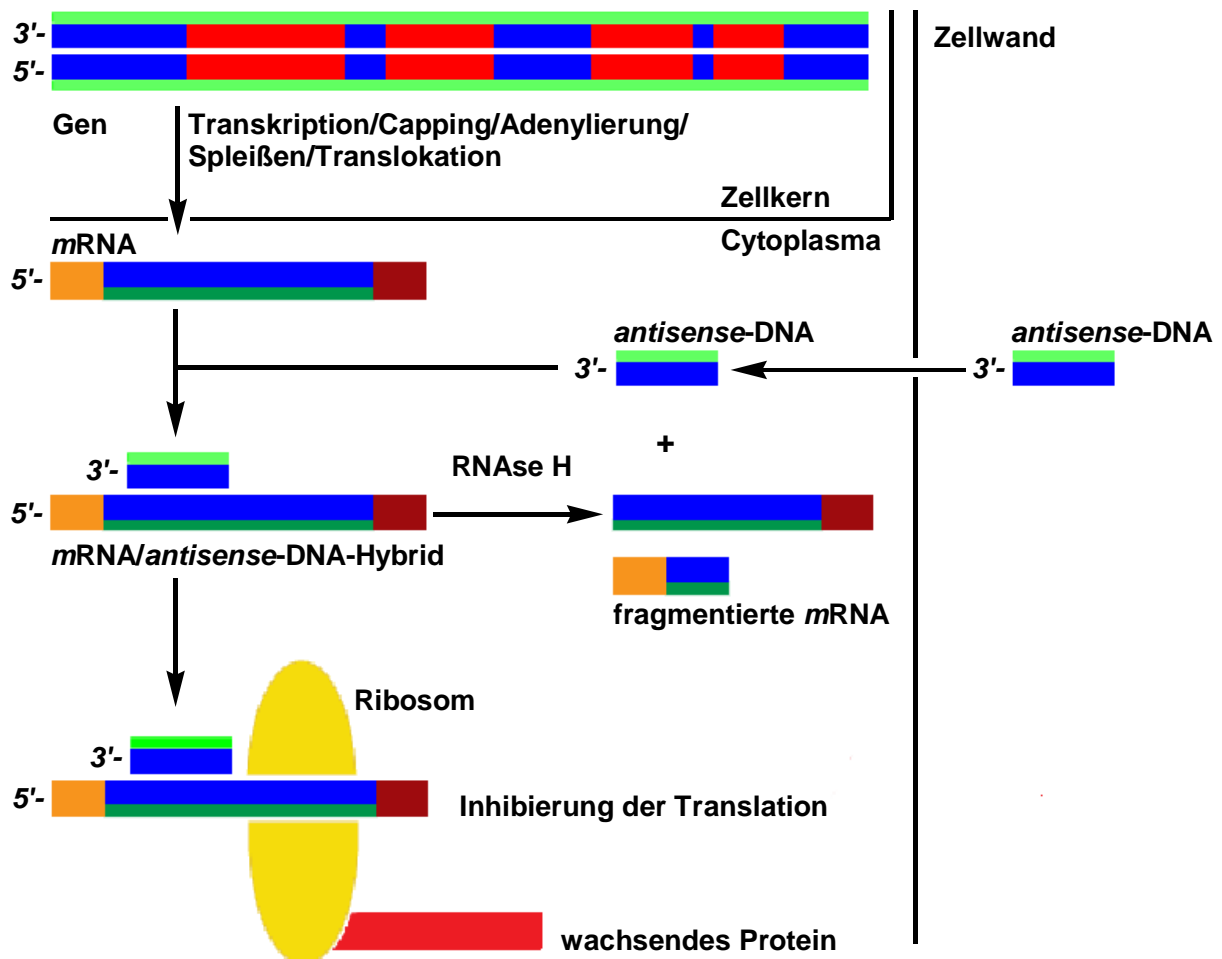


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Wirkmechanismen von *antisense*-Oligonucleotiden

Strategien, die auf der Stufe der *pre-mRNA* versuchen, in die Proteinsynthese einzugreifen, haben gegenüber den im Folgenden beschriebenen Strategien den Nachteil, dass die verwendeten *antisense*-Oligonucleotide nicht nur die Zellwand sondern auch die Kernmembran passieren müssen, um ihre Wirkorte zu erreichen. Durch *antisense*-Oligonucleotide, die komplementär zur Initiierungssequenz der Translation sind, lässt sich die Proteinsynthese durch sterische Behinderung des ribosomalen Komplexes verhindern (Abb.3). Mit dieser Strategie konnte sowohl die

Vermehrung des HI- und des VS-Virus (Vesicular Stomatitis Virus)^{[23],[24]} als auch die Überexpression des *N-myc*-Oncogens^[25] unterdrückt werden. Ein weiterer Angriffspunkt ist der Stem-Loop, welcher der Erkennung zahlreicher Proteine und Ribonucleoproteine dient. So konnte mit einem *antisense*-Oligonucleotid, welches die dreidimensionale Struktur des *TAR*-Elements von dem HI-Virus zerstört, die *TAR*-gesteuerte Synthese eines Reportergens unterdrückt werden.^[26]

Neben den oben erwähnten Mechanismen ist die Aktivierung des Enzyms RNase H ein vielversprechender Ansatz zur *antisense*-Oligonucleotid-Therapie (Abb.3, S.8). Das Enzym RNase H erkennt selektiv RNA/DNA-Hybride und spaltet eine oder mehrere Phosphatdiesterbindungen der *sense*-RNA, während die *antisense*-DNA intakt bleibt. Da die Hydrolyse der *sense*-RNA innerhalb des RNA/DNA-Hybrids erfolgt, kann das *antisense*-Oligonucleotid von den RNA-Fragmenten dissoziieren und mit einem intakten *mRNA*-Strang erneut hybridisieren. Durch die Aktivierung der RNase H ist ein *antisense*-Oligonucleotid also befähigt, eine große Anzahl von *mRNA*-Molekülen auszuschalten. Dieser Mechanismus trägt erheblich zur hohen Effizienz von *antisense*-Therapien bei.

Im Gegensatz zu herkömmlichen Medikamenten, die direkt auf Proteine wirken, ist bei *antisense*-Oligonucleotiden die Suche nach einer spezifischen Leitstruktur durch die gegebene Sequenz der Ziel-RNA wesentlich vereinfacht. Hier ist zu beachten, dass eine ausreichende Sequenzspezifität mit genügender Bindungsenthalpie mit gleichzeitiger sterischer Zugänglichkeit der Zielsequenz verbunden wird. Auch müssen Sequenzen vermieden werden, die in der Lage sind, unspezifische Wechselwirkungen eingehen zu können. Hierzu sei, die Fähigkeit von vier aufeinanderfolgenden Guanosinbasen (Guanosin-Quadrupeln), I-Motive auszubilden,^[27] und die von (dC)p(dG)-reichen Sequenzen, Immunantworten zu stimulieren,^[28] erwähnt.

Die optimale Länge eines *antisense*-Oligonucleotids ergibt sich aus verschiedenen Anforderungen. Bezüglich der Sequenzspezifität ist eine Länge von ca. 15 bis 20 Basen optimal, da eine beliebige Sequenz von 17 Basen statistisch nur einmal im menschlichen Genom vorkommt. Bei längeren Sequenzen nimmt zwar die statistische Spezifität zu, jedoch übt der verringerte Einfluss von Basenfehlpaarungen auf die Bindungsenthalpie einen gegenteiligen Effekt aus.

Die Bindungsaffinität zwischen dem *antisense*-Oligonucleotid und der Zielsequenz wird durch den T_m -Wert "melting point" (siehe 4.5.1, S.103) angegeben. Eine erste

Näherung des T_m -Werts für Oligonucleotide mit einer Länge zwischen 12 und 20 Basen kann mit der Formel von R. B. WALLACE berechnet werden (Gleichung 1).^[29] Demnach sollte ein Oligonucleotid mindestens 13 Basen lang sein, um einen T_m -Wert über 37 °C zu haben.

$$T_m = \text{Anz. der Basenp. (dA|dT)} \cdot (2^\circ\text{C}) + \text{Anz. der Basenp. (dG|dC)} \cdot (4^\circ\text{C})$$

Gleichung 1: T_m -Wert-Näherung für Oligonucleotide zwischen 12 und 20 Basenpaaren (nach R. B. WALLACE^[29])

Bedingt durch komplexe Sekundär- und Tertiärstrukturen, welche von großen RNA-Molekülen ausgebildet werden, ist aus sterischen Gründen nicht jede erdenkliche Zielsequenz durch *antisense*-Oligonucleotide zugänglich. Andererseits wird durch die Komplexität der Struktur die Sequenzspezifität erhöht. Zwar sind Sekundärstrukturen heutzutage durch computergestützte Rechnungen gut bestimmbar, jedoch ist die Berechnung von Tertiärstrukturen noch nicht ausreichend entwickelt, um genaue Vorhersagen treffen zu können.^{[30],[31]} Hier bieten kombinatorische Oligonucleotidbibliotheken, die auf Aktivität von RNase H getestet werden, einen geeigneten Ansatz, um sterisch zugängliche Zielregionen aufzufinden.^{[32],[33]}

Ein weitaus größeres Problem als die Bestimmung einer geeigneten Zielsequenz stellt die notwendige Proliferation des *antisense*-Oligonucleotids zu seinem Wirkort dar. Zum einen können Oligonucleotide, bedingt durch ihr negativ geladenes Phosphatrückgrat, die Zellmembran nur schlecht passiv durchdringen, zum anderen unterliegen sie extra- und intrazellulär einem enzymatischen Abbau.

Für einige Zelllinien konnte gezeigt werden, dass kurze Oligonucleotide durch einen ATP-abhängigen aktiven Transport die Zellmembran passieren können, welcher über eine rezeptorgesteuerte Endocytose verläuft.^{[34],[35]} Jedoch werden bei einer mikromolaren extrazellulären Konzentration nicht mehr als 10 % des Oligonucleotids von der Zelle aufgenommen. Sowohl die Zellspezifität als auch der schlechte Wirkungsgrad der Endocytose machen aktive Transportsysteme für den therapeutischen Einsatz von *antisense*-Oligonucleotiden unpraktikabel.

Eine weitere Anforderung an *antisense*-Oligonucleotide ist ihre Stabilität gegenüber enzymatischem Abbau. Einzelsträngige Oligonucleotide unterliegen extra- und intrazellulär einem sehr schnellen Abbau durch Exo- und Endonucleasen, wobei die hohe Konzentration an extrazellulären Exonucleasen die größte Hürde darstellt.

Da sich aus den hier genannten Gründen unmodifizierte Oligonucleotide nicht *in vivo* einsetzen lassen, müssen *antisense*-Oligonucleotide geeignet modifiziert werden, um den Erfordernissen eines therapeutischen Einsatzes Genüge zu leisten.

2.2 MODIFIKATIONEN VON OLIGONUCLEOTIDEN

In Abb.4 (S.12) ist eine Auswahl untersuchter Modifikationen von Oligonucleotiden gezeigt. Bedingt durch die Struktur der DNA lassen sich diese Modifikationen in vier Kategorien einteilen: der Base (**A**), der Phosphatbrücke (**B**), der Riboseeinheit (**C**) und der Kombination von Phosphatbrücke und Riboseeinheit (**D**).

Durch Modifizierung der Base (**A**) kann sowohl die Bindungsspezifität und -affinität zur Zielsequenz, als auch die Nucleasestabilität beeinflusst werden. Durch den Einsatz von 5-Propinylpyrimidin kann sowohl ein höherer T_m -Wert als auch eine bessere Spezifität erzielt werden. Auch scheinbar kleine Modifikationen können einen erheblichen Einfluss haben, z.B. aus dem Vertauschen des N^7 -Stickstoffs mit dem C^8 -Kohlenstoff resultiert ein höherer T_m -Wert. Ein interessanter Ansatz ist die Einführung der Base N^4, N^4 -Ethan-5-methylcytidin, welche durch den Aziridinring befähigt ist, eine kovalente Bindung zum *sense*-Strang auszubilden (cross-linking).^{[36],[37]}

Durch Modifikation der Phosphatbrücke (**B**) kann einerseits die Stabilität gegenüber Nucleasen erhöht werden, andererseits durch Entfernung der negativen Ladung die Membrangängigkeit erhöht werden. Zu den bestuntersuchten Verbindungsklassen gehören die Methylphosphonate, Phosphorthioate und Phosphordithioate.

Durch den Austausch des negativ geladenen Sauerstoffs der Phosphatdiesterbrücke durch eine Methylgruppe erhöht sich die Lipophilie des Oligonucleotids, wodurch einem besseren passiven Membrantransport gewährleistet wird. Diese über Methylphosphonamidat gut zugänglichen,^[38] modifizierten Oligonucleotide weisen eine sehr hohe Stabilität gegenüber Nucleasen auf,^[39] was bei einem therapeutischen Einsatz eine ungewünschte Akkumulation des *antisense*-Oligonucleotids zur Folge hätte. Des Weiteren weisen Methylphosphonate keine RNase H Aktivität auf, was durch die ineffektive Unterdrückung der Translation der Dihydrofolatreduktase-*mRNA* (DHFR) gezeigt werden konnte.^[40] Thiophosphat-modifizierte Oligonucleotide sind über die Festphasen-Oligonucleotidsynthese unter

Austausch der Iodlösung durch ein Schwefelreagenz, wie z.B. 3*H*-1,2-Benzodithiol-3-on-1,1-dioxid (Beaucage Reagenz^[41]) oder das in Lösung stabilere 3-((Dimethylaminomethylen)amino)-3*H*-1,2,4-dithiazol-3-thion (DDTT^{AM Chemicals}), gut zugänglich.

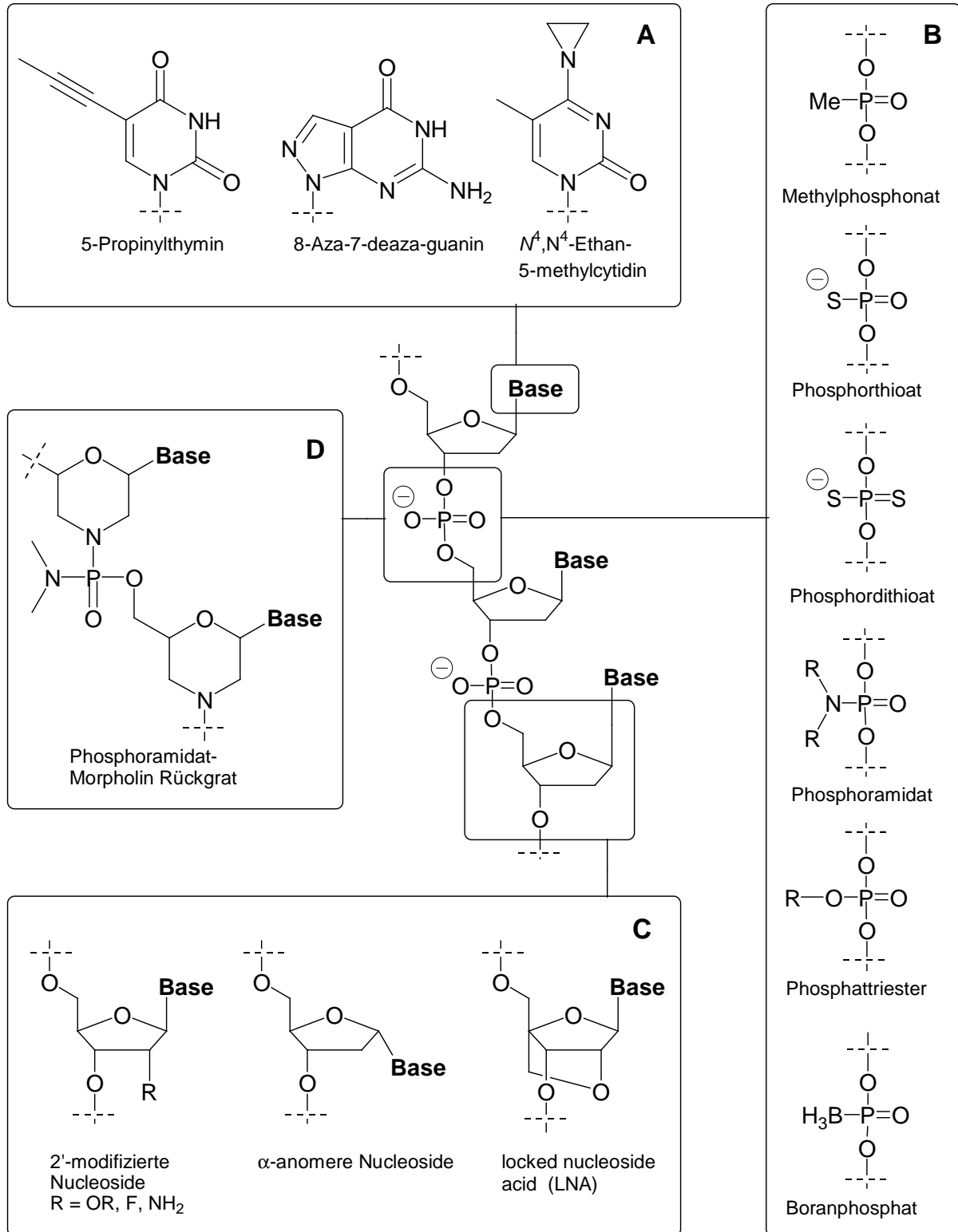


Abbildung 4: Verschiedene Modifikationen von Oligonucleotiden

Wie Methylphosphonate weisen auch Thiophosphonate eine hohe Nucleasestabilität auf. Neben der daraus resultierenden Akkumulation haben Phosphorthioat-modifizierte Oligonucleotide eine hohe Affinität zu Proteinen,^[42] was zu unerwünschten toxischen Nebenwirkungen führen kann.

Sowohl Methylphosphonate als auch Phosphorthioate weisen am Phosphoratom ein stereogenes Zentrum auf, so dass bei einer nicht diastereoselektiven Synthese eines *n*-Oligomers sich ein Produktgemisch aus $2^{(n-1)}$ Diastereomeren bildet. Durch Einsatz von Tryptophan abgeleiteten chiralen Phosphoramiditen konnten im Labormassstab diastereomerenreine Methylphosphonate und Phosphorthioat-modifizierte Oligonucleotide dargestellt werden.^{[43],[44]} Wie erwartet zeigten Messungen der Schmelzpunkte (T_m -Wert), dass R_P -diastereomerenreine Oligonucleotide eine höhere Hybridisierungsenergie haben als S_P -konfigurierte Oligonucleotide.

Auch war der Zucker des Nucleotids Ziel verschiedener Modifikationen (Abb.4 C, S.12). Die häufigste Modifikation der 2'-Desoxy- β -D-ribofuranose-Einheit ist die Einführung einer 2'-O-Methylgruppe. Diese Modifikation, die die *antisense*-Oligonucleotide der zweiten Generation auszeichnet, kommt nativ auch in *tRNAs* (*transfer-RNA*), *rRNAs* (*ribosomale-RNA*) und *snRNAs* (*small-nuclear-RNA*) vor. Die daraus folgende höhere Duplexstabilität mit RNA (ca. 0.5-1.0 °C pro Modifikation) resultiert aus der A-Form des Hybrids, welche durch den von der 2'-O-Methylgruppe erzwungenen höheren Anteil der North-Konformation (3'-*endo*) des Ribofuranose-Zuckers bevorzugt wird. Dieser Trend setzt sich mit zunehmendem sterischen bzw. elektronischen Einfluss des 2'-Substituenten fort (Fluor, 2-Methoxymethoxy, 3-Aminopropyl).^[45] Wird die North-Konformation durch LNA (locked nucleic acid) erzwungen, können T_m -Wert-Erhöhungen bis zu 8 °C pro Modifikation erreicht werden. Trotz der zusätzlichen Nucleasestabilität der LNAs ist deren Einsatz als *antisense*-Oligonucleotide wegen der fehlenden RNase H Aktivität eingeschränkt.^{[46],[47]}

Ein sehr interessanter Ansatz sind die Phosphoramidat-Morpholin-modifizierten Oligonucleotide (Abb.4 D, S.12), bei denen sowohl die Phosphatbrücke als auch der Zucker ausgetauscht werden. Hierdurch wird eine 20-fach höhere Affinität zur Zielsequenz verglichen mit dem entsprechenden 2'-O-Methylthiophosphat-modifizierten Oligonucleotid erreicht.^[48] Trotz fehlender RNase H Aktivität ist bei der Wahl einer geeigneten Zielsequenz ihr Einsatz erfolgreich.^[49] Dies wird auch durch

die beiden sich in der klinischen Phase II befindlichen *antisense*-Oligonucleotide der Firma AviBioPharma belegt (Tab.1, S.4).

2.3 DAS *PRO-ANTISENSE*-OLIGONUCLEOTID-KONZEPT

Ein Ansatz, die oben genannten Schwierigkeiten (siehe 2.2, S.11) (mangelhafte Membrangängigkeit, unerwünschte Akkumulation, Proteinaffinität) beim Einsatz von *antisense*-Oligonucleotiden zu umgehen, ist die Verwendung von *pro-antisense*-Oligonucleotiden.

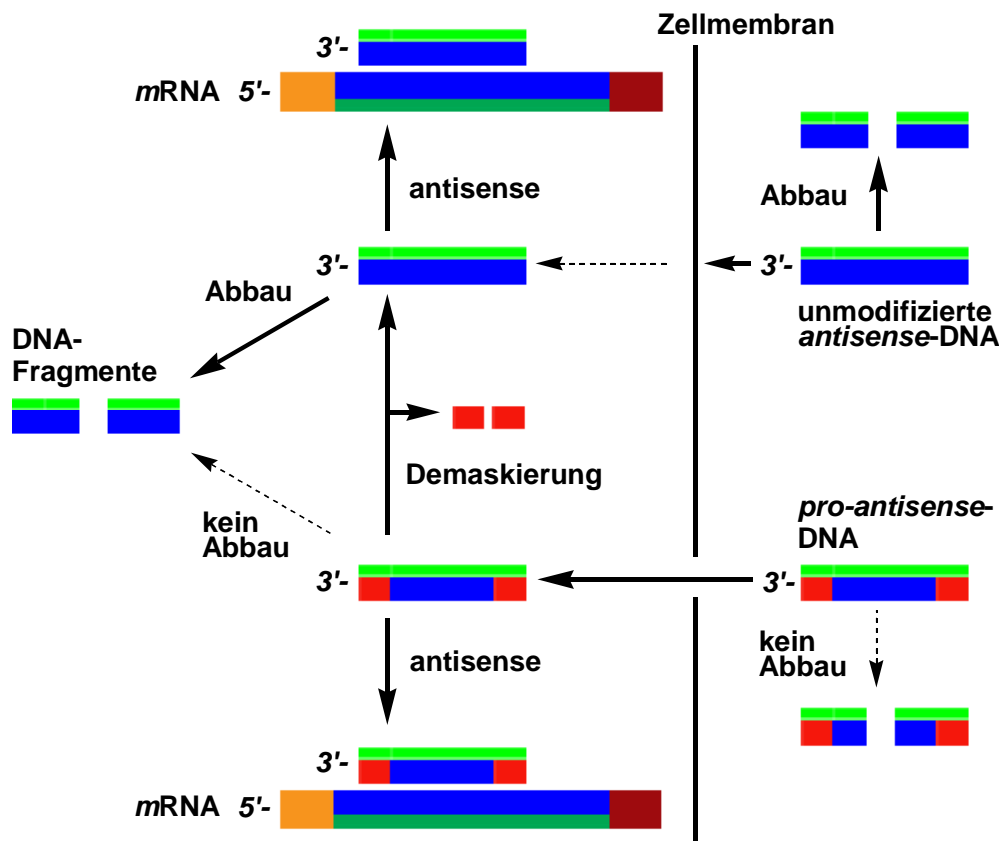


Abbildung 5: *Pro-antisense-Oligonucleotid-Konzept*

Um einen passiven Membrantransport zu ermöglichen, wird hier ein Teil der negativen Ladungen der Phosphatgruppen durch geeignete Schutzgruppen maskiert. Die Entschützung und damit die Freisetzung des unmodifizierten *antisense*-Oligonucleotids sollte durch chemische bzw. enzymatische Hydrolyse gezielt am Wirkort, also erst in der Zelle, erfolgen. Durch den nun möglichen Abbau des

Oligonucleotids wird dessen unerwünschte Akkumulation verhindert. In Abb.5 (S.14) ist dieser Wirkmechanismus schematisch dargestellt.

Um einen erfolgreichen Einsatz von *pro-antisense*-Oligonucleotiden zu gewährleisten, müssen diese die fünf folgenden Kriterien erfüllen:

1. Sie müssen genügend lipophil sein, um passiv die Zellmembran zu durchdringen.
2. Sie müssen gegenüber dem enzymatischen Abbau durch Exonucleasen hinreichend stabil sein, so dass sie ihren Wirkort erreichen.
3. Die abgespaltene Maske darf nicht toxisch sein.
4. Die Bindung zur Zielsequenz muss ausreichend stabil sein.
5. Sie müssen spezifisch nur mit der Zielsequenz hybridisieren.

Die für einen passiven Membrantransport optimale Lipophilie des *pro-antisense*-Oligonucleotids lässt sich über die Anzahl der maskierten Ladungen steuern. Eine Anforderung an die verwendete Schutzgruppe ist, dass sie das Oligonucleotid gegenüber Nucleasen stabilisiert. So kann durch die Schützung der beiden randständigen Phosphatgruppen (gapmer) ein Abbau des Oligonucleotids durch die hauptsächlich extrazellulär vorkommenden Exonucleasen verhindert werden. Durch Steuerung der Geschwindigkeit der Demaskierung kann Einfluss auf die Verweildauer des Oligonucleotids in der Zelle genommen werden. Ein wünschenswerter Nebeneffekt wäre gegeben, wenn schon das *pro-antisense*-Oligonucleotid selbst eine Wirkung entfalten würde.

Neben dem in dieser Arbeit behandelten Konzept für *pro-antisense*-Oligonucleotide sind in der Literatur zwei weitere Ansätze von J. L. IMBACH et al. und R. P. IYER et al. zu finden. In beiden Arbeiten werden Schutzgruppen über das Schwefelatom der Thiophosphatgruppe des Rückgrats eingebracht.

In der Arbeitsgruppe von J. L. IMBACH werden hierzu lipophile Estergruppen eingesetzt, die durch Esterasen abspaltbar sind (Abb.6, S.16). Zu den verwendeten enzymlabilen Schutzgruppen zählen: Pivaloyloxymethyl (POM), Methyl-S-acylthiomethyl (Me-SATM), Methyl-S-acylthioethyl (Me-SATE), *tert*-Butyl-S-acylthioethyl (tBu-SATE) und Phenyl-S-acylthioethyl (Ph-SATE).^{[50]-[58]} Von diesen werden nach der Zellaufnahme des *pro-antisense*-Oligonucleotids die Thiolestergruppen durch eine Carboxyesterase abgespalten.

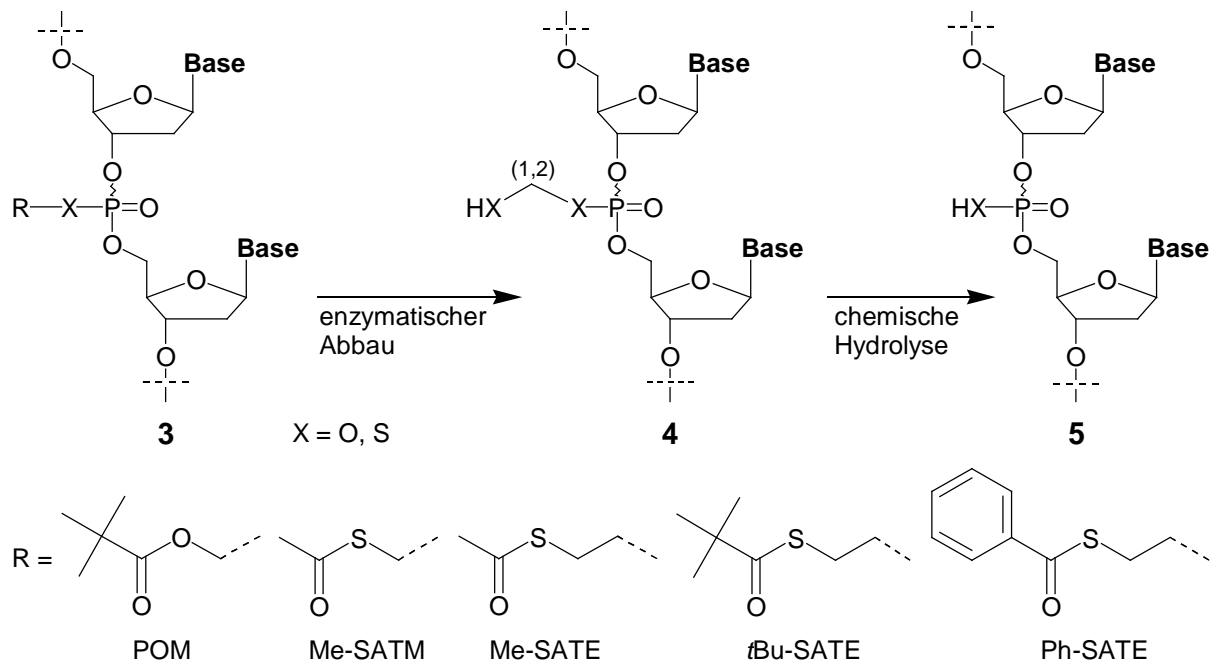


Abbildung 6: Pro-antisense-Oligonucleotid-Ansatz von J. L. IMBACH et al.

Der so gebildete Thioethylphosphatdiester ist instabil und spaltet nach einem $\text{S}_{\text{N}}1$ -Mechanismus Thiiran ab, wobei das entsprechende Thiophosphat-modifizierte Oligonucleotid freigesetzt wird. Jedoch konnten in Tierversuchen karzinogene Eigenschaften des Thiirans nachgewiesen werden.^{[59],[60]} Dieses Konzept wurde auch auf Phosphatdiesteroligonucleotide übertragen und deren Aufnahme in HeLa-Zellen mit 5'-fluoreszenzmarkierten $(\text{dT})_{12}$ -Oligonucleotiden untersucht.^[61]

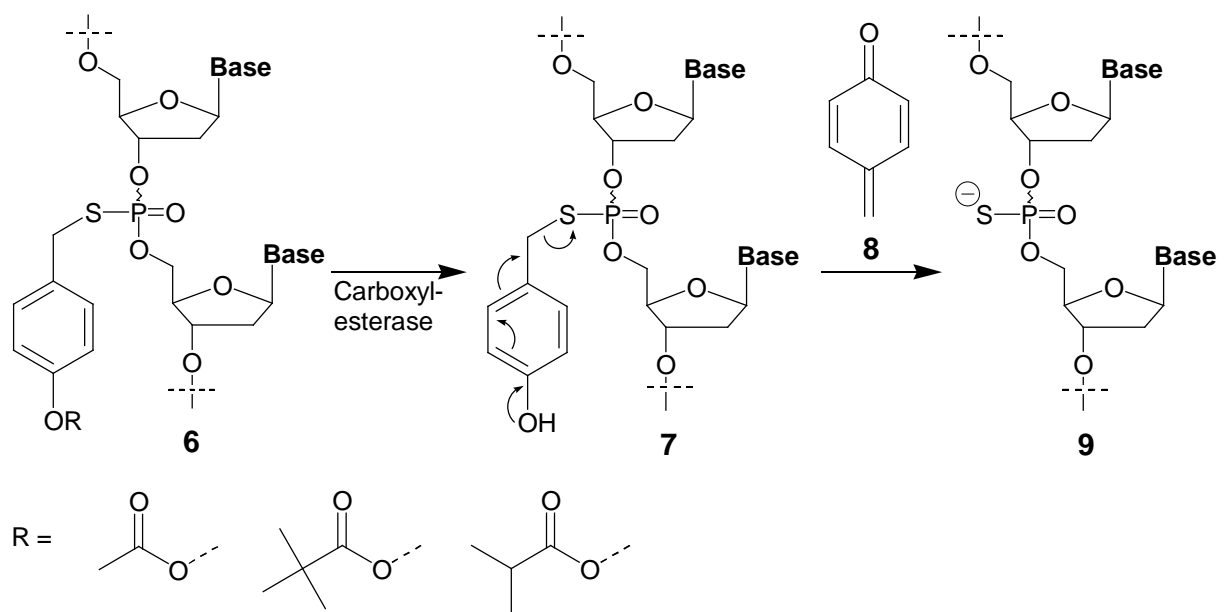


Abbildung 7: Pro-antisense-Oligonucleotid-Ansatz von R. P. IYER et al.

Auch in der Arbeitsgruppe von R. P. IYER et al. werden Schutzgruppen eingesetzt, die durch eine Carboxyesterase abgespalten werden können (Abb.7, S.16). Im Gegensatz zu den von IMBACH verwendeten aliphatischen Estern werden hier Acyloxyarylderivate eingesetzt. Auch hier tritt nach enzymatischer Spaltung des Esters **6** eine chemische Hydrolyse des *para*-Hydroxyphenylmethylphosphat-triesters **7** ein, wodurch das Thiophosphat-modifizierte Oligonucleotid **9** freigesetzt wird.^{[62],[63]} Dieser Ansatz bietet gegenüber der SATE-Modifikation den Vorteil, dass das wesentlich weniger toxische Chinonmethid **8** freigesetzt wird.

2.4 DAS α -HYDROXYPHOSPHONAT-*PRO-ANTISENSE*-OLIGONUCLEOTID-KONZEPT

In der Arbeitsgruppe von C. MEIER wurde ein weiteres Konzept eines Prodrugsystems für Oligonucleotide entwickelt. Die Grundlage dieses neuen Systems gründet auf ein vor längerer Zeit entwickelten Prodrugsystem für *anti*-HIV-aktive Nucleosidanaloga.

Hierzu wurden α -Hydroxybenzylphosphonat-5',5'-dinukleotide von 3'-Azido-2'-desoxythymidin (AZT), 2'-Desoxy-2',3'-didehydrothymidin (d4T) und 2',3'-Didesoxyuridin (ddU) untersucht^{[64]-[66]} (Abb.8).

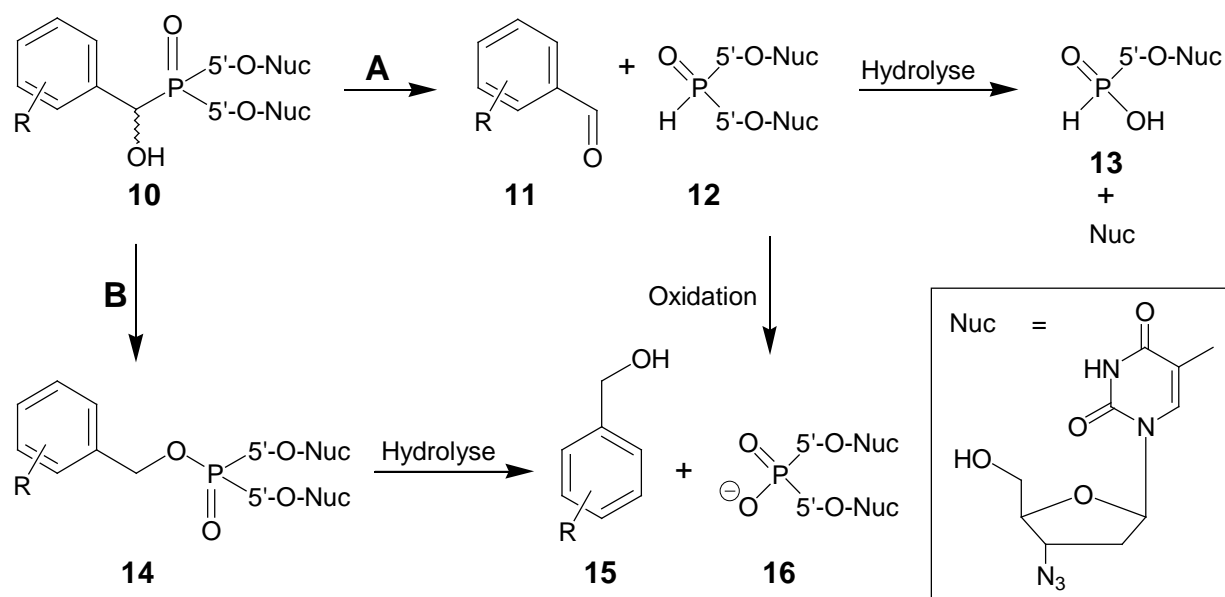


Abbildung 8: Abbauewege von α -Hydroxyphosphonaten unter basischen Bedingungen (*R* siehe Tabelle 2, S.18)

Diese α -Hydroxybenzylphosphonate **10** unterliegen in wässrig, basischem Milieu einem chemischen Abbau. Prinzipiell sind hier zwei verschiedene Demaskierungswege möglich, bei denen die nicht toxischen Benzaldehyd-Masken **11** (Abb.8, S.17, Abbauweg **A**) bzw. Benzylalkohol-Masken **15** (Abbauweg **B**) freigesetzt werden.^[67] Welcher der beiden möglichen Reaktionswege beschrrieben wird, hängt von den elektronischen Eigenschaften des Substituenten **R** an dem Phenylring ab. Während elektronenziehende Acceptorsubstituenten den Reaktionsweg **A** begünstigen, bevorzugen Donorsubstituenten den Reaktionsweg **B**.

R	T _{1/2} [h] (pH 7.5)	Triester (Weg A)	H-Phosphonat (Weg B)
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 %

Tabelle 2: *Abhängigkeit des Abbauwegs vom Substituentenmuster des Phenylrings*

In Tab.2 sind die Verhältnisse der Abbauprodukte in Abhängigkeit vom Substituenten **R** aufgeführt. In Abb.9 (S.19) und Abb.10 (S.19) sind die Reaktionswege der beiden Demaskierungen gezeigt. Ist der Phenylring in der *para*-Position donor-substituiert (z.B. 4-OCH₃ oder 4-CH₃) wird ausschließlich der Reaktionsweg **A** - die Rückspaltung - beschrrieben. Nach Deprotonierung der α -Hydroxygruppe des α -Hydroxybenzylphosphonats **10** erfolgt ein heterolytischer P-C-Bindungsbruch (**17**) unter Freisetzung der Benzaldehyd-Maske **11** und des Anions **16** des Phosphonatdiesters, aus welchem sich durch Reprotonierung der H-Phosphonatdiester **12** bildet. Dieser ist unter basischen Bedingungen nicht stabil und hydrolysiert zu dem freien Nucleosid und dem H-Phosphonatmonoester **13**. Durch weitere Oxidation des H-Phosphonatmonoesters **13** könnte das entsprechende Nucleosidmonophosphat entstehen.

Ist hingegen der Phenylring in *ortho*- bzw. *para*-Position acceptor-substituiert (z.B. 2-NO₂ oder 2,4-NO₂) wird bevorzugt die Phosphonat-Phosphat-Umlagerung (Abb.10, S.19, Abbauweg **B**) beschrrieben, bei zweifacher Substitution sogar annähernd quantitativ (Tab.2).

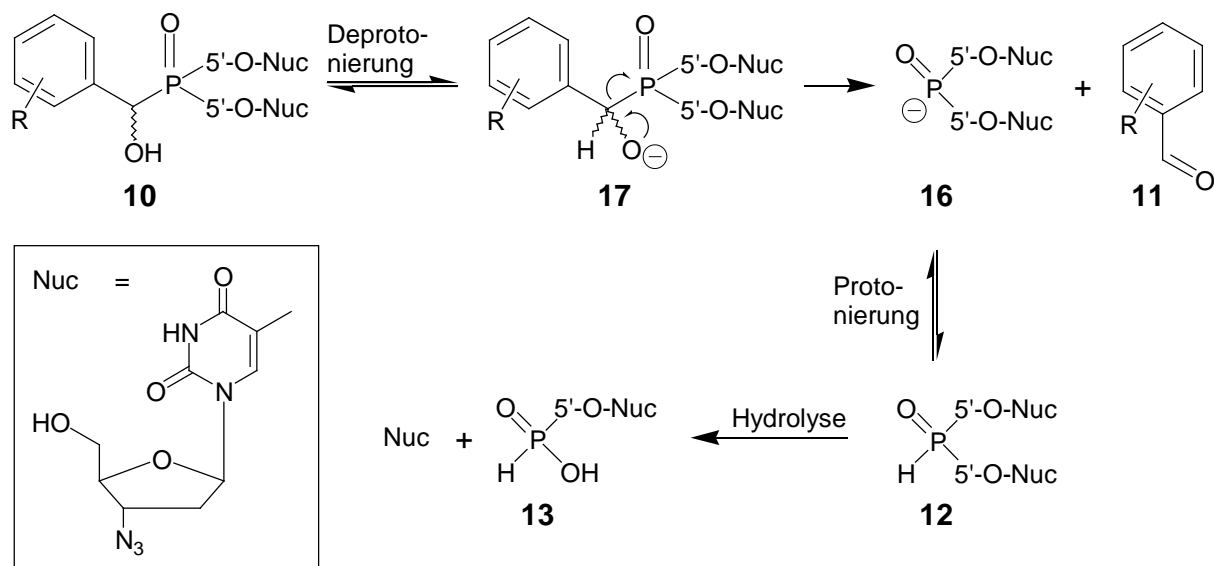


Abbildung 9: Abbaueweg A: H-Phosphonat-Rückspaltung von α -Hydroxyphosphonat-5',5'-Dinucleotiden

Zunächst wird wie bei der Rückspaltung die α -Hydroxygruppe des α -Hydroxybenzylphosphonats **10** deprotoniert. Das so entstandene Hydroxylanion **17** greift unter Bildung eines Oxaphosphiran-Rings **19** das Phosphoratom an. Nach heterolytischem P-C-Bindungsbruch entsteht das Benzylanion **20**, dessen Reptonierung irreversibel ist. Der resultierende Benzylphosphatdiester **14** ist hydrolyseinstabil und bildet unter basischen Bedingungen die Benzylalkohol-Maske **15** und den Phosphatdiester **16**.

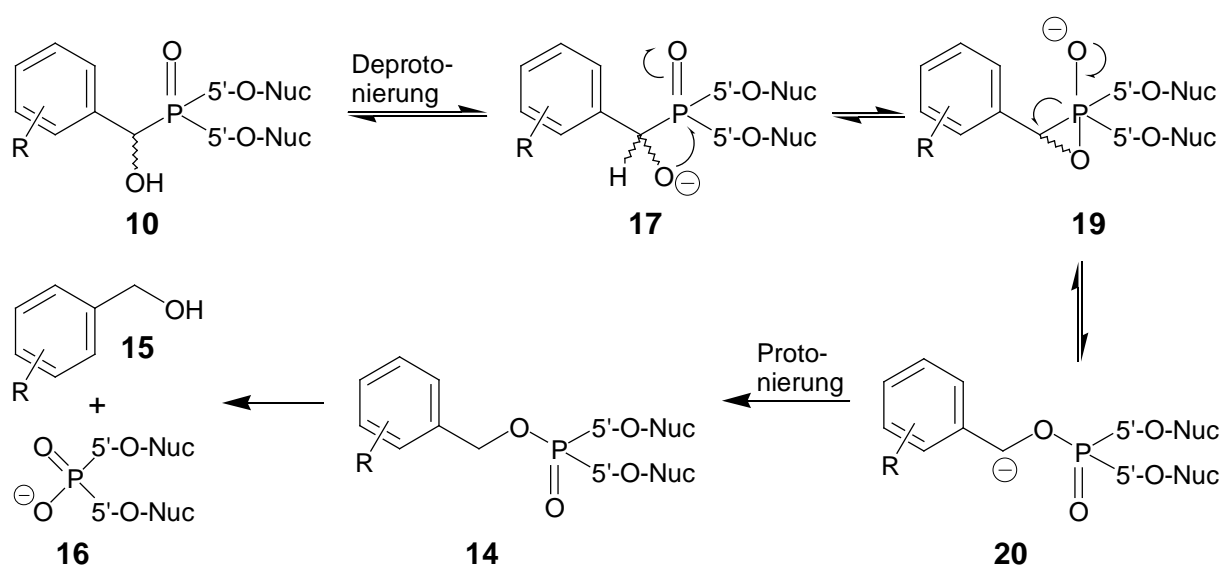


Abbildung 10: Abbaueweg B: Phosphonat-Phosphat-Umlagerung von α -Hydroxyphosphonat-5',5'-Dinucleotiden

Die Bevorzugung der Phosphat-Phosphonat-Umlagerung vor der Rückspaltung durch Acceptorsubstituenten liegt in deren Eigenschaft, Benzylanionen zu stabilisieren, wodurch das Reaktionsgleichgewicht ($17 \rightleftharpoons 19 \rightleftharpoons 20$) auf die Seite des Benzylanions **20** gezogen wird.

Um dieses Konzept auf Oligonucleotide zu übertragen, wurde die α -Hydroxyphosphonat-Maske in *antisense*-Oligonucleotide eingebaut.^{[68]-[71]} Es kann durch verschiedene Reste am Aromaten nicht nur der Abbauweg beeinflusst werden, sondern auch die Dauer der Demaskierung (Tab.2, S.18). In früheren Arbeiten wurden (dT)₁₅-Oligonucleotide jeweils an den beiden endständigen Phosphatgruppen modifiziert.^[72] Es konnte gezeigt werden, dass sich durch die endständige Einführung der 2-Nitro- α -hydroxyphosphonat-Gruppe die Stabilität der Oligonucleotide gegenüber Exonucleasen um ein Vielfaches steigern lässt. Während der Einbau am 5'-Ende des Oligonucleotids die Stabilität ca. um das 16-fache erhöht, steigert der Einbau am 3'-Ende die Resistenz um das 30-fache. Dabei ist nicht geklärt, worauf die erhöhte Stabilität der modifizierten Oligonucleotide beruht. Ein Extremfall wäre, dass die Modifizierung den direkten enzymatischen Abbau gänzlich verhindert und erst die chemische Demaskierung das unmodifizierte und somit enzymatisch schnell abbaubare Oligonucleotid freisetzt. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Modifizierung lediglich eine Verlangsamung des direkten enzymatischen Abbaus bewirkt.

Des Weiteren konnte ein Einfluss der Chiralität bezüglich der Phosphoratome der α -Hydroxyphosphonateinheit auf die T_m-Werte der Oligonucleotide festgestellt werden. Wie erwartet besitzen die R_P-Diastereomere einen höheren Schmelzpunkt als die S_P-Diastereomere.

2.5 FLUORESZENZMARKER FÜR OLIGONUCLEOTIDE

Für die Untersuchung der Membrangängigkeit von Oligonucleotiden und deren Verteilung innerhalb der Zelle besteht, neben ihrer Markierung mit einem Radioisotop (z.B. ³²P), die Möglichkeit, sie mit einem Fluoreszenzmarker zu versehen und die Zellaufnahme mittels Fluoreszenzmikroskopie zu verfolgen. Die hierfür zur Verfügung stehenden Fluoreszenzmarker lassen sich grob in zwei Klassen einteilen, den 'extrinsischen' und den 'intrinsischen' Markern.

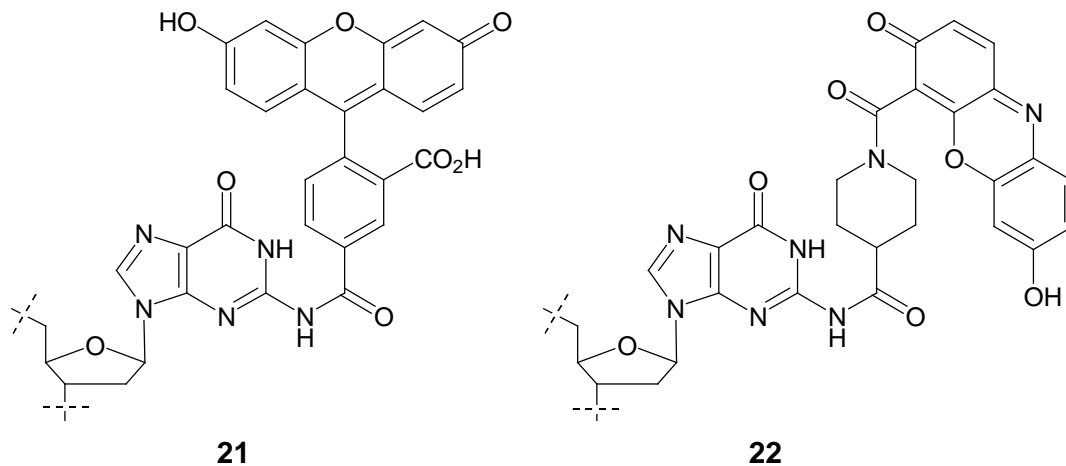


Abbildung 11: 'Extrinsische' Fluoreszenzmarker; Carboxyfluorescein-markiertes dG **21**, dG mit N-Resorufin-4-carboxyl-piperidin-4-carbonsäure markiert **22**

Bei der Verwendung eines 'extrinsischen' Markers wird eine fluoreszierende Substanz über einen geeigneten Anker an das Oligonucleotid gebunden.

In der Arbeitsgruppe von J. L. IMBACH wurde die Aufnahme eines Oligonucleotids in HeLa Zellen untersucht, indem dieses am 5'-Ende mit Fluorescein markiert worden war (Abb.11, **21**).^[61]

Neben Fluorescein wird auch Resorufin eingesetzt, welches über Piperidin-4-carbonsäure an die exozyklische Aminogruppe von 2'-Desoxyguanosin gebunden werden kann (Abb.11, **22**). Diese beiden Beispiele verdeutlichen die Schwierigkeiten, die sich aus der Verwendung von 'extrinsischen' Fluoreszenzmarkern ergeben. Neben ihrer Lipophilie, wodurch sich die Membrangängigkeit des Oligonucleotids ändert, ist es nicht vorhersehbar, wie weit andere Eigenschaften des Oligonucleotids, z.B. der T_m -Wert und die Enzymstabilität beeinflusst werden.

Um diesen Unzulänglichkeiten zu entgehen, wurden verschiedene 'intrinsische' Fluoreszenzmarker entwickelt. Bei diesen Nucleosidanaloga werden durch eine möglichst kleine chemische Modifikation einer Base Fluoreszenzeigenschaften erzeugt (Abb.12, S.22).

In der Arbeitsgruppe von F. SEELA wurde eine Reihe von Nucleosidanaloga mit Fluoreszenzeigenschaften synthetisiert, die sich von Inosin ableiten lassen (Abb.12, S.22, 2-Aminopurin **23**, 7-Deazaisosin **24**, Isoinosin **25**).^{[73]-[77]} Auch wurden von Purin- und Pyrimidinnucleosiden abgeleitete Analoga mit anellierten Ringsystemen

dargestellt. (Abb.12, Furo-[2,3-d]pyrimidin **26**^{[78],[79]}, ϵ -Adenosin **27**^[80], 3- β -D-2'-Desoxyribofuranosyl-3,5-diaza-4-oxopheothiazin **28**^[81]).

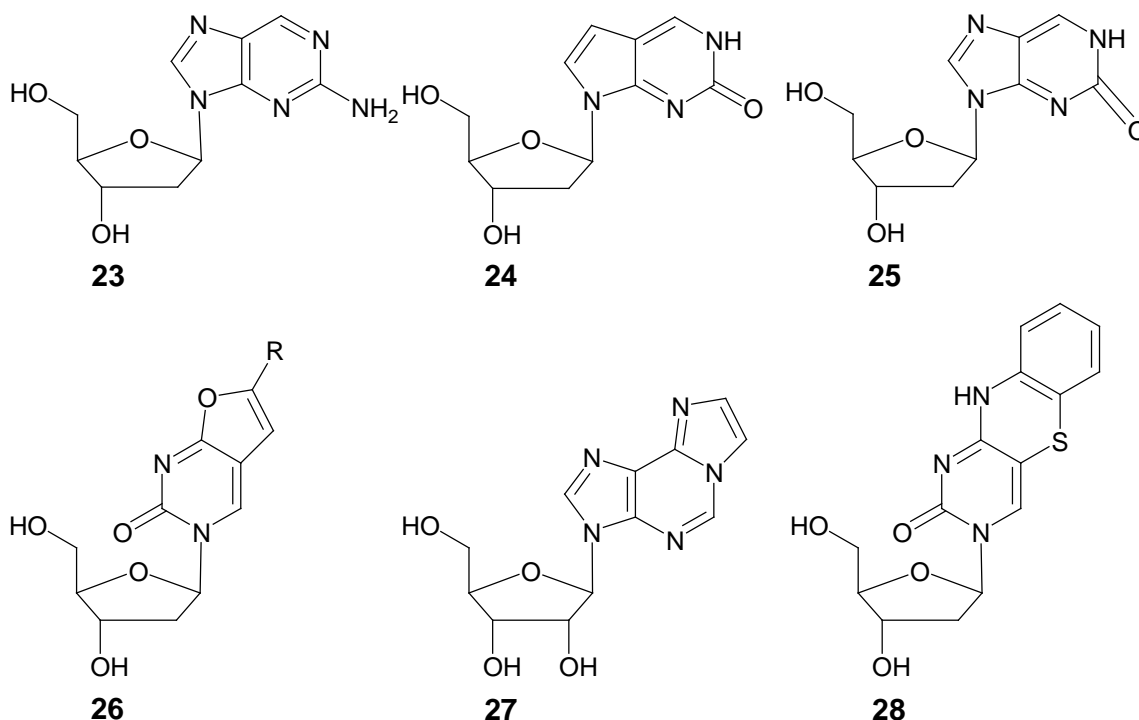


Abbildung 12: 'Intrinsische' Fluoreszenzmarker: 2-Aminpurin **23**, 7-Deazaisoinosin **24**, Isoinosin **25**, Furo-[2,3-d]-pyrimidin **26**; ϵ -Adenosin **27**, 3- β -D-2'-Desoxyribofuranosyl-3,5-diaza-4-oxopheothiazin **28**

Zwar stellen diese Verbindungen eine deutliche Verbesserung gegenüber den sperrigen 'extrinsischen' Fluoreszenzmarkern **22** und **23** (Abb.11, S.21) dar, sind aber im Hinblick auf die geplante Anwendung eines fluoreszenten Nucleosid-analogons in Thymidinoligomere immer noch ungeeignet, da sie nur wenig Ähnlichkeit zu Thymidin aufweisen.

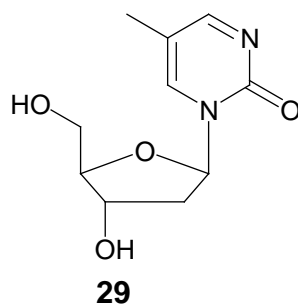


Abbildung 13: Das fluoreszente Thymidinanalogon N¹-(β -D-2'-Desoxyribofuranosyl)-5-methylpyrimidin-2-on (m^5K) **29**

Eine vielversprechende neue Syntheseroute zu einem bereits bekannten fluoreszenzaktiven Nucleosidanalogen wurde von der Arbeitsgruppe von S. F. SINGELTON et al. beschrieben.^[82] Ihnen gelang unter milden Bedingungen die Darstellung des fluoreszenten Thymidinanalogs *N*¹-(β -D-2'-Desoxyribosyl)-5-methylpyrimidin-2-on (*m*⁵K) **29** (Abb.13, S.22). Es diente dem Einbau in Oligonucleotide, um den *RecA*-ssDNA Komplex mit Hilfe von Fluoreszenzspektroskopie zu untersuchen.

Dieses Analogon unterscheidet sich von Thymidin lediglich in der reduzierten Carbonylgruppe in der 4-Position der Base und ist damit die bisher aussichtsreichste neutrale Sonde im Hinblick auf den Einbau in Thymidinoligomere.

3. AUFGABENSTELLUNG

In vorherigen Arbeiten von R. P. MAURITZ^[83] wurde das α -Hydroxyphosphonat-*pro*-Oligonucleotid-Konzept entwickelt und an Hand von (dT)₁₅-Oligomeren umgesetzt. Das Hauptaugenmerk lag auf der Synthese und Untersuchung von *freien* α -Hydroxyphosphonat-modifizierten Oligonucleotiden. Jedoch ist diese Modifikation in einem wässrig basischen Milieu für den Einbau in *antisense*-Oligonucleotide zu labil. Erst durch die intramolekulare Schützung der α -Hydroxygruppe als Lacton kann die gewünschte Stabilität erzielt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die in Abb.14 dargestellten chimeren Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide ODN-1, ODN-2 und ODN-3 zu synthetisieren und ihre Eigenschaften zu untersuchen.

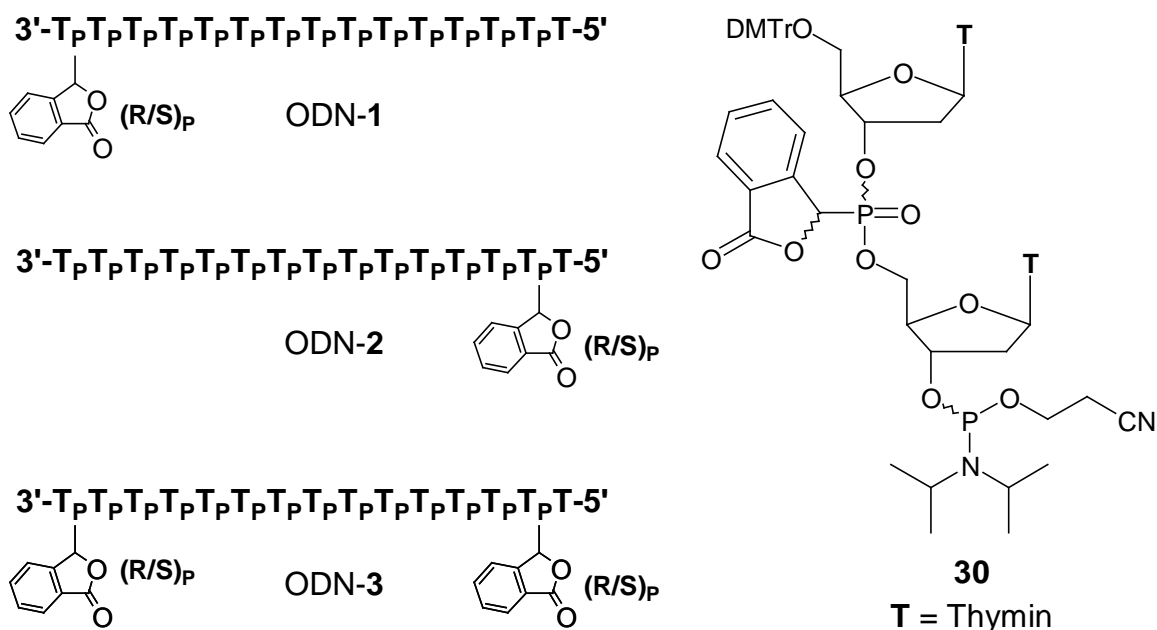


Abbildung 14: Links: Phthalidylphosphonat-modifizierte Oligonucleotide;
 rechts: 5'-O-DMTr-Phthalidylphosphonatdiester-3'-O-amidit **30**

Mit dem endständigen Einbau der Phthalidylgruppe in das Oligonucleotid soll die geforderte Stabilität gegenüber Exonucleasen erzeugt werden. Eingebaut wird die Modifikation mit dem in Abb.14 gezeigten Phthalidylphosphonatdiester-3'-O-amidit **30**, das als 'quasi'-Monomer in die Festphasensynthese eingesetzt wird. Während der Synthese des Amidits **30** werden zwei stereogene Zentren aufgebaut,

eins am Phosphoratom und eins am α -Kohlenstoffatom. Um insbesondere den Einfluss der Konfiguration des Phosphoratoms auf die Eigenschaften der modifizierten Oligonucleotide untersuchen zu können, müssen die diastereomerenreinen Amidite (R_P)-**30** und (S_P)-**30** dargestellt und in die Festphasensynthese eingesetzt werden.

Die Untersuchung der Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide hinsichtlich ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften bildet den zweiten Teil dieser Arbeit. An erster Stelle steht die Messung ihrer Bindungsaffinitäten zu den komplementären DNA bzw. RNA-Strängen (T_m -Werte). Ebenfalls ein wichtiger Aspekt ist der Einfluss der Phthalidylgruppe auf die Wechselwirkung mit verschiedenen Enzymen. Neben der Stabilität gegenüber 3'- und 5'-Exonucleasen, ist eine mögliche Demaskierung der Oligonucleotide durch Esterase gesteuerte Hydrolyse des Lactonrings von großem Interesse.

Um die Zellaufnahme bzw. den passiven Membrantransport modifizierter Oligonucleotide zu untersuchen, müssen diese markiert werden. Hierzu stehen je nach Anforderung unterschiedliche Fluoreszenzsonden zur Verfügung.



ODN-10

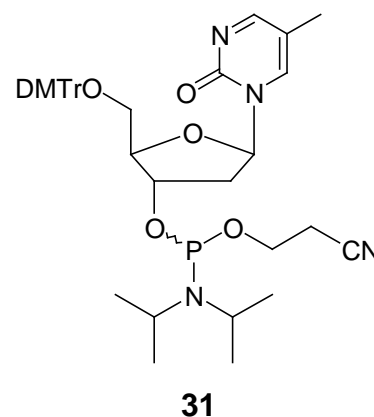


Abbildung 15: Links: chimeres $(dT)_{15}$ -Oligomer mit m^5K ODN-10;
rechts: 5'-O-DMTr-3'-O-Amidit- m^5K **31** ;

Die Wahl m^5K **29** (Abb.13, S.22) als Fluoreszenzmarker zu benutzen, ist durch seine große Übereinstimmung mit Thymidin gegeben. Zunächst sollte das in Abb.15 gezeigte 5'-O-DMTr- m^5K -3'-O-Amidit **31** dargestellt werden und in das links abgebildete Oligonucleotid eingebaut werden. Der Einbau des m^5K **29** in die achte Position des $(dT)_{15}$ -Oligomers bietet für das weitere Design von gapmer-Oligonucleotiden die größte Freiheit.

4. RESULTATE UND DISKUSSION

4.1 SYNTHESE DES N^1 -(3'-O-(2-CYANOETHOXY- N,N -DIISOPROPYL AMINOPHOSPHINO)-5'-O-(4,4'-DIMETHOXYTRIPHENYLMETHYL)- β -D-2'-DESOXYRIBOSYL)-5-METHYLPYRIMIDIN-2-ONS (31)

4.1.1 Retrosynthetische Analyse und Syntheseplanung

Das 5'-O-DMTr-3'-O-Amidit- N^1 -(β -D-2'-desoxyribosyl)-5-methylpyrimidin-2-on (5'-O-DMTr-3'-O-Amidit- m^5k) **31** wird als Baustein für die DNA-Festphasensynthese benötigt. Für seine Darstellung bietet sich als zentrales Intermediat das ungeschützte m^5K **29** an, aus dem es sich in zwei Schritten gewinnen lässt.

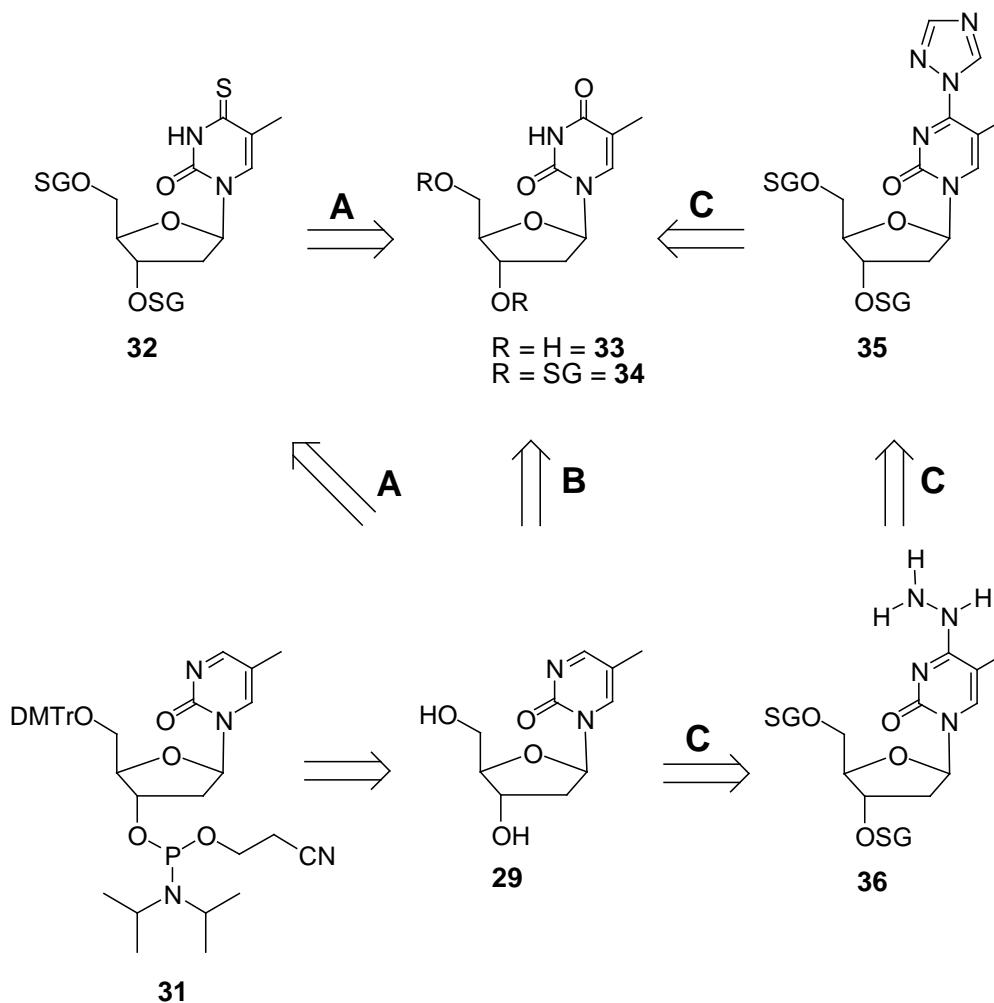


Abbildung 16: Retrosynthetische Analyse des 5'-O-DMTr-3'-O-Amidit- m^5K **31**

In Abb.16 (S.26) sind drei mögliche Synthesewege ausgehend von Thymidin **33** skizziert, die zu dem gewünschten m^5K **29** führen.

Die unter Weg **A** gezeigte Syntheseroute verläuft über ein 3'-O- und 5'-O- geschütztes 4-Thiothymidinderivat **32**, welches durch Verschwefelung des entsprechenden 3'-O- und 5'-O- geschützten Thymidins **34** mit Hilfe des Lawesson's-Reagenzes erhältlich ist. Die anschließende reduktive Entschwefelung des 4-Thiothymidinderivats **32** geschieht mit Raney-Nickel in einer Wasserstoffatmosphäre. Zur Blockierung der 3'- und 5'-Hydroxygruppe des Thymidins bietet sich hier die *tert*-Butyldimethylsilyl-Schutzgruppe (TBDMS) an. Jedoch zeigt die Erfahrung bei der Anwendung dieser Methode auf Purinnucleoside, dass die der Verschwefelung folgende Aufarbeitung mit einem hohen Aufwand verbunden ist und nur unbefriedigende Ausbeuten erzielt werden können. Auch im Hinblick auf eine mögliche pharmakologische Anwendung ist es wünschenswert, möglichst keine Schwermetalle in der Synthese einzusetzen.

Eine weitere mögliche Methode zur Darstellung des m^5K **29** ist die direkte Reduktion von Thymidin (Route **B**, Abb.16, S.26) mit Natriumamalgam in einer wässrigen 0.2 N Essigsäure-Lösung.^[84] Hier ist die Ausbeute niedrig (ca. 12 %) und der Einsatz von Hg ist selbstverständlich auch nicht erwünscht.

Die dritte unter **C** (Abb.16, S.26) beschriebene Synthese des m^5K **29** verläuft über die Oxidation des 4-Hydrazinylthymidinderivats **36**. Um die harschen Bedingungen bei der Verwendung von Ag_2O ^[85] und die damit verbundene Problematik geeigneter Schutzgruppen zu umgehen, setzten S. F. SINGELTON et al. das wesentlich mildere Oxidationsmittel 4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion (PTAD) **37** (siehe 4.1.17, S.52) ein.^[82] Das 4-Hydrazinylthymidinderivat **36** lässt sich aus dem 4-Triazolylthymidinderivat **35** durch Umsetzung mit Hydrazin erhalten. Die Substitution des 4-Sauerstoffatoms des Pyrimidinheterozyklus gegen Triazol ist eine gängige Methode zur Aktivierung der 4-Position. Daher dürfte die Synthese des 4-Triazolylthymidinderivats **35** keine größeren Schwierigkeiten bieten. Als mögliche Schutzgruppe für die 3'- und 5'-Hydroxyfunktionen des Thymidins bietet sich neben der von S. F. SINGELTON et al. verwendeten Triethylsilyl- (TES) auch die TBDMS-Schutzgruppe an.

Aus den oben genannten Gründen wurde zur Darstellung des 5'-O-DMTr-3'-O-Amidit- m^5K **31** die Syntheseroute **C** (Abb.16, S.26) gewählt. So ergibt sich der in

Abb.17 dargestellte Syntheseplan. Ausgehend von Thymidin **33** wird zunächst die 3'- und die 5'-Hydroxyfunktion als Silylether geschützt **38/39** und zur Aktivierung der 4-Position der Pyrimidinbase das zweifach geschützte Thymidinderivat **38/39** in das 4-Triazololyderivat **40/41** überführt. Nach Umsetzung dieses reaktiven Intermediats **40/41** mit Hydrazin zu dem 4-Hydrazinylderivat **42/43** erfolgt die reduktive Eliminierung der 4-Hydrazingruppe mit PTAD **37** zu dem zweifach geschützten m⁵K **44/45**.

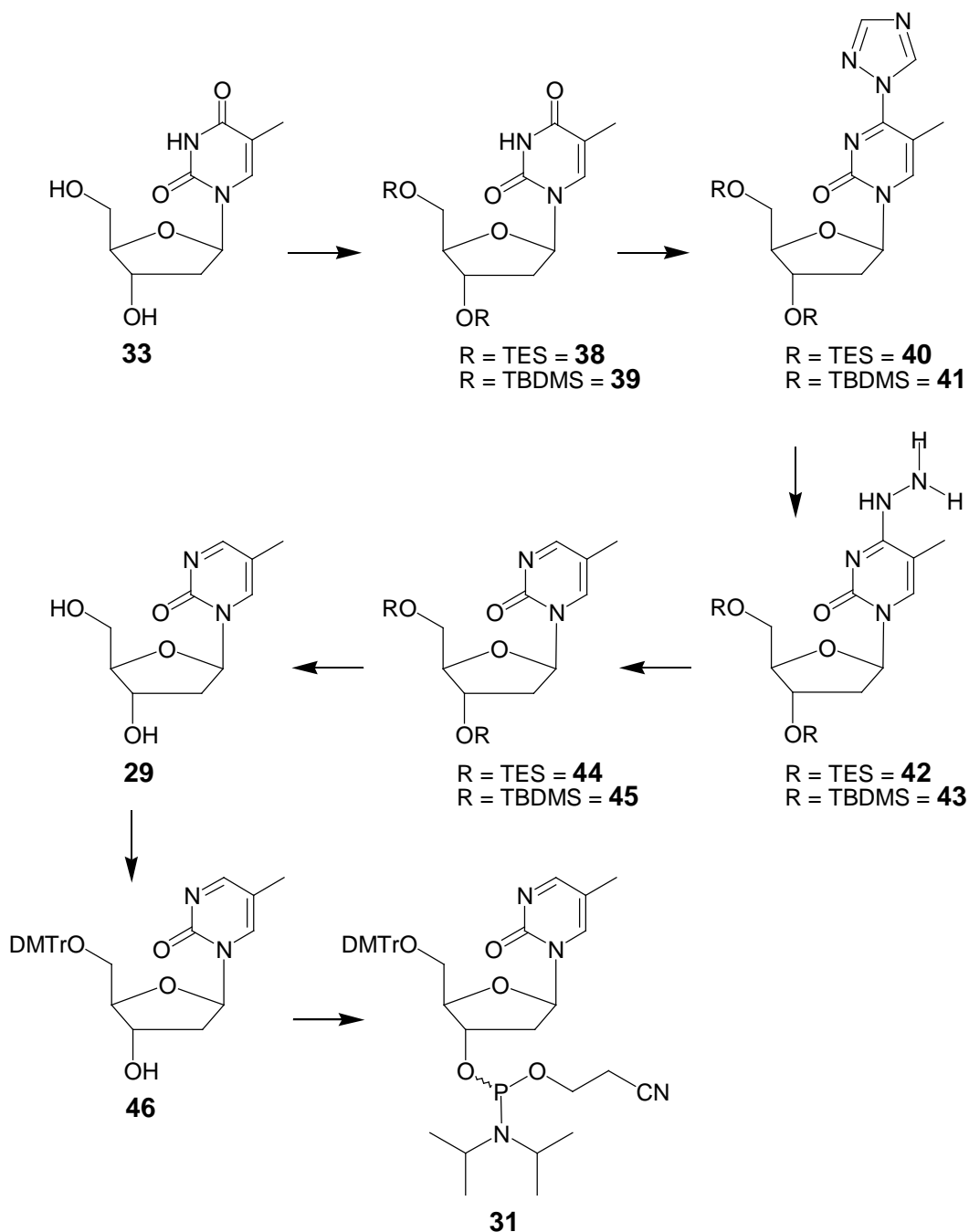


Abbildung 17: Syntheseplan des 5'-O-DMTr-m⁵K-3'-O-Amidits **31**

Nach Entschützung der 3'- und 5'-Hydroxygruppen wird das freie m⁵K **29** unter Standardbedingungen zu dem 5'-O-DMTr-m⁵K **46** umgesetzt, aus dem die Zielverbindung **31** erhältlich ist.

4.1.2. Synthese von 3',5'-O-Bis(triethylsilyl)thymidin (**38**)

Zur Schützung der 3'- und der 5'-Hydroxyfunktion des Thymidins **33** wurde analog dem Syntheseprotokoll von S. F. SINGELTON et al. die TES-Schutzgruppe verwendet.^[82] Die an sich recht labile TES-Schutzgruppe bietet sich an, da sie unter den milden Bedingungen der weiteren m⁵K-Synthese stabil sein sollte und anschließend leicht mit Essigsäure in Wasser wieder abgespalten werden kann.

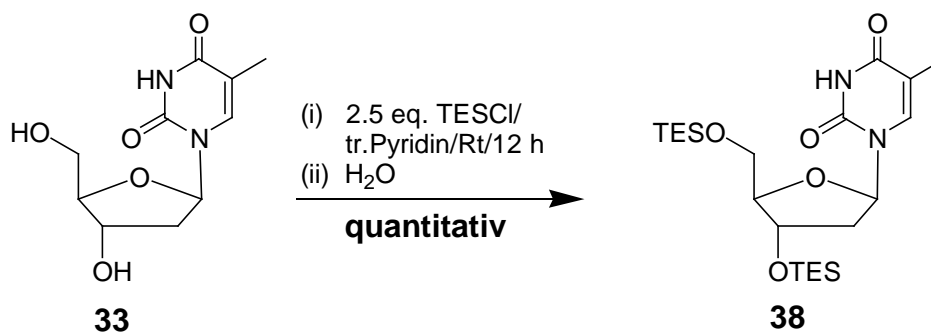


Abbildung 18: Synthese des 3',5'-O-BisTES-Thymidins **38**

Die Synthese erfolgte in trockenem Pyridin mit einem 1.25-fachen Überschuss an Triethylsilylchlorid pro Hydroxygruppe mit einer quantitativen Ausbeute problemlos, wobei die weitere Zugabe einer Base nicht von Nöten war. Zum Abbruch der Reaktion wurde entsalztes Wasser anstelle des üblicherweise verwendeten Methanols hinzugegeben, um das nicht umgesetzte Triethylsilylchlorid als Silanol und nicht als Silylmethylether abzufangen. Der wesentlich kleinere R_f-Wert des Triethylsilanols (R_f = ca. 0.6 CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) gegenüber dem Silylmethylether (R_f = ca. 0.9) erleichterte die Aufreinigung des 3',5'-O-BisTES-Thymidins **38** (R_f = 0.79 CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) wesentlich.

Die TES-Schutzgruppe erwies sich wieder Erwarten als *recht* labil. Wurde das 3',5'-O-BisTES-Thymidin **38** zwei Tage bei Raumtemperatur der normalen Atmosphäre ausgesetzt, konnte eine Zersetzung von ca. 20 % beobachtet werden.

Demzufolge wurden alle weiteren TES-geschützten Derivate bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Inertgasatmosphäre gelagert.

4.1.3 Synthese von 3',5'-O-Bis(*tert*-butyldimethylsilyl)thymidin (**39**)

Zur Synthese des 3',5'-O-BisTBDMS-Thymidins **39** wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet.

Bei der ersten Methode **A** wurde Thymidin **33** in trockenem *N,N*-Dimethylformamid mit einem 1.3-fachen Überschuss pro Hydroxygruppe an TBDMSCl unter Aktivierung mit Imidazol über 24 Stunden bei Raumtemperatur umgesetzt. Nach chromatographischer Aufreinigung konnte mit dieser Methode eine Ausbeute von 82 % erzielt werden.

Die zweite Methode **B** wurde ebenfalls bei Raumtemperatur und über 12 Stunden, jedoch in trockenem Pyridin und mit einem 2-fachen Überschuss je Hydroxygruppe an TBDMSCl, durchgeführt. Hier konnte eine Umsetzung des eingesetzten Thymidins von 95 % erzielt werden.

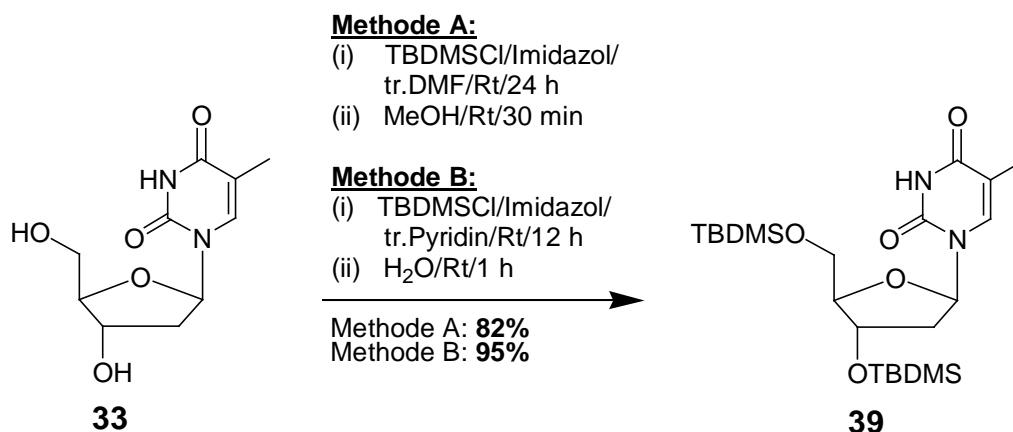


Abbildung 19: Synthese des 3',5'-O-BisTBDMS-Thymidins **39**

Die Methode **B** bietet gegenüber der Methode **A** neben der höheren Ausbeute den Vorteil einer wesentlich leichteren Aufarbeitung, da Pyridin anstelle von *N,N*-Dimethylformamid verwendet wurde.

4.1.4 Synthese von 3',5'-O-Bis(triethylsilyl)-4-(1,2,4-triazol-1-yl)-thymidin (**40**)

Um die Reaktivität des C₄-Kohlenstoffatoms der Nucleobase gegenüber Nucleophilen zu erhöhen, wurde 3',5'-O-BisTES-Thymidin **38** in 3',5'-O-BisTES-4-Triazolylthymidin **40** überführt.

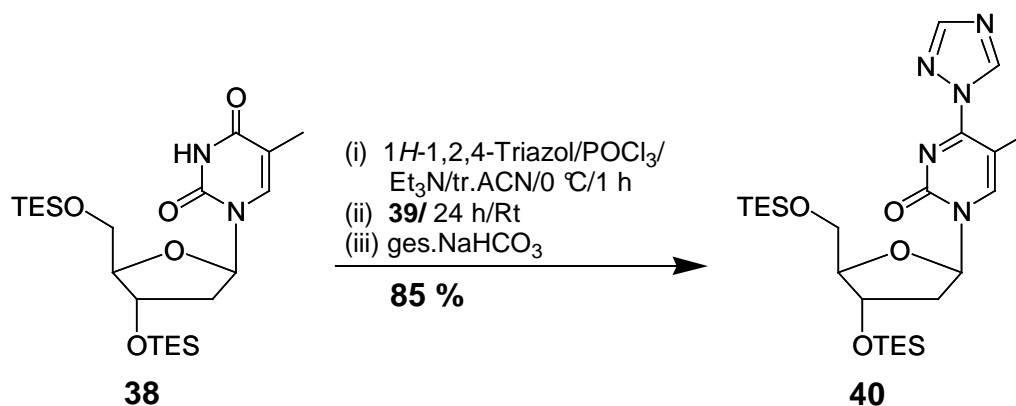


Abbildung 20: Synthese des 3',5'-O-BisTES-4-Triazolylthymidins **40**

Hierzu wurde das zweifach geschützte Thymidin **38** mit 1H-1,2,4-Triazol, Phosphorylchlorid und Triethylamin in trockenem Acetonitril bei Raumtemperatur über 24 Stunden umgesetzt. Das Triazol stellt für die folgende Additions-/Eliminierungsreaktion mit Hydrazin eine gute Austrittsgruppe dar.

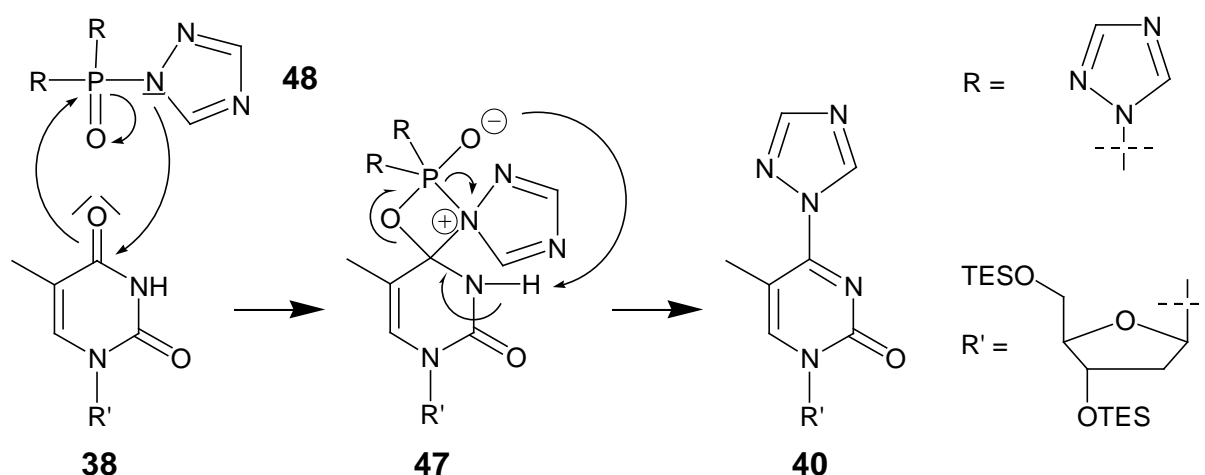


Abbildung 21: Mechanismus der Additions-/Eliminierungsreaktion von der Synthese des 3',5'-O-BisTES-4-Triazolylthymidins **40**

Zur Aktivierung des Triazols wurde dieses in *sito* mit Phosphorylchlorid unter Zugabe von Triethylamin in das Bis-(1,2,4-triazol-1-yl)phosphinoyl-1,2,4-triazol **48** überführt, so dass es anschließend in einer Additions-/Eliminierungsreaktion (**47**) an der C₄-Carbonylgruppe der Nucleobase auf den Heterozyklus übertragen werden konnte. Zur Deaktivierung des verbleibenden Restes des Vilsmeier-Reagenzes wurde die Reaktion vorsichtig mit einer gesättigt wässrigen Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, wobei ein sehr voluminöser und schwer abtrennbarer amorpher Niederschlag entstand. Die Reaktion lieferte mit 85 % eine guten Ausbeute. Nach chromatographischer Reinigung konnte das Produkt **40** als farbloses Öl erhalten werden, welches anschließend langsam sternförmig kristallisierte. Bemerkenswert ist die sehr starke Fluoreszenz von **40** (siehe 4.1.14, S.48).

4.1.5 Synthese von 3',5'-O-Bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-4-(1,2,4-triazol-1-yl)thymidin (**41**)

Die Synthese des 3',5'-O-BisTBDMS-4-Triazolylthymidins **41** erfolgte analog der 3',5'-O-BisTES-4-Triazolylthymidin **40** Synthese (siehe 4.1.4, S.31).

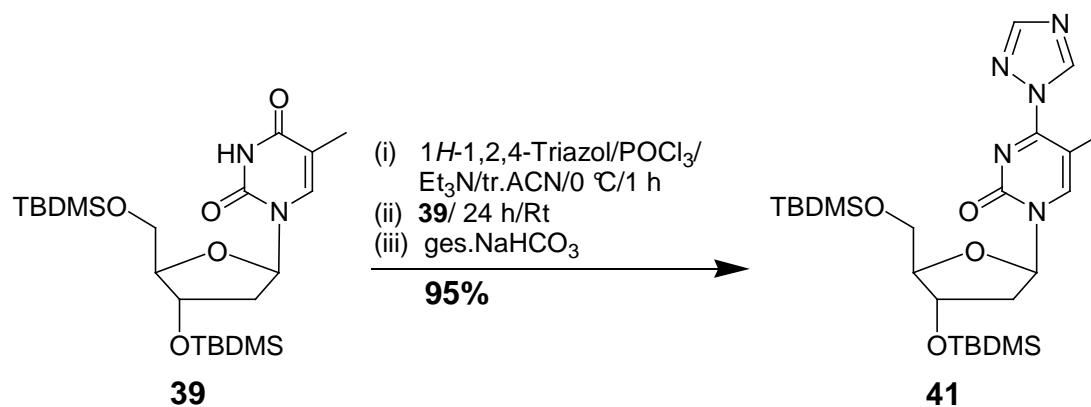


Abbildung 22: Synthese des 3',5'-O-BisTBDMS-4-Triazolylthymidins **41**

Auch hier zeigt sich parallel zur Schutzungsreaktion der 3'- und 5'-Hydroxygruppen des Thymidins **33** (siehe 4.1.2, S.29) der Vorteil der höheren Stabilität der TBDMS-Gruppe gegenüber der TES-Gruppe. Wie bei 3',5'-O-BisTES-4-Triazolylthymidin **40** wurde auch hier eine sehr starke Fluoreszenz beobachtet (siehe 4.1.14, S.48).

4.1.6 Synthese und Optimierung der 3',5'-O-Bis(TES/TBDMS) geschützten N'-(β -D-2'-Desoxyribose)-5-methylpyrimidin-2-on Derivate (**44**), (**45**)

Als problematisch stellte sich die Reduktion des 3',5'-O-BisTES-4-Triazolylthymidins **40** zum 3',5'-O-BisTES- m^5K **44** heraus. Wurde die Synthese analog zum Protokoll von S. F. SINGELTON et al.^[82] durchgeführt, konnte keine Ausbeute höher als 10-20 % erzielt werden (**V1**, Tab.3, S.35).

Im ersten Reaktionsschritt wird das an dem C₄-Kohlenstoffatom der Nucleobase gebundene Triazol durch Hydrazin substituiert. Hierzu wird zunächst die Lösung des 3',5'-O-BisTES-4-Triazolylthymidins **40** in trockenem 1,4-Dioxan zum Entgasen solange unter Vakuum gesetzt, bis diese bei 8 °C erarrt.

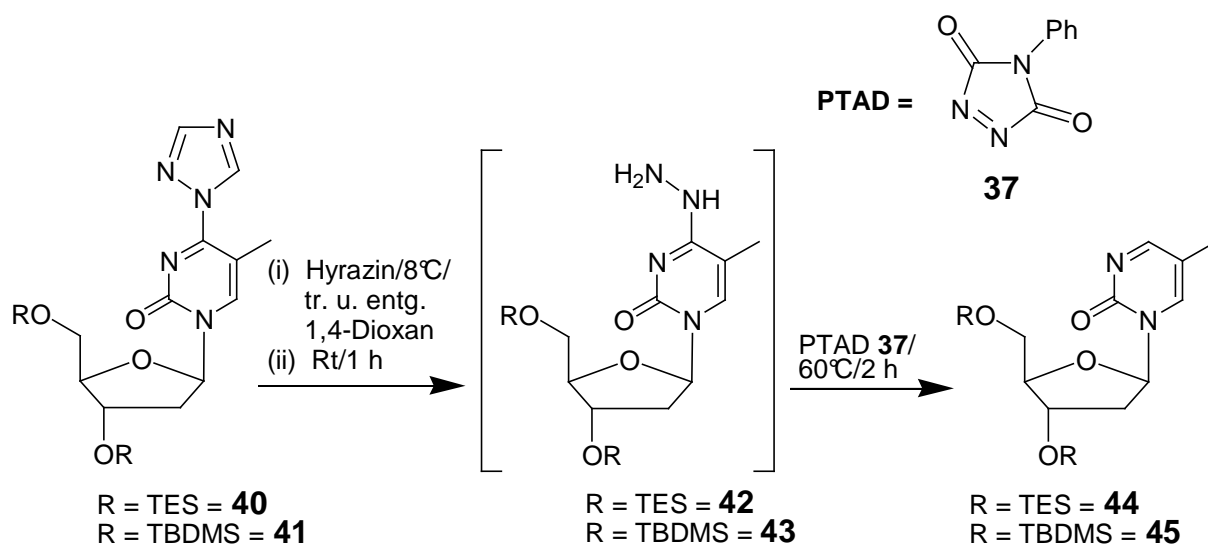


Abbildung 23: Synthese des 3',5'-O-BisTES- m^5K **44** und des 3',5'-O-BisTBDMS- m^5K **45**

Nachdem die Lösung fast vollständig wieder aufgetaut war, wurden zwei Äquivalente Hydrazin (1M Lösung in trockenem THF) hinzugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur unter Bildung des 4-Hydrazinylderivats **42** gerührt. Vor dem zweiten Syntheseschritt wurde die Reaktionslösung unter Schutzgas bis *fast* zur Trockene eingengt, um nichtumgesetztes Hydrazin aus der Reaktionslösung zu entfernen, da dieses im Folgenden mit dem Oxidationsmittel PTAD **37** reagieren würde. Nach Aufnahme des Rückstands in trockenem und entgastem 1,4-Dioxan wurden 1.2 Äquivalente PTAD ebenfalls gelöst in 1,4-Dioxan langsam bei 60 °C hinzugegeben. Während der Zugabe der tiefroten PTAD-Lösung konnte deren

sofortige Entfärbung unter der erwarteten jedoch sehr schwachen Stickstoffentwicklung beobachtet werden. Nach Zugabe von ca. 1.1 Äquivalenten der PTAD-Lösung verlangsamte sich die Entfärbung der Lösung wesentlich und kam nach Zugabe von 1.2 Äquivalenten zum Stillstand, was die Vermutung nahelegte, dass das gesamte 4-Hydrazinylderivat **42** abreagiert war. Die Isolierung des 3',5'-O-BisTES-m⁵K **44** erfolgte durch wiederholte chromatographische Trennung an Kieselgel, wobei dem Eluenten 1 % Triethylamin beigelegt wurde. Dies ist notwendig, da die Aminabindung des 3',5'-O-BisTES-m⁵K **44** in Folge seiner elektronenreicheren Nucleobase wesentlich säurelabiler ist als die des Thymidins. Wie oben erwähnt, konnten mit diesem Syntheseprotokoll trotz sorgfältiger Reaktionsführung und Aufarbeitung keine Ausbeuten höher als 10-20 % erzielt werden. Mehrere Versuche, das rasch gebildete 4-Hydrazinylderivat **42** nach dem ersten Reaktionsschritt zu isolieren, schlugen fehl. Ein möglicher Grund hierfür mag

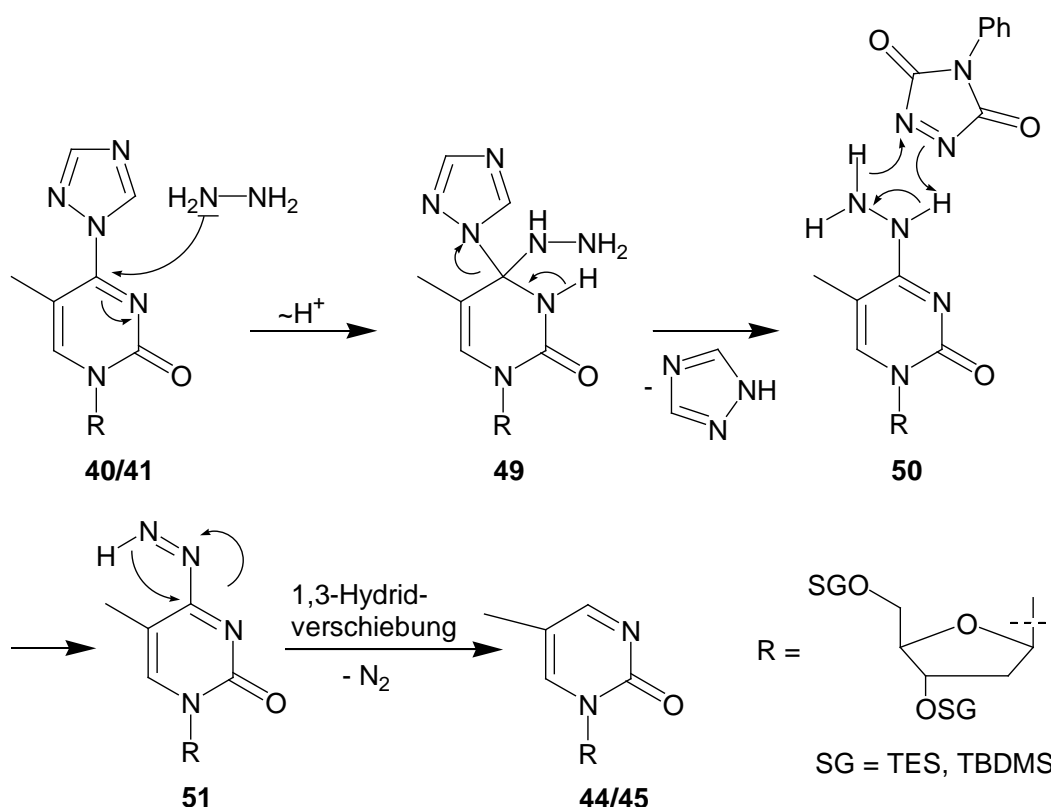


Abbildung 24: Postulierter Reaktionsmechanismus der Oxidation mit PTAD

die hohe Labilität der TES-Schutzgruppe gewesen sein, welche die sofortige Umsetzung des 4-Hydrazinylderivats **44**, beschrieben in dem Syntheseprotokoll von S. F. SINGELTON et al.,^[82] erklären würde. In Abb.24 wird ein wahrscheinlicher

Reaktionsmechanismus der zweistufigen Oxidation postuliert. Demnach erfolgt die Substitution des Triazols durch das Hydrazin über einen Additions-/Eliminierungsmechanismus (**49**). Die Oxidation des 4-Hydrazinylderivats (**50**) mit PTAD **37** ist hier als eine konzertierte zyklische Reaktion mit einer anschließenden 1,3-Hydridverschiebung dargestellt. Das postulierte intermediäre Iminoderivat **51** konnte nicht nachgewiesen werden. Sicherlich ist hier auch ein nichtkonzertierter Reaktionsmechanismus denkbar.

Da die beiden 3'- und 5'-Hydroxygruppen mit der labilen TES-Schutzgruppe blockiert worden waren, lag zunächst die Annahme nahe, dass die schlechten Ausbeuten auf eine teilweise Entschützung der Hydroxygruppen bei der Reaktion bzw. der Aufarbeitung zurückzuführen sind. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde die gesamte Synthese mit der wesentlich stabileren TBDMS-Schutzgruppe durchgeführt. Es konnten jedoch zunächst auch mit dieser Schutzgruppe keine Ausbeuten höher als 25 % erzielt werden.

Zur Optimierung wurden die in der folgenden Tabelle aufgelisteten Variationen der Reaktionsbedingungen durchgeführt.

	eq. Hydrazin	Reaktionszeit nach PTAD Zugabe	Temperatur	eq. PTAD	Ausbeute
V1	2	1 h	60 °C	1.2	10-25 %
V2	1	1 h	60 °C	1.2	10 %
V3	3	1 h	60 °C	1.2	25 %
V4	2	16 h	60 °C	1.2	26 %
V5	2	1 h	80 °C	1.2	0 %
V6	2	1 h	60 °C	2	57 %
V7	2	1 h	60 °C	3	53 %

Tabelle 3: Variationen der Reaktionsbedingungen der Oxidation mit PTAD **37**

In Versuch **V2** und **V3** wurden die Äquivalente an Hydrazin zur Bildung des Hydrazinylderivats **43** variiert. Zunächst wurde durch die Verwendung von nur einem Äquivalent an Hydrazin versucht, mögliche Hydrazinrückstände während der Oxidation mit PTAD zu vermeiden. Jedoch hatte dies die Halbierung der Ausbeute zur Folge. Eine Erklärung hierfür ist, dass noch nicht umgesetztes Hydrazin durch bereits

eliminiertes Triazol protoniert und so der Reaktion entzogen wird. Wegen der beobachteten nicht stöchiometrischen Umsetzung des Triazolylderivats **41** wurde in **V3** ein dreifacher Überschuss an Hydrazin eingesetzt, wodurch allerdings keine Ausbeuteerhöhung erzielt werden konnte.

Die schnelle Entfärbung der PTAD-Lösung nach Zugabe zu dem Hydrazinylderivat **43** war ein guter Indikator für die Bildung des in Abb.24 (S.34) postulierten Iminoderivats **51**. Die beobachtete schwache Stickstoffentwicklung hingegen wies auf eine mögliche Hemmung der Stickstoffeliminierung hin. Die Variation der Reaktionszeit (**V4**) und der Reaktionstemperatur (**V5**) ergab jedoch keine Ausbeuteerhöhung, indes hatte die Temperaturerhöhung auf 80 °C die komplette Zersetzung des Produkts zur Folge. Bei Versuch **V5** wurde beobachtet, dass nach 16 Stunden die Reaktionslösung größtenteils entfärbt war, diese Beobachtung ist durch die Lichtempfindlichkeit des PTAD bedingt.

Da auch hier Versuche der Isolierung des 3',5'-O-BisTBDMS-4-Hydrazinylthymidins **43** fehlschlugen, konnte nicht falsifiziert werden, dass es sich quantitativ gebildet hatte. Um die Umsetzung des 4-Triazolylderivats **41** mit Hydrazin zu untersuchen, wurde versucht, die Stabilität des 4-Hydrazinylderivats **43** durch Methylierung der Hydrazingruppe zu erhöhen.

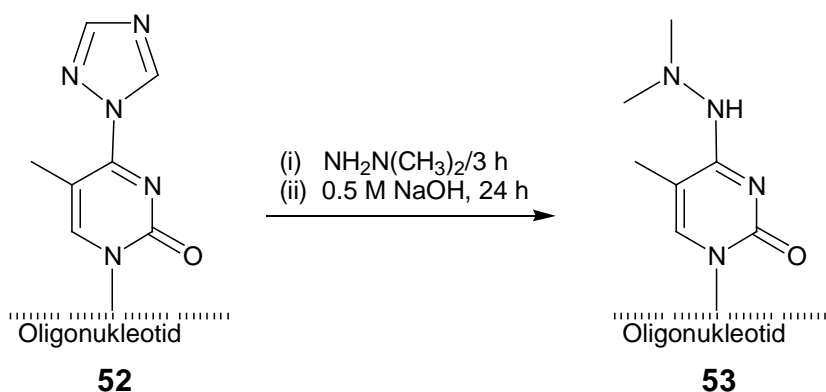


Abbildung 25: Postsynthetische Substitution der Triazolygruppe mit *N,N*-Dimethylhydrazin nach Y. XU^[86]

Anstoß hierzu gaben Arbeiten von Y. XU.^[86] In ihnen wurde postsynthetisch an einem festphasengebundenen Oligonucleotid **52** eine Triazolygruppe mit *N,N*-Dimethylhydrazin zu dem *N,N*-Dimethylhydrazinyl-modifizierten Oligonucleotid **53** substituiert (Abb.25).

Als Methylierungsreagenz wurde Methyljodid verwendet. Zur nötigen quantitativen Umsetzung des Hydrazinylderivats **43** sollte ein großer Überschuss an Methyljodid eingesetzt werden. Es war jedoch ungewiss, ob nicht unter diesen Bedingungen eine Übermethylierung eintreten könnte (Abb.26).

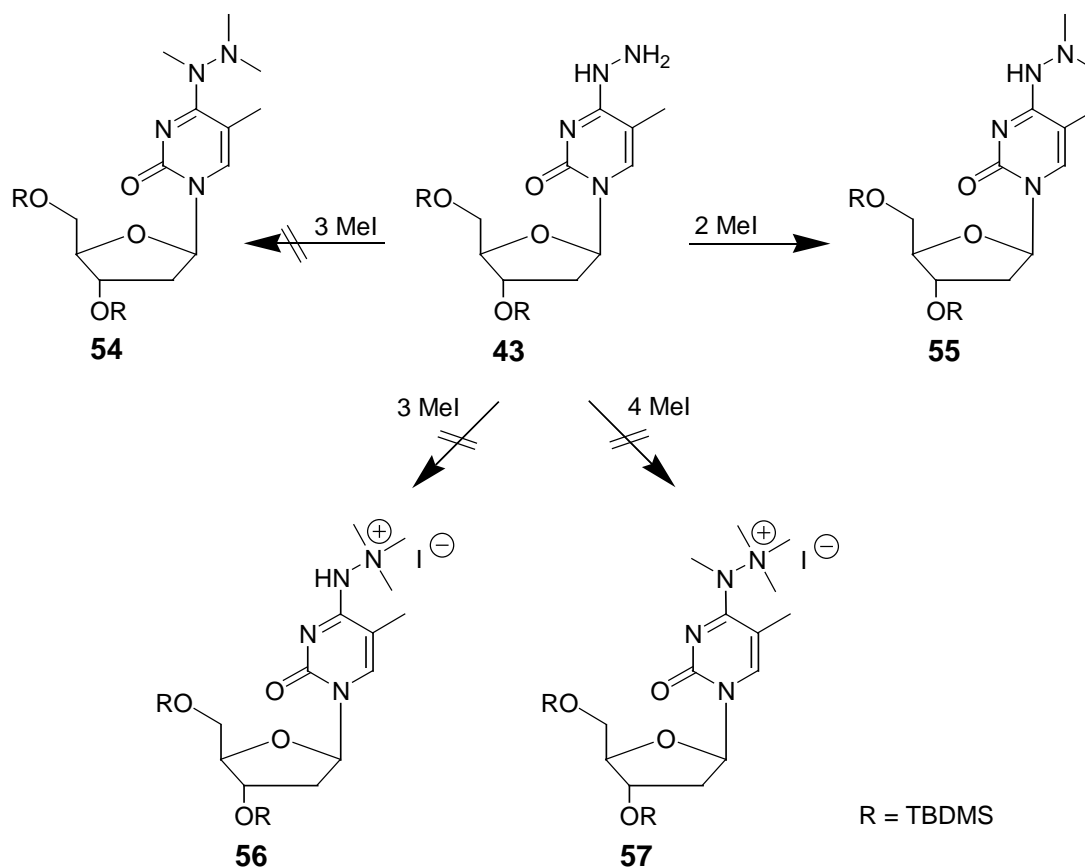


Abbildung 26: Mögliche Methylierungen der Hydrazinylgruppe des 3',5'-O-BisTBDMS-4-Hydrazinylthymidins **43**

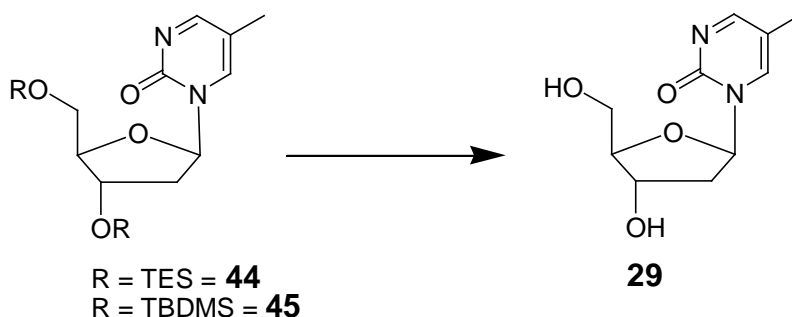
Zur Klärung dieses Sachverhalts wurde das Hydrazinylderivat **43** analog der m^5K -Synthese dargestellt, und anstelle der PTAD-Lösung vier Äquivalente Methyljodid hinzugegeben. Aus dieser Reaktion konnte 3',5'-O-BisTBDMS-4-DiMe-Hydrazinylthymidin **55** mit einer Ausbeute von 60 % isoliert werden. Keines der in Abb.26 gezeigten drei weiteren alternativen Methylierungsprodukte **54**, **56** und **57** konnten nachgewiesen werden. *N,N'*-Dimethylhydrazinylderivat **55** wurde anschließend mit 10 Äquivalenten Methyljodid in 1,4-Dioxan umgesetzt, wobei keine weitere Methylierung an der Hydrazinylgruppe festgestellt werden konnte. Da hierdurch gezeigt werden konnte, dass durch einen hohen Überschuss an Methyljodid keine Übermethylierung erfolgt, wurde der oben beschriebene Versuch

mit 27 anstelle von 4 Äquivalenten an Methyljodid durchgeführt, und es konnte das DiMe-Hydrazinylderivat **55** mit einer Ausbeute von 88 % isoliert werden. Daraus ergab sich, dass der limitierende Schritt der Synthese des 3',5'-O-BisTBDMS- m^5K **45** die Oxidation des Hydrazinylderivats **43** mit der PTAD-Lösung ist.

Die bei **V5** (Tab.3, S.35) beobachtete verlangsamte Entfärbung der Reaktionslösung, welche zuvor ausschließlich mit der Lichtempfindlichkeit von PTAD **37** erklärt worden war, kann zusätzlich auch ein Indiz für eine unvollständige Umsetzung des Hydrazinylderivats **43** sein. Demzufolge wurde im nächsten Versuch **V6** sowohl 2 anstelle von 1.2 Äquivalenten *selbsthergestelltes* PTAD verwendet (siehe 4.1.17, S.52) als auch die Reaktion unter Lichtausschluss durchgeführt. Es konnte hiermit die Ausbeute an 3',5'-O-BisTBDMS- m^5K **45** auf 57 % erhöht werden. Durch eine weitere Erhöhung der Äquivalente (**V7**) an PTAD konnte jedoch keine weitere Verbesserung der Ausbeute erzielt werden.

4.1.7 Synthese von *N'*-(β -D-2'-Desoxyribosyl)-5-methylpyrimidin-2-on (m^5K) (**29**)

Als letzten Schritt der m^5K **29** Synthese erfolgte die Entschützung der 3'- und 5'-Hydroxygruppen.



Methode A: (i) **44**/AcOH:H₂O:THF 4:4:1/12 h/Rt (ii) ges. NaHCO₃ **46 %**

Methode B: (i) **44**/Et₃N3HF/Et₃N/THF/1 h/Rt (ii) H₂O/Silicagel/1 h/Rt **56 %**

Methode C: (i) **45**/TBAF/THF/1 h/Rt **quantitativ**

Abbildung 27: Entschützung der 3',5'-O-BisTES/TBDMS-geschützten m^5K -Derivate **44** und **45**

Analog dem Syntheseprotokoll von S. F. SINGELTON et al.^[82] wurden die beiden säurelabilen TES-Gruppen des 3',5'-O-BisTES- m^5K **44** mit Essigsäure in wässrigem

THF abgespalten. Es konnte jedoch nur eine Ausbeute von 46 % gegenüber der von S. F. SINGELTON angegebenen Ausbeute von 81 % erzielt werden. Die Ausbeute konnte auf 56 % durch den Einsatz von Triethylamintrihydrofluorid in THF/Et₃N erhöht werden. Nach der Entschützung wurden die überschüssigen Fluoridionen durch Zugabe von Silicagel aus der Reaktionslösung entfernt.

Diente 3',5'-O-BisTBDMS-m⁵K **55** als Edukt, wurde die Entschützung mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) in THF über eine Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Mit dieser Methode konnte eine quantitative Ausbeute erzielt werden.

4.1.8 Isolierung und Charakterisierung weiterer Substanzen aus der 3',5'-O-BisTBDMS-m⁵K-Synthese (**45**)

Es konnten während der Aufarbeitung der 3',5'-O-BisTBDMS-m⁵K-Synthesen **45** neben dem Hauptprodukt zwei weitere Substanzen isoliert werden, die mit 4 % bzw. 8 % anfielen. Die eine Substanz (4 %) konnte leicht als nicht umgesetztes 3',5'-O-BisTBDMS-4-Triazolylthymidin **41** identifiziert werden.

Für die zweite und unbekanntere Substanz wurde auf Grund NMR-spektroskopischer Untersuchungen zunächst angenommen, dass es sich um die postulierte, intermediär entstehende Iminoverbindung **51** (Abb.24, S.34 und Abb.28, S.40) handelt, welche durch die Konjugation der Iminogruppe mit dem π -System der Base stabilisiert wäre. Das ¹H-NMR-Spektrum, welches weitgehend dem des 3',5'-O-BisTBDMS-Thymidins **39** entspricht, weist ein Singulett mit einer chemischen Verschiebung von $\delta = 9.07$ ppm auf, welches anfänglich als Hinweis auf das vermeintliche Iminoproton interpretiert wurde.

Die Elementaranalyse (Tab.4, S.40) ergab jedoch ein Wasserstoff/Stickstoff-Verhältnis von 14.7 ± 0.3 , welches deutlich grösser ist als das bei der Iminoverbindung **51** theoretisch erwartete Verhältnis von 11.2 (H/N). Somit konnte es sich nicht um die Iminoverbindung **51** handeln.

In Abb.28 (S.40) sind zwei weitere mögliche Strukturen dargestellt. Das symmetrische, über die Basen verbrückte Hydrazinyldimer **59** könnte aus der Reaktion des 3',5'-O-BisTBDMS-Hydrazinylthymidins **43** mit einem weiteren 3',5'-O-BisTBDMS-4-Triazolylthymidin **41** entstehen. Durch Oxidation dieses Hydrazinyl-dimers **59** mit PTAD **37** entstünde das Iminodimer **60**.

	Gehalt [%] (gemessen)					Verhältniss H/N			
	1.	2.	3.	4.	Ø	gemes.	51 ber.	59 ber.	60 ber.
N	8,38	8,43	8,53	8,43	8,44±0.014	14.7±0.3	11,24	14.62	14.98
H	8,54	8,50	8,45	8,61	8,52±0.014				
C	54,15	54,61	54,52	54,41	54,42±0.12				

Tabelle 4: Elementaranalyse des Dimers von 3',5'-O-BisTBDMS-4-Hydrazinylthymidin **43**

Sowohl das Stickstoff/Wasserstoff-Verhältnis des Hydrazinyldimers **59** (H/N = 14.98) als auch das des Iminodimers **60** (H/N = 14.62) lagen im Messfehlerbereich der Elementaranalyse (Tab.4, rechts). So konnte mit der Elementaranalyse nicht zwischen den beiden Dimeren **59** und **60** unterschieden werden.

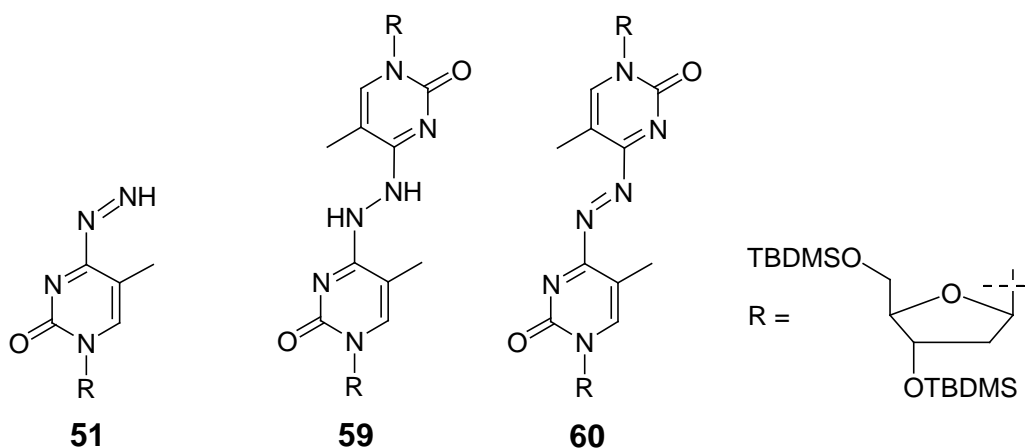


Abbildung 28: Postulierte Dimere **59** und **60** des TBDMS-geschützten Hydrazinyl- **43** und des Iminoderivats **51**

Da das EI-Massenspektrum keine eindeutigen Rückschlüsse zuließ, weil es keinen $[M+H]^+$ Molekülpeak bzw. charakteristische Fragmente eines der beiden möglichen Dimere **59** und **60** aufwies, wurde ein MALDI-TOF-Spektrum aufgenommen, welches anhand des Peaks mit $[M+H]^+ = 937$ m/z den Nachweis lieferte, dass es sich um das Dimer **59** der Hydrazinverbindung **43** handelte. Es sei bemerkt, dass sowohl das Natriumaddukt ($[M+Na]^+ = 959$ m/z) als auch das Kaliumaddukt ($[M+K]^+ = 975$ m/z) des Dimers **59** im Spektrum gemessen wurde.

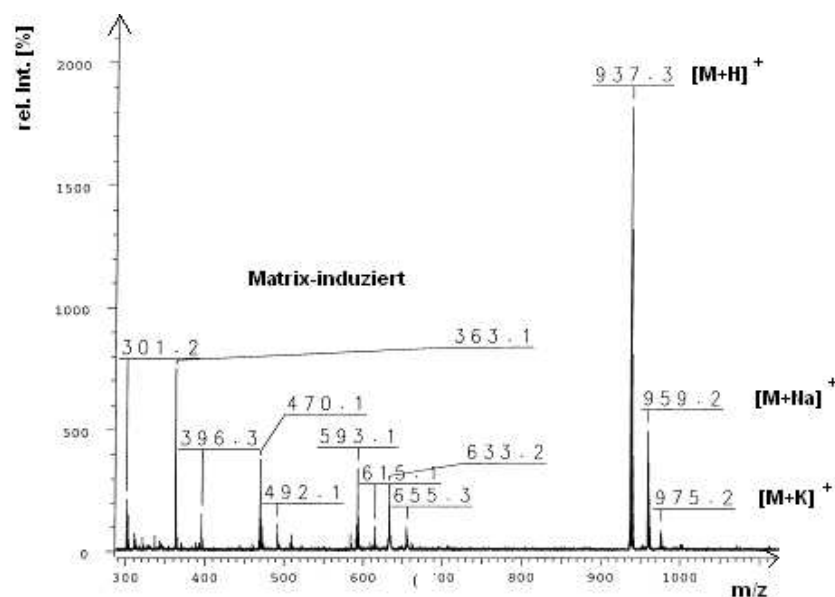


Abbildung 29: MALDI-TOF-Spektrum des Dimers **59** von 3',5'-O-BisTBDMS-4-Hydrazinylthymidin **43**

Dieses Dimer **59** könnte hinsichtlich der Untersuchung der krebserregenden Eigenschaften von DNA-Crosslinks interessant sein.^[87]

4.1.9 Synthese von *N'*-(3',5'-O-Bis(triethylsilyl)- β -D-2'-desoxyriboseyl)-4-(*N,N'*-dimethylhydrazinyl)-5-methylpyrimidin-2-on (**61**)

Zur Darstellung des 3',5'-O-BisTES-4-DiMe-Hydrazinylthymidins **61** wurde zunächst entsprechend dem ersten Schritt der m^5K -Synthese das 3',5'-O-BisTES-4-Triazolylthymidin **40** mit Hydrazin in trockenem und sauerstofffreiem 1,4-Dioxan bei

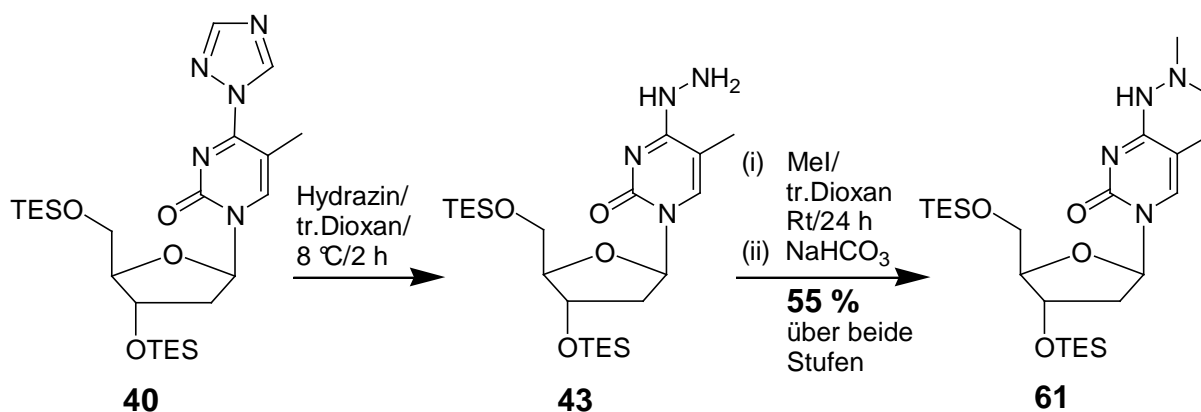


Abbildung 30: Synthese des 3',5'-O-BisTES-4-DiMe-Hydrazinylthymidins **61**

8 °C zu 3',5'- O-BisTES-4-Hydrazinylthymidin **43** umgesetzt. Zur Entfernung des überschüssigen Hydrazins wurde die Reaktionslösung bis *fast* zur Trockene eingeeengt. Die weitere Umsetzung des 3',5'-O-BisTES-4-Hydrazinylthymidins **43** zu dem 3',5'-O-BisTES-4-DiMe-Hydrazinylthymidin **61** erfolgte durch Zugabe von 6 Äquivalenten Methyljodid. Es konnten jedoch keine Ausbeuten höher als 55 % erzielt werden. Die verhältnismäßig schlechte Ausbeute gegenüber der 3',5'-O-BisTBDMS-4-DiMe-Hydrazinylthymidin **55** Synthese spiegelt die in Abschnitt 4.1.3 (S.30) erwähnte Labilität der TES-Schutzgruppe wider.

4.1.10 Synthese von *N'*-(β -D-2'-Desoxyriboseyl)-4-(*N,N'*-dimethylhydrazinyl)-5-methylpyrimidin-2-on (**62**)

Zur Deblockierung der 3'- und der 5'-Hydroxygruppe des 3',5'-O-BisTES-4-DiMe-Hydrazinylthymidins **61** wurden die in Tab.5 (S.43) aufgeführten vier Entschützungs-methoden ausprobiert.

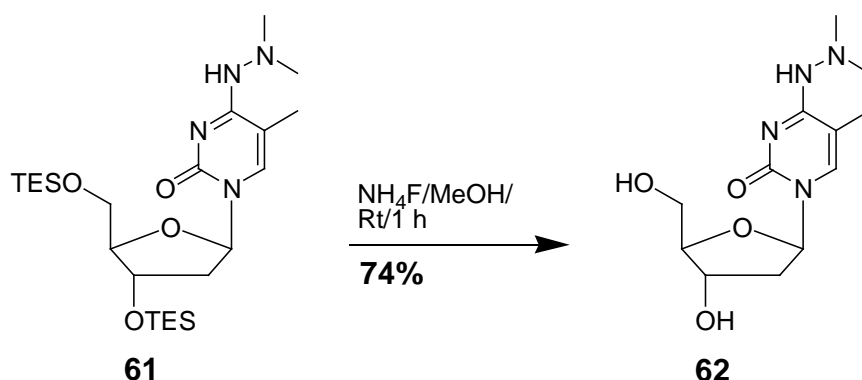


Abbildung 31: Synthese des 4-DiMe-Hydrazinylthymidins **62**

Das beste Ergebnis konnte mit einer Ausbeute von 74 % unter Verwendung von NH_4F in MeOH erzielt werden (Variante **A**). Durch dünnschichtchromatographische Verfolgung der Reaktion zeigte sich, dass sich nach einer Reaktionszeit von einer Stunde nahezu das gesamte Edukt umgesetzt hatte, so dass durch Verlängerung der Reaktionszeit keine Steigerung der Ausbeute erzielt werden konnte. Unter Verwendung von TBAF in THF (Variante **B**) konnte nur eine unzureichende Ausbeute von 45 % erzielt werden.

	Reagenz	Lösungsmittel	Temperatur	Zeit	Ausbeute
A	NH ₄ F	MeOH	RT	1 h	74 %
B	TBAF	THF	RT	2 h	45 %
C	Essigsäure	MeOH/H ₂ O 1:1 v/v	RT	1 d	kein Produkt
D	Et ₃ N·3HF	THF/Et ₃ N	RT	2 h	kein Produkt

Tabelle 5: Varianten zur Deblockierung des 3',5'-O-BisTES-4-DiMe-Hydrazinylthymidins **61**

Bei den beiden letzten Entschützungsversuchen mit Essigsäure in einem Methanol/Wasser-Gemisch (Variante **C**) und mit Triethylamintrihydrofluorid in THF/Et₃N (Variante **D**) konnte in beiden Fällen kein Produkt isoliert werden.

4.1.11 Synthese von *N'*-(5'-(3-MethylcycloSal)-β-D-2'-desoxyribose)-pyrimidin-2-onmonophosphat (**63**)

Die Darstellung des 3-Me-cycloSal-m⁵KMP **63** wurde mit dem für cycloSal-Verbindungen üblichen Syntheseprotokoll durchgeführt.^[88] Nach Umsetzung des m⁵K **29** mit 1.2 Äquivalenten des 5*H*-2-Chloro-8-methylbenzo[3,4-*b*][2,6,1]-dioxaphosphinins **68** in einem DMF/THF-Gemisch (2:1 v/v) bei -20 °C, wobei die entstehende Salzsäure durch langsame Zugabe von Diisopropylethylamin

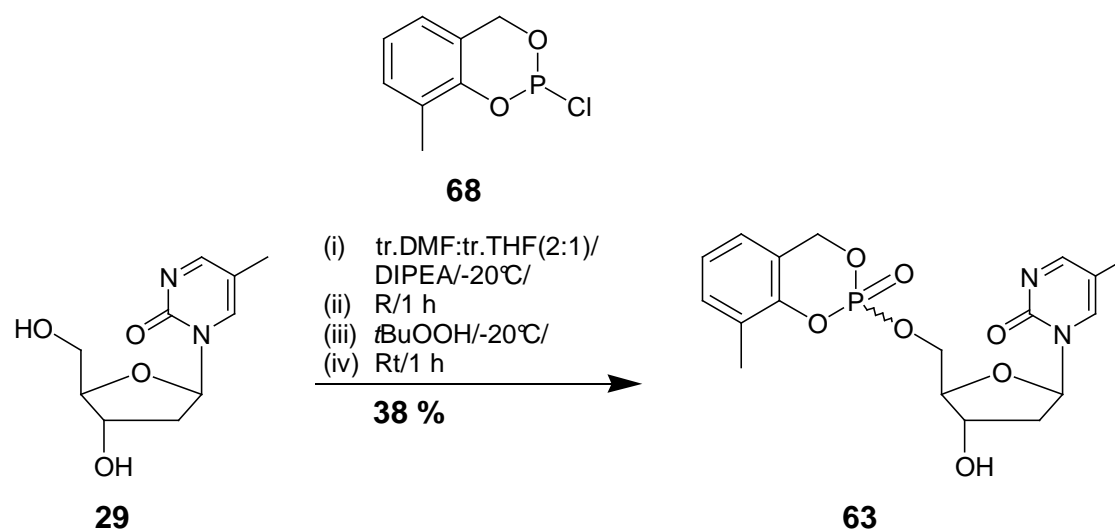


Abbildung 32: Synthese des 3-Me-cycloSal-m⁵KMP **63**

neutralisiert wurde, wurde die intermediär gebildete Phosphor(III)-Verbindung *in situ* mit *tert*-Butylhydroperoxid zu der gewünschten 3-Me-*cycloSal*-Verbindung **63** oxidiert. In Anbetracht der im m^5K **29** anwesenden sekundären 3'-Hydroxygruppe, die mit der primären 5'-Hydroxygruppe um das sterisch nicht anspruchsvolle 3-Methylsaligenylchlorphosphan **68** konkurriert, ist die hier erreichte Ausbeute von 38 % zufriedenstellend.

Zur Charakterisierung von 3-Me-*cycloSal*- m^5KMP **63** (Molmasse = 408 g/mol) wurde das abgebildete MALDI-TOF-Spektrum (Abb.33) aufgenommen, wobei 2,5-Dihydroxybenzoesäure als Matrix diente.

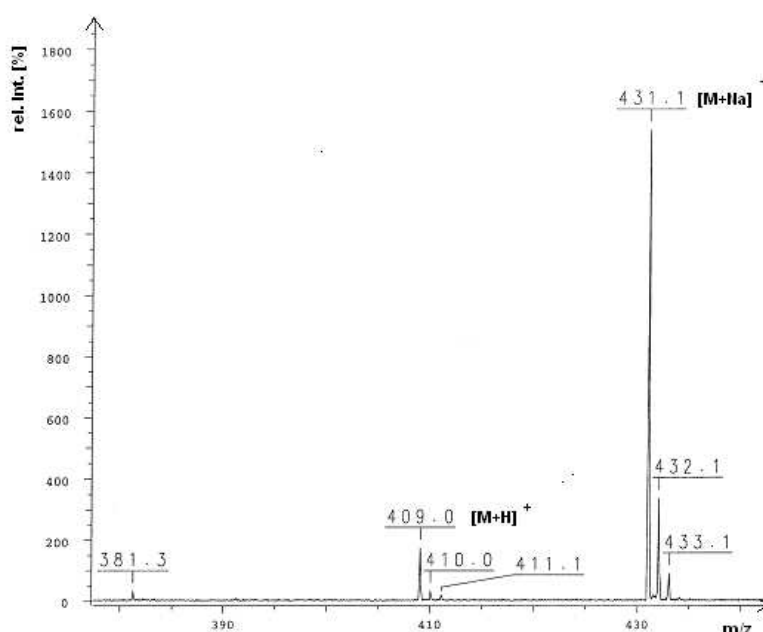


Abbildung 33: MALDI-TOF-Spektrum des 3-Me-*cycloSal*- m^5KMP **63**

Neben dem Peak bei $[M+H]^+ = 409$ m/z ist der Peak bei $[M+Na]^+ = 431$ m/z, welcher durch die für die MALDI-TOF-Spektrometrie typische Adduktbildung mit Alkaliionen verursacht wurde, der Intensitätsstärkste.

Um die Hydrolysestabilität von 3-Me-*cycloSal*- m^5KMP **63** zu untersuchen, wurde eine chemische Hydrolyse bei 37 °C in basischem Phosphat puffer (pH 7.3) durchgeführt. Die Halbwertszeit konnte mit $t_{1/2} = 8.21$ h bestimmt werden und liegt, wie aus der strukturellen Analogie zu erwarten war, im Bereich der Halbwertszeiten von 3-Me-*cycloSal*-dTMP ($t_{1/2} = 8.55$ h) und 3-Me-*cycloSal*-AZTMP ($t_{1/2} = 7.88$ h).^[89] Die beobachtete Beschleunigung der Hydrolyse gegenüber 3-Me-*cycloSal*-NMP-Verbindungen ohne 3'-Hydroxygruppe wie z.B. 3-Me-*cycloSal*-d4TMP ($t_{1/2} = 14.03$ h)

oder 3-Me-*cycloSal*-ddTMP ($t_{1/2} = 14.93$ h)^[89] ist durch die unterstützende Wirkung der 3'-Hydroxygruppe durch Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zum eintretenden Nukleophil zu erklären.

Durch *in vitro* Zelltests konnte gezeigt werden, dass 3-Me-*cycloSal*-m⁵KMP **63** zwar nicht aktiv gegen HIV-1 und HIV-2 ist, jedoch glücklicher Weise nur eine sehr kleine Zytotoxizität aufweist,^[90] so dass es als Fluoreszenzprobe zur Untersuchung der *cycloSal*-Maske in Zellen gut geeignet sein sollte.

4.1.12 Synthese von 3-Methyl-*cycloSal*-2'-desoxy-2'-*ara*-fluoro-zebularin-monophosphat (**65**) und N'-(5'-(3-Methyl-*cycloSal*)- β -D-2'-desoxy ribosyl)-4-(N',N'-dimethylhydrazinyl)-5-methylpyrimidin-2-on-monophosphat (**66**)

Neben 3-Me-*cycloSal*-m⁵KMP **63** wurden noch zwei weitere 3-Me-*cycloSal*-Verbindungen mit der in Abschnitt 4.1.11 (S.43) beschriebenen Methode^[88] dargestellt. Zum einen 3-Me-*cycloSal*-Zebularin-MP **65** und zum anderen 3-Me-*cycloSal*-4-DiMe-Hydrazinyl-dTMP **66**. Die Ausbeuten liegen mit 41 % und 40 % im erwarteten Bereich in Anbetracht der konkurrierenden 3'-Hydroxygruppe.

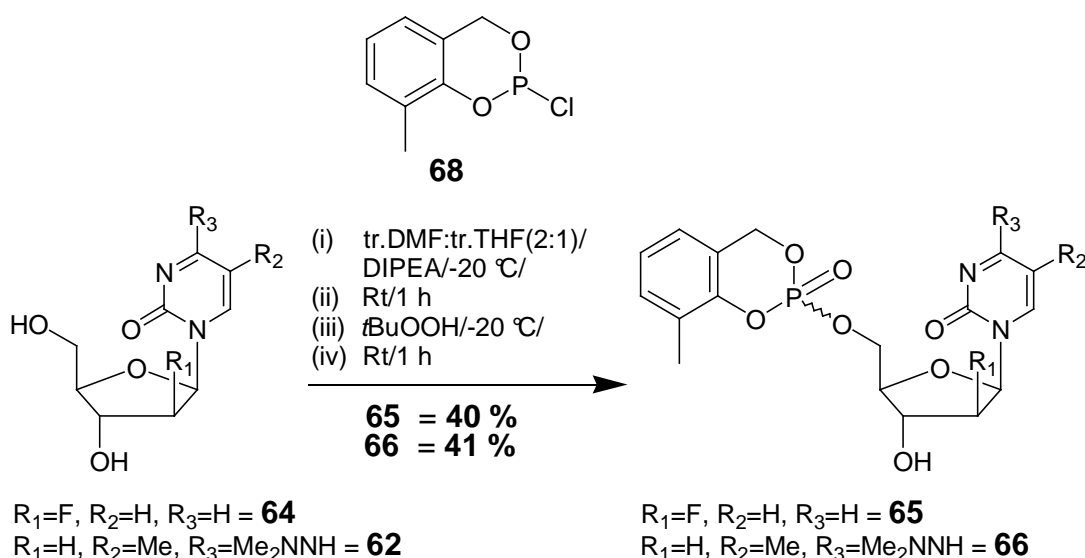


Abbildung 34: Synthese des 3-Me-*cycloSal*-Zebularin-MP **65**
und des 3-Me-*cycloSal*-4-DiMe-Hydrazinyl-dTMP **66**

Das für diese Synthese benötigte 2'-Desoxy-2'-*ara*-fluoro-zebularin **64** wurde freundlicherweise von V. E. MARQUEZ, Laboratory of Medicinal Chemistry, National Cancer Institute, Maryland zur Verfügung gestellt.

4.1.13 Antivirale *in vitro* Aktivitäten von 3-Me-*cycloSal*-2'-Desoxy-2'-*ara*-fluoro-zebularin-MP (**65**) und 3-Me-*cycloSal*-4-DiMe-Hydrazinyl-dTMP (**66**)

Da Nucleoside nur in der Form ihrer Triphosphate in DNA-Stränge eingebaut werden, müssen auch Nucleosidanaloga in ihre Triphosphate metabolisiert werden, bevor sie ihre therapeutische Wirkung entfalten können.^[91] Dies geschieht meistens durch zelleigene Kinasen.^[92] Beispielsweise wird d4T in einer Enzymkaskade erst durch die Thymidinkinase (TK) zum d4TMP, dann durch die Thymidylatkinase zum d4TDP und im letzten Schritt durch die Nucleosiddiphosphat-Kinase zum biologisch aktiven d4TTP phosphoryliert (Abb.35).

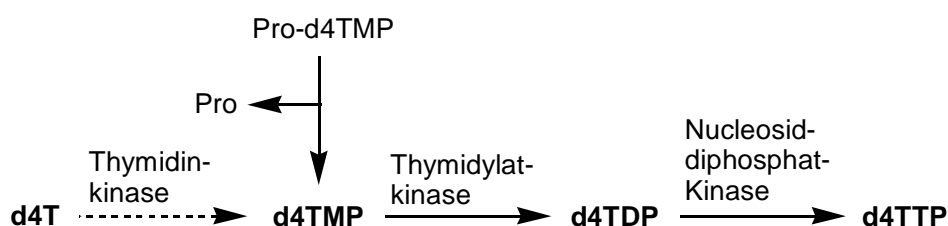


Abbildung 35: Schematische Darstellung des TK-Bypass-Konzepts

Da die beteiligten Kinasen zum Teil eine hohe Substratspezifität aufweisen, können einzelne Phosphorylierungsschritte für Nucleosidanaloga gehemmt sein.^[91] Im Fall des d4T stellt die Phosphorylierung zum d4TMP durch die Thyminkinase den hemmenden Schritt dar. Hier sollte durch direkte Applikation des Monophosphats die therapeutische Wirkung verbessert werden können (TK-Bypass, Abb.35). Jedoch sind freie Monophosphate bedingt durch ihre schlechte passive Membrangängigkeit^[93] und ihren Abbau durch Nucleotidasen und nichtspezifischen Phosphatasen im Blut^[94] nicht einsetzbar. Ein Ausweg bietet hier die Maskierung der Phosphatgruppe mit einer geeigneten Schutzgruppe. Das hierfür von C. MEIER et al. entwickelte *cycloSal*-Konzept^{[95]-[97]} erfüllt alle Anforderungen an ein Prodrug,

den passiven Membrantransport, die Freisetzung am Wirkort und eine nicht toxische Maske.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von J. BALZARINI, Universität Leuven, Belgien, wurden für die beiden 3-Me-*cycloSal*-Verbindungen **65** und **66** *in vitro-anti-HIV*-Tests in Zellkulturen durchgeführt.

Verbindungen	EC ₅₀ (μ M)			CC ₅₀ (μ M)
	CEM/0		CEM/TK ⁻	CEM/0
	HIV-1	HIV-2	HIV-2	
3-Me- <i>cycloSal</i> -4-DiMeHydrazinyl-dTMP 66	50.0 \pm 0.0	40.0 \pm 14.1	50	187 \pm 89.8
3-Me- <i>cycloSal</i> -Zebularin-MP 65	250>50	250>50	250>50	187 \pm 89.8
AZT(Referenz) ^[98]	0.006	0.005	>100	>100

EC₅₀: effektive bzw. benötigte Konzentration für einen 50 %igen Schutz der CEM-Zellen vor der Zytopathogenese von HIV

CC₅₀: Zytotoxische bzw. notwendige Konzentration zur 50 %igen Reduktion vitaler CEM-Zellen

Tabelle 6: *Anti-HIV-Aktivitäten und Zytotoxizitäten der 3-Me-cycloSal-Verbindungen 65 und 66*

Als Testmedium dienten sowohl HIV-1 und HIV-2 infizierte humane T-Lymphozyten (CEM/0) als auch HIV-2 infizierte Thymidinkinase-defiziente humane T-Lymphozyten (CEM/TK⁻).

Während 3-Me-*cycloSal*-Zebularin-MP **65** keinerlei Aktivität gegen HIV-1 und HIV-2 aufweist, konnte bei 3-Me-*cycloSal*-4-DiMeHydrazinyl-dTMP **66** eine geringe Aktivität gegen beide HIV-Stämme nachgewiesen werden, die jedoch im Vergleich zu AZT verschwindend gering ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass hier der gewünschte TK-Bypass durch den Einsatz der *cycloSal*-Maske beschränkt wurde, da die Aktivität in HIV-2 infizierten CEM/TK⁻ Zellen erhalten bleibt.

Bemerkenswert ist, dass sowohl 3-Me-*cycloSal*-4-DiMeHydrazinyl-dTMP **66** als auch 3-Me-*cycloSal*-Zebularin-MP **65** praktisch keine zelltoxische Wirkung haben. Dies ist insofern von Bedeutung, da hierdurch indirekt gezeigt wird, dass im Besonderen die abgespaltene 3-Me-*cycloSal*-Maske nicht zelltoxisch ist.

4.1.14 Fluoreszenzeigenschaften der drei Verbindungen: m^5K (29), 3-Me-cycloSal- m^5KMP (63) und 3',5'-O-BisTBDMS-4-Triazolylthymidin (41)

Zur Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften der drei Verbindungen wurden ihre UV- und Fluoreszenzspektren aufgenommen (Abb.36 und Abb.37, S.49). Sie weisen alle drei, bedingt durch ihre ähnliche Struktur, jeweils eine Absorptionsbande bei $\lambda_{max} = 220$ nm und $\lambda_{max} = 320$ nm auf. Zur Anregung der Fluoreszenz diente eine Wellenlänge von $\lambda_{max} = 325$ nm. Um die Fluoreszenzeigenschaften der drei Verbindungen vergleichen zu können, wurde die Konzentration so eingestellt, dass sie alle eine Absorption von $A = 0.2$ bei $\lambda_{max} = 325$ nm hatten (Abb.36). Aus Abb.37 (S.49) ist zu ersehen, dass alle drei Verbindungen bei einer Emissionswellenlänge von $\lambda_{max} = 386$ nm fluoreszieren. Die größte Fluoreszenzquantenausbeute besitzt 3',5'-O-BisTBDMS-4-Triazolylthymidin **41**, was auch während der Aufarbeitung der m^5K -Synthese bei der DC-Analytik beobachtet werden kann (siehe 4.1.3, S.30).

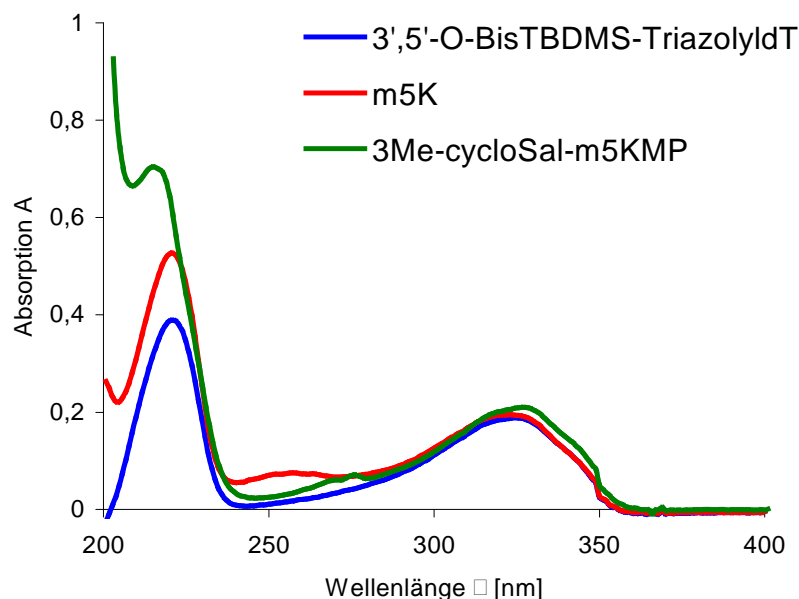


Abbildung 36: UV-Spektren des m^5K **29**, 3-Me-cycloSal- m^5KMP **63** und des 3',5'-O-BisTBDMS-4-Triazolylthymidins **41**

Grund hierfür können sowohl die elektronischen als auch die sterischen Eigenschaften des mit der Base in Konjugation stehenden Triazolrings sein. Durch seinen sterischen Einfluss könnte die Flexibilität der Base herabgesetzt und damit die Lebensdauer des S_0 -Schwingungsgrundzustands verlängert sein. Bezüglich des

elektronischen Einflusses wurde beobachtet, dass durch die Einführung eines +M-Substituenten in die 4-Position der Base (z.B. 3',5'-O-BisTES-4-*N,N'*-DiMe-Hydrazinylthymidin **42**) die Fluoreszenz zusammenbricht.

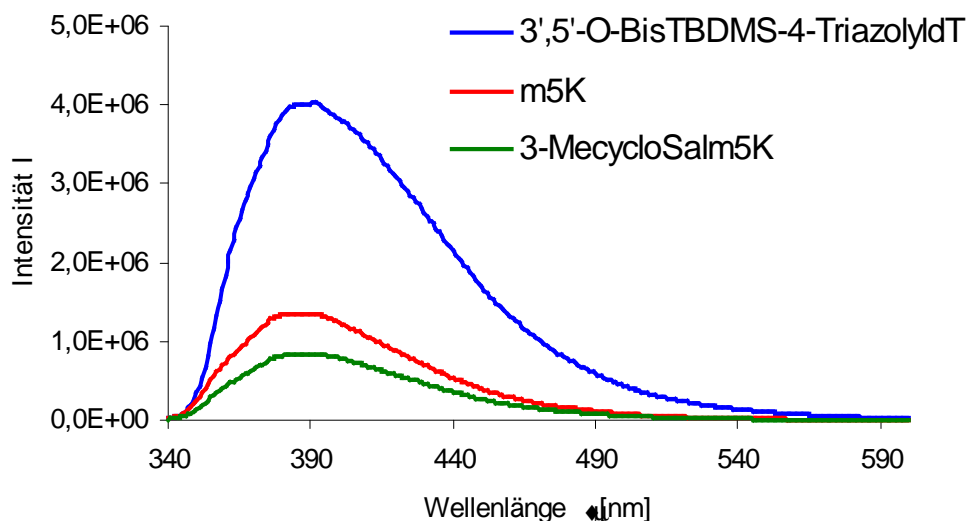


Abbildung 37: Fluoreszenzspektren des m⁵K **29**, 3-Me-cycloSal-m⁵KMP **63** und des 3',5'-O-BisTBDMS-4-Triazolyldthymidins **41**

Bemerkenswert ist die ca. 40 % schwächere Fluoreszenz von 3-Me-cycloSal-m⁵KMP **63** im Vergleich zu m⁵K **29** und stimmt mit der Beobachtung von T. M. NORDLUND et al. überein, dass die Fluoreszenz von m⁵K **29** sensibel auf die chemische Umgebung reagiert.^[99] Diese Erniedrigung kann durch eine teilweise Löschung (quenching) der Fluoreszenz durch die cycloSal-Gruppe hervorgerufen werden, sofern eine Konformation vorliegt in der diese parallel zur Base des m⁵K **29** angeordnet ist. Genau diese Konformation konnte durch Röntgenstrukturuntersuchungen von (R_P)-3-Tertbutyl-5-formyl-cycloSal-d4TMP nachgewiesen werden, die eine π - π -Wechselwirkung zwischen den beiden aromatischen Ring belegt.^[100] Diese konformationsbedingte Erniedrigung der Fluoreszenz ermöglicht die Verfolgung der chemischen Hydrolyse der cycloSal-Gruppe über den daraus resultierenden Anstieg der Fluoreszenz.

4.1.15 Synthese von *N*'-(5'-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- β -D-2'-desoxyriboseyl)-5-methylpyrimidin-2-on (**46**)

Damit das m^5K **29** in der standardisierten Oligonucleotid-Festphasensynthese eingesetzt werden kann, muss die 5'-Hydroxygruppe mit der üblich verwendeten 4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl-Schutzgruppe (DMTr) blockiert werden.

Die DMTr-Schutzgruppe konnte ohne weitere Probleme nach der Standardmethode unter basischen Bedingungen in trockenem Pyridin mit einer durchschnittlichen Ausbeute von 84 % eingeführt werden. Anders als bei der Isolierung des 5'-O-DMTr-Thymidins **79** mittels Umkristallisation (siehe 4.2.2, S.57) wurde das 5'-O-DMTr- m^5K **46** chromatographisch an Kieselgel gereinigt.

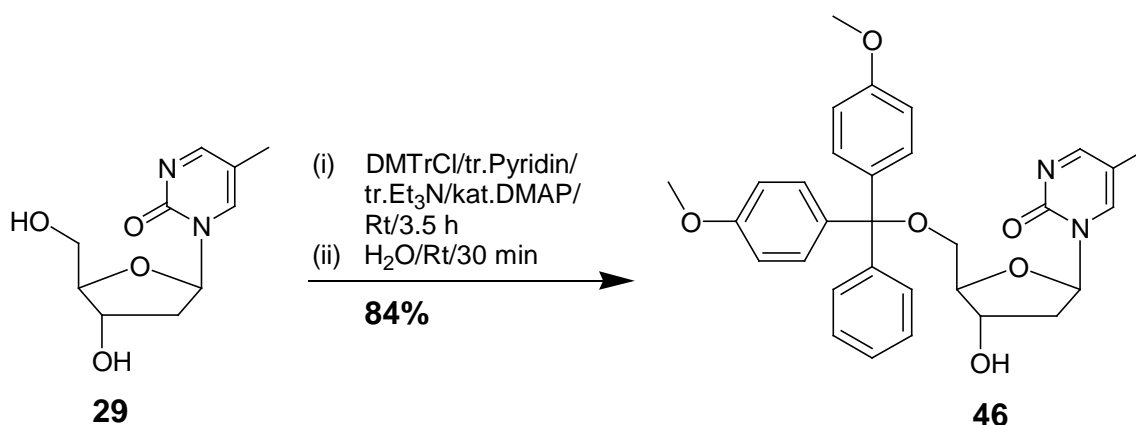


Abbildung 38: Synthese des 3'-O-DMTr- m^5K **46**

Als Eluent diente Dichlormethan mit einem Methanolgradienten (0-4 %), wobei dem Eluenten 1 % Triethylamin zugesetzt worden war, um die sauer katalysierte Entschützung der DMTr-Gruppe durch das Kieselgel zu unterbinden.

4.1.16 Synthese von *N*'-(3'-O-(2-cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylamino)-phosphino)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)- β -D-2'-desoxyriboseyl)-5-methylpyrimidin-2-on (**31**)

Die Synthese des 5'-O-DMTr- m^5K -3'-O-Amidits **31** erfolgte mit 2-Cyanoethoxybis-(*N,N*-diisopropylamino)phosphin **67** nach dem Standard-Syntheseprotokoll unter saurer Katalyse in trockenem Acetonitril. Da das früher als saurer Katalysator

verwendete 1*H*-Tetrazol (pK_a ca. 4.7) nach dem deutschen Sprengstoffgesetz nicht mehr verwendet werden darf (SprengG §5 Abs. 2 Satz. 3), wurde hier 4,5-Dicyanoimidazol (DCI) eingesetzt. Auch ist das etwas nucleophilere DCI (pK_a ca. 5.2) nicht so sauer wie 1*H*-Tetrazol, so dass mit ihm die Detritylierung als Nebenreaktion bei längeren Kupplungszeiten vermieden werden kann.^[101] Durch chromatographische Reinigung des Rohprodukts über Silicagel konnte das durch Hydrolyse des Phosphoramidits entstandene *H*-Phosphonat nicht abgetrennt werden. Dieses ließ sich im ¹H-NMR-Spektrum durch das für *H*-Phosphonate typische Duplett bei einer chemischen Verschiebung von $\delta = 6.90$ ppm mit einer ¹J-Phosphor-Wasserstoff-Kopplung von $^1J_{P-H} \approx 640$ Hz nachweisen.

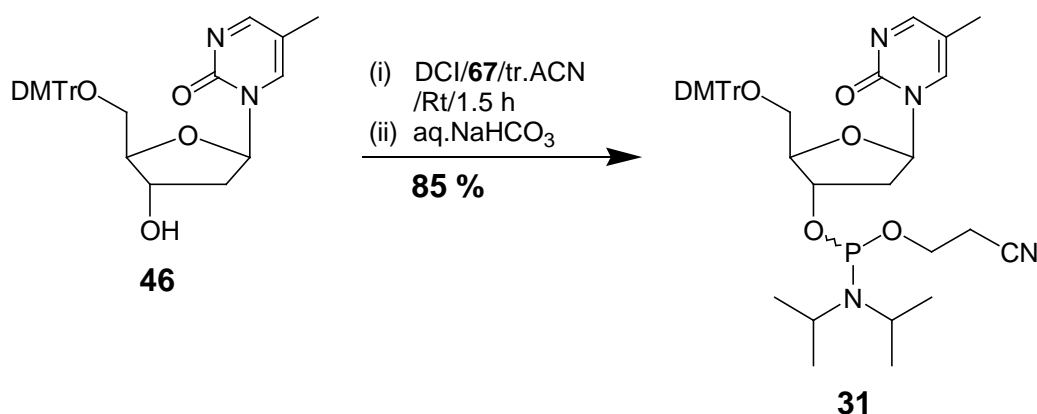


Abbildung 39: Synthese des 5'-O-DMTr-*m*⁵K-3'-O-Amidits **31**

Zur Abtrennung des unerwünschten *H*-Phosphonats wurde Alox (neutral) der Aktivitätsstufe 3 verwendet, wobei es zur Unterdrückung der Hydrolyse notwendig war, dem Eluenten 1 % Triethylamin zuzusetzen. Zur Überprüfung, ob das Phosphoramidit **31** unter diesen Bedingungen stabil ist, wurde es in einer Suspension von Alox in Acetonitril/Triethylamin über längere Zeit gerührt. Durch dünnschichtchromatographische Überprüfung konnte die Stabilität des Phosphoramidits **31** nachgewiesen werden. Die beiden bei der Synthese durch die Generierung eines stereogenen Zentrums am Phosphoratom anfallenden Diastereomere konnten nicht getrennt werden. Da bei der Oligonucleotidsynthese das stereogene Zentrum am Phosphoratom durch dessen Oxidation und anschließender Eliminierung der 2-Cyanoethyl-Schutzgruppe verloren geht, ist die Trennung der Diastereomere nicht nötig.

4.1.17 Synthese von 4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion (PTAD) (37)

Da käuflich erhältliches PTAD **37** wegen seiner hohen Reaktivität (es ist eines der stärksten bekannten Dienophile^[102]) und seiner Lichtempfindlichkeit zumeist minderer Qualität und zudem sehr teuer ist, wurde das zur m⁵K **29** Synthese benötigte PTAD **37** frisch aus 4-Phenyl-1,2,4-triazolidin-3,5-dion **69** dargestellt. Zur Synthese des PTAD **37** wurde das 4-Phenyl-1,2,4-triazolidin-3,5-dion **69** mit *N*-Bromsuccinimid **70** (NBS) in Dichlormethan bei 0 °C über 30 Minuten oxidiert, wobei sich die Reaktionslösung durch die Bildung von PTAD tief rot färbte.

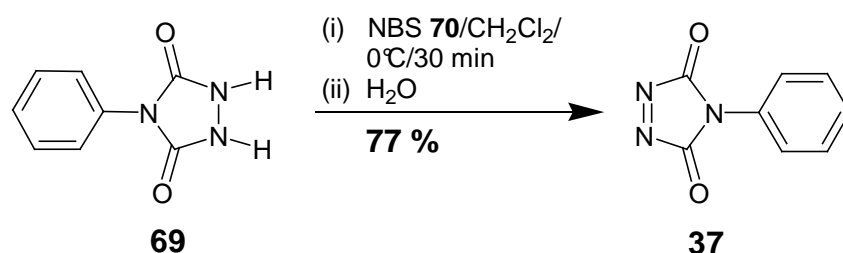


Abbildung 40: Synthese des 4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dions (PTAD) **37**

Die Aufarbeitung bestand in wiederholtem Waschen der Reaktionslösung mit destilliertem Wasser bis die organische Phase eine *klare* dunkelrote Lösung bildete, aus der nach Einengen tief dunkelrote amorphe PTAD-Kristalle ausfielen. Bei der Aufarbeitung ist zu beachten, dass durch wiederholtes Waschen der organischen Phase das PTAD **37** vollständig zersetzt werden kann. Es hat sich nach einigen Versuchen gezeigt, dass zweimaliges starkes Waschen mit der zu der organischen Phase äquivalenten Menge an destilliertem Wasser jeweils über ca. 2 Minuten eine optimale Abtrennung der Nebenprodukte gewährleistet, ohne nennenswerte Mengen an PTAD zu verlieren.

In Abb.41 (S.53) ist ein möglicher radikalischer Reaktionsmechanismus der PTAD **37** Synthese dargestellt. Demnach wird zunächst ein am Stickstoff gebundenes Wasserstoffatom des 4-Phenyl-1,2,4-triazolidin-3,5-dions **69** durch ein aus dem NBS **70** stammenden Bromradikal (**71**) abstrahiert. Im zweiten Schritt (**72**) der Reaktion wird das verbliebene Wasserstoffatom homolytisch unter Bildung einer *N-N*-Doppelbindung durch ein Succinylradikal abgespalten.

Mit der oben beschriebenen Aufarbeitung konnte eine zufriedenstellende Ausbeute von 77 % erzielt werden. Da sich der während der Synthese gebildete

Bromwasserstoff durch das zweimalige Waschen nicht restlos abtrennen lässt, müssen zu dessen Entfernung die PTAD-Kristalle mindestens zwei Tage im Ölpumpenvakuum getrocknet werden.

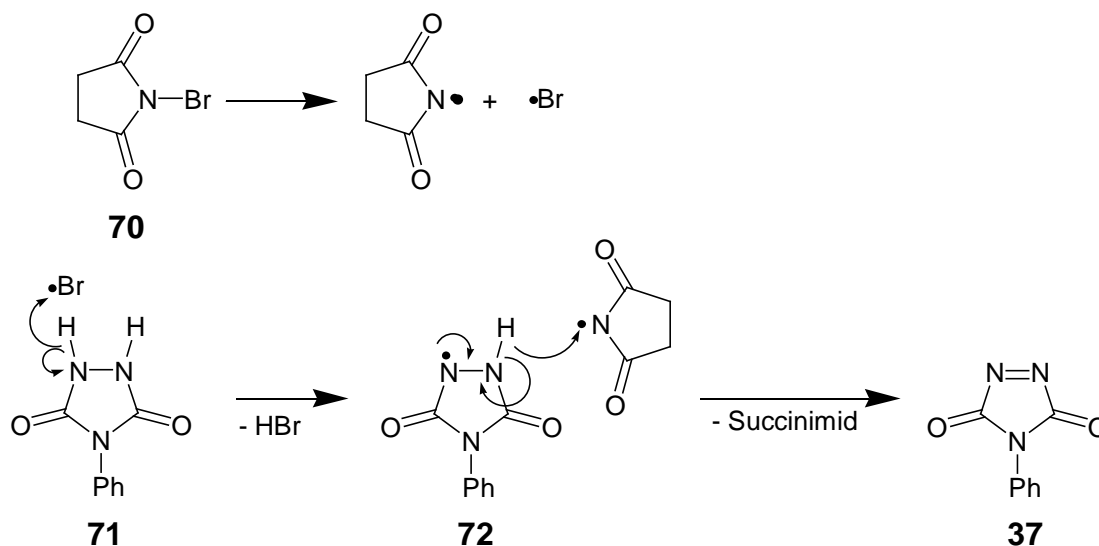


Abbildung 41: Möglicher radikalischer Reaktionsmechanismus der PTAD **37**
Synthese mit NBS **70**

Weiterhin hatte es sich gezeigt, dass PTAD lichtempfindlich ist. Wird PTAD in einem Glasbehältnis ein bis zwei Tage dem Sonnenlicht ausgesetzt, bildet sich eine leicht gelbliche Schicht um die PTAD-Kristalle. So ist es notwendig, die Synthese und die Aufarbeitung unter Lichtausschluss durchzuführen, um eine gute "PTAD-Qualität" zu erhalten.

4.2 SYNTHESE DER R_P - und S_P -5'-O-DMTR-PHTHALIDYL-PHOSPHONATDIESTER-3'-O-AMIDITE (R_P)-**30** und (S_P)-**30**

4.2.1 Retrosynthetische Analyse und Synthesepanung

In der Darstellung des DNA-Synthesebausteins 5'-O-DMTr-Phthalidylphosphonatester-3'-O-amidits **30** bietet sich der *H*-Phosphonatester **74** als geeignetes Intermediat an. Aus dem *H*-Phosphonatester **74** lässt sich durch basische Addition von 2-Carboxylbenzaldehyd und anschließender Lactonisierung der 3',5'-O-geschützte Phthalidylphosphonatester **73** darstellen. Nach Entschützung der

3'-Hydroxygruppe sollte das gewünschte 5'-O-DMTr-Phthalidylphosphonat-3'-O-Amidit **30** leicht erhältlich sein (Abb.42).

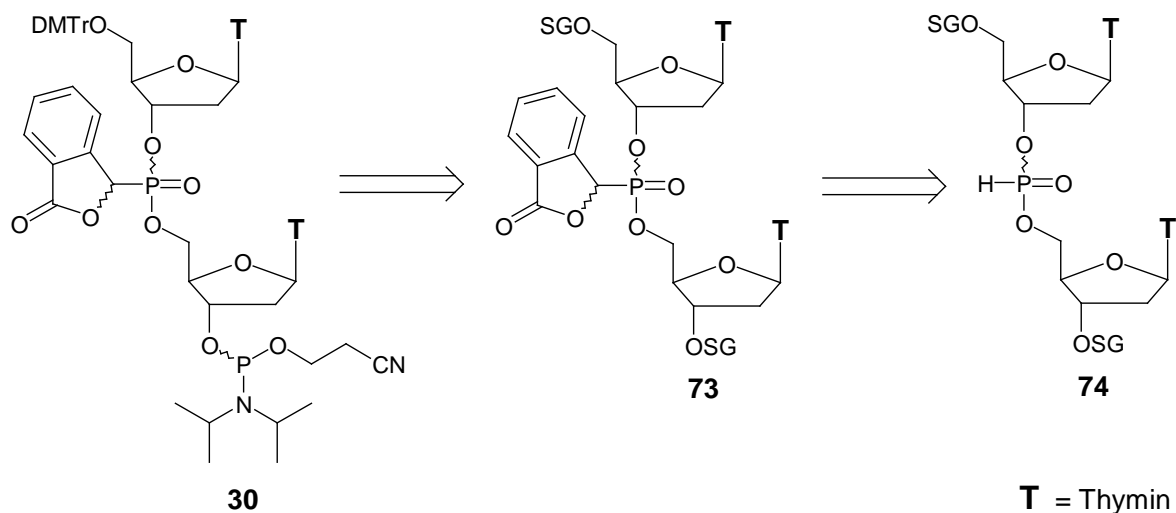


Abbildung 42: Retrosynthese des Phthalidylphosphonatdiester-3'-O-amidits **30**

Während der Synthese des Phthalidylphosphonatdiesters **73** werden zwei stereogene Zentren aufgebaut, eins am Phosphoratom und eins an dem zu ihm α -ständigen Kohlenstoffatom. Da hier insbesondere die Stereochemie der Phosphoratom eine großen Einfluss auf verschiedene Eigenschaften eines Oligonucleotids haben, ist es wünschenswert diastereomerenreine Verbindungen bezüglich des Phosphoratoms zu erhalten. Weil sich eine Mischung der vier Diastereomere nicht chromatographisch trennen lässt,^[103] sollten die beiden stereogenen Zentren nacheinander aufgebaut werden.

Eine notwendige Voraussetzung für diesen Syntheseweg ist, dass der Aufbau des stereogenen Zentrums am α -Kohlenstoffatom unter Retention der Konfiguration des stereogenen Zentrums am Phosphoratom verläuft. F. SEELA et al. konnte zeigen, dass die Methylierung von *H*-Phosphonatdiestern unter Retention der Konfiguration verläuft.^[104] Desweiteren konnte J. STEC et al. an Hand von Nucleosid-3'-O-Methanphosphonanilidaten belegen, dass die Substitution des Anilids am Phosphoratom mit 3'-O-Acetylnucleosiden ebenfalls unter Retention verläuft.^[105]

Der *H*-Phosphonatdiester **74** bietet sowohl den schrittweisen Aufbau beider stereogenen Zentren, als auch den Erhalt der Konfiguration am Phosphoratom. Er ist über zwei unterschiedliche Synthesewege erhältlich (Abb.43, S.55). Syntheseweg **A** geht von einem 5'-*H*-Phosphonatmonoester **75** aus, der mit 5'-O-geschütztem

Thymidin **76** gekuppelt wird. Wohingegen bei Syntheseweg **B** ein 3'-*H*-Phosphonatmonoester **77** mit 3'-*O*-geschütztem Thymidin **78** umgesetzt wird.

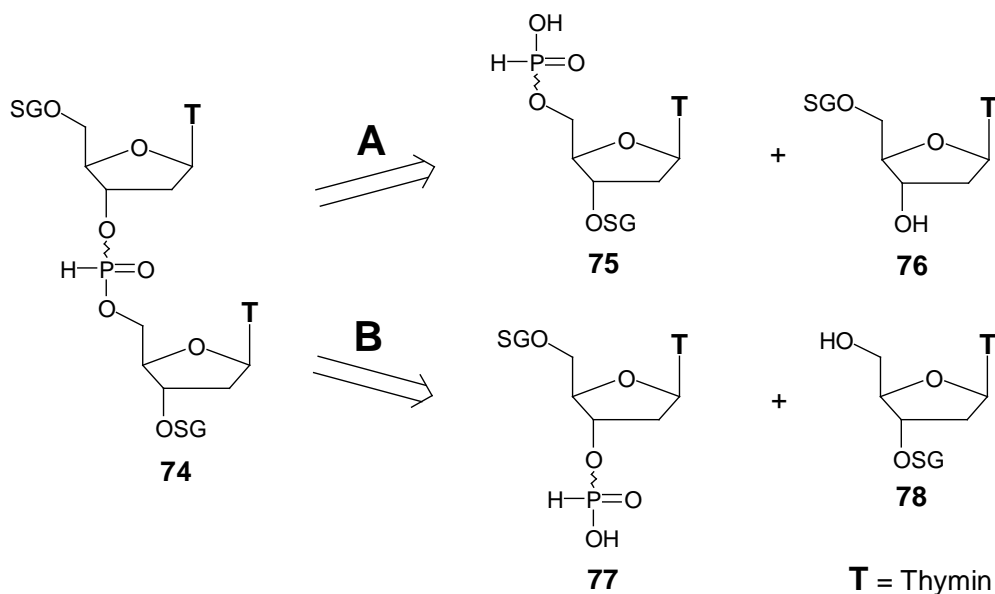


Abbildung 43: Retrosynthese des *H*-Phosphonatediesters **74**

In dieser Arbeit wurde der Syntheseweg **B** besprochen, da dieser sowohl in Arbeiten von STRAWINSKI et al.^{[107],[107]} als auch in unserer Arbeitsgruppe^{[103],[108],[109]} verwendet wurde. Für die Kupplung des 5'-geschützten 3'-*H*-Phosphonatmonoesters **77** mit 3'-*O*-geschütztem Thymidin **78** ist es notwendig, dass die entsprechenden Hydroxygruppen in der 3'- und der 5'-Position passend geschützt werden. Bei der Wahl der Schutzgruppen ist darauf zu achten, dass sie sich orthogonal zueinander verhalten, da für die Synthese des Phthalidylphosphonatediester-3'-*O*-amidits **30** deren Differenzierung notwendig ist. Auch müssen beide Schutzgruppen stabil gegenüber Basen sein, da sowohl die Synthese des 3'-*H*-Phosphonatmonoesters **77** als auch des *H*-Phosphonatediesters **74** und des Phthalidylphosphonatediesters **73** unter basischen Bedingungen durchgeführt wird. Des Weiteren könnten sterisch anspruchsvolle Schutzgruppen in 3'- und 5'-Position die Flexibilität des *H*-Phosphonatediesters **74** verringern, wodurch die Differenz der Retentionszeiten der beiden *H*-Phosphonatediester (*R_P*)-**74** und (*S_P*)-**74** erhöht werden könnte und somit deren chromatographische Trennung erleichtert werden würde.

Für den Einsatz des Phthalidylphosphonatediesters **73** in der Oligonucleotid-Festphasensynthese muss die 5'-Hydroxygruppe mit der DMTr-Schutzgruppe blockiert sein. Eine Einführung dieser Schutzgruppe zu Beginn der Synthese würde

einen späteren Austausch der 5'-O-Schutzgruppe vermeiden. Die DMTr-Gruppe erfüllt alle oben genannten Kriterien für die Blockierung der 5'-Hydroxygruppe. Sie besitzt eine hohe Stabilität gegenüber Basen und hat zusätzlich einen hohen sterischen Anspruch. Neben ihrer Eigenschaft, sich selektiv in die 5'-Position einführen zu lassen, ist sie unter mild sauren Bedingungen quantitativ abspaltbar. Für die 3'-Hydroxygruppe bietet sich die *tert*-Butyldiphenylsilylschutzgruppe (TBDPS) an, da sie ebenfalls unter wasserfrei basischen Bedingungen stabil ist und einen hohen sterischen Anspruch hat.

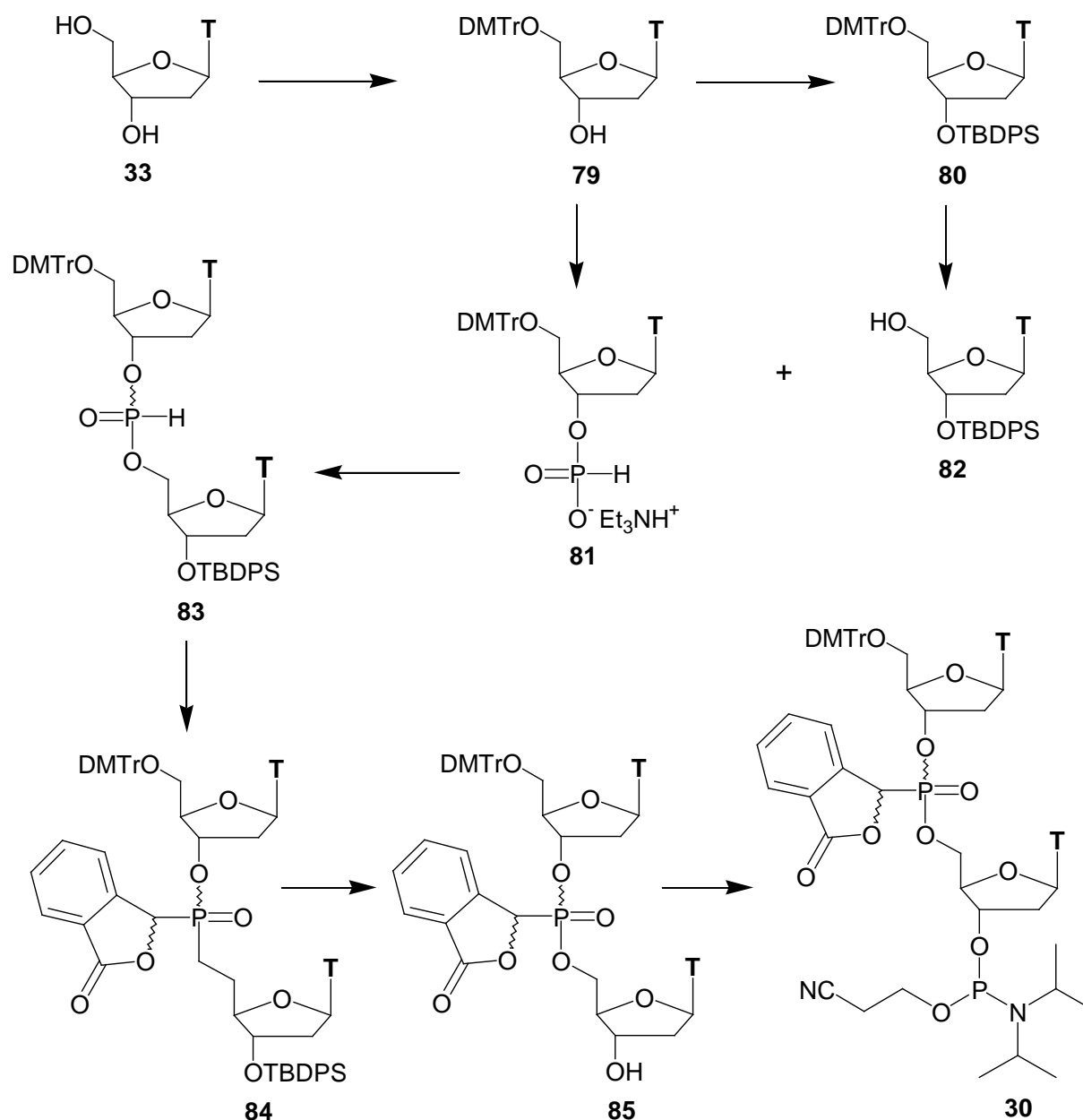


Abbildung 44: Synthesepfad der R_P - und S_P -5'-O-DMTr-Phthalidylphosphonate diester-3'-O-amidite (R_P)-30 und (S_P)-30

Weil sich die TBDPS-Gruppe unter milden Bedingungen mit Fluoridionen abspalten lässt, verhält sie sich orthogonal zur DMTr-Schutzgruppe. So kann sie durch eine *temporäre* Blockierung der 5'-Hydroxygruppe mit der DMTr-Gruppe eingeführt werden.

Aus der oben beschriebenen retrosynthetischen Analyse ergibt sich der in Abb.44 (S.56) dargestellte Synthesepfad des 5'-O-DMTr-Phthalidylphosphonatdiester-3'-O-amidits **30**. Im ersten Syntheseschritt wird die 5'-Hydroxygruppe von Thymidin **33** mit der DMTr-Schutzgruppe blockiert. Von 5'-O-DMTr-Thymidin **79** ausgehend wird sowohl der 5'-O-DMTr-3'-*H*-Phosphonatmonoester **81** als auch 3'-O-TBDPS-5'-O-DMTr-Thymidin **80** dargestellt, aus dem anschließend durch Abspaltung der DMTr-Gruppe 3'-O-TBDPS-Thymidin **82** zugänglich wird.

Durch Kondensation des 3'-*H*-Phosphonatmonoesters **81** mit 3'-O-TBDPS-Thymidin **82** lässt sich der zweifach geschützte 3'-O-TBDPS-5'-O-DMTr-*H*-Phosphonatdiester **83** als Gemisch beider Diastereomere (R_P)-**83** und (S_P)-**83** darstellen, die zur weiteren Synthese chromatographisch voneinander getrennt werden müssen.

Ausgehend von den diastereomerenreinen *H*-Phosphonatdiestern (R_P)-**83** und (S_P)-**83** werden die 3'-O-TBDPS-5'-O-DMTr-Phthalidylphosphonatdiester (R_P)-**84** und (S_P)-**84** durch Addition von 2-Carboxylbenzaldehyd an die Phosphorwasserstoffbindung mit anschließender Lactonisierung dargestellt. Nach der Entschützung der 3'-Hydroxygruppe zu den 5'-O-DMTr-Phthalidylphosphonatdiestern (R_P)-**85** und (S_P)-**85** erfolgt im letzten Schritt der Synthese die Darstellung der 5'-O-DMTr-Phthalidylphosphonatdiester-3'-O-amidite (R_P)-**30** und (S_P)-**30**.

4.2.2 Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)thymidin (**79**)

Die 5'-Hydroxygruppe des Thymidins **33** wurde mit der für die Oligonucleotid-Festphasensynthese gebräuchlichen und unter sauren Bedingungen quantitativ abspaltbaren DMTr-Schutzgruppe als 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylether blockiert. Zur Synthese des 5'-O-DMTr-Thymidins **79** wurde Thymidin **33** mit DMTrCl in trockenem Pyridin mit stöchiometrischen Mengen von trockenem Triethylamin und katalytischen Mengen an DMAP umgesetzt. Die Reinigung erfolgte durch wiederholte Umkristallisation aus Benzol/Ethylacetat (10:1 v/v).



Abbildung 45: Synthese des 5'-O-DMTr-Thymidins **79**

Da schon Spuren von Pyridin stark löslichkeitsvermittelnd wirken, sollte zu dessen Entfernung das Rohprodukt vor der Umkristallisation mehrmals mit Toluol koevaporiert werden. Auch ist es für eine maximale Ausbeute ratsam, bei der ersten Umkristallisation das Benzol sehr langsam hinzuzugeben und kein Ethylacetat zu verwenden. Es konnten so stets Ausbeuten von ca. 85 % erreicht werden.

4.2.3 Synthese von Triethylammonium-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)thymidyl-3'-H-phosphonat (**81**)

Die *H*-Phosphonatgruppe wurde unter Verwendung von Phosphor(III) in die 3'-O-Position des 5'-O-DMTr-Thymidins **79** eingeführt.

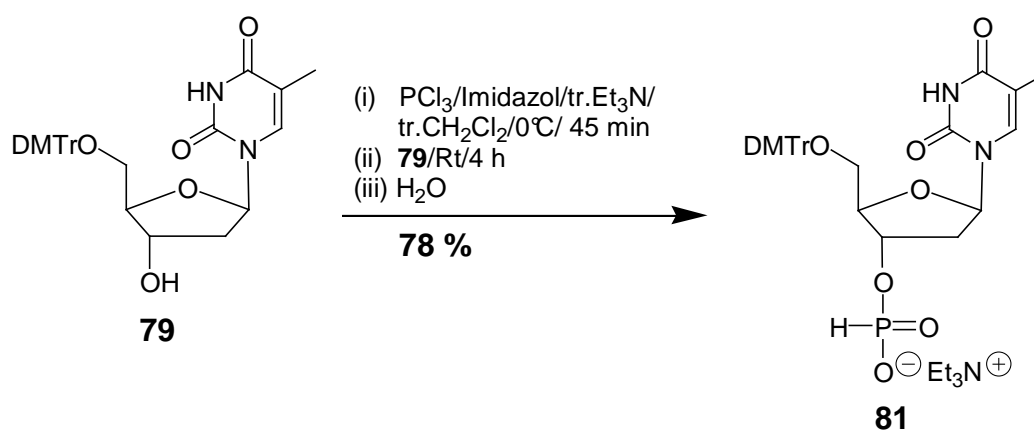


Abbildung 46: Synthese des 5'-O-DMTr-Thymidin-3'-H-Phosphonats **81**

Hierzu wurde Phosphortrichlorid mit Imidazol und Triethylamin *in situ* zu dem reaktiven Phosphortriimidazol umgesetzt, das nach Reaktion mit 5'-O-DMTr-

Thymidin **79** und anschließender Hydrolyse den gewünschten 3'-*H*-Phosphonatmonoester **81** mit Ausbeuten bis zu 78 % bildete.

5'-*O*-DMTr-3'-*H*-Phosphonatmonoester **81** lässt sich durch die für *H*-Phosphonate übliche chemische Verschiebung im ^{31}P -NMR-Spektrum von $\delta = 4.46$ ppm und der typischen Kopplungskonstante zwischen dem Phosphoratom und dem an ihm gebundenen Wasserstoffatom von $^1J_{\text{P-H}} = 617.7$ Hz leicht charakterisieren. Weiterhin konnten die Kopplungskonstanten zwischen dem Phosphoratom und dem 3'-Wasserstoffatom mit $^3J_{\text{P-H}3'} = 8.8$ Hz und dem 3'-Kohlenstoffatom mit $^2J_{\text{P-C}3'} = 4.0$ Hz ermittelt werden.

4.2.4 Synthese von 5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-*O*-(*tert*-butyl-diphenylsilyl)thymidin (**80**)

Die 3'-Hydroxygruppe des 5'-*O*-DMTr-Thymidins **79** wurde mit TBDPSCI als Silylether **80** blockiert. Statt der schon erprobten Äthyläthylgruppe^[83] wurde die zur DMTr-Gruppe orthogonale TBDPS-Schutzgruppe wegen ihres wesentlich höheren sterischen Anspruchs gewählt. So wurde die gewünschte Rigidität des 3'-*O*-TBDPS-5'-*O*-DMTr-Phthalidylphosphonat-diesters **84** für die Aufklärung der absoluten Konfiguration am α -Kohlenstoff erhöht (Anhang A, S.198).^[103]

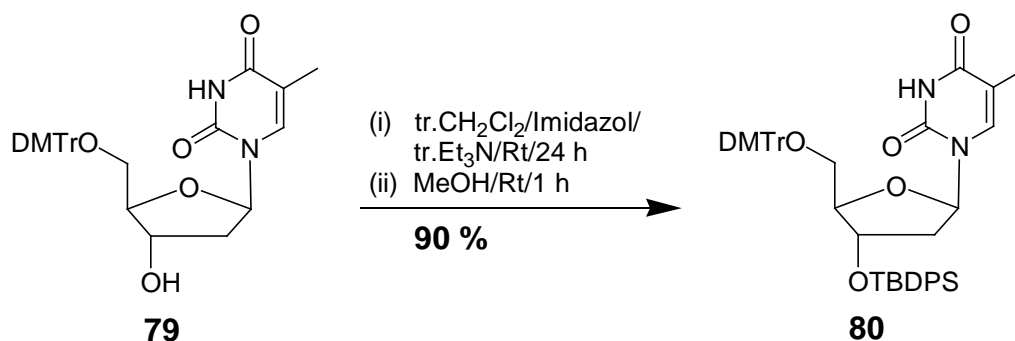


Abbildung 47: Synthese des 3'-*O*-TBDPS-5'-*O*-DMTr-Thymidins **80**

Durch den sterischen Anspruch der TBDPS-Gruppe im Zusammenspiel mit der sekundären Position der 3'-Hydroxygruppe war eine relativ drastische Reaktionsführung von Nöten, um eine hohe Ausbeute zu erhalten. Diese wurde in früheren Arbeiten mit dem Aktivatorsystem Imidazol/Triethylamin in trockenem Dichlormethan gefunden.^[103] So konnten Ausbeuten bis zu 90 % erzielt werden.

4.2.5 Synthese von 3'-O-(*tert*-Butyldiphenylsilyl)thymidin (**82**)

Die Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe von der 5'-O-Position des 3'-O-TBDPS-5'-O-DMTr-Thymidins **80** konnte quantitativ mit einer Lösung von *para*-Toluolsulfonsäure (*p*-TSA) in Dichlormethan/Methanol (7:3 v/v) über 10 Minuten bei Raumtemperatur erzielt werden. Zur Neutralisation wurde eine kaltgesättigt methanolische Ammoniak-Lösung verwendet. Da sich das gebildete *p*-TSA-Salz nicht in Dichlormethan löst, konnte der Großteil leicht durch Einengen der Reaktionslösung und Extraktion des Rückstands mit Dichlormethan abgetrennt werden.

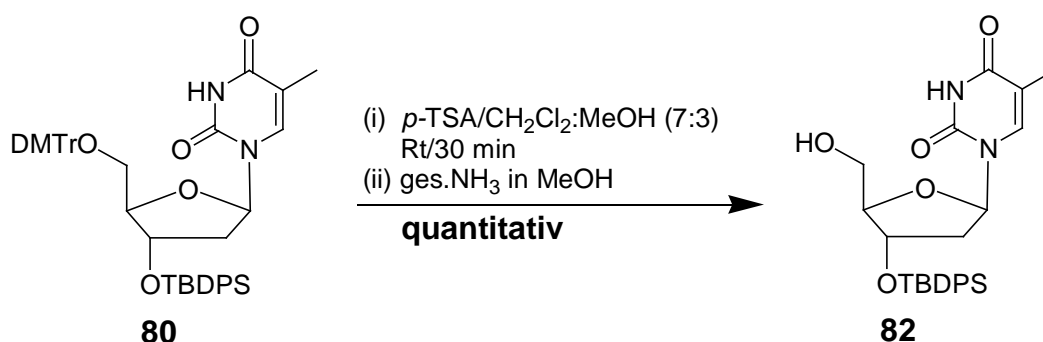


Abbildung 48: Synthese des 3'-O-TBDPS-Thymidins **82**

4.2.6 Synthese der *R_P*- und *S_P*-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidyl-[5'→3']-3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)thymidyl-*H*-Phosphonate (*R_P*)-**83** und (*S_P*)-**83**

Zur Synthese des (*R/S_P*)-3'-O-TBDPS-5'-O-DMTr-*H*-Phosphonatdiesters (*R/S_P*)-**83** wurde der 5'-O-DMTr-3'-*H*-Phosphonatmonoester **81** mit 3'-O-TBDPS-Thymidin **82** unter Verwendung von frisch destilliertem Pivaloylchlorid als Aktivator in trockenem Dichlormethan gekuppelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer 5 %igen wässrigen Natriumhydrogencarbonat-Lösung bei 0 °C abgebrochen.

Bei einer vorsichtigen Reaktionsführung konnten Ausbeuten bis zu 82 % des 1 zu 1 Gemischs von (*R_P*)-**83** und (*S_P*)-**83** erzielt werden. Es muss genau darauf geachtet werden, dass die Zugabe des Pivaloylchlorids sehr schnell erfolgt und die Reaktionszeit von 11 Minuten und 30 Sekunden eingehalten wird, um die

O-Acylierung des dem Phosphonsäurediester tautomeren Phosphorigsäurediesters weitgehendst zu unterdrücken.^[103]

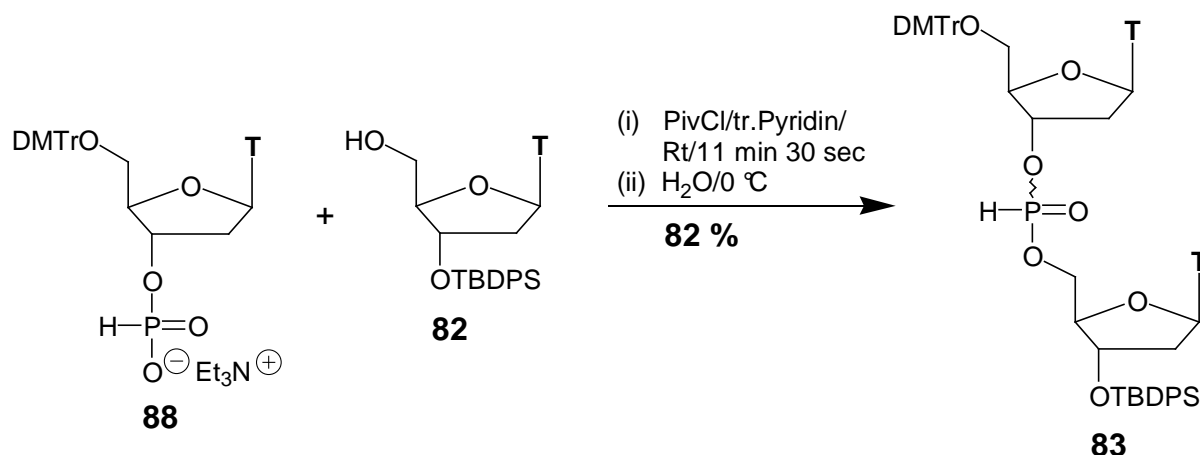


Abbildung 49: Synthese des 3'-O-TBDPS-5'-O-DMTr-H-Phosphonatdiesters **83**

4.2.7 Trennung der R_P- und S_P-3'-O-TBDPS-5'-O-DMTr-H-Phosphonatdiester (R_P)-**83** und (S_P)-**83**

Um bezüglich des Phosphorzentrums diastereomerenreine Phthalidylphosphonatdiester zu erhalten, muss die Trennung der Diastereomere auf der Stufe des H-Phosphonatdiesters **83** erfolgen. Nach Aufbau des zweiten stereogenen Zentrums am α -Kohlenstoffatom ist eine präparative chromatographische Trennung nicht mehr möglich, da die Retentionszeiten der nunmehr vier Diastereomere zu ähnlich sind (Anhang B, S.199). Die Überprüfung der Diastereomerenreinheit der getrennten H-Phosphonatdiester (R_P)-**83** und (S_P)-**83** wurde ³¹P-NMR-spektroskopisch durchgeführt. In Abb.50 (S.62) sind die ¹H-entkoppelten ³¹P-NMR-Spektren der beiden H-Phosphonatdiester (R_P)-**83** (fast, R_f = 0.52 CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v, δ = 8.73 ppm) und (S_P)-**83** (slow, R_f = 0.50 CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v, δ = 9.76 ppm) nach wiederholter chromatographischer Trennung an Kieselgel gezeigt. Die besten Trennergebnisse ließen sich mit einem Eluenten aus Dichlormethan und 2.25 % Methanol erzielen, dem zur Stabilisierung des H-Phosphonatdiesters 0.1 % Essigsäure zugesetzt war. Bedingt durch den sehr kleinen R_f-Wertunterschied von

($\Delta R_f = 0.02$) verschlechtert sich die Trennung schon bei kleinen Schwankungen der Zusammensetzung des Eluenten.

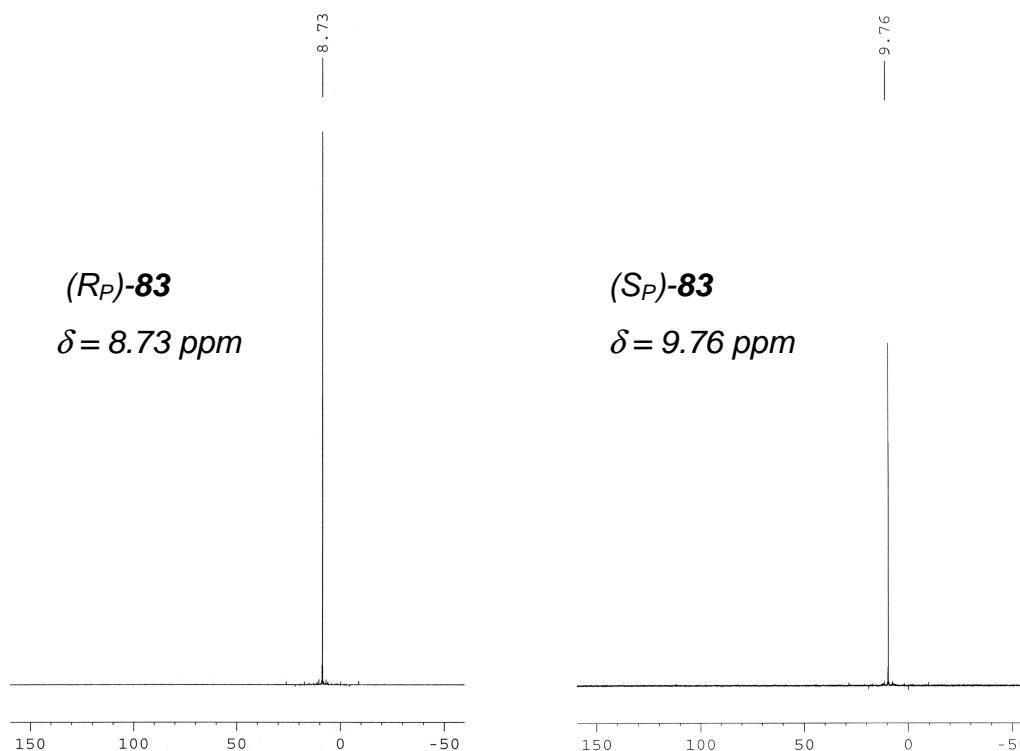


Abbildung 50: ^1H -entkoppelte ^{31}P -NMR-Spektren des R_P - und des S_P -3'-O-TBDPS-5'-O-DMTr-H-Phosphonatdiesters (R_P)-**83** und (S_P)-**83**

Die Bestimmung der absoluten Konfiguration der Phosphoratome erfolgte mit Hilfe von NOE-Spektren der (R_P)- und (S_P)-Methylphosphonatdiester, die unter Retention der Konfiguration aus den H -Phosphonatdiestern (R_P)-**83** und (S_P)-**83** dargestellt worden waren^[103] (Anhang A, S.198).

4.2.8 Synthese von R_P - und S_P -5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)thymidyl-[5'→3']-3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)thymidylphthalidylphosphonat (R_P)-**84** und (S_P)-**84** (α -C-Diastereomerenpaar)

Die Synthese der beiden R_P - und S_P -3'-O-TBDPS-5'-O-DMTr-Phthalidylphosphonatdiester (R_P)-**84** und (S_P)-**84** erfolgte in zwei Schritten aus den entsprechenden H -Phosphonatdiestern (R_P)-**83** und (S_P)-**83** über die intermediär gebildeten α -Hydroxyphosphonate (R_P)-**86** und (S_P)-**86** (Abb.51, S.63). Im ersten Reaktionsschritt wurde der jeweilige H -Phosphonatdiester **83** mit 2-Carboxyl-

benzaldehyd **87** und Triethylamin in trockenem Dichlormethan zu dem entsprechenden α -Hydroxyphosphonat **86** umgesetzt. Nach Deprotonierung des Phosphoratoms durch Triethylamin, greift dieser die Aldehydgruppe des 2-Carboxybenzaldehyds **87** unter Ausbildung einer P-C-Bindung nucleophil an.

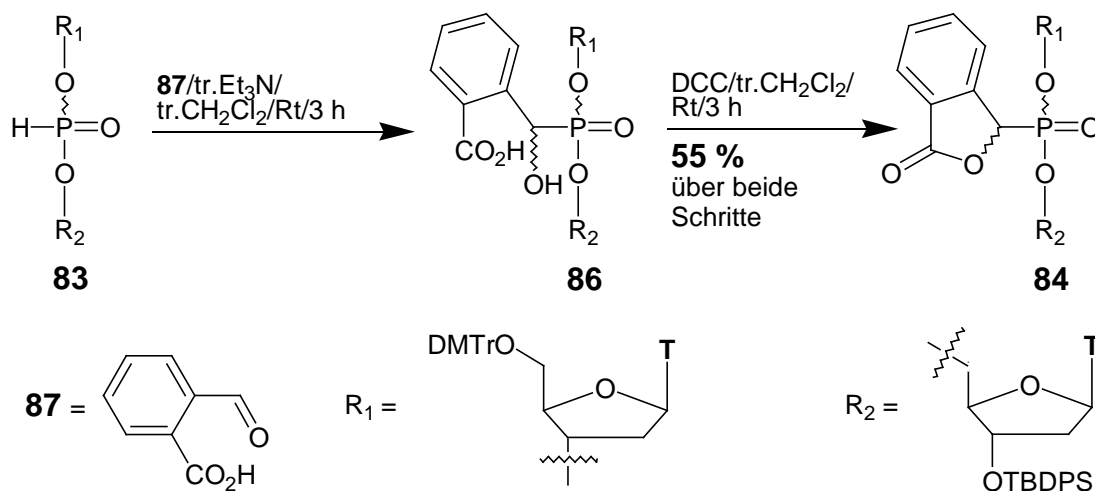


Abbildung 51: Synthese der R_P - und S_P -3'-O-TBDPS-5'-O-DMTr-Phthalidylphosphonatdiester (R_P)-**84** und (S_P)-**84**

Da die intermediär gebildeten Anionen der H -Phosphonatdiester (R_P)-**83** und (S_P)-**83** bei Raumtemperatur bezüglich des Phosphoratoms inversionsstabil sind,^{[110],[111]} erfolgt die Bildung der α -Hydroxyphosphonate (R_P)-**86** und (S_P)-**86** unter Retention der Konfiguration. Weil die α -Hydroxyphosphonate (R_P)-**86** und (S_P)-**86** unter wässrig basischen Bedingungen der Phosphonat-Phosphat-Umlagerung unterliegt (siehe 2.4, S.17), muss die Reaktion unter strengstem Wasserausschluss durchgeführt werden. Daher sollten die α -Hydroxyphosphonate (R_P)-**86** und (S_P)-**86** möglichst schnell im zweiten Reaktionsschritt mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) zur Lactonisierung unter Bildung der Phthalidylphosphonatgruppe umgesetzt werden.

Mittels ^{31}P -NMR-spektroskopischen und HPLC-chromatographischen Untersuchungen (Anhang B, Abb.115, S.199) konnte gezeigt werden, dass während der Synthese von (R_P)-**86** und (S_P)-**86** keine chirale Induktion von dem Phosphoratom auf das α -ständige Kohlenstoffatom ausgeübt wurde.

Es konnten über beide Syntheseschritte Ausbeuten bis zu 55 % der 3'-O-TBDPS-5'-O-DMTr-Phthalidylphosphonatdiester (R_P)-**84** und (S_P)-**84** als 1 zu 1 Gemisch der α -C-Diastereomere erzielt werden. Versuche, die α -C-Diastereomere auf der 3'-O-DMTr- und 5'-O-TBDPS-geschützten Stufe der Phthalidylphosphonate

chromatographisch voneinander zu trennen, belegen die in früheren Arbeiten^[103] gemachten Beobachtungen, deren Grundlage die in Anhang B (S.199) abgebildeten HPLC-Chromatogramme der Phthalidylphosphonatdiester (R_P)-**84** und (S_P)-**84** sind.

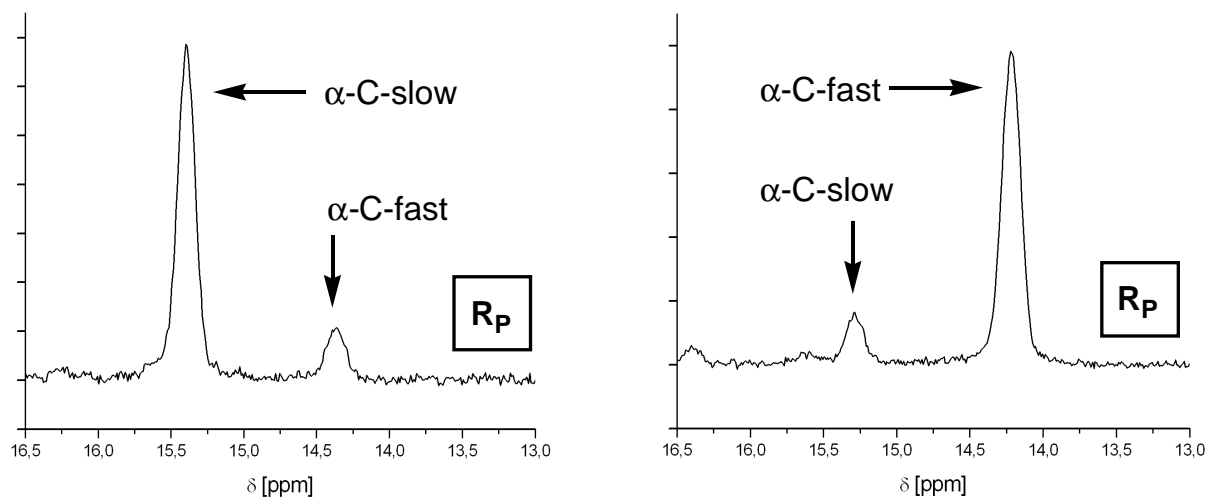


Abbildung 52: ^1H -entkoppelte ^{31}P -NMR-Spektren der Trennung von (R_P)-**84**- α -C-slow und α -C-fast

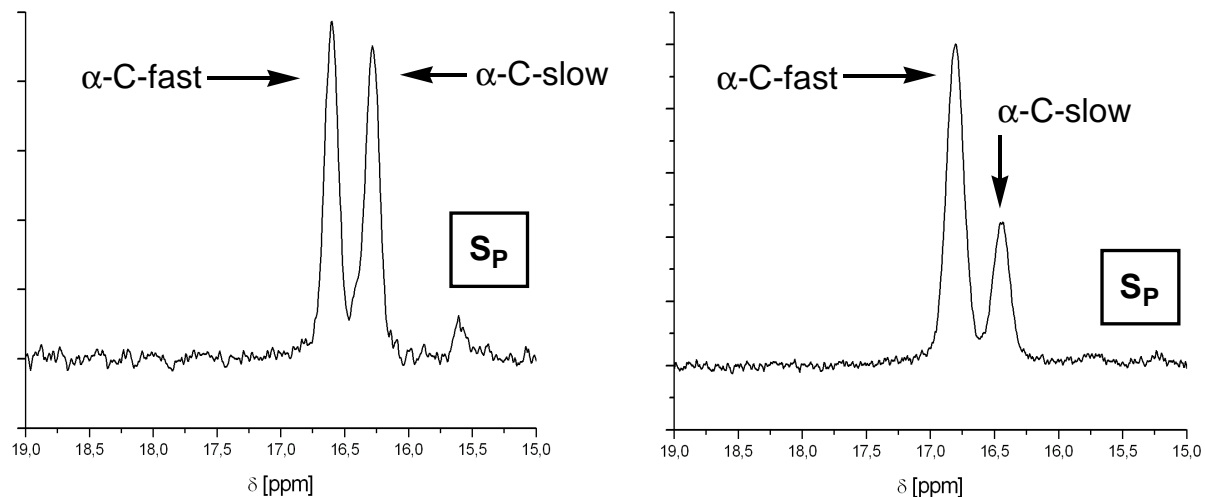


Abbildung 53: ^1H -entkoppelte ^{31}P -NMR-Spektren der Trennung von (S_P)-**84**- α -C-slow und α -C-fast

Die in Abb.52 und Abb.53 abgebildeten ^1H -entkoppelten ^{31}P -NMR-Spektren zeigen, dass sich die beiden R_P - α -C-Diastereomere wesentlich besser chromatographisch voneinander trennen lassen als die beiden S_P - α -C-Diastereomere. Bei den S_P - α -C-Diastereomeren konnte hier lediglich nur eine Anreicherung des α -C-fast-Diastereomers erzielt werden (Abb.53, rechts).

4.2.9 Bestimmung der absoluten Konfiguration der α -Kohlenstoffatome der beiden R_P - und S_P -3'-O-TBDPS-5'-O-DMTr-Phthalidylphosphonate diester (R_P)-**84** und (S_P)-**84**

Mit Hilfe von 2D-ROESY- und 2D-TOCSY-NMR-Spektren konnten die absoluten Konfigurationen der α -Kohlenstoffatome von (R_P)-**84** und (S_P)-**84** zugeordnet werden.

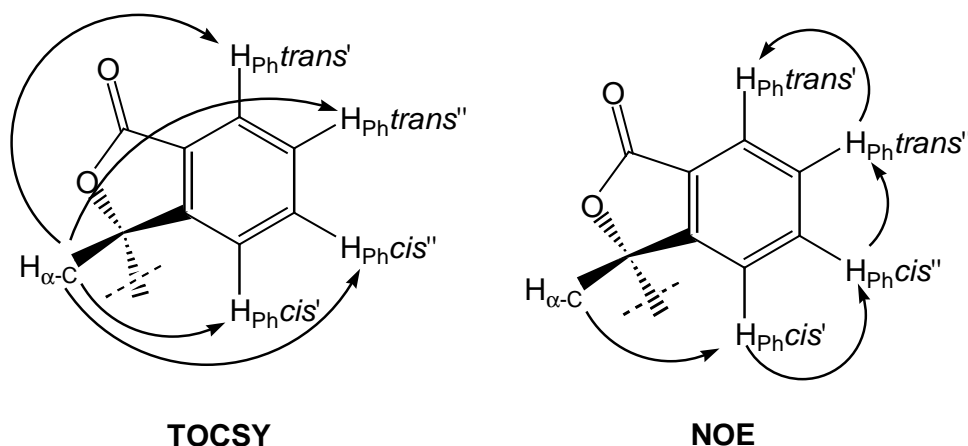


Abbildung 54: Erwartete NOE und TOCSY-Signale zwischen dem α -C-Proton ($H_{\alpha-C}$) und den Phthalidylprotonen ($H_{PhCis'}$, $H_{PhCis''}$, $H_{Phtrans'}$, $H_{Phtrans''}$)

Im Folgenden wird die Vorgehensweise am Beispiel von (R_P)-**84**- α -C-fast genauer beschrieben.

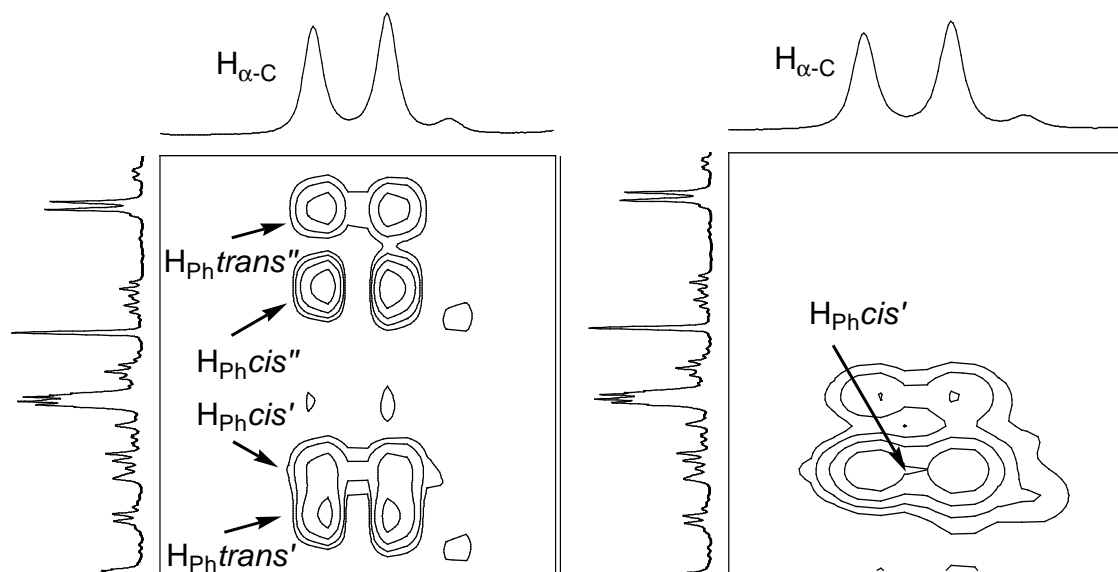


Abbildung 55: Ausschnitte aus den TOCSY- (Links) und ROESY- (rechts) Spektren für die Zuordnung der Phthalidylprotonen

Als primäre NOE-Sonde diente das Proton des α -Kohlenstoffatoms und als sekundäre Sonde die Protonen der Phthalidylgruppe. Zunächst wurden die chemischen Verschiebungen der vier Phthalidylprotonen (H_{Ph}) über ihre TOCSY-Signale zum α -C-Proton identifiziert (Abb.54, S.65, links; Abb.55, S.65, links).

Die relative Position des $H_{Ph}cis'$ -Protons zum α -C-Proton konnte mit Hilfe des NOE-Signals identifiziert werden. (Abb.54, S.65, rechts; Abb.55, S.65, rechts). Während sowohl die zwei $H_{Ph}cis'$ - als auch die beiden $H_{Ph}trans$ -Protonen TOCSY-Signale zu dem α -C-Proton erzeugen, ist ein starker NOE nur zwischen dem $H_{Ph}cis'$ und dem α -C-Proton zu erwarten.

Die in Abb.55 (S.65) dargestellten Ausschnitte des TOCSY-Spektrums (links) und des ROESY-Spektrums (rechts) entsprechen dieser Erwartung.

Ausgehend von dem $H_{Ph}cis'$ -Proton ($\delta(H_{Ph}cis') = 7.57$ ppm) konnten auch die weiteren drei Phthalidylprotonen ihren chemischen Verschiebungen mit $\delta(H_{Ph}cis'') = 7.15$ ppm, $\delta(H_{Ph}trans') = 7.67$ ppm und $\delta(H_{Ph}trans'') = 6.98$ ppm eindeutig zugeordnet werden (Abb.56).

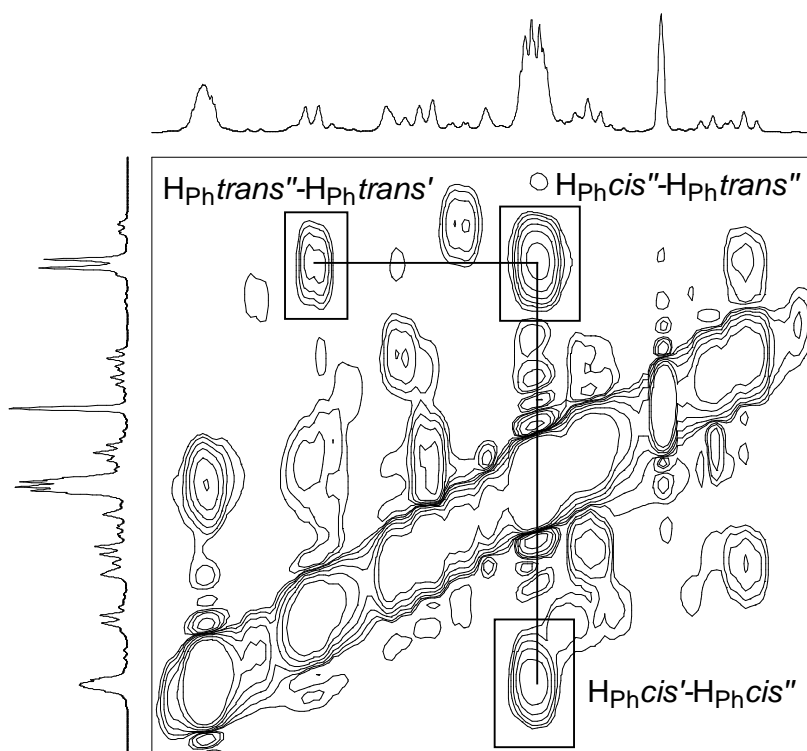


Abbildung 56: Ausschnitt aus dem ROESY-Spektrum zur Bestimmung der Anordnung der Phthalidylprotonen gegenüber dem α -C-Proton

Als nächstes wurde die Lage des α -C-Protons zu der beiden 2'-Desoxyribosegruppen **A** und **B** bestimmt (Abb.58, S.68). Die 5 stärksten NOE-Signale (Abb.55, S.65) rühren von den beiden H_5B -Protonen der 3'-O-TBDPS-geschützten Ribosegruppe **B** und den H_1A -, H_3A - und H_4A -Protonen der 5'-O-DMTr-geschützten Ribosegruppe **A** her. Diese Signale sind nur durch zwei Rotationskonformere der Ribosegruppe **A** um die C_3 -O-Bindung zu erklären (Rotamer 1: H_1A und H_4A , Rotamer 2: H_3A und H_4A).

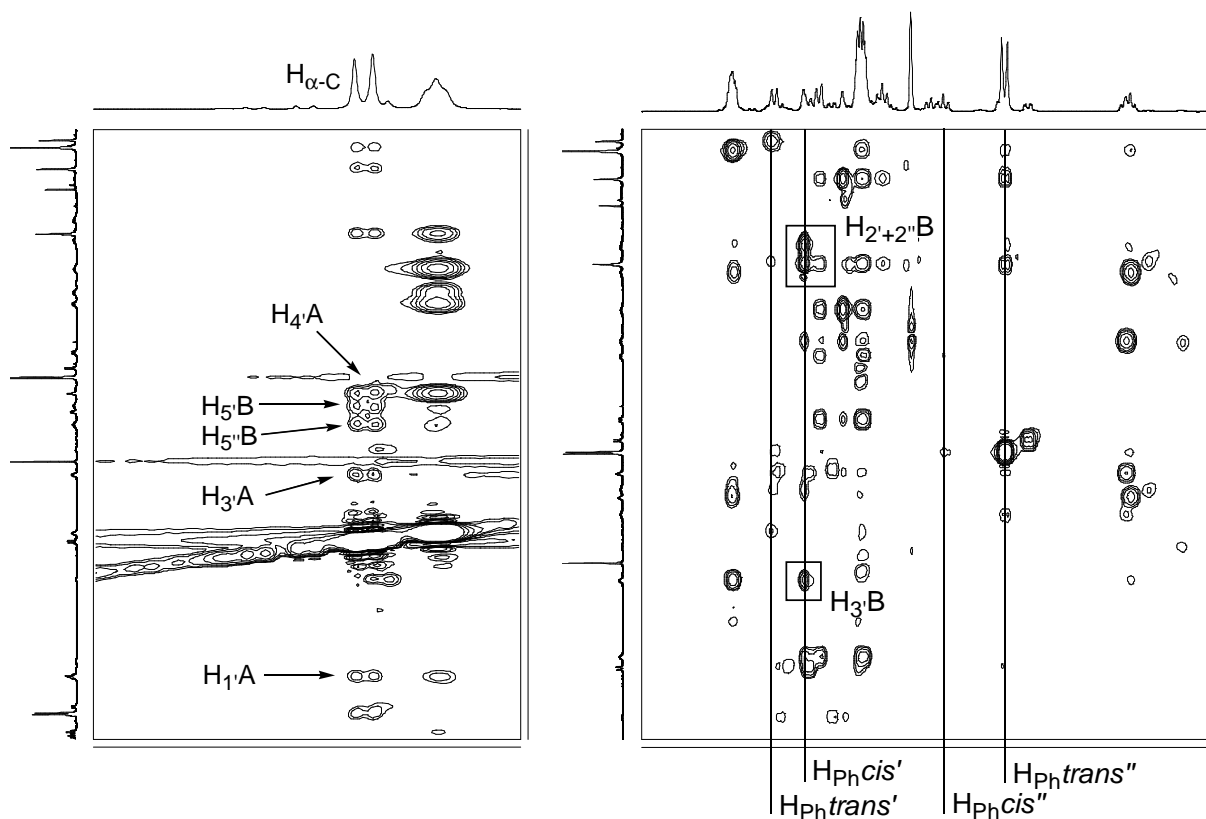


Abbildung 57: Ausschnitte aus dem ROESY-Spektrum zur Bestimmung der Lage des α -C-Protons (links) und der relativen Orientierung der Phthalidylgruppe (rechts)

Bei beiden Rotationskonformeren ergibt sich der in Abb.58 (S.68) am Beispiel des H_1A - H_4A -Konformers dargestellte Sachverhalt, bei dem sich das α -C-Proton zwischen der Ribosegruppe **A** und den H_5 -Protonen der Ribosegruppe **B** befindet. Dies wäre sowohl für das α -C-(S)-Diastereomer (Abb.58, S.68, links) als auch für das α -C-(R)-Diastereomer (Abb.58, rechts) möglich. Jedoch sind bei dem α -C-(S)-Diastereomer NOE-Signale zwischen den $H_{Ph}cis$ -Protonen und denen der Ribosegruppe **B** zu erwarten, die bei dem α -C-(R)-Diastereomer nicht möglich sind

und andersherum sind bei dem α -C-(R)-Diastereomer NOE-Signale zwischen den $H_{Ph\text{cis}}$ -Protonen und denen der Ribosegruppe **A** zu erwarten, die wiederum bei dem α -C-(S)-Diastereomer nicht möglich sind. Aus den vier Spuren der Phthalidylprotonen (Abb.57, S.67, rechts) ist ersichtlich, dass es ausschließlich NOE-Signale zwischen dem $H_{Ph\text{cis}'}$ -Proton, den beiden $H_{2'/2''}$ -B-Protonen und dem H_3 -B-Proton gibt. Somit handelt es sich bei (R_P)-**84**- α -C-fast um das α -C-(S)-Diastereomer.

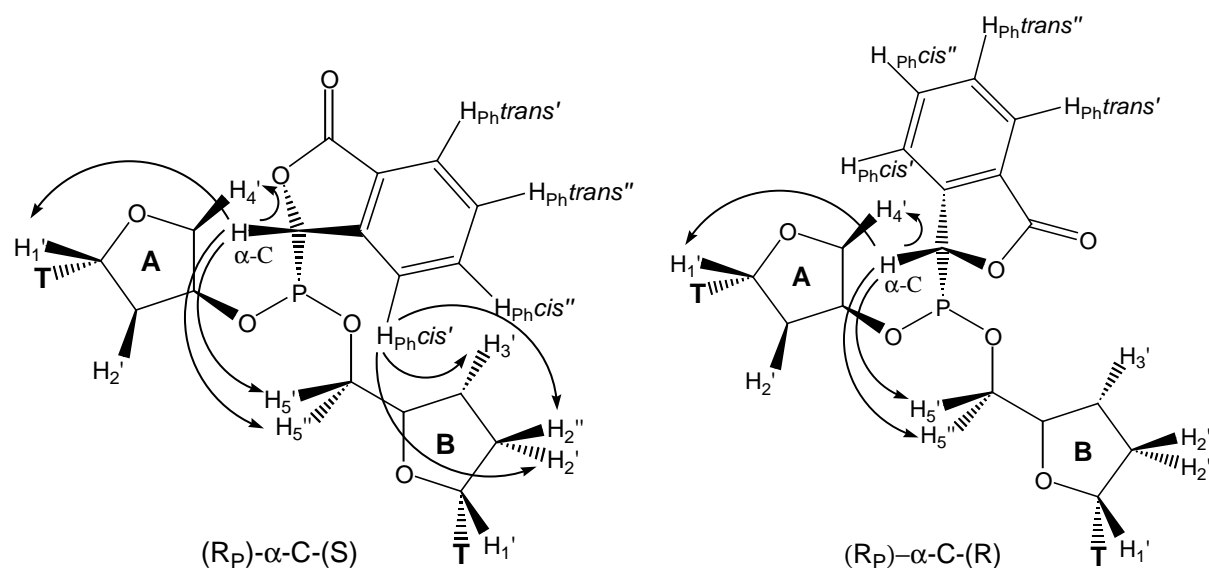


Abbildung 58: NOE-Signale zwischen den Protonen der Phthalidylgruppe und den 2'-Desoxyribosegruppen in Abhängigkeit der α -C-Konfiguration

Ungeachtet des Umkehrschlusses, dass es sich so bei (R_P)-**84**- α -C-slow nur um das α -C-(R)-Diastereomer handeln kann, wurde auch hier analog der beschriebenen Methode die erwartete absolute Konfiguration des α -Kohlenstoffatoms eindeutig bestätigt.

Die absoluten Konfigurationen der α -Kohlenstoffatome der beiden (S_P)-**84**-Diastereomere konnte ebenfalls mit dieser Methode bestimmt werden. Trotz der schwierigen chromatographischen Trennung der Diastereomere, bei der nur das (S_P)-**84**- α -C-fast-Isomer angereichert werden konnten (siehe 4.2.8, S.62), war es dennoch möglich die relevanten NOE-Signale eindeutig zuzuordnen. So konnte (S_P)-**84**- α -C-fast als das α -C-(R)-Isomer und das (S_P)-**84**- α -C-slow als das α -C-(S)-Isomer identifiziert werden.

Retention P	Retention α -C	Konfig. P	Konfig. α -C	^{31}P -NMR δ [ppm]
fast	fast	R _P	α -C-(S)	14.22
fast	slow	R _P	α -C-(R)	15.25
slow	fast	S _P	α -C-(R)	16.78
slow	slow	S _P	α -C-(S)	16.43

Tabelle 7: Relative Retentionen, absolute Konfigurationen und die ^{31}P -NMR-Verschiebungen der vier Phthalidylphosphonate **84**

In Tab.7 sind noch einmal die Retentionszeiten, die absoluten Konfigurationen und die chemischen Verschiebungen der Phosphor- und α -Kohlenstoffatome von den vier Diastereomeren des Phthalidylphosphonatdiesters **84** gegenüber gestellt. Es ist zu ersehen, dass sich die Retentionszeit nicht mit der absoluten Konfiguration korrelieren lässt. Während das R_P- α -C-fast-Isomer α -C-(S) kofiguriert ist, hat hingegen das S_P- α -C-fast-Isomer am α -Kohlenstoffatom die R-Konfiguration.

Hingegen lässt sich die absolute Konfiguration des α -Kohlenstoffatoms mit der chemischen Verschiebung des Phosphoratoms korrelieren. Sowohl das Phosphoratom des R_P- α -C-(R)-Isomers ist gegenüber dem des R_P- α -C-(S)-Isomers tieffeldverschoben, als auch das des S_P- α -C-(R)-Isomers gegenüber dem des S_P- α -C-(S)-Isomers.

4.2.10 Synthese von R_P- und S_P-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidyl-[5'→3']-thymidylphthalidylphosphonat (R_P)-**85** und (S_P)-**85**(α -C-Diastereomerenpaar)

Zur Synthese der 5'-O-DMTr-Phthalidylphosphonatdiester (R_P)-**85** und (S_P)-**85** mussten die 3'-Hydroxygruppen der Phthalidylphosphonatdiester (R_P)-**85** und (S_P)-**85** entschützt werden. Für die Abspaltung der Silylschutzgruppe bietet sich ein fluoridhaltiges Reagenz an, welches sowohl die DMTr- als auch die Phthalidylgruppe nicht angreift. Bei ersten Versuchen, die Entschützung unter Standardbedingungen mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) durchzuführen, stellte sich heraus, dass es nicht möglich war, eine Ausbeute größer als 53 % zu erzielen, welches für eine Entschützung – insbesondere an dieser Stelle der Synthese - nicht akzeptabel ist.

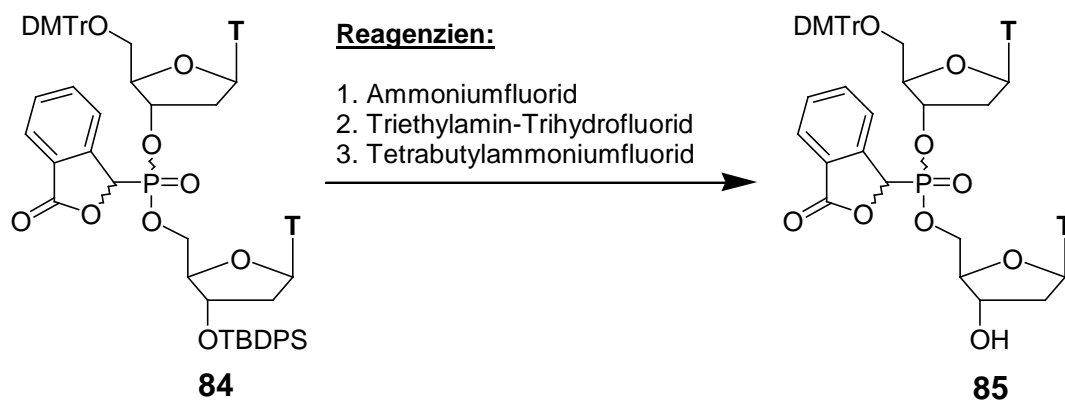


Abbildung 59: Entschützung des R_P - und des S_P -3'-O-TBDPS-5'-O-DMTr-Phthalidylphosphonatdiesters (R_P)-**85** und (S_P)-**85**

Zur Optimierung der Desilylierung wurden drei der gängigen fluorhaltigen Reagenzien verwendet: Ammoniumfluorid, Triethylamin-Trihydrofluorid und Tetrabutylammoniumfluorid. In der folgenden Tab.8 sind die Entschützungsversuche unter Verwendung der oben genannten Reagenzien mit den jeweiligen Reaktionsbedingungen und ihren Ausbeuten aufgeführt.

	Reagenz	Reaktionsbedingungen	Ausbeute
V1	NH ₄ F	Rt/MeOH/3 d	Kein Umsatz
V2	Et ₃ N•3HF	Rt/THF	≤ 50 %
V3	Et ₃ N•3HF	-20 °C/THF	≤ 50 %
V4a/V4b	Et ₃ N•3HF	Rt bzw. -20 °C /tr. THF	≤ 53 %
V5	Et ₃ N•3HF	-20 °C/THF/Et ₃ N	≤ 47 %
V6a/V6b	TBAF	Rt bzw. -20 °C/THF	≤ 58 %
V7	TBAF	-20 °C/tr. THF	63 %
V8	TBAF	-20 °C tr. THF/eq. H ₂ O	74 %
V9	TBAF	-20 °C tr. THF/eq. H ₂ O/Puffer	71 %

Tabelle 8: Optimierung der Entschützung der 3'-O-TBDPS-5'-O-DMTr-Phthalidylphosphonate (R_P)-**85** und (S_P)-**85**

Bei der Verwendung von Ammoniumfluorid in Methanol (**V1**, Tab.8), des mildesten der drei hier eingesetzten Reagenzien, konnte selbst nach drei Tagen Reaktionszeit keine Entschützung beobachtet werden, wobei das Edukt quantitativ isoliert werden konnte. Erste Entschützungsversuche (**V2** und **V3**) mit Triethylamin-

Trihydrofluorid in THF ergaben sowohl bei Raumtemperatur als auch bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ Ausbeuten nicht über 50 %. Bei beiden Versuchen wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie eine nicht unbeträchtliche Zersetzung des Edukts beobachtet. Auch die Durchführung von **V2** und **V3** unter wasserfreien Bedingungen ergab keine deutliche Verbesserung der Ausbeute (**V4a** und **V4b**). Da Triethylamin-Trihydrofluorid einen pH-Wert von ca. 2 hat, kann als mögliche Nebenreaktion die saure Abspaltung der 3'-O-DMTr-Schutzgruppe eintreten. Um diese Nebenreaktion zu vermeiden, wurde die Desilylierung unter den Bedingungen des Versuchs **V3** nur zusätzlich mit 20 äquivalenten Triethylamin durchgeführt (**V5**). Dies hatte jedoch eine Verschlechterung der Ausbeute zur Folge. Als drittes Entschützungsreagenz wurde Tetrabutylammoniumfluorid in THF verwendet. Auch hier war trotz Variation der Bedingungen **V6a**, **V6b** und **V7** keine zufriedenstellende Ausbeute zu erzielen, wobei die Ausbeute von **V7** mit 63 % nicht reproduzierbar war. Wie bei der Verwendung von Triethylamin-Trihydrofluorid konnte eine erhebliche Zersetzung des Edukts beobachtet werden.

Bei der Reaktionsverfolgung mittels Dünnschichtchromatographie zeigte sich, dass sich eine Verbindung mit einem gegenüber dem erwünschten Produkt niedrigeren R_f -Wert ($R_f = 0.26$) während der Reaktion bildete. Diese Verbindung war nach Einengung der Reaktionslösung etwa in gleichem Maße vorhanden, konnte jedoch teilweise durch Waschen des in Dichlormethan aufgenommenen Rohprodukts mit destilliertem Wasser abgetrennt werden. Die Bildung dieser teilweise wasserlöslichen Verbindung würde sich durch die Hydrolyse des Lactonringes der Phthalidylgruppe und anschließender *H*-Phosphonat-Rückspaltung (siehe 2.4, S.17) erklären. Bei der Verwendung von nicht trockenen Lösungsmitteln in einem basischen Medium (**V6**) wird der Lactonring durch die Bildung von Hydroxidionen hydrolysiert. Sind hingegen unter wasserfreien Bedingungen nicht genügend Protonen vorhanden (**V7**), um das bei der Entschützung entstehende 3'-Alkoholat zu protonieren, wird der Lactonring durch die deprotonierte 3'-Hydroxylgruppe geöffnet.

Dieser Interpretation folgend wurde angenommen, dass die Anwesenheit von Wasser nötig ist, um die angenommene Nebenreaktion zu unterbinden. Auch wurde aus der Nichtreproduzierbarkeit des Versuches **V7** und der Versuche **V6a** und **V6b** geschlossen, dass die Menge an Wasser eine entscheidende Rolle spielt. Es hatte sich gezeigt, dass durch die Verwendung einer äquimolaren Menge an Wasser die beobachtete Nebenreaktion größtenteils unterbunden und zunächst eine gute Ausbeute

von 74 % erreicht werden konnte (**V8**), die leider wiederum nicht reproduzierbar war. Erst mit der Verwendung eines Phosphatpuffers (pH 6.8) bei der wässrigen Aufarbeitung konnten reproduzierbare Ausbeuten von 71 % erzielt werden (**V9**).

4.2.11 Synthese von R_P - und S_P -5'-O-(4'4-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidyl-[5'→3']-thymidylphthalidyl-3'-O-(diisopropyl-2-cyanoethyl)-phosphoamidit (R_P)-**30** und (S_P)-**30** (α -C-Diastereomerenpaar)

Die Darstellung der R_P - und S_P -5'-O-DMTr-Phthalidylphosphonatdiester-3'-O-amidite (R_P)-**30** und (S_P)-**30** erfolgte unter Standardbedingungen durch Umsetzen der entsprechenden R_P - und S_P -5'-O-DMTr-Phthalidylphosphonatdiester (R_P)-**85** und (S_P)-**85** mit 2-Cyanoethoxy-bis(*N,N*-diisopropylamino)phosphin **67** unter saurer Katalyse mit 4,5-Dicyanoimidazol in trockenem Acetonitril über 1.5 Stunden bei Raumtemperatur.

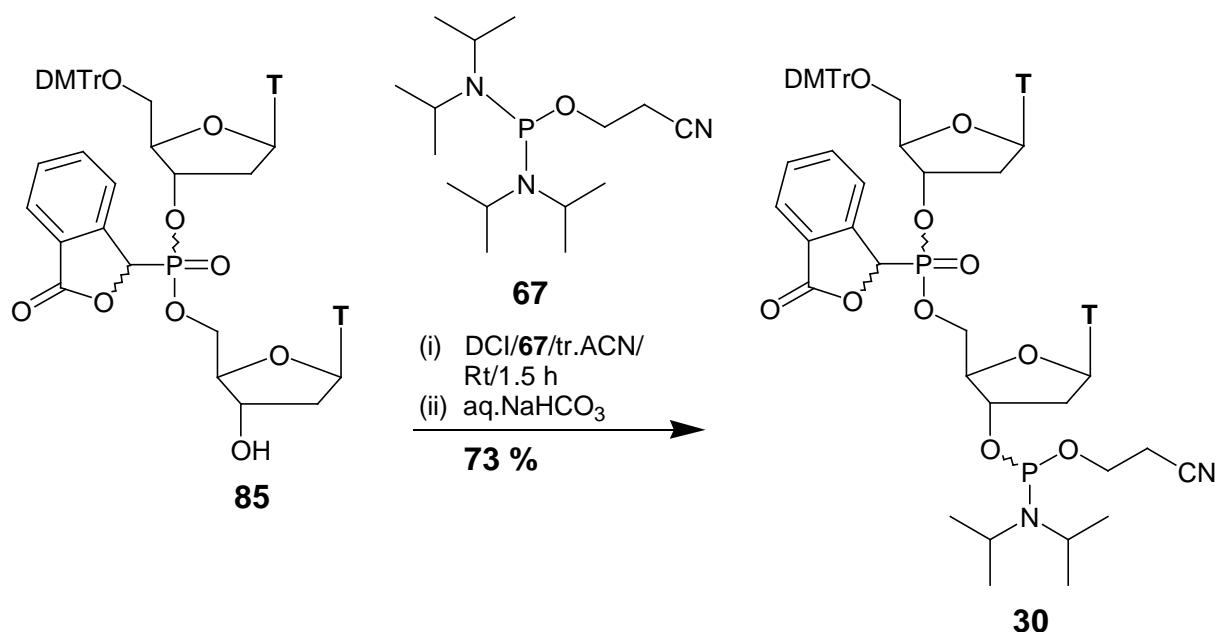


Abbildung 60: Synthese des R_P - und des S_P -5'-O-DMTr-Phthalidylphosphordiester-3'-O-amidits (R_P)-**30** und (S_P)-**30**

Parallel zu der Darstellung des 5'-O-DMTr-⁵K-3'-O-Amidit **30** (siehe 4.1.16, S.50) entsteht auch während dieser Synthese zu gewissen Anteilen das entsprechende *H*-Phosphonat als Nebenprodukt, welches sich ebenfalls nicht durch Chromatographie an Silicagel abtrennen lässt. Auch hier konnte dieses Problem

durch die Verwendung von Alox (neutral, Aktivitätsstufe 3) gelöst werden, wobei darauf zu achten ist, dass dem Laufmittel 1 % Triethylamin zugesetzt werden muss, da sonst das Phosphoramidit **30** spontan bei Kontakt mit Alox hydrolysiert. Die Ausbeuten lagen mit ca. 73 % im üblichen Bereich dieser Reaktion.

4.2.12 Synthese von 5'-O-(4',4-Dimethoxytriphenylmethyl)thymidyl-3'-O-(diisopropyl-2-cyanoethyl)phosphoramidit (**88**)

Die als Modellreaktion dienende Synthese des 5'-O-DMTr-Thymidin-3'-O-amidits **88** wurde unter den in Abschnitt 4.1.16 (S.50) beschriebenen Bedingungen aus dem 5'-O-DMTr-Thymidin **79** dargestellt. Sie diente sowohl der Qualitätskontrolle des frisch synthetisierten 2-Cyanoethoxy-bis(*N,N*-diisopropylamino)phosphins **67** als auch der Optimierung der Trägerbelegung (siehe 4.3.2, S.78).

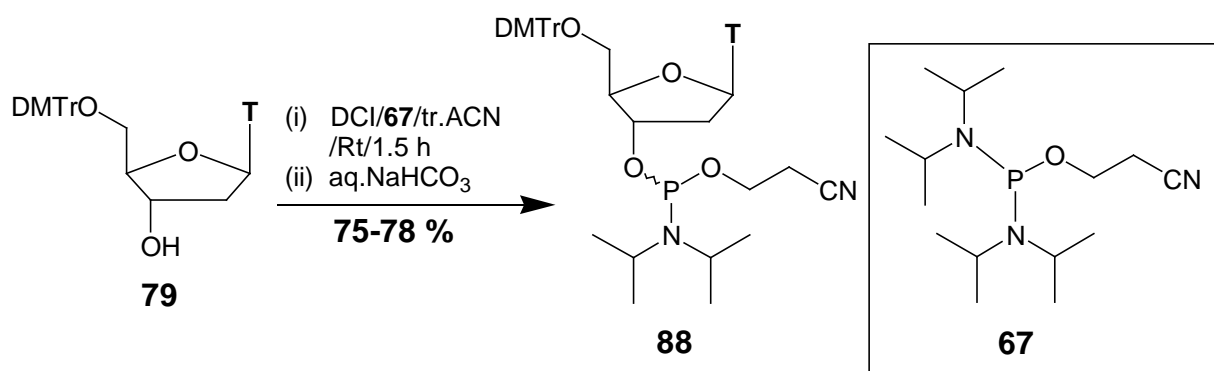


Abbildung 61: Synthese des 5'-O-DMTr-Thymidin-3'-O-amidits **88**

Mit dem hier synthetisierten 5'-O-DMTr-Thymidin-3'-O-amidit **88** wurde neben der Handhabung der Amidite, der Befüllung des DNA-Synthesizers und der Abschätzung der dabei auftretenden Totvolumina, vor jeder Oligonucleotidsynthese ein (dT)-Trimer synthetisiert, um die ordnungsgemäße Funktion des Synthesizers zu gewährleisten.

4.2.13 Synthese von 2-Cyanoethoxy-bis(*N,N*-diisopropylamino)-phosphin (**67**)

Für die Synthese der verschiedenen Phosphoramidite wurde das Phosphitylierungsreagenz 2-Cyanoethoxy-bis(*N,N*-diisopropylamino)phosphin **67** benötigt. Dieses kann

in zwei Syntheseschritten aus Phosphortrichlorid über 2-Cyanoethylphosphordichlorid **89** nach dem Syntheseprotokoll von W. BANNWARTH und A. TRZECIAK dargestellt werden.^[113]

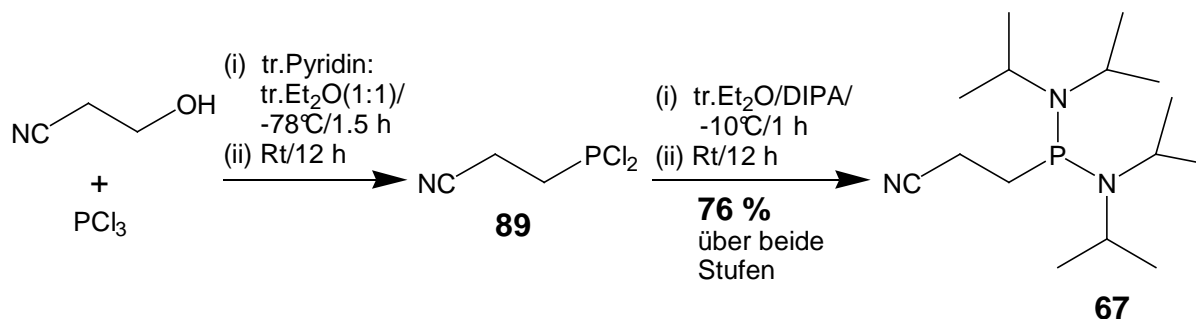


Abbildung 62: Synthese des 2-Cyanoethoxybis(*N,N*-diisopropylamino)-phosphins **67**

Zunächst wird zu dem in einer 1 zu 1 Mischung aus trockenem Pyridin und trockenem Diethylether gelösten frisch destillierten Phosphortrichlorid 2-Cyanoethanol langsam über 1.5 h bei -78°C gegeben. Das während der Reaktion ausfallende Pyridiniumchlorid bildet einen zähen voluminösen Niederschlag, wodurch die Konvektion der Reaktionslösung bei ungenügendem Rühren zum Erliegen kommen kann. Durch Verwendung von THF statt Diethylether sollte dieses Problem zu umgehen sein. Im zweiten Syntheseschritt wurde zu einer Lösung des 2-Cyanoethylphosphordichlorids **89** in trockenem Diethylether langsam Diisopropylamin (DIPA) bei -10°C gegeben. Nach Isolierung mittels Kugelrohrdestillation konnte das 2-Cyanoethoxy-bis(*N,N*-diisopropylamino)-phosphin **67** mit einer Ausbeute von 76 % über beide Stufen erhalten werden.

4.3 SYNTHESE DER PHTHALIDYLPHOSPHONAT-MODIFIZIERTEN OLIGONUCLEOTIDE

4.3.1 Belegung des CPG-Trägers

Bei der Oligonucleotid-Festphasensynthese wird ein 5'-O-DMTr-geschütztes Nucleosid vor der Synthese des Oligonucleotids mit der 3'-Hydroxygruppe chemisch über einen Linker an die Festphase gebunden. Dabei muss dieser Anker so

beschaffen sein, dass er unter den Bedingungen der Oligonucleotidsynthese stabil ist und dass sich das fertige Oligonucleotid nach der Synthese quantitativ von der Festphase abspalten lässt.

Als Festphase wurde hier der neben dem Polystyrenträger am häufigsten verwendete CPG-Träger (**controlled pore glass**) mit einer Porengröße von 500 Angström eingesetzt, der mit dem standardisierten LCAA-Spacer (**long chain alkylamin**) belegt ist (Abb.63).

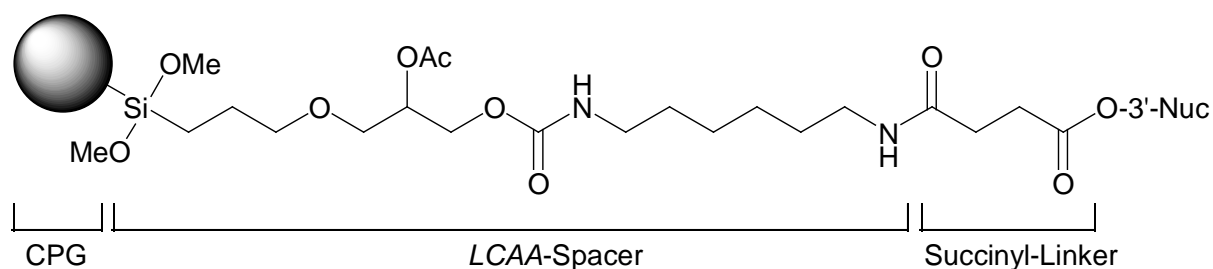


Abbildung 63: Struktur des LCAA-CPG-Trägers mit einem 3'-O-succinyl-gebundene Nucleosid

Wie in Abb.63 dargestellt wird das Nucleosid mit der 3'-Hydroxygruppe über einen Linker an den LCAA-Spacer gebunden. Der hier gezeigte Succinyllinker wird in der Oligonucleotid-Festphasensynthese standardmäßig eingesetzt.^[113] Zur Abspaltung des Oligonucleotids von dem Träger wird dieser über 8 Stunden bei 50 °C mit einer 25 %igen wässrigen Ammoniaklösung behandelt, wobei der Succinyl-Nucleosidester einer Aminolyse unterliegt. Gleichzeitig werden die Phosphate des Oligonucleotids durch β -Eliminierung der 2-Cyanoethylgruppe entschützt.

Diese Methode ist jedoch für die Synthese von Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotiden nicht geeignet, da der Lactonring unter den basischen Abspaltungsbedingungen nicht stabil ist (siehe 4.5.8, S.123).

Ein Linker, der sich unter wesentlich mildereren Bedingungen abspalten lässt, ist der Oxalyllinker.^[114] Die Behandlung des beladenen Trägers mit einer gesättigten methanolischen Ammoniaklösung über 3.5 Minuten bei Raumtemperatur gewährleistet eine quantitative Freisetzung des modifizierten Oligonucleotids (siehe 4.3.5, S.84). Jedoch unterliegt die 2-Cyanoethylgruppe bei diesen Bedingungen keiner β -Eliminierung. Zur Entschützung der Phosphatgruppen muss der belegte CPG-Träger vor Abspaltung des Oligonucleotids 14 Stunden bei Raumtemperatur mit Diisopropylamin (DIPA) behandelt werden.^[114]

Zur Synthese der Oligonucleotide, bei denen die Phthalidylphosphonat-Modifikation am 3'-Ende eingebaut werden soll, muss zunächst der CPG-Träger mit den entsprechenden Phthalidylphosphonatdiestern belegt werden. Auch muss für die Synthese von nicht 3'-modifizierten Oligonucleotiden das 3'-O-DMTr-Thymidin **79** über den Oxallylinker an den Träger gebunden werden.

Die Kupplung der Nucleoside bzw. der Dimere über den Oxallylinker an den CPG-Träger muss unter strengstem Wasserausschluss durchgeführt werden, da einerseits mit sehr kleinen Mengen gearbeitet wird und andererseits die Reaktion per se sehr empfindlich gegenüber Feuchtigkeit ist.

Die Kupplungsreaktion besteht aus vier aufeinanderfolgenden Syntheseschritten, analog dem Syntheseprotokoll von R. MAURITZ (Abb.64).^[83]

1. Aktivierung des Oxallychlorids mit Triazol

Für die Kupplung des Oxallylinkers an die 3'-O-Position des Nucleosids wird zunächst Oxallychlorid **90** aktiviert. Hierzu wird Oxallychlorid zu einer Lösung von 1,2,4-Triazol in Acetonitril gegeben, wobei sich Bistriazolyloxalat **91** bildet. Das dabei ausgefallene Triazoliumchlorid wird anschließend durch Zugabe von Pyridin wieder in Lösung gebracht (Lösung 1).

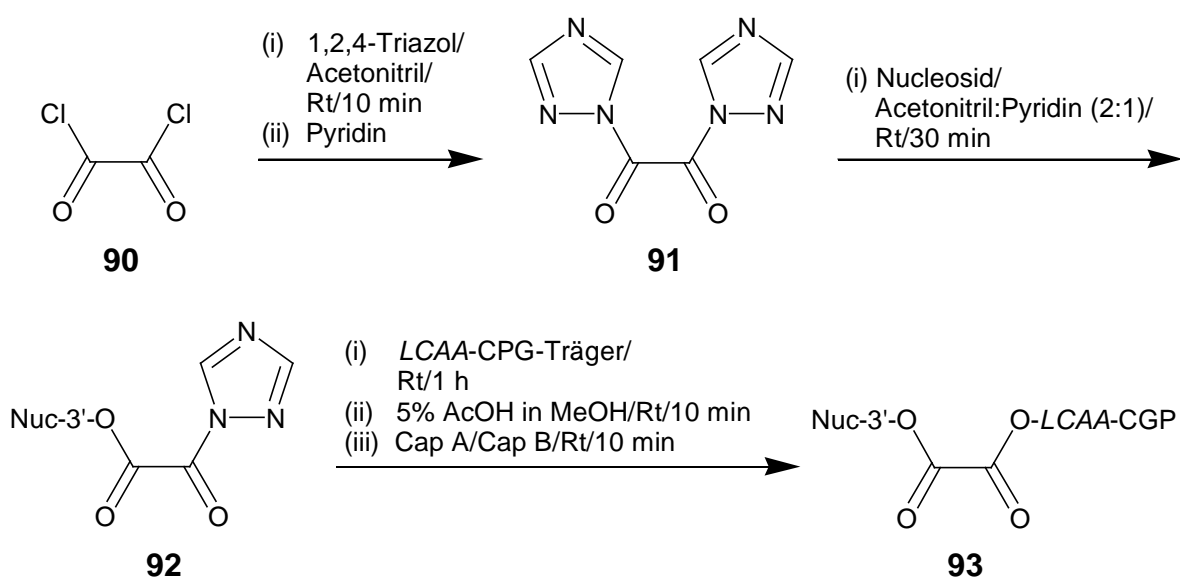


Abbildung 64: Aktivierung, Kupplung und Capping eines Nucleosids an den LCAA-CPG-Träger (nicht optimierte Reaktionsbedingungen)

2. Kupplung des Bistriazolyloxalat **91** mit dem Nucleosid

Zur Kupplung des 5'-O-DMTr geschützten Nucleosids mit Bistriazolyloxalat **91** wird dieses Nucleosid, gelöst in einer 2 zu 1 Mischung aus Acetonitril und Pyridin, zu der Bistriazolyloxalat-Lösung (Lösung 1) gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt (Lösung 2).

3. Belegung des LCAA-CPG-Trägers mit dem Nucleosid

Zur Belegung des LCAA-CPG-Trägers wird zu diesem nach Trocknen durch Koevaporation mit Acetonitril die 3'-O-Triazolyloxalyl-5'-O-DMTr-Nucleosid-Lösung **92** (Lösung 2) gegeben und 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Die Durchmischung der Reaktionslösung erfolgt durch mehrmaliges Schwenken des Kolbens in 5 Minuten Abständen, da die Gefahr besteht, dass bei der Verwendung eines Rührfisches der LCAA-CPG-Träger mechanisch Schaden nehmen könnte (Lösung 3).

4. Desaktivierung (Capping) der nicht abreagierten LCAA-Spacer

Als letzter Schritt müssen die verbliebenden nicht belegten Aminogruppen des LCAA-Spacers in Form von Essigsäureamiden desaktiviert werden. Hierzu wird der belegte LCAA-CPG-Träger **93** mit einer Lösung von Essigsäureanhydrid in Pyridin zweimal über 5 Minuten bei Raumtemperatur behandelt.

Trägerbelegungen, die analog dem oben beschriebenen Syntheseprotokoll durchgeführt wurden, ergaben zwar reproduzierbare, aber im Bereich früherer Arbeiten liegende^[83] schlechte Ausbeuten:

Wurden z.B. 93 mg LCAA-CPG-Träger mit 109 mg (0.087 mmol) (R_P/S_P)-5'-O-DMTr-Phthalidylphosphonatdiester (R_P/S_P)-**85** umgesetzt, ergab dies nur eine Trägerbelegung von 15.9 µmol/g.

Bezüglich der hier erzielten absoluten Trägerbelegung lag die Reaktion im unteren Normalbereich, jedoch hinsichtlich der eingesetzten molaren Menge an Nucleosid ergab dieses Syntheseverfahren kein zufriedenstellendes Ergebnis, wodurch eine Optimierung der Trägerbelegung unabdingbar wurde.

4.3.2 Optimierung der Trägerbelegung

Zur Optimierung der Trägerbelegung wurden sowohl die Mengen an eingesetztem Nucleosid, als auch das Reaktionsvolumen und die Reaktionsdauer der Kupplung variiert. Bei den durchgeführten Optimierungsreaktionen wurden jeweils 50 mg des LCAA-CPG-Trägers eingesetzt, welcher zunächst mit dem leicht zugänglichen 5'-O-DMTr-Thymidin **79** (siehe 4.2.2, S.58) belegt wurde. Ausgehend von den oben beschriebenen (siehe 4.3.1, S.75) und in den vorhergehenden Arbeiten^[82] angewandten Bedingungen (57.9 μmol Nucleosid auf 50 mg CPG-Träger mit einer Kupplungszeit von einer Stunde) wurden diese Parameter variiert.

Für die in Tab.9 aufgeführten Versuche wurden jeweils identische Stammlösungen des aktiven 5'-O-DMTr-Thymidin-3'-O-Triazolyloxalat **92** frisch hergestellt, von denen für die einzelnen Versuche die entsprechenden Mengen entnommen und zu dem mit Acetonitril koevaporierten LCAA-CPG-Träger gegeben wurden, so dass sichergestellt war, dass die Konzentration des Thymidin-Triazolyloxalat **92** über alle Versuche konstant blieb. Dementsprechend bestand zwischen den Mengen an verwendetem Thymidin-Triazolyloxalat **92** und den Reaktionsvolumina ein linearer Zusammenhang.

	Nucleosid	Menge	Reakt.-zeit	vol.	Trägerbelegung	Ausbeuteverhältnis zu A
A	79	59.7 μmol	1 h	1.6 mL	7.52 $\mu\text{mol/g}$	
BI	79	29.8 μmol	1.5 h	0.8 mL	8.34 $\mu\text{mol/g}$	2.22
BII	79	29.8 μmol	3.5 h	0.8 mL	18.3 $\mu\text{mol/g}$	4.87
CI	79	14.9 μmol	2 h	0.4 mL	25.0 $\mu\text{mol/g}$	13.1
CII	(R _P /S _P)- 85	20 μmol	3.5 h	0.4 mL	29.5 $\mu\text{mol/g}$	11.7
D	79	7.46 μmol	2.5 h	0.2 mL	11.6 $\mu\text{mol/g}$	12.34
E	79	20 μmol	20 h	0.4 mL	15.0 $\mu\text{mol/g}$	5.97

Tabelle 9: Variation der Reaktionsbedingungen für die Optimierung der Trägerbelegung

Versuch **A** entspricht den ursprünglich^[83] verwendeten Reaktionsbedingungen. Da die Belegungsreaktion sehr empfindlich gegenüber Feuchtigkeit ist, mehrfaches Überführen der Reaktionslösung nötig ist und mit sehr kleinen Mengen gearbeitet

wird, war es wichtig, alle Optimierungsversuch exakt gleichartig durchzuführen, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Um dieses zu garantieren, wurde zu jedem der sechs Versuche **B–E** der Versuch **A** parallel durchgeführt. Durch gezielte gleichzeitige Variation beider Reaktionsparameter (Reaktionszeit, Reaktionsvolumen \triangleq Nucleosidmenge) wurde versucht, mit möglichst wenigen Versuchen ein Optimum zu erzielen.

Hierzu wurde zunächst die verwendete Menge an 3'-O-Triazolyloxalyl-5'-O-DMTr-Thymidin **92** auf die Hälfte reduziert und die Reaktionszeit um eine halbe Stunde erhöht (Versuch **BI**). Die Ausbeuteerhöhung von ca. 220 % zeigte, dass durch die Erhöhung der Reaktionszeit und Verringerung des Reaktionsvolumens die verringerte Menge an Thymidin-Triazolyloxalat **92** bei weitem kompensiert werden konnte. Konsequenterweise wurden in Versuch **CI** und **D** die Thymidin-Triazolyloxalat **92** sukzessive halbiert und die Reaktionszeiten um jeweils eine halbe Stunde erhöht, wobei Versuch **CI** eine ca. 13 mal höhere Ausbeute und Versuch **D** eine ca. 12 mal höhere Ausbeute als Versuch **A** ergab. Zur Untersuchung des Einflusses der Reaktionszeit wurde diese unter analogen Bedingung wie in Versuch **BI** auf 3.5 Stunden erhöht (**BII**), welches eine 2.2-fache Erhöhung der Ausbeute gegenüber Versuch **BI** zur Folge hatte. Da der Versuch **CI** zufriedenstellende Ausbeuten der Trägerbelegung lieferten, wurde die weitere Optimierung mit dem 5'-O-DMTr-Phthalidylphosphonatdiester (R_P/S_P)-**85** durchgeführt.

Die aus dieser Versuchsreihe abgeleiteten optimalen Reaktionsbedingungen entsprachen denen des Versuches **CI** mit einer verlängerten Reaktionszeit von 3.5 Stunden (**CII**). Um den Einfluss der Konzentration des Amidits abschätzen zu können wurde in Versuch **CII** diese um 25 % erhöht. Die Trägerbelegung mit dem 5'-O-DMTr-Phthalidylphosphonatdiester (R_P/S_P)-**86** ergab eine ca. 12-fache höhere Ausbeute wie Versuch **A**, was zeigte, dass ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Ausbeute besteht. Um abzusichern, dass eine Reaktionszeit über 3.5 Stunden keine wesentliche Ausbeuteerhöhung zur Folge hat, wurde in Versuch **E** die Reaktionszeit drastisch auf 20 Stunden erhöht, wobei jedoch gegenüber Versuch **CII** eine 50 % Ausbeuteerniedrigung festgestellt werden konnte.

4.3.3 Messung der Trägerbelegung

Die Bestimmung der Trägerbelegung erfolgte mittels UV/VIS-photometrischer Untersuchungen nach Abspaltung der 5'-O-DMTr-Schutzgruppe von dem trägergebundenen Nucleosid.

Hierzu wird eine möglichst kleine Menge des Trägers abgewogen. Zumeist wurde ca. 1 mg verwendet. Der abgewogene Träger wird in 10 mL einer 0.1 molaren *p*-TSA-Lösung in Acetonitril über 5 Minuten bei Raumtemperatur geschwenkt, um die 5'-O-DMTr-Gruppe quantitativ abzuspalten. Von dieser durch das Trityliumkation orange gefärbten Lösung wird die Trägerbelegung indirekt durch Messung der Konzentration des Trityliumkations bestimmt, indem die Extinktion dieser Lösung bei einer Schichtdicke von 1 cm und einer Wellenlänge von $\lambda = 490$ nm gemessen wird.

$$\frac{\text{Extinktion [1/cm]} * 10 \text{ [mL]}}{\text{CPG-Träger [mg]}} * 14.3 \text{ [\mu mol * cm/mL]} = x \text{ [\mu mol/g]}$$

Gleichung 2: Berechnung der Trägerbelegung

Mit Gleichung 2 lässt sich die Trägerbelegung aus der gemessenen Extinktion berechnen. Der Faktor 14.3 ergibt sich aus dem reciproken Wert des Extinktionskoeffizienten für DMTr (ca. 70 mL/(cm* μ mol)) mal 1000, da hier die Einwaage des CPG-Trägers in mg angegeben wird.

Es hatte sich gezeigt, dass bei vorsichtiger Durchführung der Messung der Messfehler kleiner 5 % ist, so dass bei einem plausiblen Messergebniss eine Einfachbestimmung der Trägerbelegung ausreicht, um Verluste an belegtem Träger zu vermeiden.

4.3.4 Die Oligonucleotid-Festphasensynthese

In Abb.65 (S.81) ist schematisch die Oligonucleotid-Festphasensynthese nach der Phosphoramiditmethode dargestellt.^[115] Prinzipiell besteht sie aus einem Zyklus von vier aufeinander folgenden Syntheseschritten. Im ersten Syntheseschritt erfolgt die Entschützung der 5'-O-DMTr-Schutzgruppe des an der Festphase gebundenen Oligonucleotids **94** bzw. Nucleosids **95** mit einer 0.1 molaren Lösung von

Trichloressigsäure in Dichlormethan. Die dabei anfallende saure Lösung der abgespaltenen DMTr-Schutzgruppe kann separat aufgefangen werden, um anschließend mit Hilfe des Trityl-Assays die Ausbeute der vorangegangenen Kupplung zu bestimmen (siehe 4.3.7, S.88).

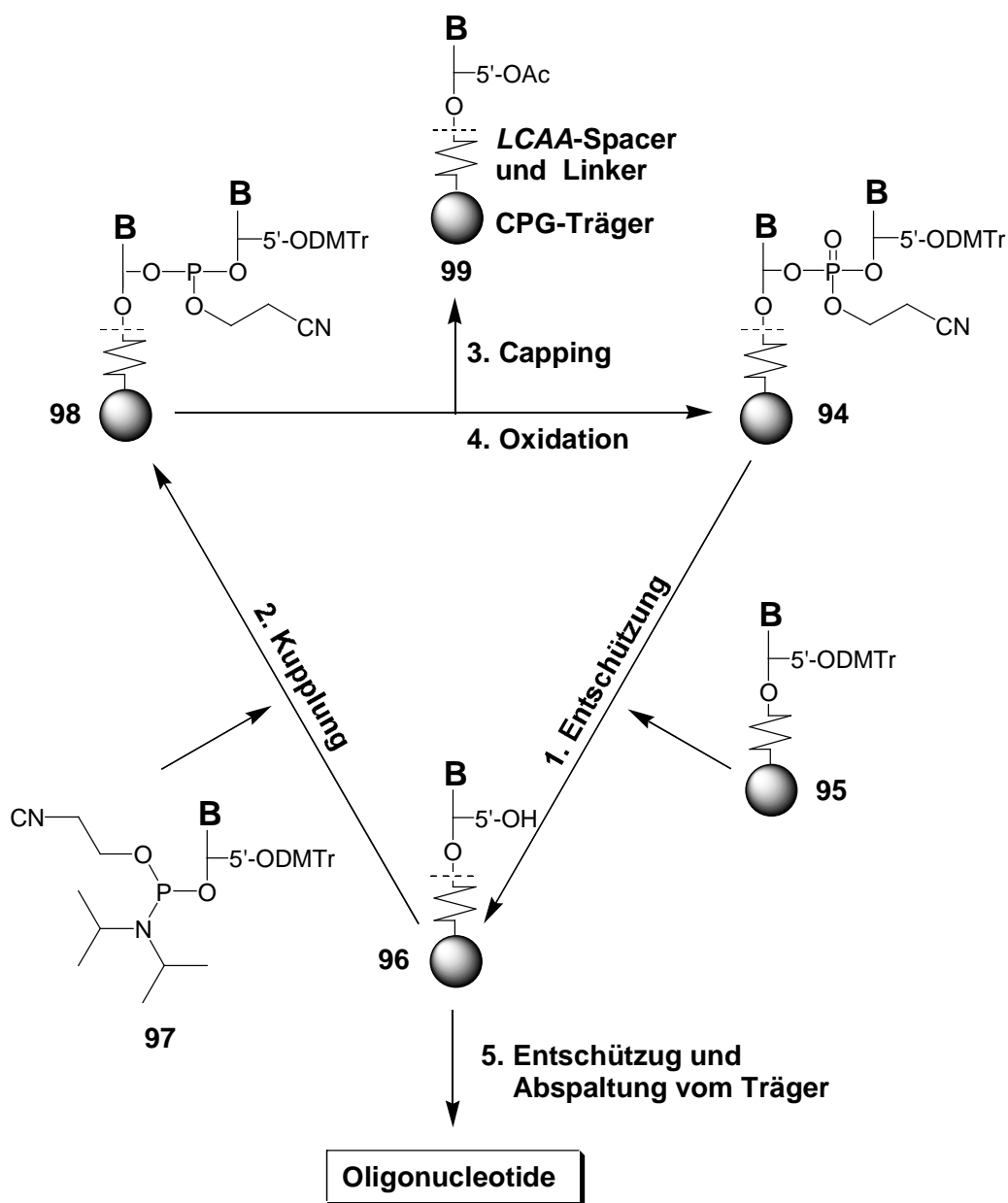


Abbildung 65: Schematische Darstellung der Oligonucleotid-Festphasensynthese

Im zweiten Syntheseschritt erfolgt die Kupplung zwischen der nun entschützten 5'-Hydroxygruppe des an die Festphase gebundenen Nucleosids **95** bzw. Oligonucleotids **96** mit der 3'-O-Phosphoramiditgruppe des folgenden Nucleotids **97**. Das entsprechende 5'-O-DMTr-3'-O-Phosphoramidit **97** wird als eine 0.1 molare

Lösung in trockenem Acetonitril in die Synthese eingeführt. Als saurer Katalysator dient hier 4,5-Dicyanoimidazol in Acetonitril.

Im darauffolgenden dritten Syntheseschritt werden die endständigen 5'-Hydroxygruppen derjenigen Oligonucleotide (**99**), die keine Kupplung eingegangen sind, mit einer Mischung von Essigsäureanhydrid in THF (Cap A) und 1-Methylimidazol ebenfalls in THF (Cap B) verestert (gecappt), so dass sie im folgenden Synthesezyklus keine weitere Kupplung eingehen können.

Im vierten und letzten Schritt erfolgt die Oxidation des Phosphorigesäuretriesters **98** zum Phosphattriesters **93** mit einer 0.25 molaren Jod-Lösung in Acetonitril.

Nach Beendigung der gesamten Oligonucleotidsynthese und Abspaltung der 5'-O-DMTr-Schutzgruppe müssen noch die 2-Cyanoethyl-Schutzgruppen der Phosphatbrücken und gegebenenfalls die Schutzgruppen der Basen von dem Oligonucleotid abgespalten werden. Beides wird meistens vor der Abspaltung des Oligonucleotids von der Festphase durchgeführt. Bei der Verwendung des Succinyl-linkers geschieht dies mit einer 25 %igen wässrigen ammoniakalischen Lösung bei 50 °C über 8 Stunden. Bei Verwendung des labileren Oxallylinkers wird die β -Eliminierung der 2-Cyanoethyl-Schutzgruppe mit DIPA bei Raumtemperatur über 14 Stunden durchgeführt. Die Abspaltung erfolgt dann mit einer kalt gesättigten methanolischen Ammoniak-Lösung.

In Abb.66 (S.83) sind die in dieser Arbeit erfolgreich synthetisierten chimeren Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide ODN-1 bis ODN-9 abgebildet. Sie lassen sich in drei Gruppen einteilen, je nach Ort des Einbaus der Phthalidylphosphonatgruppe in das Oligonucleotid: 3'-modifiziert, 5'-modifiziert und 3',5'-zweifach-modifiziert. Von jeder dieser drei Gruppen wurden sowohl das S_P - und das R_P -Diastereomer als auch das 1 zu 1 R_P/S_P -Diastereomerenpaar synthetisiert, wobei bei zweifacher Modifikation Phthalidylphosphonate gleicher Konfiguration eingesetzt wurden.

Das Design von chimeren "end-blocked" bzw. "gapmer" *antisense*-Oligonucleotiden wurde schon bei verschiedenen Modifikationen einschließlich LNA,^[116] HNA (hexitol nucleic acid)^[117] und der 2'-O-Propyl-Modifikation^[118] erfolgreich eingesetzt, um unter anderem die passive Zellaufnahme, die Stabilität gegenüber Nucleasen oder die RNase H Aktivierung zu verbessern.

Auch das gapmer-Design Thiophosphonat-modifizierter LNA bzw. 2'-O-Propyl-DNA mit bis zu fünffach endständigen Modifikationen sind Gegenstand neuerer Untersuchungen.^[119] Durch den endständigen Einbau der Modifikation werden verschiedene für *antisense*-Oligonucleotide notwendige Eigenschaften abgedeckt.

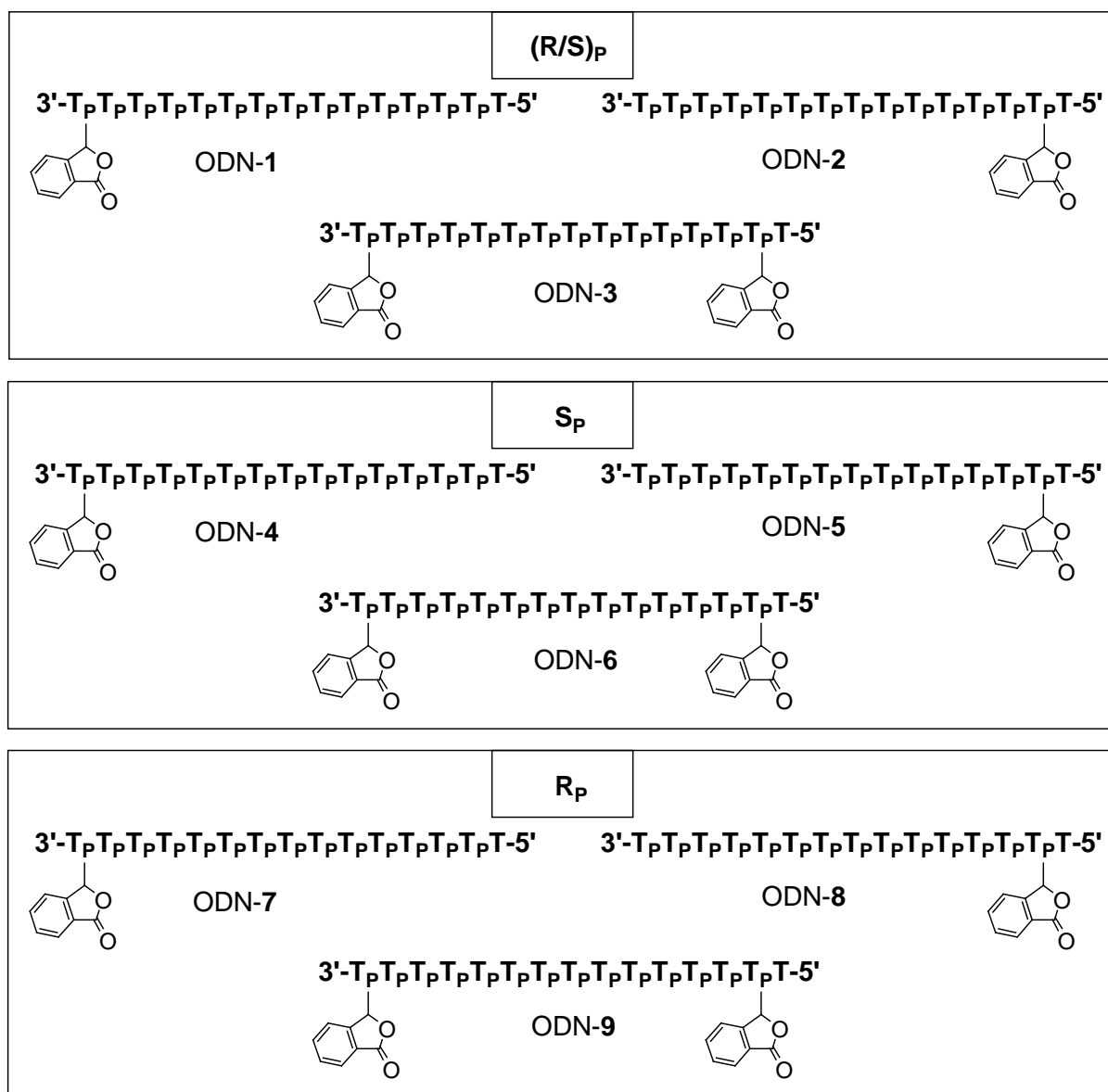


Abbildung 66: Synthetisierte Phthalidylphosphonat-modifizierte Oligonucleotide ODN-1 bis ODN-9

Da 3'- und 5'-Exonucleasen immer nur die endständige Phosphatdiesterbindung spalten, reicht theoretisch nur eine endständige Modifikation aus, um die gewünschte Enzymstabilität zu erzeugen. Auch der Einfluss lipophiler Gruppen auf den gewünschten passiven Membrantransport ist bei endständigem Einbau am Größten. Dies gilt auch für Gruppen, die wie im Fall der Phthalidylphosphonat-Modifikation

negative Ladungen der Phosphatbrücken maskieren. Hingegen können gerade Modifikationen, die im mittleren Teil des *antisense*-Oligonucleotids liegen, die Aktivierung der RNase H verhindern.

Die Synthese aller Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide erfolgte nach der Phosphoramiditmethode an einem Eppendorf/Biotronik ECOSYN DNA 300+ Synthesizer. Die Kupplungen von unmodifizierten Phosphoramiditen erfolgte nach dem Standard-Kupplungsprotokoll (siehe 7.13.1, S.193). Für die Kupplung der modifizierten Phosphoramidite wurde ein leicht verändertes Protokoll verwendet. Zum einen wurde die Kupplungszeit von 15 Sekunden auf 60 Sekunden verlängert und zum anderen die Kupplungswiederholungen pro Zyklus von 2 auf 3 erhöht.

4.3.5 Entschützung und Abspaltung der Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide von der Festphase

Nach abgeschlossener Festphasensynthese sind noch zwei Schritte nötig, um das freie Oligonucleotid zu erhalten. Zum einen muss das Oligonucleotid noch von der Festphase abgespalten werden und zum anderen die verbliebenen 2-Cyanoethyl-Schutzgruppen der Phosphate durch β -Eliminierung entfernt werden.

Zur Abspaltung der 2-Cyanoethyl-Gruppen wurde das noch an der Festphase gebundene Oligonucleotid mit DIPA über 14 h bei Raumtemperatur behandelt, wobei der Oxallylinker unter diesen Bedingungen stabil ist.^[114] Nach Entschützung der Phosphatgruppen wurde das DIPA unter Vakuum an der Speedvac entfernt.

Wie in Abschnitt 4.3.2 (S.78) erwähnt wurde bei der Synthese der Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide der Oxallylinker verwendet, da der normalerweise angewendete Succinyllinker harsch basische Abspaltungsbedingungen benötigt, unter denen die Phthalidylgruppe labil ist. Eine Standardprozedur der Abspaltung Oxalyl-gebundener Oligonucleotide von dem CPG-Träger ist die Behandlung mit einer kaltgesättigten methanolischen Ammoniak-Lösung über 15 min.^[83]

Es hatte sich jedoch herausgestellt, dass die Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide unter den Bedingungen der Entschützung und der Abspaltung von der Festphase einer Zersetzung unterliegen, wobei es sich höchstwahrscheinlich um die basische Öffnung des Lactonrings der Phthalidylgruppe handelt. In Abb.67 (S.85)

ist ein für diese Aufarbeitung charakteristisches HPLC-Chromatogramm des 3'-modifizierten Oligonucleotids ODN-1 dargestellt, aus dem zu ersehen ist, dass sich weit über 50 % des ursprünglichen Oligonucleotids zersetzt hat. Die Annahme, dass es sich bei dieser Zersetzung um die Öffnung des Lactonrings der Phthalidylgruppe handelt, lässt sich indirekt aus der Anwesenheit der beiden $(dT)_{14}$ - und $(dT)_{15}$ -Oligomere ableiten (siehe 4.4.4, S.100), da diese nicht aus der Synthese sondern nur aus der *H*-Phosponat-Rückspaltung bzw. Phosponat-Phosphat-Umlagerung entstanden sein können (siehe 2.4, S.17).

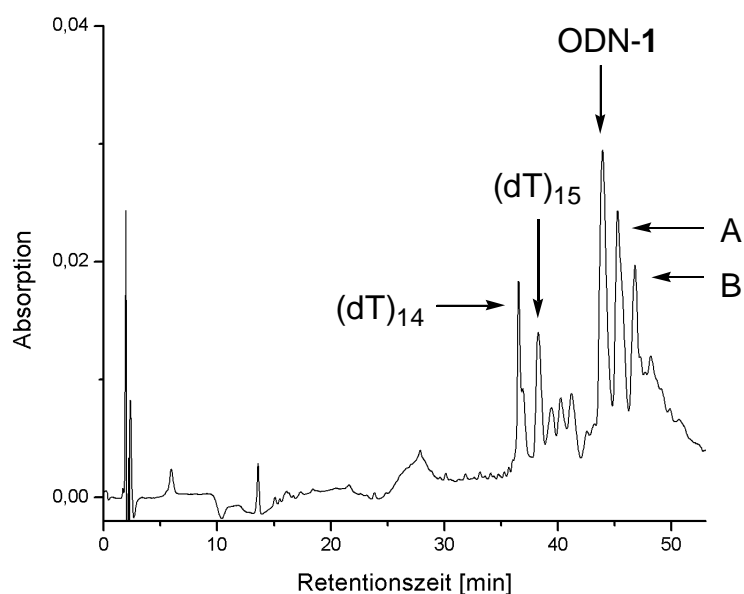


Abbildung 67: HPLC-Chromatogramm des unter feuchten Bedingungen abgespaltenen Oligonucleotids ODN-1

Infolge dieser nicht akzeptabel hohen Zersetzung war eine Optimierung der Aufarbeitung unumgänglich. Zur notwendigen Entkopplung der beiden Syntheseschritte wurden zunächst nur bei dem ersten Syntheseschritt - der Entschützung – die Reaktionsparameter variiert, während die Abspaltungsbedingungen unverändert gehalten wurden. Es wurde sowohl die Reaktionszeit der Entschützung zwischen 5 und 14 Stunden variiert als auch trockenes DIPA verwendet. Jedoch hat sich gezeigt, dass keine Änderung der Reaktionsbedingungen einen Einfluss auf die prozentuale Zusammensetzung der vollentschützten Oligonucleotide hatte. Die Analyse der HPLC-Chromatogramme wurde dadurch erleichtert, dass die bei kürzeren Reaktionszeiten noch vorhandenen, an den Phosphatgruppen nicht vollentschützten Oligonucleotide, bedingt durch ihre höhere Lipophilie, eine kürzere Retentionszeit

aufwiesen. Somit konnte der erste Syntheseschritt als Ursache der Zersetzung ausgeschlossen werden.

Zur Optimierung der Abspaltung von der Festphase wurde zunächst die Reaktionszeit variiert. Hierzu wurden jeweils ca. 5 mg des CPG-Trägers (ODN-1) mit 300 µl einer kalt-gesättigten methanolischen Ammoniak-Lösung in einem Stickstoffkolben behandelt.

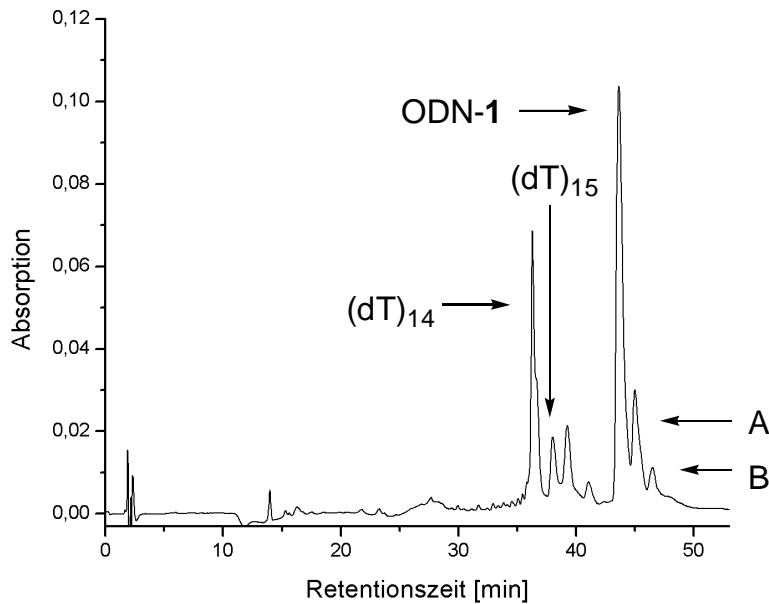


Abbildung 68: HPLC-Chromatogramm des unter trockenen Bedingungen abgespaltenen Oligonucleotids ODN-1

Durch Entfernen der methanolischen Ammoniak-Lösung unter Vakuum konnte die Reaktionszeit gut kontrolliert werden. Ab einer Reaktionszeit unter 4 Minuten konnte eine deutlich sichtbare, jedoch nicht ausreichende Unterdrückung der Zersetzung festgestellt werden. Erst bei Durchführung der Abspaltung unter Schutzgas und der Verwendung einer trockenen, methanolischen Ammoniak-Lösung konnte ein einigermaßen zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden. Als optimal hat sich eine Reaktionszeit von 3,5 Minuten herausgestellt (Abb.68).

Aus dem Vergleich der beiden Abb.67 (S.85) und Abb.68 ist zu ersehen, dass mit Hilfe der optimierten Abspaltungsbedingungen das Entstehen der beiden Substanzen **A** und **B** deutlich unterdrückt werden kann. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen beiden Verbindungen um Zwischenprodukte der Phthalidylphosphonat-Entschützung handeln könnte. Ein weiteres Indiz hierfür ist die in etwa gleiche Abnahme von **B** und (dT)₁₅ gegenüber **A** und (dT)₁₄, welches **A** als

Zwischenprodukt der *H*-Phosphonat-Rückspaltung und **B** als Zwischenprodukt der Phosphonat-Phosphat-Umlagerung ausweisen würde. Dies ist insofern eine schlüssige Interpretation, da die Phosphonat-Phosphat-Umlagerung nur in wässrig-basischem Milieu vonstatten geht, und eben diese Bedingungen durch die Verwendung einer trockenen methanolischen Ammoniak-Lösung vermieden wurden.

4.3.6 Isolierung der Oligonucleotide

Die Isolierung der Phthalidylphosphonat-modifizierten und nicht-modifizierten Oligonucleotide erfolgte mittels der HPLC an einer RP₁₈-Säule. Als Eluent diente ein Gemisch eines 0.1 molaren wässrigen Triethylamin/Essigsäure-Puffers (pH 6.8) und Acetonitril. Die verwendeten Gradienten wurden jeweils so eingestellt, dass die modifizierten Oligonucleotide eine Retentionszeit zwischen 40 und 50 Minuten hatten.

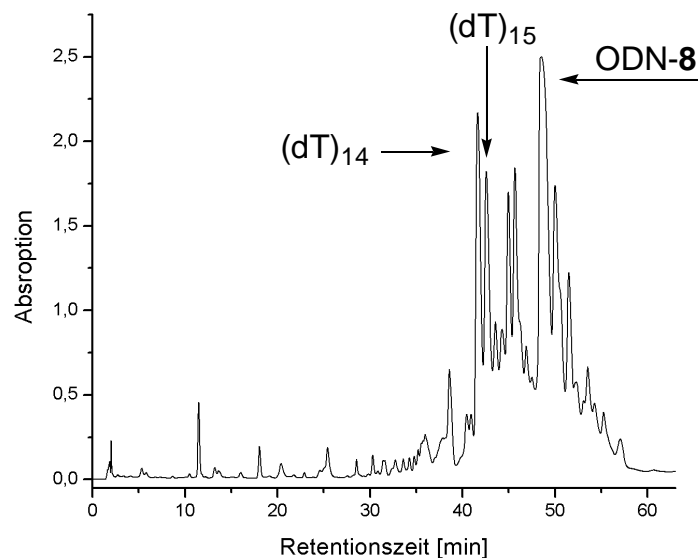


Abbildung 69: HPLC-Chromatogramm der Trennung des Rohprodukts von ODN-3

In Abb.69 ist ein typisches Chromatogramm einer Trennung des Rohprodukts eines zweifach Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotids, hier ODN-3, gezeigt. Der hier relativ größere Anteil an Nebenprodukten bzw. Abbauprodukten gegenüber dem Rohprodukt des ODN-1 (Abb.68, S.86) ist durch die Anwesenheit zweier Phthalidylgruppen bedingt. Abb.70 (S.88) zeigt den analytischen HPLC-Lauf des gereinigten ODN-3 nach zweifacher Trennung. Die unterschiedlichen

Retentionszeiten des Oligonucleotids in dem HPLC-Chromatogramm des Trennungslaufs und dem des analytischen Laufs rühren daher, da zur Messzeitverkürzung für die analytischen Läufe ein steilerer Acetonitrilgradienten benutzt wurde, als für die Trennung.

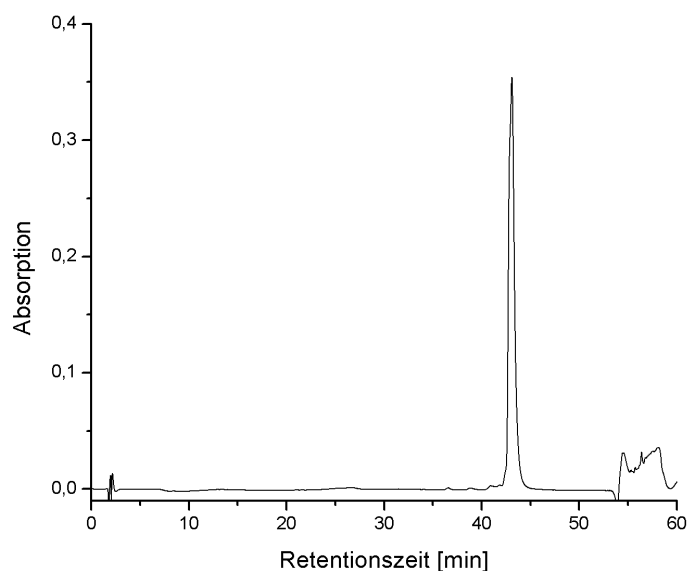


Abbildung 70: Analytisches HPLC-Chromatogramm nach zweifacher Trennung von ODN-3

Die hier verwendete Methode der Isolierung der Oligonucleotide ist der in früheren Arbeiten^[83] verwendeten Trennung mittels Ionenaustausch-Chromatographie, bei der ein stark salzhaltiger Eluent vonnöten ist ($> 50 \text{ mM Na}^+$), bei weitem überlegen. Neben der kleineren Menge an benötigtem Lösungsmittel entfällt das nach der Trennung notwendige Entsalzen der Oligonucleotide, da der hier verwendete Triethylamin/Essigsäure-Puffer im Vakuum flüchtig ist. Auch wäre hinsichtlich der Analytik mit der MALDI-TOF-Spektrometrie die Verwendung von Alkalisalzen sehr problematisch (siehe 4.4, S.90).

4.3.7 Der Trityl-Assay

Die Verfolgung der Ausbeuten der einzelnen Kupplungsschritte während der Oligonucleotidsynthese wird mit Hilfe eines Trityl-Assays durchgeführt, bei dem die absoluten Mengen der abgespaltenen DMTr-Schutzgruppe der einzelnen

Syntheseyklen ermittelt werden. Hierzu werden die Reaktionslösungen der DMTr-Entschützungen getrennt aufgefangen, mit einer 0.1 molaren *p*-TSA-Lösung in Acetonitril auf 10 mL verdünnt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von $\lambda = 490$ nm gemessen. In Abb.71 ist exemplarisch ein Trityl-Assay der Synthese eines (dT)₁₅-Oligomers abgebildet.

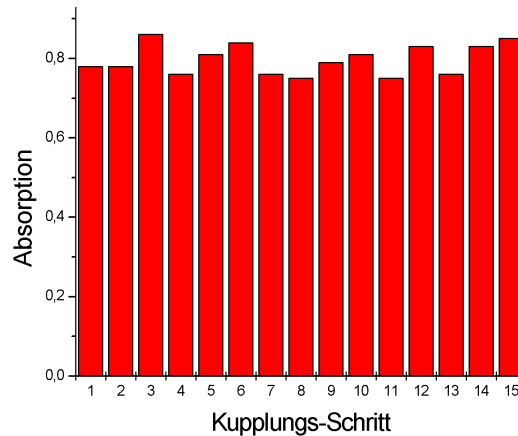


Abbildung 71: UV/VIS-spektroskopische Verfolgung des Trityl-Assay einer (dT)₁₅-Oligomersynthese

Aus Abb.71 ist zu erkennen, dass mit Hilfe des Trityl-Assays keine Aussagen bezüglich der Kupplungsausbeute genauer als ca. 10 % getroffen werden können. Dies zeigt sich z.B. an dem Extinktionsanstieg nach der zweiten Kupplung, da es keine Ausbeutesteigerung zur vorhergehenden Kupplung wegen des 3'-OH-Cappingschritts geben kann. Demzufolge kann mit Hilfe des Trityl-Assays, wie er hier an diesem DNA-Synthesizer durchgeführt werden kann, nur eine Aussage über einen drastischen Ausbeuteverlust getroffen werden.

Da solche hohen Ausbeuteverluste optisch leicht an den durch das DMTr-Kation orange gefärbten Entschützungs-lösungen zu erkennen sind, wurde bei den meisten Oligonucleotidsynthesen nur eine optische und keine UV/VIS-spektroskopische Verfolgung des Trityl-Assays durchgeführt.

4.3.8 Die Bestimmung der optischen Dichte (OD_{260})

Mit Hilfe des OD_{260} -Werts kann die molare Menge eines bekannten Oligonucleotids bestimmt werden.

Per Definition entspricht ein OD_{260} der Menge an Oligonucleotid, welches in einem mL gelöst, mit einer Schichtdicke von 1 cm einen Extinktionskoeffizienten von 1 bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm hat.

Aus der gemessenen optischen Dichte eines Oligonucleotids kann mit Hilfe der Extinktionskoeffizienten der unterschiedlichen Basen die molare Menge des Oligonucleotids berechnet werden (Gleichung 3).

$$x \text{ [nmol]} = \frac{\text{gesamt } OD_{260} \cdot 100}{(1.52aA + 1.20gG + 0.71cC + 0.48tT)}$$

Gleichung 3: Berechnung der molaren Menge eines Oligonucleotids aus der optischen Dichte (OD_{260})

Wobei a = Anzahl der Adenine, g der Guanine, c der Cytidine und t der Thymine sind.

Das zu messende Oligonucleotid wird in einem Eppendorf-Cap in 100 μ L Mili-Q-Wasser gelöst. Von dieser Lösung wird zur Bestimmung der Extinktion 10 μ L abgenommen und auf 1000 μ L verdünnt. Mit Hilfe der oben angegebenen Gleichung 3 kann die molare Menge des entsprechenden Oligonucleotids berechnet werden.

4.4 CHARAKTERISIERUNG DER OLIGONUCLEOTIDE MIT DER MALDI-TOF-SPEKTROMETRIE

4.4.1 Die MALDI-TOF-Spektrometrie

Zur Charakterisierung von Oligonucleotiden stellt die massenspektrometrische Analyse mit der Matrix-unterstützten Laserdesorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie (time of flight) (MALDI-TOF) neben der ESI-Massenspektrometrie die

einzig praktikable Methode dar, da andere Methoden, wie z.B. die strukturelle Untersuchung mit der NMR-Spektroskopie, bei weitem zu aufwendig sind. Eine herausragende Stärke der MALDI-TOF-Spektrometrie liegt in der Möglichkeit mit ihr Moleküle großer Masse ohne deren hier unerwünschte Fragmentierung zu messen. In Abb.72 ist schematisch die Versuchsanordnung des in dieser Arbeit verwendeten UV-MALDI-TOF-Spektrometers, des Bruker Reflex III, gezeigt.

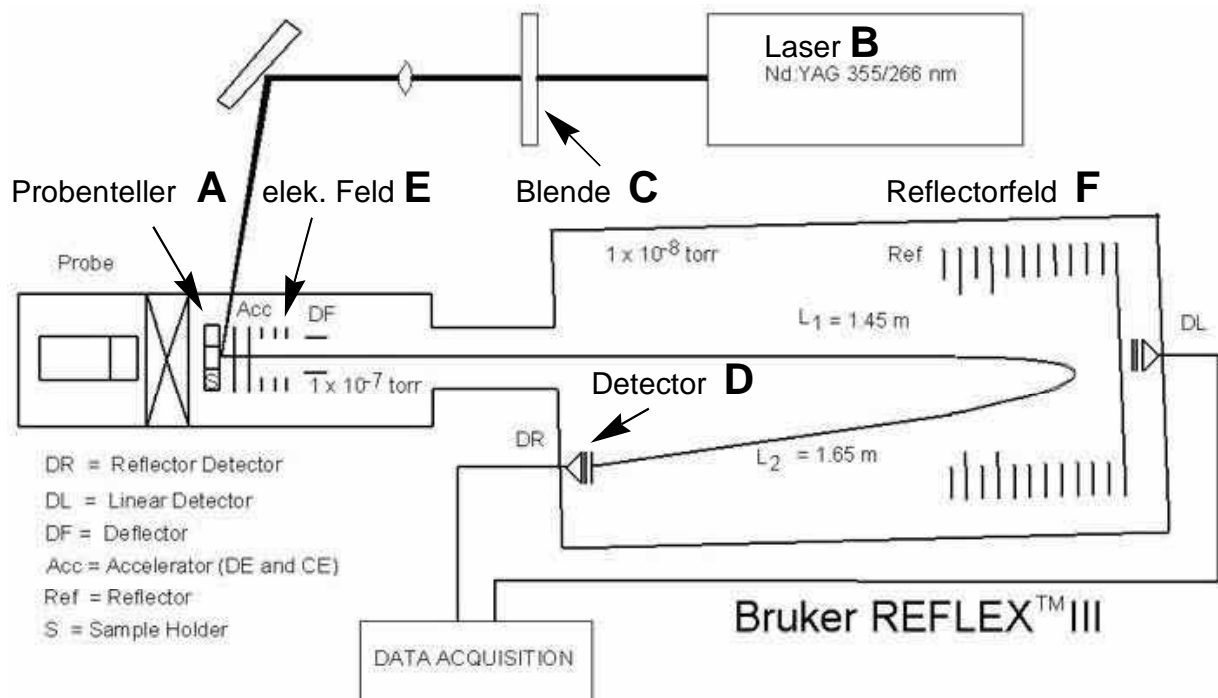


Abbildung 72: Schematische Darstellung des Bruker Reflex III MALDI-TOF-Spektrometers

Die auf dem metallischen Probenhalter **A** zusammen mit der Matrix aufgetragene Probe wird durch Pulse (Pulsdauer: 3-4 ns) eines UV-Nd-Lasers (355/266 nm) **B** in die Gasphase gebracht und dort von geladenen Matrixfragmenten ionisiert. Die Intensität des Lasers, welche einen großen Einfluss auf die Desorption der Probe hat, kann mit der Blende **C** kontrolliert werden. Die geladenen Moleküle werden durch ein elektrisches Feld **E** (Accelerator) umgekehrt proportional zu ihrer Masse beschleunigt und gelangen in die ca. 1.5 Meter lange Flugkammer. Am Ende der Flugkammer befindet sich ein Reflektorfeld **F**, welches den Molekularstrahl refokussiert auf den Detektor **D** lenkt. Hierdurch werden Laufzeitschwankungen, bedingt durch unterschiedliche Beschleunigungsstrecken und nicht parallele Flugbahnen, ausgeglichen.

4.4.2 Präparation der MALDI-TOF-Proben

Die richtige Präparation der MALDI-TOF-Proben ist für das Gelingen und die Reproduktion der Messung von Oligonucleotiden von entscheidender Bedeutung. Hierzu stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, die grob in zwei Kategorien unterteilt werden können. Bei der "schichtweisen" Präparation wird zunächst die verwendete Matrix gegebenenfalls mit notwendigen Additiven als Lösung auf den Probenteller aufgetragen. Nachdem das Lösungsmittel verdampft ist, wird das ebenfalls gelöste Oligonucleotid auf die kristallisierte Matrix gegeben, wobei ein Teil der Matrix angelöst wird, so dass die gewünschte Kokristallisation zwischen Matrix und Oligonucleotid stattfinden kann. Bei der zweiten Präparationsmethode werden Matrix, notwendige Additive und das Oligonucleotid schon vor dem Auftragen auf den Probenteller gemischt. Während sich bei der ersten Methode durch geschicktes Anlösen der Matrix ein Mischungsgradient zwischen Matrix und Oligonucleotid erzeugen lässt, bietet die zweite Präparation die Möglichkeit, definierte Konzentrationsverhältnisse einzustellen. Das Konzentrationsverhältnis ist insofern von großer Bedeutung, da es die Bildung der "Hotspots", eben jener Kristalle bzw. Probenbereiche, welche das Oligonucleotid befähigen, besonders gut in die Gasphase zu gelangen, stark beeinflusst.

Bei der in Abschnitt 4.4.3 (S.93) beschriebenen Optimierung der Probenbereitung wurden beide Methoden angewendet. Wobei es sich schnell herausstellte, dass das gemeinsame Auftragen der Matrix mit dem Oligonucleotid wesentlich bessere Proben liefert als die Präparation in Schichten.

Das größte Problem bei der Probenpräparation von Oligonucleotiden ist die effektive Unterdrückung von Alkalimetallionen, insbesondere Natrium und Kalium, da sich deren polyvalente Oligonucleotidaddukte nicht oder im besten Fall äußerst schwer desorbieren lassen und somit die Messung stark erschweren, wenn nicht sogar gänzlich verhindern.

Zur Unterdrückung der Alkalimetallsalze von Oligonucleotiden stehen mehrere Methoden zur Verfügung, die in Abhängigkeit der Anforderungen an die jeweilige Messung ihre unterschiedlichen Vorteile bieten. Durch Zugabe von alkalimetallbindenden Substanzen (Additive bzw. Komatrix) kann die effektive Konzentration der Metallionen verringert werden. Neben der Chromatographie der Probe mit einer C¹⁸-Ionenaustauschsäule besteht auch die Möglichkeit durch Behandlung der

Probenlösung mit Ionenaustauschern die absolute Alkalimetallkonzentration herabzusetzen.^[120]

4.4.3 Optimierung der MALDI-TOF Probenpräparation

Für Oligonucleotide mit einer Masse unter 10^4 Da stellen 3,4,5-Trihydroxyacetophenon (THAP) **100**, Picolinsäure (PA) **101**, 3-Hydroxypicolinsäure, (3-HPA) **102** und 6-Aza-2-thiothymidin (ATT) **103** (Abb.73) die am häufigsten bei einem UV-Laser verwendeten Matrices dar, wobei PA **101** und 3-HPA **102** auch bei DNA-Fragmenten über 10^4 Da angewendet werden. ATT **103** als nicht-saure Matrix wurde zur Vermessung von ds-DNA mit zufriedenstellenden Ergebnissen eingesetzt.

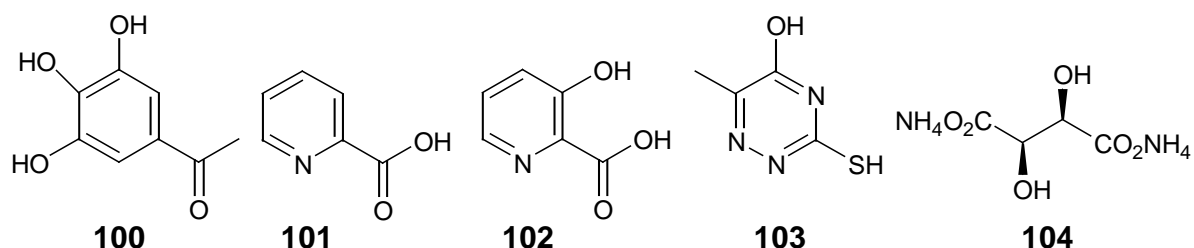


Abbildung 73: THAP **100**, PA **101**, 3-HPA **102**, ATT **103**, (+)-DAT **104**

Während der hier durchgeführten Optimierung der Probenpräparation wurden alle vier Matrices bezüglich ihrer Fähigkeit, gut messbare Proben zu liefern, getestet. Als Standardoligonucleotid wurde bei jeder Testmessung ein (dT)₁₅-Oligomer verwendet, da es die größtmögliche Übereinstimmung zu den Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotiden hat und die glycosidische Bindung im Thymidin unter MALDI-Bedingungen wesentlich stabiler ist als die von Adenosin, Guanosin und Cytosin.^{[116],[117]}

In der ersten Messreihe wurden die drei sauren Matrices THAP **100**, PA **101** und 3-HPA **102** verwendet, die üblicherweise als gesättigte Lösungen in Wasser bzw. in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (1:1 v/v) eingesetzt werden. Zusätzlich wurde zur Verdrängung der Alkaliionen Diammoniumtartrat^{[123],[124]} (DAT) **104** (Abb.73) verwendet.

In Abb.74 (S.94) ist der Flowchart der Versuchsreihe gezeigt, in der die einzig erfolgreiche Präparation hervorgehoben ist.

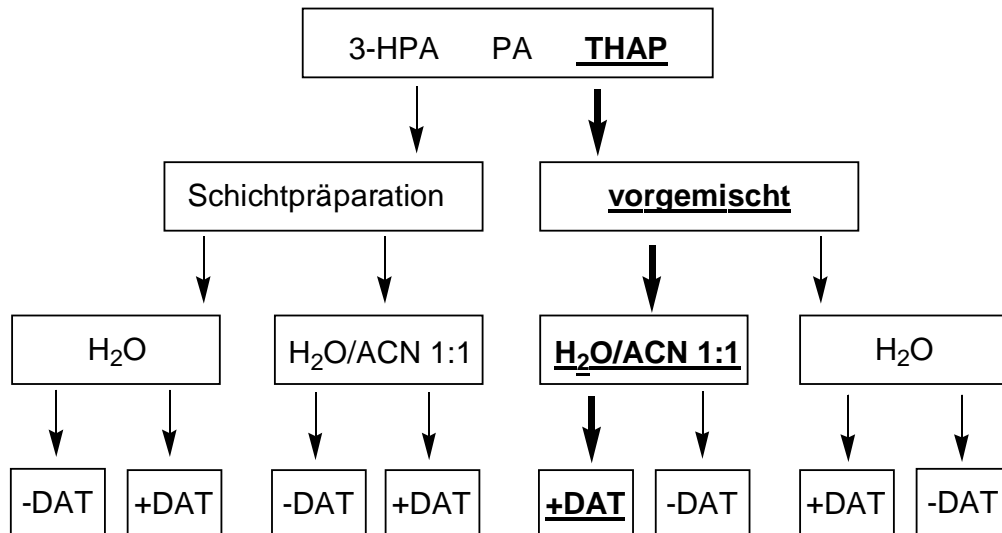


Abbildung 74: Flowchart zur Messreihe der sauren Matrices THAP 100, PA 101 und 3-HPA 102

Mit dieser Messreihe wurden zunächst drei vordergründige Parameter sondiert, um für die folgenden Versuche eine möglichst gute Einschränkung der Präparationsbedingungen zu erzielen. Dem Flowchart folgend ergaben sich 24 Kombinationen für die Probenpräparation, von denen jeweils drei Proben zur Verifizierung der Reproduzierbarkeit vermessen wurden. Es wurde für jede Probe 50 pmol des (dT)₁₅-Oligomers in 2 µL einer gesättigten Lösung der jeweiligen Matrix und 1 µL einer

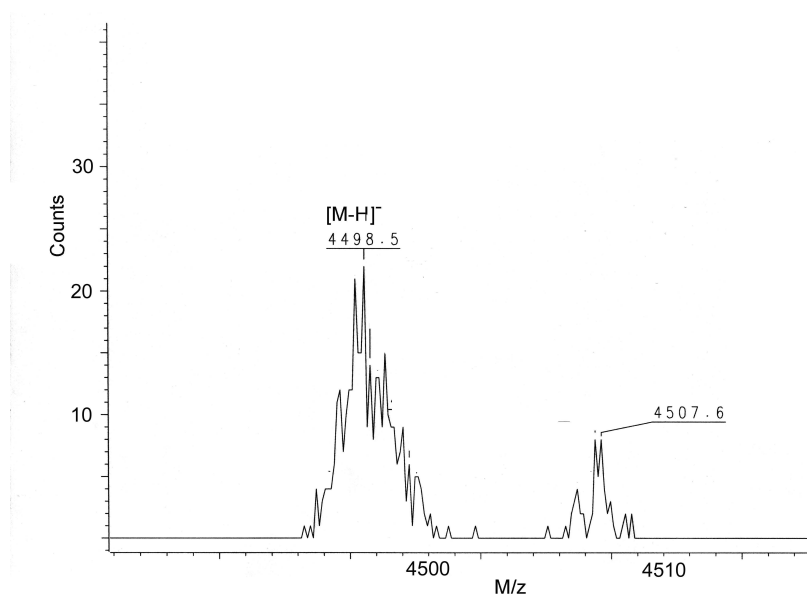


Abbildung 75: MALDI-TOF-Spektrum des (dT)₁₅-Oligomers unter den in Abb.74 hervorgehobenen Bedingungen

1 molaren Lösung von DAT **104** verwendet. Während die Mischungsmethode und die Wahl des Lösungsmittels Einfluss auf das Konzentrationsverhältnis zwischen Matrix und Oligonucleotid nehmen, beeinflusst die Zugabe von DAT **104** zusätzlich noch die Zusammensetzung der Matrix.

In Abb.75 (S.94) ist das Spektrum der einzig erfolgreichen Messung mit dem Signal $[M-H]^- = 4499$ m/z abgebildet. Es konnten zwar die grundlegenden Parameter der Probenbereitung eingegrenzt werden, doch ist die Intensität von ca. 20 Counts bei 500 Laserpulsen viel zu klein für die Verwendung als standardisierte analytische Methode. Positiv zu vermerken ist, dass es möglich war, die Alkalimetallionen größtenteils zu unterdrücken. Demnach ergaben sich aus dieser Messreihe folgende drei Schlussfolgerungen:

1. Nur mit der Verwendung von THAP **100**, gelöst in einem Wasser/Acetonitril-Gemisch (1:1 v/v), lassen sich messbare Proben herstellen.
2. Durch die schichtweise Präparation werden zu wenige bzw. keine auffindbare Hotspots erzeugt.
3. Die Zugabe von DAT **104** ist notwendig zur Unterdrückung der Alkaliionen.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine zweite Messreihe durchgeführt (Tab.10, S.96), in der das Mischungsverhältnis zwischen THAP **100** und DAT **104** variiert wurde. Zusätzlich wurde der Einfluss von Trifluoressigsäure (TFA) auf die Bildung einer guten Matrix untersucht. Durch die Zugabe von DAT **104** zu der Matrix werden die Alkaliionen durch das Ammoniumion unter Bildung der Ammoniumphosphate verdrängt. Hierdurch wird die "Qualität" der MALDI-TOF-Proben wesentlich verbessert, da die Ammoniumsalze von Oligonucleotiden leichter desorbiert werden als deren Alkalisalze. Im Vakuum zersetzen sie sich dann in die entsprechenden freien Oligonucleotide und Ammoniak. Da die Verdrängung der Alkalimetallionen durch die Ammoniumionen eine Gleichgewichtsreaktion ist, verschiebt eine hohe Konzentration an DAT **104** das Gleichgewicht zwar auf die gewünschte Seite, jedoch wird gleichzeitig die Zusammensetzung der Matrix ungünstig für die Desorption der Oligonucleotide, so dass ein Optimum des Verhältnisses von THAP **100** und DAT **104** gefunden werden muss.

Zur Abschätzung eines optimalen Verhältnisses wurden die drei in Tab.10 (S.96) angegebenen, sich über 2 Größenordnungen erstreckenden Konzentrationsverhältnisse untersucht.

	THAP [μ l]	DAT [μ mol]	1 %ige TFA [μ l]	(dT) ₁₅ [pmol]
A	1.4	1.4	-	35
B	1.4	0.14	-	35
C	1.4	0.014	-	35
D	1.4	1.4	1.4	35
E	1.4	0.14	1.4	35
F	1.4	0.014	1.4	35

Tabelle 10: Optimierung des Verhältnisses von THAP 100 und DAT 104

Auch wurde eine kleinere Probe von 35 pmol anstatt 50 pmol des (dT)₁₅-Oligomers benutzt, was sich jedoch als zu gering herausstellte. Aus den drei Spektren der Versuche **C** (Abb.78, S.97), **E** (Abb.76) und **F** (Abb.77, S.97) und dem vorangegangenen Spektrum (Abb.75, S.94), das dem Spektrum von Versuch **A** entspricht, ist der Einfluss von DAT **104** gut zu erkennen.

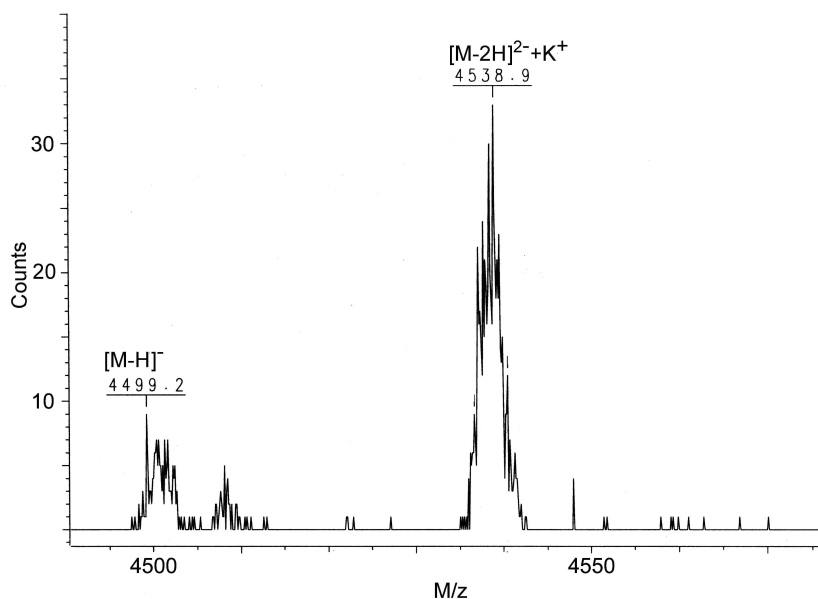


Abbildung 76: MALDI-TOF-Spektrum des (dT)₁₅-Oligomers, Versuch **E**

Der Vergleich der drei Spektren der Versuche **A**, **E** und **F** zeigt, dass mit zunehmender Konzentration des DAT **104** die effektive Alkaliionenkonzentration zwar abnimmt, jedoch auch wie erwartet die Intensität des Signals. Während bei der hohen DAT-Konzentration **104** (Versuch **A**) die Alkaliionen soweit verdrängt wurden, dass keines ihrer Addukte nachweisbar war, zeigt Versuch **E** (mittlere DAT-

Konzentration) das freie $(dT)_{15}$ -Oligomer und dessen mono-Kaliumaddukt mit $[M-2H]^{2-}+K^+ = 4538$ m/z in einem Verhältnis von ca. 1 zu 5.

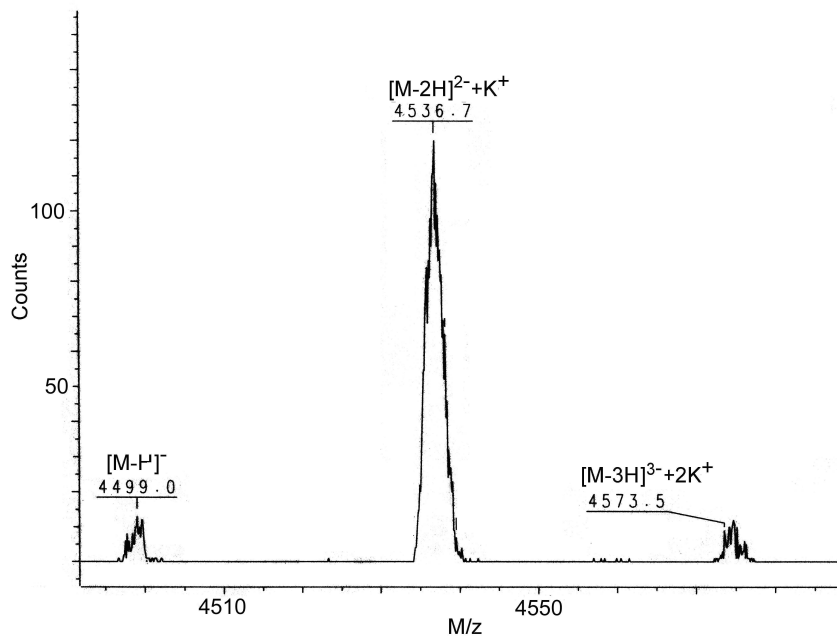


Abbildung 77: MALDI-TOF-Spektrum des $(dT)_{15}$ -Oligomers, Versuch **F**

Bei der niedrigsten DAT-Konzentration (Versuch **F**) lässt sich zusätzlich zu dem mono-Kaliumaddukt noch das di-Kaliumaddukt mit $[M-3H]^{3-}+2K^+ = 4573$ m/z

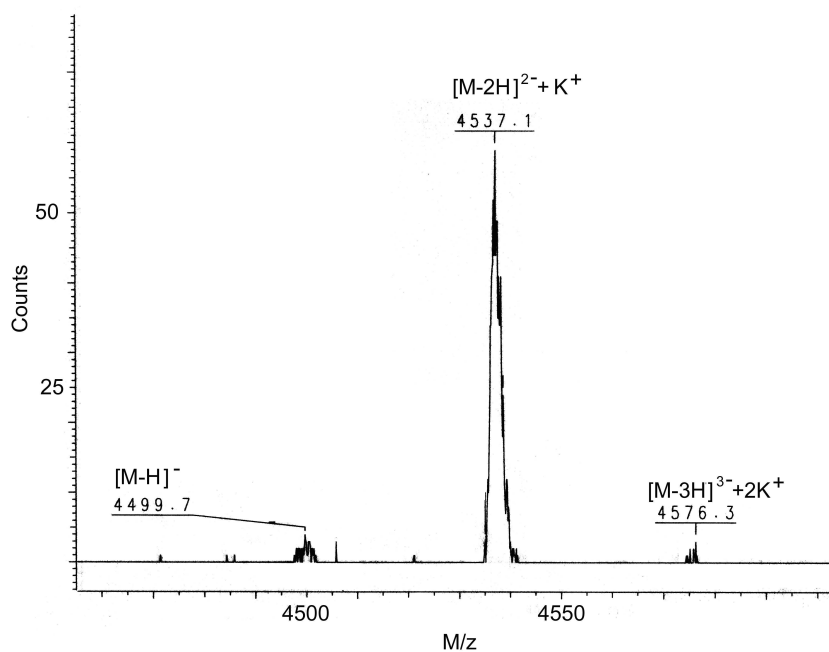


Abbildung 78: MALDI-TOF-Spektrum des $(dT)_{15}$ -Oligomers, Versuch **C**

nachweisen, während sich das Intensitätsverhältnis zwischen dem freien (dT)₁₅-Oligomer und dessen mono-Kaliumaddukt verringerte. Die beiden Versuche **E** und **F** zeigen, dass bei höherer DAT **104** Konzentration die Intensität des Signals stark abnimmt. Der Einfluss von TFA ist aus den Versuchen **C** und **F** (Abb.78 und Abb.77, S.97) ersichtlich. Durch das Ansäuern der Probenlösungen lässt sich die Intensität der Signale nahezu verdoppeln.

Es konnte zwar eine Optimierung für die THAP **100** Matrix erreicht werden. Doch war immer noch die Intensität der Signale mit ca. 120 Counts bei 500 Laserpulsen zu klein und auch die Anzahl der Hotspots zu niedrig, um eine zuverlässige Analytik zu gewährleisten, insbesondere für die Untersuchung von Mischungen unbekannter Oligonucleotide (siehe 4.4.4, S.100).

Als nächstes wurde die nicht saure Matrix ATT **103** verwendet. Es wurden mehrere Proben analog der für THAP-optimierten Präparationen hergestellt und vermessen. Jedoch konnte bei keiner der Messungen das (dT)₁₅-Oligomer nachgewiesen werden, welches die Schlussfolgerung nahelegte, dass die ATT-Matrix wesentlich stärker von DAT **104** beeinflusst wird als die THAP-Matrix, somit konnte hier DAT nicht zur Unterdrückung der Alkaliionen verwendet werden.

Als alternative Methode besteht die Möglichkeit, die Probenlösung mit NH₄⁺-belegten und pH-neutralen Ionenaustauscher-Beans zu behandeln, welche durch Waschen des sauren Ionentauschers (Dowex 80 W) mit einer gesättigt wässrigen Diammoniumtartrat-Lösung hergestellt werden kann. Zunächst wurde eine Probenlösung aus 2 µL einer gesättigten ATT-Lösung in Acetonitril/Wasser (1:1 v/v) und 2 µL der Oligonucleotid-Lösung (50 µmol in Acetonitril/Wasser 1:1 v/v) mit ca. 10 Ionenaustauscher-Beans über 2 Stunden in einem Eppendorf-Cap behandelt. Jedoch erwies sich die Inkubationszeit als wesentlich zu kurz.

Wurde die Probe über ca. 12 Stunden mit dem belegten Ionenaustauscher behandelt, war das ursprüngliche Probenvolumen zu gering, da es nicht zu vermeiden war, dass ein Teil des Acetonitrils verdunstet und deswegen das ausfallende ATT **103** einen Teil des Oligonucleotids bindet. Als optimal hatte sich herausgestellt, einerseits die ATT-Lösung vor der Probenbereitung 12 Stunden mit dem Ionenaustauscher zu behandeln und andererseits die Probe mit Acetonitril auf das Doppelte zu verdünnen. Des Weiteren ist es wichtig, darauf zu achten, dass der Ionenaustauscher relativ trocken zu der Probe gegeben wird, damit die Probe nicht zusätzlich mit Wasser verdünnt wird. Mit dieser Präparationsmethode konnten

MALDI-TOF-Proben hergestellt werden, die sowohl eine ausreichende Intensität als auch eine hohe Anzahl an Hotspots aufwiesen.

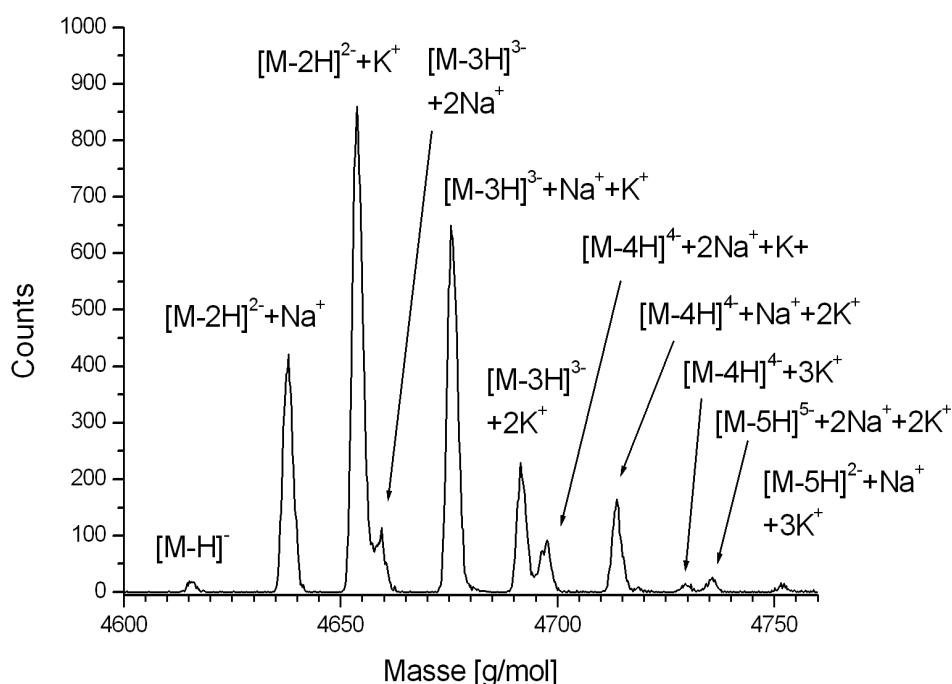


Abbildung 79: MALDI-TOF-Spektrum von ODN-1 (ATT 103 und Beans)

In Abb.79 ist das MALDI-TOF-Spektrum des Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotids ODN-1 abgebildet, dessen Probenpräparation mit der oben beschriebenen Methode durchgeführt wurde. Aus Tab.11 sind die zugehörigen Massen der Alkalimetalladdukte zu entnehmen.

Addukt	Masse [g/mol]	Addukt	Masse [g/mol]
$[M-H]^-$	4615.1	$[M-4H]^{4-} + 2Na^+ + K^+$	4687.5
$[M-2H]^{2-} + Na^+$	4637.8	$[M-4H]^{4-} + Na^+ + 2K^+$	4713.7
$[M-2H]^{2-} + K^+$	4653.8	$[M-4H]^{4-} + 3K^+$	4729.5
$[M-3H]^{3-} + 2Na^+$	4659.8	$[M-5H]^{5-} + 2Na^+ + 2K^+$	4735.6
$[M-3H]^{3-} + Na^+ + K^+$	4675.6	$[M-5H]^{5-} + Na^+ + 3K^+$	4752.8
$[M-3H]^{3-} + 2K^+$	4691.6		

Tabelle 11: Massen der Natrium- und Kaliumaddukte von ODN-1

Wie aus Abb.79 (S.99) klar ersichtlich ist, kann mit dieser Präparationsmethode die Alkalimetallionenkonzentration nicht so gesenkt werden, dass das $[M-H]^-$ -Ion eine signifikante Intensität bei der Messung ergab. Jedoch ist die Gesamtintensität bei der Verwendung von ATT **103** um ein Vielfaches größer als bei der Verwendung von THAP **100**. Es lies sich sogar das $[M-5H]^{5-}+Na^++3K^+$ -Ion nachweisen. Abschließend sei bemerkt, dass sich durch NH_4^+ -belegte Ionenaustauscher-Beans die Natriumaddukte nicht unterdrücken lassen wie bei der Verwendung von DAT **104**.

4.4.4 Fragmentierung der Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide

Wie in Abschnitt 4.3.5 (S.84) beschrieben, entstand während der Abspaltung der Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide von dem CPG-Träger eine Reihe von Nebenprodukten. Die HPLC-Retentionszeiten einiger Nebenprodukte legten die Annahme nahe, dass durch die basischen Bedingungen der Abspaltung ein Teil der Phthalidylgruppen unter Öffnung des Lactonrings hydrolysiert worden waren. Dem zur Folge würde es sich bei den beobachteten Nebenprodukten um die aus der Phosphonat-Phosphat-Umlagerung bzw. der *H*-Phosphonat-Rückspaltung (siehe 2.4, S.17) resultierenden Oligonucleotide handeln.

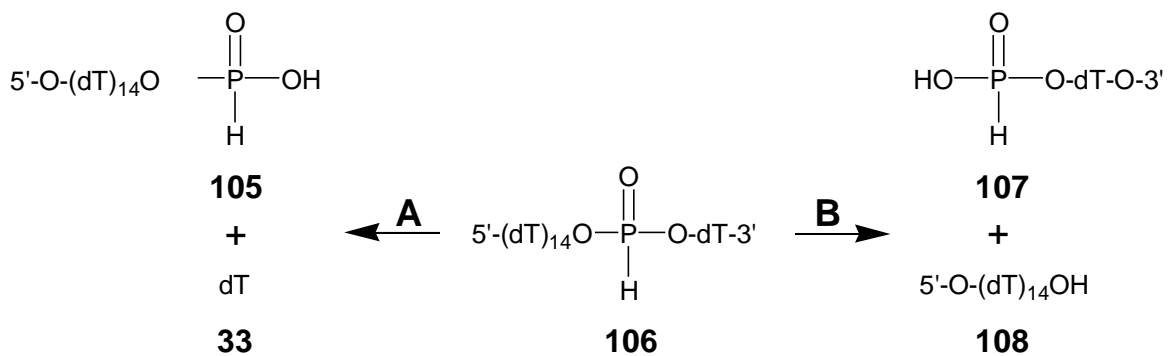


Abbildung 80: Die zwei möglichen Fragmentierungsrichtungen der *H*-Phosphonat-Rückspaltung

Während aus der Phosphonat-Phosphat-Umlagerung mit anschließender Hydrolyse des Benzylesters ein unmodifiziertes $(dT)_{15}$ -Oligomer resultieren würde, sind bei der *H*-Phosphonat-Rückspaltung zwei Produkte möglich (Abb.80).

Je nach Richtung der Fragmentierung des *H*-Phosphonat-Oligonucleotids **106** entsteht entweder das 3'-*H*-Phosphonat-(dT)₁₄-Oligomer **105** und Thymidin **33** (Weg **A**) oder das (dT)₁₄-Oligomer **108** und das 5'-*H*-Phosphonatthymidin **107** (Weg **B**).

Um diese Fragmentierungen zu untersuchen wurden zwei der Nebenprodukte der ODN-2-Abspaltung mit Retentionszeiten um die 37 Minuten als Mischung isoliert und mit Hilfe der MALDI-TOF-Spektrometrie charakterisiert (Abb.81). Das MALDI-TOF-Spektrum zeigt, dass es sich tatsächlich um zwei der vermuteten Fragmentierungsprodukte handelt, dem (dT)₁₅-Oligomer und einem (dT)₁₄-Oligomer. Das MALDI-TOF Spektrum gibt trotz seiner sehr niedrigen Intensität qualitativ das gleiche Mengenverhältnis der beiden Oligonucleotide wie das HPLC-Chromatogramm wieder.

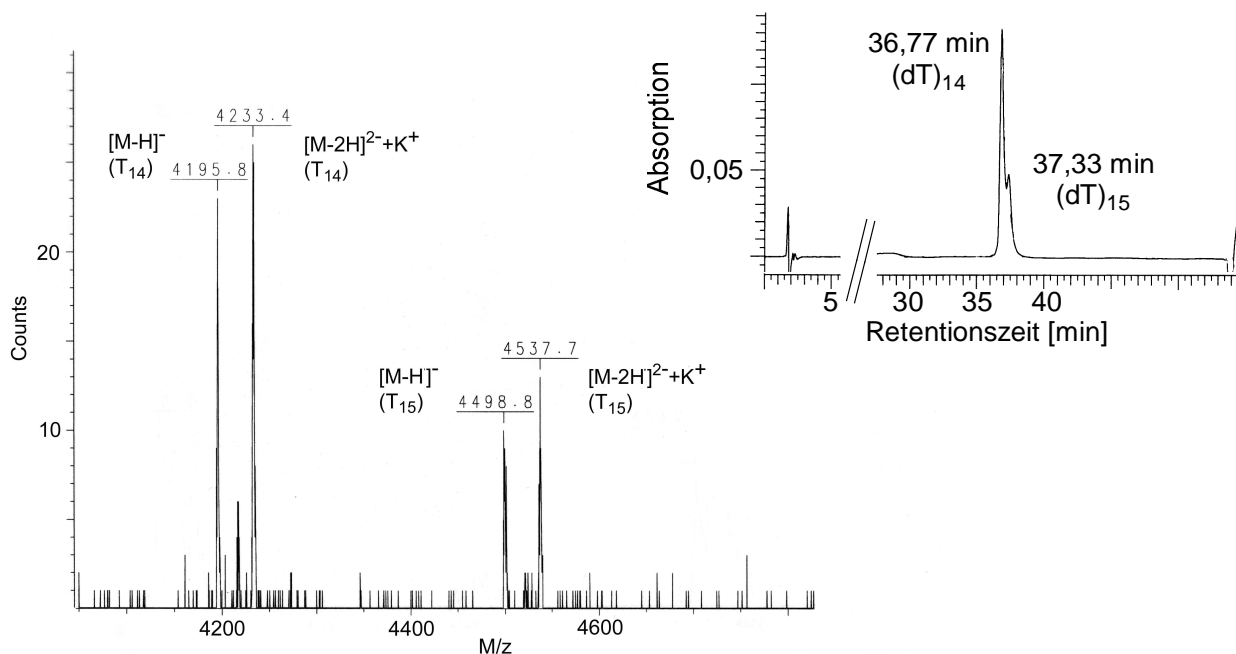


Abbildung 81: MALDI-TOF-Spektrum und HPLC-Chromatogramm der beiden Abbauprodukte des ODN-2

Hierdurch konnte gezeigt werden, dass mit der angewendeten MALDI-TOF-Probenpräparation durchaus Mischungen unbekannter Oligonucleotide analysiert werden können. Zur vollständigen Charakterisierung wurden die beiden (dT)₁₄- und (dT)₁₅-Oligomere voneinander getrennt und separat analysiert. In Abb.82 ist das Spektrum von (dT)₁₅ mit einer Masse von [M-H]⁻ = 4499 m/z und in Abb.83 (S.102) das von (dT)₁₄ mit einer Masse von [M-H]⁻ = 4196 m/z abgebildet.

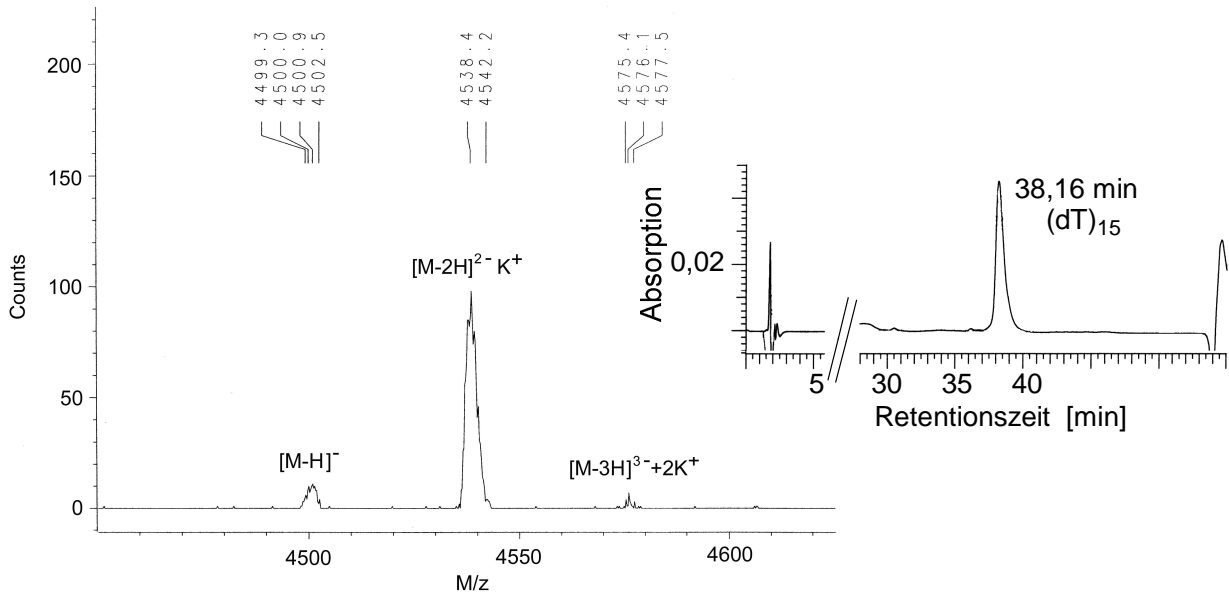


Abbildung 82: MALDI-TOF-Spektrum und HPLC-Chromatogramm des ODN-2, (dT)₁₅-Fraktion

Das aus dem Reaktionsweg **A** resultierende Fragment 3'-H-Phosphonat-(dT)₁₄-Oligonucleotid **105** mit einer Masse von [M-H]⁻ = 4261 m/z konnte in keiner Probe gefunden werden.

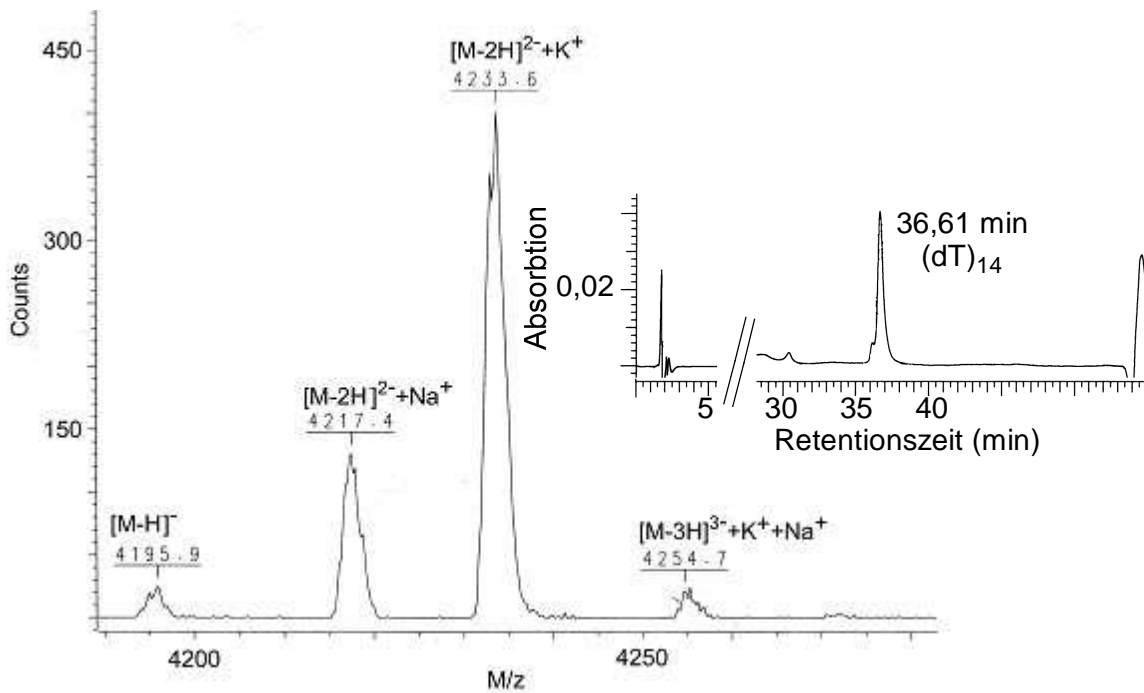


Abbildung 83: MALDI-TOF-Spektrum und HPLC-Chromatogramm des ODN-2, (dT)₁₄-Fraktion

In Abb.84 ist das MALDI-TOF-Spektrum eines (dT)₁₃-Oligomers mit einer Masse von [M-H]⁻ = 3899 m/z gezeigt, welches aus dem Rohprodukt der Abspaltung des zweifach modifizierten Oligonucleotids ODN-3 isoliert werden konnte.

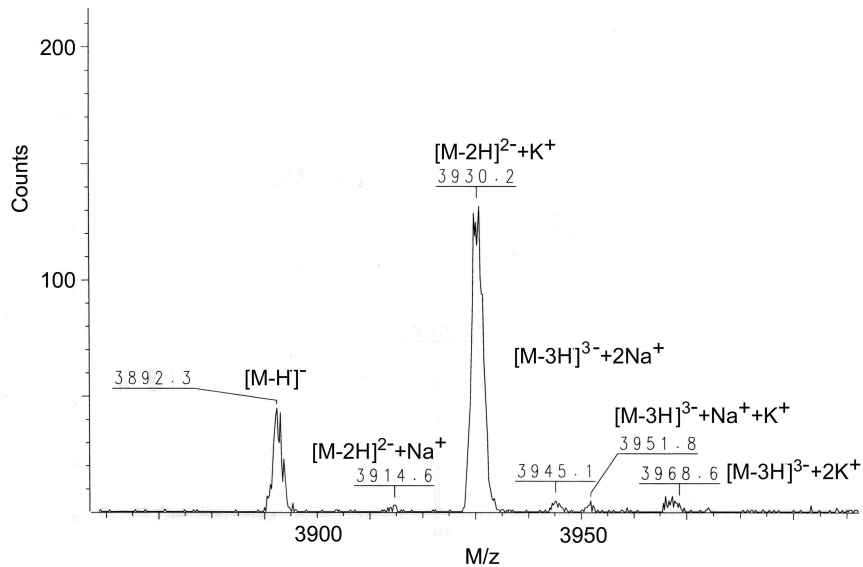


Abbildung 84: MALDI-TOF-Spektrum des ODN-3, (dT)₁₃-Fraktion

Das Verhältnis zwischen dem (dT)₁₄- und dem (dT)₁₅-Oligomer (Abb.81, S.101) und insbesondere die Existenz des (dT)₁₃-Oligomers (ODN-3-Abspaltung) zeigen, dass der größte Teil der hydrolysierten Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide wie erwartet unter der *H*-Phosphonat-Rückspaltung fragmentiert und dabei den Reaktionsweg **B** beschreitet (Abb.80, S.100).

4.5 UNTERSUCHUNG DER PHTHALIDYLPHOSPHONAT-MODIFIZIERTEN OLIGONUCLEOTIDE

4.5.1 Thermodynamische Daten der Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide

Die Hybridisierungseigenschaften eines *antisense*-Oligonucleotids mit der *sense*-RNA sind grundlegend für dessen Funktion und werden mit den thermodynamischen Parametern T_m , ΔH , ΔS , und $K(T)$ beschrieben. Der T_m -Wert (melting point) ist ein

Maß für die thermodynamische Stabilität von assoziativen Komplexen, die durch Oligonucleotide in Lösung gebildet werden. Bei zwei komplementären bzw. teilweise komplementären Oligonucleotiden gibt er diejenige Temperatur an, bei der die Hälfte der Oligonucleotide als Doppelhelix im dynamischen Gleichgewicht mit den Einzelsträngen vorliegt. Der T_m -Wert wird außer von der Anzahl der Basenpaare hauptsächlich durch drei verschiedene Faktoren beeinflusst:

1. C/G reiche Sequenzen haben einen höheren T_m -Wert, da C/G Basenpaare im Gegensatz zu T/A Basenpaaren drei an Stelle von zwei Wasserstoffbrücken ausbilden.
2. Durch eine hohe Oligonucleotidkonzentration wird die Ausbildung der Doppelhelix bevorzugt, woraus ein höherer T_m -Wert resultiert.
3. Eine hohe Salzkonzentration wirkt stabilisierend auf die Doppelhelix, da hierdurch die elektrostatische Abstoßung der Einzelstränge durch die negativ geladenen Phosphatgruppen teilweise kompensiert wird, welches ebenfalls einen höheren T_m -Wert zur Folge hat.

Wie in Abschnitt 2.1 (S.6) dargelegt, ist der T_m -Wert eines *antisense*-Oligonucleotids von großer Bedeutung. Liegt er deutlich unter der Körpertemperatur bilden sich nicht die gewünschten *antisense*-DNA/*sense*-RNA-Hybride aus. Ist er andererseits wesentlich höher, können durch Fehlpaarungen ungewünschte *antisense*-DNA/RNA-Hybride mit nicht target-Sequenzen entstehen oder das *antisense*-Oligonucleotid löst sich nicht von der RNase H verdauten *sense*-RNA. In all diesen Fällen würde die Wirkung des *antisense*-Oligonucleotids stark gemindert.

Da Modifikationen einen unbekanntem Einfluss auf die Hybridisierungseigenschaften von Oligonucleotiden haben können, ist die Untersuchung ihrer Wirkung auf den T_m -Wert von großem Interesse.

4.5.2 Tripelhelix vs. Doppelhelix

Bei einer Mischung von (dT)-Oligonucleotiden und (dA)- bzw. (rA)-Oligonucleotiden besteht die Möglichkeit, neben der Bildung der Watson-Crick-Doppelhelix, dass sich durch Einlagerung eines dritten Strangs in die große Furche der Doppelhelix eine Tripelhelix entsteht. Theoretisch können sich drei unterschiedliche Strukturen bilden

(Abb.85), eine parallele Einlagerung über die Hoogsteen-Bindung (T•AxT **109**) und zwei antiparallele über die reverse-Hoogsteen-Bindung (T•AxT **110**, A•AxT **111**). Die Bildung einer Tripelhelix bei einer äquimolaren Mischung komplementärer Oligonucleotide könnte gravierende Folgen für die Messung des T_m -Werts haben. Hierzu finden sich in der frühen Literatur unterschiedliche Aussagen. Während M. SWIERKOWSKI und D. SZER nur von der Bildung einer Doppelhelix berichten,^[125] kommen D. BARSZCZ und D. SHUGAR 5 Jahre später zu dem Ergebnis, dass unter gewissen Bedingungen unabhängig von dem Konzentrationsverhältnis der komplementären Stränge sich ausschließlich eine Tripelhelix bildet.^[126]

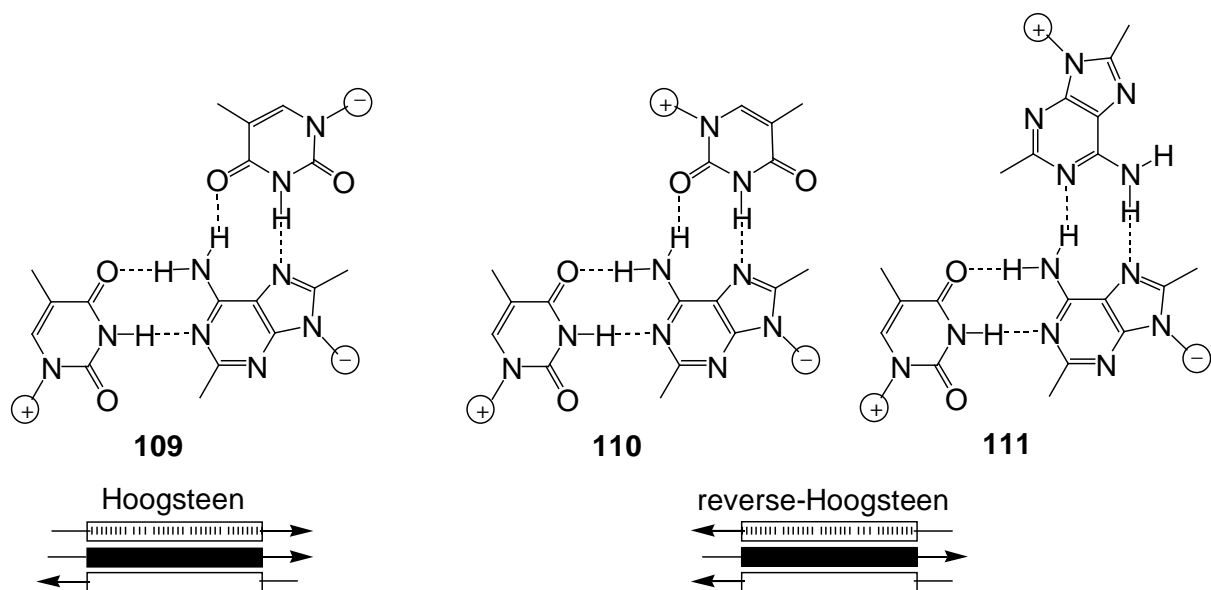


Abbildung 85: Hoogsteen- und reverse-Hoogsteen-Tripelhelices, T•AxT **109**, T•AxT **110**, A•AxT **111**

Die Diskrepanz zwischen diesen Ergebnissen spiegelt die Empfindlichkeit der Tripelhelixbildung von den Bedingungen wie z.B. der Na^+ - und insbesondere der Mg^{2+} -Konzentration wieder.

Neuere Arbeiten zeigen, dass ohne triplexunterstützende Additive die Watson-Crick Bindung wesentlich stabiler ist, als die Hoogsteen-Bindung^{[127],[128]} und somit die Disproportionierung von (dT)/(d/rA) energetisch benachteiligt ist. Auch haben kinetische Messungen von K. R. FOX et al. ergeben,^[129] dass die Dissoziations- und Assoziationskonstante der Tripelhelix mit ca. $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-2}$ etwa 2 bis 3 Größenordnungen langsamer sind als die der Doppelhelix.

Somit ist sichergestellt, dass sich bei den hier verwendeten Versuchsbedingungen zur Messung der T_m -Werte keine Tripelhelices bilden können.

4.5.3 Bestimmung des T_m -Werts

Die Bestimmung des T_m -Werts erfolgt über die Abhängigkeit des Extinktionskoeffizienten von der Temperatur bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm. In der Doppelhelix sind die Basenpaare annähernd senkrecht zu der helikalen Achse ausgerichtet und sind somit parallel zueinander angeordnet (π -Stacking). Die daraus resultierende π - π -Wechselwirkung der aromatischen Elektronen verringert die Absorption (Hyperchromizität). So besitzen komplementäre Oligonucleotide bei niedriger Temperatur, wenn sie zum größten Teil als Doppelhelix vorliegen, einen kleinen Extinktionskoeffizienten und bei höherer Temperatur als Einzelstrang vorliegend einen größeren Extinktionskoeffizienten. Wird nun die Extinktion in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen, ergibt sich eine sigmoidale Kurve, deren Wendepunkt den T_m -Wert angibt (Abb.86 A, S.107).

Zur Bestimmung der T_m -Werte wurden jeweils 1 nmol der komplementären Oligonucleotide in 1 mL Phosphatpuffer (pH 6.8) gelöst und der Extinktionskoeffizient in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen. Da die T_m -Werte aller hier gemessenen Oligonucleotide zwischen 35 °C und 40 °C liegen, wurde ein Messbereich von 10 °C bis 60 °C gewählt. Zur Äquilibrierung der Probe wurde sie mit einer Heizrate von 5 °C pro Minute auf 60 °C erwärmt und anschließend auf die Starttemperatur von 10 °C abgekühlt. Zur Messung wurde eine Heizrate von 0.5 °C pro Minute verwendet. Um den statistischen Fehler zu minimieren wurde der Temperaturbereich sechsmal pro Messung durchlaufen. Die Auswertung der Messung erfolgte mit der van't Hoff-Analyse.

4.5.4 Van't Hoff-Analyse

Aus der gemittelten sigmoidalen Schmelzkurve der komplementären Oligonucleotide wurden mit Hilfe der van't Hoff-Analyse die drei thermodynamischen Größen, der T_m -Wert, ΔH und ΔS berechnet.^{[130],[131]}

Um die Temperaturabhängigkeit des Extinktionskoeffizientens zu eliminieren, welche nicht durch die Hybridisierung der Oligonucleotide hervorgerufen wird, werden zunächst die beiden linearen Bereiche der Schmelzkurve über den gesamten Temperaturbereich extrapoliert (Abb.86 A, S.107).

$$\alpha(T) = \frac{x}{x+y}$$

Gleichung 4: Bestimmung des Dissoziationsgrads $\alpha(T)$

Unter Berücksichtigung beider Ausgleichsgeraden wird der Dissoziationsgrad $\alpha(T)$ bestimmt (Gleichung 4) und durch Auftragen gegen die Temperatur die α -Kurve erhalten. (Abb.86 B).

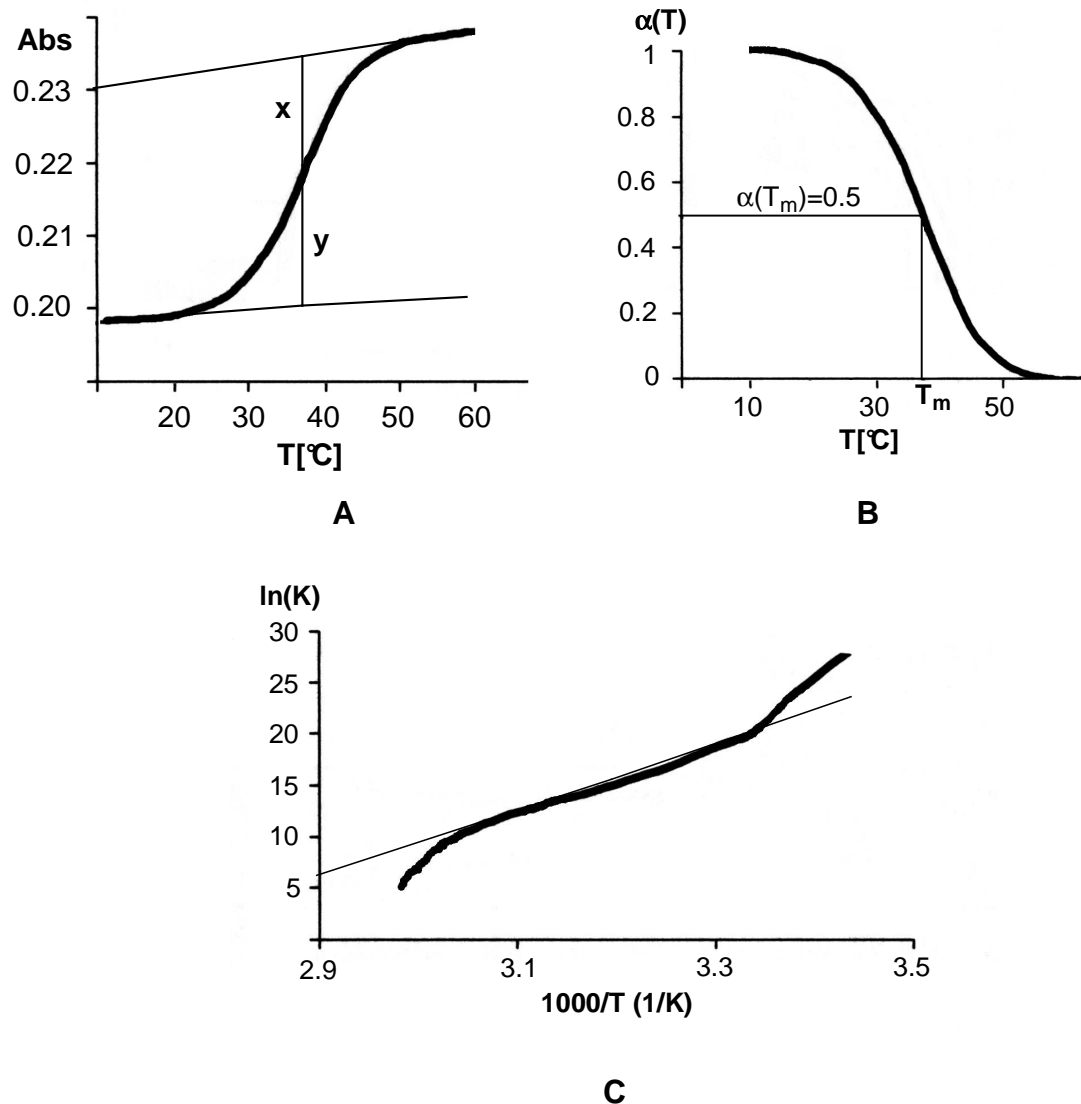


Abbildung 86: Van't Hoff-Analyse, A) T_m -Kurve, B) α -Kurve, C) Van't Hoff-Graph

Aus der so erhaltenen α -Kurve ergibt sich der T_m -Wert mit $\alpha(T_m) = 0.5$. Die Gleichgewichtskonstante $K(T)$ für komplementäre Oligonucleotide lässt sich näherungsweise mit Gleichung 5 ausdrücken.

$$K(T) = \frac{\alpha(T)}{(1-\alpha(T))^n \left(\frac{C_t}{n}\right)^{(n-1)}}$$

Gleichung 5: Bestimmung der Gleichgewichtskonstante $K(T)$

Wobei n die Molekularität und C_t die Gesamtkonzentration der Oligonucleotide ist.

Um ΔH und ΔS zu erhalten, wird der natürliche Logarithmus der Gleichgewichtskonstanten $K(T)$ gegen die reziproke Temperatur aufgetragen (van't Hoff-Graph, Abb.86 C, S.107). Aus der Steigung s der Ausgleichsgeraden des linearen Bereichs der van't Hoff-Kurve ergibt sich die Bindungsenthalpie ΔH mit $\Delta H = -s \cdot R$ und aus dem Achsenabschnitt a die Entropie ΔS mit $\Delta S = a \cdot R$, wobei R die Gaskonstante ist.

4.5.5 T_m -Werte der Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide

Die T_m -Werte der Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide gegenüber $(dA)_{15}$ und $(rA)_{15}$ wurden mit der im Abschnitt 4.5.3 (S.106) beschriebenen Methode bestimmt.

In Tab.12 (S.109) sind die gemessenen T_m -Werte der Oligonucleotide ODN-1 bis ODN-9 gegenüber $(dA)_{15}$ angegeben. Da der T_m -Wert stark von der Ionenstärke des verwendeten Puffermediums abhängt wurde als Referenz der T_m -Wert von $(dT)_{15}/(dA)_{15}$ mit $T_m = 38.68 \text{ }^\circ\text{C}$ bestimmt.

Der Messfehler, der bei der van't Hoff-Analyse durch die falsche Wahl des linearen Bereichs (Abb.86 C, S.107) auftreten kann, lag je nach Güte der Messung zwischen $\pm 0.05 \text{ }^\circ\text{C}$ und $\pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Der T_m -Wert einer Mischung unterschiedlicher komplementärer Oligonucleotide setzt sich linear aus den T_m -Werten der einzelnen komplementären Oligonucleotide zusammen, d.h. der T_m -Wert einer äquimolaren Mischung zweier Oligonucleotidpaare ist Mittelwert der T_m -Werte beider separaten Oligonucleotidpaare. Da die drei Oligonucleotide ODN-1, ODN-2 und ODN-3 jeweils aus dem racemischen Gemisch der entsprechenden R_P - und S_P -konfigurierten Oligonucleotide bestehen, sollten die gemessenen T_m -Werte diesen Zusammenhang widerspiegeln.

		Struktur	T_m [°C]	ΔH [KJ/mol]	ΔS [J/mol/k]
		(dT) ₁₅	38.68	-605.0	-1588
ODN-1	(R/S) _P	3'-dT _{Ph} dT ₁₄ -5'	37.64 (-1.04)	-587.8	-1770
ODN-7	R _P	3'-dT _{Ph} dT ₁₄ -5'	39.50 (+0.82)	-514.8	-1445
ODN-4	S _P	3'-dT _{Ph} dT ₁₄ -5'	36.27 (-2.41)	-485.2	-1445
ODN-2	(R/S) _P	3'-dT _{14Ph} dT-5'	38.45 (-0.23)	-500.1	-1482
ODN-8	R _P	3'-dT _{14Ph} dT-5'	39.69 (+1.1)	-476.8	-1402
ODN-5	S _P	3'-dT _{14Ph} dT-5'	38.06 (-0.62)	-514.2	-1531
ODN-3	(R/S) _P	3'-dT _{Ph} dT _{13Ph} dT-5'	38.27 (-0.41)	-440.5	-1293
ODN-9	R _P	3'-dT _{Ph} dT _{13Ph} dT-5'	39.35 (+0.67)	-487.0	-1439
ODN-6	S _P	3'-dT _{Ph} dT _{13Ph} dT-5'	37.15 (-1.53)	-439.6	-1296

Tabelle 12: T_m -Werte und thermodynamische Daten der Oligonucleotide ODN-1 bis ODN-9 mit (dA)₁₅ hybridisiert

In Tab.13 sind sowohl die aus den T_m -Werten der entsprechenden R_P- und S_P-konfigurierten Oligonucleotide berechneten T_m -Mittelwerte als auch die gemessenen T_m -Werte der drei diastereomeren Oligonucleotidmischungen (ODN-1 bis ODN-3) aufgelistet.

	ODN-1/(dA) ₁₅	ODN-2/(dA) ₁₅	ODN-3/(dA) ₁₅
T_m (berechnet)	37.77 °C	38.87 °C	38.25 °C
T_m (gemessen)	37.64 °C	38.45 °C	38.27 °C

Tabelle 13: Berechnete und gemessene T_m -Werte des ODN-1/(dA)₁₅-, ODN-2/(dA)₁₅- und des ODN-3/(dA)₁₅-Hybrids

Die Übereinstimmungen sind ein Beleg für die Genauigkeit der gemessenen T_m -Werte. Im Fall des zweifach-modifizierten Oligonucleotids ODN-3 beträgt die Abweichung des gemessenen T_m -Werts von dem berechneten sogar nur 0.02 °C.

Die T_m -Werte aller drei racemischen Oligonucleotidmischungen (ODN-1 bis ODN-3) liegen mit 1.04 °C (ODN-1), 0.22 °C (ODN-2) und 0.41 °C (ODN-3) unter dem des unmodifizierten (dT)₁₅-Oligomers (T_m = 38.68). Bemerkenswert ist, dass der Einfluss der Phthalidylphosphonatgruppe am 3'-Ende des Oligonucleotids einen deutlich

größeren Einfluss hat als am 5'-Ende. Auch hat sich gezeigt, dass sich diese Einflüsse nicht additiv verhalten, da der T_m -Wert des zweifach-modifizierten Oligonucleotids (ODN-3) zwischen denen der einfach-modifizierten Oligonucleotide liegt.

Bei der Betrachtung der T_m -Werte der diastereomerenreinen Phthalidylphosphonat-modifizierte Oligonucleotide ergibt sich ein wesentlich differenziertes Bild. Alle drei R_P -konfigurierten Oligonucleotide ODN-7, ODN-8 und ODN-9 haben einen höheren T_m -Wert als das unmodifizierte (dT)₁₅-Oligomer, wobei das am 5'-Ende modifizierte Oligonucleotid ODN-8 mit 1.1 °C die größte T_m -Werterhöhung aufweist. Im Gegensatz hierzu weisen alle drei S_P -konfigurierten Oligonucleotide ODN-4, ODN-5 und ODN-6 einen niedrigeren T_m -Wert auf, wobei das am 3'-Ende modifizierte Oligonucleotid ODN-4 mit -2.41 °C den niedrigsten T_m -Wert hat.

Auch lässt sich ein reziproker Einfluss des 3'- und des 5'-Endes auf den T_m -Wert beobachten. Am 5'-Ende eingebaut hat die R_P -konfigurierte Phthalidylphosphonatgruppe einen größeren Einfluss als eingebaut am 3'-Ende ($|\Delta T_m \text{ODN-7}| < |\Delta T_m \text{ODN-8}|$), hingegen hat die Phthalidylphosphonatgruppe in S_P -Konfiguration eingebaut am 3'-Ende einen größeren Einfluss als am 5'-Ende ($|\Delta T_m \text{ODN-4}| > |\Delta T_m \text{ODN-5}|$).

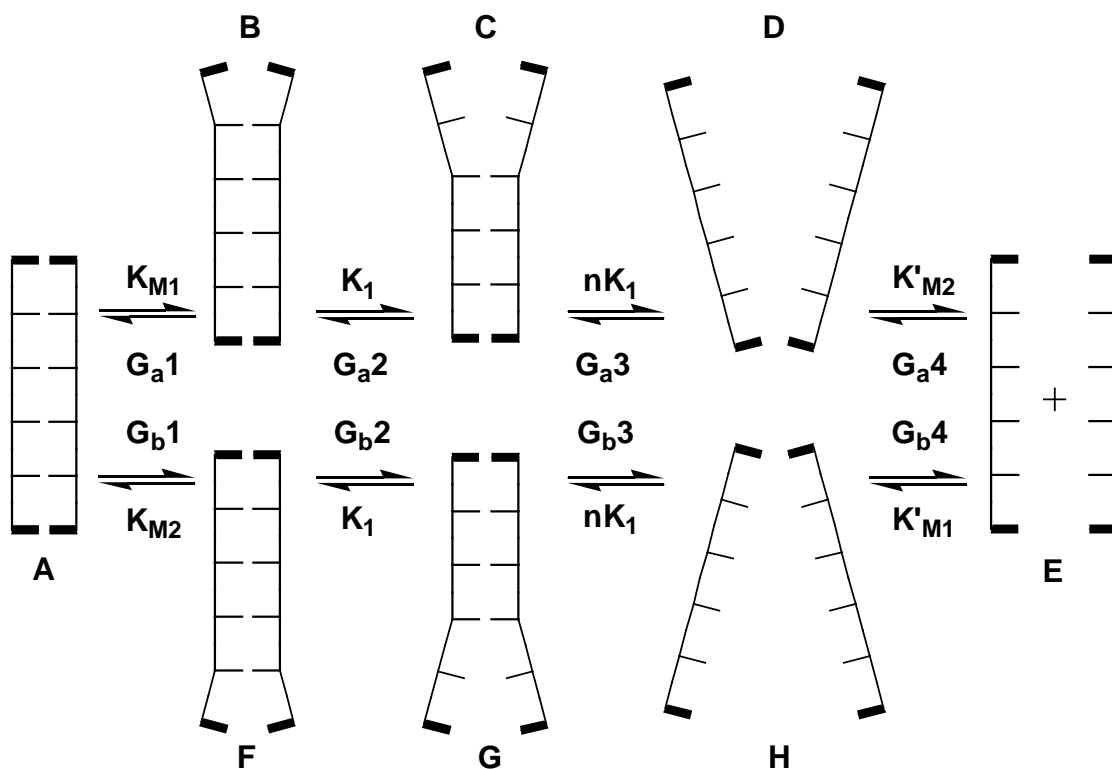


Abbildung 87: Darstellung des Zip-Modells

Das nicht additive Verhalten beider einzelnen Modifikationen zweifach modifizierter Oligonucleotide, z.B. $1.10\text{ }^{\circ}\text{C}(\Delta T_m\text{ODN-8}) + 0.87\text{ }^{\circ}\text{C}(\Delta T_m\text{ODN-7}) \neq 0.67\text{ }^{\circ}\text{C}(\Delta T_m\text{ODN-9})$, lässt sich durch Betrachtung des Hybridisierungsmechanismus zweier Einzelstränge mit dem in Abb.87 (S.110) dargestellten Zip-Modell erklären. Diesem Modell liegt die Idee zugrunde, dass die Dissoziation zweier Oligonucleotidstränge an einem Ende der Helix beginnt und sich längs der Helix fortsetzt. Dies lässt sich mit dem Öffnen eines Reißverschluss verbildlichen (zipper: eng. = Reißverschluss).

Die beiden endständigen "Öffnungen" der Helix werden mit den Gleichgewichtskonstanten K_{M1} und K_{M2} beschrieben, die durch die Modifikation beeinflusst werden ($\mathbf{G}_{a/b1}$, $A \rightleftharpoons B/F$). Die Gleichgewichtskonstanten der folgenden Dissoziationsschritte können näherungsweise als gleich groß angenommen werden ($\mathbf{G}_{a/b2}$ und $\mathbf{G}_{a/b3}$, $B \rightleftharpoons C/G \rightleftharpoons D/H$). Bei der vollständigen Dissoziation ($\mathbf{G}_{a/b4}$, $D/H \rightleftharpoons E$) werden die Gleichgewichtskonstanten (K'_{M2} und K'_{M1}) jedoch wieder durch die Modifikationen beeinflusst.

Da die Gleichgewichtskonstanten von dem Hybridisierungszustand der jeweils angrenzenden Basenpaare abhängen, gilt somit $K_{M1} \neq K'_{M1}$ und $K_{M2} \neq K'_{M2}$. Desweiteren gilt bedingt durch den grossen Entropiegewinn, der bei der vollständigen Trennung beider Stränge auftritt ($D/H \rightleftharpoons E$): $K_{M1} \ll K'_{M1}$ und $K_{M2} \ll K'_{M2}$. Das bedeutet, dass der Einfluss der Modifikation auf die beiden Gleichgewichte $\mathbf{G}_{a/b4}$ ($D/H \rightleftharpoons E$) vernachlässigt werden können. Also haben die Modifikationen jeweils nur einen Einfluss auf die beiden Gleichgewichte $\mathbf{G}_{a/b1}$ ($A \rightleftharpoons B/F$).

Wird nun angenommen, dass ca. die eine Hälfte der Oligonucleotide über den Weg \mathbf{G}_a1 bis \mathbf{G}_a4 und die andere Hälfte über den Weg \mathbf{G}_b1 bis \mathbf{G}_b4 dissoziieren, ergibt sich:

$$\Delta T_m\text{ODN-9}_{\text{berechnet}} = (\Delta T_m\text{ODN-7} + \Delta T_m\text{ODN-8})/2 = 0.96\text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$\Delta T_m\text{ODN-6}_{\text{berechnet}} = (\Delta T_m\text{ODN-4} + \Delta T_m\text{ODN-5})/2 = -1.51\text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$\Delta T_m\text{ODN-9}_{\text{gemessen}} = 0.67\text{ }^{\circ}\text{C} \text{ und } \Delta T_m\text{ODN-6}_{\text{gemessen}} = -1.53\text{ }^{\circ}\text{C}$$

In Tab.14 (S.112) sind die gemessenen T_m -Werte der Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide ODN-1 bis ODN-9 (mit $(rA)_{15}$ hybridisiert) angegeben. Auch hier wurde als Referenz der T_m -Wert von $(dT)_{15}/(rA)_{15}$ mit $34.32\text{ }^{\circ}\text{C}$ bestimmt.

Analog zu den in Tab.13 (S.109) berechneten T_m -Werten wurden hier die T_m -Werte von ODN-1/(rA)₁₅, ODN-2/(rA)₁₅ und ODN-3/(rA)₁₅ aus den T_m -Werten der entsprechenden R_P- und S_P-konfigurierten Oligonucleotiden berechnet (Tab.15).

		Struktur	T_m [°C]	ΔH [KJ/mol]	ΔS [J/mol/k]
		(dT) ₁₅	34.32	-574.4	-1566
ODN-1	(R/S) _P	3'-dT _{Ph} dT ₁₄ -5'	33.47 (-0.85)	-563.2	-1493
ODN-7	R _P	3'-dT _{Ph} dT ₁₄ -5'	34.35 (+0.33)	-580.6	-1564
ODN-4	S _P	3'-dT _{Ph} dT ₁₄ -5'	32.35 (-1.97)	-503.2	-1328
ODN-2	(R/S) _P	3'-dT _{14Ph} dT-5'	33.97 (-0.35)	-491.7	-1301
ODN-8	R _P	3'-dT _{14Ph} dT-5'	35.26 (+0.94)	-563.2	-1463
ODN-5	S _P	3'-dT _{14Ph} dT-5'	34.20 (-0.12)	-552.6	-1482
ODN-3	(R/S) _P	3'-dT _{Ph} dT _{13Ph} dT-5'	34.04 (-0.28)	-495.7	-1316
ODN-9	R _P	3'-dT _{Ph} dT _{13Ph} dT-5'	34.59 (+0.27)	-482.3	-1289
ODN-6	S _P	3'-dT _{Ph} dT _{13Ph} dT-5'	32.96 (-1.36)	-514.8	-1333

Tabelle 14: T_m -Werte und thermodynamische Daten der Oligonucleotide ODN-1 bis ODN-9 mit (rA)₁₅ hybridisiert

Wie aus Tab.15 zu entnehmen, sind die gemessenen T_m -Werte von ODN-1 bis ODN-9 hybridisiert mit (rA)₁₅ wesentlich ungenauer als die entsprechenden T_m -Werte der Oligonucleotide hybridisiert mit (dA)₁₅.

	ODN-1/(rA) ₁₅	ODN-2/(rA) ₁₅	ODN-3/(rA) ₁₅
T_m (berechnet)	33.91 °C	34.74 °C	33.77 °C
T_m (gemessen)	33.47°C	33.97°C	34.04°C

Tabelle 15: Berechnete und gemessene T_m -Werte des ODN-1/(rA)₁₅, ODN-2/(rA)₁₅- und des ODN-3/(rA)₁₅-Hybrids

Allgemein lässt sich sagen, dass die Phthalidylphosphonatgruppe gegenüber (rA)₁₅ einen ähnlichen Einfluss hat wie gegenüber (dA)₁₅. Auch zeigt das (R_P)-5'-modifizierte-Oligonucleotid ODN-8 mit $\Delta T_m = 0.94$ die größte T_m -Werterhöhung.

4.5.6 CD-Spektren der Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide

Der Circular dichroismus basiert auf der unterschiedlichen Absorption von rechts und links zirkularpolarisiertem Licht. Charakteristische CD-Spektren werden von Substanzen erzeugt, die entweder einen chiralen Chromophor oder einen Chromophor in chiraler Umgebung besitzen.

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie ist es möglich, Rückschlüsse auf die Sekundärstruktur von Oligonucleotiden zu machen. Die Sekundärstruktur von Oligonucleotiden lässt sich in drei Klassen einteilen – die A-Form, die B-Form und die C-Form. Letztere wird häufig auch als Z-Form bezeichnet. Diese drei Formen unterscheiden sich in ihrem Drehsinn, in der Anzahl der Basen, der Länge pro helikaler Windung und der Anordnung der Basen zueinander (twist). Während die A- und B-Form rechtsdrehend sind, ist die C-Form linksdrehend und kommt nur bei artifiziellen Systemen vor wie z.B. bei der Wiederholung des dCdG-Motivs. Der Unterschied zwischen der A- und der B-Form ist in der Konformation des Ribosezuckers begründet. Während bei der B-Form der Zucker in der South-Konformation (C_3 -exo) vorliegt (typisch für RNA/RNA-Hybride), liegt bei der A-Form der Zucker in der North-Konformation (C_3 -endo) vor (DNA/DNA-Hybride).

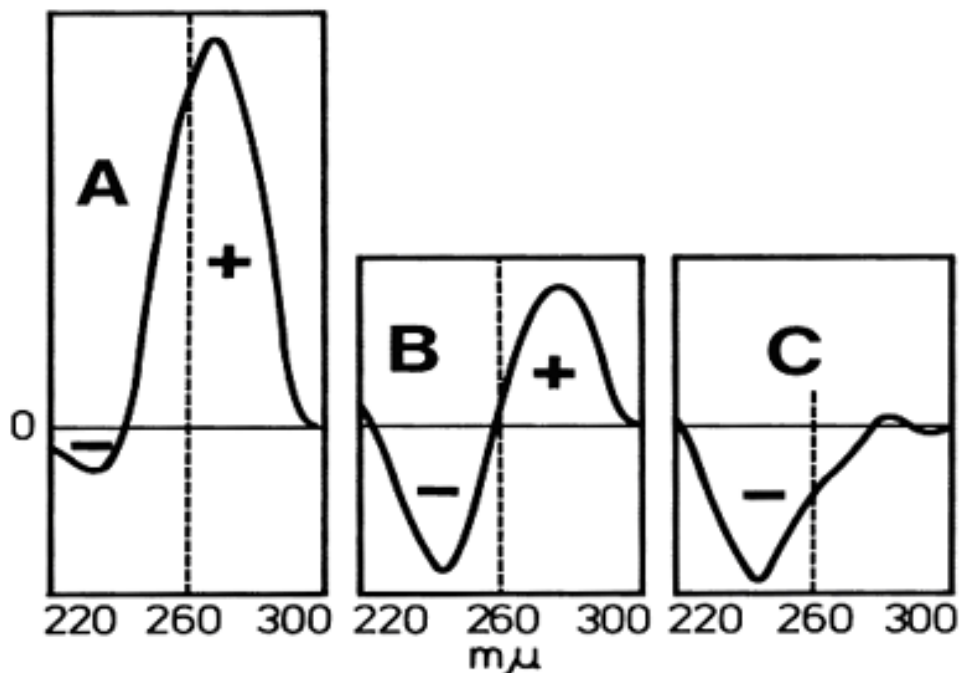


Abbildung 88: Schematische Darstellung der CD-Spektren der A-, B- und C(Z)-Form der DNA

Ein Oligonucleotid lässt sich mit Hilfe seines CD-Spektrums einer dieser drei Formen zuordnen. Jedoch ist es in Anbetracht der vielen konformellen Untergruppen nicht möglich, detaillierte Aussagen über die Sekundärstruktur zu treffen. In Abb.88 (S.113) sind die CD-Spektren der drei Formen schematisch dargestellt. Während alle drei Formen ein Minimum zwischen einer Wellenlänge von $\lambda = 230$ und $\lambda = 250$ nm aufweisen, unterscheiden sie sich deutlich in dem positiven Bereich zwischen $\lambda = 260$ und $\lambda = 300$ nm.

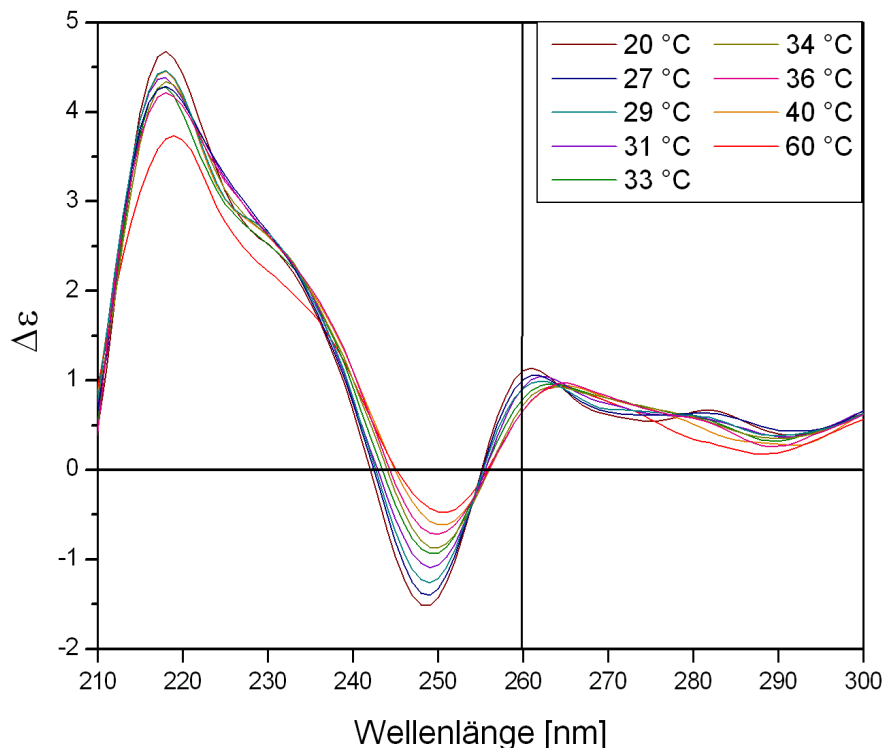


Abbildung 89: CD-Spektren des $(dT)_{15}/(dA)_{15}$ -Hybrids (20 °C bis 60 °C)

In Abb.89 sind die CD-Spektren des $(dT)_{15}/(dA)_{15}$ -Duplexes bei verschiedenen Temperaturen abgebildet. Aus ihnen ist ersichtlich, dass dieses Duplex eine nicht typische B-Form hat. Untersuchungen von A. RICH et al. zeigten, dass poly-dT/dA-Sequenzen eine Abweichung von der normalen B-Form hervorrufen und geben dieser konformellen Untergruppe den Namen B_P -Form. Während bei der normalen B-Form der Propeller Twist ca. 6° beträgt, ist er bei der B_P -Form mit ca. 28° wesentlich größer.^[132]

Zum Vergleich der Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide mit dem unmodifizierten $(dT)_{15}$ -Oligomer sind in Abb. 90 (S.115) die CD-Spektren von $(dT)_{15}/(dA)_{15}$, ODN-4/ $(dA)_{15}$ und ODN-7/ $(dA)_{15}$ bei 10°C abgebildet.

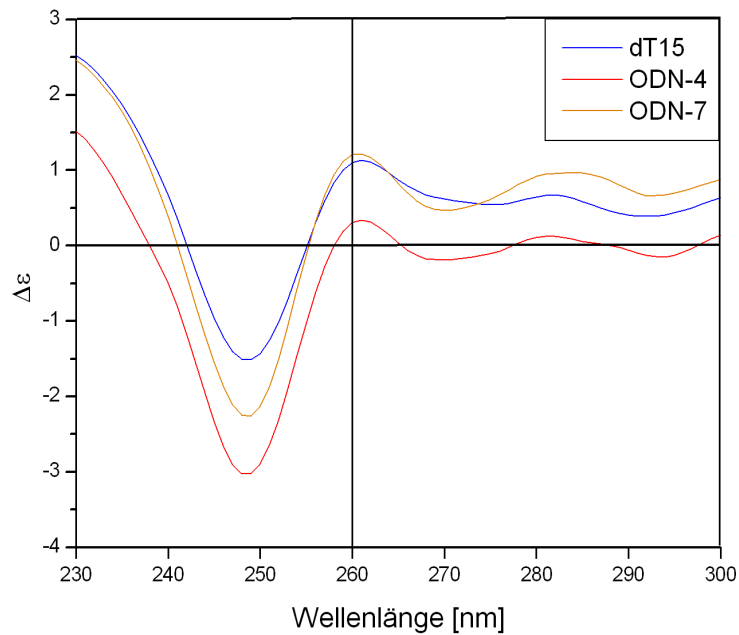


Abbildung 90: CD-Spektren des $(dT)_{15}/(dA)_{15^-}$, $ODN-4/(dA)_{15^-}$ und $ODN-7/(dA)_{15^-}$ Hybrids bei 10°C

Die Spektren des unmodifizierten Oligonucleotids und der modifizierten Oligonucleotide stimmen weitgehend überein. Lediglich bei einer Wellenlänge von ca. $\lambda = 270$ nm weisen die modifizierten Oligonucleotide ein kleines Minimum auf.

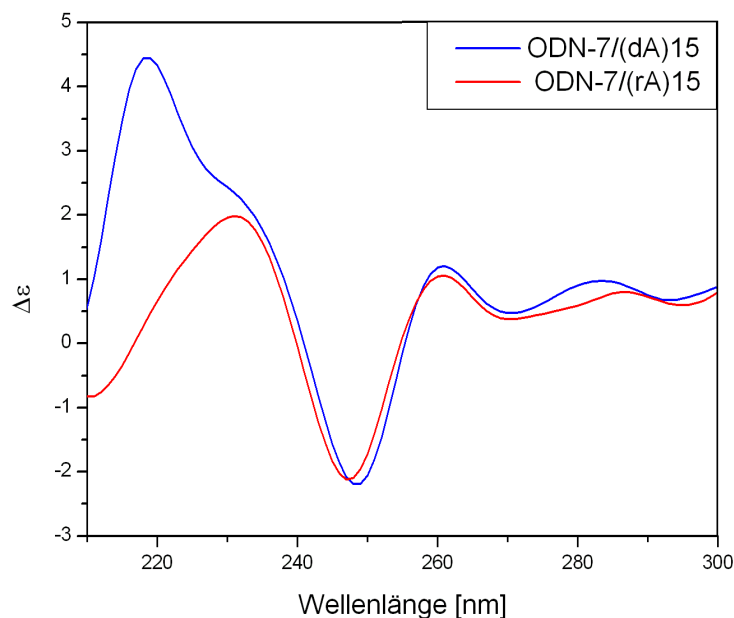


Abbildung 91: CD-Spektren des $ODN-7/(dA)_{15^-}$ -Hybrids (blau) und $ODN-7/(rA)_{15^-}$ -Hybrids (rot) bei 10°C

In Abb.91 (S.115) sind die beiden CD-Spektren der Hybride von ODN-7 mit (dA)₁₅ (blau) und (rA)₁₅ (rot) bei 10 °C abgebildet. Auch hier sind die CD-Spektren (bis auf ein Maximum des ODN-7/(dA)₁₅ Hybrids bei ca. 220 nm) weitgehend identisch.

4.5.7 Exonucleasestabilität der Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide

In Abschnitt 2.3 (S.14) wurden die Anforderungen, die sich an ein *antisense*-Oligonucleotid stellen, näher beschrieben. Eine dieser Anforderungen ist die hinreichend grosse Stabilität gegenüber Nucleasen, die zur Enzymklasse der Hydrolasen (E.C. 3) und zur Subklasse der Esterasen (E.C. 3.1) gehören. Dies ist notwendig, damit das *antisense*-Oligonucleotid zu seinem Zielort - dem Zellinneren – unbeschadet gelangen und dort seine Wirkung entfalten kann.

Innerhalb der Nucleasen (Phosphodiesterhydrolasen, E.C. 3.1.4) gibt es zwei DNA-Einzelstrang verdauende Enzymgruppen, die der Restriktionsendonucleasen und die der Exonucleasen. Die Exonucleasen lassen sich zudem in zwei Untergruppen einteilen: Die 3'-Exonucleasen (Phosphodiesterase I, E.C. 3.1.4.1) hydrolysiert ausgehend von dem 3'-Terminus die endständige Phosphatdiesterbindung der DNA unter Bildung von 5'-Monophosphatnucleotiden. Die 5'-Exonuclease (Phosphodiesterase II, E.C. 3.1.16.1) baut die DNA von dem 5'-Terminus aus ab unter Freisetzung von 3'-Monophosphatnucleotiden. Die resultierenden DNA-Fragmente tragen also keine Phosphatgruppe am 3'- bzw. 5'-Terminus.

Die Restriktionsendonucleasen hingegen bauen DNA nicht terminal ab, sondern hydrolysieren DNA-Einzel- und Doppelstränge sequenzspezifisch.

Da Restriktionsendonucleasen im Gegensatz zu Exonucleasen kaum im Blutserum und im Cytoplasma vorkommen, ist die Stabilität von *antisense*-Oligonucleotiden gegenüber Exonucleasen wesentlich wichtiger.

Zur Bestimmung der 3'-Exonucleasestabilität wurde die Calf Spleen Phosphodiesterase (CSP, E.C. 3.1.4.1) in einem TRIS-Puffer (pH 6.8) verwendet. Die Bestimmung der 5'-Exonucleasestabilität erfolgte mit der Snake Venom Phosphodiesterase (SVP, E.C. 3.1.16.1) in einem Phosphatpuffer (pH 6.8).

4.5.7.1 Optimierung der Exonuclease-Assays

Zur Bestimmung der Stabilität der 3'- und der 5'-modifizierten-Oligonucleotide gegenüber 3'- bzw. 5'- Exonucleasen wird das zu untersuchende Oligonucleotid in dem jeweiligen Puffer bei 37 °C mit der entsprechenden Phosphodiesterase inkubiert. Zur Detektion des Hydrolyseabbaus stehen mehrere Methoden zur Verfügung – sie kann sowohl durch Gelelektrophorese, per UV-Spektroskopie als auch mittels HPLC erfolgen. Zur Verfolgung des Assays mit Hilfe der Gelelektrophorese werden jedoch relativ große Mengen an *antisense*-Oligonucleotid benötigt, so dass diese Methode hier nicht praktikabel war. Die Detektion mittels UV-Spektroskopie hat zwar den Vorteil, dass sie mit recht kleinen Mengen an Oligonucleotid (ca. 1 nmol) auskommt, es wird jedoch nur der Anstieg des Extinktionskoeffizienten infolge des bei dem Abbau auftretenden hyperchromen Effekts beobachtet. Es können also im Gegensatz zur Gelelektrophorese keine einzelnen DNA-Fragmente nachgewiesen werden. Die Verfolgung des enzymatischen Abbaus mit Hilfe der HPLC vereinigt beide Vorteile. Zum einen können Oligonucleotidmengen um die 200 pmol reproduktiv untersucht werden und zum anderen lassen sich auch DNA-Fragmente über ihre unterschiedlichen Retentionszeiten nachweisen.

Vor der Untersuchung der 3'- und 5'-Exonuclease Stabilitäten der Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide wurden beide Enzymassays optimiert, wobei das (dT)₁₅-Oligomer verwendet wurde. Bei beiden Optimierungen wurde das Augenmerk auf die benötigten Mengen an Oligonucleotid und Exonuclease, die Zeitpunkte der Probenentnahmen und die Reproduzierbarkeit des Assays gelegt.

Nach einigen Vorversuchen zur Einschätzung der Enzymaktivität und der benötigten Menge an Oligonucleotid, wurden für die Optimierung des CSP-Assays drei

	(dT) ₁₅ [nmol]	Enzym [u]	T ₀ [min]	t ₁ [min]	t ₂ [min]	t ₃ [min]	t ₄ [min]
A	1	0.01	0	12	300	-	-
B	1	0.05	0	8	30	100	280
C	1	0.1	0	4	15	40	120

Tabelle 16: Bedingungen der Optimierung des CSP-Assays, (dT)₁₅

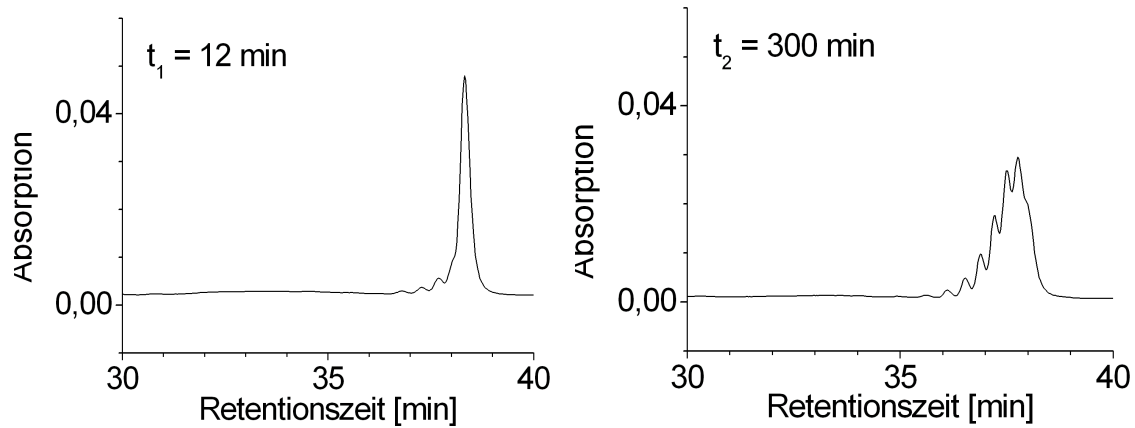


Abbildung 92: HPLC-Chromatogramme des 3'-Exonuclease-Assays des $(dT)_{15}$ -Oligomers (0.01 u CSP)

Messreihen mit verschiedenen Konzentrationen an CSP und variablen Probenentnahmezeiten durchgeführt (Tab.16, S.117).

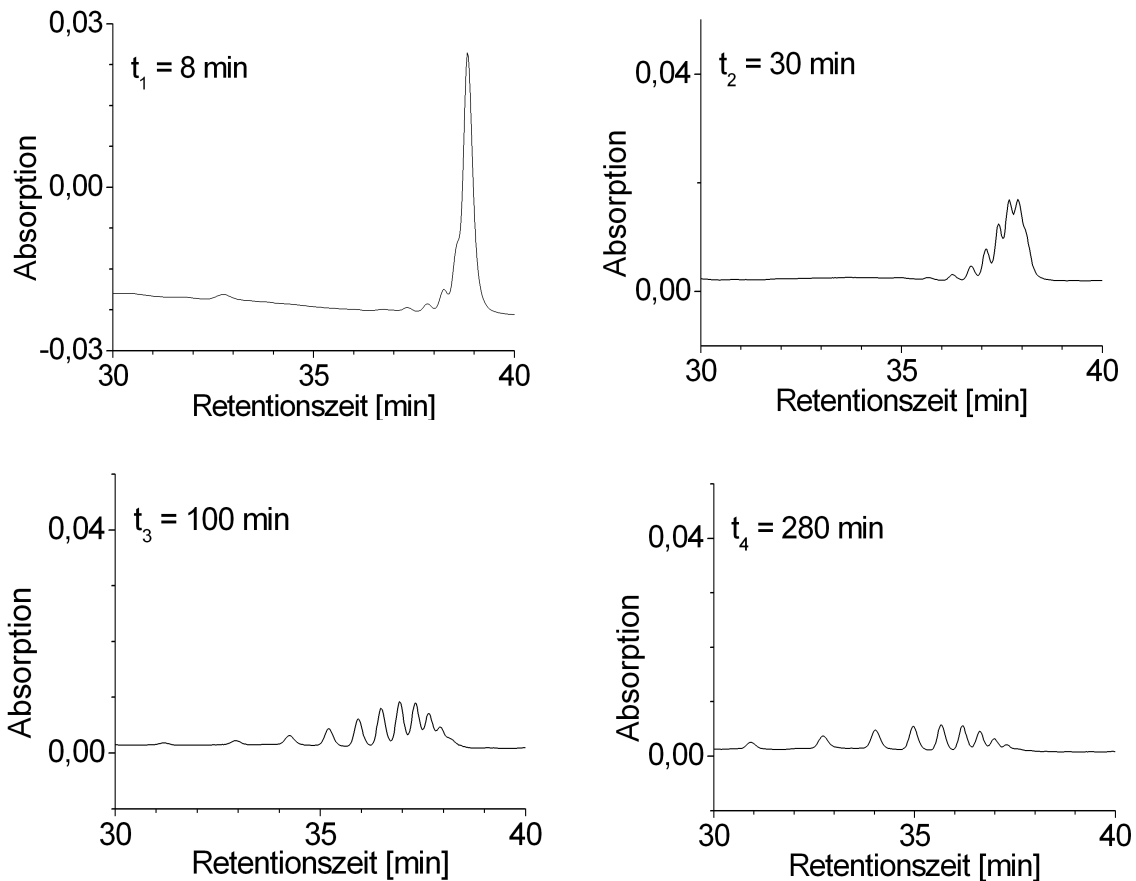


Abbildung 93: HPLC- Chromatogramme des 3'-Exonuclease-Assays des $(dT)_{15}$ -Oligomers (0.05 u CSP)

Für jede Messreihe wurde 1 nmol des $(dT)_{15}$ -Oligomers in soviel TRIS-Puffer gelöst, dass sich nach Zugabe der jeweiligen Menge an CSP-Stammlösung ein Gesamtvolumen von 50 μL ergab. Bei 5 Probenentnahmen enthält dann eine Probe von 10 μL 200 pmol des $(dT)_{15}$ -Oligomers. Mit dieser Probenmenge konnten problemlos reproduzierbare Chromatogramme aufgenommen werden. Abschließend wurde zur Desaktivierung der Nuclease die entnommene Probe mit 10 μL Acetonitril verdünnt. In den Abb.92 (S.118), Abb.93 (S.118), und Abb.94 sind die HPLC-Chromatogramme der drei Messreihen abgebildet. Aus ihnen ist der Verlauf der enzymatischen Abbaureaktionen gut erkennbar. Mit der Verwendung von nur 0.01 u CSP-Esterase (Abb.92, S.118) verlief der Abbau des Oligonucleotids so langsam, dass selbst nach 5 Stunden Inkubationszeit nur ein kleiner Teil des $(dT)_{15}$ -Oligomers abgebaut wurde.

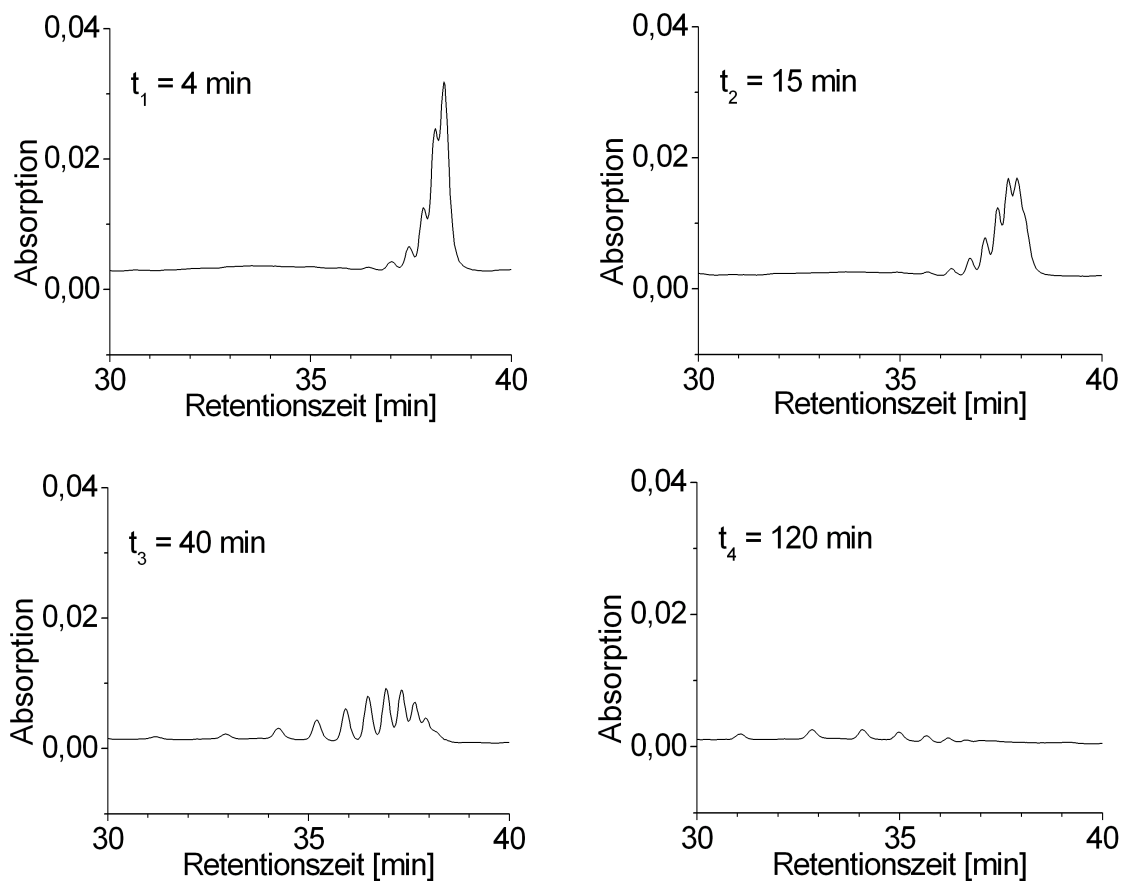


Abbildung 94: HPLC-Chromatogramme des 3'-Exonuclease-Assays des $(dT)_{15}$ -Oligomers (0.1 u CSP)

Wurde hingegen 0.1 u der CSP-Esterase (Abb.93, S.118) verwendet, verlief die Abbaureaktion so schnell, dass schon nach 15 Minuten kein $(dT)_{15}$ -Oligomer mehr vorhanden und nach 120 Minuten ein vollständiger Verdau erfolgt war.

Als optimal stellte sich eine Menge von 0.05 u CSP-Esterase heraus (Abb.94, S.119). Hier erfolgte der Abbau des $(dT)_{15}$ -Oligomers nach ca. 100 Minuten und die komplette Verdauung nach ca. 280 Minuten.

Die Durchführung des SVP-Assay zur Bestimmung der 5'-Nucleasestabilität war insofern schwieriger, da die SVP-Esterase nicht als reines Enzym vorlag, sondern in Form von getrocknetem Schlangengift. Daher konnten die Proben nicht wie bei dem CSP-Assay ohne Vorbehandlung auf die HPLC-Säule aufgetragen werden, sondern mußten vorher einer Methanolfällung unterzogen werden, um die großen Mengen Protein zu entfernen. Da durch die Methanolfällung ein Teil des $(dT)_{15}$ -Oligomers verloren ging, wurden jeweils nur 2 Proben (je 25 µl) entnommen.

In Abb.95 sind exemplarisch die beiden HPLC-Chromatogramme eines SVP-Esteraseabbaus des $(dT)_{15}$ -Oligomers abgebildet. Hier wurde die für optimal befundene Menge an 0.1 u VSP-Esterase verwendet.

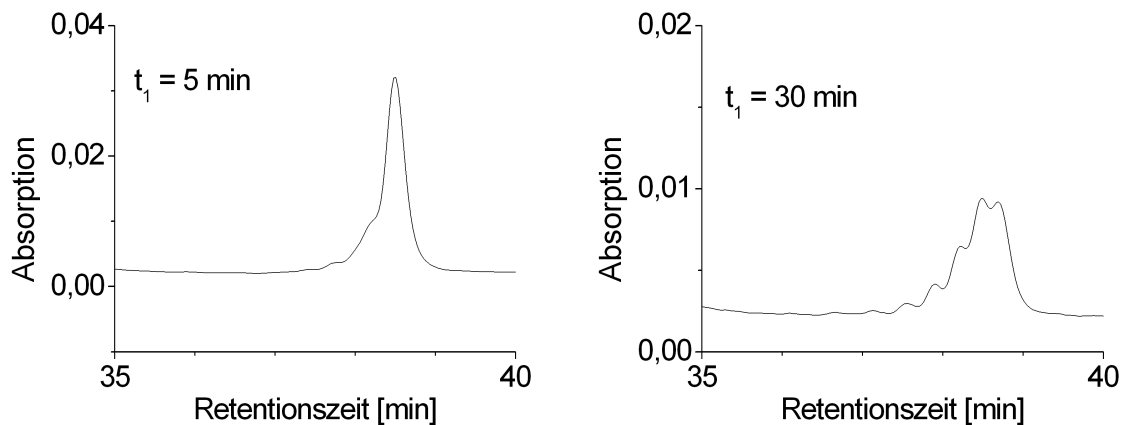


Abbildung 95: HPLC-Chromatogramme von dem 5'-Exonuclease-Assays des $(dT)_{15}$ -Oligomers (0.1 u SVP)

In den folgenden Enzymassays zur Bestimmung der 3'-, und 5'-Exonuclease-stabilitäten der Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide wurden die hier optimierten Bedingungen verwendet. Auch wurde parallel zu jedem Assay ein $(dT)_{15}$ -Oligomerabbau durchgeführt, um die Enzymaktivität, welche sich durch längeres Lagern des Enzyms in Lösung verschlechtern kann, und die richtige Präparation der Assays zu kontrollieren.

4.5.7.2 Stabilität der Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide gegenüber der 3'-Exonuclease

Mit den in Abschnitt 4.5.7.1 (S.117) optimierten Bedingungen wurden die am 3'-Ende Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide ODN-1, ODN-4 und ODN-7 auf ihre Stabilität gegenüber der Calf Spleen Phosphodiesterase (CSP, E.C. 3.1.4.1) getestet.

Hierzu wurden 1 nmol des zu untersuchenden Oligonucleotids in 50 μ L TRIS-Puffer (pH 6.8) gelöst und mit 0.05 u CSP-Esterase versetzt. Es wurden 2 Proben entnommen, eine bei $t_0 = 0$ Minuten und eine bei $t_1 = 180$ Minuten. Da das erwünschte Messergebnis – Stabilität gegenüber der 3'-Exonuclease – dem Negativergebnis des Assays entspricht, wurde als Positivprobe parallel ein (dT)₁₅-Oligomerabbau (Versuchsbedingungen **B**, Tab.16, S.117) durchgeführt. Hierdurch konnten etwaige Fehler bei der Präparation des Assays ausgeschlossen werden.

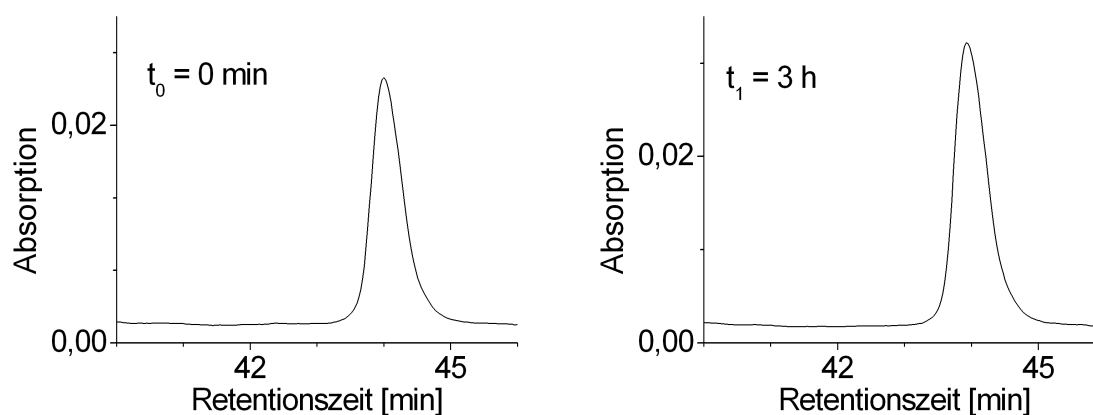


Abbildung 96: HPLC-Chromatogramme des 3'-Exonuclease-Assays von ODN-1

In Abb.96 sind die beiden HPLC-Chromatogramme des CSP-Assays von dem (R_P/S_P)-3'-Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotid ODN-1 abgebildet. Diese zeigen deutlich, dass selbst nach 3 Stunden Inkubationszeit keinerlei Abbau des Oligonucleotids erfolgt war. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die Phthalidylgruppe im Rahmen dieses Assays einen 100 %igen Schutz gegenüber 3'-Exonucleasen bietet. Auch liegt keine Bevorzugung eines der beiden R_P-, S_P-Diastereomere vor, da der durchgeführte Abbau von ODN-1 ein *in situ* Abbau von ODN-4 und ODN-7 ist.

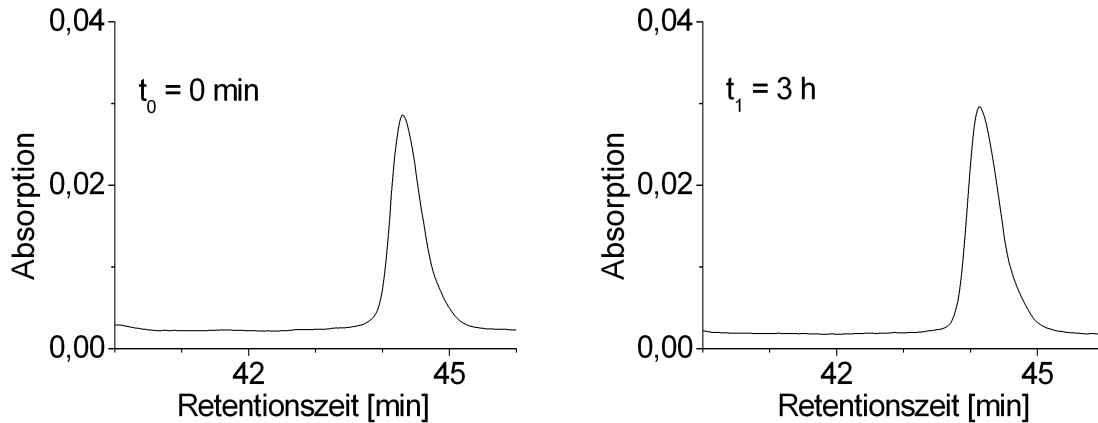


Abbildung 97: HPLC-Chromatogramme des 3'-Exonuclease-Assays von ODN-4

Um jedoch etwaige unerwartete synergetische Effekte auszuschliessen zu können, wurde der Assay getrennt mit ODN-4 und ODN-7 durchgeführt. In Abb.97 sind hierfür exemplarisch die HPLC-Chromatogramme des 3'-Exonuclease-Assays des S_P -konfigurierten Oligonucleotids ODN-4 dargestellt, die die erwartete Stabilität gegenüber der CSP-Esterase belegen.

4.5.7.3 Stabilität der Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide gegenüber der 5'-Exonuclease

Mit den in Abschnitt 4.5.7.1 (S.117) optimierten Bedingungen wurden die 5'-Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide auf ihre Stabilität gegenüber der Snake Venom Phosphodiesterase (SVP, E.C. 3.1.16.1) getestet.

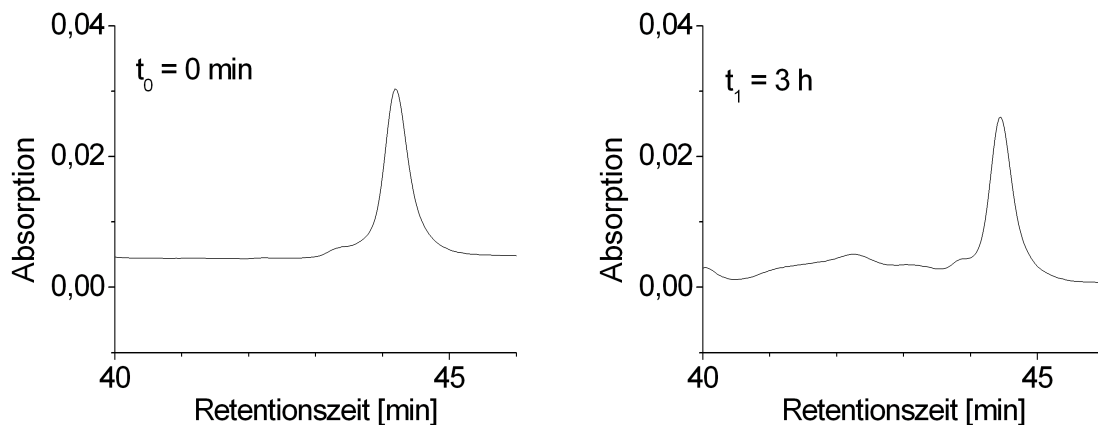


Abbildung 98: HPLC-Chromatogramme des 5'-Exonuclease-Assays von ODN-2

Auch hier wurde ein (dT)₁₅-Oligomerabbau als Positivprobe parallel durchgeführt. Die beiden in Abb.98 (S.122) gezeigten HPLC-Chromatogramme des SVP-Abbaus des (R_P/S_P)-konfigurierten Oligonucleotids ODN-2 beweisen, dass auch hier ein 100 %iger Schutz durch die Einführung der Phthalidylphosphonatgruppe vor 5'-Exonucleasen erzielt werden kann.

4.5.8 Untersuchung zur Demaskierung der Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide

Eine weitere Anforderung an *pro-antisense*-Oligonucleotide ist die Abspaltung der Maske am Wirkort unter Freisetzung des unmodifizierten Oligonucleotids (siehe 2.3, S.14), so dass dieses dann durch Nucleasen abgebaut werden kann. Hierdurch soll sichergestellt werden, dass es zu keiner möglichen toxischen Akkumulation des *antisense*-Oligonucleotids in der Zelle kommen kann. Auch wird durch einen kontrollierten Abbau die Verabreichung bzw. Dosierung des *antisense*-Oligonucleotids ermöglicht.

Eine mögliche Demaskierung der Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide könnte durch die Hydrolyse des Lactonrings der Phthalidylgruppe durch zelleigene Esterasen erfolgen.

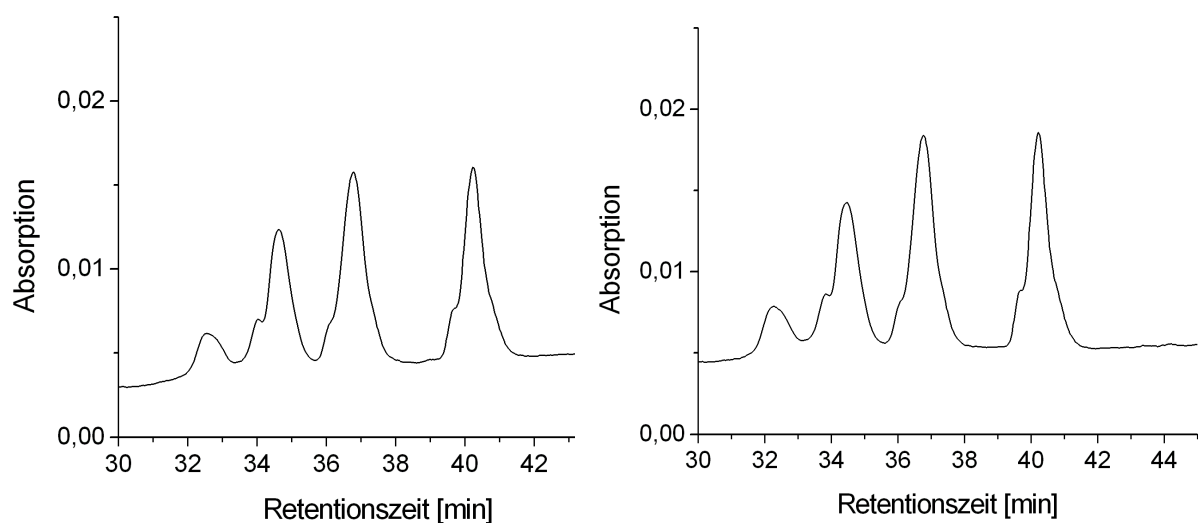


Abbildung 99: HPLC-Chromatogramm des (R_P/S_P)-3',5'-Diphthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotids ODN-3; rechts: Phosphatpuffer pH 7.3; links: Phosphatpuffer pH 7.3 und PLE

Das aus der Ringöffnung resultierende α -Hydroxyphosphonat-modifizierte Oligonucleotid würde, bedingt durch das basische Milieu im Zellinneren (pH 7.3), der *H*-Phosphonat-Rückspaltung bzw. der Phosphonat-Phosphat-Umlagerung unterliegen (siehe 2.4, S.17).

Zur Untersuchung dieses Demaskierungsweges wurde das (R_P/S_P)-3',5'-Diphthalidylphosphonat-modifizierte Oligonucleotid ODN-3 mit der PL-Esterase (Pig Liver Esterase, Serine Hydrolase, E.C. 3.1.1.1), bei dem im Zellinneren herrschenden pH-Wert von 7.3 inkubiert. Als Referenzexperiment wurde parallel dasselbe Oligonucleotid ODN-3 nur mit dem verwendeten Phosphatpuffer (pH 7.3) inkubiert.

In Abb.99 (S.123) sind die HPLC-Chromatogramme beider Experimente jeweils nach einer Inkubationszeit von 80 Stunden abgebildet. Der Vergleich der beiden Chromatogramme zeigt, dass der Lactonring der Phthalidylgruppe zwar bei einem pH-Wert von 7.3 hydrolysiert, jedoch keiner enzymatischen Ringöffnung unterliegt. Auch zeigen die Integralverhältnisse der einzelnen Signale beider Chromatogramme, dass keine Bevorzugung eines Diastereomers bezüglich der enzymatischen Esterspaltung vorliegen kann.

Die vier Signale lassen sich über ihre Retentionszeit zuordnen. Das Signal bei 40.5 min rührt von dem nicht hydrolysierten Oligonucleotid ODN-3 her, die drei Signale mit kürzerer Retentionszeit entsprechen den drei nicht modifizierten Oligonucleotiden: (dT)₁₅ (37 min), (dT)₁₄ (34.5 min) und (dT)₁₃ (32.5 min).

4.6 SYNTHESE UND UNTERSUCHUNG VON m^5K -MODIFIZIERTEN OLIGONUCLEOTIDEN

Neben den Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotiden wurde versucht das fluoreszierende Thymidinanalogon m^5K 29 in Oligonucleotide einzubauen. Als erstes und einzig erfolgreich isoliertes bzw. charakterisiertes Oligonucleotid wurde das in Abb.100 dargestellte Oligonucleotid ODN-10 synthetisiert.



Abbildung 100: m^5K -modifiziertes Oligonucleotid ODN-10

M⁵K **29** wurde in die achte Position, also genau in der Mitte des (dT)₁₅-Oligomers eingebaut, da diese Position dem späteren Design von symmetrischen gapper Oligonucleotiden die größtmögliche Freiheit bietet.

Als Syntheseprotokoll für den DNA-Synthesizer diente das schon für die Phthalidylphosphonat-Modifikation verwendete Protokoll. Der Trityl-Assay zeigte, dass die Kupplung des 5'-O-DMTr-m⁵K-3'-O-Amidit **31** mit mindestens 90 % Ausbeute zufriedenstellend verlief.

Die HPLC-Retentionszeit entsprach erwartungsgemäß mit 37.81 Minuten in etwa der des unmodifizierten (dT)₁₅-Oligomers (Abb.101).

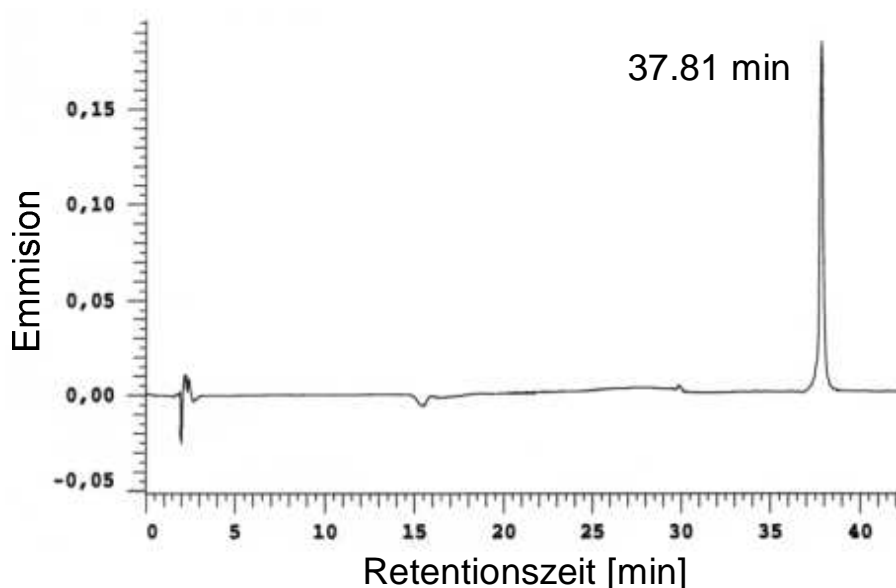


Abbildung 101: HPLC-Chromatogramm des gereinigten ODN-10

Das in Abb.101 gezeigte HPLC-Chromatogramm von ODN-10 wurde mit einem Fluoreszenzdetektor aufgenommen. Das Maximum der Emission lag erwartungsgemäß bei ca. $\lambda = 354$ nm.

Mehrere Versuche, ein MALDI-TOF-Spektrum von ODN-10 aufzunehmen, schlugen fehl. Es konnten lediglich kürzere DNA-Fragmente nachgewiesen werden, die auf eine Fragmentierung während der Messung des Oligonucleotids in Nachbarschaft des m⁵K **29** hindeuteten. Der positive Trityl-Assay und das HPLC-Chromatogramm beweisen jedoch eindeutig die erfolgreiche Synthese und Isolierung von ODN-10.

Der gemessene T_m-Wert von ODN-10 gegen (dA)₁₅ liegt mit 25.45 °C ca. 12 °C unter dem des unmodifizierten (dT)₁₅-Oligomers. Diese auf den ersten Blick groß erscheinende T_m-Werterniedrigung wird jedoch häufiger bei single-mismatch

Sequenzen beobachtet.^{[133],[134]} Das von B. GILDEA und L. W. MCLAUGHLIN synthetisierte und selbst komplementäre Dodecamer d(CGCGAAT(m₅K)CGCG) zeigte eine ungewöhnliche Schmelzkurve mit einem T_m-Wert von 40 °C, der 20 °C unter dem des nativen Oligonucleotids lag.^[135]

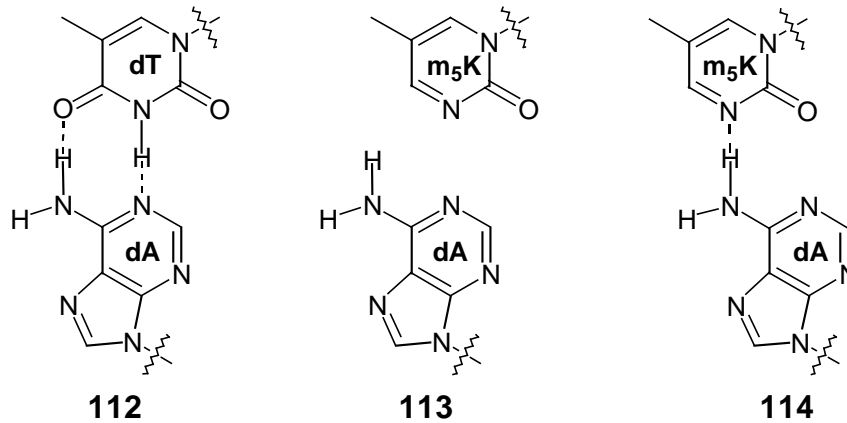


Abbildung 102: Wasserstoffbrücken der Basenpaare dT/dA **112** und m₅k/dA **113** und **114** „wobbel base pair“

Durch das Fehlen des 4-Carbonylsauerstoffatoms im m⁵K **29** ändert sich die Tautomerie des N³-Stickstoffs, so dass sich im Gegensatz zum dT/dA-Basenpaar **112** (Abb.102) keine Watson-Crick-Bindung zwischen m⁵K **29** und dA ausbilden kann **113**. Jedoch ist unter Bildung eines „wobbel base pair“ **114** die Ausbildung zumindest einer Wasserstoffbrücke möglich.

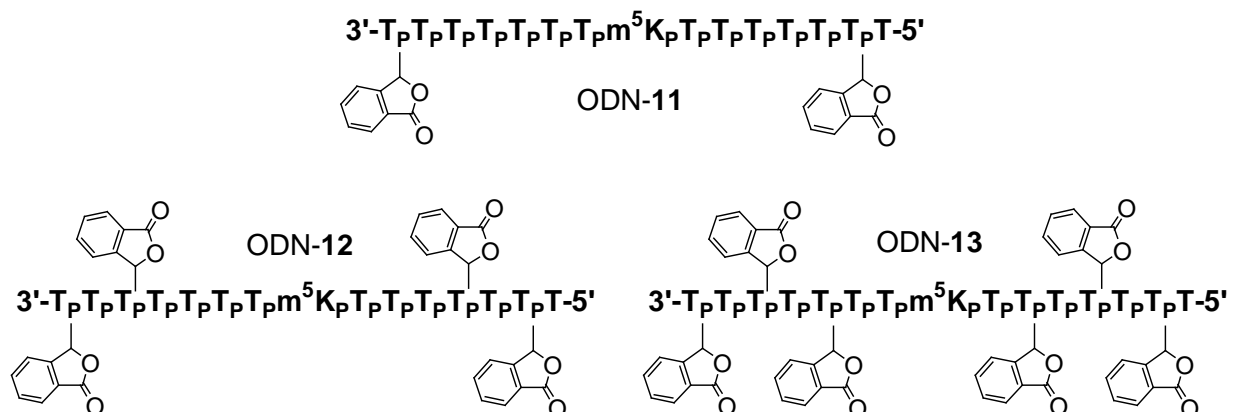


Abbildung 103: Synthetisierte chimere (R_P/S_P)-Phthalidylphosphonat- und m⁵K-modifizierte Oligonucleotide ODN-11, ODN-12 und ODN-13

Weiterhin wurden drei weitere Phthalidylphosphonat-modifizierte Oligonucleotide ODN-11 bis ODN-13, die analog dem ODN-10 das fluoreszente m⁵K **29** an der achten Position enthielten, synthetisiert (Abb.103, S.126).

Das ODN-11 entspricht dem ODN-4 bei dem am 3'-Ende und am 5'-Ende jeweils eine Phthalidylphosphonat-Modifikation endständig eingeführt worden war. Bei ODN-12 wurden jeweils 2 Phthalidylphosphonat-Modifikationen an jedem Ende eingeführt und bei ODN-13 jeweils drei Modifikationen. Bei allen drei Synthesen wurde das (R_P/S_P)-5'-O-DMTr-Phthalidylphosphonatdiester-3'-O-Amidit (R_P/S_P)-**30** eingesetzt.

Die Trityl-Assays zeigten einen reibungslosen Ablauf der drei Oligonucleotidsynthesen, die jeweils mit einer Gesamtausbeute von mindestens 80 % verliefen. Es konnte bei der Trennung der Rohprodukte keine HPLC-Fraktion isoliert werden, aus der, wie nach den Ergebnissen von **ODN-10** erwartet, anschließend mittels MALDI-TOF-Spektrometrie das gewünschte Produkt oder ein entsprechendes Fragment eindeutig nachgewiesen werden konnte.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das *antisense*-Konzept ist ein neuer, viel versprechender Ansatz zur Bekämpfung einer Vielzahl von Krankheiten. Ihm liegt die Idee zugrunde, dass durch Hybridisierung einer *sense*-RNA mit einer künstlichen *antisense*-DNA die Expression eines gewünschten Proteins unterdrückt wird (siehe 2.1, S.6). Ein entscheidender Vorteil von *antisense*-Oligonucleotiden gegenüber herkömmlichen Medikamenten ist, dass sie schon auf der Stufe der Proteinbiosynthese wirken. Auch ist die Suche nach einer spezifischen Leitstruktur durch die gegebene Sequenz der Ziel-RNA wesentlich vereinfacht. Neben ihren offensichtlichen Stärken müssen *antisense*-Oligonucleoide jedoch verschiedenen Anforderungen genügen, damit sie therapeutisch eingesetzt werden können. Zum einen ist die Proliferation des *antisense*-Oligonucleotids an seinen Wirkort durch passiven Membrantransport nötig und zum anderen müssen sie ausreichend vor dem enzymatischen Abbau durch Exonucleasen geschützt sein. Um diese Anforderungen zu erfüllen, wurde eine Vielzahl von verschiedenen chemischen Modifikationen entwickelt (siehe 2.2, S.11). Bei dem *pro-antisense*-Oligonucleotid-Konzept wird das Oligonucleotid durch eine geeignete Gruppe maskiert und erst am Wirkort wird das unmodifizierte Oligonucleotid durch chemische bzw. enzymatische Hydrolyse freigesetzt (siehe 2.3, S.14). Ein Ansatz hierzu ist das in der Arbeitsgruppe von C. MEIER entwickelte α -Hydroxyphosphonat-*pro*-Oligonucleotid-Konzept (siehe 2.4, S.17).

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die bezüglich des Phosphoratoms diastereomerenreinen Phthalidylphosphonatdiesteramidite (R_P)-**30** und (S_P)-**30** dargestellt (Abb.104, S.129) und erfolgreich in Oligonucleotide eingebaut (Abb.105, S.131). Die Phthalidylphosphonatdiesteramidite (R_P)-**30** und (S_P)-**30** konnten in einer 8-stufigen konvergenten Synthese mit einer Gesamtausbeute von 14 % und einer Diastereomerenreinheit von $de > 98$ % synthetisiert werden (siehe 4.2, S.53).

Ausgehend von Thymidin wurde die 5'-Hydroxygruppe unter Standardbedingungen DMTr-geschützt. Aus dem so erhaltenen 5'-O-DMTr-Thymidin **79** konnte das 3'-O-TBDPS-5'-O-DMTr-Thymidin **80** unter Aktivierung mit Imidazol/Triethylamin als Aktivator in Dichlormethan in einer Ausbeute von 90 % dargestellt werden. Die quantitative saure Entschützung der 5'-Hydroxygruppe führte zu dem einfach geschützten 3'-O-TBDPS-Thymidin **82**. Die Darstellung des 5'-O-DMTr-Thymidin-

3'-*H*-Phosphonatmonoesters **81** erfolgte durch Umsetzen von 5'-*O*-DMTr-Thymidin **79** mit Phosphortrichlorid, Imidazol und Triethylamin mit anschließender Hydrolyse.

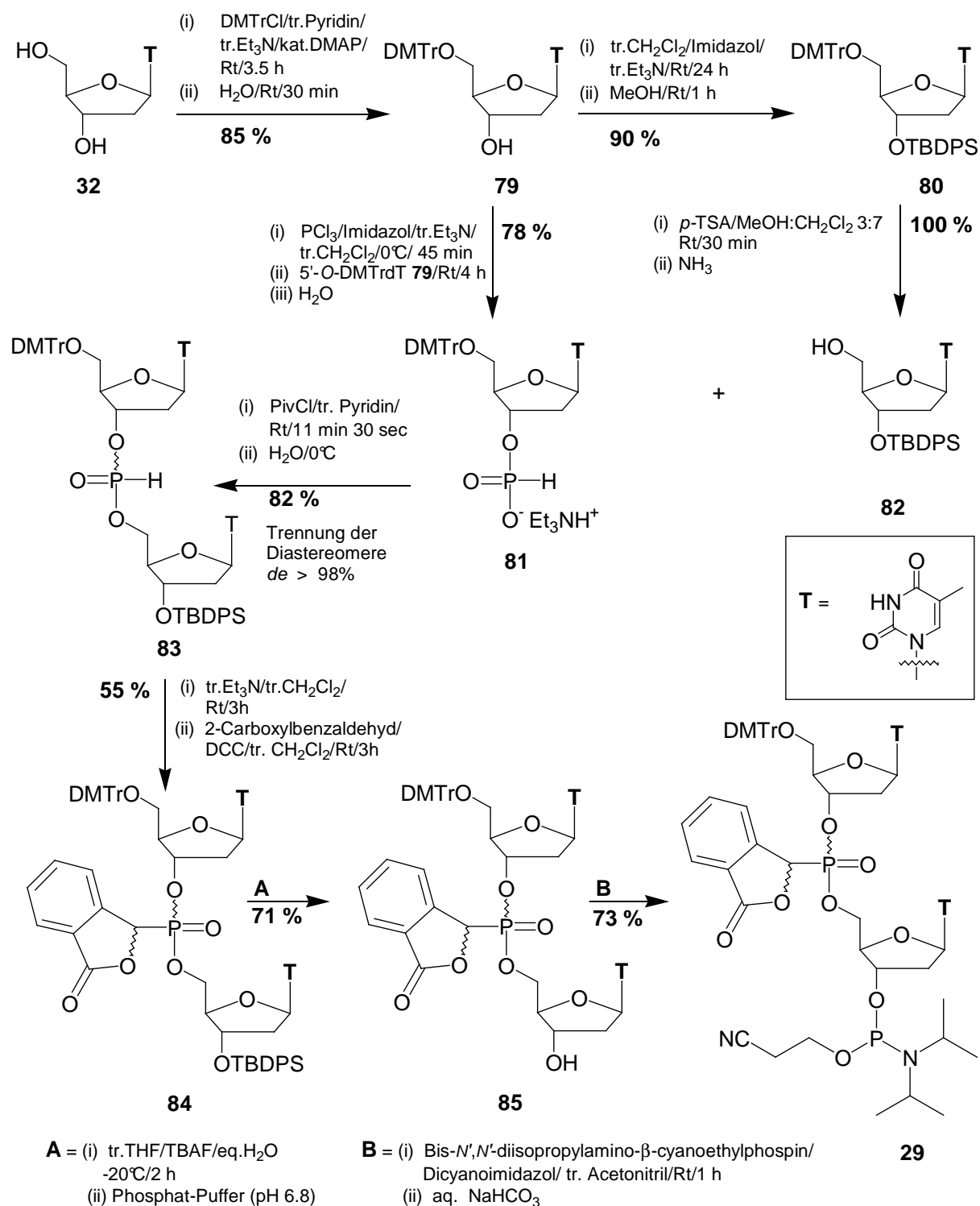


Abbildung 104: Synthese der (*R_P*)- und (*S_P*)-5'-*O*-DMTr-Phthalidylphosphonate diester-3'-*O*-amidite (*R_P*)-**30** und (*S_P*)-**30**

Die Kondensation der beiden monomeren Bausteine **81** und **82** zu dem Diastereomergemisch von R_P - und S_P -3'-O-TBDMS-5'-O-DMTr-*H*-Phosphonatdiester (R_P)-**83** und (S_P)-**83** gelang mit Hilfe des Aktivators Pivaloylchlorid. Die bei dieser Synthese durch den Aufbau des stereogenen Zentrums am Phosphoratom resultierenden Diastereomere konnten durch wiederholte Chromatographie mit einem diastereomeren Überschuss von $de > 98\%$ voneinander getrennt werden (siehe 4.2.7, S.61). Die Detektion der Diastereomere erfolgte mittels ^{31}P -NMR, da die Differenz der R_f -Werte ($\Delta R_f = 0.02$) zu klein war, um die Trennung mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie zu verfolgen. Die Zuordnung der absoluten Konfiguration des Phosphoratoms wurde in früheren Arbeiten durchgeführt^[103] (Anhang A, S.198).

Zur Darstellung der Phthalidylphosphonatdiester (R_P)-**84** und (S_P)-**84** wurden die entsprechenden *H*-Phosphonatdiester (R_P)-**83** und (S_P)-**83** mit 2-Carboxylbenzaldehyd und stöchiometrischen Mengen Triethylamin umgesetzt. Der intermediär gebildete α -Hydroxyphosphonatdiester wurde *in situ* zur Lactonisierung mit DCC umgesetzt. Die wider Erwarten schwierige Entschützung der 3'-Hydroxygruppe der Phthalidylphosphonatdiester (R_P)-**84** und (S_P)-**84** gelang mit TBAF in trockenem THF, stöchiometrischen Mengen Wasser und Aufarbeitung bei pH 6.8 (Phosphat-Puffer). Die Synthese der Phthalidylphosphonatdiesteramidite (R_P)-**30** und (S_P)-**30** verlief unter Standardbedingungen problemlos.

Die bei der Synthese der Phthalidylphosphonatdiester (R_P)-**84** und (S_P)-**84** durch den Aufbau eines weiteren stereogenen Zentrums am α -Kohlenstoff entstandenen Diastereomere konnten im Fall der (R_P)-Isomere chromatographisch voneinander getrennt werden, hingegen konnte bei den (S_P)-Isomeren nur eine Anreicherung des α -C-fast-Isomers erzielt werden (siehe 4.2.8, S.62). Nicht desto trotz war es möglich, die absoluten Konfigurationen der α -Kohlenstoffatome aller vier Diastereomere mit Hilfe der NOE-Spektroskopie zu bestimmen (siehe 4.2.9, S.65).

Es konnten die in Abb. 105 (S.131) gezeigten Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide ODN-1 bis ODN-9 mit Hilfe der Festphasensynthese unter leichter Änderung des Standard-Syntheseprotokolls dargestellt werden (siehe 4.3.4, S.80).

Durch Kupplung der 3'-entschützten Phthalidylphosphonatdiester (R_P)-**85** und (S_P)-**85** an die Festphase konnte die Modifikation in das 3'-Ende der Oligonucleotide eingeführt werden (siehe 4.3.1, S.74). Hierfür wurde der Oxalyl-Linker verwendet, da

sich dieser unter wesentlich mildereren Bedingungen von der Festphase abspalten lässt als der normalerweise verwendete Succinyl-Linker (siehe 4.3.2, S.78). So konnte die basische Hydrolyse der Phthalidylgruppe bei der Abspaltung zum größten Teil unterdrückt werden (siehe 4.3.5, S.84). Auch konnte gezeigt werden, dass die dennoch hydrolysierten Oligonucleotide unter der *H*-Phosphonat-Rückspaltung fragmentieren (siehe 4.4.4, S.100).

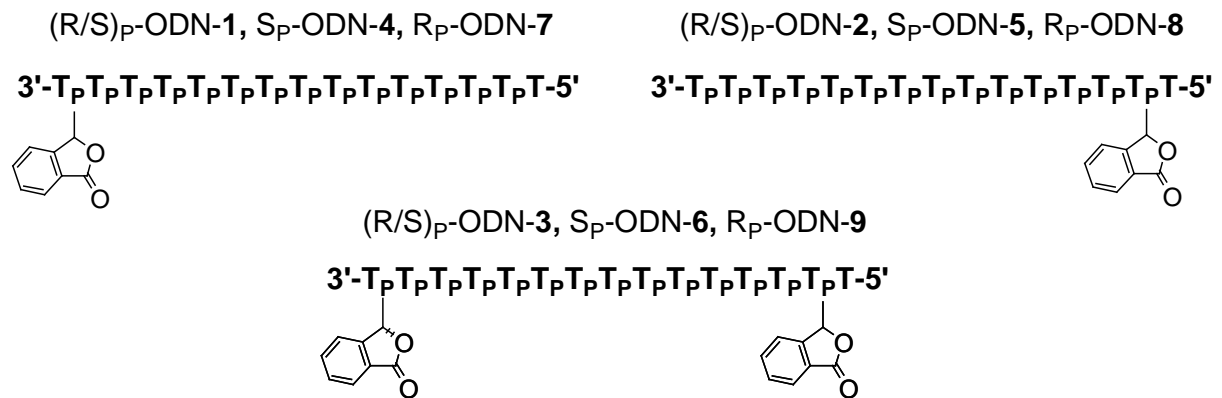


Abbildung 105: Synthetisierte Phthalidylphosphonat-modifizierte Oligonucleotide

Die Isolierung der Oligonucleotide erfolgte durch wiederholte HPLC-chromatographische Reinigung mit einer analytischen RP₁₈-Säule, wobei als Eluent ein Ammoniumacetat-Puffer (pH 6.8) mit einem Acetonitrilgradienten verwendet wurde (siehe 4.3.6, S.87).

Die Charakterisierung der Oligonucleotide wurde mit Hilfe der MALDI-TOF-Spektrometrie durchgeführt (siehe 4.4.1, S.90). Es hatte sich gezeigt, dass die nicht saure Matrix 6-Aza-2-thiothymin (ATT) **103** im Gegensatz zu den ansonsten gebräuchlichen Matrices THAP **100**, PA **101** und 3-HPA **102** wesentlich bessere Ergebnisse lieferte (siehe 4.4.3, S.93).

Um den Einfluss der Phthalidylphosphonatgruppe auf die Hybridisierungseigenschaften der modifizierten Oligonucleotide zu untersuchen, wurden die T_m -Werte der DNA/DNA-Hybride ODN-1/(dA)₁₅ bis ODN-9/(dA)₁₅ gemessen (siehe 4.5.5, S.108). Der Einbau von R_P-konfigurierten Phthalidylphosphonatgruppen hat erwartungsgemäß eine T_m -Werterhöhung zur Folge (ΔT_m ODN-7 = 0.8 °C, ΔT_m ODN-8 = 1.1 °C), hingegen sinkt der T_m -Wert bei der Verwendung von S_P-konfigurierten Phthalidylphosphonaten (ΔT_m ODN-4 = -2.4 °C, ΔT_m ODN-5 = -0.6 °C). Auch lässt sich ein reziproker Einfluss des 3'- und des 5'-Endes auf den T_m -Wert beobachten.

Am 5'-Ende eingebaut hat die R_P -konfigurierte Phthalidylphosphonatgruppe einen größeren Einfluss als am 3'-Ende eingebaut ($|\Delta T_m \text{ODN-7}| < |\Delta T_m \text{ODN-8}|$), hingegen hat die S_P -konfigurierte Phthalidylphosphonatgruppe einen größeren Einfluss, wenn sie am 3'-Ende eingebaut ist ($|\Delta T_m \text{ODN-4}| > |\Delta T_m \text{ODN-5}|$). Die T_m -Werte der zweifach-modifizierten Oligonucleotiden ODN-3 ($\Delta T_m = -0.4 \text{ }^\circ\text{C}$), ODN-9 ($\Delta T_m = -0.7 \text{ }^\circ\text{C}$) und ODN-6 ($\Delta T_m = -1.5 \text{ }^\circ\text{C}$) setzen sich nicht additiv aus den T_m -Werten der entsprechenden einfach-modifizierten Oligonucleotiden zusammen, sondern ergeben sich aus deren Mittelwert. Dies zunächst verblüffende Ergebnis lässt sich mit dem Zip-Modell erklären (siehe 4.5.5, S.108). Die T_m -Werte der DNA/RNA-Hybride ODN-1/(rA)₁₅ bis ODN-9/(rA)₁₅ zeigen, dass die Phthalidylphosphonatgruppe gegenüber RNA denselben, jedoch schwächeren Einfluss als gegenüber DNA hat.

Um die Stabilität der Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotide gegenüber Exonucleasen, zu untersuchen wurden zwei Enzymassays durchgeführt (siehe 4.5.7, S.116). Zur Bestimmung der 3'-Exonucleasestabilität diente die Calf Spleen Phosphodiesterase (E.C. 3.1.4.1) und für die 5'-Exonucleasestabilität die Snake Venom Phosphodiesterase (E.C. 3.1.16.1). Bei beiden Enzymassays war nach dreistündiger Inkubationszeit keinerlei Abbau der modifizierten Oligonucleotide zu beobachten, wobei unter denselben Bedingungen das unmodifizierte (dT)₁₅-Oligomer nach 15 Minuten vollständig verdaut worden war (siehe 4.5.7.2, S.121 und 4.5.7.3, S.122). Somit bietet die Phthalidylphosphonat-Modifikation einen hinreichend großen Schutz vor dem Abbau durch Exonucleasen.

Weiterhin wurde untersucht, ob der Lactonring der Phthalidylphosphonatgruppe durch Esterasen hydrolysiert werden kann (siehe 4.5.8, S.123). Die Inkubation des (R_P/S_P)-3',5'-Diphthalidylphosphonat-modifizierten Oligonucleotids ODN-3 mit der PL-Esterase (Pig Liver Esterase, Serine Hydrolase, E.C. 3.1.1.1) ergab jedoch keinerlei Öffnung des Lactonrings. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bei intrazellulärem pH-Wert von 7.3 eine langsame Hydrolyse der Phthalidylgruppe stattfindet.

Zur Untersuchung der Membrangängigkeit von Oligonucleotiden besteht neben der Radioisotopenmarkierung die Möglichkeit, sie mit einem Fluoreszenzmarker zu versehen (siehe 2.5, S.20). Hierzu wurde das fluoreszierende Thymidinanalogon m^5K 29 synthetisiert (Abb.106, S.133) und erfolgreich in ein Oligonucleotid eingebaut. Aus den verschiedenen literaturbekannten Synthesen für m^5K 29 wurde die von S. F. SINGELTON et al.^[82] gewählt, da hier das milde Oxidationsmittel

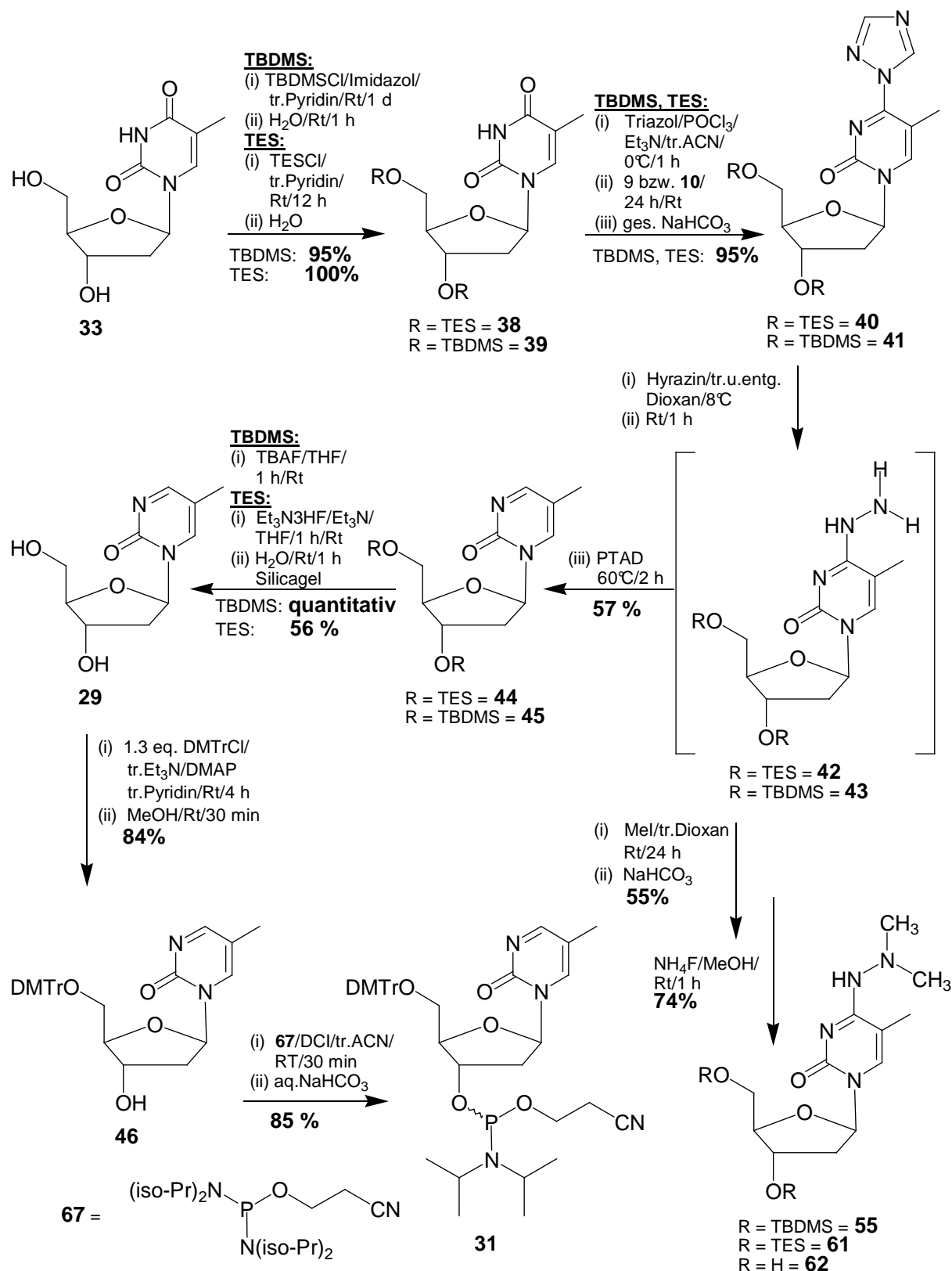


Abbildung 106: Synthese des 5'-O-DMTr-*m*⁵K-3'-O-amidits **31**

PTAD **37** eingesetzt wird (siehe 4.1.17, S.52). Das für die Oligonucleotid-Festphasensynthese benötigte 5'-O-DMTr-*m*⁵K-3'-O-Amidit **30** konnte in einer sechs-

stufigen Synthese mit einer Gesamtausbeute von 25 % dargestellt werden (siehe 4.1, S.26).

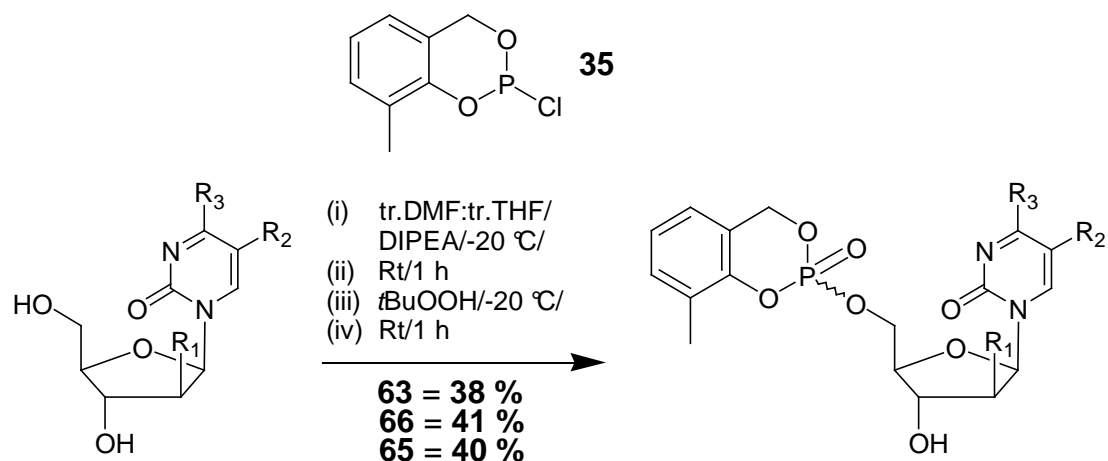
Die TES-Schützung von Thymidin **33** und die Synthese des 4-Triazolylderivats **40** konnte mit hohen Ausbeuten durchgeführt werden. Jedoch ergab die Synthese des 3',5'-O-BisTES- m^5K **44** zunächst keine Ausbeuten größer als 25 %. Erst durch den Austausch der TES-Schutzgruppe mit der stabileren TBDMS-Gruppe und Optimierung der Oxidation mit PTAD **37** konnte eine Ausbeute von 57 % erzielt werden. Zur Differenzierung der beiden Syntheseschritte (**41**→**43**→**45**) wurde das intermediär gebildete 4-Hydrazinylderivat **43** durch Methylierung des endständigen Stickstoffs abgefangen (siehe 4.1.6, S.33). Die Entschützung des 3',5'-O-BisTBDMS- m^5K **45** gelang mit TBAF in THF in quantitativer Ausbeute. Die DMTr-Schützung der 5'-Hydroxygruppe und die anschließende Synthese des 5'-O-DMTr- m^5K -3'-O-Amidits **31** konnten unter Standardbedingungen problemlos durchgeführt werden.

Der Einbau des fluoreszenten m^5K **29** in die Mitte eines (dT)₁₅-Oligomers bietet die größtmögliche Freiheit für das weitere Design verschiedener chimere gapmer-Oligonucleotide. Das einzig erfolgreich synthetisierte und isolierte Oligonucleotid, bei dem das m^5K **29** in die achte Position eingebaut worden war, ist das in Abb.107 gezeigte ODN-**10** (siehe 4.6, S.124).



Abbildung 107: ODN-**10** mit dem fluoreszenten m^5K **29**

Des Weiteren wurden die in Abb.108 (S.135) gezeigten drei Phosphatriester **63**, **65** und **66** synthetisiert. Das hier angewendete *cycloSal*-Prodrug-Konzept dient als Bypass der Thyminkinase, welche die Phosphorylierung von Nucleosiden zu Nucleosidmonophosphaten katalysiert, und als sehr spezifisches Enzym in der Biosynthese der aktiven Nucleosidtriphosphaten limitierend wirkt (siehe 4.1.13, S.46). Die Darstellung der *cycloSal*-Triester erfolgte durch Umsetzung der freien Nucleosidanaloga **29**, **64** und **62** mit 5*H*-2-Chlor-8-methylbenzo[3,4-*b*][2,6,1]-dioxaphosphinin **68** in Gegenwart der Base DIPEA und anschließender Oxidation der intermediär gebildeten Phosphor(III)-Verbindungen mit *tert*-Butylhydroperoxid (siehe 4.1.11, S.43 und 4.1.12, S.45). In Anbetracht der konkurrierenden 3'-Hydroxygruppe lagen die Ausbeuten mit ca. 40 % im erwarteten Bereich.



$R_1=H, R_2=Me, R_3=H = \mathbf{29}$
 $R_1=H, R_2=Me, R_3=Me_2NNH = \mathbf{62}$
 $R_1=F, R_2=H, R_3=H = \mathbf{64}$

$R_1=H, R_2=Me, R_3=H = \mathbf{63}$
 $R_1=H, R_2=Me, R_3=Me_2NNH = \mathbf{66}$
 $R_1=F, R_2=H, R_3=H = \mathbf{65}$

Abbildung 108: Synthese der drei 3-Me-cycloSal-Monophosphattriester **63**, **65** und **66**

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von J. Balzarini, Universität Leuven, Belgien, wurden für die drei 3-Me-cycloSal-Verbindungen **63**, **65** und **66** *in vitro*-anti-HIV-Tests in Zellkulturen durchgeführt (siehe 4.1.12, S.45 und 4.1.13, S.46). Während 3-Me-cycloSal- m^5 KMP **63** und 3-Me-cycloSal-ZebularinMP **65** keine Wirkung gegen HIV-1 und HIV-2 aufwies, konnte bei 3-Me-cycloSal-DiMeHydrazinyl- m^5 KMP **66** eine leichte Aktivität gegen beide HIV-Stämme nachgewiesen werden. Insbesondere konnte mit einer Thymidinkinase-defizienten Zelllinie gezeigt werden, dass im Fall des 3-Me-cycloSal-DiMeHydrazinyl- m^5 K **36** der TK-Bypass beschriftet wurde.

6. AUSBLICK

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Phthalidylphosphonat-modifizierte Oligonucleotide wesentliche Anforderungen erfüllen, die an *antisense*-Oligonucleotide gestellt werden. So konnte eine Grundlage für zukünftige Untersuchungen gelegt werden.

Neben dem Einbau der Phthalidylphosphonat-Modifikation in literaturbekannte *antisense*-Sequenzen sind eine Reihe weiterer Untersuchungen der Modifikation von Interesse. Eine wichtige Fragestellung ist, ob Phthalidylphosphonat-DNA/RNA-Hybride gute Substrate für die RNase H sind, da erst durch die Aktivierung der RNase H eine effektive Antisensewirkung ermöglicht wird. Ein weiterer Aspekt ist die Untersuchung der passiven Zellaufnahme Phthalidylphosphonat-modifizierter Oligonucleotide mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie. Hierfür ist es jedoch notwendig, die in Abb.103 (S.126) abgebildeten fluoreszenzmarkierten chimären Oligonucleotide zu synthetisieren bzw. zu isolieren. Wie in Abschnitt 4.6 (S.125) beschrieben war es nicht möglich, Oligonucleotide mit mehr als zwei Phthalidylphosphonat-Modifikationen erfolgreich zu isolieren, da durch die basischen Abspaltungsbedingungen des Oxallylinkers die Phthalidylphosphonatgruppe teilweise hydrolysiert wird. Durch die Verwendung des von E. ANDERSON et al.^[136] entwickelten photolabilen 2-Nitrophenyllinkers könnte dieses Problem umgangen werden.

Für den variablen Einbau der Phthalidylphosphonat-Modifikation in unterschiedliche Sequenzen ist es notwendig, neben dem in dieser Arbeit synthetisierten (dT)-Dimer auch andere Dimere darzustellen. Jedoch sind die üblicherweise verwendeten Acyl-Schutzgruppen (Benzoyl-, Anisoyl- und Isobutyroylgruppen) für die exozyklischen Aminogruppen von Adenosin, Cytosin und Guanosin nicht einsetzbar, da auch hier die Phthalidylphosphonatgruppe unter den benötigten basischen Entschützungsbedingungen nicht stabil ist. Alternativ zu den herkömmlichen Schutzgruppen stehen verschiedene Strategien zur Verfügung. Es können Schutzgruppen eingesetzt werden, die mit nichtnukleophilen Basen (z.B. DBU) unter β -Eliminierung entfernt werden können, wie z.B. die 2-(4-Nitrophenyl)-ethoxycarbonyl-(NPEOC)-Schutzgruppe **114**^[137] (Abb.109, S.137) oder die 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-(Fmoc)-Gruppe. Auch wurde von R. NOYORI die Allyloxycarbonyl-Schutzgruppe, die durch Verwendung eines Palladium(0)katalysators wieder abgespalten werden kann,

erfolgreich in der Oligonucleotid-Festphasensynthese eingesetzt.^[138] Weitere Möglichkeiten bieten die beiden in Abb.109 dargestellten photolabilen Schutzgruppen NVOC **115** und diNPEOC **116**,^[139] mit denen auch die exozyklische Aminogruppe des Guanosins blockiert werden kann.

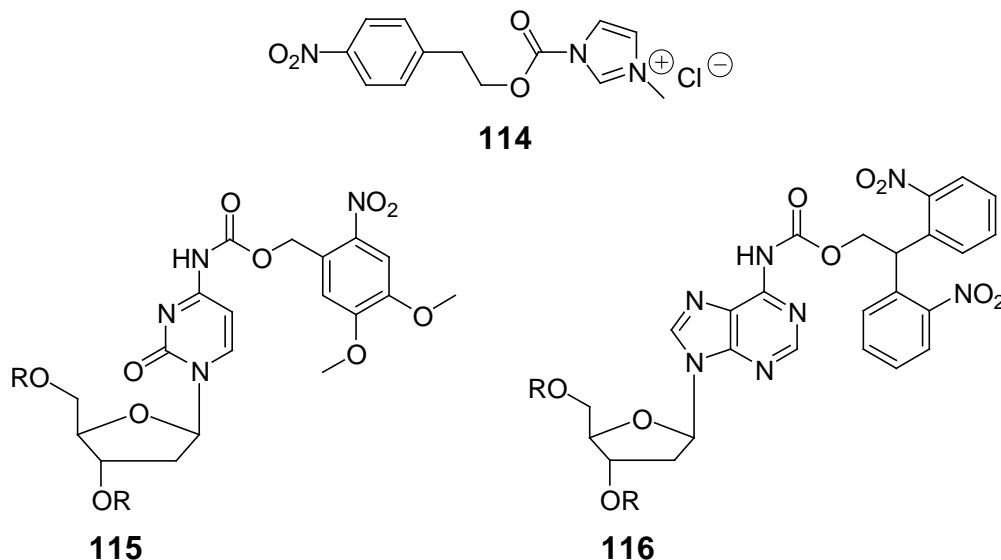


Abbildung 109: NPEOC-Imidazoliumchlorid **114**, N-(6-Nitroveratryloxycarbonyl)cytosin (NVOC) **115**, N-(2,2'-bis(2-nitrophenyl)ethoxycarbonyl)adenosin (diNPEOC) **116**

Zum Einbau der Phthalidylphosphonat-Modifikation in schon untersuchte *antisense*-Oligonucleotide steht eine große Anzahl verschiedener Sequenzen zur Verfügung. In Abb.110 sind die Sequenzen der *antisense*-H-Ras-DNA^[140] und der *antisense*-Influenza-DNA^[141] abgebildet, die beide schon als α -Hydroxy-2-nitrobenzylphosphonat-modifizierte Oligonucleotide synthetisiert wurden.^[142]



Abbildung 110: Verschiedene *antisense*-Sequenzen

Beide Sequenzen haben jedoch den Nachteil, dass für die Synthese des modifizierten gapmer-Oligonucleotids zwei unterschiedliche Phthalidylphosphonat-modifizierte Dimere benötigt würden. Eine Sequenz, die an beiden Enden das gleiche Basendimer hätte, würde den synthetischen Aufwand selbstverständlich erheblich verringern. Das *antisense*-EGFR-Oligonucleotid z.B. hat eine solche Sequenz, bei der nur ein (dC)-Dimer benötigt wird (Abb.110). Der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) spielt eine wichtige Rolle in der Regulierung des Zellwachstums und ist daher ein vielversprechendes Ziel zur Bekämpfung von verschiedenen Krebsarten.^[143]

7. EXPERIMENTELLER TEIL

7.1 ALLGEMEINES

7.1.1 Lösungsmittel

Acetonitril; C_2H_3N [41.05]; Sdp.: 81-82 °C; $d = 0.78$

- a) zur Synthese; Merck Nr. 800015.
- b) technische Qualität; über di-Phosphorpentoxid getrocknet und bei Normaldruck abdestilliert.

Benzol; C_6H_6 [78.11]; Sdp.: 79-81 °C; $d = 0.879$

- a) min. 99.7 %; Riedel-de-Haën Nr. 32212.

Dichlormethan; CH_2Cl_2 [84.93]; Sdp.: 39-40 °C; $d = 1.325$

- a) technische Qualität; über Calciumchlorid getrocknet, Normaldruck destilliert
- b) puriss. absolut, über Molsieb, $H_2O \leq 50$ ppm; Fluka Nr. 66749.

Diethylether; $C_4H_{10}O$ [74.12]; technische Qualität; Sdp.: 35 °C; $d = 0.71$

- a) bei Normaldruck destilliert und über Kaliumhydroxid aufbewahrt.
- b) über Natrium getrocknet und bei Normaldruck destilliert.

N,N-Dimethylformamid (DMF); C_3H_7NO [73.10]; Sdp.: 190-191 °C

- a) puriss. absolut, über Molsieb, Fluka Nr. 40248

1,4-Dioxan; $C_4H_8O_2$ [123-91-1]; Sdp.: 101 °C; $d = 1,03$

- a) über Natrium getrocknet und bei Normaldruck destilliert.

Essigsäureethylester; $C_4H_8O_2$ [88.11]; technische Qualität; Sdp.: 77 °C

- a) über Calciumchlorid getrocknet und bei Normaldruck abdestilliert.

Methanol; CH_4O [32.04]; Sdp.: 64 °C; $d = 0.791$

- a) technische Qualität; bei Normaldruck destilliert.
- b) puriss. absolut, über Molsieb, Fluka Nr. 65542.

Pyridin; C_5H_5N [79.10];

- a) puriss. absolut über Molsieb, $H_2O \leq 50$ ppm; Fluka Nr. 82704.
- b) technische Qualität; über Natriumhydrid getrocknet, Normaldruck destilliert.

Tetrahydrofuran; C_4H_8O [72.11]; Sdp.: 67 °C; $d = 0.887$

- a) puriss. absolut über Molsieb, $H_2O \leq 50$ ppm; Fluka Nr. 87371.
- b) technische Qualität; über Kalium getrocknet, bei Normaldruck destilliert

Toluol; C₇H₈ [92.14]; technische Qualität; Sdp.: 110 °C; d = 0.86

a) bei Normaldruck destilliert.

7.1.2 Verwendete Puffer und Reagenzien

7.1.2.1 *Kaltgesättigte ammoniakalische Methanollösung*

In einem 100 mL Rundkolben wurden 80 mL Methanol vorgelegt und mit einer Eis-NaCl-Kältemischung auf -15 °C gekühlt. Über eine Glaspipette wurde solange Ammoniakgas in das Methanol eingeleitet (ca. 15 min), bis dieses gesättigt war. Die fertige Ammoniak-kaltgesättigte Methanollösung wurde bei -20 °C gelagert.

7.1.2.2 *0.1 M Triethylammoniumacetat-Puffer pH 6.8 (HPLC)*

Zu 950 mL Milli-Q-Wasser wurden 13.8 mL Triethylamin und 5.6 mL Essigsäure gegeben. Nachdem der pH-Wert dieser Lösung auf pH 6.8 eingestellt worden war, wurde sie mit Milli-Q-Wasser 1000 mL aufgefüllt.

7.1.2.3 *Phosphatpuffer zur T_m-Wert Bestimmung pH 6.8*

Zur Bestimmung der T_m-Werte wurde ein 0.14 M NaCl-Puffer verwendet. Zur Herstellung des Puffers wurden 85 mg (0.616 mmol, 137.98 g/mol) Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat (NaH₂PO₄•H₂O), 69 mg (0.390 mmol, 177.96 g/mol) Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na₂HPO₄•2H₂O) und 37 mg (0.10 mmol, 374.26 g/mol) Dinatriumethyldiaminotetraacetat Dihydrat (Na₂EDTA•2H₂O) in 100 mL Milli-Q-Wasser gelöst und mit einer 0.1 M wässrigen NaOH Lösung der pH-Wert auf pH 6.8 eingestellt.

7.1.2.4 *Phosphatpuffer für den 5'-Exonuclease-Assay pH 6.8*

Für die Bestimmung der Stabilität von modifizierten Oligonukleotiden gegenüber dem Abbau durch die Calf Spleen Phosphodiesterase (CSP) wurde ein 0.15 M Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄) Puffer verwendet. Zur Herstellung des Puffers

wurden 2.04 g (15 mmol, 136.09 g/mol) Kaliumdihydrogenphosphat, 419 mg (1.12 mmol, 374.26 g/mol) Dinatriumethyldiamintetraacetat Dihydrat ($\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) in 80 mL Milli-Q-Wasser gelöst und mit 15 mL einer 1 %igen wässrigen Tween 80 Lösung versetzt. Nachdem der pH-Wert dieser Lösung mit einer 0.1 M wässrigen NaOH-Lösung auf pH 6.8 eingestellt worden war, wurde sie mit Milli-Q-Wasser auf 100 mL aufgefüllt.

7.1.2.5 *TRIS-Puffer für den 3'-Exonuclease-Assay (pH 6.8)*

Für die Bestimmung der Stabilität von Phthalidylphosphonat-modifizierten Oligonukleotiden gegenüber dem Abbau durch die Snake Venom Phosphodiesterase (SVP) wurde ein 0.032 M TRIS-Puffer verwendet. Zur Herstellung des Puffers wurden 387 mg (3.20 mmol, 121.14 g/mol) Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) und 143 mg (1.50 mmol, 95.21 g/mol) Magnesiumchlorid in 100 mL Milli-Q-Wasser gelöst und mit einer 0.1 M wässrigen NaOH-Lösung der pH-Wert auf 6.8 eingestellt.

7.1.2.6 *NH₄-belegte pH-neutrale Ionenaustauscher-Beans*

Zum Entsalzen der MALDI-TOF-Proben wurden NH₄-belegte pH-neutrale Ionenaustauscher-Beans verwendet. Für deren Herstellung wurde eine Glaspipette, die mit einem kleinen Stück Watte abgedichtet war, ca. 5 cm hoch mit Ionenaustauscher-Beans (Dowex 80 W) gefüllt. Diese Beans wurden zunächst mit 20 mL einer Lösung von ca. 5 g Diammoniumtartrat in 20 mL MilliQ-Wasser langsam gewaschen und anschließend solange mit reinem MilliQ-Wasser gespült, bis das Eluent einen pH-Wert von 7 hatte. Zur Aufbewahrung wurden die Beans in ein Eppendorf-Cap überführt und bei -20 °C gelagert.

7.2 CHROMATOGRAPHIE

7.2.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Alumina; Merck Nr. 5554 Detektion: a) UV (254 nm); b) UV/Fluoreszenz (366 nm); c) Zuckersprühreagenz: Anisaldehyd, Ethanol, H₂SO₄; d) Iodkammer;

7.2.2 Zirkulare, zentrifugale Dünnschichtchromatographie (CCTLC)

Chromatotron; Harrison Research; Modell 7924,

Trennmaterial: 60 PF₂₅₄ Merck Nr. 7749

Mit Hilfe eines Chromatotrons wurden UV-aktive Substanzgemische bis maximal 6 g aufgereinigt. Als Trennmaterial diente gipshaltiges Kieselgel, das in Schichtdicken von 1, 2 und 4 mm aufgetragen wurde. Die Detektion der UV-aktiven Substanzen erfolgte mit einer UV-Lampe der Firma Konrad Benda bei einer Wellenlänge von 254 nm.

7.2.3 Präparative Säulenchromatographie und Flash-Chromatographie

Die säulenchromatographische Trennung wurde an Kieselgel 60 (230-400 mash, Korngröße 0.040 – 0.063 mm, Merck) durchgeführt. Bei dem flash-Verfahren wurde mit einem Überdruck von 0.2 – 0.4 bar gearbeitet. Es wurden stets destillierte Lösungsmittel verwendet.

7.2.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde an zwei Merck-Hitachi-Anlagen durchgeführt.

Software:	Chromatography Data Station Software HPLC-Manager Version 2
Interface:	Model D 6000
Pumpe:	Model L 6200 A Intelligent Pump
Automatischer Probenwechsler:	Model AS 2000 A
Detektion:	UV, 260 nm
Analytische Säule:	LiChroCART 250-3 mit Lichrospher 100-3 RP 18 (5 µm) Füllmaterial
Software:	Chromatography Data Station Software HPLC System Manager Version 3.1.1.
Interface:	Model L-7000
Pumpe:	Model L-7100
Automatischer Probenwechsler:	Model L-7200
Dioden Array Detektor:	Model L-7455

Analytische Säule: LiChroCART 250-3 mit Lichrospher 100-3 RP 18
(5 µm) Füllmaterial

7.2.4.1 HPLC-Methoden

Eluent 1:

95 % eines 0.1 M Triethylammoniumacetat-Puffers (pH 6.8) und 5 % Acetonitril

Methode 1: (Hydrolysekinetik):

1. Wasser mit einem Acetonitril-Gradienten von 5-100 % in 20 Minuten
2. 15 Minuten isokratisch Acetonitril/Wasser 5:95 v/v

Flussrate: 0.5 mL/min

Detektion: UV (240-260 nm)

Methode 2:

1. Wasser mit Eluent 1 von 5-25 % in 45 Minuten
2. 100 % Acetonitril 5 Minuten
3. Eluent 1 5% mit einem Acetonitril/Wasser-Gradienten von 95-0 % in 20 Minuten

Flussrate: 0.5 mL/min

Detektion: UV (240-260 nm)

Methode 3:

1. Wasser mit Eluent 1 von 5-30 % in 50 Minuten
2. 100 % Acetonitril 5 Minuten
3. Eluent 1 5% mit einem Acetonitril/Wasser-Gradienten von 95-0 % in 20 Minuten

Flussrate: 0.5 mL/min

Detektion: UV (240-260 nm)

Methode 4:

1. Wasser mit Eluent 1 von 5-35 % in 60 Minuten
2. 100 % Acetonitril 5 Minuten
3. Eluent 1 5% mit einem Acetonitril/Wasser-Gradienten von 95-0 % in 20 Minuten

Flussrate: 0.5 mL/min

Detektion: UV (240-260 nm)

7.3 KERNRESONANZSPEKTROSKOPIE (NMR)

Alle NMR-Spektren wurden in der organischen bzw. der anorganischen NMR-spektroskopischen Abteilung der Universität Hamburg messen.

Bruker AC 250 P (^1H mit 250 MHz; ^{13}C mit 62.9 MHz, ^{31}P mit 81 MHz), Bruker AMX 400 (^1H mit 400 MHz; ^{13}C mit 101 MHz, ^{31}P mit 162 MHz), Bruker DMX 500 (^1H mit 500 MHz; ^{13}C mit 126 MHz, ^{31}P mit 202 MHz, ^{19}F mit 471 MHz).

7.3.1 NMR-Nomenklatur

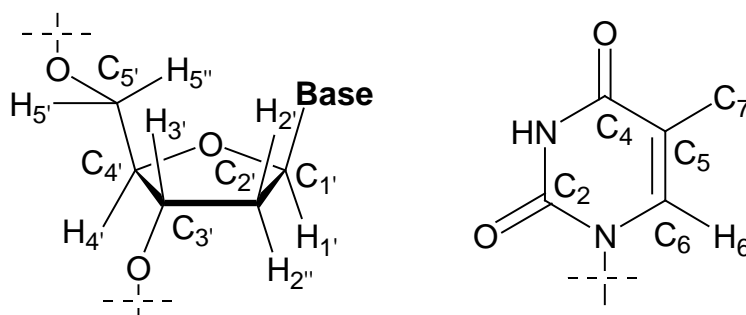


Abbildung 111: Bezeichnung der Wasserstoff- und Kohlenstoffatome

- (i) Die Wasserstoff- und Kohlenstoffatome der 2'-Desoxyribofuranoseringe werden ausgehend von dem anomeren Kohlenstoffatom ($\text{C}_{1'}$) im Uhrzeigersinn nummeriert.
- (ii) Bei den dimeren Verbindungen werden die Wasserstoffatome des 5'-O-geschützten Ringes mit A und des 3'-O-geschützten Ringes mit B gekennzeichnet.
- (iii) Im Falle zweier Diastereomere ist das eine mit 1 und das andere mit 2 gekennzeichnet.

7.4 MALDI-TOF-SPEKTROMETRIE

Alle MALDI-TOF-Messungen wurden an einem MALDI-TOF-Spektrometer der Firma Bruker (Model Reflex III) durchgeführt.

7.4.1 MALDI-TOF-Probenpräparation

Für die MALDI-TOF-Probenpräparation wurde zunächst 0.5 mL einer gesättigten Lösung von 6-Aza-2-thiothymin **103** in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (1:1 v/v) hergestellt. Der Überstand wurde abgenommen, in ein Eppendorf-Cap überführt, dass zuvor mit NH_4 -belegten pH-neutralen Ionenaustauscher-Beans befüllt worden war, und 12 h bei Raumtemperatur geschwenkt (Termomixer). Paralell wurden in einem Eppendorf-Cap zu 8-10 NH_4 -belegten pH-neutralen Ionenaustauscher-Beans 50 pmol des Oligonucleotids geößt in 4 μl eines Acetonitril/Wasser-Gemischs (1:1 v/v) gegeben und ebenfalls 12 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden 2 μL der 6-Aza-2-thiothymin-Lösung zu der Oligonucleotid-Lösung gegeben, mit dieser gemischt, auf den MALDI-TOF-Probenteller aufgetragen. Der Probenteller wurde abgedeckt und zur Kristallisation der Matrix ca. 1 h bei Raumtemperatur stehengelassen.

7.5 GERÄTE

7.5.1 Ultraviolettspektroskopie

Die UV-spektroskopischen Messungen wurden an einem UV-Spektrometer der Firma Varian (Model CARY 1E) durchgeführt.

7.5.2 Gefriertrocknung

Wässrige Lösungen wurden an einer Amsco/Finn-Aqua Lyovac GT2 Gefriertrocknungsanlage bzw. an einer Christ/Alpha 2-4 Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert.

7.5.3 Thermomixer

Die Hydrolysekinetik und die enzymatischen Untersuchungen wurden bei 37 °C in einem Thermomixer der Firma Eppendorf (Model: 5436) durchgeführt.

7.5.4 DNA-Synthesizer

Alle Oligonucleotide wurden via der Festphasen-Phosphoramidit-Methode mit dem DNA-Synthesizer der Firma Eppendorf /Biotronic (Modell: DNA 300+) synthetisiert.

7.5.5 Speedvak (Vakuum-Probenkonzentrator)

Wässrige DNA-Lösungen wurden in Eppendorf-Caps an einem Probenkonzentrator der Firma UNIVAPO (Modell: 150K) unter Ölpumpenvakuum eingeengt.

7.5.6 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren wurden an einem AVIS Instruments, Modell 125 aufgenommen. Als Lösungsmittel diente der für die T_m -Wert Messung hergestellte Phosphatpuffer (pH 6.8).

7.5.7 Infrarotspektroskopie

Die IR-Spektren wurden auf einem ATI Mattson Genesis Serie FTIR aufgenommen.

7.6 ENZYMATISCHE ARBEITSVORSCHRIFTEN

7.6.1 Hydrolysekinetik von *N*'-(5'-(3-MethylcycloSal)- β -D-2'-desoxyribosyl)-5-methylpyrimidin-2-on (**63**) in Phosphatpuffer (pH 7.3)

Es wurde eine 50 mM Lösung von *N*'-(5'-(3-MethylcycloSal)- β -D-2'-desoxyribosyl)-5-methylpyrimidin-2-on **63** in DMSO angesetzt. Für die 1.9 mM Hydrolyse-Stammlösung wurden von dieser Lösung 11.4 μ L mit MilliQ-Wasser auf 300 μ L aufgefüllt, für den internen Standard mit 5 μ L einer AZT-Lösung (5 mg in 500 μ L H₂O) versetzt und auf 37 °C erwärmt. Die Hydrolyse wurde durch Zugabe von 300 μ L des auf 37 °C erwärmten Phosphatpuffers und Durchmischen (Vortex) gestartet. Die Triester Konzentration betrug so 0.94 mM und die des Puffersalzes 24.8 mM. Sofort nach Zugabe des Phosphatpuffers wurden zur Bestimmung des T_0 -Werts 60 μ L

entnommen, diese zum Abbruch der Hydrolyse auf 3 Tropfen konzentrierter Essigsäure gegeben und auf -196 °C gekühlt. Alle weiteren Probenentnahmen wurden analog der t_0 -Probenentnahme durchgeführt.

Die Proben wurden HPLC-analytisch untersucht (HPLC-Methode 1). Für die Auswertung der Kinetik wurden die Quotienten der Peakflächen des Triesters und des internen Standards gegen die Zeit aufgetragen. Durch eine exponentielle Ausgleichskurve wurde die Geschwindigkeitskonstante k ermittelt. Da die Konzentration des Wassers sehr viel grösser war als die des Triesters, ist die Hydrolyse *pseudo* 1. Ordnung.

So konnte mit: $t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$ die Hydrolysehalbwertszeit $t_{1/2}$ bestimmt werden.

Die Messdaten wurden durch eine Doppelbestimmung verifiziert.

7.6.2 3'-Exonuclease-Assay

In einem Eppendorf-Cap wurden 1 nmol des jeweiligen Oligonucleotids in 50 μL TRIS-Puffer (pH 6.8) gelöst und auf 37 °C erwärmt um Start der Abbaureaktion wurden zu dieser Lösung 0.05 u der Calf Spleen Phosphodiesterase (CSP, E.C. 3.1.4.1) in Form einer Lösung in TRIS-Puffer gegeben (ca. 1 u/10 μL) und gut durchmischt (Vortex). Sofort wurden 10 μL für die t_0 -Messung abgenommen und zur Denaturierung des Enzyms mit 10 μL Acetonitril verdünnt. Die verbliebenen 40 μL wurden unter langsamer Bewegung in einem Thermomixer auf 37 °C gehalten. Alle 15 Minuten wurde kontrolliert, dass sich keine größeren Mengen der Reaktionslösung als Kondensat unter dem Deckel des Eppendorf-Caps sammeln konnten. Die zu den jeweiligen Zeitpunkten entnommenen Proben (10 μL) wurden ebenfalls mit 10 μL Acetonitril verdünnt. Zur Messung der Proben wurden diese ohne weitere Behandlung mit der HPLC analysiert.

Parallel zu jedem 3'-Exonuclease-Assay wurde ein $(dT)_{15}$ -Oligomer-Abbau durchgeführt, um durch eine Positivmessung die richtige Durchführung des Assays zu gewährleisten.

Probenentnahmezeiten:

$T_0 = 0\text{ min}$; $t_1 = 10\text{ min}$; $t_2 = 30\text{ min}$; $t_3 = 30\text{ min}$; $t_4 = 240\text{ min}$

HPLC-Methode (T₁₅-Oligomer): Methode 2

HPLC-Methode (einfach modifizierte-Oligomere): Methode 3

HPLC-Methode (zweifach modifizierte-Oligomere): Methode 4

7.6.3 5'-Exonuclease-Assay

In einem Eppendorf-Cap wurden 1 nmol des jeweiligen Oligonucleotids in 50 µL Phosphatpuffer (pH 6.8) gelöst und auf 37 °C erwärmt. Zum Start des Exonuclease-Abbaus wurden 0.1 u Snake Venom Phosphodiesterase in Form einer Lösung (ca. 1 u/10 µL) in Phosphatpuffer (pH 6.8) gegeben und gut durchmischt (Vortex). Sofort wurden 25 µL für die t₀-Messung abgenommen und zur Denaturierung der Phosphodiesterase und Fällung aller Proteine mit 25 µL Methanol verdünnt. Die verbliebenen 25 µL wurden unter langsamer Bewegung in einem Thermomixer auf 37 °C gehalten. Alle 15 Minuten wurde kontrolliert, dass sich keine größeren Mengen der Reaktionslösung als Kondensat unter dem Deckel des Eppendorf-Caps sammeln konnten. Für die zweite Probe (t₁) wurden die gesamten 25 µL ebenfalls mit 25 µL Methanol verdünnt.

In einer Ultrazentrifuge wurden die gefällten Proteine über 5 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Rückstand 2 mal mit je 25 µL extrahiert. Die vereinigten Lösungen wurden in einem Probenkonzentrator auf ca. die Hälfte ihres Volumens eingeeengt (50 µL) und mit der HPLC analysiert.

Parallel zu jedem 5'-Exonuclease-Assay wurde ein (dT)₁₅-Oligomer-Abbau durchgeführt, um durch eine Positivmessung die richtige Durchführung des Assay zu gewährleisten.

Es wurden dieselben HPLC-Methoden wie bei dem 3'-Exonuclease-Assay (siehe 7.8.2, S.147) verwendet.

7.6.4 Esterase-Assay

In einem Eppendorf-Cap wurden 0.5 nmol des jeweiligen Oligonucleotids in 200 µL Tris-Puffer (pH 7.3) gelöst und auf 37 °C erwärmt. Zum Start des Esterase-Abbaus wurden 5 u PL-Esterase in Form einer Lösung (ca. 1 u/1 µL) in Tris-Puffer (pH 7.3)

gegeben und gut durchmischt (Vortex). Sofort wurden 50 μL für die t_0 -Messung abgenommen und mit der HPLC analysiert. Die verbliebenen 150 μL wurden unter langsamer Bewegung in einem Thermomixer auf 37 $^{\circ}\text{C}$ gehalten. Alle 15 Minuten wurde kontrolliert, dass sich keine größeren Mengen der Reaktionslösung als Kondensat unter dem Deckel des Eppendorf-Caps sammeln konnten. Für die zweite Probe (t_1) wurden nach 100 Minuten weitere 50 μL der Reaktionslösung entnommen und mit der HPLC analysiert.

Parallel zu dem Esterase-Assay wurde dasselbe Experiment durchgeführt, nur ohne die Zugabe des Enzyms.

Es wurde dieselbe HPLC-Methode wie bei dem 3'-Exonuclease-Assay (siehe 7.8.2, S.147) verwendet.

7.7 DARSTELLUNG VON $m^5\text{K}$ (29) UND DESSEN DERIVATEN

7.7.1 Darstellung von 3',5'-O-Bis(triethylsilyl)thymidin (38)

Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Es wurden 10.0 g (41.0 mmol, 242.23 g/mol) Thymidin **33** 2 mal mit je 15 mL trockenem Pyridin koevaporiert und in 200 mL trockenem Pyridin gelöst. Zu dieser Lösung wurden langsam 34 mL (0.205 mol, 31.0 g, 150.72 g/mol, 0.90 g/cm³) Triethylsilylchlorid gegeben. Nachdem die Lösung 4 h bei Raumtemperatur gerührt worden war, wurden 10 mL destilliertes Wasser hinzugegeben und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Pyridin-Wasser-Gemisch wurde unter Vakuum abkondensiert und der Rückstand in 200 mL Diethylether aufgenommen. Die organische Phase wurde 2 mal mit je 100 mL destilliertem Wasser und einmal mit 100 mL einer gesättigten wässrigen NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und unter Vakuum eingeengt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanolgradienten (0-3 %), wobei dem Eluenten 1 % Triethylamin zugesetzt worden war. Da sich das 3',5'-O-Bis(triethylsilyl)thymidin **38** bei Raumtemperatur langsam zersetzt, wurde es sofort nach Isolierung bei -20 $^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Ausbeute: 20.7 g (41.0 mmol, 100 %)

farbloses Öl

$C_{22}H_{42}N_2O_5Si_2 = 470.75 \text{ g/mol}$

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 v/v) $R_f = 0.71$

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.44 (s, 1H, NH); 7.54 (d, 1H, $^4J_{H_6-H_7} = 1.2 \text{ Hz}$, H_6); 6.34 (dd, 1H, $^3J_{H_{1'}-H_{2'}} = 5.9 \text{ Hz}$, $^3J_{H_{1'}-H_{2''}} = 7.8 \text{ Hz}$, $H_{1'}$); 4.40 (ddd, 1H, $^3J_{H_{3'}-H_{2'}} = 2.7 \text{ Hz}$, $^3J_{H_{3'}-H_{2''}} = 5.9 \text{ Hz}$, $^3J_{H_{3'}-H_{4'}} = 2.3 \text{ Hz}$, $H_{3'}$); 3.94 (ddd, 1H, $^3J_{H_{4'}-H_{5'}} = 2.7 \text{ Hz}$, $^3J_{H_{4'}-H_{5''}} = 2.4 \text{ Hz}$, $H_{4'}$); 3.85 (dd, 1H, $^2J_{H_{5'}-H_{5''}} = 11.3 \text{ Hz}$, $H_{5'}$); 3.74 (dd, 1H, $H_{5''}$); 2.24 (ddd, 1H, $^2J_{H_{2'}-H_{2''}} = 13.1 \text{ Hz}$, $H_{2'}$); 2.02 (ddd, 1H, $H_{2''}$); 1.91 (d, 3H, C_7); 0.98 (q, 6H, $^3J = 7.9 \text{ Hz}$, $Si(CH_2CH_3)_3$); 0.96 (q, 6H, $^3J = 7.9 \text{ Hz}$, $Si(CH_2CH_3)_3$); 0.65 (t, 9H, $Si(CH_2CH_3)_3$); 0.60 (t, 9H, $Si(CH_2CH_3)_3$)

^{13}C -NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 163.96 (1C, C_4); 153.32 (1C, C_2); 132.36 (1C, C_6); 88.68 (1C, $C_{3'}$); 111.23 (1C, C_5); 87.76 (1C, $C_{1'}$); 71.18 (1C, $C_{4'}$); 61.99 (1C, $C_{5'}$); 42.65 (1C, $C_{2'}$); 17.15 (1C, C_7); 6.75 (3C, $Si(CH_2CH_3)_3$); 6.69 (3C, $Si(CH_2CH_3)_3$); 4.68 (3C, $Si(CH_2CH_3)_3$); 4.29 (3C, $Si(CH_2CH_3)_3$)

IR (KBr) ν [cm^{-1}] = 3179, 3057, 2955, 2911, 2876, 2829, 2734, 2361, 2344, 2203, 1830, 1693, 1560, 1540, 1466, 1414, 169, 1322, 1310, 1275, 1242, 1197, 1103, 1065, 1031, 1014, 967, 940, 884, 580, 835, 807, 777, 744, 618, 558, 516, 491, 423

7.7.2 Darstellung von 3',5'-O-Bis(*tert*-butyldimethylsilyl)thymidin (39)

Methode A:

Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Es wurden 5 g (20.6 mmol, 242.23 g/mol) Thymidin **33** 2 mal mit je 10 mL trockenem Pyridin koevaporiert und in 60 mL trockenem *N,N*-Dimethylformamid gelöst. Zu dieser Lösung wurden nacheinander 3.65 g (53.6 mmol, 68.08 g/mol) Imidazol und 8.09 g (53.6 mmol, 150.72 g/mol) *Tert*butyldimethylchlorsilan gegeben. Nachdem die Reaktionslösung 24 h bei Raumtemperatur gerührt worden war, wurden 50 mL Methanol zum Abbruch der Reaktion hinzugegeben und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt, der Rückstand in 200 mL Dichlormethan aufgenommen und 2 mal mit je 100 mL destilliertem Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat

getrocknet, filtriert und eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanolgradienten (0-3 %) gereinigt.

Ausbeute: 7.95 g (14.3 mmol, 82 %)

Methode B:

Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeitsschluss durchgeführt. Es wurden 5.3 g (21.9 mmol, 242.23 g/mol) Thymidin **33** 2 mal mit je 10 mL trockenem Pyridin koevaporiert und in 200 mL trockenem Pyridin gelöst. Zu dieser Lösung wurden nacheinander 3.22 g (47.3 mmol, 68.08 g/mol) Imidazol und 7.33 g (48.6 mmol, 150.72 g/mol) Tertbutyldimethylchorsilan gegeben. Nachdem die Reaktionslösung einen Tag bei Raumtemperatur gerührt worden war, wurden zum Abbruch der Reaktion 50 mL destilliertes Wasser hinzugegeben und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 200 mL Dichlormethan aufgenommen und 2 mal mit je 100 mL destilliertem Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit einem Dichlormethan/Methanolgradienten (0-3 %) gereinigt.

Ausbeute: 9.78 g (20.8 mmol, 95 %)

farbloser Schaum

$C_{28}H_{54}N_2O_5Si_2 = 554.91 \text{ g/mol}$

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) R_f = 0.77

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 8.45 (s, 1H, NH); 7.47 (q; 1H, J_{H6-H7} = 1.1 Hz, H₆); 6.33 (dd, 1H, ³J_{H1'-H2'} = 5.8 Hz, ³J_{H1'-H2''} = 8.0 Hz, H_{1'}); 4.40 (ddd, 1H, ³J_{H3'-H2'} = 2.6 Hz, ³J_{H3'-H2''} = 2.6 Hz, ³J_{H3'-H4'} = 6.0 Hz, H_{3'}); 3.92 (ddd, 1H, ³J_{H4'-H5'} = 2.6 Hz, ³J_{H4'-H5''} = 2.4 Hz, H_{4'}); 3.87 (dd, 1H, ²J_{H5'-H5''} = 11.4 Hz, H_{5'}); 3.6 (dd, 1H, H_{5''}); 2.24 (ddd, 1H, ²J_{H2'-H2''} = 13.1 Hz, H_{2'}); 1.99 (ddd, 1H, H_{2''}); 1.91 (d, 3H, H₇); 0.93 (s, 9H, SiC(CH₃)₃); 0.89 (s, 9H, SiC(CH₃)₃); 0.11 (s, 3H, SiCH₃); 0.10 (s, 3H, SiCH₃); 0.08 (s, 3H, SiCH₃); 0.07 (s, 3H, SiCH₃);

¹³C-NMR (202 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 163.96 (1C, C₄); 150.35 (1C, C₂); 135.43 (1C, C₆); 110.80 (1C, C₅); 87.76 (1C, C_{4'}); 84.76 (1C, C_{1'}); 72.19 (1C, C_{3'}); 62.91 (1C, C_{5'});

41.34 (1C, C₂); 12.51 (1C, C₇); 25.88 (3C, SiC(CH₃)₃); 25.70 (3C, SiC(CH₃)₃); 18.35 (1C, SiC(CH₃)₃); 17.96 (1C, SiC(CH₃)₃); -4.68 (1C, SiCH₃); -4.89 (1C, SiCH₃); -5.42 (1C, SiCH₃); -5.50 (1C, SiCH₃);

IR (KBr) ν [cm⁻¹] = 3167, 3063, 2954, 2886, 2875, 2360, 2341, 1705, 1472, 1462, 1400, 1388, 1361, 1322, 1275, 1256, 1197, 1103, 1069, 1034, 1018, 1005, 968, 936, 921, 889, 834, 813, 776, 733, 672, 614, 560, 424

7.7.3 3',5'-O-Bis(triethylsilyl)-4-(1,2,4-triazol-1-yl)thymidin (40)

Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Es wurden 1.12 g (16.2 mmol, 69.1 g/mol) 1H-1,2,4-Triazol in 13 mL trockenem Acetonitril suspendiert und mit einer NaCl-Eis-Mischung auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Suspension wurden nacheinander langsam 0.35 mL (3.82 mmol, 0.586 g, 153.33 g/mol, 1.675 g/cm³) frisch destilliertes Phosphorylchlorid und 2.60 mL (65.1 mmol, 1.90 g, 101.19 g/mol, 0.78 g/cm³) trockenes Triethylamin gegeben. Diese Suspension wurde bei 0°C 60 min stark gerührt, wobei eine leichte Gelbfärbung eintrat. Separat wurde 510 mg (1.08 mmol, 470.57 g/mol) 3,5-O-Bis(triethylsilyl)thymidin **38** 2 mal mit je 5 mL trockenem Acetonitril koevaporiert und in 7 mL trockenem Actonitril gelöst. Diese Lösung wurde langsam über 10 min zu der Triazol-Phosphorylchlorid-Suspension gegeben. Nach 20 stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung filtriert und mit 100 mL Ethylacetat verdünnt und 2 mal nacheinander mit je 100 mL einer gesättigten wässrigen Natriumcarbonat-Lösung und gesättigten wässrigen Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingengt. Das zu ca. 95 % reine Rohprodukt wurde chromatographisch (Chromatotron, 1 mm Trennschicht) mit einem Dichlormethan/ Methanolgradienten (0-4 %) gereinigt.

Ausbeute: 480 mg (0.916 mol, 85%)

farblose Kristalle

C₂₄H₄₅N₅O₄Si₂ = 523.82 g/mol

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) R_f = 0.56

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.28 (s, 1H, Triazolid); 8.32 (d, 1H, ³J_{H6-H7} = 0.7 Hz, H₆); 8.11 (s, 1H, Triazolid); 6.30 (dd, 1H, ³J_{H1'-H2'} = 6.1 Hz, ³J_{H1'-H2''} = 6.1 Hz, H_{1'}); 4.40 (ddd, 1H, ³J_{H3'-H2''} = 6.1 Hz, ³J_{H3'-H2'} = 4.2 Hz, ³J_{H3'-H4'} = 3.4 Hz, H_{3'}); 4.05 (ddd, 1H, ³J_{H4'-H5'} = 2.6 Hz, ³J_{H4'-H5''} = 2.4 Hz, H_{4'}); 3.95 (dd, 1H, ²J_{H5'-H5''} = 11.4 Hz, H_{5'}); 3.79 (dd, 1H, H_{5''}); 2.45 (d, 3H, H₇); 2.63 (ddd, 1H, ²J_{H2'-H2''} = 13.4 Hz, H_{2'}); 2.11 (ddd, 1H, H_{2''}); 0.98 (t, 9H, ³J = 7.8 Hz, Si(CH₂CH₃)₃); 0.96 (t, 9H, ³J = 7.8 Hz, Si(CH₂CH₃)₃); 0.66 (q, 6H, Si(CH₂CH₃)₃); 0.61 (q, 6H, Si(CH₂CH₃)₃)

¹³C-NMR (202 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 158.03 (1C, C₄); 154.19 (1C, C₂); 153.35 (1C, C₅Triazol); 146.80 (1C, C₆); 145.06 (1C, C₃Triazol); 105.17 (1C, C₅); 89.12 (1C, C_{3'}); 88.12 (1C, C_{1'}); 62.43 (1C, C_{4'}); 62.43 (1C, C_{5'}); 43.09 (1C, C_{2'}); 17.59 (1C, C₇); 7.18 (3C, Si(CH₂CH₃)₃); 7.13 (3C, Si(CH₂CH₃)₃); 5.12 (3C, Si(CH₂CH₃)₃); 4.73 (3C, Si(CH₂CH₃)₃)

MS (FAB⁺) Matrix/MNBA: 522.4 (M+H)⁺

7.7.4 Darstellung von 3',5'-O-Bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-4-(1,2,4-triazol-1-yl)thymidin (41)

Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Es wurden 8.70 g (126 mmol, 69.1 g/mol) 1*H*-1,2,4-Triazol in 100 mL trockenem Acetonitril suspendiert und mit einer NaCl-Eis-Mischung auf 0°C gekühlt. Zu dieser Suspension wurden nacheinander langsam 2.66 mL (29.0 mmol, 4.45 g, 153.33 g/mol, 1.675 g/cm³) frischdestilliertes Phosphorylchlorid und 20.4 mL (126 mmol, 12.7 g, 101.19 g/mol, 0.78 g/cm³) trockenes Triethylamin gegeben. Diese Reaktionssuspension wurde bei 0°C über 30 min stark gerührt, wobei eine leichte Gelbfärbung eintrat. Separat wurde 3.90 g (8.20 mmol, 470.57 g/mol) 3',5'-O-Bis(*tert*-butyldimethyl)thymidin **39** 2 mal mit je 10 mL trockenem Acetonitril koevaporiert, in 50 mL trockenem Acetonitril gelöst und langsam über 15 min zu der Triazol-Phosphorylchlorid Suspension gegeben. Nach 24 stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung mit 200 mL Dichlormethan verdünnt und nacheinander mit je 200 mL einer gesättigten wässrigen Natriumcarbonat-Lösung und einer gesättigten wässrigen Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingengt. Das zu ca. 95 % reine Rohprodukt wurde chromatographisch

(Chromatotron, 4 mm Trennschicht) mit einem Dichlormethan/Methanolgradienten (0-5 %) gereinigt.

Ausbeute: 4.08 g (7.80 mmol, 95 %)

rötlicher Feststoff

$C_{24}H_{45}N_5O_4Si_2 = 523.82$ g/mol

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 v/v) $R_f = 0.82$

Schmp.: 97-98°C

Zersp.: 120-123 °C

1H -NMR (400 MHz, C_6D_6) δ [ppm] = 9.18 (s, 1H, Triazol); 8.01 (s, 1H, H_6); 7.86 (s, 1H, Triazol); 6.36 (dd, 1H, $^3J_{H1'-H2'} = 6.3$ Hz, $^3J_{H1'-H2''} = 6.3$ Hz, H_1'); 4.36 (ddd, 1H, $^3J_{H3'-H2'} = 4.0$ Hz, $^3J_{H3'-H2''} = 6.9$ Hz, $^3J_{H3'-H4'} = 2.5$ Hz, H_3'); 3.91 (ddd, 1H, $^3J_{H4'-H5'} = 2.8$ Hz, $^3J_{H4'-H5''} = 2.8$ Hz, H_4'); 3.66 (dd, 1H, $^3J_{H5'-H5''} = 11.5$ Hz, H_5'); 3.51 (dd, 1H, H_5''); 2.19 (s, 3H, H_7); 2.63 (ddd, 1H, $^3J_{H12'-H2''} = 13.5$ Hz, H_2'); 2.06 (ddd, 1H, H_2''); 0.92 (s, 9H, $Si(CH_3)_3$); 0.02 (s, 9H $Si(CH_3)_3$); 0.02 (s, 6H, $Si(CH_3)_2$); 0.01 (s, 6H, $Si(CH_3)_2$); 0.01 (s, 6H, $Si(CH_3)_2$)

^{13}C -NMR (202 MHz, C_6D_6) δ [ppm] = 157.97 (1C, C_4); 153.70 (1C, Triazol); 153.53 (1C, C_2); 145.96 (C, C_6); 145.34 (1C, Triazol); 104.23 (1C, C_5); 88.57 (1C, C_4'); 87.94 (1C C_1'); 71.86 (1C, C_3'); 62.65 (1C, C_5'); 42.69 (1C, C_2'); 26.00 (3C, $Si(CH_3)_3$); 25.89(3C, $Si(CH_3)_3$); 18.46 (1C, $Si(CH_3)_3$); 18.14 (1C, $Si(CH_3)_3$); 17.37 (1C, C_7); -4.49 (1C, $Si(CH_3)_2$); -4.85 (1C, $Si(CH_3)_2$); -5.41 (1C, $Si(CH_3)_2$); -5.43 (1C, $Si(CH_3)_2$)

7.7.5 Darstellung von *N*'-(3',5'-*O*-Bis(triethylsilyl)- β -*D*-2'-desoxyribosyl)-5-methylpyrimidin-2-on (44)

Nach SINGELTON^[82]:

Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeits- und Sauerstoffausschluss durchgeführt. Es wurden 10.2 g (19.6 mmol, 523.82 g/mol) 3',5'-*O*-Bis(triethylsilyl)-4-(1,2,4-triazol-1-yl)thymidin **40** zweimal mit je 10 mL trockenem Toluol koevaporiert und in 200 mL trockenem und entgastem 1,4-Dioxan gelöst. Zu dieser Lösung wurden 1.24 mL (39 mmol, 1.25 g, 1.01 g/cm³) wasserfreies Hydrazin langsam hinzugegeben und eine

Stunde bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung bis fast zur Trockene eingengt, der Rückstand in 200 mL trockenem und entgastem 1,4-Dioxan aufgenommen und auf 60 °C erwärmt. 4.1 g (23.4 mmol, 175.14 g/mol) PTAD **37** wurden 2 mal mit je 5 mL trockenem Toluol koevaporiert und in 60 mL trockenem und entgastem 1,4-Dioxan gelöst. Die PTAD-Lösung wurde bei 60 °C zu der obigen Reaktionslösung langsam über 30 Minuten hinzugegeben, wobei sich die PTAD-Lösung unter leichter Gasentwicklung entfärbte. Nach vollständiger Zugabe der PTAD-Lösung wurde die Reaktionslösung eine weitere Stunde bei 60 °C gerührt. Nachdem das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt worden war, wurde das Rohprodukt chromatographisch (Chromatotron, 2 mm Trennschicht) mit einem Dichlormethan/Methanolgradienten (0-1 %) gereinigt, wobei dem Eluenten 1 % Triethylamin beigegeben worden war.

Ausbeute: 2.25 g (4.95 mmol, 25%)

$C_{22}H_{42}N_2O_4Si_2 = 454.75 \text{ g/mol}$

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 v/v) $R_f = 0.81$

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 8.43 (d, 1H, $^4J_{H4-H6} = 3 \text{ Hz}$, H_4); 8.11 (dd, 1H, $^3J_{H6-H7} = 0.8 \text{ Hz}$, H_6); 6.23 (dd, 1H, $^3J_{H1'-H2'} = 6.2 \text{ Hz}$, $^3J_{H1'-H2''} = 6.1 \text{ Hz}$, $H_{1'}$); 4.37 (ddd, 1H, $^3J_{H3'-H2''} = 6.2 \text{ Hz}$, $^3J_{H3'-H2'} = 4.3 \text{ Hz}$, $^3J_{H3'-H4'} = 4.2 \text{ Hz}$, $H_{3'}$); 4.01 (ddd, 1H, $^3J_{H4'-H5'} = 2.7 \text{ Hz}$, $^3J_{H4'-H5''} = 2.6 \text{ Hz}$, $H_{4'}$); 3.92 (dd, 1H, $^5J_{H5'-H5''} = 11.4 \text{ Hz}$, $H_{5'}$); 3.77 (dd, 1H, $J = 11.4 \text{ Hz}$, $H_{5''}$); 2.60 (ddd, 1H, $^2J_{H2'-H2''} = 13.5 \text{ Hz}$, $H_{2'}$); 2.11 (d, 3H, $J = 0.7 \text{ Hz}$, H_7); 2.06 (ddd, 1H, $H_{2''}$); 0.97 (t, 9H, $^3J = 7.9 \text{ Hz}$, $Si(CH_2CH_3)_3$); 0.94 (t, 9H, $^3J = 7.9 \text{ Hz}$, $Si(CH_2CH_3)_3$); 0.64 (q, 6H, $Si(CH_2CH_3)_3$); 0.59 (q, 6H, $Si(CH_2CH_3)_3$)

^{13}C -NMR (202 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 167.77 (1C, C_4); 155.57 (1C, C_2); 141.39 (1C, C_6); 112.33 (1C, C_5); 88.75 (1C, C_4'); 87.83 (1C, C_1'); 71.36 (1C, C_3'); 62.29 (1C, C_5'); 42.93 (1C, C_2'); 14.85 (1C, C_7); 7.13 (9C, $Si(CH_2CH_3)_3$); 7.09 (9C, $Si(CH_2CH_3)_3$); 5.08 (6C, $Si(CH_2CH_3)_3$); 4.68 (6C, $Si(CH_2CH_3)_3$)

7.7.6 Darstellung von *N*-(3',5'-*O*-Bis(*tert*-butyldimethylsilyl)- β -*D*-2'-desoxy-ribose)-5-methylpyrimidin-2-on **45**

Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeits-, Sauerstoff- und Lichtausschluss durchgeführt. Es wurden 1.30 g (2.48 mmol, 523.82 g/mol) 3',5'-*O*-Bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-4-(1,2,4-triazol-1-yl)thymidin **41** zweimal mit je 5 mL trockenem Toluol koevaporiert und in 100 mL trockenem und entgastem 1,4-Dioxan gelöst. Die Lösung wurde solange unter Vakuum eingeengt, bis sie bei 8 °C anfang zu erstarren. Zu dieser Lösung wurden 5 mL (5.0 mmol) einer 1M Hydrazinlösung in THF langsam über 5 Minuten hinzugegeben und eine Stunde bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung bis fast zur Trockene eingeengt um nicht umgesetztes Hydrazin zu entfernen. Der Rückstand wurde in 100 mL trockenem und entgastem 1,4-Dioxan aufgenommen und auf 60 °C erwärmt. 876 mg (5.0 mmol, 175.14 g/mol) PTAD **37** (selbst hergestellt) wurden 2 mal mit je 5 mL trockenem Toluol koevaporiert und in 60 mL trockenem und entgastem 1,4-Dioxan gelöst. Die PTAD-Lösung wurde bei 60 °C zu der obigen Reaktionslösung über 30 Minuten hinzugegeben, wobei sich die PTAD-Lösung unter leichter Gasentwicklung entfärbte. Nach vollständiger Zugabe der PTAD-Lösung wurde die Reaktionslösung eine weitere Stunde bei 60 °C gerührt. Nachdem das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt worden war, wurde das Rohprodukt chromatographisch (Chromatotron, 2 mm Trennschicht) mit einem Dichlormethan/Methanolgradienten (0-1 %) gereinigt, wobei dem Eluenten 1 % Triethylamin beigelegt worden war.

Ausbeute: 641 mg (1.41 mmol, 57 %)

DC (Ethylacetat/Petrolether(60/70) 1:1 v/v) $R_f = 0.81$

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 8.43 (dd, 1H, ³J_{H6-H7} = 0.7 Hz, ³J_{H6-H7} = 3.3 Hz, H₆); 8.03 (dd, 1H, ³J_{H6-H7} = 0.9 Hz, H₄); 6.23 (dd, 1H, ³J_{H1'-H2'} = 6.3 Hz, ³J_{H1'-H2''} = 6.3 Hz, H_{1'}); 4.36 (ddd, 1H, ³J_{H3'-H2''} = 6.3 Hz, ³J_{H3'-H4'} = 3.8 Hz, ³J_{25'-H2''} = 3.8 Hz, H_{3'}); 4.01 (ddd, 1H, H_{4'}); 3.96 (dd, 1H, ²J_{H5'-H75''} = 11.5 Hz, ³J_{H5'-H4'} = 2.7 Hz, H_{5'}); 3.77 (dd, 1H, ³J_{H5''-H4'} = 2.5 Hz, H_{5''}); 2.60 (ddd, 1H, ²J_{H2'-H2''} = 13.5 Hz, H_{2'}); 2.03 (dd, 3H, H₇); 2.02 (ddd, 1H, H_{2''}); 0.90 (s, 9H, SiC(CH₃)₃); 0.88 (s, 9H, SiC(CH₃)₃); 0.10 (s, 3H, Si(CH₃)₂); 0.09 (s, 3H, Si(CH₃)₂); 0.07 (s, 3H, Si(CH₃)₂); 0.06 (s, 3H, Si(CH₃)₂);

$^{13}\text{C-NMR}$ (202 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 153.79 (1C, C_4); 147.02 (C, C_2); 145.51 (1C, C_6); 105.69 (1C, C_5); 89.20 (1C, C_4'); 88.24 (1C, C_1'); 72.10 (1C, C_3'); 63.03 (1C, C_5'); 43.05 (1C, C_2'); 26.34 (3C, $\text{SiC}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 26.16 (3C, $\text{SiC}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 18.83 (1C; $\text{SiC}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 18.42 (1C; $\text{SiC}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 17.66 (1C, C_7); -4.17 (1C; $\text{Si}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$); -4.46 (1C; $\text{Si}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$); -4.63 (1C; $\text{Si}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$); -4.87 (1C; $\text{Si}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$):

7.7.7 Darstellung von *N*¹-(β -D-2'-Desoxyribosyl)-5-methylpyrimidin-2-on (*m*⁵K) (**29**)

Ausgehend von 3',5'-O-Bis(triethylsilyl)-*N*¹-(β -D-2'-Desoxyribosyl)-5-methylpyrimidin-2-on **44**

Methode A: Synthesevorschrift nach SINGELTON^[82]

In einem Kunststoffgefäß wurden 2.24 g (4.76 mmol, 454.75 g/mol) 3',5'-O-Bis(triethylsilyl)-*N*¹-(β -D-2'-Desoxyribosyl)-5-methylpyrimidin-2-on **44** in 22.5 mL einer Mischung aus Essigsäure, Tetrahydrofuran und Wasser (4:4:1, v/v/v) gelöst, wobei sich die Lösung leicht gelb färbte. Nach dem die Reaktionslösung 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt worden war, wurde sie vorsichtig mit einer gesättigten wässrigen Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutralisiert. Anschließend wurde die Suspension mit 50 mL destilliertem Wasser verdünnt und zweimal mit je 70 mL Diethylether gewaschen. Die wässrige Phase wurde eingeeengt (Gefriertrocknung) und dreimal mit je 50 mL einer Mischung aus Dichlormethan und Methanol (1:1, v/v) extrahiert. Nachdem das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt worden war, wurde das erhaltene Rohprodukt chromatographisch (Chromatotron, 2 mm Trennschicht) mit einem Dichlormethan/Methanolgradienten (0-10%) gereinigt.

Ausbeute: 495 mg (2.18 mmol, 46 %)

Methode B:

In einem Kunststoffgefäß wurden 410 mg (0.871 mmol, 470.57 g/mol) 3',5'-O-Bis(triethylsilyl)-*N*¹-(β -D-2'-desoxyribosyl)-5-methylpyrimidin-2-on **44** in Methanol gelöst. Es wurden vier Äquivalente 0.4 mL (3.48 mmol) Triethylamintrihydrofluorid unter Rühren zugetropft. Die Reaktionslösung wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur

gerührt. Anschließend wurden erst 6 Tropfen Wasser, dann 0.2 mL Triethylamin und eine halber Teelöffel Kieselgel zugegeben und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde filtriert und der Kieselgelrückstand mit Methanol gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt und das Rohprodukt zweimal chromatographisch (Chromatotron, 1 mm Trennschicht) mit einem Dichlormethan/Methanolgradienten (0-10 %) gereinigt

Ausbeute: 110 mg (0.486 mmol, 56 %)

Ausgehend von 3',5'-O-Bis(tertbutyldimethylsilyl)-N¹-(β-D-2'-Desoxyriboseyl)-5-methylpyrimidin-2-on **45**

In einem Kunststoffgefäß wurden zu einer Lösung von 565 mg (1.20 mmol, 470.57 g/mol) 3',5'-O-Bis(tertbutyldimethylsilyl)-N¹-(β-D-2'-Desoxyriboseyl)-5-methylpyrimidin-2-on **45** in 5 mL Tetrahydrofuran 3 mL (3.0 mmol) einer 1 molaren Lösung von Tetrabutylammoniumfluorid in Tetrahydrofuran gegeben. Nachdem diese Lösung eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt worden war, wurde sie unter Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wurde zweifach chromatographisch (Chromatotron, 1 mm Trennschicht) mit einem Dichlormethan/Methanolgradienten (0-10 %) gereinigt

Ausbeute: 271 mg (1.20 mmol, quantitativ)

gelblicher Feststoff

$C_{10}H_{14}N_2O_4 = 226.23 \text{ g/mol}$

DC (CH₂Cl₂/MeOH 7:3 v/v) R_f = 0.59

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 8.45 (d, 1H, ⁴J_{H4-H6} = 3.2 Hz, H₄) 8.25 (dd, 1H, ⁴J_{H6-H7} = 0.8 Hz, H₆) 6.06 (dd, H, ³J_{H1'-H2'} = 6.3 Hz, ³J_{H1'-H2''} = 6.3 Hz, H_{1'}); 5.30 (d, 1H, ³J_{3'-OH-H3'} = 4.3 Hz, 3'-OH); 5.13 (dd, 1H, ³J_{5'-OH-H5'} = 5.2 Hz, ³J_{5'-OH-H5''} = 5.2 Hz, 5'-OH); 3.87 (ddd, 1H, ³J_{H4'-H5'} = 3.8 Hz, ³J_{H4'-H5''} = 3.2 Hz, ³J_{H4'-H3'} = 4.2 Hz, H_{3'}); 4.22 (dddd, H, ³J_{H3'-H2'} = 4.2 Hz, ³J_{H3'-H2''} = 4.8 Hz, H_{4'}); 3.66 (ddd, 1H, ²J_{H5'-H5''} = 11.9 Hz, H_{5'}); 3.58 (ddd, 1H, H_{5''}); 2.32 (ddd, 1H, ²J_{H2'-H2''} = 13.4 Hz, H_{2'}); 2.13 (ddd, 1, H_{2''}); 2.04 (d, 3H, H₇)

¹³C-NMR (202 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 167.48 (1C, C₄); 154.30 (1C, C₂); 141.58 (1C, C₆); 112.16 (1C, C₅); 87.94 (1C, C_{4'}); 86.44 (1C, C_{1'}); 69.61 (1C, C_{3'}); 60.67 (1C, C_{5'}); 40.92 (1C, C_{2'}); 13.77 (1C, C₇);

MS (FAB⁺) Matrix/MNBA: 227.2 [M+H⁺]⁺

7.7.8 Darstellung von *N*'-(5'-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- β -D-2'-desoxy-riboseyl)-5-methylpyrimidin-2-on **46**

Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Es wurden 265 mg (0.117 mmol, 226.23 g/mol) *N*'-(β -D-2'-Desoxyriboseyl)-5-methyl-pyrimidin-2-on (m⁵k) **29** 2 mal mit je 5 mL trockenem Pyridin koevaporiert und in 10 mL trockenem Pyridin gelöst. Zu dieser Lösung wurden nacheinander 515 mg (1.52 mmol, 338.83 g/mol) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid, 11 mg (0.1 mmol, 122.17 g/mol) DMAP und 156 mg (1.54 mmol, 0.21 mL, 0.73 g/cm³) trockenes Triethylamin gegeben. Nachdem die Reaktionslösung 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt worden war, wurden 5 mL Methanol zum Abbruch der Reaktion hinzugegeben und weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung unter Vakuum eingeeengt, der Rückstand in 20 mL Dichlormethan aufgenommen, einmal mit 15 mL destilliertem Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt worden war, wurde das Rohprodukt chromatographisch (Chromatotron, 1 mm Trennschicht) mit einem Dichlormethan/Methanolgradienten (0-4 %) gereinigt, wobei dem Eluenten 1 % Triethylamin beigelegt worden war.

Ausbeute: 520 mg (0.983 mmol, 84%)

farbloses Öl

C₃₁H₃₂N₂O₆ = 528.60 g/mol

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) R_f = 0.77

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 8.41 (d, 1H, ³J_{H4-H6} = 3.0 Hz, H₄); 8.14 (dd, 1H, ³J_{H6-H7} = 0.6 Hz, H₆); 7.39-7.32 (m, 9H, DMTr); 6.84-6.81 (m, 4H, DMTr); 6.27 (dd, 1H, ³J_{H1'-H2'} = 6.1 Hz, ³J_{H1'-H2''} = 6.1 Hz, H_{1'}); 4.54 (ddd, 1H, ³J_{H3'-H2'} = 4.5 Hz, ³J_{H3'-H2''} = 6.1 Hz, ³J_{H3'-H4'} = 4.3 Hz, H_{3'}); 4.16 (ddd, 1H, ³J_{H4'-H5'} = 3.2 Hz, ³J_{H4'-H5''} = 3.3 Hz, H_{4'}); 3.79 (s, 6H, OCH₃); 3.52 (dd, 1H, ³J_{H5'-H5''} = 10.7 Hz, H_{5'}); 3.39 (dd, 1H, H_{5''}); 2.68 (ddd, 1H, ³J_{H2'-H2''} = 13.9 Hz, H_{2'}); 2.32 (ddd, 1H, H_{2''}); 2.17(d, 3H, C₇);

¹³C-NMR (202 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 167.54 (1C, C₄) 146.64 (C, C₆); 130.02 (Ar); 18,04 (Ar); 128.00 (Ar); 113.30 (1C, C₅) 87.38 (1C, C_{4'}); 86.52 (1C, C_{1'}) 71.52 (1C, C_{3'}); 62.92 (1C, C_{5'}); 42.08 (1C, C_{2'}); 13.95 (1C, C₇);

7.7.9 Darstellung von *N'*-(3'-(2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminophosphino)-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-β-*D*-2'-desoxyribosyl)-5-methylpyrimidin-2-on (31)

Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Es wurden 80 mg (0.151 mmol, 528.60 g/mol) 5'-*O*-(4,4'-Dimethyltriphenylmethyl)-*N'*-(β-*D*-2'-desoxyribosyl)-5-methylpyrimidin-2-on **46** zweimal mit je 5 mL trockenem Acetonitril koevaporiert und in 10 mL trockenem Acetonitril gelöst. Anschließend wurden 68.1 mg (0.23 mmol, 301.41 g/mol) (2-Cyanoethoxy)bis(*N,N*-diisopropylamino)-phosphin **67** und 0.92 mL (0.211 mmol) einer 0.23 molaren 4,5-Dicyanoimidazol-Lösung in trockenem THF hinzugegeben und 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 30 mL Dichlormethan verdünnt und 2 mal mit je 20 mL 5 %iger wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch an Alox (neutral, Aktivitätsstufe 3) mit einem Dichlormethan/Methanolgradienten (0-4%), dem 1 % Triethylamin zugesetzt war, gereinigt.

Ausbeute: 110 mg (0.103 mmol, 85 %)

leicht gelbliches Öl

C₄₀H₄₉N₄O₇P = 728.81 g/mol

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) Produkt R_f = 0.75

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) Nebenprodukt: *H*-Phosphonat R_f = 0.60

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆) δ [ppm] = 8.33 (dd, 1H, ³J_{H4-CH3} = 1.1 Hz, ³J_{H4-H6} = 0.8 Hz, H₄); 8.32 (d, 1H, ³J_{H4-CH3} = 1.2 Hz, H₄); 8.14 (dd, 1H, ³J_{H6-CH3} = 3.2 Hz, H₆); 8.08 (dd, 1H, ³J_{H6-CH3} = 3.3 Hz, H₆); 7.36-7.30 (m, 18H, DMTr A+B); 6.70-6.80 (m, 8H, DMTr A+B); 6.29 (dd, 1H, ³J_{H1'-H2'} = 6,2 Hz, ³J_{H1'-H2''} = 6,7 Hz, H_{1'A}); 6.24 (dd, 1H, ³J_{H1'-H2''} = 6.2 Hz, ³J_{H1'-H2'} = 6.1 Hz, H_{1'B}); 4.63 (ddd, 1H, ³J_{H3'-H2'} = 4.7 Hz, ³J_{H3'-H2''} = 6.6 Hz, ³J_{H3'-H4'} = 5.5 Hz, H_{3'A}); 4.61 (ddd, 1H, ³J_{H3'-H2''} = 6.6 Hz, ³J_{H3'-H2'} = 3.0 Hz, ³J_{H3'-H4'} =

6.0 Hz, H₃B); 4.23 (ddd, 1H, ³J_{H4'-H5'} = 5.0 Hz, ³J_{H4'-H5''} = 3.2 Hz, H₄A); 4.20 (ddd, 1H, ³J_{H4'-H5'} = 4.9 Hz, ³J_{H4'-H5''} = 3.3 Hz, H₄B); 3.79 (s, 3H, OCH₃); 3.78 (s, 3H, OCH₃); 3.74 (t, 2H, ³J = 6.1 Hz, POCH₂CH₂CN); 3.69 (t, 2H, ³J = 6.1 Hz, POCH₂CH₂CN); 3.58 (dd, 1H, ³J_{H5'-H5''} = 10.6 Hz, H₅B); 3.57 (t, 2H, POCH₂CH₂CN); 3.55 (t, 2H, POCH₂CH₂CN); 3.52 (dd, 1H, ³J_{H5'-H5''} = 10.6 Hz, H₅A); 3.32 (dd, 1H, H₅B); 3.27 (dd, 1H, H₅A); 2.76 (ddd, 1H, ³J_{H2'-H2''} = 14.5 Hz, H₂A); 2.69 (ddd, 1H, ³J_{H2'-H2''} = 13.0 Hz, H₂B); 2.60 (dd, 3H, ³J = 6.3 Hz, ³J = 6.3 Hz, N(CH(CH₃)₂)₂); 2.40 (dd, 3H, ³J = 6.4 Hz, ³J = 6.4 Hz, N(CH(CH₃)₂)₂); 2.34 (ddd, 1H, H₂B); 2.33 (ddd, 1H, H₂A); 1.65 (d, 3H, H₇); 1.63 (d, 3H, H₇); 1.16 (d, 3H, N(CH(CH₃)₂)₂); 1.15 (d, 3H, N(CH(CH₃)₂)₂); 1.14 (d, 3H, N(CH(CH₃)₂)₂); 1.04 (d, 3H, N(CH(CH₃)₂)₂)

¹³C-NMR (202 MHz, C₆D₆) δ [ppm] = 168.25 (1C, C₄); 168.00 (1C, C₄); 154.65 (1C, C₂); 150.45 (1C, C₂); 144.34 (1C, C₅); 146.68 (1C, C₅); 141.64 (1C, C₆); 141.39 (1C, C₆); 130.58-130.51 (16C, Trityl); 128.63-128.38 (8C, Trityl); 89.12 (1C, C₄B); 88.20 (1C, C₄A); 86.39 (1C, C₁A); 86.23 (1C, C₁B); 73.41 (1C, C₃B); 73.24 (1C, C₃A); 72.59 (1C, CO-Trityl); 72.42 (1C, CO-Trityl); 68.34 (2C, C₅A+B); 68.22 (2C, C₅A+B); 64.45 (1C, OCH₂CH₂CN); 64.23 (1C, OCH₂CH₂CN); 63.76 (1C, POCH₂CH₂CN); 63.67 (1C, POCH₂CH₂CN); 55.69 (1C, OCH₃); 55.56 (1C, OCH₃); 43.79 (1C, C₂A); 43.71 (1C, C₂B); 43.67 (1C, C₂B); 43.59 (1C, C₂A); 25.6 (1C, N(CH(CH₃)₂)₂); 24.99 (1C, N(CH(CH₃)₂)₂); 24.92 (1C, N(CH(CH₃)₂)₂); 24.89 (1C, N(CH(CH₃)₂)₂); 20.34 (1C, N(CH(CH₃)₂)₂); 20.22 (1C, N(CH(CH₃)₂)₂); 14.23 (1C, C₇); 14.21 (1C, C₇)

³¹P-NMR (MHz, C₆D₆) δ [ppm] = 150.6 (ddt); 149.9 (ddt)

7.7.10 Darstellung von 3',5'-O-Bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-4-*N,N*-dimethylhydrazinylthymidin (43)

Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Es wurden 276 mg (0.527 mmol, 523.82 g/mol) 3',5'-O-Bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-4-(1,2,4-triazol-1-yl)-thymidin **41** 2 mal mit je 5 mL trockenem Acetonitril koevaporiert und in 6 mL trockenem und entgastem 1,4-Dioxan gelöst. Diese Lösung wurde solange unter Vakuum eingengt, bis sie bei 8°C erstarrte. Nach Auftauen der Lösung wurden langsam 1.05 mL (1.05 mmol) einer 1 molaren Hydrazin-Lösung in trockenem THF über 5 Minuten hinzugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt.

Nachdem die Reaktionslösung bis fast zur Trockene eingengt worden war, um nichtumgesetztes Hydrazin zu entfernen, wurde der Rückstand in 30 mL trockenem 1,4-Dioxan aufgenommen. Zu dieser Lösung wurden 0.872 mL (14.0 mmol, 1.98 g, 141.94 g/mol, 2.27 g/cm³) Methyljodid hinzugegeben und diese über 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zum Abbruch der Reaktion durch Hydrolyse des Methyljodids wurden 40 mL einer wässrigen 5 %igen NaHCO₃-Lösung hinzugegeben und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem die Reaktionslösung mit 50 mL Dichlormethan verdünnt worden war, wurde die organische Phase abgetrennt, zweimal mit je 50 mL destilliertem Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingengt. Das Rohprodukt wurde chromatographisch (Chromatotron, 2 mm Trennschicht) und einem Dichlormethan/Methanolgradienten (0-5%) gereinigt.

Ausbeute: 238 mg (0.464 mmol, 88 %)

leicht gelblicher Schaum

C₂₄H₄₈N₄O₄Si₂ = 512.83 g/mol

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) R_f = 0.54

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆) δ [ppm] = 9.13 (s, 1H, NH); 6.82 (d, 1H, ³J_{H6-H7} = 1.2 Hz, H₆); 6.63 (dd, 1H, ³J_{H1'-H2'} = 6.2 Hz, ³J_{H1'-H2''} = 7.8 Hz, H_{1'}); 4.39 (ddd, 1H, ³J_{H3'-H4'} = 2.7 Hz, ³J_{H3'-H2'} = 3.1 Hz, ³J_{H3'-H2''} = 6.6 Hz, H_{3'}); 3.81 (ddd, 1H, ³J_{H4'-H5'} = 3.1 Hz, ³J_{H4'-H5''} = 3.1 Hz, H_{4'}); 3.64 (dd, 1H, ²J_{H5'-H5''} = 11.2 Hz, H_{5'}); 3.53 (dd, 1H, 2.8 Hz, H_{5''}); 2.12 (s, 6H, N(CH₃)₂); 2.01 (ddd, 1H, ³J_{H2'-H2''} = 13.1 Hz, H_{2'}); 1.93 (d, 3H, H₇); 1.92 (ddd, 1H, H_{2''}); 1.91 (s, 9H, SiC(CH₃)₃A); 0.88 (s, 9H, SiC(CH₃)₃B); 0.02 (s, 3H, SiCH₃); 0.01 (s, 3H, SiCH₃); -0.01 (s, 3H, SiCH₃); -0.03 (s, 3H, SiCH₃)

¹³C-NMR (202 MHz, C₆D₆) δ [ppm] = 151.02 (1C, C₄); 149.50 (1C, C₂); 108.77 (1C, C₅); 129.02 (1C, C₆); 87.10 (1C, C_{4'}); 84.50 (1C, C_{1'}); 72.45 (1C, C_{3'}); 63.90 (1C, C_{5'}); 46.80 (2C, N(CH₃)₂); 40.56 (1C, C_{2'}); 26.06 (3C, SiC(CH₃)₃); 25.94 (3C, SiC(CH₃)₃); 18.49 (1C, SiC); 18.17 (1C, SiC); 13.39 (1C, C₇); -4.59 (1C, Si(CH₃)₂); -4.75 (1C, Si(CH₃)₂); -5.33 (1C, Si(CH₃)₂); -5.47 (1C, Si(CH₃)₂)

7.7.11 Darstellung von 3',5'-O-Bis(triethylsilyl)-4-N',N'-dimethylhydrazinylthymidin (42)

Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Es wurden 1 g (1.91 mmol, 523.82 g/mol) 3',5'-O-Bis(triethylsilyl)-4-(1,2,4-triazol-1-yl)thymidin **40** 2 mal mit je 5 mL trockenem Acetonitril koevaporiert und in 5 mL trockenem 1,4-Dioxan gelöst. Diese Lösung wurde solange unter Vakuum eingeeengt bis sie bei 8°C erstarrte. Nach Auftauen der Lösung wurden langsam 4.2 mL (4.20 mmol) einer 1M Hydrazin-Lösung in trockenem THF über 5 Minuten hinzugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung bis fast zur Trockene eingeeengt, um nichtumgesetztes Hydrazin zu entfernen, und der Rückstand in 20 mL trockenem 1,4-Dioxan aufgenommen. Zu dieser Lösung wurden 2 mL (32.0 mmol, 141.94 g/mol, 2.27 g/cm³) Methyljodid hinzugegeben und über 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zum Abbruch der Reaktion durch Hydrolyse des Methyljodids wurden 40 mL einer wässrigen 5 %igen NaHCO₃-Lösung hinzugegeben und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem die Reaktionslösung mit 50 mL Dichlormethan verdünnt worden war, wurde die organische Phase abgetrennt, zweimal mit je 50 mL destilliertem Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Die Aufreinigung des als gelbliches Öl anfallenden Rohprodukts erfolgte chromatographisch (Chromatotron, 2 mm Trennschicht). Als Eluent diente Dichlormethan mit einem Methanolgradienten (0-5%).

Ausbeute: 543 mg (1.05 mmol, 55 %)

leicht gelblicher Schaum

C₂₄H₄₈N₄O₄Si₂ = 512.83 g/mol

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) R_f = 0.56

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.34 (d, 1H, ³J_{H6-7'} = 1.0 Hz, H₆); 6.52 (dd, 1H, ³J_{H1'-H2'} = 5.4 Hz, ³J_{H1'-H2''} = 8.1 Hz, H_{1'}); 4.55 (ddd, ³J_{H3'-H2'} = 2.9 Hz, ³J_{H3'-H4'} = 3.0 Hz, ³J_{H3'-H2''} = 5.6 Hz, H_{3'}); 4.06 (ddd, 1H, ³J_{H4'-H5'} = 2.9 Hz, ³J_{H4'-H5''} = 2.6 Hz, H_{4'}); 3.97 (dd, 1H, ³J_{H15'-H5''} = 11.2 Hz, H_{5'}); 3.89 (dd, 1H, H_{5''}); 3.67 (s, 1H, NH); 2.59 (s, 6H, N(CH₃)₂); 2.29 (ddd, 1H, ²J_{H2'-H2''} = 13.3 Hz, H_{2'}); 2.18 (8ddd, 1H, H_{2''}); 2.06 (d, 3, H₇); 1.14 (t, 9H, ³J = 8.0 Hz, Si(CH₂CH₃)₃); 1.11 (t, 9H, ³J = 8.0 Hz, Si(CH₂CH₃)₃); 0.81 (q, 6H, Si(CH₂CH₃)₃); 0.76 (q, 6H, Si(CH₂CH₃)₃)

$^{13}\text{C-NMR}$ (202 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 151.41 (1C, C₄); 149.22 (1C, C₂), 129.44 (1C, C₆); 107.95 (1C, C₅); 87.50 (1C, C_{4'}); 84.12 (1C, H_{1'}); 62.69 (1C, C_{5'}); 46.67 (2C, N(CH₃)₂); 40.58 (1C, C_{2'}); 6.71 (3C, Si(CH₂CH₃)₃); 6.67 (3C, Si(CH₂CH₃)₃); 4.68 (3C, Si(CH₂CH₃)₃); 4.26 (3C, Si(CH₂CH₃)₃)

7.7.12 Darstellung von 4-*N',N'*-dimethylhydrazinylthymidin (62)

Methode A:

Die Reaktion wurde in einem Kunststoffgefäß durchgeführt. Zu einer Lösung von 120 mg (0.233 mmol, 512.83 g/mol) *N'*-(3',5'-*O*-Bis(triethylsilyl)- β -*D*-2'-desoxyribosyl)-4-(*N',N'*-dimethylhydrazinyl)-5-methylpyrimidin-2-on **42** in 10 mL THF wurden 0.45 mL (0.45 mmol) einer 1 molaren Lösung von Tetrabutylammoniumfluorid in THF gegeben. Nachdem die Reaktionslösung 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt worden war, wurde sie unter Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wurde chromatographisch (Chromatotron, 1 mm Trennschicht) mit einem Dichlormethan/Methanolgradienten (0-10%) gereinigt.

Ausbeute: 30 mg (0.105 mmol, 45 %)

farblose Substanz

$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_4 = 284.31 \text{ g/mol}$

Methode B:

Die Reaktion wurde in einem Kunststoffgefäß durchgeführt. Zu einer Lösung von 620 mg (1.21 mmol, 512.83 g/mol) *N'*-(3',5'-*O*-Bis(triethylsilyl)- β -*D*-2'-desoxyribosyl)-4-(*N',N'*-dimethylhydrazinyl)-5-methylpyrimidin-2-on **42** in 10 mL Methanol wurden 300 mg (8.10 mmol, 37.04 g/mol) Ammoniumfluorid gegeben. Nachdem die Reaktionslösung eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt worden war, wurden 5 g Kieselgel hinzugegeben und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Das Kieselgel wurde abfiltriert und mit Methanol gewaschen. Nachdem das Filtrat eingengt worden war, wurde das Rohprodukt chromatographisch (Chromatotron, 1 mm Trennschicht) mit einem Dichlormethan/Methanolgradienten (0-10%) gereinigt.

Ausbeute: 254 mg (0.893 mmol, 74 %)

DC (CH₂Cl₂/MeOH 7:3 v/v) R_f = 0.32

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 7.32(s, 1H, NH); 7.32 (s, 1H, H₆); 6.15 (dd, 1H, ³J_{H1'-H2'} = 6.2 Hz, ³J_{H1'-H2''} = 6.2 Hz, H_{1'}); 5.18 (s, 1H, OH); 4.95 (s, 1H, OH); 4.21 (ddd, 1H, ³J_{H3'-H2'} = 7.8 Hz, ³J_{H3'-H2''} = 2.9 Hz, J_{H3'-H4'} = 2.9 Hz, H_{3'}); 3.72 (ddd, 1H, ³J_{H4'-H5'} = 4.3 Hz, ³J_{H4'-H5''} = 4.3 Hz, H_{4'}); 3.56 (ddd, 1H, ²J_{H5'-OH} = 1.5 Hz, ³J_{H5'-H5''} = 11,7 Hz, H_{5'}); 3.51 (ddd, 1H, ²J_{H5''-OH} = 1.5 Hz, H_{5''}); 3.17 (s, 1H, NH); 2.38 (s, 6H, N(CH₃)₂); 2.03 (ddd, 1H, ³J_{H2'-H2''} = 13.4 Hz, H_{2'}); 1.98 (ddd, 1H, H_{2''}); 1.76 (s, 3H, H₇)

¹³C-NMR (202 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 106.94 (1C, C₄); 86.87 (1C, C_{4'}); 83.37 (1C, C_{1'}); 70.52 (1C, C_{3'}); 61.45 (1C, C_{5'}); 46.50 (2C, N(CH₃)₂); 45.67 (1C, C_{2'}); 38.34 (1C, C_{3''}); 12.99 (1C, C₇)

7.7.13 Charakterisierung von von *N,N*-Bis(3',5'-*O*-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N'*-(β-*D*-2'-Desoxyribosyl)-5-methylpyrimidin-2-on-4-yl)hydrazin (60)

farblose Substanz

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) R_f = 0.90

¹H-NMR (400 MHz CDCl₃): δ[ppm] = 9.07 (s, 2H, NH), 6.89 (d, ⁴J_{6,CH3} = 1.3 Hz, 2H, H₆), 6.33 (dd, ³J_{1',2'} = 6.1 Hz, ³J_{1',2''} = 7.9 Hz, 2H, H_{1'}), 4.39 (ddd, ³J_{2',3'} = 2.5 Hz, ³J_{2'',3'} = 6.1 Hz, ³J_{H3'-H4'} = 2.5 Hz, 2H, H_{3'}), 3.86 (ddd, ³J_{H4'-H5'} = 2.5 Hz, ³J_{H4'-H5''} = 2.5 Hz, 2H, H_{4'}), 3.81 (dd, ²J_{H5'-H5''} = 11.4 Hz, 2H, H_{5'}), 3.73 (dd, 2 H, H_{5''}), 2.11 (ddd, ²J_{H2'-H2''} = 13.2 Hz, 2H, H_{2'}), 1.99 (m, 2H, H_{2''}), 1.87 (d, 6H, H₇), 0.89 (s, 36H, SiC(CH₃)₃), 0.07 (s, 24H, Si(CH₃)₂)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ[ppm] = 150.65 (s, 2C, C₂), 149.36 (s, 2C, C₅), 129.27 (s, 2C, C₆), 110.76 (s, 2C, C₄), 88.82 (s, 2C, C_{4'}), 84.16 (s, 2C, C_{1'}), 73.58 (s, 2 C, C_{3'}), 63.34 (s, 2C, 2x C_{5'}), 41.55 (s, 2C, C_{2'}), 26.21 (2x s, 12C, SiC(CH₃)₃), 18.77 (2x s, 4C, SiC(CH₃)₃), 14.93 (s, 2C, 2x C₇), -4.38 (m, 8C, Si(CH₃)₂)

MALDI-TOF (2,5-Dihydroxybenzoesäure) m/z = 937.3 [M+H]⁺

7.8 DARSTELLUNG DER PHTHALIDYLPHOSPHONATAMIDITE

7.8.1 Darstellung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)thymidin (79)

Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 15.0 g (62.0 mmol, 242.23 g/mol) Thymidin **33** wurden zweimal mit je 20 mL trockenem Pyridin koevaporiert und in 250 mL trockenem Pyridin gelöst. Zu dieser Lösung wurden nacheinander 180 mg (1.40 mmol, 122.17 g/mol) 4-*N,N*-Dimethylaminopyridin und 31.1 g (92.0 mmol, 338.83 g/mol) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid gegeben und anschließend wurde langsam 9.34 g (12.8 ml, 92.0 mmol, 0.73 g/cm³) trockenes Triethylamin zugetropft. Nachdem die Reaktionslösung 3.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt worden war, wurde zum Abbruch der Reaktion 150 mL Methanol hinzugegeben und weitere 30 Minuten gerührt. Die Reaktionslösung wurde eingeeengt, der Rückstand in 200 mL Dichlormethan aufgenommen, zweimal mit je 100 mL destilliertem Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde dreimal aus Benzol/Ethylacetat (10:1 v/v) umkristallisiert.

Ausbeute: 28.8 g (53.0 mmol, 85 %)

farblose kristalline Substanz

C₃₁H₃₂N₂O₇ = 544.22 g/mol

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) R_f = 0.63

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 8.99 (s, 1H, NH); 7.49 (d, 1H, ⁴J_{H5-H7} = 1.2 Hz, H₆); 7.30-7.23 (m, 14H, Ar); 6.74-6.72 (m, 4H, Ar); 6.33 (dd, 1H, ³J_{H1'-H2'} = 5.9 Hz, ³J_{H1'-H2''} = 7.8 Hz, H_{1'}); 4.47 (ddd, 1H, ³J_{H3'-H4'} = 6.4 Hz, ³J_{H3'-H2''} = 6.3 Hz, ³J_{H3'-H2'} = 2.7 Hz, H_{3'}); 3.97 (ddd, 1H, ³J_{H4'-H5'} = 3.1 Hz, ³J_{H4'-H5''} = 2.9 Hz, H_{4'}); 3.68 (s, 3H, OCH₃); 3.36 (dd, 1H, ²J_{H5'-H5''} = 10.5 Hz, H_{5'}); 3.26 (dd, 1H, H_{5''}); 2.33 (ddd, 1H, ²J_{H2'-H2''} = 13.6 Hz, H_{2'}); 2.21 (ddd, 1H, H_{2''}); 1.36 (dd, 1H, H₇)

¹³C-NMR (202 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 164.17 (1C, C₄); 159.14 (2C, Trityl); 150.84 (1C, C₂); 144.73 (1C, Trityl); 135.76 (1C, C₆); 130.56 (2C, Trityl); 128.75 (1C, Trityl); 128.53 (1C, Trityl); 128.43 (2C, Trityl); 127.58 (1C, Trityl); 113.71 (4C, Trityl); 111.711 (1C, C₅); 87.38; 86.60 (1C, Trityl-CO); 86.15(1C, C₄); 85.15 (1C,

C_{1'}); 72.96 (1C, C_{3'}); 64.00 (1C, C_{5'}); 55.68 (2C, OCH₃); 41.38 (1C, C_{2'}); 12.26(1C, C_{6'})

7.8.2 Darstellung von Triethylammonium-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)thymidyl-3'-H-phosphonat (81)

Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Es wurden 3.88 g (58.0 mmol, 68.08 g/mol) Imidazol in 70 mL trockenem Dichlormethan gelöst und mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt. Zu dieser Lösung wurden nacheinander 6.63 g (70 mmol, 8.50 mL, 101.19 g/mol, 0.73 g/cm³) trockenes Triethylamin über 5 min und 1.00 g (70 mmol, 1.60 mL, 137.33 g/mol, 1.574 g/cm³) Phosphortrichlorid über 2 min zugetropft. Nachdem diese Lösung 45 min bei 0°C gerührt worden war, wurde eine 0°C kalte Lösung von 2.00 g (4.00 mmol, 544.22 g/mol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)thymidin **79** in 40 mL trockenem Dichlormethan über 5 min zugetropft und 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung wieder auf 0°C abgekühlt, sehr langsam 50 mL 0°C kaltes destilliertes Wasser hinzugegeben und weitere 30 min gerührt. Nachdem die Lösung eingeeengt worden war, wurde sie fünfmal mit je 50 mL Pyridin/Triethylamin (4:1 v/v) und fünfmal mit je 50 mL Toluol koevaporiert. Der Rückstand wurde in 100 mL Dichlormethan aufgenommen und einmal mit 70 mL destilliertem Wasser und einmal mit 70 mL einer gesättigten wässrigen Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde chromatographisch (Chromatotron, 2 mm Trennschicht) gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit einem Methanolgradienten (0-16 %), dem 1 % Triethylamin zugesetzt worden war.

Ausbeute: 2.22 g (3.14 mmol, 78 %)

farbloser Schaum

C₃₇H₄₈N₃O₉P = 709.77 g/mol

DC (CH₂Cl₂/MeOH 7:3 v/v) R_f = 0.36

Schmp.: 78 °C

Zersp.: ca. 110 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.60 (d, 1H, ³J_{H6-H7} = 1.0 Hz, H₆); 7.39-7.21 (m, 9H, Trityl); 6.82-6.80 (m, 4H, Trityl); 6.89 (d, 1H, ¹J_{H-P} = 618.3 Hz, P_H); 6.43 (dd, 1H, ³J_{H1'-H2'} = 5.6 Hz, ³J_{H1'-H2''} = 8.3 Hz, H_{3'}); 5.00 (dddd, 1H, ³J_{H3'-H2''} = 5.4 Hz, ³J_{H3'-H4'} = 5.1 Hz, ³J_{H3'-P} = 5.2 Hz, ³J_{H3'-H2'} = 2.1 Hz, H_{3'}); 4.26 (ddd, 1H, ³J_{H4'-H5'} = 2.9 Hz, ³J_{H4'-H5''} = 2.9 Hz, H_{4'}); 3.77 (s, 6H, OCH₃); 3.47 (dd, 1H, ²J_{H5'-H5''} = 10.6 Hz, H_{5'}); 3.38 (dd, 1H, H_{5''}); 3.01 (q, 6H, ³J = 7.3 Hz, HN(CH₂CH₃)₃); 2.58 (ddd, 1H, ²J_{H2'-H2''} = 13.4 Hz, H_{2'}); 2.38 (ddd, 1H, H_{2''}); 1.35 (d, 3H, , H₇); 1.23 (t, 9H, HN(CH₂CH₃)₃)

¹³C-NMR (202 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 163.63 (1C, C₄); 158.66 (2C, Trityl); 150.37 (1C, C₂); 144.24 (1C, Trityl); 135.78 (1C, C₆); 135.31 (1C, Trityl); 135.26 (1C, Trityl); 130.15 (2C, Trityl); 130.13 (2C, Trityl); 128.20 (2C, Trityl); 127.93 (2C, Trityl); 127.08 (1C, Trityl); 113.21 (4C, Trityl); 111.14 (1C, C₅); 86.96 (1C, Trityl-CO); 85.31 (1C, C_{4'}); 84.57 (1C, C_{1'}); 74.19 (d, 1C, ²J_{C3'-P} = 4.0 Hz, C_{3'}); 63.46 (1C, C_{5'}); 55.22 (2C, OCH₃); 45.57 (3C, HN(CH₂CH₃)₃); 39.78 (1C, C₂); 11.56 (1C, C₇); 8.70 (3C, HN(CH₂CH₃)₃)

³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃, 1H-entkoppelt) δ [ppm] = 4.46(s)

³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃, 1H-gekoppelt) δ [ppm] = 4.46(s, ¹J_{H,P} = 619.1 Hz, ³J_{H3',HP} = 8.8 Hz)

IR (KBr) ν [cm⁻¹] = 3407, 3142, 2983, 2932, 2835, 2616, 2484, 2353, 2046, 1973, 1700, 1607, 152 158, 1465, 1446, 1399, 1369, 1322, 1294, 1275, 1251, 1217, 1177, 1131, 1096, 1062, 032, 984, 961, 916, 830, 791, 757, 727, 703, 664, 634, 61, 597, 584, 557, 493, 464, 418

7.8.3 Darstellung von 3'-O-(*tert*-Butyldiphenylsilyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)thymidin (80)

Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Es wurden 1.70 g (3.12 mmol, 544,22 g/mol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)thymidin **79** und 360 mg (5.29 mmol, 68.08 g/mol) Imidazol zweimal mit je 5 mL trockenem Pyridin koevaporiert und in 10 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Anschließend wurden

nacheinander 1.45 g (1.35 mL, 5.29 mmol, 274.87 g/mol, 1.07 g/cm³) *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid und 535 mg (0.73 mL, 5.29 mmol, 101.19 g/mol, 0.73 g/cm³) trockenes Triethylamin langsam zugetropft. Nachdem die Lösung 22 Stunden bei Raumtemperatur gerührt worden war, wurden zum Abbruch der Reaktion 10 mL Methanol hinzugegeben und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde eingeeengt und der Rückstand in 50 mL Dichlormethan aufgenommen und je einmal mit 50 mL destilliertem Wasser und einer gesättigten wässrigen Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und eingeeengt. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte chromatographisch (Chromatotron, 2 mm Trennschicht), wobei Dichlormethan mit einem Methanolgradienten (0-6%) als Eluent diente.

Ausbeute: 2.20 g (2.81 mmol, 90 %)

farbloser Schaum

C₄₇H₅₀N₂O₇Si = 782.99 g/mol

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) R_f-Wert = 0.74

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 8.38 (s, 1H, NH); 7.61-7.10 (m, Ar); 6.76-6.72 (m, Ar); 6.49 (dd, 1H, ³J_{H1'-H2'} = 5.6 Hz, ³J_{H1'-H2''} = 8.2 Hz, H_{1'}); 4.54 (ddd, 1H, ³J_{H3'-H4'} = 4.6 Hz, ³J_{H3'-H2''} = 5.7 Hz, ³J_{H3'-H2'} = 2.0 Hz, H_{3'}); 4.06 (ddd, 1H, ³J_{H4'-H5'} = 2.8 Hz, ³J_{H4'-H5''} = 2.9 Hz, H_{4'}); 3.78 (s, 3H, OCH₃); 3.22 (dd, 1H, ²J_{H5'-H5''} = 10.6 Hz, H_{5'}); 2.88 (dd, 1H, H_{5''}); 2.37 (ddd, 1H, ²J_{H2'-H2''} = 13.0 Hz, H_{2'}); 2.07 (ddd, 1H, H_{2''}); 1.35 (d, 3H, ⁴J_{H7-H6} = 1.1 Hz, H₇); 1.04 (s, 9H, SiC(CH₃)₃)

¹³C-NMR (202 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 163.15 (1C, C₄); 150.16 (1C, C₂); 144.23 (Ar); 135.66 (2C, Ar); 15.61 (2C, Ar); 135.30 (1C, Ar); 135.24 (1C, C₆); 133.02 (Ar); 129.99 (Ar); 128.04 (Ar); 127.84 (Ar); 127.80 (Ar); 126.99 (Ar); 113.16 (4C, Ar); 110.99 (1C, C₅); 86.80 (1C, TritylC); 86.76 (1C, C_{4'}); 84.84 (1C, C_{1'}); 73.98 (1C, C_{3'}); 63.03 (1C, C_{5'}); 55.22 (2C, OCH₃); 41.10 (C; C_{2'}); 26.86 (3C, SiC(CH₃)₃); 18.97 (1C, SiC); 11.61 (1C; C₇)

7.8.4 Darstellung von 3'-O-(*tert*-Butyldiphenylsilyl)thymidin (**82**)

Zu einer Lösung aus 307 mg (0.392 mmol, 782.99 g/mol) 3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-5'-O-(4,4'-Dimethoxy-triphenylmethyl)thymidin **80** in Dichlormethan

/Methanol (7:3) wurden bei Raumtemperatur 25 mL einer 2%igen *para*-Toluolsulfonsäure-Lösung in Dichlormethan/Methanol (7:3 v/v) gegeben. Die Reaktionslösung wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit einer gesättigten methanolischen Ammoniaklösung der pH-Wert auf pH 7 eingestellt. Die Lösung wurde eingeeengt und der Rückstand in Dichlormethan suspendiert, 30 Minuten stark gerührt und filtriert. Das Filtrat wurde eingeeengt und das Rohprodukt chromatographisch (Chromatotron, 2 mm Trennschicht) gesäubert. Als Eluent diente Dichlormethan mit einem Methanol-Gradienten (0-4%).

Ausbeute: 182 mg (0.392 mmol, quantitativ)

farbloser Schaum

$C_{37}H_{32}N_2O_5 = 464.55$ g/mol

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 v/v) $R_f = 0.56$

Schmp.: 93 °C

Zersp.: 195°C

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 8.59 (s, 1H, NH); 7.66-7.22 (m, 2H, Ar); 7.49 (d, 1H, $^4J_{H_6-H_7} = 1.1$ Hz, H_6); 7.47-7.38 (m, 2H, Ar); 7.28-7.26 (m, 1H, Ar); 6.23 (dd, 1H, $^3J_{H_{1'}-H_{2'}} = 6.2$ Hz, $^3J_{H_{1'}-H_{2''}} = 7.6$ Hz, $H_{1'}$); 4.45 (ddd, 1H, $^3J_{H_{3'}-H_{4'}} = 6.4$ Hz, $^3J_{H_{3'}-H_{2''}} = 3.6$ Hz, $^3J_{H_{3'}-H_{2'}} = 3.9$ Hz, $H_{3'}$); 3.98 (ddd, 1H, $^3J_{H_{4'}-H_{5'}} = 2.5$ Hz, $^3J_{H_{4'}-H_{5''}} = 3.0$ Hz, $H_{4'}$); 3.63 (dd, 1H, $^2J_{H_{5'}-H_{5''}} = 12.0$ Hz, $H_{5'}$); 3.24 (dd, 1H, $H_{5''}$); 2.27 (ddd, 1H, $^2J_{H_{2'}-H_{2''}} = 13.4$ Hz, $H_{2'}$); 2.16 (ddd, 1H, $H_{2''}$); 1.85 (d, 3H, H_7); 1.09 (s, 9H, $SiC(CH_3)_3$);

^{13}C -NMR (202 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 163.43 (1C, C_4); 150.19 (1C, C_2); 136.78 (1C, C_6); 135.78 (Ar); 135.68 (Ar); 133.28 (Ar); 133.06 (Ar); 130.14 v 130.09 (Ar); 127.89 (Ar); 110.95 (1C, C_5); 87.64 (1C, $C_{4'}$); 86.84 (1C, $C_{1'}$); 72.92 (1C, $C_{3'}$); 62.06 (1C, $C_{5'}$); 40.24 (1C, $C_{2'}$); 26.87 (3C, $SiC(CH_3)_3$); 19.01 (1C, SiC); 12.44 (1C, C_7);

IR: 3435, 3187, 3069, 2930, 2857, 2360, 1962, 1682, 1589, 1471, 1427, 1363, 1320, 1275, 1197, 1105, 1061, 1032, 958, 880, 822, 777, 741, 702, 635, 611, 559, 507, 489, 418

7.8.5 Darstellung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)thymidyl-[5'→3']-3'-O-*tert*-butyldiphenylsilylthymidyl-*H*-phosphonat (P-Diastereomerenpaar) (83)

Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Es wurden 1.84 g (3.96 mmol, 464.55 g/mol) 3'-O-(*tert*-Butyldiphenylsilyl)thymidin **82** und 3.0 g (4.22 mmol, 709.77 g/mol) Triethylammonium-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-thymidyl-3'-*H*-phosphonat **81** zweimal mit je 10 mL trockenem Pyridin koevaporiert und in 100 mL trockenem Pyridin gelöst. Zu dieser Lösung wurden bei Raumtemperatur sehr schnell 1.38 g (1.41 mL, 11.4 mmol, 120.58 g/mol, 0.98 g/cm³) Pivaloylchlorid gegeben und genau 11.5 Minuten gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 150 mL 0 °C kaltem Dichlormethan verdünnt und die Reaktion durch Zugabe von 100 mL einer 0 °C kalten 5 %igen Natriumhydrogencarbonat-Lösung beendet. Nach 30 minütigem Rühren und Erwärmung auf Raumtemperatur wurde die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase zweimal mit je 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und eingeengt. Das Rohprodukt wurde chromatographisch (Chromatotron, 4 mm Trennschicht) gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit einem Methanol-Gradienten (0-5 %), dem 0.1 % Essigsäure zugesetzt worden war.

Ausbeute: 3.38 g (3.21 mmol, 81 %)

farbloser Schaum

$C_{58}H_{63}N_4O_{13}P = 1055.11$ g/mol

7.8.5.1 Trennung der (*R_P*)-und (*S_P*)-Diastereomere von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)thymidyl-[5'→3']-3'-O-*tert*-butyldiphenylsilylthymidyl-*H*-phosphonat (*R_P*)-**83** und (*S_P*)-**83**

Die Trennung der Diastereomere erfolgte chromatographisch an Kieselgel. Hierzu wurde eine Trennsäule ($\varnothing = 8-10$ cm) ca. 20 cm hoch gefüllt, mit einer Mischung, die auch als Eluent diente, aus Dichlormethan und Methanol (2.25 % v/v), dem 0.1 % Essigsäure zugesetzt worden war, äquilibriert, mit einem passenden Filterpapier bedeckt und ca. 10 Stunden zum Setzen des Kieselgels stehen gelassen. Es wurden 3-4 g eines sauberen 1 zu 1 Gemisches von (*R_P*)- und (*S_P*)-5'-O-(4,4'-

Dimethoxytriphenylmethyl)thymidyl-[5'→3']-3'-*O*-*tert*-butyl-diphenylsilylthymidyl-*H*-phosphonat (R_P)-**83** und (S_P)-**83** in 5-7 mL Dichlormethan gelöst und auf die Säule aufgetragen. Die Trennung erfolgte ohne zusätzlichen Überdruck bei einer Füllhöhe des Eluenten von ca. 35 cm. Da zum Erreichen einer Diastereomerenreinheit von $de > 98\%$ zwei bis dreimaliges Trennen erforderlich ist, kann das Eluent problemlos in 500 mL Fraktionen aufgefangen werden. Die Diastereomerenreinheit wurde mit der ^{31}P -NMR-Spektroskopie bestimmt, da die Dünnschichtchromatographie, bedingt durch den zu kleinen R_f -Wert-Unterschied der Diastereomere $\Delta R_f = 0.02$, nicht hinreichend genau ist.

7.8.5.2 *Charakterisierung von (R_P)-5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidyl-[5'→3']-3'-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl-thymidyl-*H*-phosphonat (R_P)-**83** (fast-Diastereomer)*

DC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 v/v) $R_f = 0.52$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 8.87 (s, 1H, NH); 8.76 (s, 1H, NH); 7.34-7.60 (m, Ar); 7.44-7.18 (m, Ar); 6.84-6.82 (m, Ar); 6.32 (dd, 1H, $^3J_{\text{H1}'-\text{H2}'} = 8.8$ Hz, $^3J_{\text{H1}'-\text{H2}'} = 5.4$ Hz, $\text{H}_{1'}\text{A}$); 6.28 (dd, 1H, $^3J_{\text{H1}'-\text{H2}'} = 7.9$ Hz, $^3J_{\text{H1}'-\text{H2}'} = 6.0$ Hz, $\text{H}_{1'}\text{B}$); 5.09 (dddd, 1H, $^3J_{\text{H3}'-\text{P}} = 7.7$ Hz, $^3J_{\text{H3}'-\text{H4}'} = 6.0$, $^3J_{\text{H3}'-\text{H2}'} = 1.5$ Hz, $^3J_{\text{H3}'-\text{H2}'} = 5.3$ Hz, H_3A); 4.18 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H3}'-\text{H2}'} = 2.8$ Hz, $^3J_{\text{H3}'-\text{H2}'} = 1.8$ Hz, $^3J_{\text{H3}'-\text{H4}'} = 3.0$ Hz, H_3B); 4.05 (ddd, 1H, H_4A); 3.94 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H34}'-\text{H5}''} = 5.8$ Hz, $^3J_{\text{H34}'-\text{H5}'} = 3.0$ Hz, H_4B); 3.70 (s, 3H, OCH_3); 3.69 (s, 3H, OCH_3); 3.63 (ddd, 1H, $^2J_{\text{H5}'-\text{H5}''} = 11.3$ Hz, $^3J_{\text{H5}'-\text{P}} = 8.5$ Hz, H_5B); 3.56 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H5}'-\text{P}} = 8.4$ Hz, H_5B); 3.38 (dd, 1H, $^2J_{\text{H5}'-\text{H5}''} = 10.7$ Hz, $^3J_{\text{H5}'-\text{H4}'} = 2.9$ Hz, H_5A); 3.26 (dd, 1H, $^3J_{\text{H5}'-\text{H4}'} = 2.8$ Hz, H_5A); 2.42 (ddd, 1H, $^2J_{\text{H2}'-\text{H2}''} = 13.9$ Hz, H_2A); 2.30 (ddd, 1H, H_2A); 2.25 (ddd, 1H, $^2J_{\text{H2}'-\text{H2}''} = 13.9$ Hz, H_2B); 1.90 (ddd, 1H, H_2B); 1.76 (d, 3H, $^4J_{\text{H7}-\text{H6}} = 1.2$ Hz, H_7); 1.31 (d, 3H, $^4J_{\text{H7}-\text{H6}} = 1.1$ Hz, H_7); 0.99 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$);

$^{13}\text{C-NMR}$ (202 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 163.47 (1C, C_4); 163.43 (1C, C_4); 158.82 (Ar); 150.34 (1C, C_2A); 150.17 (1C, C_2B); 135.67 (1C, C_6B); 135.62 (1C, C_6A); 153.30 (Ar); 135.09 (Ar); 134.99 (Ar); 134.90 (Ar); 130.32 (Ar); 130.23 (Ar); 13.04 (Ar); 129.00 (Ar); 128.19 (Ar); 128.04 (Ar); 127.99 (Ar); 127.30 (Ar); 113.33 (Ar); 111.74 (1C, C_5); 111.48 (1C, C_5); 85.03 (1C, C_4B); 84.59 (1C, C_4A); 84.83 (1C, C_1B); 84.79 (1C, C_1A); 77.44 (1C, C_3A); 72.42 (1C, C_3B); 65.06 (d, 1C, $^2J_{\text{C5}'-\text{P}} = 5.5$ Hz, C_5B); 63.06

(1C, C_{5'}A); 55.24 (2C, OCH₃), 40.20 (1C, C_{2'}B); 39.16 (d, 1C, ³J_{C_{2'}-P} = 3.7 Hz, C_{2'}A); 26.80 (3C, SiC(CH₃)₃); 18.95 (1C, SiC(CH₃)₃); 12.37 (1C, C₇); 11.62 (1C, C₇)

³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃, ¹H-entkoppelt) δ [ppm] = 8.58 (s)

³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃, ¹H-gekoppelt) δ [ppm] = 8.8 (dddd, ¹J_{H-P} = 716 Hz, ³J_{P-H_{3'}A} = 7.7 Hz, ³J_{P-H_{5'}aB} = 8.4 Hz, ³J_{P-H_{5'}bB} = 8.5 Hz)

7.8.5.3 Charakterisierung von (*S_P*)-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidyl-[5'→3']-3'-O-tert-butylidiphenylsilyl-thymidyl-H-phosphonat (*S_P*)-**83** (slow-Diastereomer)

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) R_f = 0.50

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 9.37 (s, 1H, NH); 9.10 (s, 1H, NH); 7.54-7.51 (m, Ar); 7.38-7.28 (m, Ar); 7.20-7.05 (m, Ar); 6.27-6.12 (m, Ar); 6.22 (dd, 1H, ³J_{H_{1'}-H_{2''}} = 7.6 Hz, ³J_{H_{1'}-H_{2'}} = 6.3 Hz, H_{1'}B); 6.01 (dd, 1H, ³J_{H_{1'}-H_{2''}} = 7.7 Hz, ³J_{H_{1'}-H_{2'}} = 6.3 Hz, H_{1'}A); 5.04 (dddd, 1H, ³J_{H_{3'}-P} = 8.7 Hz, ³J_{H_{3'}-H_{2''}} = 5.8 Hz, ³J_{H_{3'}-H_{2'}} = 2.8 Hz, ³J_{H_{3'}-H_{4'}} = 2.8 Hz, H_{3'}A); 4.21 (ddd, 1H, ³J_{H_{3'}-H_{2''}} = 6.6 Hz, ³J_{H_{3'}-H_{2'}} = 3.3 Hz, ³J_{H_{3'}-H_{4'}} = 3.4 Hz, H_{3'}B); 3.99 (ddd, 1H, ³J_{H_{4'}-H_{5'}} = 2.8 Hz, ³J_{H_{4'}-H_{5'}} = 2.6 Hz, H_{4'}A); 3.94 (ddd, 1H, H_{4'}B); 3.72 (ddd, 1H, ²J_{H_{5'}-H_{5''}} = 11.7 Hz, ³J_{H_{5'}-P} = 8.7 Hz, H_{5'}B); 3.69 (s, 6H, OCH₃); 3.65 (ddd, 1H, ³J_{H_{5''}-P} = 8.7 Hz, H_{5''}B); 3.69 (dd, 1H, ²J_{H_{5'}-H_{5''}} = 11.5 Hz, 3.0, H_{5'}A); 3.62 (dd, 1H, H_{5''}A); 2.27 (ddd, 1H, ²J_{H_{2'}-H_{2''}} = 14.1 Hz, H_{2'}A); 2.24 (ddd, 1H, H_{2''}A); 2.23 (ddd, 1H, ²J_{H_{2'}-H_{2''}} = 13.7 Hz, H_{2''}B); 1.93 (ddd, 1H, H_{2''}B); 1.76 (d, 6H, C₇); 0.97 (s, 9H, SiC(CH₃)₃)

¹³C-NMR (202 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 164.14 (1C, C₄); 163.97 (1C, C₄); 158.57 (2C, Tr4); 150.52 (1C, C₂B); 150.35 (1C, C₂B); 136.60 (1C, C₆A); 136.03 (1C, C₆B); 135.68 (Ar); 135.64 (Ar); 132.28 (Ar); 132.59 (Ar); 130.33 (Ar); 130.25 (Ar); 130.04 (Ar); 129.10 (Ar); 128.05 (Ar); 128.00 (Ar); 127.80 (Ar); 120.73 (Ar); 27.30 (Ar); 111.53 (1C, C₅); 111.51 (1C, C₅); 86.11 (1C, C_{1'}B); 85.76 (1C, C_{4'}A); 85.71 (1C, C_{4'}B); 85.49 (1C, C_{1'}A); 76.27 (1C, ²J_{C_{3'}-P} = 6.0 Hz, C_{3'}A); 72.39 (1C, C_{3'}B); 65.24 (1C, ²J_{C_{3'}-P} = 6.1 Hz, C₅B); 61.79 (1C, C₅A); 55.22 (2C, OCH₃); 39.71 (1C, C₂B); 38.66 (1C, C₂A); 26.81 (1C, SiC(CH₃)₃); 18.96 (1C, SiC(CH₃)₃); 12.46 (3C, C₇); 12.29 (3C, C₇)

³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃, ¹H-entkoppelt) δ [ppm] = 9.77 (s)

³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃, ¹H-gekoppelt) δ [ppm] = 9.77 (dddd, ¹J_{H-P} = 611.5 Hz, ³J_{P-H3'A} = 8.7 Hz, ³J_{P-H5'aB} = 8.7 Hz, ³J_{P-H5'bB} = 8.7 Hz)

7.8.6 Darstellung von (R_P)-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)thymidyl-[5'→3']-3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)thymidylphthalidylphosphonat (R_P)-84 (α-C-Diastereomerenpaar)

Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Es wurden 435 mg (0.41 mmol, 1055.11 g/mol) (R_P)-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)thymidyl-[5'→3']-3'-O-*tert*-butyldiphenylsilyl-thymidyl-*H*-phthalidylphosphonat (R_P)-83 und 183 mg (1.20 mmol, 150.13 g/mol) 2-Carboxybenzaldehyd dreimal mit je 10 mL trockenem Acetonitril koevaporiert und in 15 mL trockenem Dichlormethan gelöst. Zu dieser Lösung wurden langsam 233 mg (0.17 ml, 1.20 mmol, 101.19 g/mol, 0.73 g/cm³) trockenes Triethylamin zugegeben und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde bis zur Trockene eingengt und der Rückstand erneut in 5 mL Dichlormethan aufgenommen. Zu dieser Lösung wurden 251 mg (1.20 mmol, 206.33 g/mol) Dicyclohexylcarbodiimid gegeben. Nach 24 stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung filtriert und das Filtrat eingengt. Das Rohprodukt wurde chromatographisch (Chromatotron, 2 mm Trennschicht) gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit einem Methanolgradienten (0-2%).

Ausbeute: 330 mg (0.27 mmol, 59%)

farbloser Schaum

C₆₅H₆₇N₄O₁₅PSi = 1203.30 g/mol

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) R_f = 0.64

8.8.6.1 Charakterisierung des R_P-α-C-R-Isomers

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 10.70 (s, 1H, NH); 10.61(s, 1H, NH); 7.72-6.77 (m, 23H, Ar(DMTr, Si)) 7.63 (m, 1H, H_{Ph}*cis*'); 7.11 (m, 2H, H_{Ph}*trans*' + H_{Ph}*trans*''); 6.93 (m, 1H, H_{Ph}*cis*'); 6.46 (dd, 1H, ³J_{H1'-H2'} = 7.1 Hz, ³J_{H1'-H2'} = 7.1 Hz, H₁B); 6.27 (dd, 1H,

$^3J_{H1'-H2'} = 5.6$ Hz, $^3J_{H1'-H2''} = 5.6$ Hz, $H_{1'}A$); 5.51 (ddd, 1H, B 21.7 Hz, 4.7, 7.5, 6.6, 2.9, $H_{3'}A$); 5.24 (s, 1H, $^2J_{\alpha C-P} = 9.9$ Hz, $H_{\alpha-C}$); 4.22 (ddd, 1H, $^3J_{4'-5''} = 3.5$ Hz, $^3J_{4'-5'} = 3.3$ Hz, $^3J_{4'-3'} = 3.5$ Hz, $H_{4'}A$); 4.07 (ddd, 1H, 5.9, 2.9, 2.9, $H_{4'}B$); 3.79 (ddd, 1H, 2.2, 5.0, $H_{3'}B$); 3.64 (dd, 1H, 3.6, $^2J_{5'-5''} = 11.0$ Hz, $H_{5'}A$); 3.59 (dd, 1H, 10.9, 3.2, $H_{5'}A$); 3.58 (dd, 1H, $H_{5''}B$); 3.48 (s, 3H, O-CH₃); 3.47 (s, 3H, O-CH₃); 3.42 (dd, 1H, $H_{5''}B$); 2.58 (ddd, 2H, $H_{2'}+H_{2''}A$); 2.0 (s, 3H, H_7); 2.00 (ddd, 1H, $H_{2'}B$); 1.55 (s, 3H, H_7); 1.42 (ddd, 1H, $H_{2''}B$); 1.18 (s, 9H, SiC(CH₃)₃)

^{13}C -NMR (202 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 159.56 (1C, C₄), 150.77 (1C, C₂), 136.12 (Ar), 135.62 (1C, C₆); 133.43 (Ar); 130.50 (Ar); 128.30 (Ar); 125.64 (Ar); 123.66 (Ar); 129.28 (s, 1C, C_{Ph cis'}); 125.59 (s, 1C, C_{Ph cis''}); 113.65 (1C, C₅), 85.46 (1C, $H_{1'}B$); 85.03 (1C, C_{1'}); 85.24 (1C, $H_{3'}B$); 77.87 (1C, C_{3'A}); 75.81 (1C, $\alpha-C$); 67.46 (1C, $H_{5'}B$); 63.13 (1C, C_{5'A}); 84.38 (1C, $H_{4'}A$); 72.38 (1C, C_{4'B}); 54.88 (2C, OCH₃); 40.14 (1C, $H_{2'}B$); 39.17 (1C, C_{2'A}); 27.34 (3C, SiC(CH₃)₃); 13.24 (1C, C₇); 12.38 (1C, C₇)

^{31}P -NMR (202 MHz, CDCl₃, 1H -entkoppelt) δ [ppm] = 15.20 (s)

8.10.6.2 Charakterisierung des *R_P*- α -C-S-Isomers

1H -NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 10.96 (s, 1H, NH); 10.66 (s, 1H, NH); 7.80-6.89 (m, 23H, Ar(DMTr, Si)); 7.67 (m, 1H, $H_{Ph trans'}$); 7.57 (m, 1H, $H_{Ph cis'}$); 7.15 (m, 1H, $H_{Ph cis''}$); 6.98 (m, 1H, $H_{Ph trans''}$), 6.52 (dd, 1H, $^3J_{H1'-H2'} = 5.3$ Hz, $^3J_{H1'-H2''} = 8.6$ Hz, $H_{1'}A$); 6.49 (dd, 1H, $^3J_{H1'-H2''} = 6.9$ Hz, $^3J_{H1'-H2'} = 6.9$ Hz, $H_{1'}B$); 5.11 (d, 1H, $^3J_{\alpha CH-P} = 10.9$ Hz, αCH); 5.03 (ddd, 1H, B 12.5, $^3J_{H3'-H4'} = 3.0$ Hz, $^3J_{H3'-H2'} = 2.3$, $^3J_{H3'-H2''} = 5.8$ Hz, $H_{3'}A$); 4.45 (ddd, 1H, $^3J_{H3'-H2'} = 7.0$ Hz, $^3J_{H3'-H4'} = 3.4$ Hz, $^3J_{H3'-H2''} = 3.4$ Hz, $H_{3'}B$); 3.95 (ddd, 1H, $^2J_{H5'-H5''} = 12.1$ Hz, $^3J_{H4'-H5''} = 6.2$ Hz, $H_{5'}B$); 3.75 (dd, 1H, $^3J_{H4'-H5''} = 4.2$ Hz, $H_{5''}B$); 3.81 (dd, 1H, $H_{4'}B$); 3.63 (ddd, 1H, $^3J_{H4'-H5'} = 2.6$, $^3J_{H4'-H5''} = 2.5$, $H_{4'}A$); 3.21 (dd, 1H, $^2J_{H5'-H5''} = 11.5$, $H_{5'}A$); 2.61 (dd, 1H, $H_{5''}A$); 2.62 (ddd, 1H, $^2J_{H2'-H2''} = 14.1$ Hz, $H_{2'}A$); 2.36 (ddd, 1H, $H_{2''}A$); 2.08 (ddd, 1H, $H_{2'}B$); 1.86 (ddd, 1H, $H_{2''}B$); 1.47 (d, 3H, $^4J_{H7-H6} = 1.1$ Hz, H_7), 1.25 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 1.17 (d, 3H, $^4J_{H7-H6} = 1.2$ Hz, H_7)

^{13}C -NMR (202 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 164.44 (1C, C₄); 150.77 (1C, C₂); 136.36 (1C, C₆); 135.99 (Ar); 135.62 (Ar); 133.43 (Ar); 130.50 (Ar); 129.71 (Ar); 128.62 (Ar); 128.30 (Ar); 125.62 (Ar); 123.66 (Ar); 113.65; (1C, C_{Ph cis'}); 84.80 (2C, C_{1'A/B}); 80.68 (1C, C_{3'A}); 72.22 (1C, C_{1'}); 75.26 (1C, $\alpha-C$); 67.45 (1C, C_{5'B}); 63.76 (1C, C_{5'A}); 84.80

(1C, C₄B); 84.58 (1C, C₄A); 52.91 (2C, OCH₃); 39.90 (1C, H₂A); 39.47 (1C, C₂B); 27.32 (3C, SiC(CH₃)₃); 12.57 (1C, C₇); 12.14 (1C, C₇)

³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃, ¹H-entkoppelt) δ [ppm] = 14.22 (s)

7.8.7 Darstellung von (S_P)-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)thymidyl-[5'→3']-3'-O-(*tert*-butyldiphenylsilyl)thymidylphthalidylphosphonat (S_P)-84 (α-C-Diastereomerenpaar)

Die Synthese des (S_P)-84-Isomers wurde analog der Synthese des (S_P)-84 durchgeführt. Es wurden 435 mg (0.41 mmol, 1055.11 g/mol) (R_P)-5'-O-(4,4'-Dimethoxy-triphenylmethyl)thymidyl-[5'→3']-3'-O-*tert*-butyldiphenylsilyl-thymidyl-*H*-phthalidyl-phosphonat (R_P)-83 mit 183 mg (1.20 mmol, 150.13 g/mol) 2-Carboxybenzaldehyd umgesetzt, wobei 233 mg (0.17 ml, 1.20 mmol, 101.19 g/mol, 0.73 g/cm³) trockenes Triethylamin als Base zugesetzt wurden. Die Lactonisierung erfolgte mit 251 mg (1.20 mmol, 206.33 g/mol) Dicyclohexylcarbodiimid.

Ausbeute: 330 mg (0.27 mmol, 59%)

farbloser Schaum

C₆₅H₆₇N₄O₁₅PSi = 1203.30 g/mol

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) R_f = 0.62

8.8.6.1 Charakterisierung des S_P-α-C-R-Isomers

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 10.38 (1H, NH); 10.29 (1H, NH); 7.73-6.79 (m, Ar); 7.79(m, 1H, H_{Ph}*trans*'); 7.64(m, 1H, H_{Ph}*cis*'); 7.27(m, 1H, H_{Ph}*cis*''); 7.16(H_{Ph}*trans*''); 7.49 (d, 1H, H₆); 7.47 (d, 1H, H₆); 6.47 (dd, 1H, ³J_{H1'-H2'} = 6.8 Hz, ³J_{H1'-H2''} = 6.8 Hz, H₁'A); 6.23 (dd, 1H, ³J_{H1'-H2'} = 6.2 Hz, ³J_{H1'-H2''} = 6.2 Hz, H₁'B); 5.33 (d, 1H, ²J_{αCH-P} = 0.3 Hz, αCH); 5.15 (ddd, 1H, H₃B); 4.41 (ddd, 1H, ³J_{H3'-H2'} = 2.8 Hz, ³J_{H3'-H4'} = 3.4 Hz, ³J_{H3'-H2''} = 6.3 Hz, H₃A); 4.14 (ddd, 1H, H₄A); 4.08 (ddd, 1H, H₄B); 3.91 (ddd, 1H, H₅A); 3.83 (ddd, 1H, H₅A); 3.40 (s, 3H, OCH₃); 3.39 (s, 3H, OCH₃); 3.39 (dd, 2H, H₅'+H₅'B); 2.13 (ddd, 1H, ²J_{H2'-H2''} = 13.7 Hz, H₂A); 1.82 (ddd, 1H, H₂'A); 1.94 (ddd, 1H, H₂'+H₂'B); 1.93 (d, 3H, H₇); 1.49 (d, 3H, H₇); 1.16 (s, 9H, SiC(CH₃)₃)

¹³C-NMR (202 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 164.60 (1C, C₄); 150.80 (1C, C₂); 136.11 (1C, C₆); 135.78 (Ar); 134.28 (Ar); 130.36 (Ar); 128.41 (Ar); 127.97 (Ar); 127.11 (Ar); 125.59 (Ar); 123.64 (Ar); 113.89 (1C, C₅); 85.90 (1C, C₁A); 84.81 (1C, C₄B); 84.60 (1C, C₄A); 84.38 (1C, C₁B); 78.53 (1C, C₃A); 76.14 (1C, α-C); 73.32 (1C, C₃B); 66.59 (1C, C₅B); 63.13 (1C, C₅A); 5.88 (2C, CH₃O); 39.92 (1C, C₂B); 39.48 (1C, C₂A); 27.59 (3C, SiC(CH₃)₃); 13.24 (1C, C₇); 12.59 (1C, C₇)

³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃, ¹H-entkoppelt) δ [ppm] = 16.43 (s)

8.8.7.2 Charakterisierung des S_P-α-C-S-Isomers

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 9.93 (2H, NH); 7.75-7.69 (m, Ar); 7.62-7.54(m, Ar); 7.40-7.18(m, Ar); 6.82-6.78(m, Ar); 6.40 (dd, 2H, ³J_{H1A'-H2'} = 5.8 Hz, ³J_{H1A'-H2''} = 7.3 Hz, ³J_{H1B'-H2'} = 6.4 Hz, ³J_{H1B'-H2''} = 7.7 Hz, H₁A'+H₁B'); 5.51 (ddd, 1H, ³J_{H3'-H4'} = 3.1 Hz, ³J_{H3'-H2'} = 3.1, ³J_{H3'-H2''} = 7.3 Hz, H₃A); 5.44 (d, 1H, ³J_{α-CH-P} = 10.0 Hz, α-CH); 4.41 (ddd, 1H, ³J_{H3'-H2'} = 5.8 Hz, ³J_{H3'-H4'} = 2.8 Hz, ³J_{H3'-H2''} = 2.8 Hz, H₃B); 4.26 (ddd, 1H, ³J_{H4'-H5'} = 2.8 Hz, ³J_{H4'-H5''} = 2.7 Hz, H₄A); 4.08 (ddd, 1H, ³J_{H4'-H5'} = 3.0 Hz, ³J_{H4'-H5''} = 3.0 Hz, H₄B); 3.90 (ddd, 1H, ³J_{H5'-H5''} = 12.1 Hz, ³J_{H5'-P} = 5.7 Hz, H₅B); 3.83 (ddd, 1H, ³J_{H5'-P} = 8.2 Hz, H₅'B); 3.56 (dd, 1H, ³J_{H5'-H5''} = 10.6 Hz, H₅A); 3.51 (dd, 1H, H₅'A); 2.56 (ddd, 1H, ³J_{H2'-H2''} = 14.0 Hz, H₂A); 2.45 (ddd, 1H, ³J_{H2'-H2''} = 13.8 Hz, H₂'A); 2.13 (ddd, 1H, H₂B); 1.82 (ddd, 1H, H₂'B); 1.90 (d, 3H, ⁴J_{H7-H6} = 1.1 Hz, H₇); 1.49 (d, 3H, ⁴J_{H7-H6} = 1.3 Hz, H₇), 1.15 (s, 9H, SiC(CH₃)₃)

¹³C-NMR (202 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 135.78 (Ar); 155.59 (Ar); 131.01 (Ar); 129.06 (Ar); 128.63 (Ar); 127.79 (Ar); 113.44 (Ar); 85.64 (1C, C₁A); 85.25 (1C, C₄B); 84.60 (1C, C₄A); 84.81 (1C, C₁B); 78.53 (1C, C₃A); 74.84 (1C, α-C); 73.76 (1C, C₃B); 67.03 (1C, C₅B); 63.34 (1C, C₅A); 55.13 (2C, CH₃O); 40.14 (1C, C₂B); 39.70 (1C, C₂A); 27.55 (3C, SiC(CH₃)₃); 13.24 (1C, C₇); 12.59 (1C, C₇);

³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃, ¹H-entkoppelt) δ [ppm] = 16.87 (s)

7.8.8 Darstellung von (R_P)-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidyl-[5'→3']-thymidylphthalidylphosphonat (R_P)-85 (α-C-Diastereomerenpaar)

Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Es wurden 202 mg (0.168 mmol) (R_P)-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)thymidyl-[5'→3']-3'-O-(*tert*-butyldi-phenylsilyl)thymidylphthalidylphosphonat (R_P)-84 zweimal mit je 5 mL trockenem Acetonitril koevaporiert und in 5 mL trockenem Tetrahydrofuran gelöst. Zu dieser Lösung wurden nacheinander 2.88 mg (0.168 mmol) destilliertes Wasser und 0.2 mL (0.2 mmol) TBAF gegeben. Nachdem die Reaktionslösung zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt worden war, wurde sie mit 20 mL Phosphat-Puffer (pH 6.8) gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt, filtriert, über Natriumsulfat getrocknet und unter Vakuum eingeeengt. Das Rophprodukt wurde chromatographisch (Chromatotron, 1 mm Trennschicht) mit einem Dichlormethan/Methanolgradienten (0-5%) gereinigt.

Ausbeute: 115 mg (0.119 mmol, 71 %)

farbloser Schaum

C₄₉H₄₉N₄O₁₅P = 964.91 g/mol

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) R_f = 0.56

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 9.71 (s, 1H, NH); 9.62 (s, 1H, NH); 9.38(s, 2H, NH); 7.78-7.71 (m Ar); 7.61-7.35 (m, Ar); 7.33-.22 (m, Ar); 7.18-7.09 (m, Ar); 7.06-7.03 (m, Ar); 6.74-6.64 (m, 16H, Trityl); 6.33 (dd, 1H, ³J_{H1'-H2'} = 5.7 Hz, ³J_{H1'-H2''} = 8.0 Hz, H_{1'2A}); 6.31 (dd, 1H, ³J_{H1'-H2'} = 5.0 Hz, ³J_{H1'-H2''} = 9.6 Hz, H_{1'1A}); 6.29 (dd, 1H, ³J_{H1'-H2'} = 6.8 Hz, ³J_{H1'-H2''} = 6.8 Hz, H_{1'1B}); 6.13 (dd, 1H, ³J_{H1'-H2'} = 6.7 Hz, ³J_{H1'-H2''} = 6.7 Hz, H_{1'2B}); 5.76 (d, 1H, ¹J_{H-P} = 10.6 Hz, α-CH); 5.51 (d, 1H, ¹J_{H-P} = 9.6 Hz, α-CH); 5.31 (dddd, 1H, ³J_{H3'-H2'} = 2.5 Hz, ³J_{H3'-P} = 5.8 Hz, ³J_{H3'-H4'} = 2.7 Hz, ³J_{H3'-H2''} = 5.5, H_{3'2A}); 4.91 (dddd, 1H, ³J_{H3'-H2'} = 2.3 Hz, ³J_{H3'-H2''} = 5.5 Hz, H_{3'1A}); 4.52 (ddd, 1H, ³J_{H3'-H2'} = 3.2 Hz, ³J_{H3'-H4'} = 7.7 Hz, ³J_{H3'-H2''} = 3.9 Hz, H_{3'1B}); 4.40 (ddd, 1H, H_{5'+H5''1B}); 4.28 (ddd, 1H, ³J_{H3'-H4'} = 3.9 Hz, ³J_{H3'-H2''} = 3.3 Hz, ³J_{H3'-H2'} = 7.3 Hz, H_{3'2B}); 4.22 (ddd, 1H, ³J_{H4'-H5'} = 2.7 Hz, ³J_{H4'-H5''} = 2.2 Hz, H_{4'2A}); 4.16 (ddd, 1H, ³J_{H4'-H5'} = 3.8 Hz, ³J_{H4'-H5''} = 3.8 Hz, H_{4'1B}); 4.10 (ddd, 1H, H_{5'+H5''2B}); 3.99 (ddd, 1H, ³J_{H4'-H5'} = 4.1 Hz, ³J_{H4'-H5''} = 4.1 Hz, H_{4'2B}); 3.69 (s, 3H, OCH₃); 3.68 (s, 3H, OCH₃); 3.63 (s, 3H, OCH₃); 3.62 (s, 3H, OCH₃); 3.56 (dd, 1H, ²J_{H5'-H5''} = 10.9 Hz, H_{5'2A}); 3.52 (dd, 1H, ²J_{H5'-H5''} = 10.6, Hz,

H₅'1A); 3.46 (dd, 1H, H₅'2A); 3.16(dd, ³J_{H₅'-H₄'} = 2.8 Hz, H₅'1A); 2.71 (ddd, 1H, ²J_{H₂'-H₂'} = 14.0 Hz, H₂'2A); 2.54 (ddd, 1H, ²J_{H₁'-H₂'} = 13.4 Hz, H₂'1A); 2.41 (ddd, 1H, H₂'2A); 2.43 (ddd, 1H, ²J_{H₁'-H₂'} = 12.8 Hz, H₂'1B); 2.31 (ddd, 1H, H₂'1A); 2.27 (ddd, 1H, H₂'1B); 2.26 (ddd, 1H, ²J_{H₂'-H₂'} = 13.7 Hz, H₂'2B); 1.88 (d, 3H, ⁴J_{H₇-H₆} = 1.2 Hz, H₇); 1.84 (ddd, 1H, H₂'2B); 1.65 (d, 3H, ⁴J_{H₇-H₆} = 1.2 Hz, H₇); 1.30 (d, 3H, ⁴J_{H₇-H₆} = 1.2 Hz, H₇); 1.25 (d, 3H, H₇)

¹³C-NMR (202 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 164.12 (2C, C₄); 163.95 (2C, C₄); 159.07; 151.25 (1C, C₂); 151.01 (2C, C₂); 150.71 (1C, C₂); 144.17; 135.87 (1C, C₆); 135.63 (1C, C₆); 135.14 (1C, C₆); 134.89 (1C, C₆); 130.50; 128.55; 128.30; 127.81; 112.43 (1C, C₅); 112.18 (1C, C₅); 111.68 (1C, C₅); 111.45 (1C, C₅); 85.67 (1C, C₁); 85.45 (1C, C₁); 84.81 (2C, C₄); 84.59 (2C, C₁); 84.55 (2C, C₄); 81.12 (1C, C₃); 78.95 (1C, C₃); 75.49 (1C, α-C); 75.26 (1C, α-C); 70.71 (2C, C₃); 68.32 (1C, C₅); 67.67 (1C, C₅); 63.59 (1C, C₅); 63.11 (1C, C₅); 40.39 (1C, C₂); 40.12 (2C, C₂); 39.90 (1C, C₂)

³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃, ¹H-entkoppelt) δ [ppm] = 32.45 (s)

³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃, ¹H-gekoppelt) δ [ppm] = 32.45(m)

MS (FAB+) Matrix/MNBA: 965.6 (M+H)⁺

7.8.9 Darstellung von (S_P)-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidyl-[5'→3']-thymidylphthalidylphosphonat (S_P)-85 (α-C-Diastereomerenpaar)

Die Synthese von (S_P)-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)thymidyl-(5'→3')-thymidylphthalidylphosphonat (S_P)-85 wurde analog der Synthese des R_P-Diastereomers (R_P)-85 durchgeführt (siehe 8.10.8, S.161). Es wurden 400 mg (0.439 mmol, 1203.30 g/mol) (S_P)-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)thymidyl-[5'→3']-3'-O-(*tert*-butyldi-phenylsilyl)thymidylphthalidylphosphonat (S_P)-84 mit 0.4 mL (0.4 mmol) einer 1M Lösung von TBAF in THF unter Zugabe von 5.78 mg destillierten Wasser umgesetzt.

Ausbeute: 296 mg (0.307 mmol, 70 %)

farbloser Schaum

$C_{49}H_{49}N_4O_{15}P = 964.91 \text{ g/mol}$

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 v/v) R_f -Wert = 0.52

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 9.59 (s, 1H, NH); 9.53(s, 2H, NH); 9.48(s, 1H, NH); 7.72-7.67 (m, Ar); 7.42-7.31 (m, Ar); 7.27-7.16 (m, Ar); 6.82-6.78 (m, Ar); 6.40 (dd, 1H, $^3J_{H1-H2'} = 5.8 \text{ Hz}$, $^3J_{H1-H2''} = 8.1 \text{ Hz}$, $H_1'1A$); 6.30 (dd, 1H, $^3J_{H1-H2'} = 6.3 \text{ Hz}$, $^3J_{H1-H2''} = 6.3 \text{ Hz}$, $H_1'1B$); 6.13 (dd, 1H, $^3J_{H1-H2'} = 6.1 \text{ Hz}$, $^3J_{H1-H2''} = 6.1 \text{ Hz}$, $H_1'2A$); 6.11 (dd, 1H, $^3J_{H1-H2'} = 7.9 \text{ Hz}$, $^3J_{H1-H2''} = 6.0 \text{ Hz}$, $H_1'2B$); 5.97 (d, 1H, $^2J_{\alpha-CH-P} = 10.6 \text{ Hz}$, $\alpha-CH_1$); 5.79 (d, 1H, $^2J_{\alpha-CH-P} = 10.0 \text{ Hz}$, $\alpha-CH_2$); 5.31 (dddd, 1H, $^3J_{H3'-H2''} = 4.1 \text{ Hz}$, $^3J_{H3'-H2'''} = 7.0 \text{ Hz}$, $^3J_{H3'-H4'} = 2.2 \text{ Hz}$, $H_3'1B$); 4.95 (dddd, 1H, $H_3'2B$); 4.61 (ddd, 1H, $^3J_{H3'-H2''} = 2.3 \text{ Hz}$, $^3J_{H3'-H2'''} = 5.8 \text{ Hz}$, $^3J_{H3'-H4'} = 2.8 \text{ Hz}$, $H_3'1A$); 4.43 (ddd, 1H, $^3J_{H3'-H2''} = 7.8 \text{ Hz}$, $^3J_{H3'-H2'''} = 7.1 \text{ Hz}$, $^3J_{H3'-H4'} = 2.0 \text{ Hz}$, $H_3'2A$); 4.20 (ddd, 1H, $^3J_{H4'-H5'} = 2.3 \text{ Hz}$, $^3J_{H4'-H5''} = 2.2 \text{ Hz}$, $H_4'1B$); 4.16 (ddd, 1H, $^3J_{H4'-H5'} = 3.4 \text{ Hz}$, $^3J_{H4'-H5''} = 6.4 \text{ Hz}$, $H_4'2A$); 4.12 (ddd, 1H, $^3J_{H4'-H5'} = 2.6 \text{ Hz}$, $H_4'2B$); 4.11 (ddd, 1H, $^3J_{H4'-H5'} = 2.8 \text{ Hz}$, $H_4'1A$); 3.98 (ddd, 2H, $H_5'+H_5''2A$); 3.75 (s, 6H, OCH_3); 3.49 (dd, 1H, $^2J_{H5'-H5''} = 10.6 \text{ Hz}$, $H_5'1B$); 3.39 (dd, 1H, $H_5'1B$); 3.36 (dd, 1H, $^2J_{H5'-H5''} = 10.5 \text{ Hz}$, $H_5'2B$); 3.35 (ddd, 1H, $H_5'+H_5''1A$); 3.34 (dd, 1H, $H_5'2B$); 2.45 (ddd, 1H, $^2J_{H2'-H2''} = 13.4 \text{ Hz}$, $H_2'1A$); 2.27 (ddd, 1H, $H_2'1A$); 2.39 (ddd, 1H, $^2J_{H2'-H2''} = 13.6 \text{ Hz}$, $H_2'1B$); 2.11 (ddd, 1H, $H_2'1B$); 2.22 (ddd, 1H, $^2J_{H2'-H2''} = 13.2 \text{ Hz}$, $H_2'2A$); 1.93 (ddd, 1H, $H_2'2A$); 2.03 (m, 2H, $H_2'+H_2''2B$); 1.83 (d, 3H, H7); 1.82 (d, 3H, H7); 1.40 (d, 3H, H7); 1.38 (d, 3H, H7)

^{13}C -NMR (202 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 164.04 (1C, C_4); 163.95 (1C, C_4); 163.84 (1C, C_4); 163.82 (1C, C_4); 158.62 (1C, CO-Phth); 158.50 (1C, CO-Phth); 150.95 (1C, C_2); 150.47 (1C, C_2); 150.36 (1C, C_2); 150.30 (1C, C_2); 144.29 (1C, C2-Phth); 143.88 (1C, C2-Phth); 135.50 (1C, C_6); 135.43 (1C, C_6); 135.27 (1C, C_6); 134.90 (1C, C_6); 134.73 (Ar); 134.28 (Ar); 134.25 (Ar); 130.12-126.90 (m, Ar); 113.22 (2C, Trityl); 113.20 (2C, Trityl); 113.10 (2C, Trityl); 112.98 (2C, Trityl); 111.45 (1C, C_5); 111.41 (1C, C_5); 111.21 (1C, C_5); 110.94 (1C, C_5); 87.13 (1C, TritylC); 87.05 (1C, TritylC); 85.06 (1C, C_4); 84.95 (1C, C_4); 84.66 (2C, C_4); 84.60 (1C, C_1); 84.55 (1C, C_1); 84.27 (1C, C_1); 83.93 (1C, H_1); 78.76 (1C, C_3); 78.62 (1C, C_3); 74.32 (1C, $\alpha-C$); 74.11 (1C, $\alpha-C$); 72.09 (1C, C_3); 69.99 (1C, C_3); 67.80 (1C, C_5); 67.54 (1C, C_5); 67.26 (1C, C_5); 62.87 (1C, C_5); 59.79 (4C, OCH_3); 39.55 (1C, C_2); 39.41 (1C, C_2); 39.02 (1C, C_2); 38.63 (1C, C_2); 12.26 (1C, C_7); 11.56 (1C, C_7); 11.50 (1C, C_7); 11.44 (1C, C_7)

^{31}P -NMR (202 MHz, $CDCl_3$, 1H -entkoppelt) δ [ppm] = 15.75 (s)

³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃, ¹H-gekoppelt) δ [ppm] = 15.75 (m)

MS (FAB+) Matrix/MNBA: 964.4 (M)⁺

7.8.10 Darstellung von (R_P)-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidyl-[5'→3']-thymidylphthalidyl-3'-O-(diisopropyl-2-cyanoethyl)phosphoamidit (R_P)-31

Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Es wurden 250 mg (0.259 mmol, 964.91 g/mol) (R_P)-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)thymidyl-(5'→3')-thymidylphthalidylphosphonat (R_P)-**85** zweimal mit je 5 mL trockenem Acetonitril koevaporiert und in 5 mL trockenem Acetonitril gelöst. Zu dieser Lösung wurden nacheinander 114 mg (0.378 mmol, 301.41 g/mol) 2-Cyanoethoxybis(*N,N*-diisopropylamino)phosphin **67** und 1.53 mL (1.53 mmol) einer 1 molaren Lösung von 4,5-Dicyanoimidazol in gegeben. Nachdem diese Lösung 1.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt worden war, wurde sie unter Vakuum bis zur Trockene eingengt. Das Rohprodukt wurde chromatographisch an Alox neutral (Aktivitätstufe 3) gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit einem Methanolgradienten (0-%), dem 1 % Triethylamin zugesetzt worden war.

Ausbeute: 220 mg (0.189 mmol, 73 %)

farbloser Schaum

C₅₈H₆₆N₆O₁₆P₂ = 1165.12 g/mol

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) R_f = 0.61

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 6.54 (m, 1H, H_{1'}); 6.53 (m, 1H, H_{1'}); 6.42 (m, 2H, H_{1'}); 6.36 (m, 1H, H_{1'}); 6.31 (m, 1H, H_{1'}); 6.29 (m, 1H, H_{1'}); 6.25 (m, 1H, H_{1'}); 5.60 (m, 2H, H_{3'}); 5.17 (m, 1H, H_{3'}); 5.12 4.73 (m, 1H, H_{3'}); 4.75 (m, 1H, H_{3'}); 4.74 (m, 1H, H_{3'}); 4.71 (m, 1H, H_{3'}); 4.66 (m, 1H, H_{3'}); 4.73 (m, 1H, H_{4'}); 4.30 (m, 1H, H_{4'}); 4.26 (m, 1H, H_{4'}); 4.25 (m, 2H, H_{4'}); 4.41 4.31 3.82 3.77 3.74 3.63 (m, 2H, H_{5'}); 5.47 (d, 1H, ²J_{α-CH-P} = 10.6 Hz, α-CH); 5.37 (d, 1H, ²J_{α-CH-P} = 10.5 Hz, α-CH); 5.32 (d, 1H, ²J_{α-CH-P} = 9.4 Hz, α-CH); 5.26 (d, 1H, ²J_{α-CH-P} = 9.6 Hz, α-CH); 3.45 (s, 12H, CH₃O); 3.44 (s, 12H, CH₃O); 3.27 m, 1H, H_{5'}); 2.79 (m, 1H, H_{2'}); 2.72 (m, 1H, H_{2'}); 2.59 (m, 1H, H_{2'});

2.45 (m, 1H, H_{2'}); 2.40 (m, 1H, H_{2'}); 2.62 (m, 1H, H_{2'}); 2.15 (m, 1H, H_{2'}); 1.98 (m, 1H, H_{2'}); 1.22-1.03 (d, 24H, NCH(CH₃)₂)

¹³C-NMR (202 MHz, C₆D₆) δ [ppm] = 135.56-123.63 (Ar); 85.67 (2C, C_{1'}); 85.42 (1C, C_{1'}); 85.02 (1C, C_{1'}); 84.81 (1C, C_{4'}); 84.15 (1C, C_{4'}); 83.94 (1C, C_{4'}); 83.72 (1C, C_{4'}); 80.48 (2C, C_{3'}); 75.26 (4C, α-C); 72.87(2C, C_{3'}); 63.98 (1C, C_{5'}); 63.11 (1C, C_{5'}); 58.77 (2C, C_{5'}); 55.30 (4C, CH₃O); 43.81 (s, 4C, 4 x OCH₂CH₂CN); 43.59 (8C, 8 x NCH(CH₃)₃); 39.47 (3C, C_{2'}); 39.03 (1C, C_{2'}); 24.93 (s, 16C, 16 x NCH(CH₃)₂); 13.00 (3C, C_{7'}); 12.36 (1C, C_{7'});

³¹P-NMR (MHz, C₆D₆, 1H-entkoppelt) δ [ppm] = 150.30 (s, 1P, Amidit); 150.21 (s, 1P, Amidit); 149.79 (s, 1P, Amidit); 149.63 e15.83 (s, 2P, Phth); 15.65 (s, 2P, Phth);

7.8.11 Darstellung von (S_P)-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidyl-[5'→3']-thymidylphthalidyl-3'-O-(diisopropyl-β-cyanoethyl)phosphoamidit (S_P)-30

Die Synthese von (S_P)-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidyl-(5'→3')-thymidylphthalidyl-3'-O-(diisopropyl-2-cyanoethyl)phosphoamidit (S_P)-**85** wurde analog der Synthese des R_P-Diastereomers (R_P)-**85** durchgeführt. Es wurden 200 mg (0.207mmol, 964.91 mol/g) mit 91.5 mg (mmol, 301.41 mol/g) 2-Cyanoethoxy-bis(*N,N*-diisopropylamino)phosphin **67** und 1.23 mL einer 1 molaren Lösung von 4,5-Dicyanoimidazol in umgesetzt.

Ausbeute: 174 mg (0.149 mmol, 72 %)

farbloser Schaum

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) R_f = 0.58

¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆) δ [ppm] = 7.83-7.72 (m, Ar); 7.69-7.09 (m, Ar); 6.86-8.81 (m, Ar); 6.52 (dd, 1H, ³J_{H1'-H2'} = 4.7 Hz, ³J_{H1'-H2''} = 4.7 Hz, H_{1'}); 6.50 (dd, 1H, ³J_{H1'-H2'} = 6.5 Hz, ³J_{H1'-H2''} = 6.5 Hz, H_{1'}); 6.31 (dd, 1H, ³J_{H1'-H2'} = 6.3 Hz, ³J_{H1'-H2''} = 6.3 Hz, H_{1'}); 6.30 (2H, 2 x H_{1'}); 6.26 (dd, 1H, ³J_{H1'-H2'} = 6.8 Hz, ³J_{H1'-H2''} = 6.8 Hz, H_{1'}); 6.13 (dd, 1H, ³J_{H1'-H2'} = 6.5 Hz, ³J_{H1'-H2''} = 6.5 Hz, H_{1'}); 6.07 (dd, 1H, ³J_{H1'-H2'} = 7.1 Hz, ³J_{H1'-H2''} = 7.1 Hz, H_{1'}); 5.69 (d, 1H, ³J_{α-CH-P} = 9.6 Hz, α-CH); 5.67 (d, 1H, ³J_{α-CH-P} = 9.6 Hz, α-CH); 5.65 (d, 1H, ³J_{α-CH-P} = 10.7 Hz, α-CH); 5.62 (d, 1H, ³J_{α-CH-P} = 10.6 Hz, α-CH); 5.60

(dddd, 1H, H_{3'}); 5.58 (dddd, 1H, H_{3'}); 5.25(dddd, 1H, H_{3'}); 5.20 (dddd, 1H, H_{3'}); 4.71 (ddd, 1H, H_{3'}); 4.70 (ddd, 1H, H_{4'}); 4.69 (ddd, 1H, H_{3'}); 4.43 (ddd, 1H, H_{3'}); 4.41 (ddd, 1H, H_{3'}); 4.40 (ddd, 1H, H_{4'}); 4.38 (ddd, 1H, H_{4'}); 4.35 (ddd, 1H, H_{4'}); 4.31 (s, 24H, OCH₃); 4.26 (ddd, 1H, H_{4'}); 4.25 (ddd, 1H, H_{4'}); 4.21 (ddd, 1H, H_{4'}); 3.95 (ddd, 1H, H_{4'}); 3.58 (m, 4H, H_{5'}+H_{5''}); 3.57 (m, 2H, H_{5'}+H_{5''}); 3.55-3.45 (m, 8H, OCH₂CH₂CN); 3.41 (m, 1H, H_{5'}); 3.48 (m, 2H, H_{5'}+H_{5''}); 3.39 (m, 1H, H_{5''}); 3.35(m, 8H, OCH₂CH₂CN); 3.36 (m, 2H, H_{5'}+H_{5''}); 3.23 (m, 2H, H_{5'}+H_{5''}); 3.11 (tt, 2H, ³J = 6.8 Hz, NCH(CH₃)₃); 3.07 (tt, 2H, ³J = 6.8 Hz, NCH(CH₃)₃); 3.12 (t, 2H, ³J = 6.8 Hz, OCH₂CH₂CN); 3.11 (t, 2H, ³J = 6.8 Hz, OCH₂CH₂CN); 3.07 (t, 2H, ³J = 7.1 Hz, OCH₂CH₂CN); 3.06 (t, 2H, ³J = 7.1 Hz, OCH₂CH₂CN); 2.64 (ddd, 1H, H_{2'}); 2.62 (ddd, 1H, H_{2'}); 2.51 (ddd, 1H, H_{2''}); 2.47 (ddd, 1H, H_{2''}); 2.43 (ddd, 1H, H_{2'}); 2.33 (ddd, 1H, H_{2''}); 2.31 (ddd, 1H, ²J_{H2'-H2''} = 11.6 Hz, ³J_{H2''-H3'} = 5.0 Hz, H_{2'}); 2.29 (ddd, 1H, H_{2'}); 2.18 (ddd, 1H, H_{2''}); 2.16 (ddd, 1H, H_{2'}); 2.15 (ddd, 1H, H_{2''}); 2.08 (ddd, 1H, ²J_{H2'-H2''} = 12.0 Hz, ³J_{H2''-H3'} = 3.3 Hz, H_{2''}); 2.07 (4H, H_{2'}); 2.03 (2H, H_{2'}); 1.59 (d, 1H, ⁴J_{H7-H6} = 1.2 Hz, H₇); 1.19 (d, 1H, ⁴J_{H7-H6} = 1.2 Hz, H₇); 1.18 (d, 1H, ⁴J_{H7-H6} = 1.2 Hz, H₇); 1.07 (d, 12H, NCH(CH₃)₂); 1.03 (d, 12H, NCH(CH₃)₂)

¹³C-NMR (202 MHz, C₆D₆) δ [ppm] = 134.92 (Ar); 134.06 (Ar); 130.39 (Ar); 128.63 (Ar); 128.12 (Ar); 127.98 (Ar); 125.81(Ar); 123.43 (Ar); 86.12 (s, 1C, C_{1'}); 85.90 (s, 2C, 2 x C_{1'}); 84.87 (s, 2C, 2 x C_{1'}); 84.82 (s, 4C, 4 x C_{4'}); 84.35 (s, 3C, 3 x C_{1'}); 84.38 (s, 2C, 2 x C_{4'}); 83.95 (s, 1C, C_{4'}); 83.73 (s, 1C, C_{4'}); 78.74 (s, 2C, 2 x C_{3'}); 78.31 (s, 2C, 2 x C_{3'}); 75.06 (s, 2C, α-C); 73.54 (s, 2C, 2 x C_{3'}); 72.45 (s, 2C, 2 x C_{3'}); 63.34 (s, 2C, 2 x C_{5'}); 63.12 (s, 2C, 2 x C_{5'}); 58.35 (s, 4C, 4 x C_{5'}); 57.49 (s, 4C, 4 x C_{5'}); 45.12 (s, 12C, 4 x OCH₂CH₂CN + 8 x NCH(CH₃)₃); 43.39 (s, 4C, 4 x OCH₂CH₂CN); 39.27 (s, 3C, 3 x CH_{2'}); 38.83 (s, 5C, 5 x C_{2'}); 30.16 (s, 2c, 2 x C₇); 29.72 (s, 2c, 2 x C₇); 22.35 (s, 16C, 16 x NCH(CH₃)₂)

³¹P-NMR (MHz, C₆D₆, 1H-entkoppelt) δ [ppm] = 150.22 (s, 1P, Am), 149,74 (s, 1P, Am), 15.711 (s, 1P, Phth), 14.97 (s, 1P, Phth)

R/S MS (FAB⁺) Matrix/MNBA: m/z = 1165.6 [M+H]⁺

7.8.12 Darstellung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)thymidyl-3'-O-(*N,N*-diisopropyl-2-cyanoethyl)phosphoamidit (87)

Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Es wurden 200 mg (0.367 mmol, 544.22 g/mol) 5'-O-(4,4'-Dimethyltriphenylmethyl)thymidin **79** zweimal mit je 5 mL trockenem Acetonitril koevaporiert und in 10 mL trockenem Acetonitril gelöst. Anschließend wurden nacheinander 2.17 mL (0.50 mmol) einer 0.23 molaren 4,5-Dicyanoimidazol-Lösung in trockenem THF und 150 mg (0.50 mmol, 301.41 g/mol) 2-Cyanoethoxybis(*N,N*-diisopropylamino)phosphin **67** hinzugegeben und 90 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 30 mL Dichlormethan verdünnt und zweimal mit je 20 mL 5 %iger wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde chromatographisch (Alox neutral, Aktivitätsstufe 3) mit einem Dichlormethan/Methanol-Gradienten (0-4%), dem 1 % Triethylamin beigefügt war.

Ausbeute: 199 mg (0.267 mmol, 73 %)

farbloser Schaum

$C_{40}H_{49}N_4O_8P = 744.81$ g/mol

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 v/v) R_f (Diast.1) = 0.67, R_f (Diast.2) = 0.81

1H -NMR (400 MHz, C_6D_6) δ [ppm] = 10.19 (s, 2H, NH); 7.57-7.56 (m, 4H, Trityl); 7.42-7.39 (m, 8H, Trityl); 7.16-7.03 (m, 8H, Trityl); 6.78-6.74 (m, 8H, Trityl); 7.49 (d, 1H, H6); 7.48 (d, 1H, H6); 6.56 (dd, 1H, $^3J_{H1'-H2'} = 6.0$ Hz, $^3J_{H1'-H2''} = 7.3$ Hz, H1'A); 6.55 (dd, 1H, $^3J_{H1'-H2'} = 6.9$ Hz, $^3J_{H1'-H2''} = 6.8$ Hz, H1'B); 4.75 (dddd, 1H, $^3J_{H3'-H2'} = 3.0$ Hz, $^3J_{H3'-H2''} = 6.7$ Hz, $^3J_{H3'-H4'} = 3.2$ Hz, $^3J_{H3'-P} = 6.3$ Hz, H3'A); 4.73 (dddd, 1H, $^3J_{H3'-H2'} = 6.9$ Hz, $^3J_{H3'-H2''} = 6.9$ Hz, $^3J_{H3'-H4'} = 3.2$ Hz, $^3J_{H3'-P} = 6.3$ Hz, H3'B); 4.23 (ddd, 1H, $^3J_{H4'-H5'} = 2.9$ Hz, $^3J_{H4'-H5''} = 3.5$ Hz, H4'B); 4.18 (ddd, 1H, $^3J_{H4'-H5'} = 2.9$ Hz, $^3J_{H4'-H5''} = 3.5$ Hz, H4'A); 3.27-3.19 (m, 2H, POCH₂CH₂CN); 3.17-3.11 (m, 2H, POCH₂CH₂CN); 3.61 (dd, 1H, $^3J_{H5'-H5''} = 10.5$ Hz, H5'B); 3.55 (dd, 1H, $^3J_{H5'-H5''} = 10.5$ Hz, H5'A); 3.48 3.42 (m, 2H, N(CH(CH₃)₂)₂); 3.41 (dd, 1H, H5''B); 3.38 (dd, 1H, H5''A); 3.34 (s, 3H, OCH₃); 3.33(s, 3H, OCH₃); 3.32 (s, 3H, OCH₃); 3.31 (s, 3H, OCH₃); 2.48 (ddd, 1H, $^3J_{H2'-H2''} = 13.5$ Hz, H2'A); 2.24 (ddd, 1H, $^3J_{H2'-H2''} = 13.6$ Hz, H2'B); 2.32 (ddd, 1H, H2''A); 2.25 (ddd, 1H, H2''B); 1.86 (dt, 2H, $^4J_{H-P} = 1.5$ Hz, $^3J_{H-H} = 5.8$ Hz, POCH₂CH₂CN); 1.72 (t, 2H, $^3J_{H-H} = 5.8$ Hz, POCH₂CH₂CN); 1.59 (d, 3H,

$^3J_{H7-H6} = 1.1$ Hz, H7); 1.58 (d, 3H, $^3J_{H7-H6} = 1.0$ Hz, H7); 1.10 (d, 6H, $^3J_{CH_3-CH} = 6.8$ Hz, N(CH(CH₃)₂)₂); 1.09 (d, 12H, $^3J_{CH_3-CH} = 6.8$ Hz, N(CH(CH₃)₂)₂); 0.99 (d, 6H, $^3J_{CH_3-CH} = 6.8$ Hz, N(CH(CH₃)₂)₂)

^{13}C -NMR (202 MHz, C₆D₆) δ [ppm] = 163.97 (1C, C₄); 163.92 (1C, C₄); 151.02 (1C, C₂); 150.98 (1C, C₂); 135.34 (2C, C₆); 130.67 (Trityl); 130.65 (Trityl); 128.70 (Trityl); 127.34 (Trityl); 130.61 (Trityl); 113.63 (4C, Trityl); 111.31 (1C, C₅); 111.24 (1C, C₅); 87.27 (TritylC); 85.74 (1C, C_{4'}); 85.70 (1C, C_{4'}); 85.31 (1C, C_{1'}); 85.25 (1C, C_{1'}); 74.11 (1C, C_{3'}); 73.96 (1C, C_{3'}); 63.71 (1C, C_{5'}); 63.62 (1C, C_{5'}); 58.69 (1C, N(CH(CH₃)₂)₂); 58.56 (1C, N(CH(CH₃)₂)₂); 58.51 (1C, N(CH(CH₃)₂)₂); 58.31 (1C, N(CH(CH₃)₂)₂); 54.86 (1C, OCH₃); 54.83 (1C, OCH₃); 43.49 (1C, POCH₂CH₂CN); 43.43 (1C, POCH₂CH₂CN); 40.25 (1C, C_{2'}); 39.98 (1C, C_{2'}); 24.67 (1C, N(CH(CH₃)₂)₂); 24.63 (1C, N(CH(CH₃)₂)₂); 24.60 (1C, N(CH(CH₃)₂)₂); 24.56 (3C, N(CH(CH₃)₂)₂); 24.49 (1C, N(CH(CH₃)₂)₂); 20.11 (1C, POCH₂CH₂CN); 19.97 (1C, POCH₂CH₂CN); 12.26 (2C, C₇)

IR ν [cm⁻¹] (KBr) = 3415, 3189, 3058, 2966, 2930, 2251, 2047, 1693, 1607, 1582, 1508, 1464, 1397, 1364, 1251, 1178, 1154, 1033, 977, 892, 828, 791, 755, 726, 702, 635, 584, 557, 522, 418

7.9 DARSTELLUNG DER 3-ME-CYCLOSAL-VERBINDUNGEN

7.9.1 Darstellung von 3-MethylcycloSal-2'-desoxy-2'-ara-fluoro-zebularinmonophosphat (65)

Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Es wurden 100 mg (0.434 mmol, 230.19 g/mol) 2'-Dedoxy-2'-ara-fluoro-zebularin **64** zweimal mit 4 mL trockenem Acetonitril koevaporiert und in 1 mL trockenem THF und 2 mL trockenem DMF gelöst und auf -20 °C abgekühlt. Zu dieser Lösung wurden nacheinander langsam 112 mg (0.868 mmol, 0.148 mL, 129.25 g/mol, 0.755 g/cm³) trockenes Diisopropylethylamin (Hünig Base, DIPEA) und 99.0 mg 5*H*-2-Chloro-8-methylbenzo[3,4-*b*][2,6,1]dioxaphosphinin **68** (0.520 mmol) gegeben. Nachdem sich die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt hatte, lässt man diese eine weitere Stunde rühren und kühlt sie erneut auf -20 °C ab. Anschließend wurden

langsam 0.260 mL (1.30 mmol) einer 5 molaren Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan zu der Reaktionslösung gegeben und nach Erwärmung auf Raumtemperatur 1 Stunde gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukts wurde durch zweifache Chromatographie gesäubert (1. Ethyacetat /Methanol 9:11 v/v, 0.1% Essigsäure; 2. Dichlormethan/Methanolgradient 0–4%, 0.1% Essigsäure; Chromatotron, 1 mm Trennschicht). Zur besseren Handhabung wurde das saubere Produkt aus einer Wasser/Acetonitril-Lösung gefrieretrocknet.

Ausbeute: 72 mg (0.175 mmol, 40 %)

farblose Watte

$C_{17}H_{18}FN_2O_6P = 412.31$ g/mol

DC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1 v/v) $R_f = 0.40$

1H -NMR (400 MHz, $DMSO-D_6$) δ [ppm] = 8.62 (s, 1H, H_4); 8.09 (s, 1H, H_4); 7.27-7.26 (m, 2H, 2 x Ar); 7.11-7.10 (m, 2H, 2 x Ar); 6.47-6.44 (m, 2H, 2 x Ar); 6.47-4.44 (m, 2H, Ar); 6.17 (dd, 1H, $^3J_{H_1'-H_2'} = 7.2$ Hz, $^3J_{H_1'-F} = 5.0$ Hz, H_1'); 6.13 (dd, 1H, $^3J_{H_1'-H_2'} = 3.3$ Hz, $^3J_{H_1'-F} = 5.7$ Hz, H_1'); 5.51 (d, 1H, $^2J_{H-P} = 17.3$ Hz, H-Benzyl); 5.48 (d, 1H, $^2J_{H-P} = 17.4$ Hz, H-Benzyl); 5.43 (dd, 1H, $^2J_{H_5'-H_5''} = 10.0$ Hz, $^3J_{H_5'-H_4'} = 3.1$ Hz, H_5'); 5.41 (dd, 1H, $^2J_{H_5'-H_5''} = 9.8$ Hz, $^3J_{H_5'-H_4'} = 3.2$ Hz, H_5'); 5.19 (dd, 1H, $^3J_{H_3'-H_2'} = 3.0$ Hz, $^3J_{H_3'-H_4'} = 4.9$ Hz, H_3'); 5.01 (dd, 1H, $^3J_{H_3'-H_2'} = 2.3$ Hz, $^3J_{H_3'-H_4'} = 5.3$ Hz, H_3'); 4.45 (ddd, 1H, $^2J_{H_2'-F} = 11.4$ Hz, H_2'); 4.17 (m, 2H, 2 x H_4'); 2.22 (s, 3H, H_7); 2.20 (s, 3H, H_7); 2.08 (s, 6H, 2 x CH_3);

^{13}C -NMR (202MHz, $DMSO-D_6$) δ [ppm] = 124.49, 121.70, 93.87 (1c, C_1'), 95.33 (1C, C_1'), 86.55 (1C, C_3'), 86.54 (1C, C_4'), 86.03 (1C, C_3'), 83,37 (2C, C_2'), 74.09 (1C, C_4'),

^{31}P -NMR (entkoppelt)($DMSO-D_6$) δ [ppm] = 7.72 (s, 2 x P)

^{19}F -NMR (entkoppelt) (MHz, $DMSO-D_6$) δ [ppm] = -199.08 (s, 1F); -199.16 (s, 1F);

7.9.2 Darstellung von 3-Methyl-cycloSal-4-*N,N'*-dimethylhydrazinylthymidinmonophosphat (66)

Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Es wurden 75 mg (0.263 mmol, 284.21 g/mol) 4-*N,N'*-Dimethylhydrazinylthymidin **62** zweimal mit 4 mL trockenem Acetonitril koevaporiert und in 1 mL trockenem THF und 2 mL trockenem DMF gelöst und auf -20 °C abgekühlt. Zu dieser Lösung wurden nacheinander langsam 72.2 mg (0.559 mmol, 0.097 mL, 129.25 g/mol, 0.755 g/cm³) trockenes Diisopropylethylamin (Hünig Base, DIPEA) und 63.54 mg 5*H*-2-Chloro-8-methylbenzo[3,4-*b*][2,6,1]dioxaphosphinin **68** (0.334 mmol) gegeben. Nachdem sich die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt hatte, lässt man diese eine weitere Stunde rühren und kühlt sie erneut auf -20 °C ab. Anschließend wurden langsam 0.167 mL (0.837 mmol) einer 5 molaren Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan zu der Reaktionslösung gegeben und nach Erwärmung auf Raumtemperatur 1 Stunde gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukts wurde durch zweifache Chromatographie gesäubert (1. Ethylacetat/Methanol 9:11 v/v, 0.1% Essigsäure; 2. Dichlormethan/Methanolgradient 0–4%, 0.1% Essigsäure; Chromatotron, 1 mm Trennschicht). Zur besseren Handhabung wurde das saubere Produkt aus einer Wasser/Acetonitril-Lösung gefriergetrocknet.

Ausbeute: 52 mg (0.111 mmol, 42 %)

farblose Watte

C₂₀H₂₇N₄O₇P = 466.42 g/mol

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) R_f = 0.36

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 9.44 (s, 2H, NH), 7.11-7.08 (m, 6H, Ar), 6.11 (dd, 1H, ³J_{H1'-H2'} = 7.2 Hz, ³J_{H1'-H2''} = 7.2 Hz, H_{1'B}), 6.10 (dd, 1H, ³J_{H1'-H2'} = 7.1 Hz, ³J_{H1'-H2''} = 7.1 Hz, H_{1'B}), 5.12 (dddd, 1H, H_{3'}), 5.10 (dddd, 1H, H_{3'}), 4.40 (ddd, 1H, ²J_{H5'-H5''} = 11.5 Hz, ³J_{H5'-H4'} = 2.8 Hz, ³J_{H5'-HP} = 6.8 Hz, H_{5'}), 4.34 (ddd, 1H, ²J_{H5'-H5''} = 10.6 Hz, ³J_{H5'-H4'} = 3.9 Hz, ³J_{H5'-HP} = 5.5 Hz, H_{5'}), 4.33 (ddd, 1H, ³J_{H5'-H4'} = 1.4 Hz, ³J_{H5'-HP} = 5.8 Hz, H_{5''}), 4.30 (ddd, 1H, ³J_{H5'-H4'} = 2.2 Hz, ³J_{H5'-HP} = 6.8 Hz, H_{5''}), 4.22 (ddd, 1H, H_{4'}), 4.15 (ddd, 1H H_{4'}), 2.36 (m, 4H, H_{2'+H2''})

¹³C-NMR (202MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 166.74 (2C, C₄), 154.12 (2C, C₂), 147.80 (1C, C_{Ar}), 147.72 (1C, C_{Ar}), 144.58 (2C, C₆), 130.84 (2C, C_{Ar}), 126.86 (2C, C_{Ar}), 123.96 (1C, C₅), 123.52 (1C, C₅) 120.88 (1C, C_{Ar}), 120.7 (1C, C_{Ar}), 103.73 (1C, C_{Ar}), 103.69 (1C, C_{Ar}), 94.80 (1C, C_{1'}), 92.90 (1C, C_{1'}), 85.81 (1C, C_{3'}), 85.65 (1C, C_{3'}), 73.40 (1C, C_{4'}), 73.16 (1C, C_{4'}), 68.48 (1C, C_{5'}), 68.40 (1C, C_{5'}), 66.77 (2C, C_{Bz7}), 30.60 (2C, C_{2'}), 14.79 (1C, C_{Ar}), 14.76 (1C, C_{Ar})

³¹P-NMR (DMSO-D₆) δ [ppm] = -7.09 (s, 1P); -9.00 (s, 1P);

7.9.3 Darstellung von 3-MethylcycloSal-N¹-(β-D-2'-desoxyribosyl)-5-methylpyrimidin-2-onmonophosphat (63)

Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Es wurden 95.0 mg (0.419 mmol, 226.23 g/mol) N¹-(β-D-2'-Desoxyribosyl)-5-methylpyrimidin-2-on **29** zweimal mit 4 mL trockenem Acetonitril koevaporiert und in 1 mL trockenem THF und 2 mL trockenem DMF gelöst und auf -20 °C abgekühlt. Zu dieser Lösung wurden nacheinander langsam 108 mg (0.840 mmol, 0.143 mL, 129.25 g/mol, 0.755 g/cm³) trockenes Diisopropylethylamin (Hünig Base, DIPEA) und 102 mg 5*H*-2-Chloro-8-methylbenzo[3,4-*b*][2,6,1]dioxaphosphinin **68** (0.504 mmol, 202.57 g/mol) gegeben. Nachdem sich die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt hatte, lässt man diese eine weitere Stunde rühren und kühlt sie erneut auf -20 °C ab. Anschließend wurden langsam 0.285 mL (1.43 mmol) einer 5 molaren Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan zu der Reaktionslösung gegeben und nach Erwärmung auf Raumtemperatur 1 Stunde gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukts wurde durch zweifache Chromatographie gesäubert (1. Ethylacetat/Methanol 9:11 v/v, 0.1% Essigsäure; 2. Dichlormethan/Methanolgradient 0–4%, 0.1% Essigsäure; Chromatotron, 1 mm Trennschicht). Zur besseren Handhabung wurde das saubere Produkt aus einer Wasser/Acetonitril-Lösung gefriergetrocknet.

Ausbeute: 65 mg (0.159 mmol, 38%)

farblose Watte

C₁₈H₂₁N₂O₇P = 408.34 g/mol

DC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) R_f = 0.38

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 8.47 (d, ⁴J_{4,6} = 3.3 Hz, 1 H, H-4), 8.44 (d, ⁴J_{4,6} = 3.3 Hz, 1 H, H-4), 7.97 (dd, ⁴J_{6,CH3} = 0.8 Hz, 1 H, H-6), 7.96 (m, 1 H, H-6), 7.20 (m, 6 H, H-arom.), 6.10 (dd, ³J_{1',2'} = 6.6 Hz, ³J_{1',2''} = 6.4 Hz, 2 H, H-1'), 2.35 (m, 2 H, H-2'), 2.04 (m, 2 H, H-2'')

¹³C-NMR (d₆-DMSO, 400 MHz): δ/ppm = 168 2x C-4, 142 C-6, 141 C-6, 131 C-arom., 124 C-arom., 123 C-arom., 87 2x C-1', 86 2x C-4', 70 2x C-3', 69 2x C-B o. C-5', 68 2x C-B o. C-5', 40 2x C-2', 15 2x CH₃, 14 2x Me

³¹P-NMR (d₆-DMSO, 500 MHz): δ/ppm = -7.6 (m, 1 diastereomeres P), -7.7 (m, 1 diastereomeres P)

7.10 DARSTELLUNG EINZELNER REAGENZIEN

7.10.1 4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion (PTAD) (37)

Jeder Reaktionsschritt wurde unter strengem Lichtausschluss durchgeführt. Es wurden 10 g (56.4 mmol, 177.16 g/mol) 4-Phenyl-1,2,4-triazolidin-3,5-dion **68** in 400 mL Dichlormethan gelöst und mit einem Eisbad auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden portionsweise über 5 Minuten 21 g (0.118 mol, 177,89 g/mol) *N*-Bromsuccinimid gegeben und 30 Minuten bei 0°C gerührt, wobei sich die Reaktionslösung tief rot färbte. Anschließend wurde die Reaktionslösung solange (2-3 mal) mit je 300 mL destilliertem Wasser gewaschen, bis die organische Phase klar wurde. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingengt. Der noch verbliebene Bromwasserstoff wurde über 3 Tage unter Ölpumpenvakuum entfernt.

Ausbeute: 7.60 g (43.4 mmol, 77 %)

tief rote Kristalle

C₈H₅N₃O₂ = 175.14 g/mol

¹H-NMR (400 MHz) [ppm] = 7.44 (m, 5H, ar)

¹³C-NMR (202 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 130.31 (2C); 129.91 (1C); 124.37 (2C)

7.10.2 Darstellung von Dichloro-2-cyanoethoxyphosphin (89)

Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Es wurden 13.7 g (0.1 mmol, 8.55 mL, 137.33 g/mol, 1.574 g/cm³) Phosphortrichlorid in 8.1 mL (0.1 mmol, 79.1 g/mol, 0.98 g/cm³) trockenem Pyridin in 20 mL trockenem Diethylether gelöst. Nachdem die Lösung auf –78 °C (Ethanol/N₂) abgekühlt worden war, wurden langsam über 30 Minuten 6.8 mL (0.1 mmol, 7.1 g, 71.08 g/mol, 1.04 g/cm³) 3-Hydroxypropionitril hinzugegeben. Die Reaktion wurde auf Raumtemperatur erwärmt und über 12 Stunden gerührt. Anschließend wurde der Niederschlag unter Schutzgas abgetrennt und 2 mal mit je 10 mL trockenem Diethylether gewaschen. Nachdem das Lösungsmittel entfernt worden war, wurde das ölige Rohprodukt unter Vakuum getrocknet. Die Reinigung erfolgte mittels Kugelrohrdestillation.

Ausbeute: 13.5 g (79 mmol, 79 %)

C₃H₄Cl₂NOP = 171.95 g/mol

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 4.35 (t, 2H, ³J = 6.0 Hz, CH₂O); 2.77 (t, 2H, CH₂CN)

¹³C-NMR (202 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 116.50 (s, 1C, CN); 62.17 (s, 1C, CH₂O); 1973 (s, 1C, CH₂CN)

³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 178.65 (s)

7.10.3 Darstellung von 2-Cyanoethoxybis(*N,N*-diisopropylamino)-phosphin (67)

Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Es wurden 13.5 g (79 mmol) Dichloro-2-cyanoethoxyphosphin **89** in 50 mL trockenem Diethylether gelöst und auf –10 °C abgekühlt. Nachdem zu dieser Lösung langsam über 30 Minuten 21.1 mL (0.15 mmol, 29.4 g, 101.19 g/mol, 0.717 g/cm³) Diisopropylamin gegeben worden waren, wurde sie für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das ausgefallene Hydrochlorid wurde unter Schutzgas abfiltriert und 2 mal mit je 10 mL trockenem Diethylether gewaschen. Nachdem das Lösungsmittel unter Vakuum

entfernt worden war, wurde das Produkt mittels Kugelrohrdestillation unter Stickstoff gereinigt, wobei 0.5 g Calciumhydrid vorgelegt worden waren.

Ausbeute: 12.8 g (42 mmol, 54 %)

$C_{15}H_{32}N_3OP = 301.41 \text{ g/mol}$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 4.35 (m, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CN}$); 4.15-4.07 (bm, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$); 3.08-3.04 (m, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O}$); 1.60-1.58 (m, 12H, $\underline{\text{C}}\text{H}_3$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (202 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 117.13 (m, 1C, $\underline{\text{C}}\text{N}$); 60.45 (s, 1C, $\underline{\text{C}}\text{CN}$); 46.40 (m, 4C, $\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 24.10 (m, 2c, $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_2$); 20.22(s, 1C, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CN}$)

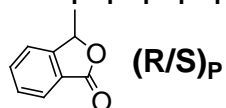
$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 177.34 (s)

7.11 SYNTHESE DER OLIGONUCLEOTIDE

7.11.1 Synthetisierte Oligonucleotide

7.11.1.1 ODN-1

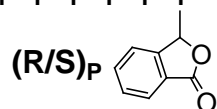
3'- $\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p$ -5'



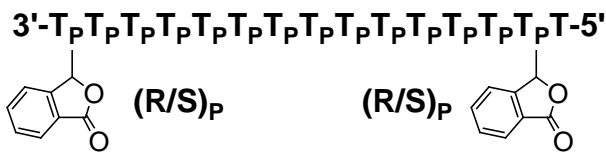
MALDI-TOF (ATT): $[\text{M-H}]^- = 4615 \text{ m/z}$

7.11.1.2 ODN-2

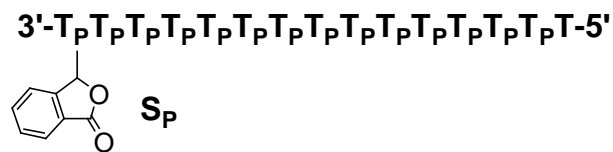
3'- $\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p\text{T}_p$ -5'



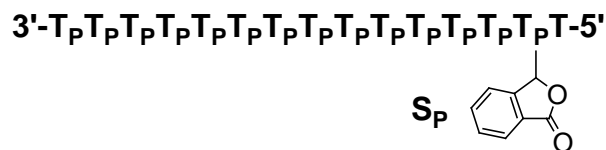
MALDI-TOF (ATT): $[\text{M-H}]^- = 4615 \text{ m/z}$

7.11.1.3 ODN-3

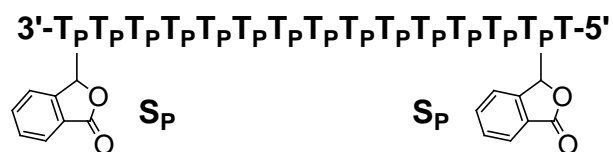
MALDI-TOF (ATT): [M-H]⁻ = 4734 m/z

7.11.1.4 ODN-4

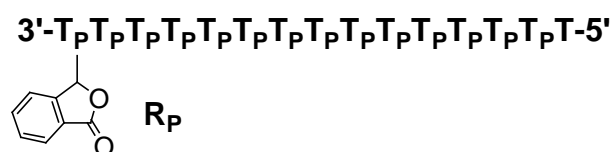
MALDI-TOF (ATT): [M-H]⁻ = 4616 m/z

7.11.1.5 ODN-5

MALDI-TOF (ATT): [M-H]⁻ = 4615 m/z

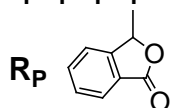
7.11.1.6 ODN-6

MALDI-TOF (ATT): [M-2H]²⁻ + K⁺ = 4770 m/z

7.11.1.7 ODN-7

MALDI-TOF (ATT): [M-H]⁻ = 4616 m/z

7.11.1.8 ODN-8

MALDI-TOF (ATT): $[M-H]^- = 4616 \text{ m/z}$

7.11.1.9 ODN-9

MALDI-TOF (ATT): $[M-H]^- = 4735 \text{ m/z}$

7.11.2 DNA-Syntheser-Protokoll

Syntheseschritt	Kupplung Thymidin	Kupplung Modifikation
1. Entschützung	detr02	detr02
2. Waschen	wash02	wash02
3. Kupplung	coupop02	coupop02
4. Capping	cap02	capfpm
5. Oxidation	oxi02	oxifpm
6. Capping	-	capfpm
7. Waschen	wash02	wash02

Tabelle 17: Synthesecyclus

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 Mix	TCA	TCA	GAS	TCA	TCA	GAS	TCA	TCA	GAS	TCA	TCA	GAS	GAS
Dest	dmt	dmt	dmt	dmt	dmt	dmt	dmt	dmt	dmt	dmt	dmt	dmt	dmt
Opto		yes			yes			yes			yes		
Delay/s		6			6			6			6		

Tabelle 18: detr02

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		yes			yes		
Delay/s							

Tabelle 19: wash02

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					yes	yes			
Delay/s				60					
Table			1					4	

Tabelle 20: coupop02

Nr./AND	A	T	C	G	Z
1	cobrstla	cobrstla	cobrstla	cobrstla	cofmpm

Tabelle 21: Table zu coupop02

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	cb	mw	mw	mw
Opto	yes		yes			
Delay/s	15		15			

Tabelle 22: Cobrstla

Step	1	2	3	4	5	6	7	8
Vol		10	1	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	yes		yes		yes			
Delay/s	60		60		60			

Tabelle 23: cofmpm

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	cb	cb	cb	cb	cb	cb	cb	mw
Opto		yes		yse			yes		
Delay/s		3	3	8					

Tabelle 24: cap02

Step	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Vol	50		50		80	20		80	10
Source	CPA	CPA	CPA	CPA	GAS	ACN	ACN	GAS	GAS
Mix	CPB	CPB	CPB	CPB					
Dest	cb	cb	Cb	cb	cb	cb	cb	cb	mw
Opto		yes		yse			yes		
Delay/s		30		30					

Tabelle 25: capfmp

Step	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Vol	15		8		80	20		80	10
Source	OXI	OXI	OXI	OXI	GAS	ACN	ACN	GAS	GAS
Mix									
Dest	cb	cb	cb	cb	cb	cb	cb	cb	mw
Opto		yes		yes			yes		
Delay/s		2	2	6					

Tabelle 26: oxid02

Step	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Vol	120		3		80	20		80	10
Source	OXI	OXI	GAS	OXI	GAS	ACN	ACN	GAS	GAS
Mix									
Dest	cb	cb	cb	cb	cb	cb	cb	cb	mw
Opto		yes		yse			yes		
Delay/s		1	2	1					

Tabelle 27: oxidfmp

TCA = Trichloressigsäure; dmt = Auslauf für den Trityl-Assay; mw = manifold waste; cb = column botton; ct = = column top; AMD = Phosphoramidit; TET = Aktivator; CPA = Cap A; CPB = Cap B; OXI = Oxidizer-Lösung; Z = modifiziertes Phosphoramidi

7.11.3 Belegung des Trägers

Allgemeine Arbeitsvorschrift (siehe 4.3.2, S.78):

Die Trägerbelegung wurde unter strengem Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. Zur Herstellung der Bis-1,2,4-triazoloxalat-Lösung wurden zunächst 158 mg (2.3 mmol) Triazol zweimal mit je 5 mL trockenem Acetonitril coevaporiert und in 4 mL trockenem Acetonitril gelöst. Zu dieser Lösung wurden 40 μ L (0.46 mmol) Oxalylchlorid bei Raumtemperatur gegeben (0.4 mL einer Lösung von 0.2 mL Oxalylchlorid in 1.8 mL trockenem Acetonitril), wobei sich ein farbloser Niederschlag bildete, der durch Zugabe von 0.2 mL trockenem Pyridin in Lösung gebracht wurde. Separat wurden 20 mg (0.0207 mmol) des jeweiligen zweifach geschützten Phthalidylphosphonatdimers **85** zwei mal mit je 2 mL trockenem Pyridin coevaporiert und in 0.2 mL trockenem Pyridin und 0.4 mL trockenem Acetonitril gelöst. Zu dieser Lösung wurden 0.4 mL der Bis-1,2,4-triazoloxalat-Lösung gegeben und 75 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden zu dieser Lösung 100 mg LCAA-CPG-Träger gegeben, welcher zuvor zweimal mit je 2 mL trockenem Acetonitril coevaporiert worden war. Die Reaktionslösung wurde 3.5 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen und alle 15 min leicht geschwenkt. Der beladene LCAA-CPG-Träger abfiltriert, mit 5 mL Acetonitril gewaschen und für 15 min bei Raumtemperatur in eine 5 %ige Lösung von Essigsäure in Methanol gegeben. Der wiederum mit Acetonitril gewaschene Träger wurde anschließend mit 2 mL einer 1 zu 1 Mischung von Cap A und Cap B (Cap A: 10 % Essigsäureanhydrid in 1 zu 1 THF/Lutidine, Cap B: 10 % 1-Methylimidazol in THF) über 10 min bei Raumtemperatur behandelt. Zuletzt wurde der Träger nacheinander mit Pyridin und Acetonitril gewaschen und im Vakuum getrocknet.

7.11.4 Messung der Trägerbelegung

Zur Messung der Trägerbelegung wurde ca. 1 mg des belegten LCAA-CPG-Trägers abgewogen und über 10 min in einer 0.1 molaren p-TSA-Lösung in Acetonitril bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend wurde von dieser Lösung die Extinktion bei $\lambda = 490$ nm gemessen. Mit Hilfe der in Abschnitt 4.3.3 (S.80) angegebenen Formel lässt sich aus der Extinktion die Belegung des Trägers berechnen.

7.11.5 Entschützung und Abspaltung des Oligonucleotids von dem *LCAA*-CPG-Träger

Allgemeine Arbeitsvorschrift (siehe 4.3.5, S.84):

Zur Entschützung der Phosphatgruppen des entsprechenden Oligonucleotids wurde der noch beladene *LCAA*-CPG-Träger über 14 Stunde mit Diethylamin bei Raumtemperatur behandelt. Anschließend wurde der Träger abfiltriert, mit 5 mL Acetonitril gewaschen und zweimal mit je 2 mL trockenem Acetonitril coevaporiert. Zur Abspaltung des Oligonucleotids wurde zu dem Träger unter Schutzgas 0.3 mL einer trockenen kaltgesättigten metanolischen Ammoniak-Lösung gegeben. Nach 3.5 min wurde die Abspaltungsreaktion durch Anlegen eines Vakuums beendet.

8. ANHANG

8.1 ANHANG A

Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration des Phosphoratoms wurden in früheren Arbeiten^[103] aus den diastereomeren *H*-Posphonatdiestern (R_P)-**83** und (S_P)-**83** unter Retention der Konfiguration die Methylphosphonatdiester (R_P)-**115** und (S_P)-**115** dargestellt. Durch ROE-spektroskopische Untersuchungen dieser Methylphosphonatdiester konnte die absolute Konfiguration des Phosphoratoms bestimmt werden (Abb. 112, 113 und 114).

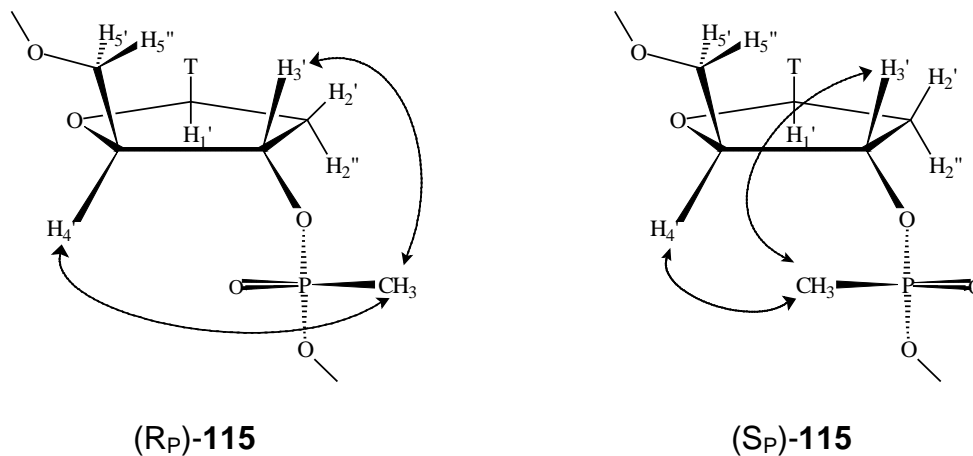


Abbildung 112: Erwartete NOE-Signale zwischen dem Methylphosphonat und der Ribosegruppe in Abhängigkeit der *P*-Konfiguration

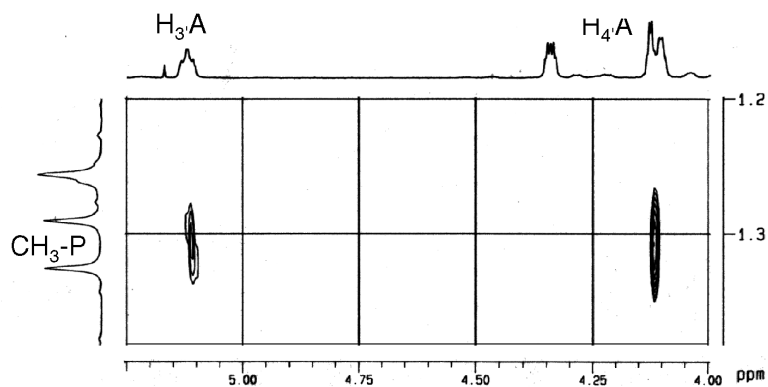


Abbildung 113: Ausschnitt aus dem ROE-Spektrum des (R_P)-Methylphosphonatdiesters „fast“-Isomer

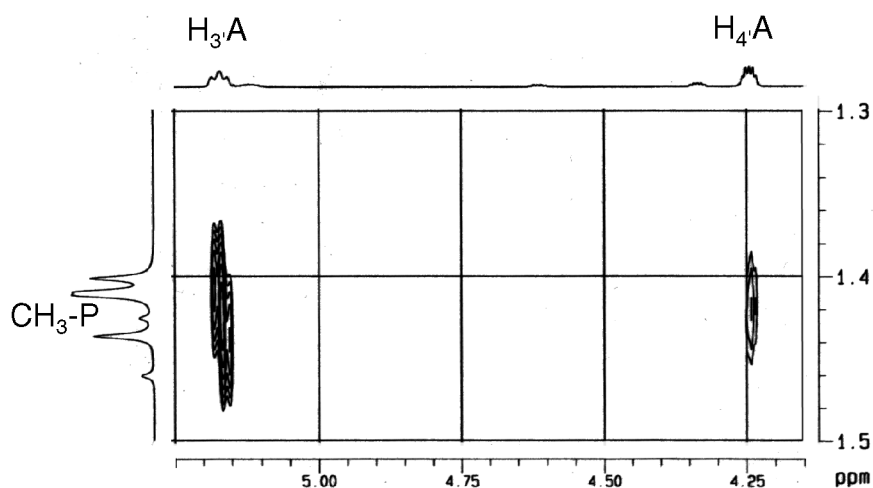


Abbildung 114: Ausschnitt aus dem ROE-Spektrum des (SP)-Methylphosphonatdiesters 3_{„slow“-Isomer}

8.2 Anhang B

HPLC-Diagramme der Trennung der α -C-Diastereomer der der 5'-O-DMTr-3'-O-TBDPS-Phthalidylphosphonatdiester (R_P)-**84** und (S_P)-**84** (Abb. 115) und der 5'-O-DMTr-Phthalidylphosphonatdiester (R_P)-**85** und (S_P)-**85** (Abb. 116)

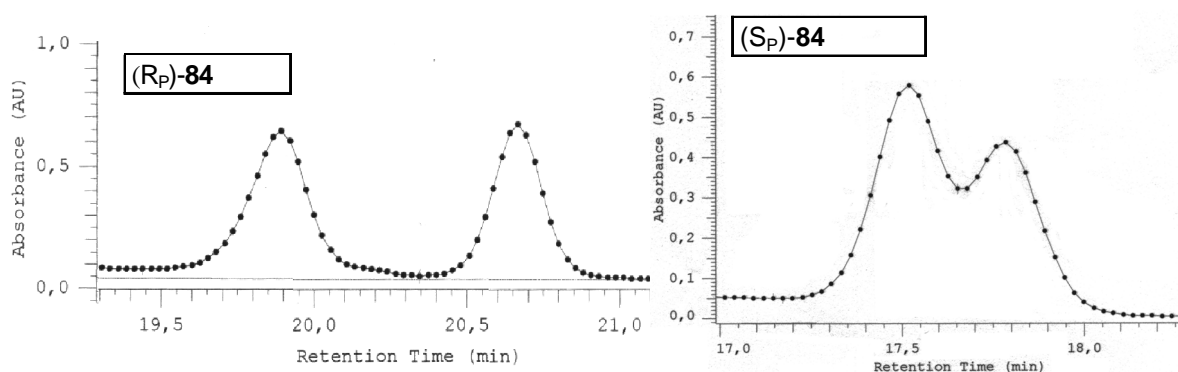


Abbildung 115: HPLC-Diagramme der 5'-O-DMTr-3'-O-TBDPS-Phthalidylphosphonate (R_P)-**84** (rechts) und (S_P)-**84** (links)

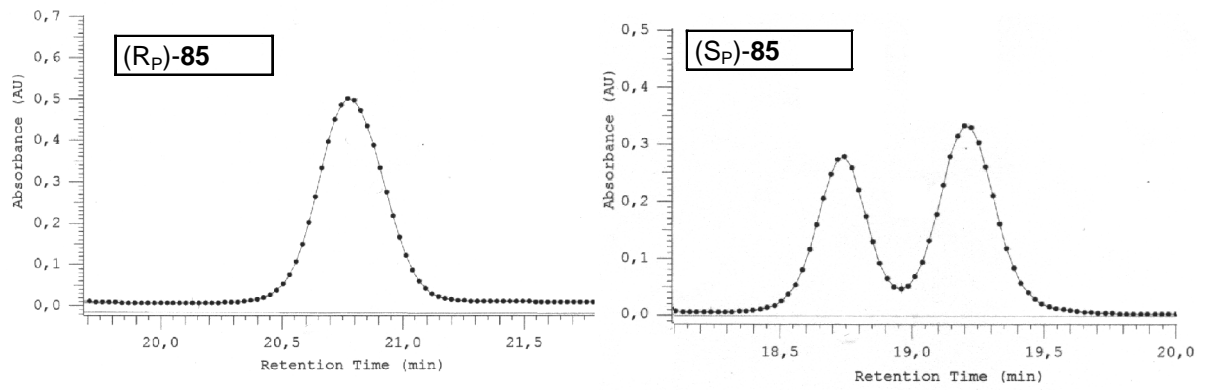


Abbildung 116: HPLC-Diagramme der 5'-O-DMTr-Phthalidylphosphonatdiester (*R_P*)-85 (rechts) und (*S_P*)-85 (links)

9. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] O. T. Avery, C. M. MacLeod, M. McCarty, Chemical Nature of the Substance inducing Transformation of Pneumococcal Types. I. Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction isolated from Pneumococcus Type III, *J. Exp. Med.*, **1944**, 79, 153-158
- [2] 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
- [3] M. McCarty, O. T. Avery, Chemical Nature of the Substance inducing Transformation of Pneumococcal Types. II. 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
- [4] E. Chargaff, S. Zamenhof, C. Green, Composition of Human Desoxyribonucleic Acid., *Nature*, **1950**, 165, 756-757
- [5] S. Zamenhof, G. Brawerman, E. Chargaff, On the Desoxyribonucleic Acid from Several Microorganisms, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1952**, 9, 402-405
- [6] J. B. Watson, F. H. C. Crick, Molecular Structure of Nucleic Acids, *Nature*, **1953**, 171, 737-738
- [7] R.E. Franklin, R.G. Gosling, Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate. *Nature*, **1953**, 171, 740-741
- [8] M.H. Wilkins, A.R. Stokes, H.R. Wilson, Molecular Structure of Deoxyribonucleic Acids, *Nature*, **1953**, 171, 738-740
- [9] F. Nagatsugi, S. Sasaki, Chemical Tools for Targeted Mutagenesis of DNA bases on Triple Helix Formation, *Biol. Pharm. Bull.*, **2004**, 27(4), 463-467
- [10] L. E. Xodo, S. Cogoi, V. Rapozz, Anti-Gen Strategies to down-regulate Gene Expression in Mammalian Cells, *Curr. Pharm. Res.*, **2004**, 10(7), 805-819

- [11] S. Buchini, C. J. Leumann, Recent Improvements in Antigene Technology, *Cuss. Opin. Chem. Biol.*, **2003**, 7(6), 717-726
- [12] P.C. Zamenic, 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
- [13] P.C. Zamenic, M.L. Stephenson, Inhibition of Rous Sarcoma viral RNA Translation by a specific Oligodeoxynucleotide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1978**, 75, 280
- [14] K. F. Pirollo A. Rait, L. S. Sleer, E. H. Chang, Antisense Therapeutics: From Theory to clinical Practice, *Pharmacol. Ther.*, **2003**, 99, 55-77
- [15] www.clinicaltrials.gov
- [16] C. M. Perry, J. A. Balfour, Fomivirsen, *Drugs*, **1999**, 57(3), 375-380
- [17] E. Wagner, B. Oberhauser, A. Holzner, H. Brunar, G. Issakides, G. Schaffner, M. Cotten, M. Knollmüller and C. R. Noe, A simple procedure for the preparation of protected 2'-O-methyl or 2'-O-ethyl ribonucleoside-3'-O-phosphoramidites, *Nucl. Acid Res.*, **1991**, 19(21), 5965-5971
- [18] C. Marvick, First 'antisense' Drug will treat CMV Retinitis, *J. Am. Med. Assoc.*, **1998**, 280, 871
- [19] B. M. Paterson, B. E. Roberts, E. L. Kuff, Structural Gene Identification and Mapping by DNA-mRNA hybrid arrested cell-free Translation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1977**, 74, 4370-4374
- [20] K. Bove, W. Szybalski, Patterns of Convergent and Overlapping Transcription within the B₂ Region of Coliphage λ, *Virology*, **1969**, 38, 614
- [21] R. W. Simons, N. Kleckner, Translational Control of IS10 Transposition, *Cell*, **1983**, 34, 683
- [22] P. Westermann, B. Gross, G. Hoinkis, Inhibition of Expression of SV40 Virus large T-Antigen by Antisense Oligodesoxyribonucleotides, *Biomed. Biochim. Acta*, **1989**, 48, 8-93

- [23] C. C. Smith, et al., Antiviral Effect of an Oligo(nucleotidemethyl-phosphonate)-complementary to the Splice Junction of Herpes Simplex Virus Type 1 immediate early pre-mRNAs 4 and 5, *Proc. Natl. Acad. Sic. USA*, **1993**, *90*, 8673-867
- [24] S.Agrawal et al., Oligodesoxynucleoside Phosphoramidates and Phosphor-thioates as Inhibition of Human Immunodeficiency Virus, *Proc. Natl. Acad. Sic. USA*, **1988**, *85*, 7079-7083
- [25] Rosolen et al., Antisense inhibition of single copy N-myc expression result in decreased cell growth without reduction of c-myc protein in a neuroepithelioma cell line, *Cancer Res.*, **1990**, 6316-6322
- [26] Vickers et al., Inhibition of HIV-LTR Gene Expression by Oligonucleotide targeted to the TAR Element, *Nucleic Acids. Res.*, **1991**, *19*, 3359-3368
- [27] J. Kundo, W. Adachi, S. Umeda, T. Sunami, A. Takenaka, Crystal structures of a DANN 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
- [28] Dalpke, A. and K. Heeg, CpG DNA as immune response modifier., *Int.J.Med.Microbiol.*, **2004**, 345-354
- [29] R. B. Wallace, J. Shaffer, R F. Murphy, J. Bonner, K. Itakura, Hybridization of Synthetic Oligodeoxyribonucleotides to Phi chi 174 DNA: The Effect of single Base Pair Mismatch, *Nucleic Acids Res.*, **1979**, *6(11)*, 3543-3557
- [30] S. L. Loke, C. A. Stein, X. H. Zhang, K. Mori, M. Nakanishi, C. Subasinghe, J. S. Cohen, L. M. Neckers, *Proc. Natl. Acad. Sic. USA*, **1989**, *86*, 3474
- [31] M. Sohail, E M Southern, Selecting optimal Antisense Reagents, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2000**, *44*, 23-34
- [32] W. F. Lima, V. BrownDriver, 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. N. Leffert, 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, *Nuc. Acids Res.*, **1996**, *24*, 1901-1907
- [34] A. Dalpke, S. Zimmermann, K. Keeg, Immunopharmacology of CpG DNA, *Biol. Chem.*, **2004**, *32(8)*, 2541-2549
- [35] 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 Quadplexes suggest a folding Mechanism of eight tandem Repeats, *Nucleic Acids Res.*, **2004**, *32(8)*, 2541-2549
- [36] Webb T. R., Matteucci M. D., Hybridization triggered Cross-Linking of Deoxyoligonucleotides, *Nucleic Acids Res.*, **1986**, *14*, 7661-7674
Webb T. R., Matteucci M. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 2764
- [37] J. W. Engels, E. Uhlmann, Synthesis, *Angew. Chem.*, **1989**, *101*, 733-762, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1989**, *28(6)*, 716-734
- [38] K. L. Agarwal, F. Riftina, Synthesis and Enzymatic Properties of Deoxyribo-oligonucleotides containing Methyl and Phenylphosphonate Linkages, *Nucleic Acids Res.*, **1979**, *6(9)*, 3009-3024
- [39] L. J. Maher, B. J. Dolnick, Comparative hybrid arrest by tandem antisense oligodeoxyribonucleotides or oligodeoxyribonucleoside methylphosphonates in a cell-free system, *Nucleic Acids Res.*, **1988**, *16(8)*, 3341-3358
- [40] R. P. Iyer, William Egan, Judith B. Regan, Serge L. Beaucage, 3H-1,2-Benzodithiole-3-one 1,1-dioxide as an improved sulfurizing reagent in the solid-phase synthesis of oligodeoxyribonucleoside phosphorothioates, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112(3)*, 1253-1254.
- [41] D. A. Brow, S.-H. Kang, S. M. Gryznov, K. DeDionisio, O. Heidenreich, S. Sullivan, X. Xu, A. I. Nerenberg, Effect of Phosphorothioate Modification of Oligodeoxynucleotides on Specific Protein Binding, *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269(43)*, 2680-2680

- [42] J.-D. Wang, G. Just, Indolyo-oxazaphosphorin Precursors for Stereoselective Synthesis of Phosphite Triesters and Dithymidyl Phosphorothioates, *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 8090-8097
- [43] 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
- [44] 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 Acid Res.*, **1997**, *2*, 4429-4443
- [45] 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
- [46] V. K. Rajwanshi, A. E. Häkansson, R. Kumar, J. Wendel, 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. Biol. Comm.*, **1999**, 2073-2074
- [47] G. Schmajuk, H. Serakowska, R. Kole, Antisense Oligonucleotides with different Backbones. Modification of splicing Pathway and efficacy of uptake, *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 21783-21789
- [48] N. Dias, S. feheur, P. E. Nielson, S. Granzno, A. van Aerschot, P. Herdweijn, C. Helene, T. E. Saison-Behmoaras, Antisense PNA tridecamers targeted to the coding region of the *Ha-ras* mRNA arrest polypeptide chain elongation, *J. Mol. Biol.*, **1999**, *294*, 403-416
- [49] J. L. Imbach, C. Périgaud, G. Gosselin, I. Lefebver, J. L. Giradet, S. Benzaria, I. Barber, Rational Design for cytosolic delivery of nucleoside monophosphates, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1993**, *3*, 2521-2529

- [50] I. Barber, B. Rayner, J. L. Imbach, The Prooligonucleotide Approach. II: Esterase mediated Reversibility of Dithymidine S-Alkyl-Phosphorothioates to Dithymidine Phosphorothioates, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1995**, 6(5), 563-568
- [51] I. Barber, G. Tosquellas, F. Movan, B. Rayner, J. L. Imbach, The Prooligonucleotide Approach.II: Synthesis and Stability Studies Chimeric Oligonucleotide Models, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1995**, 6(5), 1441-1444
- [52] G. Tosquellas, I. Barber, F. Movan, B. Rayner, J. L. Imbach, The Prooligonucleotide Approach.III: Synthesis and Bioreversibility of a Chimeric Phosphorothioate Prooligonucleotide, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, 6(7), 457-462
- [53] G. Tosquellas, F. Movan, B. Rayner, J. L. Imbach, The Prooligonucleotide Approach.IV: Synthesis of Chimeric Prooligonucleotide with 6 Enzymolabile Masking Groups and Unexpected Desulfurization Side Reaction, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, 7(8), 263-28
- [54] N. Migmet, F. Movan, 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(8), 851-845
- [55] G. Tosquellas, K. Alvarez, C. Dell'Aquila, F. Morgan, J. J. Vasseur, J. L. Imbach, B. Rayner, The Prooligonucleotide Approach: Solid Phase Synthesis and Preliminary Evaluation of model Pro-Dodecathymidylates, *Nucleic Acids Res.*, **1998**, 26(9), 2096-2074
- [56] 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
- [57] S. Benzaria, H. Péliano, R. J. Hohnson, G. Maury, J. L. Imbach, A. M. Aubertin, G. Obert. G. Gosselin, Synthesis in vitro antiviral Evaluation and Stability Studies of Bos(S-acyl-2-thioethyl) Ester Derivatives of 9-(2-Phosphonmethoxyethyl)denine (PMEA) as Potential PMEA Prodrugs with Improved Oral Bioavailability, *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 4958-4965

- [58] IRAC Monographs, *11*, **1976**, 257-262
- [59] V. P. Pugaeva, S. I. Klochkeva, F. . Mashits, R. S. Eizengart, *Gig. Tr. Prof. Zabol.* **1969**, *13*, 47- 48
- [60] E. Vive`, C. Dell'Aquila, J. C. Bologna, EF. Morvan, B.Raayner, J. L. Imbach, Lipophili pro-oligonucleotides are rapide and efficiently internalized in HeLa cells, *Nuclei Acid. Res.*, **1999**, *27(20)*, 4071-4076
- [61] R. P. Iyer, D. Yu, S. Agrawal, Prodrugs of Oligonukleotides: The Acyoxylalkyl Esters of Oligodeoxyribose Phosphorothioates, *Bioorganic Chemistry*, **1995**, *23*, 1-21
- [62] R. P. Iyer, D. Yu, T. Devlin, N. Ho, S. Agrawal, Acyloxyaryl Prodrugs of Oligonucleotide Phosphorothioates, *Bioorg, Med. Chem.*, **1996**, *6(16)*, 1917-1922
- [63] C. Meier, L. W. Habel, J. Balzarini, E. De Clercq, Lipophilic α -Hydroxybenzylphosphonates as Prodrugs of 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT), *Liebigs Ann.*, **1995**, 2159-2202
- [64] C. Meier, 5'5'-O-Dinucleoside- α -hydroxybenzylphosphonaäureester als lipophile potentielle Prodrugs von 5',3'-Didesoxythymidin (ddT), *Angew. Chem.*, **1993**, *105(12)*, 1854-186, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1994**, *33(12)*, 1704-1706
- [65] C. Meier, L. W. Habel, WHG. LAUx, E. De Clercq, J. Balzarini, Homo Dinucleoside- α -Hydroxyphosphonate Dieesters as Prodrugs of the Antiviral Nucleoside Analoguse 2',3'-Dideoxythymidine and 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidin, *Nucleosides Nucleotides*, **1995**, *14(3-5)*, 759-762
- [66] 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
- [67] R. P. Mauritz, C. Meier, E. Uhlmann, Synthesis und Eigenschaften von α -hydroxybezyolphosphonat- und phtalidyl-modifizierten Antisense-Oligonukleotiden, Dissertation Universität Würzburg, **2000**

- [68] R. P. Mauritz, C. Meier, FPMP-Protected α -Hydroxyphosphonat Diesters for the Synthesis of Pro-Oligonucleotides, *Nucleosides Nucleotides*, **1997**, *16*, 675-678
- [69] R. P. Mauritz, C. Meier, E. Uhlmann, Synthesis of 3',5'-Dithylidyl- α -Hydroxyphosphonate Dimer Building Blocks for Oligonucleotide Synthesis – A new Pro-Oligonucleotide Approach, *Nucleosides Nucleotides*, **1997**, *16-17*, 1209-1212
- [70] 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, *Nucleotides Nucleosides*, **1995**, *14*, 803-804
- [71] Eric Vives, Christele Dell'Aquila, Jean-Charles Bologna, Francois Morvan, Bernard Rayner and Jean-Louis Imbach, Lipophilic pro-Oligonucleotides are Rapidly and Efficiently Internalized in HeLa Cells, *Nucleic Acid Research*, **1999**, *27(20)*, 4071-4076
- [72] F. Seela, Y. Chen, U. Bindig, Z. Kazimierczuk, Synthesis of 2'-Deoxyisoinosine and Related 2'-Deoxyribonucleosides, *Helv. Chim. Acta*, **1994**, *77*, 194–202
- [73] F. Seela, G. Becher, Synthesis, Base Pairing and Fluorescence Properties of Oligonucleotides Containing 1*H*-Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-6-amine (8-Aza-7-deazapurin-2-amine) as an Analogue of Purin-2-amine, *Helv. Chim. Acta*, **2000**, *83*, 928–942
- [74] F. Seela, M. Zulauf, M. Sauer, M. Deimel, 7-Substituted 7-Deaza-2'-deoxyadenosines and 8-Aza-7-deaza-2'-deoxyadenosines: Fluorescence of DNA-Base Analogues induced by the 7-Alkynyl Side Chain, *Helv. Chim. Acta*, **2000**, *83*, 910–927
- [75] F. Seela, G. Becher, Y. Chen, Fluorescence Properties and base pair stability of oligonucleotides containing 8-Aza-7-deaza-2'-deoxyisoinosine or 2'-Deoxyisoinosine, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, **2000**, *19(10-12)*, 1581–1598

- [76] C. McGuigan, C. J. Yarnold, G. Jones, S. Valázquez, H. Barucki, A. Brancale, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq, J. Balzarini, Potent and selective Inhibition of Varicella-Zoster Virus (VZV) by Nucleoside Analogues with Unusual Bicyclic Base, *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 4479–4484
- [77] C. McGuigan, A. Brancale, H. Barucki, S. Srinivasan, G. Jones, R. Pathirana, S. Blewett, R. Alvarez, C. J. Yarnold, A. Carangio, S. Velázquez, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq, J. Balzarini, Fluorescent bicyclic furo pyrimidine deoxynucleoside analogues as potent and selective inhibitors of VZV and potential future drugs for the treatment of chickenpox and shingles, *Drugs of the Future*, **2000**, *25(11)*, 1151–1161
- [78] A. Holmen, B.N. Bo Albinsson, Electronic Transition Dipole Moments of the N₆-Ethenoadenine Chromophore, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 13460-13469
- [79] G.A. Bhat, L.B. Townsend, Synthesis of Certain Fluorescent Tricyclic Nucleosides Derived from Pyrazolo[3,4-*d*]Pyrimidine Nucleosides, *J. C. S. Perkin I*, **1981**, 2389
- [80] L.M. Wilhelmsson, A. Holmen, P. Lincoln, P.E. Nielsen, B. Norden, A Highly Fluorescent DNA Base Analogue that Forms Watson-Crick Base Pairs with Guanine, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 2434-2435
- [81] K.-Y. Lin, R. J. Jones, M. Matteucci, Tricyclic 2'-Deoxycytidine Analogues: Synthesis and Incorporation into Oligodeoxynucleosides Which have Enhanced Binding to Complementary RNA, *J. Am. Chem. Soc.* , **1995**, *117*, 3873-3874
- [82] S. F. Singelton, F. Shan, M. W. Kanan, C. M. McLntosh, C. J. Stearman, J. S. Helm, K. J. Webb, Facile Synthesis of a Fluorescent Deoxycytidine Analogue Suitable for Probing the RecA Nucleoprotein Filament, *Org.Lett.*, **2001**, *3(24)*, 3919-3922
- [83] R. Mauritz, Synthese und Eigenschaften von α -Hydroxybenzylphosphonat- und Phthalidyl-modifizierten Antisense-Oligonukleotiden, *Dissertation*, Würzburg, **2000**

- [84] S. G. Laland, G. Serck-Hanssen, Synthesis of Pyrimidin-2-one Deoxyribosides and their Ability to Support the Growth of the Deoxyriboside-Requiring Organism *Lactobacillus acidophilus* R26, *Biochem. J.*, **1964**, *90*, 76-81
- [85] B. A. Connolly, P. C. Newman, Synthesis and properties of oligonucleotides containing 4-thiothymidine, 5-methyl-2-pyrimidinone-1- β -D(2'-deoxyribose) and 2-thiothymidine., *Nucleic Acids Res.*, **1989**, *17(13)*, 4957-4974
- [86] Yao-Zhong Xu, Qinguo Zheng, P. F. Swann, Synthesis of DNA Containing Modified Bases by Postsynthetic Substitution. Synthesis of Oligomers Containing 4-Substituted Thymine: O⁴-Alkylthymine, 5-Methylcytosine, N⁴-(Dimethylamino)-5-methylcytosine and 4-Thiothymine, *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 3839-3845
- [87] E. Harwood, P. B. Hopkins, S. Th. Sigurdsson, Chemical Synthesis of Cross-Link Found in Nitrous Acid Treated DNA: A General Method for the Preparation of N₂-Substituted 2'-Deoxyduanosines, *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 2959-2964
- [88] C. Meier, *CycloSal*-Pronucleotides – Design of Chemical Trojan Horses, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, **2002**, *2*, 219-234
- [89] H. C. Müller, Welche Faktoren beeinflussen die Eigenschaften von Nucleosidmonophosphaten? Untersuchungen zu den Substrateigenschaften gegenüber Thymidylatkinase, Dissertation, **2003**, Hamburg
- [90] H. Jessen, W. Fendrich, T. Schulz, J. Balzarini, C. Meier, Synthesis and Properties of intrinsically fluorescent cycloSal-Pronucleotides, *Antiviral Res.*, **2006**, *70*, A60
- [91] J. Balzarini, P. Herdewijn, E. De Clercq, Differential Patterns of Intracellular Metabolism of 2',3'-Didehydro-2',3'-dideoxythymidine and 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine, Two Potent anti-Human Immunodeficiency Virus Compounds, *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 6127-6133
- [92] P Herdewijn, J, Balzarini, E. De Clercq, *Advances in Antiviral Drug Design* (Ed.: E. De Clercq) Vol. 1, **1993**, 233-318, *JAI. Press Inc.*, Greenwich, Connecticut, London

- [93] S.S: Cohen, On the Therapeutic Use of Nucleosides and the Penetrability of Phosphorylated Compoundes, *Biochem. Pharmacol.*, **1975**, *24*, 1929
- [94] J. K. Sastry, P. N. Nehete, S. Kahn, B. J. Nowak, W. Plunkett, R. B. Arlinghaus, D. Frarquhar, Membrane-Permeable Dideoxyuridine 5'-Monophosphate Analogue Inhibits Human Immunodeficiency Virus Infection, *Mol. Pharmacol.*, **1992**, *41*, 441-445
- [95] C. Meier, M. Lorey, E. De Clercq, J. Balzarini, Cyclic Saligenyl Phosphotriesters of 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidine (d4T) – A New Pro-Nucleoside Approach, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, *7*, 99-104
- [96] C. Meier, M. Lorey, E. De Clercq, J. Balzarini, *CycloSal*-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine Monophosphate (*cycloSal*-d4TMP): Synthesis and Antiviral Evaluation of a New d4TMP Delivery System, *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 1417-1427
- [97] C. Meier, T. Knispel, E. De Clercq, J. Balzarini, *CycloSal*-Pronucleotides of 2',3'-Dideoxyadenosine and 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydroadenosine: Synthesis and Antiviral Evaluation of a Highly Efficient Nucleoside Delivery System, *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 1904-1614
- [98] C. Meier, E. De Clercq, J. Balzarini; Nucleotide Delivery from *cycloSal*igenyl-3'-azido-3'-deoxythymidine Monophosphates (*cycloSal*-AZTMP); *Eur. J. Org. Chem.*, **1998**, 837-846
- [99] P. Wu, T. M. Nordlund, B. Gildea, L. W. McLaughlin, Base stacking and unstacking as determined from a DNA decamer containing a fluorescent base, *Biochemistry*, **1990**, *29*(27), 6508-6514
- [100] N. Gisch, C. Meier, in press
- [101] C. Vargeese, J. Carter, J. Yegge, S. Krivjansky, A. Settle, E. Kropp, K. Peterson, W. Pieken, Efficient activation of nucleoside phosphoramidites with 4,5-dicyanoimidazole during oligonucleotide synthesis., *Nucleic Acids Res.*, **1998**, *26*(4), 1046-1050

- [102] R. C. Cookson, S. S. Gupte, I. D. R. Stevens, C. T. Watts, 4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion, *Organic Syntheses*, **1988**, 6, 936
- [103] W. Fendrich, Diplomarbeit, , Hamburg, 2000
- [104] F. Seela, U. Kretschmer, Diastereomerically pure R_P and S_P dinucleotide *H*-phosphonates: The stereochemical course of there conversion into *P*-methylphosphonates, phosphorthioates, and [^{18}O] chiral phosphates, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 3861-3869
- [105] J. Pyzowski, L. A. Wozniak, W. J. Stec, Oligomeric building block approach to the synthesis of diastereomerically pure pentathymidine 3',5'-methane phosphonates, *Organic Letters*, **2000**, 771-773
- [106] P. J. Garegg, T. Regberg, J. Stawinski, R. Strömberg, Formation of internucleotidic bonds via phosphonate intermediates, *Chemica Scripta*, **1985**, 25, 280-282
- [107] P. J. Garegg, J. Stawinski, R. Strömberg, Nucleoside hydrogenphosphonates in oligonucleotide synthesis, *Chemica Skripta*, **1986**, 26, 59-62
- [108] R. P. Mauritz, C. Meier, E. Uhlmann, Synthesis of 3',5'-dithymidiny- α -hydroxyphosphonates dimer building blocks for oligonucleotide synthesis: A new pro-oligonucleotide approach, *Nucleosides & Nucleotides*, **1997**, 16(7-9), 1209-1212
- [109] R. P. Mauritz, C. Meier, Fmp-protected α -hydroxyphosphonatediester for the synthesis of pro-oligonucleotides, *Nucleosides & Nucleotides*, **1997**, 16(5-6), 675-678
- [110] J. Pyzowski, L. A. Wozniak, W. J. Stec, Oliomeric building block approach to the synthesis of diastereomerically pure pentathymidine 3',5'-methylphosphonates, *Organic Letters*, **2000**, 77-773
- [111] F. Seela, U. Kretschmer, Diasterically pure R_P und S_P dinucleosid *H*-phosphonates: The stereochemical course of there conversion into *P*-methylphosphonates, phosphorthioates and [^{18}O] chiral phosphates, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 3861-3869

- [112] W. Bannwarth, A. Trzeciak, A Simple and Effective Chemical Phosphorylation Procedure for Biomolecules, *Helv. Chim. Acta*, **1987**, 70, 175-186
- [113] K Miyoshi, T Miyake, T Hozumi, K. Itakura, Solidphase synthesis of polynucleotides. II. Synthesis of polythymidylic acids by the block coupling phosphotriester method, *Nucleic Acids Res.*, **1980**, 8(22), 5473–5489
- [114] R. H. Alul, C. N. Singman, G. Zhang, R. L. Lesinger, Oxalyl-CPG: A labile support for synthesis of sensitive oligonucleotide derivatives, *Nucleic Acids Res.*, **1991**, 19, 1527-1532
- [115] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, Deoxynucleoside phosphoramidites: A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis, *Tetrahedron Lett.*, **1981**, 20(22), 1859-1862
- [116] A. Grünweller, E. Wyszko, B. Bieber, R. Jahnel, V. A. Erdmann, J. Kurreck, Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA, *Nuc. Acids Res.*, **2003**, 31(12), 3185-3193
- [117] H. Kang, M. H. Fisher, D. Xu, Y. J. Miyamoto, A. Marchand, A. Van Aerschot, P. Herdewijn, R. L. Juliano¹, Inhibition of MDR1 gene expression by chimeric HNA antisense oligonucleotides, *Nuc. Acids Res.*, **2004**, 32(14), 4411-4419
- [118] R.A. McKay, L.L. Cummins, M.J. Graham, E.A. Lesnik, S.R. Owens, M. Winniman, and N.M. Dean, Enhanced activity of an antisense oligonucleotide targeting murine protein kinase C-alpha by the incorporation of 2'-O-propyl modifications, *Nuc. Acids Res.*, **1996**; 24, 411 – 417
- [119] J. Kurreck, E. Wyszok, C. Gillen, V. A. Erdmann, Design of antisense oligonucleotide stabilized by locked nucleic acids, *Nuc. Acids Res.*, **2002**, 30(9), 1911-1918
- [120] J. A. Ragas, T. A. Simmons and P. A. Limbach, A comparative study on methods of optimal sample preparation for the analysis of oligonucleotides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Analyst*, **2000**, 25, 575-581

- [121] E. Nordhoff, F. Kirpekar, M. Karas, R. Cramer, S. Hahner, F. Hillenkamp, K. Kristiansen, P. Roepstorff A. Lezius, Comparison of IR- and UV-matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of oligodeoxynucleotides, *Nuc. Acids Res.*, **1994**, *22(13)*, 2460-2465
- [122] E. Nordhoff, R. Cramer, M. Karas, F. Hillenkamp, F. Kirpekar, K. Kristiansen, P. Roepstorff, Ion stability of nucleic acids in infrared matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Nuc. Acids Res.*, **1993**, *21(15)*, 3347–3357
- [123] U. Pieves, W. Zürcher, M. Schär, H. E. Moser, Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for the mass and sequence analysis of natural and modified oligonucleotides, *Nuc. Acids Res.* **1993**, *21(14)*, 3191–3196
- [124] Y. F. Zhu, N. I. Taranenko, S. L. Allman, S. A. Martin, L. Haff, C. H. Chen, The Effect of Ammonium Salt and Matrix in the Detection of DNA by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrum*, **1996**, *10*, 1591-1596
- [125] M. Swierkowski, D. Shugar, W. Szer, Secondary structure of poly-uridylic and poly-ribothymidylic acids, their N-methylated analogues, and their 1:1 complexes with poly-A, *Acta Biochem. Polon*, **1963**, *10*, 87-106
- [126] D. Barszcz, D. Shugar, Complexes of poly-thymidylic acid with poly-adenylic acids and some properties of poly-deoxyriboadenylic acid, *Eur. J. Biochem.*, **1968**, *5(1)*, 91-100
- [127] M. Polak, N. V. Hud, Complete disproportionation of duplex poly(dT)·poly(dA) into triplex poly(dT)·poly(dA)·poly(dT) and poly(dA) by coralyne, *Nucleic Acids Res.*, **2002**, *30(4)*, 983-992
- [128] G. E. Plum, Thermodynamics of oligonucleotide triple helices., *Biopolymers*, **1997**, *44*, 241-256
- [129] P. L. James, T. Brown, K. R. Fox, Thermodynamic and kinetic stability of intermolecular triple helices containing different proportions of C⁺•GC and T•AT triplets, *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 5598-5606

- [130] 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*(22), 4501-4505
- [131] N. Sugimoto, S.-I. 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
- [132] J Aymami, M Coll, C A Frederick, A H Wang, and A Rich, The propeller DNA conformation of poly(dA).poly(dT), *Nucleic Acids Res.*, **1989**, *17*(8), 3229–3245
- [133] H. Werntges, G. Steger, D. Riesner, H.-J. Fritz, Mismatches in DNA double strands: thermodynamic parameters and their correlation to repair efficiencies, *Nucleic Acids Res.*, **1986**, *14*, 3773–3790
- [134] N. N. Anand, D.M. Brown, S. A. Salisbury, The stability of oligodeoxyribonucleotide duplexes containing degenerate bases, *Nucleic Acids Res.*, **1987**; *15*, 8167 – 8176
- [135] B. Gildea, L. W. McLaughlin, The synthesis of 2-pyrimidinone nucleosides and their incorporation into oligodeoxynucleotides, *Nucleic Acids Res.*, **1989**, *17*(6), 2261–2281
- [136] E. Anderson, T. Brown, D. Picken, Novel Photocleavable Universal Support for Oligonucleotide Synthesis, *Nucleosides & Nucleotides*, **2003**, *22*, 1403 – 1406
- [137] F. Himmelsbach, W. Pfeleiderer, The use of the p-nitrophenylethoxycarbonyl group for amino protection in cytidine and adenosine chemistry, *Tetrahedron Letters*, 1983, *24*, 3583-3586
- [138] Y. Hayakawa, S. Wakabayashi, H. Kato, R. Noyori, The Allylic Protection Method in Solid-Phase Oligonucleotide Synthesis. An Efficient Preparation of Solid-Anchored DNA Oligomers, *J. Am. Chem. SOC.*, **1990**, *112*, 1691-1696
- [139] K. Alvarez, J.-J. Vasseur, T. Beltran, J.-L. Imbach, Photocleavable Protecting Groups as Nucleobase Protections Allowed the Solid-Phase Synthesis of

- Base-Sensitive SATE-Prooligonucleotides, *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*(17), 6319 - 6328;
- [140] 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
- [141] T. Abe, T. Mizuta, T. Hatta, N. Miyano-Kurosaki, M. Fujiwara, K. Takai, S. Shigeta, . Yokota, H. Takaku, Antisense therapy of Influenza, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2001**, *13*(1), 61-69
- [142] A. Hohlfeld, α -Hydroxy-2-nitrobenzylphosphonat modifiierte Oligonucleotide. Synthese, Eigenschaften und neuen Synthesekonzepte, Dissertation, Hamburg, **2004**
- [143] Y. He, J. Zhou, J. Sheng Wu, K. Feng Dou, Inhibitory effects of EGFR antisense oligodeoxynucleotide in human colorectal cancer cell line, *World J Gastroentero*, **2000**, *6*(5), 747-749

10. GEFÄHRSTOFFE

Chemikalien	R-Sätze	S-Sätze	Symbole
Acetonitril	11-23/24/25	16-17-45	F, T
Acetylchlorid	11-14-34	9-16-26-45	F,C
Ammoniumfluorid	23/24/25	(1/2)-26-45	T
Benzol	45-11-48/23/24/25	53-45	F, T
<i>N</i> -Bromsuccinimid	22-36/37/38	26-36	Xn
<i>tert</i> -Butylhydroperoxid	7-10-21/22-23-34	3/7-14-26-36/37/39-45	O, C
2-Carboxylbnzaldehyd	-	-	-
Chloroform	22-38-40-48/20/22	36/37	Xn
Dichlormethan	40	23-24/25-36/37	Xn
4,5-Dicyanoimidazol	37/38-41	26-39	Xi
Dicyclohexylcarbodiimid	22-24-41-43	24-26-37/39-45	T
Diethylether	12-19-22-66-67	9-16-29-33	F+, Xn
<i>N,N</i> -Diethylamin	11-20/21/22-35	3-16-26-29-36/37/39-45	F,C
<i>N,N</i> -Diisopropylamin	11-36/37/38	9-16	F, Xi
4,4'-Dimethoxytritylchlorid	-	22-24/25	-
<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin	11-20/21/22-34	16-26-36/37/39-45	F, C
4,4'-Dimethylaminopyridin	24/25-36/37/38	26-36/37/39-45	T
<i>N,N</i> -Dimethylformamid	61-20/21-36	53-45	T
Dimethylsulfoxid	36/38	26	-
1,4-Dioxan	11-19-36/37-40-66	9-16-36/37-46	F,Xn
Essigsäure	10-35	23-26-45	C
Essigsäureethylester	11	16-23-29-33	F
Ethanol	11	7-16	F
Hydrazin	10-23/24/25-34- 43-45-50/53	45-53-60-61	T, N
3-Hydroxypropionitril	-	-	-
4-Hydroxymethylsäure	36/37/38	-	Xi
Imidazol	22-34	26-36/37/39-45	C
Magnesiumsulfat	22-24/25	-	-

Methanol	11-23/25	7-16-24-45	F, T
Methyliodid	21-23/25-37/38-40	1/2-36/37-38-45	T
Natriumcarbonat	36	22-26	Xi
Natriumdihydrogenphosphat	36/37/38	26-36	Xi
Natriumhydrogencarbonat	22-24/25	-	-
Natriumhydroxid	35	26-37/39-45	C
Natriumsulfat	22-24/25	-	-
Petrolether	12	9-16-29-33	F
Phosphortrichlorid	14-26/28-35-48/20	7/8-26-36/37/39-45	C
Phosphorylchlorid	14-22-26-35-48/23	7/8-26-36/37/39-45	T+,C
Pivaloylchlorid	14-22-26-35-48/23	7/8-26-36/37/39-45	T+,C
Pyridin	11-20/21/22	26-28	F, Xn
Salzsäure	34-37	26-45	C
Schwefelsäure	35	26-30-45	C
Tetrabutylammoniumfluorid	23/24/25-34	26-36/37/39-45	T, C
TBDMSCI	10-34	26-36/37/39-45	C
Tetrahydrofuran	11-19-36/37	16-29-33	F, Xi
1 <i>H</i> -Tetrazol	5-11	16-22-24/25	-
Triazol	22-36/37/38	26-36	Xn
Triethyamintrihydrofluorid	26/27/28-35	7/9-26-36/37/39-45	T+,C
Toluol	11-20	16-25-29-33	F, Xn
Toluol-4- sulfonsäuremonohydrat	36/37/38	26-37	Xi
Triethylamin	11-36/37	16-26-29	F, Xi
Trifluoressigsäure	20-35	9-26-27-28-45	C

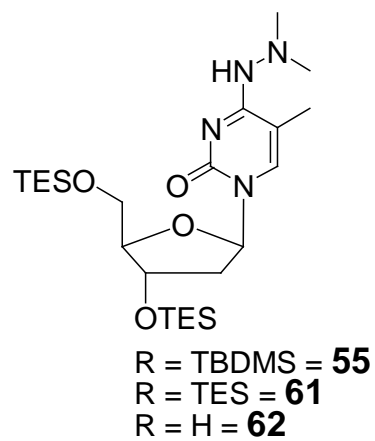
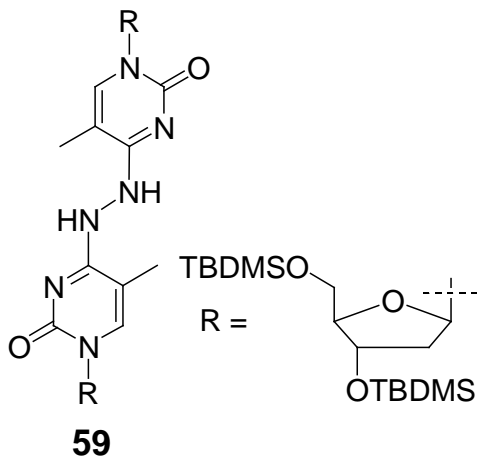
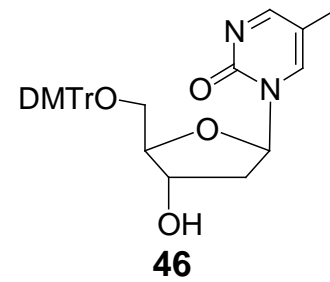
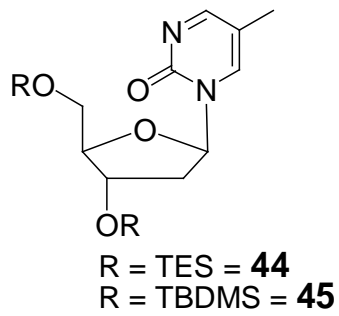
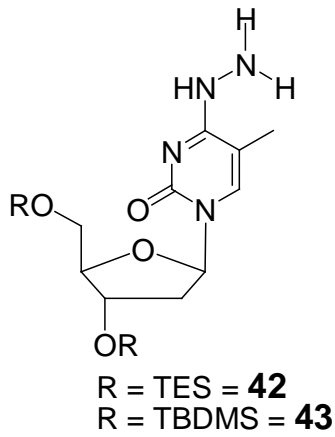
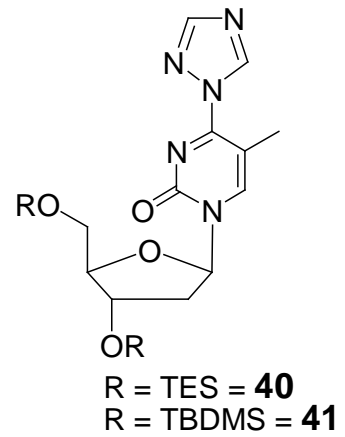
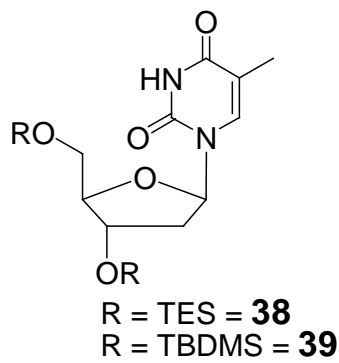
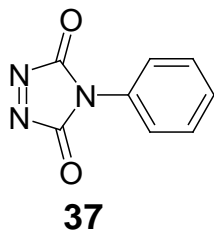
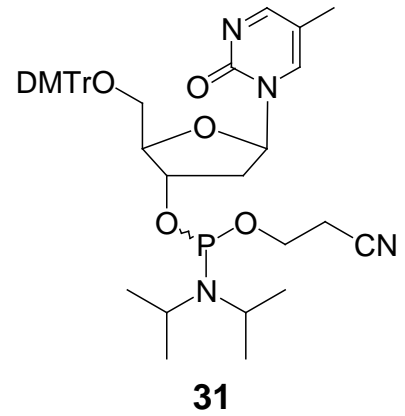
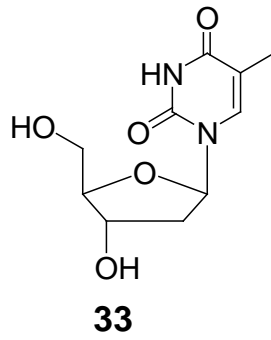
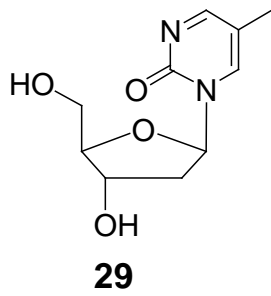
Publikationsliste

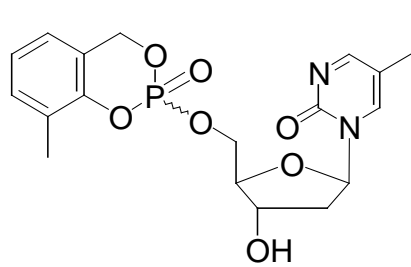
Beiträge in wissenschaftlichen Zeitschriften:

1. H.J. Jessen, W. Fendrich, C. Meier, Synthesis and Properties of fluorescent *cycloSal*-Nucleotides based on the Pyrimidine Nucleoside m^5K , *European Journal of Organic Chemistry*, **2006**, 924-931
2. H. Jessen, W. Fendrich, T. Schulz, J. Balzarini, C. Meier, Synthesis and Properties of intrinsically fluorescent *cycloSal*-Pronucleotides, *Antiviral Res.*, **2000**, 70, A60
3. Wolfgang Fendrich, James E. Harvey, Piotr Kaszynski, Molecular Structure, Conformational Analysis, and Electronic Spectra of 1-Phenyl-1-aza-closo-dodecaborane, *Inorganic Chemistry*, **1999**, 38(2), 408-410

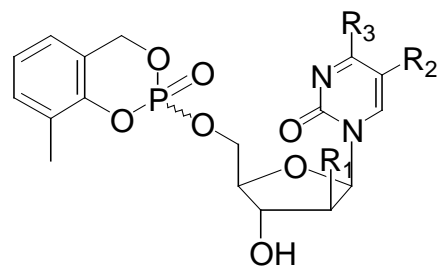
Posterbeiträge

1. A. Hohlfeld, W. Fendrich, R. P. Mauritz, C. Meier, α -Hydroxybenzylphosphonat modifizierte Oligonucleotide als potentielle neuartige Antisense-Pro-Oligonucleotide, *GDCh, Gsamttagung*, Würzburg, **2001**
1. W. Fendrich, C. Meier, Determination of the Absolute P-Configuration of a Phthalidyl-Phosphonate Thymidine-Thymidine Dimer, *XV. International Round Table of the international Society of Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids*, Leuven, Belgien, **2002**

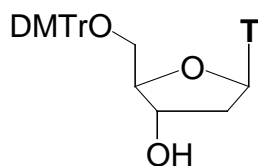




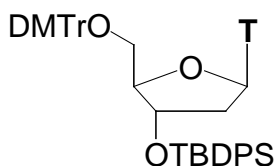
63



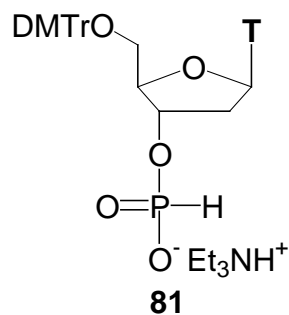
$R_1=F, R_2=H, R_3=H = 65$
 $R_1=H, R_2=Me, R_3=Me_2NNH = 66$



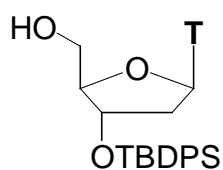
79



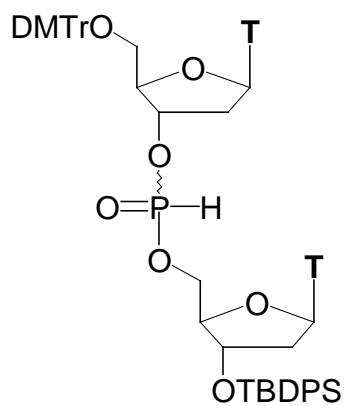
80



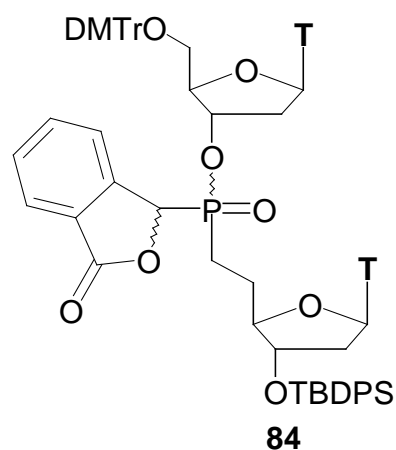
81



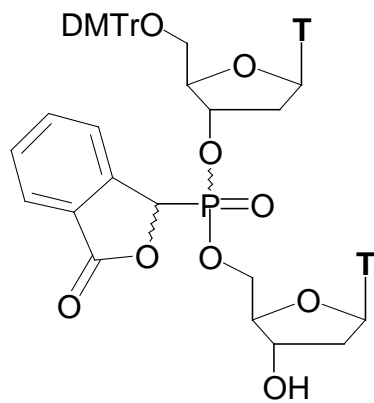
82



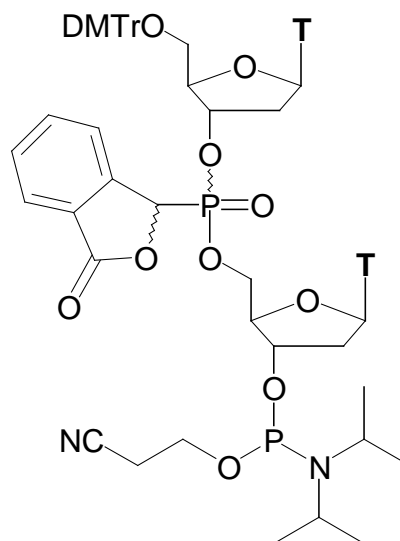
83



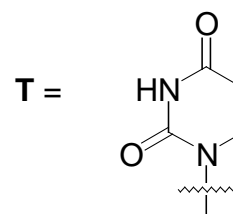
84

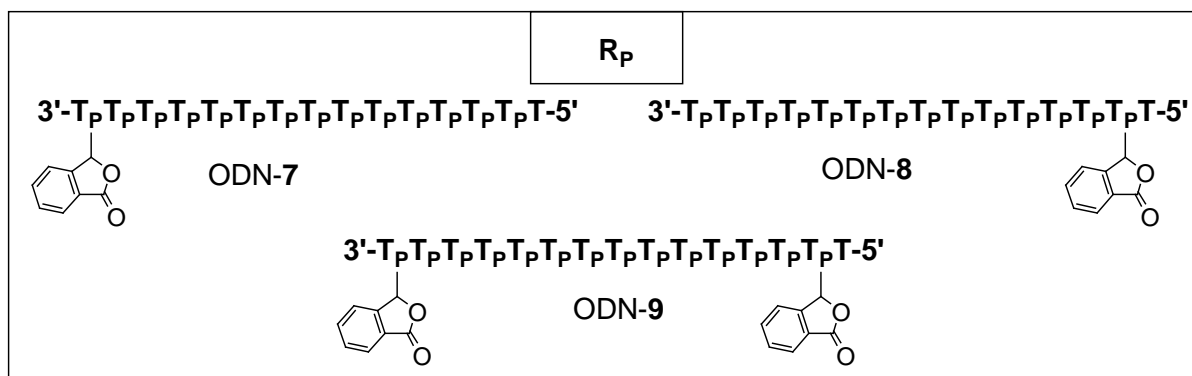
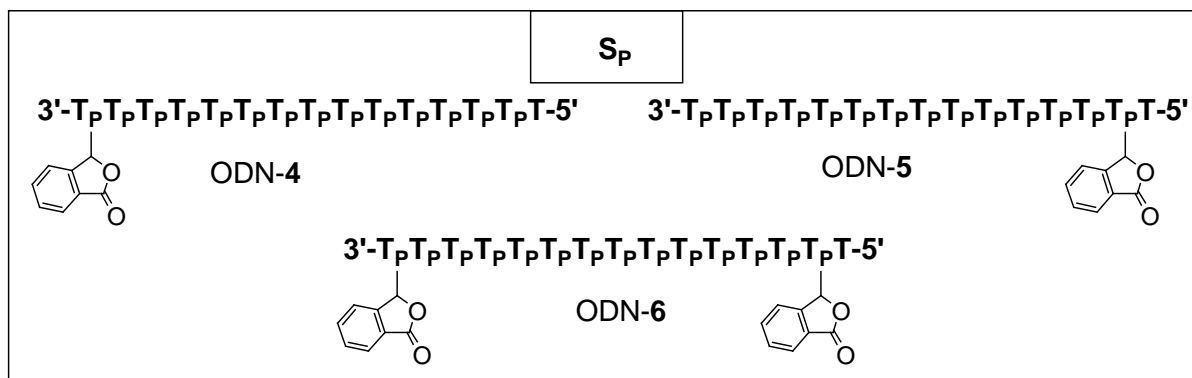
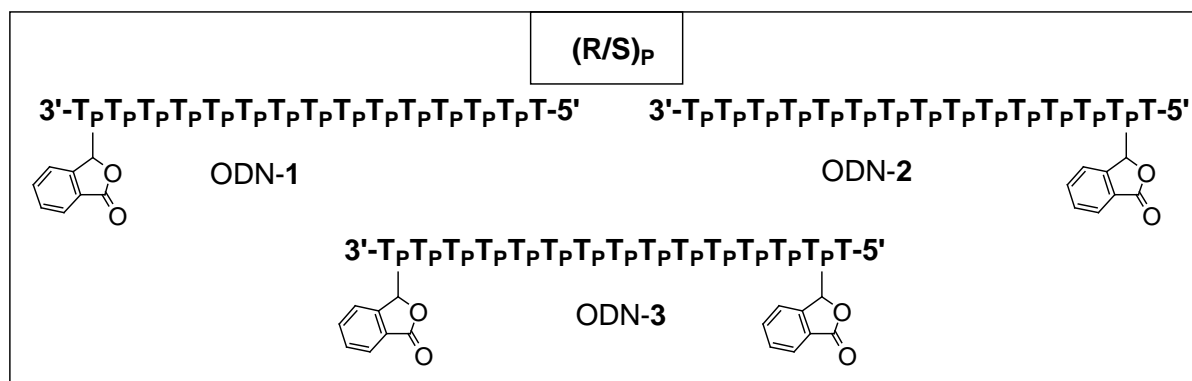


85



30





ODN-10

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Synthese und Untersuchung Phthalidylphosphonat-modifizierter Oligonucleotide“ selbständig und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch 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, den