Synthese von C8-(*N*-Acetyl)- und C8-*N*H-Arylamin-modifizierten 2´-Desoxyadenosin-Phosphoramiditen und deren Einbau in Oligonucleotide

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

von

Zita Szombati

vorgelegt dem Department Chemie der Universität Hamburg

Hamburg, im März 2011

Synthese von C8-(*N*-Acetyl)- und C8-*N*H-Arylamin-modifizierten 2´-Desoxyadenosin-Phosphoramiditen und deren Einbau in Oligonucleotide

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

von

Zita Szombati

vorgelegt dem Department Chemie der Universität Hamburg

Hamburg, im März 2011

1. Gutachter: Prof. Dr. C. Meier

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. W. Francke

Datum der Disputation: 06.05.2011

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Chris Meier am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg in der Zeit von August 2007 bis März 2011 angefertigt.

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. C. Meier für die interessante Themenstellung im Bereich des von mir bevorzugt gewünschten Themengebietes. Ferner danke ich ihm für die Freiheiten bei der Bearbeitung, für die gute Betreuung während der Arbeit, für zahlreiche Diskussionen und hilfreiche Anregungen und Hilfestellungen.

Weiterhin möchte ich allen ehemaligen und aktiven Mitgliedern des Arbeitskreises für ihre Hilfsbereitschaft und für die nette Arbeitsatmosphäre danken.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich meinen Laborkollegen Frau Dipl. Chem. Tanja Zismann, Herrn Dr. Dipl. Chem. Bastian Reichardt, Frau Dipl. Chem. Nathalie Lunau, Frau Dipl. Chem. Miriam Mahler, Frau Dipl. Chem. Lina Richter und Frau Dipl. Chem. Johanna Huchting für die gemeinsame Zeit im Labor 525 und für die hervorragende Zusammenarbeit aussprechen. Die bereits genannte Frau Dipl. Chem. Tanja Zismann möchte ich ganz besonders hervorheben, die zu meiner besten, verlässlichsten und stets unterhaltsamen Freundin geworden ist. Mit ihrer Hilfe war es auch in trüben Momenten immer wieder leicht zu einem Lächeln zurück zu finden.

In dieser Hinsicht möchte ich weiterhin auch Frau Dipl. Chem. Sarah Krüger, Herrn Dr. Dipl. Chem. Edwuin Hander Rios Morales, Frau Dipl. Chem. Cristina Arbelo Roman und Frau Dipl. Chem. Saskia Wolf für die tolle ´italienisch-kolumbianisch-spanisch-deutsche´ Zeit während der Promotion danken.

Für die thematische Zusammenarbeit danke ich weiterhin Herrn Dr. Dipl. Chem. Nicolas Böge, Frau Dr. Dipl. Chem. Maike Jacobsen und Frau Dipl. Chem. Sarah Krüger.

Ein besonderer Dank gilt den zahlreichen Praktikantinnen und Praktikanten, welche im Rahmen ihres Studiums experimentelle Arbeiten in den jeweiligen Praktika für mich durchgeführt haben. Hervorzuheben sind meine ehemaligen Schwerpunkt-praktikantinnen Frau Dipl. Chem. Claudia Worthmann und Frau Dipl. Chem. Alexandra Romek.

Herrn Dr. V. Sinnwell, Herrn Dr. T. Hackl, Herrn Dr. E.T.K. Haupt und ihren Mitarbeitern möchte ich für die Messung zahlreicher NMR-Spektren danken.

Herrn Dr. Stefan Franke, Frau A. Meiners, Frau C. Christ und Frau G. Graack möchte ich für die Messung zahlreicher FAB-, ESI-, EI- und HPLC-MS-Massenspektren danken.

Herrn Dr. Dipl. Chem. Edwuin Hander Rios Morales und Frau Dipl. Chem. Sarah Krüger danke ich für die intensive und kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Meiner Familie, insbesondere meiner Mutter Erika, möchte ich für die jahrelange Unterstützung während meines Studiums danken.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis		I
Abkürzungsverzeichnis		i
Theoretischer Teil		1
1.	**Einleitung**	1
2.	**Kenntnisstand**	6
2.1	Metabolismus der aromatischen Amine	6
2.1.1	Phase I: Oxidation; Bildung der proximalen Carcinogene	6
2.1.2	Phase II: Veresterung; Bildung der ultimalen Carcinogene	8
2.1.3	Reaktion ultimaler Carcinogene mit der DNA	8
2.2	Mechanismus der Adduktbildung *in vivo*	10
2.3	Nachweis der Carcinogenität	11
2.4	Chemische Synthese von Arylamin-Addukten	14
2.5	Chemische Synthese von Arylamin-modifiziertem 2´-Desoxyadenosin	18
2.6	Chemische Synthese von C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-Addukten	21
2.7	Synthese und Eigenschaften Arylamin-modifizierter Oligonucleotide	25
2.8	Synthese von Oligonucleotiden	27
3.	**Aufgabenstellung**	30
4.	**Resultate und Diskussion**	32
4.1	Synthese der C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten 2´-Desoxyadenosin Derivate zur Oligonucleotidsynthese **Route 1**	32
4.2	Synthese der C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten 2´-Desoxyadenosin Derivate zur Oligonucleotidsynthese **Route 2**	57
4.3	Synthese der C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten 2´-Desoxyadenosin Derivate zur Oligonucleotidsynthese **Route 3**	59
4.4	Synthese der C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten 2´-Desoxyadenosin-Phosphoramidite	62
4.5	Synthese von C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten Oligonucleotiden	74
4.6	Bestimmung der Schmelztemperatur (T_m-Werte)	126
4.7	Messung des zirkularen Dichroismus (CD)	131
5.0	Erste Versuche zur Darstellung von IQ-modifizierten 2´-Desoxyadenosin-Phosphoramiditen	136
5.1	Syntheseroute1	140
5.2	Syntheseroute 2	147
6.	**Zusammenfassung**	153
7.	**Summary**	161

8. Ausblick 163

Experimentalteil 165

9. Allgemeines 165

9.1 Lösungsmittel und Reagenzien 165

9.2 Chromatographie und Geräte 170

9.2.1 Dünnshichtchromatographie (DC) 170

9.2.2 Präparative Säulenchromatographie 170

9.2.3 Zirkulare präparative Dünnschichtchromatographie (Chromatotron) 170

9.2.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) 171

9.2.5 Kernresonanzspektroskopie (NMR) 171

9.2.6 Massenspektrometrie (MS) 172

9.2.7 Schmelzpunktbestimmung 173

9.2.8 Infrarot-Spektrometer 173

9.2.9 Polarimeter 174

9.2.10 Zentrifuge 174

9.2.11 UV-Spektrometer 174

9.2.12 Thermomixer 174

9.2.13 Speed-Vac-Probenkonzentrator 174

9.2.14 DNA/RNA-Synthesizer 175

9.2.15 Zirkularer Dichroismus (CD) 175

9.3 Synthese von Oligonucleotiden 175

9.3.1 Synthese 175

9.3.2 Entschützung und Trägerabspaltung 175

9.3.3 Reinigung der Oligonucleotide 176

9.4 Analytik der Oligonucleotide 176

9.4.1 Bestimmung der optischen Dichte (OD_{260}) 176

9.4.2 Präparation der Oligonucleotide für das ESI-MS 177

9.4.3 Präparation der Oligonucleotide für das HPLC-ESI-MS 177

9.4.4 Präparation der Oligonucleotide für die MALDI-TOF-Messung 177

9.4.5 Bestimmung der Schmelztemperatur (T_m-Wert) 178

9.4.6 Messung des zirkularen Dichroismus 178

9.4.7 Enzymatischer Abbau der Oligonucleotide mittels des EcoRI Restriktionsenzyms 178

9.4.8 Primer Extension Bedingungen 179

10. Synthesen 180

10.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften 180

10.2 Synthese der Substanzen 185

10.3 Oligonucleotide 269

11. Gefahrstoffverzeichnis 276

12. Literatur 280

13. Anhang 290

Verbindungsübersicht 294

Persönliches 296

Abkürzungen und Symbole

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
abs.	absolut, trocken
Ac	Acetyl
Äq.	Äquivalente
ATT	6-Aza-2-thiothymin
ber.	berechnet
Bn	Benzyl
BOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-*tris*(dimethylamino)phosphonium-hexafluorophosphat
Bz	Benzoyl
CCA	*α-Cyano-4-hydroxy cinnamic acid*
CD	*circular dichroism*; zirkularer Dichroismus
$CDCl_3$	Chloroform (deuteriert)
CPE	Cyanophenylethyl
CPG	*controlled pore glass*
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett
2´-dA	2´-Desoxyadenosin
2´-dA·H_2O	2´-Desoxyadenosin Monohydrat
DC	Dünnschichtchromatographie
2´-dC	2´-Desoxycytosin
DCI	4,5-Dicyanoimidazol
DCM	Dichlormethan
2´-dG	2´-Desoxyguanosin
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPA	Di*iso*propylamin
4-DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
1,2-DME	1,2-Dimethoxyethan
DMF	*N,N*-Dimethylformamid
DMSO-d_6	Dimethylsulfoxid (sechsfach deuteriert)

DMTr	4,4´-Dimethoxytriphenylmethyl
DNA	*Deoxyribonucleic acid* (Desoxyribonucleinsäure)
2´-dT	2´-Desoxythymidin
DTT	Dithioreithol
ε	molarer Extinktionskoeffizient
EcoRI	*Escherichia Coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	Essigsäureethylester
EI	Elektronenionisation
ESI	Elektronensprayionisation
FAB	*fast atom bombardment*
FMOC	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
gef.	gefunden
h	Stunde
HPA	*3-Hydroxy picolinic acid*
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography*
^{i}Bu	*iso*Butyryl
IQ	2-Amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]-quinolin
IR	Infrarot
J	skalare Kern-Kern-Kopplungskonstante
λ	Wellenlänge
K	Kelvin
Kap.	Kapitel
LiHMDS	Lithiumhexamethyldisilazan
LM	Lösungsmittel
m	Multiplett
M	Molar
MALDI-TOF	*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight*
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
Min.	Minute
MS	Massenspektrometrie
NAT	*N*-Acetyltransferase
nm	Nanometer

NMR	*Nuclear Magnetic Resonance*
NOE	*Nuclear Overhauser Effect*
NOESY	*Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy*
Pac / ^{i}PrPac	Phenoxyacetyl / *iso*Propyl-Phenoxyacetyl
$Pd_2(dba)_3$	*Tris*(Dibenzylidenaceton)-dipalladium(0)
PE	Petrolether
ppm	*parts per million*
rac-BINAP	racemisches 2,2´-*Bis*(diphenylphosphino)-1,1´-binaphtyl
R_f	Retentionsfaktor
RP	*reversed Phase*
Rt	Raumtemperatur
s	Singulett
S.	Seite
s.	siehe
Sdp.	Siedepunkt
sept	Septett
SG	Schutzgruppe
Smp.	Schmelzpunkt
t	Triplett
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	*tert*Butyldimethylsilyl
TEAA	Triethylammoniumacetat
THAP	2,4,6-Trihydroxyacetophenon
THF	Tetrahydrofuran
TIPDS-Cl_2	1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetra*iso*propyldisiloxan
T_m	*Midpoint of Transition Temperature*; Schmelzpunkt eines DNA-Duplexes
t_r	Retentionszeit
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
Xantphos	9,9-Dimethyl-4,5-*bis*(diphenylphosphino)xanthen
z.B.	zum Beispiel

Theoretischer Teil

1. Einleitung

Eine Reihe von chemischen Substanzen enthalten ein hohes toxisches Potential für Mensch und Umwelt. Gelangen solche Stoffe über die Haut, die Atemluft oder über die Nahrung in den Körper, können sie die normalen Lebensfunktionen auf unterschiedliche Weise beeinträchtigen. Sie können den Organismus schädigen und Krankheiten auslösen. Eine Erkrankung, die in eindeutigem Zusammenhang mit der Aufnahme von bestimmten Chemikalien steht, ist Krebs.[1]

Krebs

Der Sammelbegriff „Krebs“ steht für alle bösartigen (malignen) Tumore, wie z.B. Karzinome (aus den epithelialen Zellen), Sarkome (aus Bindegewebszellen) und Systemerkrankungen (z.B. Leukämie), deren Wachstum autonom und überschießend ist. Sie dringen in Nachbargewebe ein und zerstören diese, in dem sie vor allem auf dem Lymph- und/oder Blutweg Absiedelungen (Tochtergeschwülste, Metastasen) in Lymphknoten und anderen Organen bilden. Im Gegensatz zum geregelten zellulärem Wachstum im normalen Organismus ist beim bösartigen Wachstum von Tumorzellen keine Wachstumskontrolle vorhanden. Während gutartige (benigne) Tumore von sich aus expansiv (langsam und eingekapselt) wachsen, erfolgt das Wachstum bei bösartigen Tumoren infiltrativ mit Destruktion der Umgebung.[2]
In der Ursprungszelle wird die - in Form eines Signalmoleküls - von außen kommende Mutation über mehrere Stationen in geänderte Genexpression und Proliferationsverhalten umgesetzt. In ihrem physiologischen Zustand werden diese Zellen als Protoonkogene bezeichnet, die erst durch das Vortäuschen des Vorhandenseins eines Wachstumssignals aktiviert und zu Onkogenen verändert werden. Nicht alle Mutationen in einem Protoonkogen haben diesen Effekt: „*Loss of Function*“ Mutationen führen lediglich dazu, dass das kodierte Protein nicht mehr funktioniert und haben daher für die Krebsentstehung keine Bedeutung. Relevant sind nur die aktivierenden (*gain of function*) Mutationen.[3]

Krebs gilt heutzutage - durch Zurückdrängen anderer Krankheiten, wie z.B. Infektionskrankheiten, und durch die zunehmende Lebenserwartung - nach Herz- und Kreislauferkrankungen als zweithäufigste Todesursache.
Obwohl ionisierende Strahlung, infektiöses biologisches Material und genetische Determinanten mögliche Ursachen für die Krebsentstehung beim Menschen sind, gilt es als gesichert, dass chemische Substanzen in der Umwelt die Mehrzahl der menschlichen Tumore verursachen.[1]
Mittlerweile sind mehr als 100 verschiedene Krebsarten bekannt. In Deutschland stehen Lungen-, Dickdarm-, Magenkrebs sowie der Prostatakrebs bei den Männern und der Brustkrebs bei den Frauen an erster Stelle. Der Lungenkrebs fordert mit Abstand die meisten Krebsopfer. Hierbei handelt es sich um einen sehr aggressiven Tumor, der sehr früh metastasiert, aber erst spät diagnostiziert werden kann. Der Dickdarm-, der Prostata- und der Brustkrebs sind die zweithäufigsten Krebsarten und gehören zum typischen Alterskrebs, da sie sich sehr langsam aus gutartigen Vorstufen entwickeln. Beim Magenkrebs wiederum liegt die Hauptursache bei einer Infektion mit dem Bakterium *Helicobacter pylori*, dem mittlerweile medikamentös vorgebeugt werden kann.[4]

Die Entwicklung einer gesunden Zelle in eine Krebszelle und deren Wachstum zu einem Tumor ist ein mehrstufiger Prozess (Abb. 1).

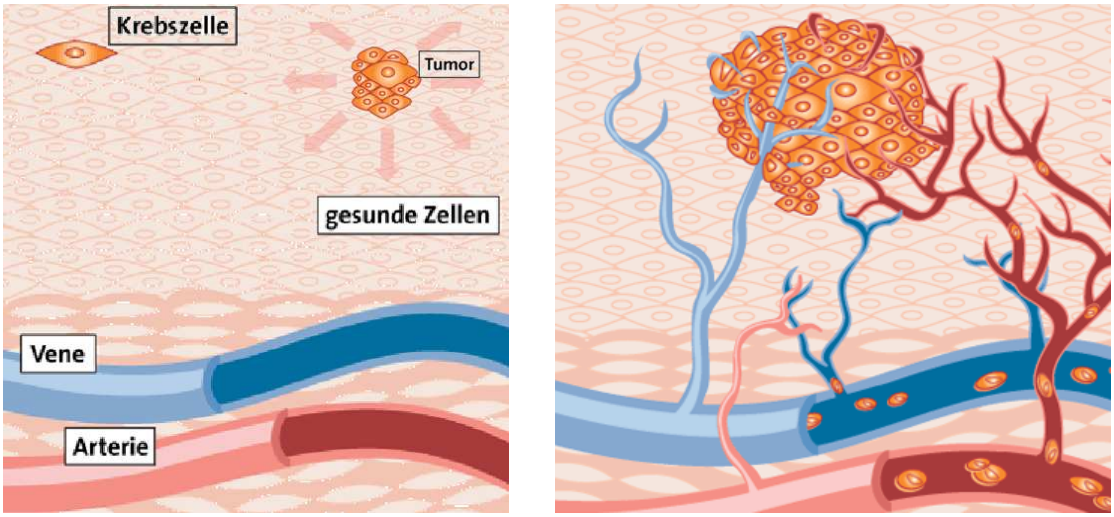


Abb. 1: Prozess der Krebsentstehung[5]

Eine bereits angegriffene Zelle kann durch Mutation zu Hyper- (Vergrößerung eines Gewebes oder Organs durch vermehrte Zellteilung) bzw. Dysplasie genannten Fehlbildungen führen (Abb. 1, linkes Bild, S. 2). Wird der Tumor durch die Produktion bestimmter Enzyme bösartig, so ist er in der Lage, die angrenzende Gewebsschicht zu durchdringen und in das angrenzende Gewebe hineinzuwachsen. Der nächste Schritt ist die Metastasierung (Abb. 1, rechtes Bild, S. 2). Maligne Tumorzellen produzieren weniger Cadherin (Adhäsionsproteine) und sind somit sehr flexibel in ihrer Fortbewegung. Anschließend heftet sich die Tumorzelle an das Blutgefäß, durchdringt dieses mit Hilfe der gebildeten Proteasen und gelangt zum Zielgewebe.[5] Der Tumor wächst in das gesunde Gewebe hinein und schädigt auf diese Weise die umgebenden Strukturen. Eine weitere Folgeerscheinung ist die sogenannte Tumoranämie, bei der die Lebensdauer der Erythrozyten herabgesenkt wird. Weiterhin kommt es auch zu Blutungen und Schädigungen der Blutgefäße, wodurch die Konzentration der Erythrozyten weiter abnimmt und schließlich die Überlebenschancen der Patienten verringert wird.[6, 7]

Cancerogene

Als Auslöser für Krebs beim Menschen scheinen Chemikalien die größte Rolle zu spielen. Die ersten Berichte über einen Zusammenhang zwischen bestimmten Substanzen und der Krankheit stammen von *Hill* (1761) und *Pott* (1775). Sie berichteten damals bereits von erhöhtem Auftreten von Krebs in den Nasenschleimhäuten nach langjährigem Schnupftabak-Gebrauch und von Ruß und Teer verursachten, so genannten „Rußwarzen“ bei Schornsteinfegern.[1, 8]

Da aromatische Amine Thema dieser Arbeit sind, sollte der Begriff „Anilin-Krebs“ näher betrachtet werden. Dieser Begriff wurde 1895 von *Rehn* geprägt. Er beobachtete eine Zunahme von Harnblasenkarzinomen bei Arbeitern, die in der Produktion von Magenta (Fuchsin) beschäftigt waren.[9] Anilin **1** stellte die Ausgangsverbindung der Synthese dar. Allerdings ist die Bezeichnung „Anilin-Krebs“ nicht ganz korrekt, da weniger Anilin **1** selbst, sondern vielmehr die Nebenprodukte der Anilinherstellung, wie z.B. 4-Aminobiphenyl **2**, krebserzeugend sind.[10] Aromatische Amine werden seit Beginn des 19. Jahrhunderts zur Synthese von Azo-Farbstoffen, Pharmaka, Pestiziden oder auch Polyurethanen benötigt. Auch waren sie bis ins 20. Jahrhundert im Straßenteer enthalten.

Darüber hinaus können sie auch als Abbauprodukte, z.B. durch Reduktion von polycyclischen Nitroaromaten aus Dieselgasen und synthetischen Treibstoffen entstehen.

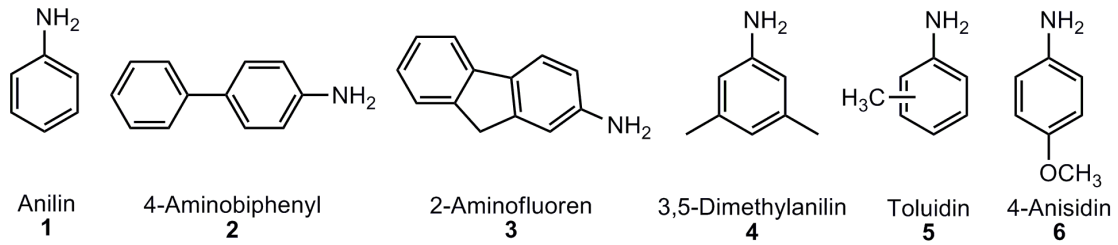
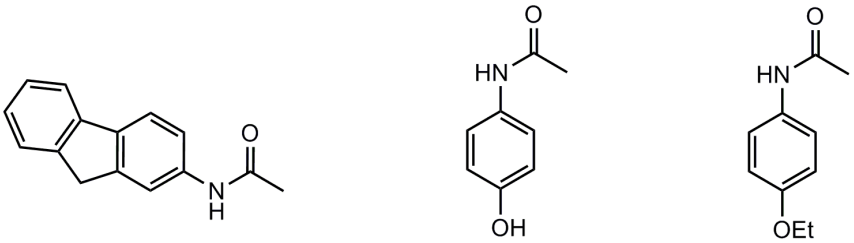


Abb. 2: Aromatische Amine

Die Befürchtung, dass „cancerogene Chemie“ der wesentlichste Auslöser von Tumoren beim Menschen ist, trifft nicht zu. Eines der weltweit relevantesten Cancerogene ist ein reines Naturprodukt: Aflatoxin B1. Es wird vom Pilz *Aspergillus flavus* gebildet und ist primär nicht mutagen. Erst nach seiner Aufnahme über den Darm gelangt es in die Leber, wo es in ein hochreaktives Zwischenprodukt überführt wird.[3] Aus diesem Grund wird chemisch gesehen zwischen direkten und indirekten Cancerogenen unterschieden. Als direkte Cancerogene werden Substanzen bezeichnet, die ohne metabolische Aktivierung „direkt“ mit der DNA reagieren können. In diese Gruppe gehören halogenierte Substanzen, Nitrosamide und Elemente, wie z.B. Pb, Cr, As. In die Gruppe der indirekten Cancerogene fallen Substanzen, die erst nach einer metabolischen Aktivierung mit der DNA und anderen Biomolekülen die entsprechenden Addukte bilden können. Zu dieser Substanzklasse gehören u.a. polycyclische, aromatische Kohlenwasserstoffe, die eben genannten aromatischen Amine, *N*-Nitrosoverbindungen und Mykotoxine (Schimmelpilzgifte). Auch monocyclische, aromatische Amine sind für die Cancerogenese von großer Bedeutung. Sie wurden unter anderem im Tabakrauch nachgewiesen, vor allem Toluidin **5** und zahlreiche Methyl-, Dimethyl-, und Ethylderivate des Anilins **1**.[11] Bisher wurde angenommen, dass sie im Allgemeinen eine geringere Cancerogenität als die polycyclischen, aromatischen Amine aufweisen. Verbindungen dieser Art, wie z.B. Anilin **1**, wurden daher als Grenzcancerogene bezeichnet. Bei Substanzen dieser Klasse kommt die Fähigkeit der Tumorinduktion nur dann zum Ausdruck, wenn eine hohe Dosierung vorliegt, die Substanz über einen langen Zeitraum verabreicht oder aber ein Comutagen zugegeben wird.

Jedoch konnte *Böge* 2008 mit Hilfe von Primer-Verlängerungs-Untersuchungen beweisen, dass die monocyclischen Modifikationen einen stärkeren Einfluss auf enzymatische Aktivitäten haben als die polycyclischen Modifikationen.[12]

Auch die *N*-acetylierten Derivate der aromatischen Amine sind von besonderer Bedeutung. Aufgrund der Acetylgruppe besitzen sie im Gegensatz zu den nicht-acetylierten Derivaten andere physicochemische und biologische Eigenschaften.

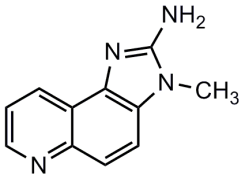


N-Acetyl-2-aminofluoren **7** | *N*-(4-Hydroxyphenyl)acetamid (Paracetamol) **8** | Phenacetin **9**

Abb. 3: *N*-Acetylierte mono- und polycyclische Arylamine

N-Acetyl-2-aminofluoren **7** bewirkt eine stärkere lokale Verzerrung der DNA als 2-Aminofluoren **3** und ist somit auch wirksamer im Unterbrechen der Replikation und Transkription. Aus diesem Grund stellt es aber auch ein besseres Substrat für die DNA-Reparatur-Enzyme dar.[13]

Ebenso konnten verschiedene heterocyclische, aromatische Amine, wie z.B. 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinolin (IQ) **10** in gekochtem Fisch und Fleisch nachgewiesen werden, wo sie durch Pyrolyse von Aminosäuren, wie Tryptophan, entstehen können.[14, 15, 16]



10

Abb. 4: 2-Amino-3-methyl-imidazo[4,5-*f*]quinolin (IQ) **10**

2. Kenntnisstand

2.1 Metabolismus der aromatischen Amine

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, handelt es sich bei aromatischen Aminen um so genannte indirekte Cancerogene. Im Organismus bedürfen sie daher einer metabolischen Aktivierung. Trotz der unterschiedlichen Wirkungsweise ist der exakte Ablauf der Cancerogenese bei den genannten Verbindungen gleich.
Gelangen aromatische Amine in den Körper, setzt ein Detoxifizierungsprozess ein, der die Wasserlöslichkeit körperfremder Stoffe zum Ziel hat, um diese ausscheiden zu können.
Bei diesen Prozessen werden zwei voneinander abhängige Phasen unterschieden. In **Phase I** findet eine Oxidation, die Bildung der proximalen Carcinogene, in **Phase II** meistens eine Veresterung der im ersten Schritt entstandenen Hydroxylfunktion, statt, was die Wasserlöslichkeit und somit das Ausscheiden des Amins über die Nieren garantiert. Allerdings können die aromatischen Amine auch durch enzymatische Reaktionen zu elektrophilen Aminierungsreagenzien (ultimale Carcinogene) umgewandelt werden (Abb. 5, S. 7).[17]

2.1.1 **Phase I:** Oxidation; Bildung der proximalen Carcinogene

Cramer, Miller und *Miller* zeigten 1960, dass bereits der erste Schritt, die Oxidation der aromatischen Amine, eine Schlüsselrolle für deren Carcinogenität spielt.
Das in den Organismus eintretende aromatische Amin **11** kann in der Leber durch die cytosolische *N*-Acetyltransferase in das entsprechende Arylamid **12** überführt werden. Unabhängig von diesem Schritt können beide Formen mittels Cytochrom P_{450} vermittelte Oxygenasen zum Hydroxylamin **13** bzw. zur Hydroxamsäure **14** *N*-hydroxyliert werden. Ebenso kann das Hydroxylamin **13** auch noch auf dieser Ebene durch das Enzym *N*-Acetyltransferase (NAT1/NAT2) zur Hydroxamsäure **14** acetyliert und anschließend durch die *N*-Glucuronierung (Entgiftungsreaktion) in den stabilen Glucuronsäureester **15** umgewandelt werden, welcher dann über die Niere abtransportiert und ausgeschieden werden kann. Erfolgt die *N*-Glucuronierung nicht, werden das Hydroxylamin **13** und die Hydroxamsäure **14** über den Blutweg in die Harnblase transportiert.

Das Hydroxylamin **13** kann im Blut durch Hämoglobin unter Methämoglobinbildung zum Nitrosoderivat **16** oxidiert werden und spontan mit Glutathion (GHS) oder SH-Gruppen des Hämoglobins abreagieren.[18, 19]

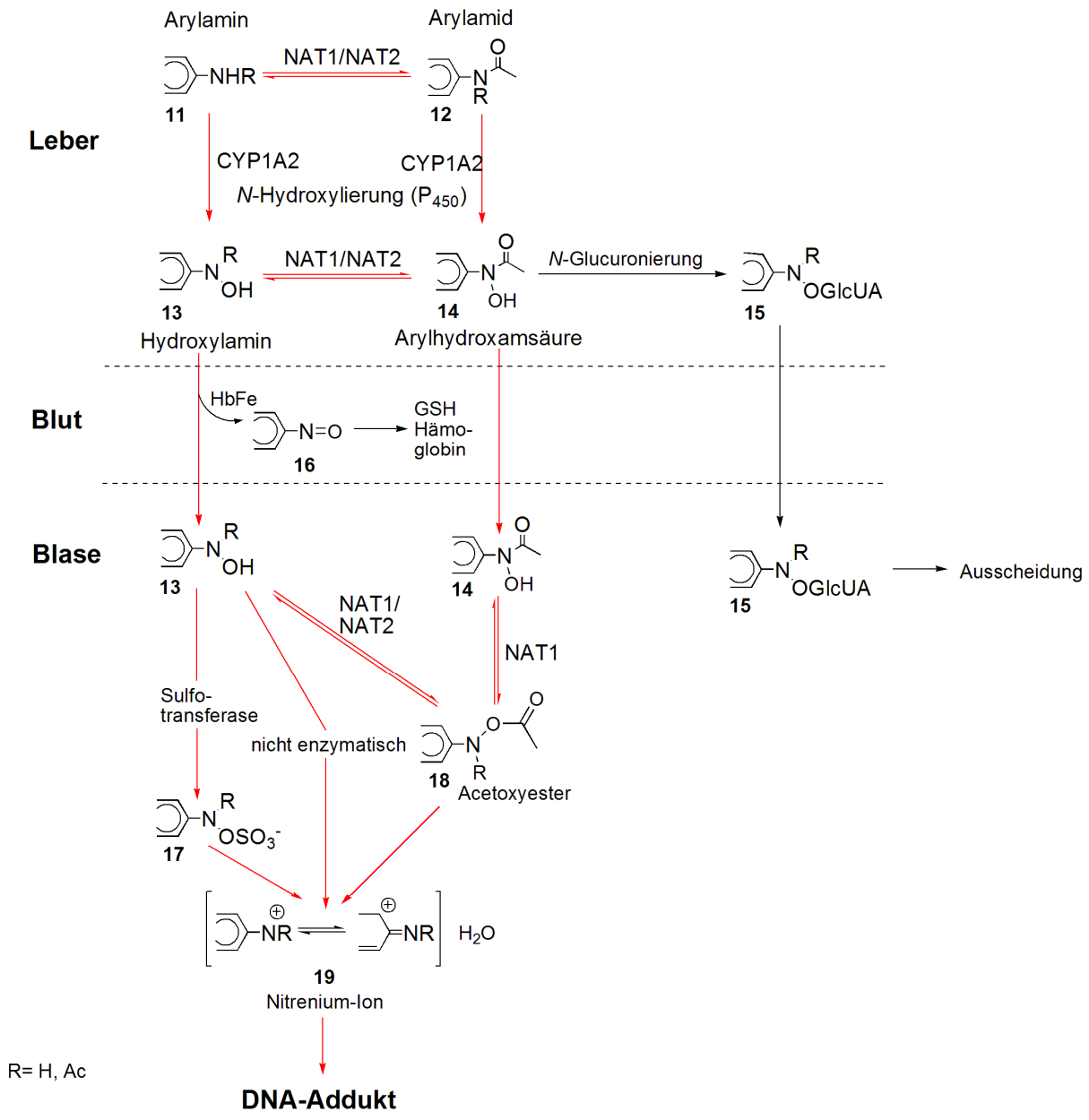


Abb. 5: Metabolismus aromatischer Amine in der Entstehung von Harnblasenkrebs[20]

(Giftungsreaktionen, Entgiftungsreaktionen)

2.1.2 **Phase II**: Veresterung; Bildung der ultimalen Carcinogene

In Phase II kommt es in der Harnblase zur Bildung der ultimalen Carcinogene. Hier findet meistens eine Veresterung statt, indem das entsprechende Hydroxylamin **13** bzw. die Hydroxamsäure **14** wegen des geringen pH-Wertes protoniert wird und so unter Wasserabspaltung das hochreaktive Nitreniumion **19** liefert.
Weiterhin ist diese Reaktion auch enzymatisch durch die Sulfotransferase bzw. *N*-Acetyltransferase möglich, wobei jeweils der Sulfatester **17** bzw. das *N*-Acyloxyarylamin **18** (ultimale Carcinogene) entstehen, welche dann unter Abspaltung von SO_4^{2-} bzw. AcO^- ebenfalls das Nitreniumion **19** liefern. Das auf diesen Wegen erhaltene Nitreniumion **19** kann kovalent an die DNA oder andere Biomoleküle binden.[21, 22]

2.1.3 Reaktion ultimaler Carcinogene mit der DNA

Das durch Metabolisierung erhaltene elektrophile Nitreniumion **19** ist in der Lage, mit nucleophilen Stellen der DNA zu reagieren und so genannte DNA-Addukte zu bilden. Die Anzahl, die Struktur und auch die Menge der mit den DNA-Basen gebildeten Produkte ist *in vitro* als auch *in vivo* je nach Carcinogen verschieden. Chemisch betrachtet ist der Begriff „DNA-Addukt“ missverständlich, da es sich bei der Reaktion zwischen Carcinogen und Nucleobase nicht um eine Additions- sondern um eine Substitutionsreaktion handelt. Da dieser Begriff in der biochemischen Terminologie jedoch gebräuchlich ist und auch in der Literatur Verwendung findet, soll er auch hier angewandt werden.
Neben der Bildung von Addukten an der N^4- und C5-Position des 2´-Desoxycytosins, an der C6-Position des 2´-Desoxythymidins, an der C8-, N^2- sowie O^6-Position des 2´-Desoxyguanosins wurden auch einige Addukte am 2´-Desoxyadenosin, welche Thema dieser Arbeit sind, gefunden. [23, 24] Hierbei handelt es sich um die C8- und N^6-Addukte (Abb. 6, S. 9).

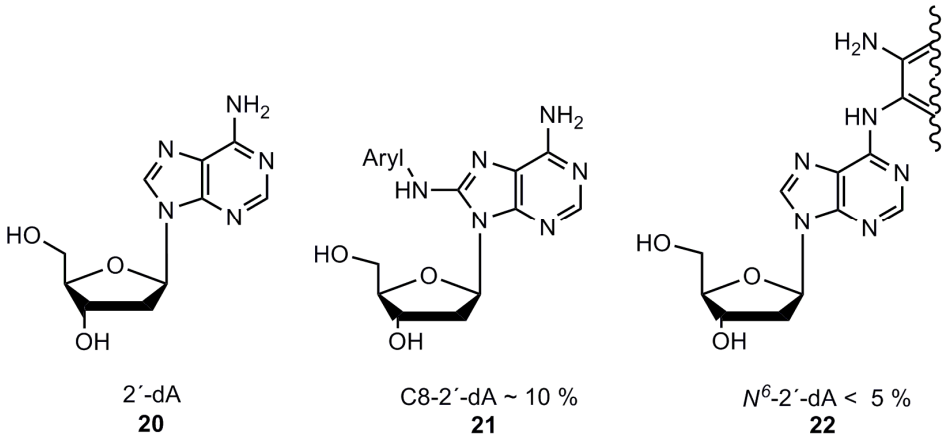


Abb. 6: 2´-Desoxyadenosin (2´-dA) **20**, C8-*N*H-2´-dA-Addukt **21** und N^6-2´-dA-Addukt **22**

Die Struktur der DNA kann dadurch soweit verändert werden, dass es bei der Transkription zu Mutationen kommt und in Folge dessen zu Zellen, die ein mutiertes Genom besitzen. Dies kann zum Absterben der Zelle oder auch zur Entwicklung einer Tumorzelle führen.[1] Allerdings führen diese DNA-Modifikationen nur dann zu Replikationsfehlern, wenn die zelleigenen Reparaturmechanismen die Veränderung nicht rechtzeitig erkennen und reparieren, oder sobald die Zelle nicht mehr in der Lage ist, ein Signal zu ihrer eigenen Zerstörung abzugeben.

In Tierversuchen konnte mittels ^{32}P-Postlabeling-Experimenten gezeigt werden, dass die unterschiedlichen DNA-Addukte der verschiedenen aromatischen Amine unterschiedlich schnell repariert werden können.[25] So werden z.B. *N*-acetylierte Derivate an der C8-Position schneller repariert als Derivate ohne die *N*-Acetyl-Funktion. Der Grund hierfür liegt an den unterschiedlichen DNA-Konformationen, welche durch die verschiedenen Addukte entstehen können. Welche Konformation vorliegt und damit maßgeblich die Struktur beeinflusst, hängt vom aromatischen System des Addukts ab. Während einige Aromaten sich in die Helix der DNA einfügen und keine merkliche konformative Änderung hervorrufen, begünstigen andere in unterschiedlichem Maße die Umwandlung von der *B*-Konformation zur *A/Z*-Konformation (z.B. 2-Aminofluoren **3** oder 4-Aminobiphenyl **2** sowie die entsprechenden *N*-Acetyl-Derivate, die eine stärkere konformative Änderung verursachen), die eine Denaturierung der DNA zur Folge hat.

Anhand von Untersuchungen mit Hilfe von Schmelzpunktexperimenten, Zirkulardichroismus- und NMR-Messungen konnte gezeigt werden, dass Addukte mit denaturierender Konformation schneller repariert werden als solche, die die Konformation nicht verändern.[26] Wird die DNA nicht repariert, so kann es bei der Transkription zu Mutationen kommen. Replikationsfehler können im weiteren Verlauf entweder zur Apoptose oder zur Entstehung einer Tumorzelle führen.

2.2 Mechanismus der Adduktbildung *in vivo*

Der Mechanismus der Bildung der DNA-Purin-Addukte ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Allerdings gilt es als erwiesen, dass als Intermediat ein Arylnitreniumion **19** (Abb. 5, S. 7) gebildet wird. Die Beobachtung, dass die Reaktion vorwiegend an der Base Guanin stattfindet, kann mit Hilfe des Redoxpotentials erklärt werden, da dieses deutlich kleiner ist als bei den anderen Heterocyclen und somit die notwendige Elektronenabgabe erst möglich macht. Aufgrund der Tatsache, dass die C8-Position nicht die nucleophilste Stelle der Base ist und mit Alkylierungsreagenzien, wie z.B. Methyliodid, eine bevorzugte Reaktion an der *N*7-Position nachgewiesen werden konnte, schlug *Guengerich* einen Mechanismus vor, der diesen Umstand mit einbezog.[19, 27, 28] Zu ähnlichen Ergebnissen kamen 3 Jahre später auch *Novak* und *Kennedy*.[29] Die durch den elektrophilen Angriff des Arylnitreniumions **19** erzeugte positive Ladung ist demnach über die *N*7-, C8- und *N*9-Positionen delokalisiert. Nach Deprotonierung an der C8-Position liegt dann ein Ylid vor, welches in einer der Stevens-Umlagerung ähnlichen Reaktion das *in vivo* beobachtete C8-Addukt **21** liefert, wobei seine Aromatizität beibehalten wird (Abb. 7).

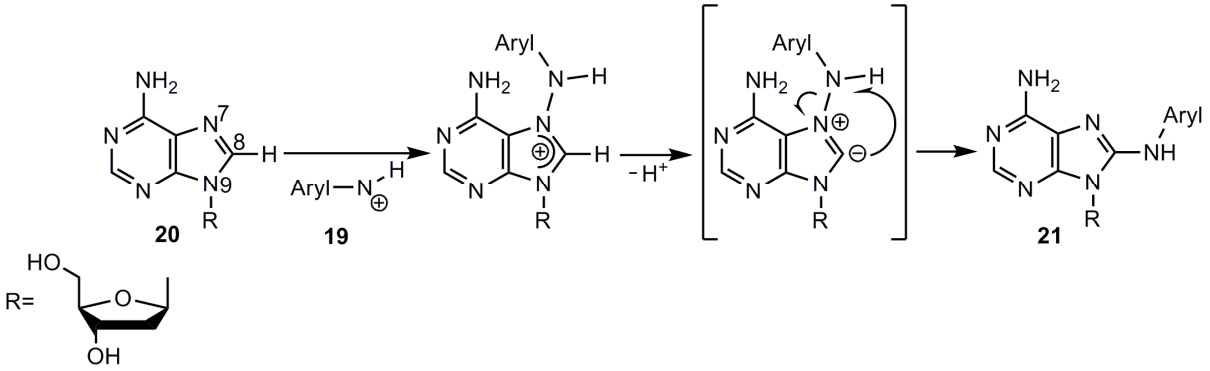


Abb. 7: Postulierter Mechanismus der C8-Adduktbildung **21**

2.3 Nachweis der Carcinogenität

Der Nachweis, ob eine Substanz carcinogen oder mutagen ist, lässt sich am zuverlässigsten in Tierversuchen an Säugetieren klären. Da diese jedoch nicht nur sehr umstritten, sondern auch teuer sind, existieren auch alternative Methoden, wie z.B. die ^{32}P-Postlabeling-Methode und der Ames-Test.

^{32}P-Postlabeling-Methode

Eine hochempfindliche Methode zum Nachweis von DNA-Addukten ist das ^{32}P-Postlabeling. Bei dem 1981 von *Randerath* eingeführten Verfahren wird zunächst die DNA mit der zu testenden Substanz inkubiert, wobei ebenfalls ein Aktivierungssystem hinzugegeben werden kann.[30] Nach Aufarbeitung wird die DNA enzymatisch zu 3´-Nucleosidmonophosphaten abgebaut. Diese werden dann durch Reaktionen mit γ-[^{32}P]-Adenosintriphosphaten am C5´ phosphoryliert. Durch mehrdimensionale Dünnschichtchromatographie können die Addukte von den unveränderten 3´,5´-Nucleosiddiphosphaten abgetrennt und radiographisch untersucht werden. Voraussetzung ist jedoch, dass die Addukte bekannt und strukturell charakterisiert sind, um eine eindeutige Zuordnung vornehmen zu können.

Ames-Test

Der gegenwärtig wichtigste Test zur Untersuchung der Mutagenität einer Verbindung ist der nach seinem Entwickler *Ames* benannte Ames-Test.[31, 32] Als Testobjekte werden hier mutierte Bakterienstämme von *Salmonella typhimurium* verwendet. Diese Stämme besitzen eine Histidinauxotrophie; eine Mutation in den Genen für die Enzyme der Histidinbiosynthese, welche dafür sorgt, dass diese Bakterien im Gegensatz zum Wildtyp nicht zur Synthese von Histidin befähigt sind und deshalb in histidinfreien Kulturen nicht wachsen können. Diese Mutation kann allerdings durch eine weitere Mutation (z.B. durch chemische Substanzen) rückgängig gemacht werden (Abb. 8, S. 12).

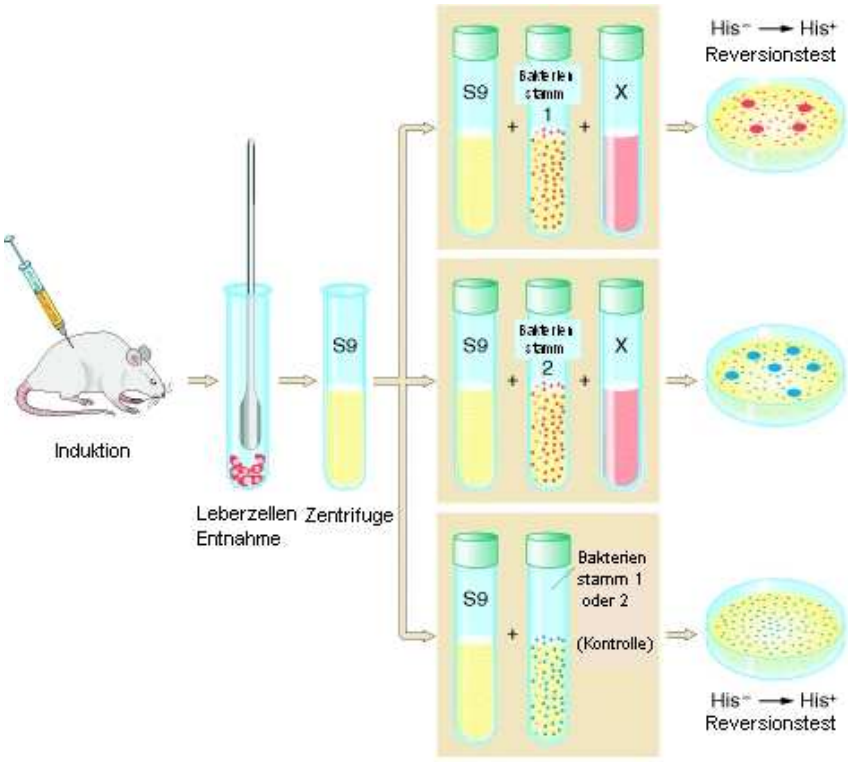


Abb. 8: Ames Test[33]

Durch diese Reversion entsteht eine Zelle (Revertante), die nun wiederum eine funktionelle Basensequenz besitzt und in der Lage ist, Histidin zu synthetisieren und damit zu leben. Es ist möglich, eine Selektion dieser Revertanten vorzunehmen, ihre quantitative Häufigkeit zu bestimmen und mit der Mutagenität der chemischen Substanz in Korrelation zu setzen. Routinemäßig werden heute fünf verschiedene Bakterienstämme eingesetzt. Da diese Stämme zum Teil verschiedene Arten von Mutationen (z.B. Leseraster oder Basenpaarmutationen) besitzen, kann mit ihrer Hilfe nicht nur das mutagene Potential einer Substanz, sondern auch eine Klassifizierung des Wirkmechanismus erfolgen. Da die meisten gentoxischen Stoffe allerdings nicht direkt, sondern erst nach Aktivierung zu reaktiven Metaboliten mit der DNA reagieren (z.B. die aromatischen Amine), muss diese im Säugetierorganismus stattfindende Metabolisierung im Ames-Test simuliert werden. Hierzu kann ein aus Säugetierleber gewonnenes Aktivierungssystem (S9-Mix) verwendet werden.[34] Ein positiver Ames-Test wird als Hinweis auf die Mutagenität einer Substanz gewertet.

Debnath, Shustermann und *Hansch* testeten 1992 die mutagene Aktivität von 67 ausgewählten Arylaminen in einem Octanol/Wasser-Gemisch an *S. typhimurium* TA98 und *S. typhimurium* TA100.[35]

Arylamin	**log*P* (exp.) (experimentelle Polarität)**	**log Rev/nmol**
2-Aminofluoren **3**	3.14	0.91
3,5-Dimethylanilin **4**	1.91	-1.31
4-Aminobiphenyl **2**	2.86	0.29
4-Methoxyanilin **6**	0.95	-1.95
Anilin **1**	0.90	-2.61

Tab. 1: Vergleich von Polarität und Mutagenität der verwendeten Arylamine[35]

Hier scheint ein Zusammenhang zwischen der Mutagenität (log Rev) und der Polarität (log*P*) der verwendeten aromatischen Amine zu bestehen. Je größer der log*P* Wert, desto lipophiler bzw. unpolarer die Substanz. Die mutagene Aktivität der Arylamine hängt in erster Linie mit der Hydrophobie der Amine zusammen. Die mutagene Aktivität steigt mit der Hydrophobie bezüglich der Amine mit log*P* > 1. Das bedeutet, je größer der log Rev/nmol-Wert, desto mutagener die Substanz (s. Tab. 1).[35] Weiterhin zeigten *Debnath, Shustermann* und *Hansch* in ihren Testreihen, dass auch elektronische Effekte bei der Mutagenität eine Rolle spielen. Diese sind allerdings nur bei den unterschiedlichen Schritten der metabolischen Aktivierung der Arylamine ausschlaggebend. Sterische Effekte wurden nicht berücksichtigt.

2.4 Chemische Synthese von Arylamin-Addukten

Bei der Synthese der modifizierten Arylamin-Addukte können generell drei Strategien angewendet werden.

Bei der *elektrophilen Arylaminierung* werden, ähnlich dem *in vivo* Mechanismus, Hydroxylamine **13** gebildet, welche dann in das elektrophile Nitreniumion **19** umgewandelt werden können. Nachteile dieser Methode sind jedoch die sehr geringen Ausbeuten (Abb. 9).[36, 37]

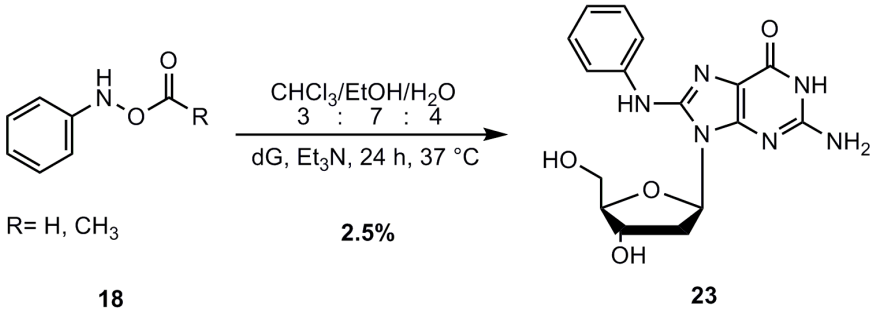


Abb. 9: Elektrophile Arylaminierung nach *Famulok* und *Boche* mit *N*-Acetoxyverbindungen **18** carcinogener Arylamine

Bei der *nucleophilen Arylaminierung* konnten *Kriek* und *Müller* 1967 bei der Umsetzung von 2´,3´,5´-Tri-*O*-acetyl-8-bromguanosin **24** mit 2-Aminofluoren **3** zu dem entsprechenden Addukt **25** mit 23% eine bessere Ausbeute erzielen, als dieses über die elektrophile Arylaminierung bisher möglich war (Abb. 10).[38]

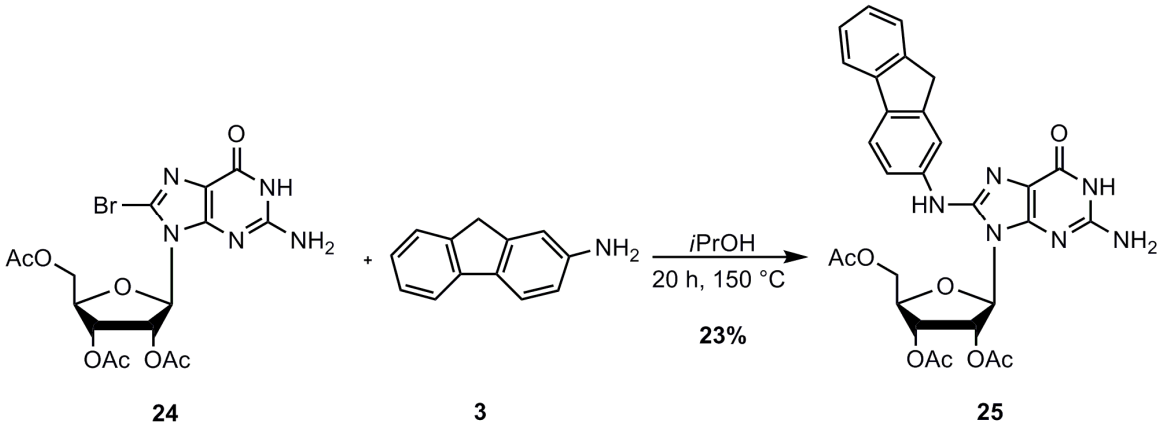


Abb. 10: Beispielreaktion zur nucleophilen Arylaminierung

Jedoch waren die harschen Reaktionsbedingungen ein Grund dafür, dass bei Reaktionen mit verschiedenen Arylaminen eine Depurinierung bei den 2´-Desoxy-nucleosiden beobachtet wurde. Somit war diese Methode bislang nur für Ribonucleoside anwendbar, während die entsprechenden 2´-Desoxyribose-nucleoside nicht das gewünschte Produkt lieferten.

Bei der erstmals von *Migita et al.* im Jahr 1983 veröffentlichten *Palladium-katalysierten C-N-Bindungskupplung* konnte eine durch $PdCl_2[P(o\text{-Tol})_3]_2$ katalysierte Kupplung eines Aminostannans mit verschiedenen Bromaromaten **26** zu den entsprechenden Arylaminen **27** beobachten werden.[39] Diese Reaktion wurde von *Buchwald* und *Hartwig* in der Folge weiterentwickelt und beide veröffentlichten schließlich 1995 die nach ihnen benannte Buchwald-Hartwig-Kupplungsreaktion (Abb. 11).[39, 40, 41]

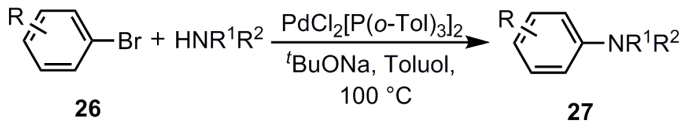


Abb. 11: Buchwald-Hartwig-Kupplung

Während sich die ersten Reaktionen mit Nucleosiden auf die exocyclischen Aminofunktionen konzentrierten, versuchten *Laksham* und *Riccardis* bereits auch die N^2- und N^6-Addukte von 2´-dG und 2´-dA **20** zu synthetisieren.[42, 43]
Die erste erfolgreiche Buchwald-Hartwig-Kupplung an der vorher bromierten C8-Position von 2´-Desoxyribonucleosiden gelang *Rizzo* und *Wang*.[44] Als Nucleosid verwendeten sie 2´-Desoxyguanosin und als Arylamin das Nahrungsmittelmutagen 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]-quinolin (IQ) **10** (Abb. 12, S. 16).

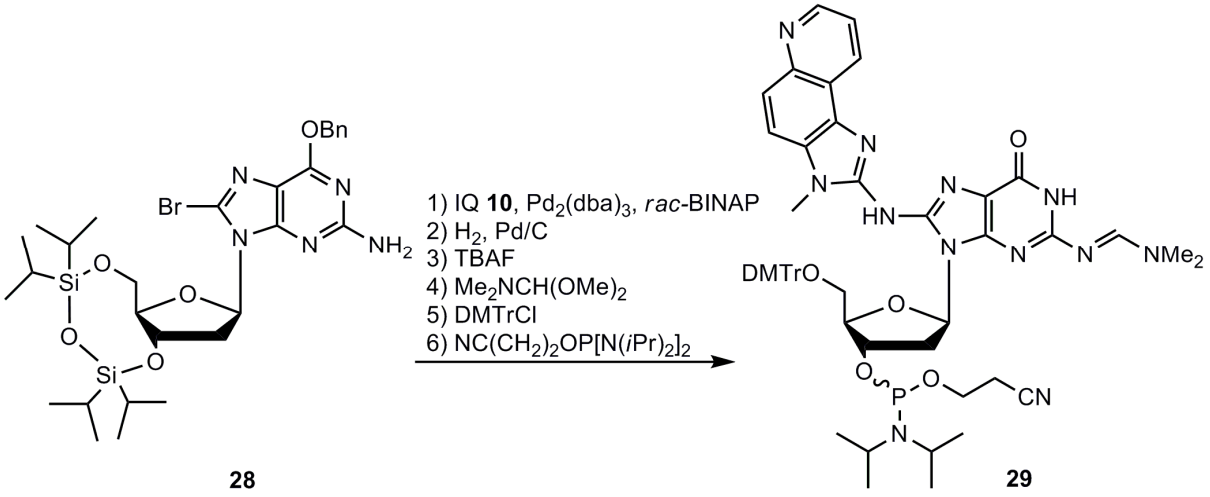


Abb. 12: Darstellung des Phosphoramidits **29** nach *Rizzo*[44]

Allerdings war es nicht möglich, die entsprechenden Phosphoramidite **29** in den standardmäßig verwendeten Lösungsmitteln zu lösen und somit eine präparative Oligonucleotidsynthese durchzuführen.

Die Darstellung C8-*N*H-Arylamin-modifizierter Phosphoramidite von 2´-dG **31** gelang *Gräsl* 2002.[45, 46, 47] Auch bei der von ihr durchgeführten Synthese erfolgte die Buchwald-Hartwig-Kupplung mit den bereits literaturbekannten Werten von 10 mol% $Pd_2(dba)_3$ und 30 mol% *rac*-BINAP. Als Base wurde Kaliumphosphat eingesetzt. Nach anschließender Debenzylierung und Desilylierung wurde an der 5´-Position die DMTr-Schutzgruppe eingeführt und das 2´-dG-Derivat in die entsprechenden Phosphoramidite **31** überführt (Abb. 13). 2005 wurde über den erfolgreichen Einbau dieser Addukte in Oligonucleotide und deren Charakterisierung berichtet.[47]

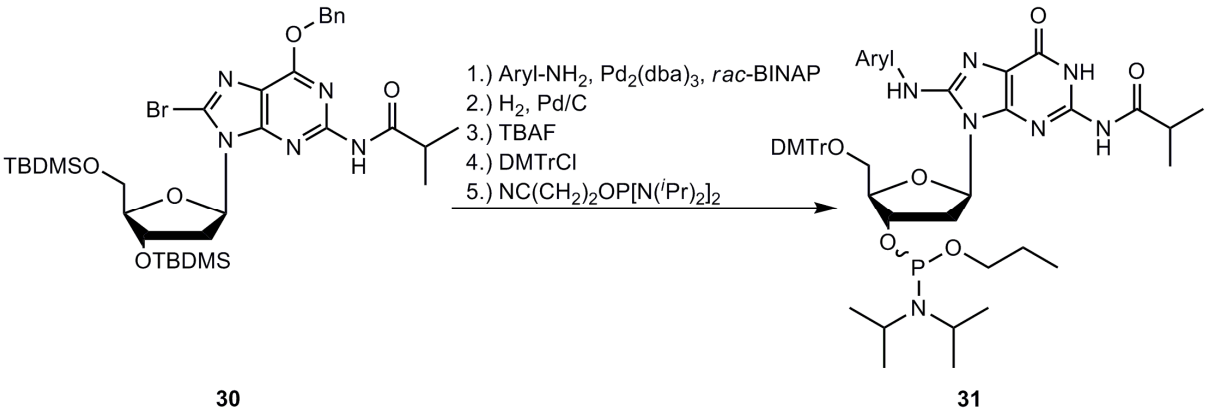


Abb. 13: Syntheseroute von *Gräsl*[45, 46, 47]

Zur gleichen Zeit untersuchte *Takamura-Enya* die Darstellung C8-*N*H-Arylamin modifizierter 2´-dG-Derivate **35** mittels der Buchwald-Hartwig-Kupplung.[48] In diesem Fall erfolgte die Umsetzung des bereits geschützten 2´-dG-Derivates **32** mit Arylbromiden (Abb. 14).

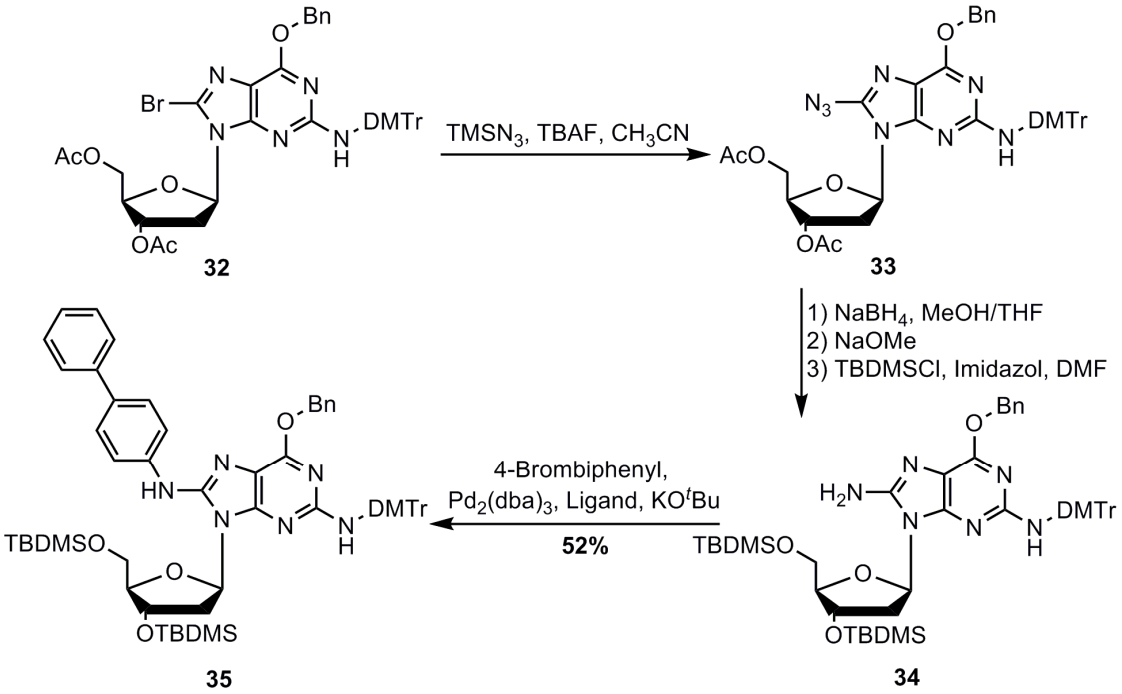


Abb. 14: Darstellung von C8-*N*H-Arylamin-modifiziertem 2´-dG **35**[48]

2.5 Chemische Synthese von Arylamin-modifiziertem 2´-Desoxyadenosin

Obwohl die C8-Addukte von 2´-dA **21** mit weniger als 10% Vorkommen im Organismus identifiziert worden sind, waren die Synthesen dieser Verbindungen lange unerforscht.

Die Kupplung eines Arylamins an die C8-Position von Adenosin mittels Buchwald-Hartwig-Reaktion wurde als erstes 2001 von *Schoffers* veröffentlicht.[49] Ein an der 2´,3´,5´-Position Silyl-geschütztes und an der C8-Position bromiertes Adenosin-Derivat **36** wurde unter Verwendung der bereits literaturbekannten Buchwald-Hartwig-Kupplungs-Bedingungen mit der starken Base NaO^{t}Bu und dem entsprechenden Arylamin umgesetzt (Abb. 15).

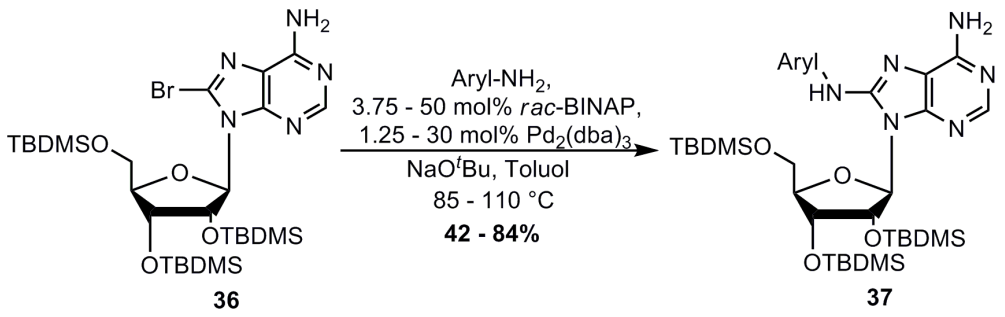


Abb. 15: Buchwald-Hartwig-Kupplung eines Arylamins mit 8-Brom-2´,3´,5´-*O*-tris(*tert*butyldimethylsilyl)-adenosin **36**[49]

Während eine Schützung der exocyclischen Aminofunktion nicht notwendig war, wurde für die Hydroxylfunktionen die TBDMS-Schutzgruppe verwendet. Für das Grenzcancerogen Anilin **1** konnten Ausbeuten um die 80% und für das starke Cancerogen 2-Aminofluoren **3** Ausbeuten um die 40% erreicht werden.

Auch die von *De Riccardis* und *Johnson* dargestellten N^6-Arylaminaddukte des 2´-dA waren durch die Buchwald-Hartwig-Kupplung darstellbar (Abb. 16).[42]

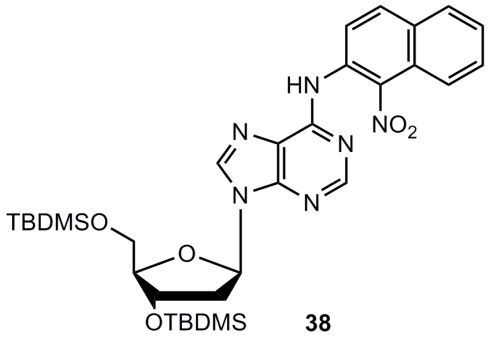


Abb. 16: N^6-Arylamin-Addukt von 2´-Desoxyadenosin **38**

Die Synthese C8-Histamin-modifizierter 2´-dA-Derivate **39**, **40** wurde erstmals 2002 durch die Gruppe von *Ting*, *Lermer* und *Perrin* veröffentlicht (Abb. 17).[50] Über die Reaktionsbedingungen und die erreichten Ausbeuten wurden leider keine Angaben gemacht.

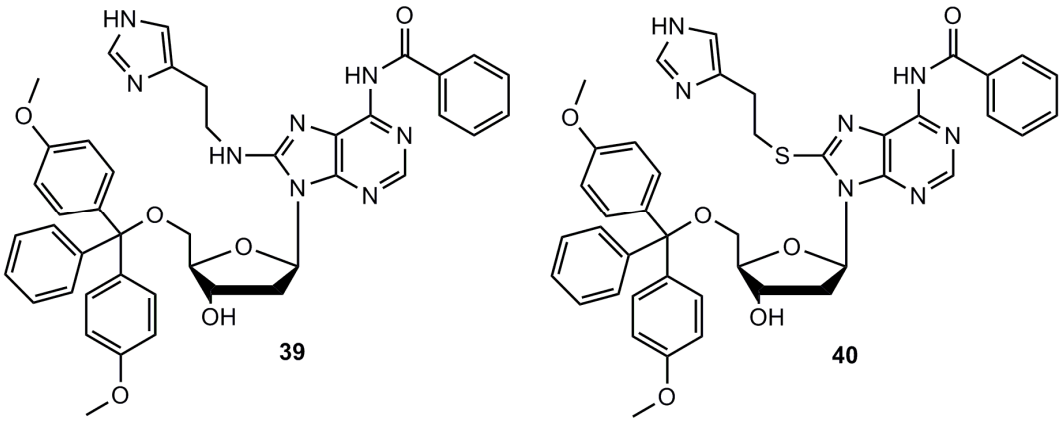


Abb. 17: C8-Histamin-modifizierte 2´-dA-Derivate **39, 40**[44]

2006 berichtete *Jacobsen* über die Darstellung C8-*N*H-Arylamin-modifizierter 2´-dA-Derivate und ihre Umwandlung in die entsprechenden Phosphoramidite **43**.[51]

Sie erkannten die Problematik der alten Syntheseroute, welche zwar auf 2´-dG, aber nicht vollständig in gleicher Weise auf 2´-dA **20** anwendbar war. Während die Bromierung bei 2´-dG mit NBS sehr gut funktionierte, musste beim 2´-dA elementares Brom verwendet werden. Die Schützung der 3´,5´-Positionen benötigte eine von TBDMS abweichende Schutzgruppe, wie z.B. TIPDS-Cl_2, mit der in einem Schritt beide Hydroxylfunktionen als Silylether blockiert werden konnten.

Die Buchwald-Hartwig-Kupplung erfolgte mit den bereits bekannten stöchiometrischen Mengen an Katalysator $Pd_2(dba)_3$ und Liganden *rac*-BINAP. Als Zusatz war die milde Base Cs_2CO_3 nötig. Mit dieser Reaktion konnten Ausbeuten um die 60-75% erreicht werden, abhängig vom jeweilig eingesetzten Arylamin. Wird die Menge des eingesetzten Katalysators minimiert, so erniedrigt sich auch die Ausbeute. Die anschließende Synthese der Phosphoramidite **43** und der Einbau dieser in die Oligonucleotide war abschließend auch für modifizierte 2´-dA möglich (Abb. 18, S. 20).[51]

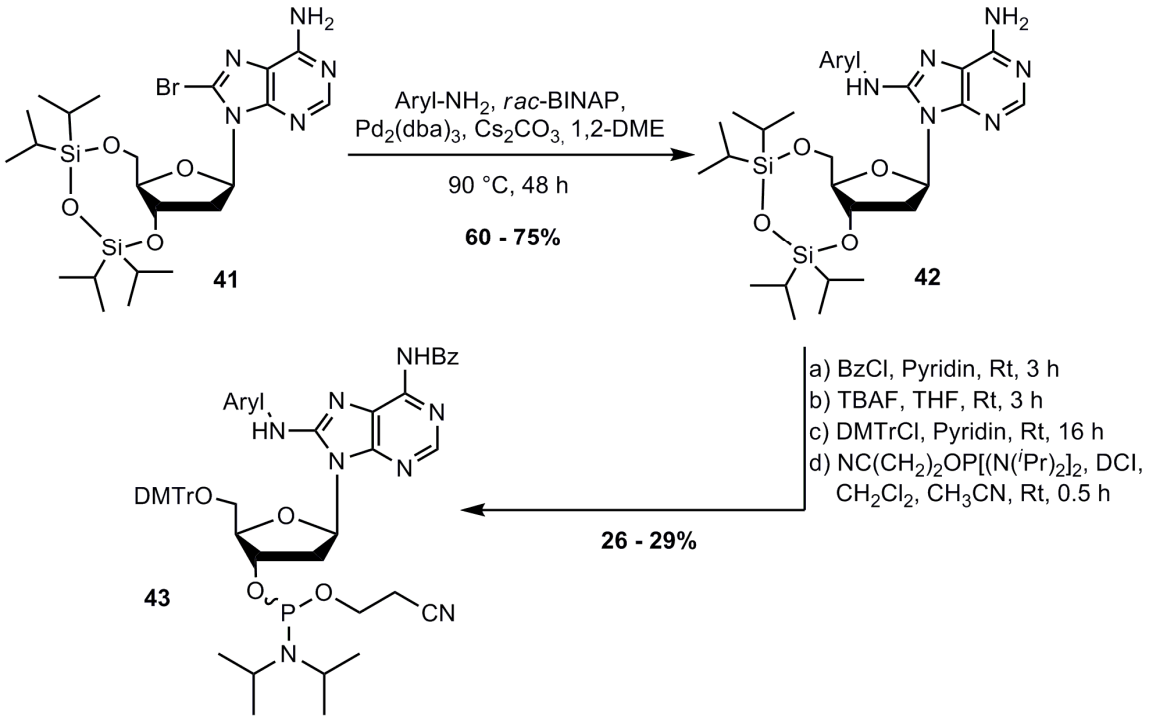


Abb. 18: Darstellung von C8-*N*H-Arylamin-2´-dA Phosphoramiditen **43**[51]

In eigenen Vorarbeiten während meiner Diplomarbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Buchwald-Hartwig-Kupplung nicht nur mit *rac*-BINAP, sondern auch mit Xantphos als Ligand funktioniert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Ausbeute des Kupplungsschrittes erhöht werden kann, wenn eine Vorreaktion zwischen Katalysator und Ligand stattfindet.[52]

Einen anderen Weg zur Synthese des Arylamin-modifizierten-2´-dA publizierten *Takamura-Enya et al.* 2006. Ihre Zielverbindungen waren die C8-Aminoaren-2´-dA- und -2´-dG-Derivate (Abb. 19).[53]

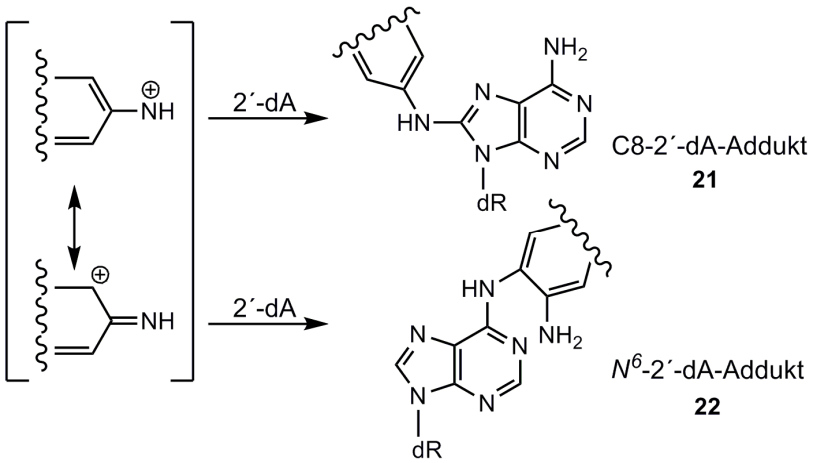


Abb. 19: Aminoaren-DNA-Addukte **21**, **22**

Sie vermuteten den Grund für die Entstehung der unterschiedlichen Addukte in der delokalisierten, positiven Ladung am Nitreniumion. Dieses führt entweder zu den C8-*N*H-Addukten **21** oder es greift an der exocyclischen Aminogruppe des 2´-dA in *ortho*- oder *para*-Position des aromatischen Ringsystems an und bildet so die N^6-Addukte **22** (Abb. 19, S. 20). Da die *para*-Position oftmals substituiert ist, überwiegt ein Angriff an der *ortho*-Position und führt so vorwiegend zu den C8-*N*H-Addukten **21**.

Die Buchwald-Hartwig-Kupplung erfolgte auch hier mit den bereits bekannten Reaktanden und führte zu Ausbeuten um die 55%. Um diese zu verbessern, wurde ein Pd(0)/Xantphos-System bei geschützten C8-Bromnucleosiden und heterocyclischen Aminen verwendet. Hiermit sind Ausbeuten um die 65% erreicht worden. In der hier zitierten Publikation wurde stets das gut bekannte Beispiel 2´-dG verwendet und die Übertragbarkeit solch eines Ligandentausches zur Verbesserung der Ausbeute an 2´-dA-Derivaten nicht näher untersucht.

2.6 Chemische Synthese von C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-Addukten

Nicht nur die C8-*N*H-Arylamin-Addukte sondern auch die entsprechenden *N*-Acetyl-Derivate haben eine große Bedeutung für die chemische Carcinogenese. Obwohl die beiden Derivate sich nur durch eine Acetylgruppe unterscheiden, haben sie ganz unterschiedliche physicochemische Eigenschaften und biologische Effekte. Bereits in der Struktur der beiden Addukte existieren massive Unterschiede. So liegt im Vergleich des C8-*N*H-2´-dG-Adduktes und seinem *N*-acetylierten Gegenüber beim 2-Aminofluoren-Addukt die *anti*-Konformation und beim 2-Acetyl-Aminofluoren-Addukt die *syn*-Konformation der glycosidischen Bindung vor.[54, 55] Daraus resultiert, dass die *N*-acetylierte Base in die DNA-Doppelhelix hinein ragt, mit den Nachbarbasen interkaliert und den Heterocyclus in die große Furche der *B*-DNA drückt. Beim unacetylierten Addukt, welches in der *anti*-Konformation vorliegt, liegt der modifizierte Teil in der großen Furche und stört die Basenpaarung nicht (Abb. 20, S. 22).

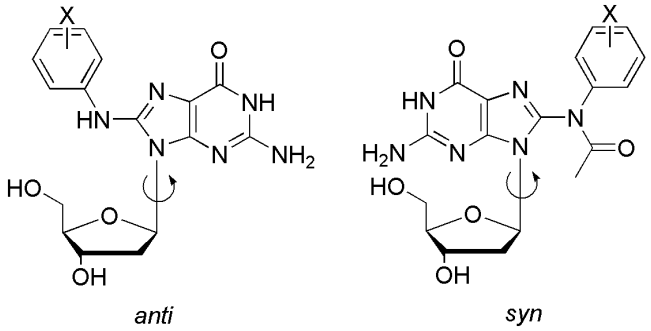


Abb. 20: *Syn*- und *anti*-Konformation

So wird auch eine Erklärung für die höhere Persistenz der 2-Aminofluoren-Addukte in der DNA gefunden, da diese schlechter von den Reparaturenzymen erkannt werden. Aus diesem Grund führen *N*-acetylierte Derivate stärker zu „frameshift-Mutationen“.[56] Diese sind Leserastermutationen, die durch Insertion oder Deletion einzelner Basen hervorgerufen werden. Die Mehrzahl dieser Mutationen führt zu biologisch völlig inaktiven Proteinen.[57, 58]

Die ersten Untersuchungen bezüglich einer Reaktion zwischen dem Insektizid 2-Acetylaminofluoren **7** und Adenosin wurden 1970 von *Marroquin* und *Coyote* durchgeführt.[59] Sie untersuchten das Verhalten von poly-A und poly-G Strängen, sobald diese mit einer Lösung aus 2-Acetylaminofluoren **7** in Propylenglycol versetzt wurden. Es wurde bevorzugt das acetylierte Addukt an Guanosin gefunden. Weiterhin erkannten sie, dass hauptsächlich das N^6-Addukt beim poly-A Strang gebildet wurde, während nur ein minimaler Anteil an der C8-Position reagierte. Zu denselben Ergebnissen gelangten auch *Saffhill* und *Abott* 13 Jahre später. Sie erkannten, dass diese Polymer-Modifikationen nicht mehr als Vorlage für *Escherichia coli DNA Polymerase I* dienen konnten, allerdings das Anknüpfen der Polymerase an den Strang nicht beeinflussten. Diese Modifikationen führen weiterhin zu einer Erhöhung des Einbaus von nicht-komplementären Nucleotiden in neu synthetisierte DNA.[60]

Die ersten erfolgreichen Synthesen dieser Addukte wurden von *Zhou* und *Romano* 1993 beschrieben.[61, 62] Mittels der bereits beschriebenen elektrophilen Arylaminierung (s. Abschn. 2.4, S. 13) konnten sie das *N*-Acetyl-2-aminofluoren-Addukt mit einer sehr geringen Ausbeute von 2.5% darstellen.

Der Einbau dieser modifizierter Phosphoramidite in Oligonucleotide mittels Festphasensynthese war jedoch lange Zeit nicht möglich, da die Acetylgruppe basenlabil ist und eine Entschützung nach der Festphasensynthese unter Standardbedingungen (Verwendung von Ammoniak) nicht ohne Verlust der Acetylgruppe möglich ist. Aus diesem Grund haben *Zhou* und *Romano* für die exocyclischen Aminofunktionen der Basen die Fmoc-Schutzgruppe eingeführt (N^2-Fmoc-2´-dG, N^6-Fmoc-2´-dA, N^4-Fmoc-2´-dC) und konnten sich auf diese Weise die Stabilität der Acetylgruppe sichern.[61, 62] Das Problem bei dieser Methode ist allerdings, dass Fmoc-geschützte Phosphoramidite nicht kommerziell erhältlich sind und somit einen erheblichen Arbeitsaufwand bei der Synthese bedeuten.
2002 veröffentlichten *Gillet* und *Schärer* die „Ultra Mild"-Methode, mit der sie in der Lage waren C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-Addukte des 2´-dGs zu synthetisieren und diese anschließend auch erfolgreich in Oligonucleotide einzubauen (Abb. 21).[64]

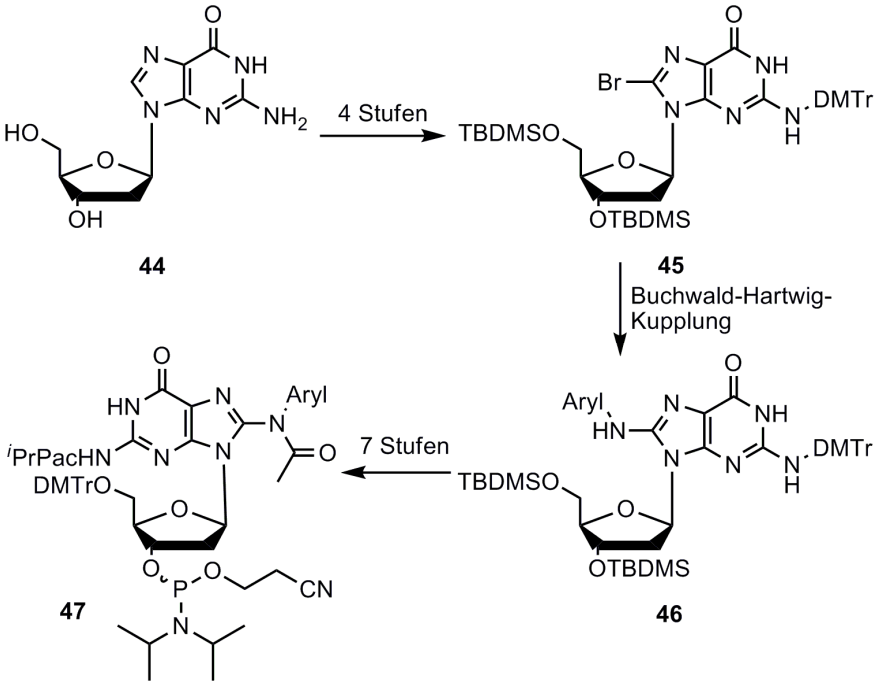


Abb. 21: Darstellung C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierter 2´-dG-Phosphoramidite **47** nach *Gillet* und *Schärer*[64]

Bei dieser Synthese konnte das gewünschte Phosphoramidit über insgesamt 12 Stufen mit einer Gesamtausbeute von 6% dargestellt werden. Hier wurden ausschließlich polycyclische, aromatische Amine verwendet. Eine Umsetzung mit monocyclischen Derivaten erfolgte nicht.

Nach der bereits bekannten Buchwald-Hartwig-Kupplung erfolgten die Acetylierung und der anschließende Einbau mittels Festphasensynthese unter Verwendung der „Ultra Mild“-Phosphoramidite. Diese haben eine ^{i}PrPac-Schutzgruppe und können unter milden Bedingungen durch eine Behandlung mit $^{i}Pr_2NH$ bei Raumtemperatur zwischen 1 - 12 h komplett entschützt und von der festen Phase gelöst werden. Die Acetylgruppe ist bei dieser Methode erst ab einer Behandlung zwischen 24 - 48 h nicht mehr stabil.[63, 64]

Die Synthese solcher *N*-acetylierter C8-Addukte ohne die Verwendung einer Kreuzkupplungsreaktion und der damit verbundenen Schutzgruppenstrategie gelang *Böge* 2007.[12] Der Schlüssel ist die Reaktion zwischen O^6-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-2´-dG **48** und der entsprechenden Aryl-Hydroxamsäure **14** (Abb. 22).

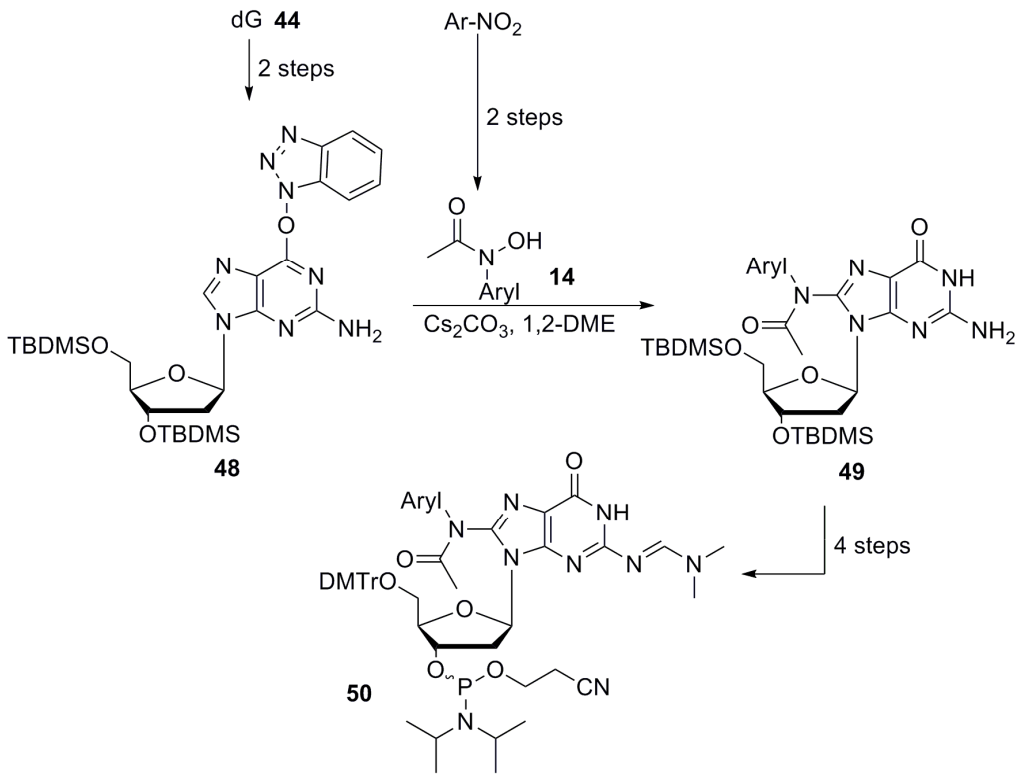


Abb. 22: Darstellung C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierter 2´-dG-Phosphoramidite **50** nach *Böge*[12]

Diese Synthese erfolgte in 7 Schritten mit einer Gesamtausbeute von 24 - 45% abhängig vom Arylamin. Die Phosphoramidite konnten erfolgreich in 12mer-Oligonucleotide eingebaut und anschließend von der festen Phase und den jeweiligen Schutzgruppen unter Verwendung von Ammoniak (25%) für 4 h bei 45 °C abgespalten werden. Trotz der basischen Bedingungen erfolgte die Entschützung hier ohne Verlust der Acetylgruppe.[65]

Eine direkte Synthese *N*-acetylierter C8-Addukte beim 2´-Desoxyadenosin ist bislang nicht bekannt und aufgrund des doch unterschiedlichen Reaktionsverhaltens der Heterobasen (2´-dA und 2´-dG) vermutlich auch nicht den bereits vorgestellten Methoden entsprechend.

2.7 Synthese und Eigenschaften Arylamin-modifizierter Oligonucleotide

Wie bereits in Kapitel 2.6 (S. 21) erwähnt, wurden die ersten synthetisierten C8-Arylamin-modifizierten Oligonucleotidbausteine und deren Einbau von *Zhou* und *Romano* beschrieben. Problematisch ist hier jedoch die Verwendung der Fmoc-Schutzgruppe, da die entsprechenden Phosphoramidite nicht kommerziell erhältlich sind.

Wiederum konnte *Gräsl* in ihren Arbeiten den erfolgreichen Einbau verschiedener Phosphoramidite zeigen.[45, 46, 47] Auch konnte sie erste Untersuchungen hinsichtlich der Eigenschaften der modifizierten Oligonucleotide durchführen. Sie beobachtete eine Verringerung des T_m-Wertes durch die eingebaute Modifikation. Auf die Konformation des Doppelstranges schienen die jeweiligen Arylamine jedoch keinen Einfluss auszuüben.

Gleichzeitig gelang auch *Rizzo* der Einbau des C8-IQ-2´-dG-modifizierten Phosphoramidits **29**. Er verglich diese Modifikation mit einem C8-(*N*-Acetyl)-2-fluorenyl-modifizierten 12mer-Oligonucleotid und konnte zeigen, dass die vorhandene Acetylgruppe einen größeren Einfluss auf den T_m-Wert hat als das Lebensmittelcarcinogen IQ **10**. Allerdings konnte auch er keine konformativen Änderungen des Doppelstranges feststellen.[66]

2005 führte *Romano* vergleichende Polymerase-Experimente durch und konnte feststellen, dass die beobachteten Effekte das Resultat der verwendeten Sequenz und der Art der Modifikation sind.[67]

In seiner Dissertation konnte auch *Böge*[12] beweisen, dass der Einbau polycyclischer C8-Arylamin-Modifikationen Einfluss auf den T_m-Wert haben und diesen deutlich gegenüber unmodifizierten Strängen senken. Allerdings wurden keine vergleichenden Experimente zwischen den *N*-acetylierten und den unacetylierten Modifikationen vorgenommen.

Weiterhin konnte er durch den erstmaligen Einbau von N^2-2´-dG-Addukten die Auswirkungen auf den T_m-Wert und auf die Aktivität des Restriktionsenzyms EcoRI durch einen Abbau demonstrieren. Die N^2-Modifikation hat einen größeren Einfluss auf den T_m-Wert als die entsprechende C8-Modifikation und je nach Position der Modifikation innerhalb oder außerhalb der Schnittstelle kann eine Erniedrigung der Enzymaktivität erreicht werden. Hierbei war der Einfluss der polycyclischen Modifikation überraschenderweise sogar geringer als der einer monocyclischen. Auch im Fall der bereits erwähnten Polymerase-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass starke Cancerogene eine geringere Rate an Fehleinbauten besitzen als die monocyclischen DNA-Schäden. Auch hier haben also die monocyclischen Modifikationen einen höheren Einfluss auf die Enzyme, was zeigt, dass die monocyclischen Modifikationen wahrscheinlich zu einer schnelleren Erkennung eines Schadens und damit zu einer schnelleren Reparatur führen als die polycyclischen Modifikationen.

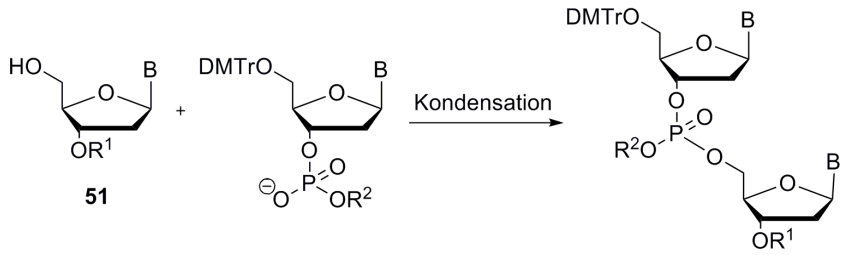
Zur gleichen Zeit konnte auch *Jacobsen* ähnliche Auswirkungen der Modifikationen bei C8-*N*H-Arylamin-modifizierten 2´-dA-Derivaten feststellen. Erstmals konnten hier C8-*N*H- und N^6-Addukte in verschiedene Sequenzen eingebaut und untersucht werden. Offensichtlich haben auch hier die N^6-Addukte, ähnlich den N^2-Addukten beim 2´-dG, einen größeren Einfluss auf die DNA als die C8-Addukte. Die T_m-Werte lagen in diesem Fall sogar unterhalb von 25 °C. [68, 69]

Entscheidend für die Reparatur durch aromatische Amine ausgelöste Schäden ist die Struktur. Addukte, bei denen das aromatische Amin innerhalb der DNA liegt, sind bessere Substrate als Addukte, deren aromatisches System in den Furchen der DNA liegt. Denn so kommt es möglicherweise eher zu einer Störung in der Basenpaarung und der Flexibilität der DNA.[70] Auch scheint eine planare aromatische Struktur persistenter in den bisher untersuchten Zelllinien zu sein.[71] Leider ist es noch nicht möglich, genauere Aussagen über den räumlichen Einfluss der jeweiligen Modifikation zu wagen, denn die bisher vorgenommenen Strukturuntersuchungen reichen hierfür noch nicht aus. Weiterhin existieren bisher auch noch keine Aussagen über die Auswirkungen einer *N*-Acetylgruppe an der C8-Position beim 2´-dA. Alle bisherigen Aussagen diesbezüglich beziehen sich auf bisherige Untersuchungen mit *N*-acetylierten-2´-dG-Derivaten. Ob in diesem Fall auch noch eine zusätzliche Differenzierung zwischen starken und Grenzcancerogenen stattfinden muss, ist eine Frage, die im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden sollte.

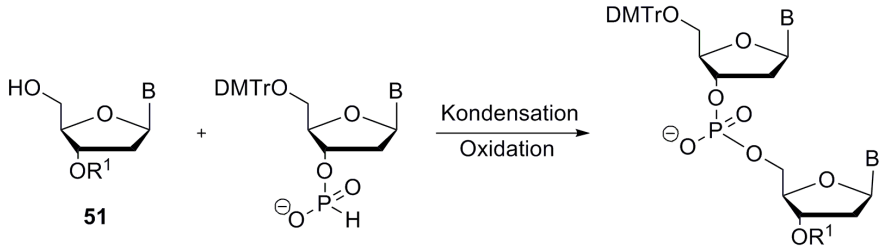
2.8 Synthese von Oligonucleotiden

Oligonucleotide sind Polymere, die durch Polykondensation von Nucleosidphosphaten entstehen. Im Gegensatz zu der auf 5´-Triphosphaten basierenden natürlichen DNA-Synthese verläuft die Oligonucleotidsynthese am DNA-Synthesizer aufgrund der höheren Reaktivität der 5´-Hydroxylgruppe in 3´→5´-Richtung. Die Methoden zur chemischen Synthese von Oligonucleotiden unterscheiden sich durch die Art, wie die Phosphorsäureesterbindung erhalten wird. Bekannt sind die Triester-, H-Phosphonat-, Phosphit- bzw. Phosphoramiditmethode. Als Ausgangsverbindung der Synthesen fungiert jeweils das entsprechend geschützte Nucleosidderivat **51** (Abb. 23).

Triestermethode



H-Phosphonatmethode



Phosphit- bzw. Phosphoramiditmethode

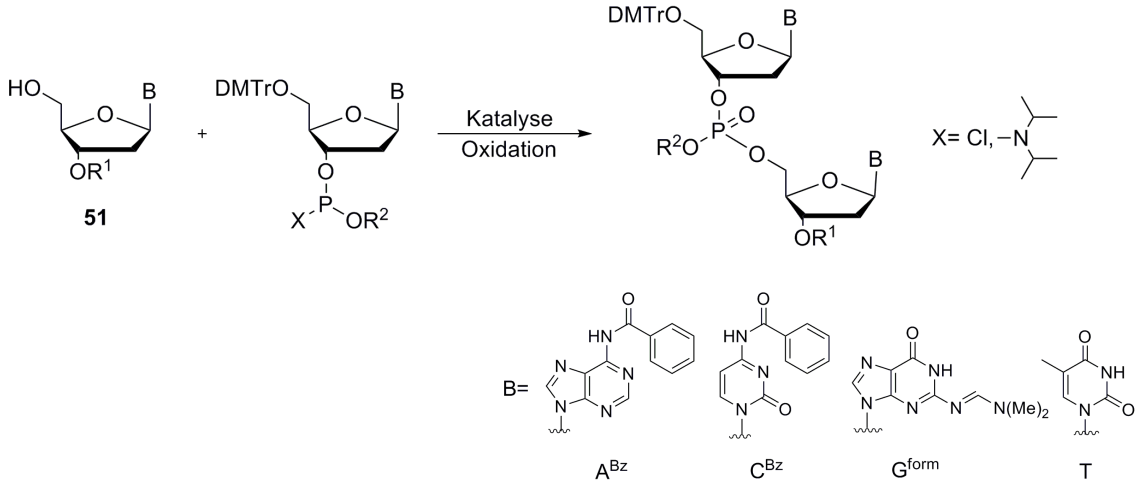


Abb. 23: Methoden der Oligonucleotidsynthese

Aufgrund der Automatisierung der DNA-Synthese haben sich einige wenige Schutzgruppen durchgesetzt. Diese sind im Wesentlichen die von *Khorana* eingeführten Acyl-Funktionen für die exocyclischen Aminofunktionen an Adenin und Cytosin (später durch Benzoyl (Bz) ersetzt), die Formamidin-Funktion am Guanin sowie die 4,4´-Dimethoxytriphenylmethylgruppe (DMTr) an der 5´-Hydroxylgruppe der 2´-Desoxyribose.[72]

Das erste Nucleosid ist bei der automatisierten Festphasensynthese über die 3´-OH-Gruppe und einem Linker bereits an einem CPG-Träger (*controlled pore glass*) gebunden. Der Linker zwischen dem festen Trägermaterial und dem Startnucleosid ist eine Dicarbonsäure (in den meisten Fällen Bernsteinsäure), welche wiederum an ein langkettiges Alkylamin gebunden ist. Die wegen ihrer sehr guten Ausbeuten standardmäßig angewandte Methode ist die Phosphoramiditmethode. Hier wird ein geschütztes Phosphoramidit in Gegenwart eines Aktivators (früher: Tetrazol, heute: DCI) mit einem 5´-OH-freien Nucleosid zu einem Phosphittriester umgesetzt. Die anschließende Oxidation führt zum entsprechenden Phosphattriester. Durch die höhere Reaktivität der P(III)-Verbindungen im Gegensatz zu den P(V)-Verbindungen sind die Phosphoramidite attraktive Edukte, wobei zunächst ihre schlechte Zugänglichkeit und Lagerfähigkeit der monomeren Bausteine im Weg stand. Mit der Einführung der durch milde Säuren aktivierbaren Phosphoramidite durch *Köster*[73] und deren Optimierung durch *Caruthers*[74] gelang der Durchbruch, wobei heute die Di*iso*propylaminoverbindungen im Zusammenhang mit der 2-Cyanoethyl-schutzgruppe den besten Kompromiss darstellen.

Der Synthesezyklus beginnt mit der Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe durch Trichloressigsäure (TCA, 1% in Acetonitril) **Schritt 1**. Darauf folgt die Aktivierung des Nucleosidphosphoramidits durch 4,5-Dicyanoimidazol (DCI) **Schritt 2**. Anschließend erfolgt die Addition des zuvor aktivierten Nucleosidphosphoramidits an die bereits freie 5´-OH-Gruppe des ersten Nucleosids an der festen Phase **Schritt 3**. Es wird zunächst ein 3´→5´-verknüpftes Dinucleosidphosphit mit Ausbeuten von >99% erhalten. Zur Vermeidung von Fehlsequenzen werden daraufhin nicht abreagierte 5´-Hydroxylgruppen mit Essigsäureanhydrid und *N*-Methylimidazol als 5´-Acetate blockiert **Schritt 4**. Der anschließenden Oxidation des dreiwertigen Phosphits zum fünfwertigen Phosphat mit einer Iodlösung **Schritt 5** folgen erneut die saure Abspaltung der nächsten DMTr-Gruppe und der Eintritt in den sich wiederholenden Synthesezyklus (Abb. 24, S. 29).

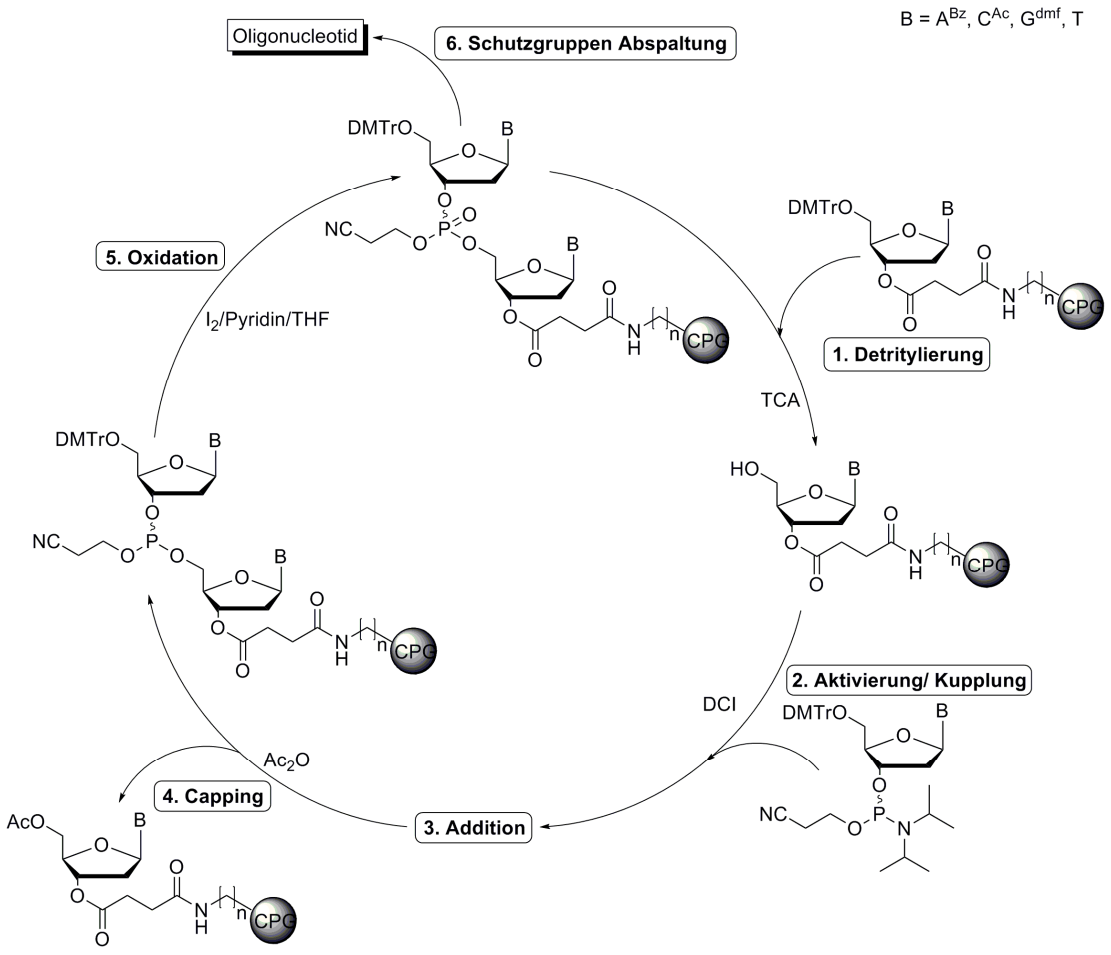


Abb. 24: Synthesezyklus der Phosphoramiditmethode

Nach Abschluss der Synthese wird unter Standardbedingungen das Oligonucleotid mit konzentrierter, wässriger Ammoniaklösung (25%) von der festen Phase abgespalten und die Schutzgruppen der Nucleobasen sowie der Phosphatgruppen im gleichen Medium bei erhöhter Temperatur (45 ℃) entfernt.

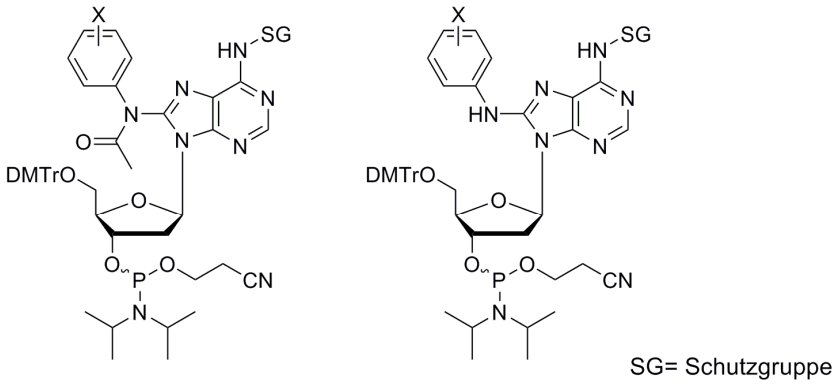
Zhou und *Romano* gelang es als erstes, die für die Festphasensynthese benötigten Phosphoramidite darzustellen und sie am DNA-Synthesizer in Oligonucleotide einzubauen.[61, 62] Zu diesem Zeitpunkt waren diese die einzigen synthetisierten Oligonucleotidbausteine, denn die dazu benötigten DNA-Addukte wurden bis zu diesem Zeitpunkt durch die elektrophile Arylaminierung dargestellt (s. Abschnitt 2.4, S. 13). Diese Methode ist nicht nur sehr aufwendig, sondern auch sehr kostspielig. Des Weiteren waren auch die Abspaltung vom Träger und die Abspaltung der Schutzgruppen aufgrund der Basenlabilität der Addukte nicht unproblematisch, dieses konnte jedoch durch Zugabe von ß-Mercaptoethanol durch Erhöhung der Basenstabilität behoben werden.

3. Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst eine bisher nicht bekannte Syntheseroute zum Zugang zu C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten 2´-Desoxyadenosin Phosphoramiditen **52** zur Oligonucleotidsynthese entwickelt werden.

Hierbei sollte die bestmögliche Schutzgruppenstrategie ausgewählt und erprobt werden, um die Darstellung der bisher chemisch noch nicht synthetisierten *N*-acetylierten 2´-dA-Addukte zu erhalten und so den späteren Einbau der Phosphoramidite in die gewünschten Oligonucleotide am DNA-Synthesizer ohne Verlust der gewählten Modifikation ermöglichen zu können.

Weiterhin sollten auch die C8-*N*H-Arylamin-modifizierten Phosphoramidite **43** dargestellt und entsprechend in ausgewählte Sequenzen eingebaut und auf ihre Eigenschaften untersucht werden.



52 **43**

Abb. 25: Zielmoleküle dieser Arbeit

Bei den zu untersuchenden Sequenzen handelte es sich um die palindrome EcoRI-Sequenz 5´-d(GTA GAA TTC TAC)-3´ für Enzym-Abbau-Untersuchungen, die modifizierte *Nar*I-Sequenz 5´-d(CTC GGC ACC ATC)-3´ und die Marx-Sequenz 5´-d(ACA TAA GCA TCT ACG ACG CG)-3´ für Primer-Verlängerungs-Experimente. Alle Sequenzen sollten schließlich hinsichtlich ihrer thermischen Stabilität (T_m) und der Konformation des Doppelstranges (CD) charakterisiert werden. Für die selbstkomplementäre Sequenz sollte ein Restriktionsverdau mittels EcoRI erfolgen, um den Einfluss der eingebauten Modifikation bezüglich der Halbwertszeit bestimmen zu können.

Durch diese Untersuchungen soll der Unterschied zunächst zwischen Mono- und polycyclischen Modifikationen an der C8-Position und weiterhin zwischen *N*-acetylierten und nicht-acetylierten Arylamin-Addukten in Hinblick auf ihre Auswirkungen auf Oligonucleotidebene geklärt werden.

Hierfür sollten weitere biochemische Untersuchungen mittels der Marx-Sequenz durchgeführt werden. Auf diesem Weg sollte der Einfluss der verschiedenen *N*-acetylierten und nicht-acetylierten Arylamin-Modifikationen bei der Replikation mittels der bereits erwähnten Primer-Verlängerungs-Untersuchungen in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. A. Marx, Universität Konstanz, untersucht werden.

4. Resultate und Diskussion

4.1 Synthese der C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten 2´-Desoxyadenosin-Derivate zur Oligonucleotidsynthese **Route 1**

Die Darstellung der C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten Oligonucleotidbausteine sollte sich zunächst an der bereits bekannten Synthese von *Gillet* und *Schärer*,[63] allerdings ausgehend von 2´-Desoxyadenosin-Monohydrat **20**, orientieren.

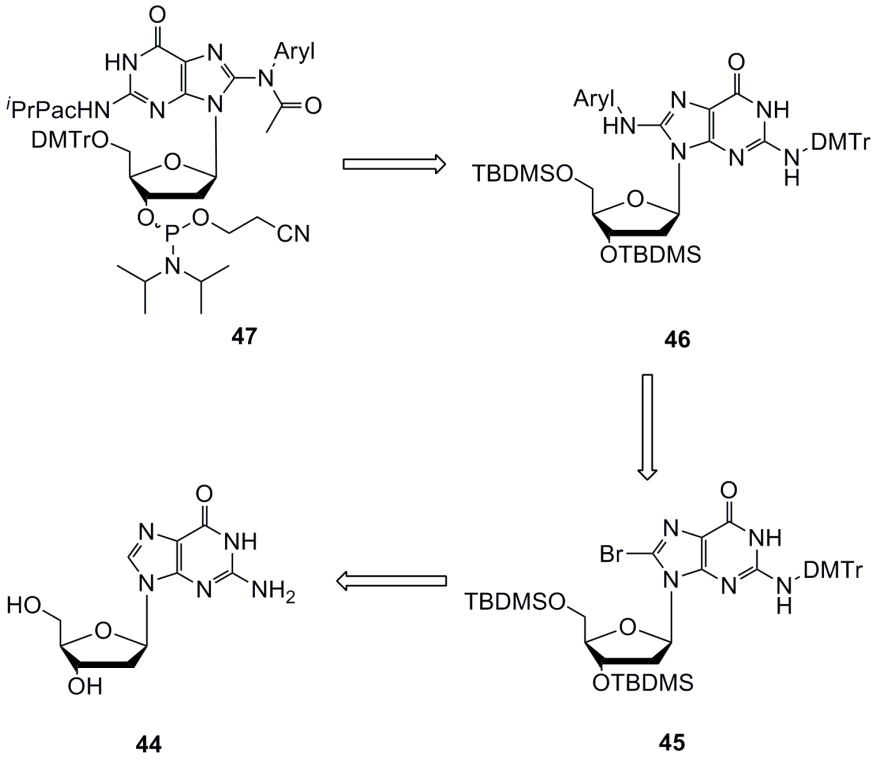


Abb. 26: Retrosynthese zur Darstellung von C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten 2´-Desoxyguanosin Phosphoramiditen **47** nach *Gillet* und *Schärer*[63]

Analog der hier gezeigten Synthese sollte die Entwicklung einer ebenso effizienten Route zur Darstellung von C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten 2´-Desoxyadenosin Phosphoramiditen **52** erfolgen. Kernpunkte sind die Schützung der 3´,5´-Hydroxylfunktionen und der exocyclischen Aminogruppe, die Pd-katalysierte Buchwald-Hartwig-Kupplung mit dem jeweiligen Arylamin und die Acetylierung der C8-*N*-Position (Abb. 27, S. 33).

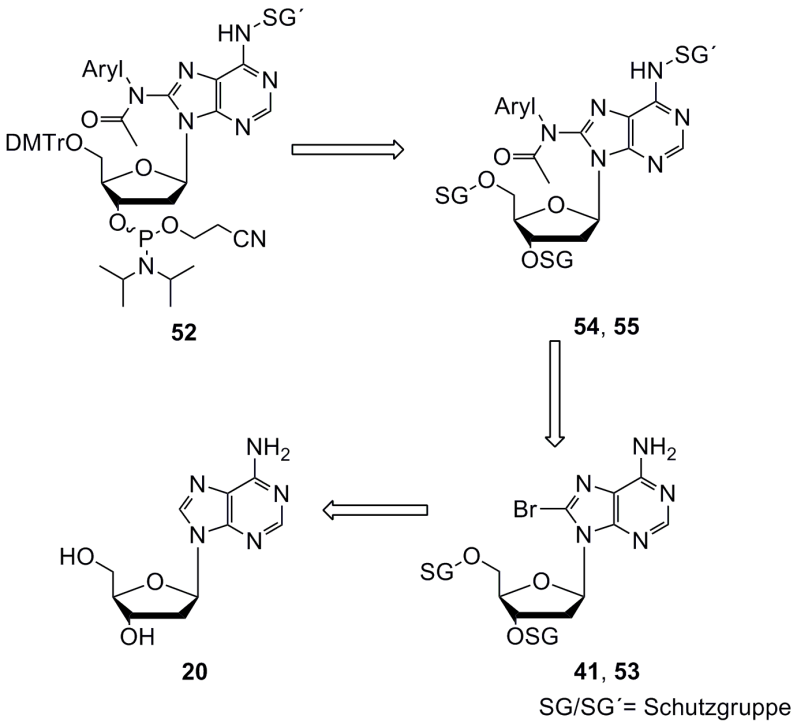


Abb. 27: Retrosynthese zur Darstellung von C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten 2´-Desoxyadenosin-Derivaten

Der erste Schritt war die Bromierung der C8-Position des 2´-Desoxyadenosin Monohydrats **20** in Anlehnung an die Synthesevorschrift von *Eason* (Abb. 28).[75]

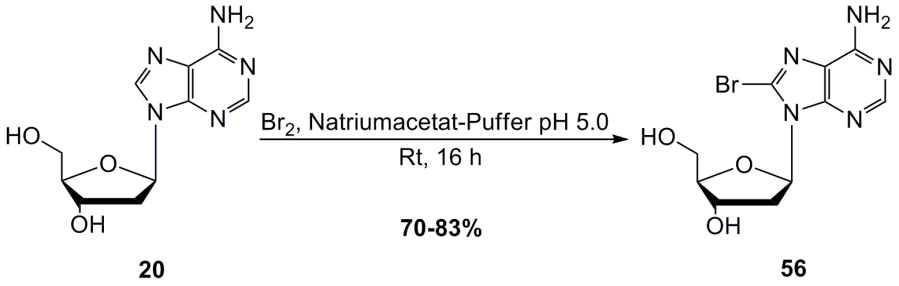


Abb. 28: Bromierung der C8-Position des 2´-Desoxyadenosins **20**

Hierbei wurde das 2´-Desoxyadenosin Monohydrat **20** in frisch hergestelltem Natriumacetat-Puffer (pH 5) suspendiert und langsam mit Brom, gelöst in Wasser, versetzt. Nach Neutralisation und Entfernen der Mutterlauge konnte das Produkt **56** mit guten Ausbeuten isoliert werden. Vorteil dieser Reaktion ist auch ihre Anwendbarkeit auf große Mengen (bis zu 15 g).

Der folgende Rektionsschritt war die Schützung der 3´,5´-Hydroxylfunktionen, um spätere unerwünschte Reaktionen an diesen Positionen zu verhindern. Hier wurden zwei bisher bekannte Schutzgruppen verwendet. Das in der 2´-dA-Chemie bekannte, allerdings auch teure und empfindliche TIPDS-Cl_2 und das in der 2´-dG-Chemie bekannte, etwas preiswertere und unempfindliche TBDMS-Cl.

Zunächst wurde 8-Brom-2´-desoxyadenosin **56** in Pyridin gelöst und mit TIPDS-Cl_2 versetzt. Nach der Aufarbeitung und Coevaporation mit Toluol konnte das Produkt **41** aus kaltem Petrolether in sehr guten Ausbeuten gefällt werden (Abb. 29).

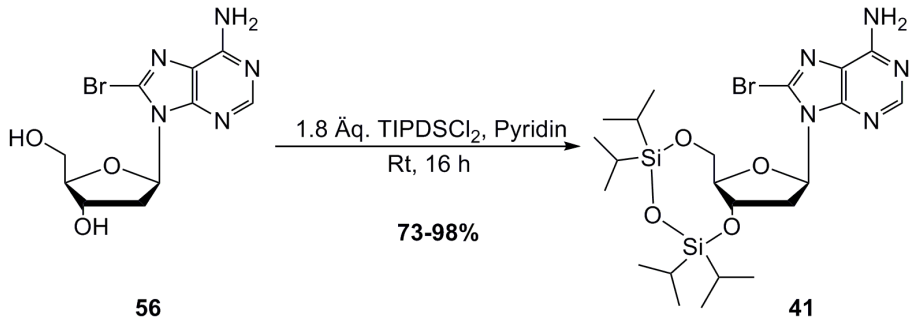


Abb. 29: Schützung der 3´,5´-Hydroxylfunktionen als 8-Ring-Silylether analog zu *Elmquist*[66]

Analog hierzu fand auch die Schützung mit TBDMSCl nach *Hopkins* statt.[76] Auch bei diesem Schritt wurde 8-Brom-2´-desoxyadenosin **56** in Pyridin gelöst und mit jeweils 3 Äq. Imidazol und TBDMSCl versetzt. Nach der entsprechenden Aufarbeitung konnte auch hier das Produkt **53** aus Acetonitril in sehr guten Ausbeuten gefällt werden (Abb. 30). Alternativ kann auch eine säulenchromatographische Reinigung (DCM/MeOH) erfolgen.

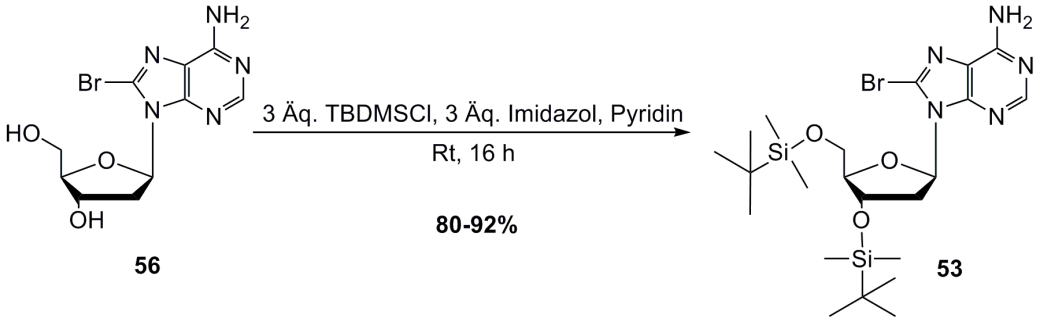


Abb. 30: Schützung der 3´,5´-Hydroxylfunktionen als Silylether analog zu *Hopkins*[76]

Mit diesen beiden Ausgangsverbindungen **41**, **53** konnte anschließend die Pd-katalysierte Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplung durchgeführt werden (Abb. 31).

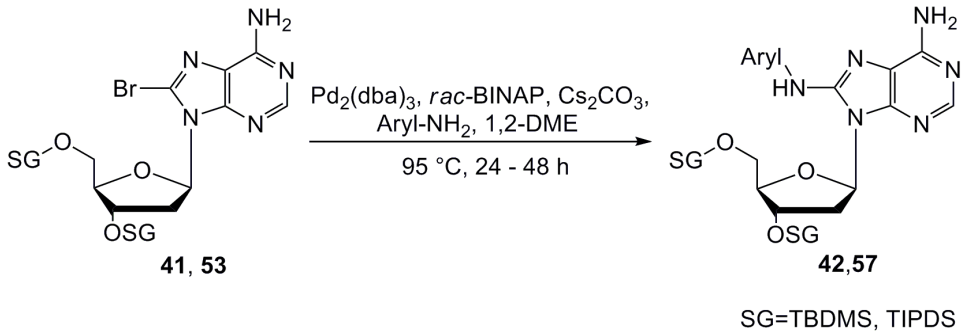


Abb. 31: Einführung der Arylamin Modifikation mittels der Buchwald-Hartwig-Kupplung

Der Ligand *rac*-BINAP und der Katalysator $Pd_2(dba)_3$ wurden in 1,2-DME vorgelegt und 1 - 2 h bei Raumtemperatur unter Stickstoff gerührt. Anschließend wurden das jeweilige Arylamin, Cs_2CO_3 und das 8-Brom-3´,5´-geschützte 2´-Desoxyadenosin **41**, **53** zugegeben und 24 - 48 h unter Rückfluss erhitzt. Die Produkte **42**, **57** konnten nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung in Ausbeuten von 61% - 96%, abhängig vom Arylamin, isoliert werden (Tab. 2).

Produkt (SG= TIPDS)	**Arylamin**	**Ausbeute**
42a	Phenyl	43 - 85%
42d	3,5-Dimethylphenyl	73 - 96%
42f	2-Fluorenyl	78 - 94%
42g	IQ	-
Produkt (SG= TBDMS)		
57a	Phenyl	61 - 86%
57b	4-Methoxyphenyl	67 - 90%
57c	4-Methylphenyl	62 - 64%
57d	3,5-Dimethylphenyl	73 - 96%
57e	4-Biphenyl	77 - 78%
57f	2-Fluorenyl	91 - 95%
57g	IQ	-

Tab. 2: Spektrum der Ausbeuten bei der Buchwald-Hartwig-Kupplung

Die polycyclischen, aromatischen Amine zeigen eine größere Tendenz bei der Kupplungsreaktion, wobei durch eine Vorreaktion zwischen Ligand und Katalysator, welche während meiner Diplomarbeit durchgeführt wurde, auch die monocyclischen, aromatischen Amine eine bessere Kupplungsausbeute lieferten.[52]

Der Mechanismus dieser Reaktion ist noch nicht vollständig geklärt, wurde aber von seinem Namensgeber *Buchwald* 1996 postuliert und kann auf die hier durchgeführte Arylaminierung übertragen werden (Abb. 32).[77]

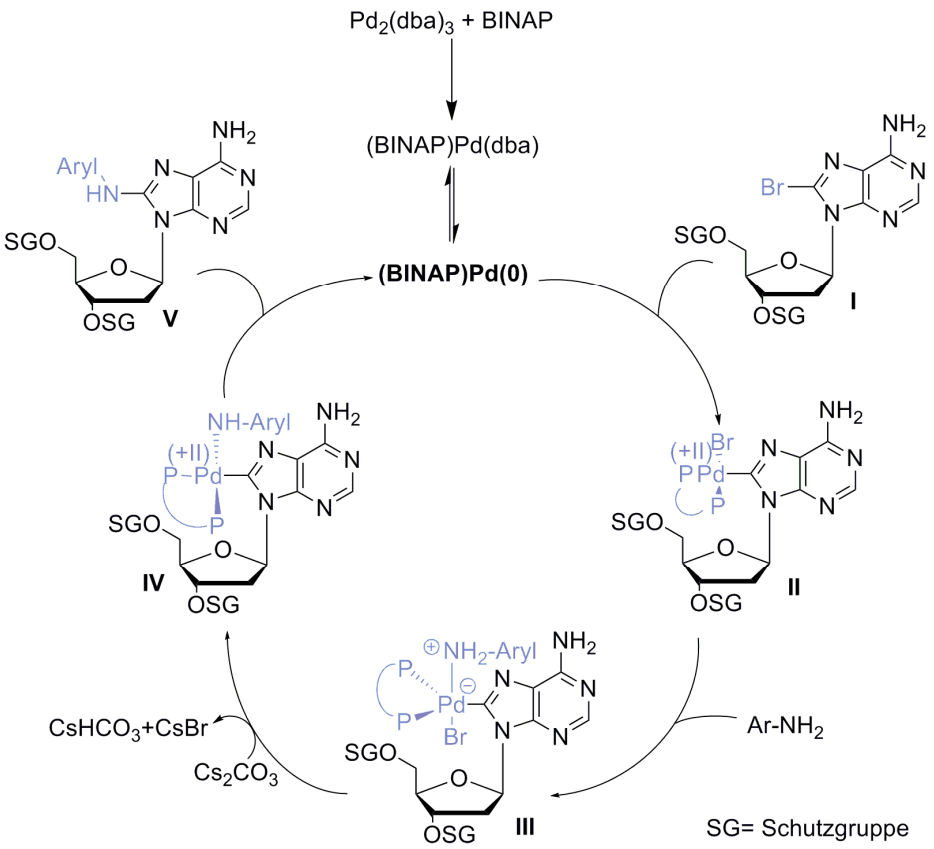


Abb. 32: Postulierter Mechanismus der Pd-katalysierten Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplung[77]

Die Palladium-katalysierte Kreuzkupplung verläuft wahrscheinlich über die oxidative Addition des C8-Brom-2´-dA **I** an die Pd^0-Spezies $(BINAP)Pd^0$, welches sich aus dem Katalysator $Pd_2(dba)_3$ und dem Liganden *rac*-BINAP bildet. Das entstehende Pd^{2+}-Intermediat **II** bildet durch die Koordination des verwendeten Arylamins die trigonal-bipyramidale Verbindung **III**. Durch Deprotonierung mit Hilfe der zugesetzten Base Cs_2CO_3 entsteht die Verbindung **IV**, welche wiederum durch reduktive Eliminierung neben dem gewünschten C8-*N*H-Arylamin-Produkt **V** auch den Pd^0-Katalysator zurückbildet.

Bevor nun die Acetylierung der C8-*N*-Position erfolgen konnte, musste eine Schützung der exocyclischen Aminofunktion erfolgen, damit diese vor der anschließenden Acetylierung unberührt bleibt.

Analog der Literatur von *Gillet* und *Schärer*[63, 64] wurde zunächst versucht, Phenoxyacetylchlorid als Schutzgruppe zu verwenden (Abb. 33).

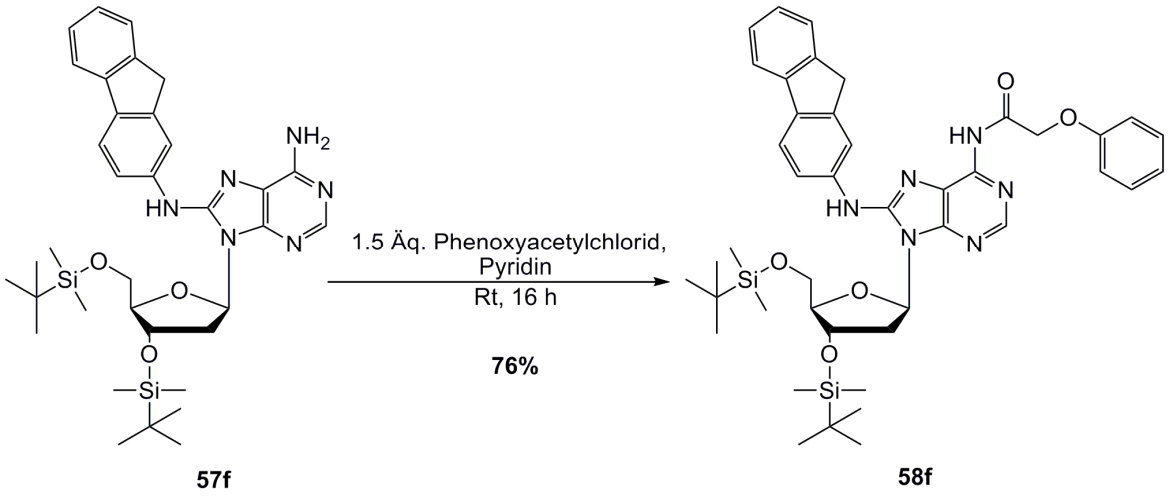


Abb. 33: Synthese von N^6-Phenoxyacetyl-8-*N*-(2-fluorenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin **58f**

Entsprechend der bereits erwähnten Literatur wurde auch bei diesem Ansatz 2-Aminofluoren **3** als Arylamin verwendet. Das Edukt **57f** wurde in Pyridin vorgelegt und mit Phenoxyacetylchlorid (PacCl) bei Raumtemperatur versetzt. Nach der dünnschichtchromatographischen Kontrolle und entsprechender Aufarbeitung konnte das Produkt **58f** in einer Ausbeute von 76% erhalten werden.

Entsprechend dieser Reaktion erfolgte auch eine doppelte Pac-Schützung an der N^6-Position, um alle Acetylierungs-Möglichkeiten, außer der C8-*N*-Position, mit Schutzgruppen zu versehen (Abb. 34, S. 38). Nach entsprechender Aufarbeitung konnte jedoch nur eine Mischung aus einfach und doppelt geschützten Produkten **58**, **59** isoliert werden. Diese konnten auch nach mehrmaliger chromatographischer Reinigung nicht voneinander getrennt werden. Aus diesem Grund erfolgte auch keine Ausbeutebestimmung.

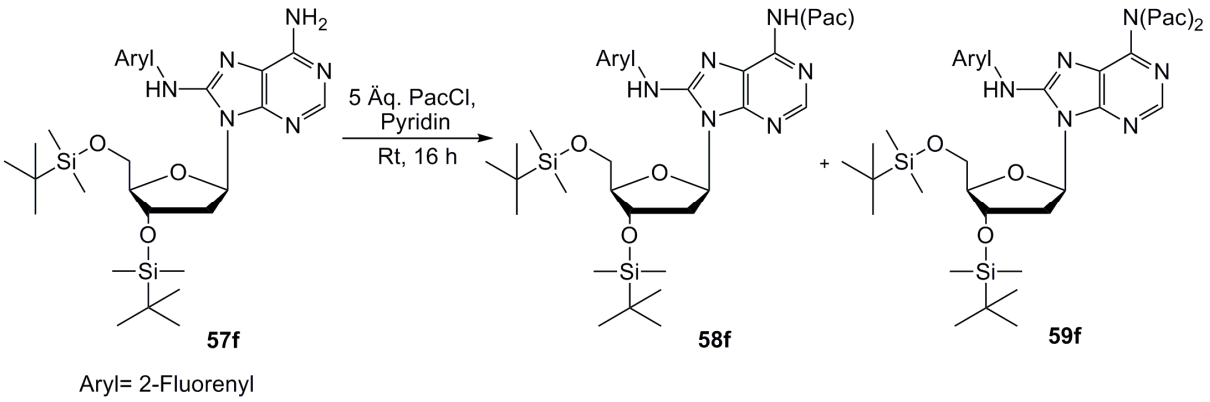


Abb. 34: Synthese von N^6-Diphenoxyacetyl-8-*N*-(2-fluorenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin **59f**

Vermutlich ist die Pac-Schutzgruppe sterisch zu anspruchsvoll, um eine vollständige doppelte Schützung an der N^6-Position zu gewährleisten. Gleichwohl wurde auch versucht, dieses Gemisch **58f**, **59f** (1:0.89) bei der darauf folgenden Acetylierung einzusetzen. Hierbei wurden 0.5 Äq. 4-DMAP und 5 Äq. Essigsäureanhydrid in Pyridin verwendet. Nach 5 h bei Raumtemperatur sollte das gewünschte C8-*N*-acetylierte Produkt **60f** ausgehend vom einfach Pac-geschütztem Edukt **58f** erhalten werden. Allerdings zeigte die dünnschichtchromatographische Kontrolle nur geringe Umsetzung des Eduktes **58f**. Aus diesem Grund wurden nach 7 h weitere 0.5 Äq. 4-DMAP zu der Reaktionslösung gegeben. Auch nach 24 h war noch ein wenig Edukt **58f** vorhanden, weshalb erneut 1 Äq. 4-DMAP hinzugefügt wurde. Nach 29 h konnte die Aufarbeitung der Reaktion erfolgen und nach anschließender säulenchromatographischer Reinigung konnte ein Produkt isoliert werden. Es handelte sich allerdings um das dreifach acetylierte Produkt N^6-Diacetyl-8-(*N*-acetyl)-2-fluorenyl-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **61f** und nicht um N^6-Diphenoxyacetyl-8-(*N*-acetyl)-fluorenyl-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **60f**. Das Produkt konnte in einer Ausbeute von 45% erhalten werden (s. Abb. 35, S. 39).

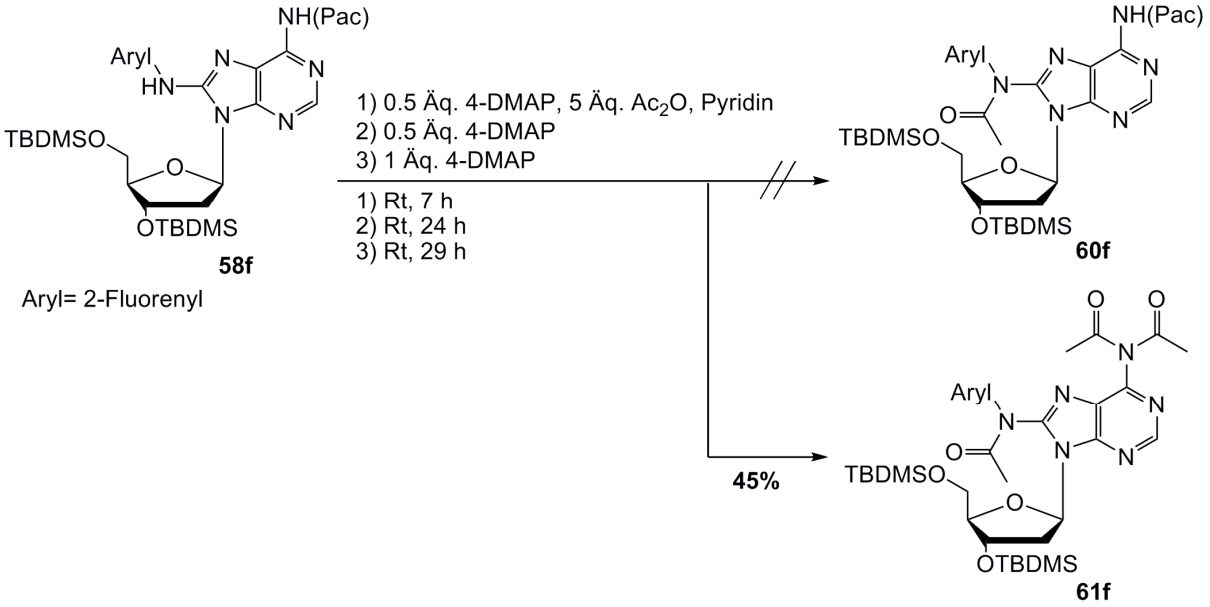


Abb. 35: Acetylierung von N^6-Phenoxyacetyl-8-*N*-(2-fluorenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin **58f**

Das weitere Arbeiten mit dem dreifach acetyliertem Produkt **61f** war nicht möglich, da nach der Festphasensynthese keine selektive Abspaltung der Acetylgruppen an der N^6-Position möglich wäre, ohne die Acetyl-Gruppe an der gewünschten C8-*N*-Position ebenfalls abzuspalten.

Da die Pac-Schutzgruppe offensichtlich sehr leicht abspaltbar ist, wurde ein zweiter Versuch mit dem Gemisch aus einfach und zweifach Pac-geschütztem Edukt **58f**, **59f** gestartet. Das Gemisch wurde, bezogen auf N^6-Diphenoxyacetyl-8-(2-fluorenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin **59f**, dieses Mal mit 1 Äq. 4-DMAP und 1 Äq. Ac_2O in Pyridin bei Raumtemperatur über Nacht umgesetzt. Nach der Aufarbeitung und mehrmaliger chromatographischer Reinigung konnten 13% des immer noch stark verunreinigten Produktes **60f** erhalten werden. Für den Erhalt eines sauberen Produktes wären weitere Reinigungsschritte notwendig gewesen, welche aber wiederum die Ausbeute weiter gesenkt hätten. Aus diesem Grund wurde diese Reaktion nicht weiter verfolgt (Abb. 36, S. 40).

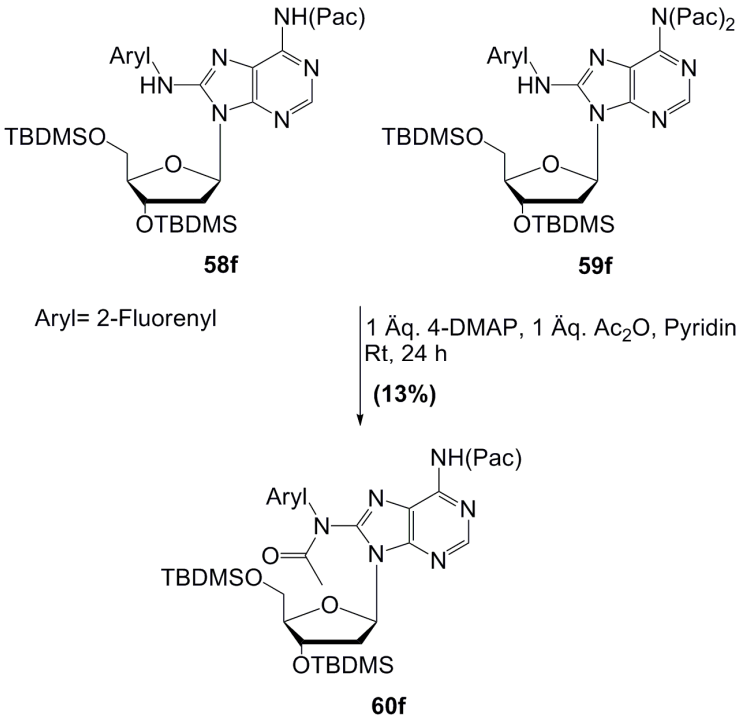


Abb. 36: Acetylierung des Gemisches **58f**, **59f**

Da die Idee dieser Route grundsätzlich zu funktionieren schien, wurde versucht, weiterhin die Richtung der orthogonalen Schutzgruppenstrategie zu verfolgen.

Die erste Überlegung war, eine andere Schutzgruppe für die exocyclische Aminogruppe zu nutzen. Die Bedingung war, dass diese, aufgrund der später folgenden Oligonucleotidsynthese, für die einfache Handhabung basenlabil sein sollte, um eine gleichzeitige Abspaltung der Schutzgruppen und der festen Phase zu garantieren. Für eine erste Orientierung wurden, analog der käuflich erwerblichen Phosphoramidite für die Oligonucleotidsynthese, die industriell verwendeten und bereits bekannten Schutzgruppen erprobt.

Synthetisch getestet wurden das aus der 2´-dG-Chemie bekannte und für Aminogruppen geeignete *N,N*-Dimethylformamiddiethylacetal, das in der 2´-dA-Chemie erfolgreich verwendete Benzoylchlorid und *Iso*buttersäureanhydrid. Für ein bestmögliches Ergebnis wurden die TBDMS und die TIPDS-Schutzgruppen parallel mit den jeweiligen basenlabilen neu eingeführten Schutzgruppen getestet.

Zunächst wurde *N,N*-Dimethylformamiddiethylacetal erprobt. Es wurde im Überschuss in Pyridin gelöst. Nach 24 h bei Raumtemperatur konnten die jeweiligen Produkte **62a**, **63a** säulenchromatographisch gereinigt und isoliert werden (Abb. 37).

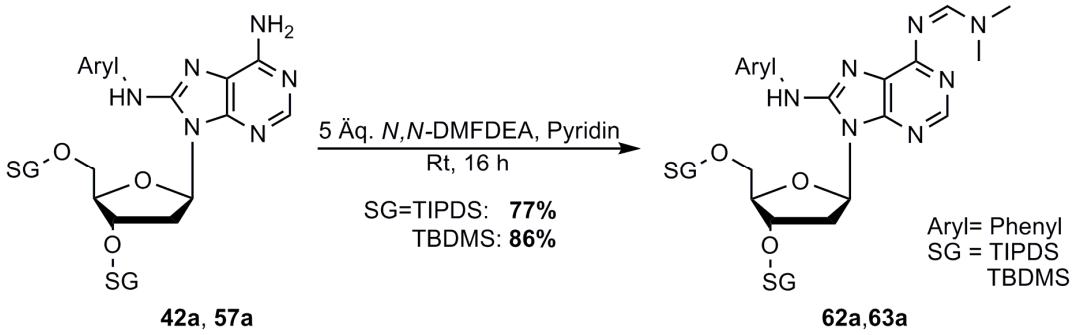


Abb. 37: *N,N*-Dimethylformamiddiethylacetal-Schützung von **42a**, **57a**

Beide Schutzgruppen für die 3´,5´-Positionen (TBDMS/TIPDS) konnten in Kombination mit der *N*,*N*-Dimethylformamiddiethylacetal-Schutzgruppe mit ähnlich guten Ergebnissen verwendet werden.

Der Versuch der Acetylierung erfolgte mit den bereits verwendeten und literaturbekannten Acetylierungsreagenzien Ac_2O und 4-DMAP in Pyridin (Abb. 38).

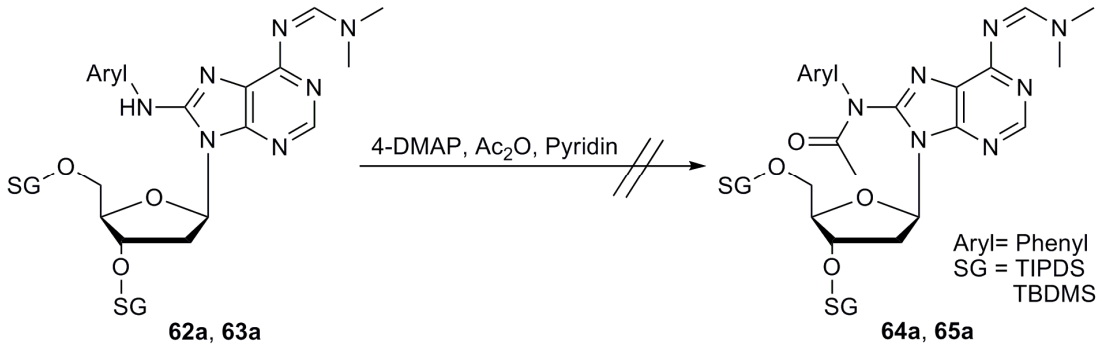


Abb. 38: Versuch zur Acetylierung von **62a**, **63a** unter Verwendung von *N,N*-Dimethylformamiddiethylacetal als Schutzgruppe

Tabelle 3 zeigt die erprobten Reaktionsbedingungen und die jeweiligen Ergebnisse.

SG an 3´,5´-OH	Ac_2O [Äq.]	4-DMAP [Äq.]	Zeit [h]	Temperatur	Resultat
TIPDS	1	-	24	Rt	keine Umsetzung
TIPDS	1	1	24	Rt	kein Produkt
TIPDS	3	3	24	Rt	nur Edukt reisoliert
TBDMS	3	3	24	Rt	kein Produkt

Tab. 3: Reaktionsbedingungen zur Acetylierung bei Verwendung der *N,N*-Dimethylformamiddiethylacetal-Schutzgruppe

Zuerst erfolgte die Acetylierung unter Verwendung der TIPDS-Schutzgruppe und ausschließlich Essigsäureanhydrid, um zu prüfen, ob 4-DMAP als Zusatz überhaupt notwendig ist. Da nach 24 h bei Raumtemperatur die Dünnschichtchromatographie keine Umsetzung zeigte, wurde 4-DMAP zu der Lösung gegeben. Trotzdem konnte nach erneuten 24 h Reaktionszeit nicht das gewünschte Produkt, sondern mehrere Nebenprodukte, die im Fall des Testansatzes nicht isoliert und somit auch nicht näher charakterisiert wurden, erhalten werden. Da 1 Äq. der jeweiligen Reagenzien offensichtlich zu gering für diese Acetylierungsreaktion war, wurden beim nächsten Versuch jeweils 3 Äq. verwendet.[79] Die Reaktion wurde nach 24 h abgebrochen und aufgearbeitet. Es konnte nur das Edukt reisoliert werden. Da die Kombination von der TIPDS- und der *N,N*-Dimethylformamiddiethylacetal-Schutzgruppe im Fall der Acetylierung nicht optimal war, wurde die letzte Reaktion erneut unter Verwendung der TBDMS-Schutzgruppe durchgeführt.

Auch hier wurden 3 Äq. 4-DMAP und 3 Äq. Ac_2O in Pyridin verwendet. Es konnte auch hier keine Produktbildung, dafür aber die Bildung vieler Nebenprodukte, welche nicht isoliert und charakterisiert wurden, beobachtet werden. Scheinbar ist auch die Kombination mit der TBDMS-Gruppe nicht erfolgversprechend. Möglicherweise ist die *N*,*N*-Dimethylformamiddiethylacetal-Schutzgruppe nicht stabil genug für eine längere Umsetzung mit den Acetylierungsreagenzien in Pyridin. Aus diesem Grund wurde auf weitere Reaktionen mit dieser Schutzgruppe verzichtet.

Auch die Verwendung der *iso*Butyryl-Gruppe ist nicht neu, sondern wurde bereits von *Gräsl*[47] 2005 an C8-*N*H-Arylamin-modifizierten 2´-dG-Derivaten erprobt. Allerdings war die Entschützung der Oligonucleotide nach der Festphasensynthese zu langsam. Ebenso wenig waren die Ausbeuten zufriedenstellend. Da aber die schneller abspaltbare *N,N*-Dimethylformamiddiethylacetal-Gruppe nicht zum gewünschten Ergebnis führte, wurde auch die *iso*Butyryl-Gruppe getestet (Abb. 39).

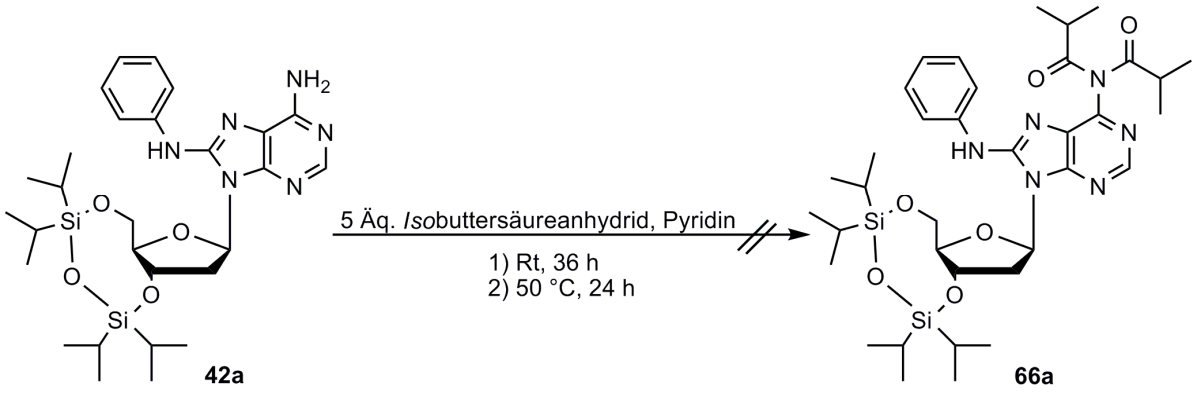


Abb. 39: Versuch zur Darstellung von N^6-Di*iso*butyryl-8-(*N*-phenyl)-3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-desoxyadenosin **66a**

Das Edukt **42a** wurde in Pyridin vorgelegt und mit einem Überschuß an *Iso*buttersäureanhydrid bei Raumtemperatur versetzt. Nach 36 h waren immer noch sehr viel Edukt und nur wenig Produkt vorhanden. Aus diesem Grund wurde die Reaktion auf 50 °C erwärmt und erneut 24 h gerührt. Auch nach dieser Zeit war keine weitere Veränderung festzustellen und die Reaktion wurde abgebrochen. Nach anschließender säulenchromatographischer Reinigung konnte allerdings kein Produkt erhalten werden. Möglicherweise ist das entstandene Produkt bei der Reinigung wieder zerfallen.

Auch die Kombination mit TBDMS als Schutzgruppe wurde erprobt (Abb. 40).

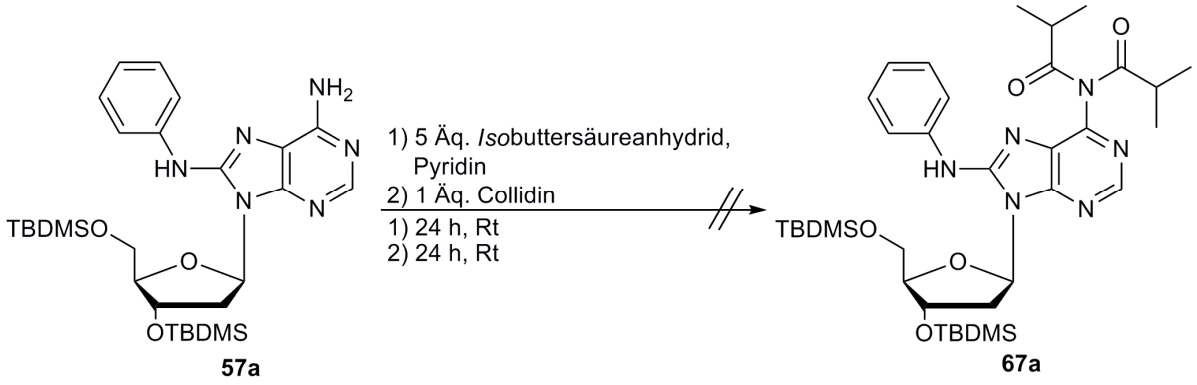


Abb. 40: Versuch zur Darstellung von N^6-Di*iso*butyryl-8-(*N*-phenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin **67a**

Auch in diesem Fall wurden 5 Äq. *Iso*buttersäureanhydrid verwendet. Da nach 24 h immer noch viel Edukt **57a** und nur wenig Produkt **67a** vorhanden waren, wurde 1 Äq. Collidin als Aktivator zur Reaktionslösung zugefügt und weitere 24 h gerührt. Trotzdem konnte dünnschichtchromatographisch keine Veränderung festgestellt werden. Die Reaktion wurde abgebrochen. Nach entsprechender Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung konnte das entstandene Produkt nicht isoliert werden. Vermutlich ist es bei der Reinigung zerfallen. Der *Iso*buttersäure-Rest scheint bei der Aufarbeitung sehr labil zu sein und da noch weitere schutzgruppenstrategische Schritte bis zum entsprechenden Phosphoramidit erfolgen, eignet sich eine Optimierung dieser Reaktion nicht.

Die Schützung der exocyclischen Aminogruppe an der N^6-Position mit Benzoylchlorid ist bereits aus der Synthese der C8-*N*H-Arylamin-modifizierten 2´-dA-Derivate bekannt.[78]

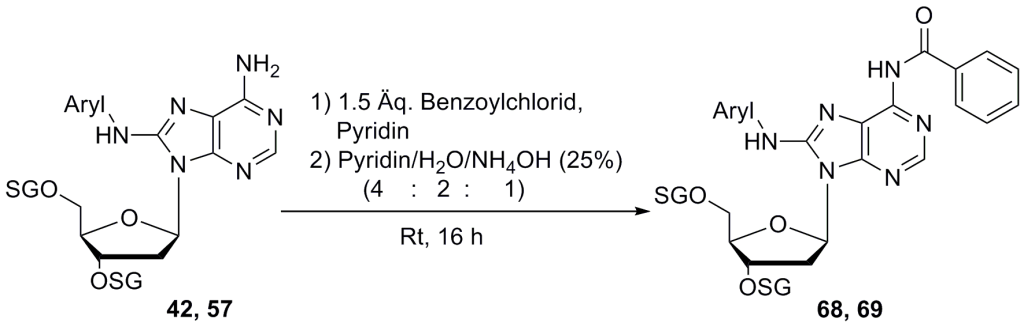


Abb. 41: Einfache Benzoylschützung der exocyclischen Aminofunktion

Um gewährleisten zu können, dass nur die C8-*N*-Position für eine Acetylierung frei bleibt, wurde auch hier eine doppelte Schützung angestrebt. Dafür wurde Benzoylchlorid im Überschuss verwendet. Nach Extraktion mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung und einer säulenchromatographischen Reinigung konnte das Produkt, abhängig vom Arylamin, in Ausbeuten zwischen 71% und 98% isoliert werden (Abb. 42).

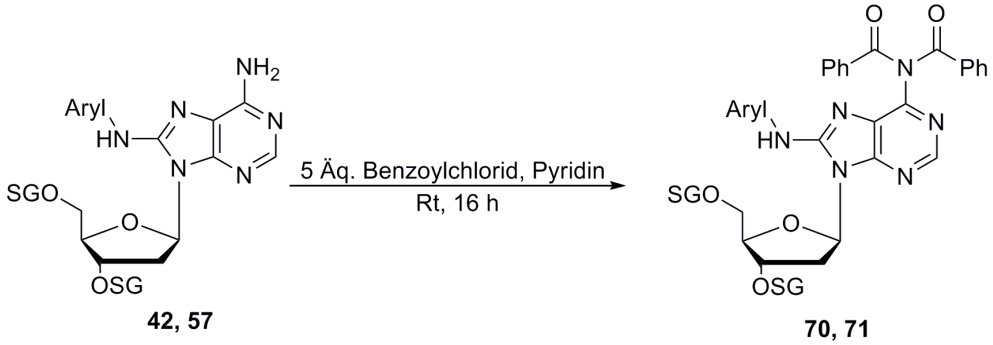


Abb. 42: Doppelte Benzoylschützung der exocyclischen Aminofunktion

Für eine einmalige Schützung wurden nur 1.5 Äq. Benzoylchlorid verwendet, wobei sich auch hier schon bei der dünnschichtchromatographischen Kontrolle die Tendenz zum doppelten Schützen zeigte (Abb. 41, S. 44). In diesem letzteren Fall musste die zweite Schutzgruppe mit Hilfe eines Pyridin/Wasser/Ammoniak (25%)-Lösung (4:2:1)-Gemisches entfernt werden, wobei dieser Schritt sehr zeitaufwändig und neben der leichteren doppelten Schützung auch unnötig wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Produkt (SG=TBDMS)	**Benzoylschützung**	**Arylamin**	**Ausbeute**
71a	doppelt	Phenyl	71 - 88%
71b	doppelt	4-Methoxyphenyl	87 - 98%
71c	doppelt	4-Methylphenyl	80%
71d	doppelt	3,5-Dimethylphenyl	89 - 98%
71e	doppelt	4-Biphenyl	77 - 85%
71f	doppelt	2-Fluorenyl	85 - 90%
Produkt (SG= TIPDS)			
70d	doppelt	3,5-Dimethylphenyl	90%
70d	einfach		71%

Tab. 4: Spektrum der Ausbeuten bei der Benzoylschützung

In allen in der Tabelle 4 (S. 45) dargestellten Fällen eignet sich Benzoylchlorid sehr gut als Schutzgruppe für die N^6-Position. Sie ist während der Aufarbeitung und der anschließenden Säulenchromatographie stabil. Wichtig ist, dass sie auch bei den nachfolgenden Reaktionsschritten stabil bleibt, und die C8-*N*-Position sterisch nicht so abschirmt, dass die Acetylierung erschwert ist.

Da das Molekül jetzt optimal geschützt war, konnte nun die Acetylierung erfolgen. Auch hier wurde zunächst analog der Literaturvorschrift von *Gillet* und *Schärer*[63, 64] eine Reaktion mit 5 Äq. Ac_2O, 0.5 Äq. 4-DMAP und 5 Äq. Et_3N in Pyridin getestet (Abb. 43).

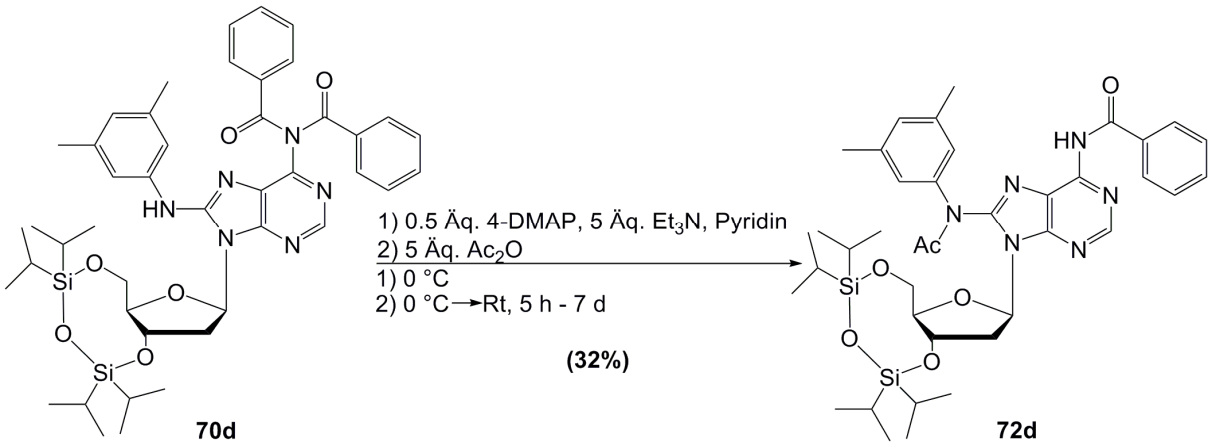


Abb. 43: Acetylierung nach *Gillet* und *Schärer* [63, 64]

Zunächst wurde das Edukt **70d** in Pyridin vorgelegt, auf 0 °C gekühlt, mit 4-DMAP und Et_3N versetzt. Nach Zugabe vom Essigsäureanhydrid wurde die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur erwärmt und je nach Ansatzgröße zwischen 5 Stunden bis zu 7 Tagen gerührt. Nach Extraktion mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung und mehrmaliger chromatographischer Reinigung konnte das Produkt **72d** mit einer Ausbeute von ca. 32% erhalten werden. Das Produkt **72d** konnte trotz mehrfacher Reinigung nicht rein isoliert werden. Jede zusätzliche Reinigung brachte weiteren Produktverlust mit sich. Aus diesem Grund wurden weitere Acetylierungsversuche, die zu besseren Ergebnissen führen sollten, unternommen.

Auffällig ist der Verlust einer Benzoylschutzgruppe nach der Acetylierungsreaktion. Der auf S. 48 gezeigte Mechanismus der Acetylierung erklärt diesen Befund.

Nach der Vorschrift von *Höfle*, *Steglich* und *Vorbrüggen*[79] wurden beim nächsten Ansatz 3 Äq. 4-DMAP verwendet, die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt, anschließend mit 3 Äq. Ac_2O versetzt und bei Raumtemperatur gerührt (Abb. 44).

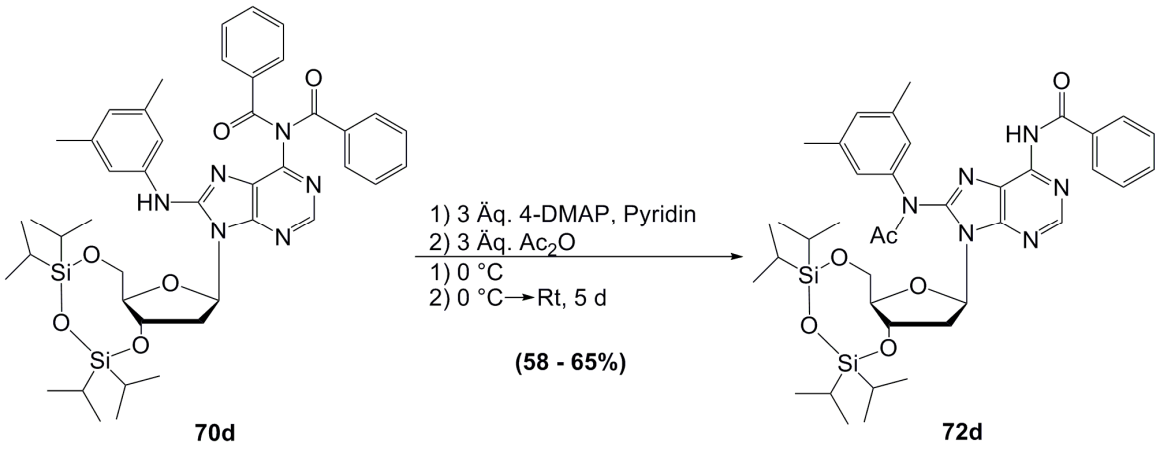


Abb. 44: Acetylierung nach *Höfle, Steglich, Vorbrüggen*[79]

Hier war die Reaktionszeit mit 5 Tagen auch noch deutlich zu lang. Auch nach entsprechender Aufarbeitung und mehrmaligen säulenchromatographischen Reinigungen konnte das gewünschte Produkt **72d** nicht rein isoliert werden. Allerdings sprechen die steigenden Ausbeuten für die hier gewählten Reaktionsbedingungen. Aus diesem Grund sollte die Acetylierung ebenso in Kombination mit der TBDMS-Schutzgruppe erprobt werden (Abb. 45).

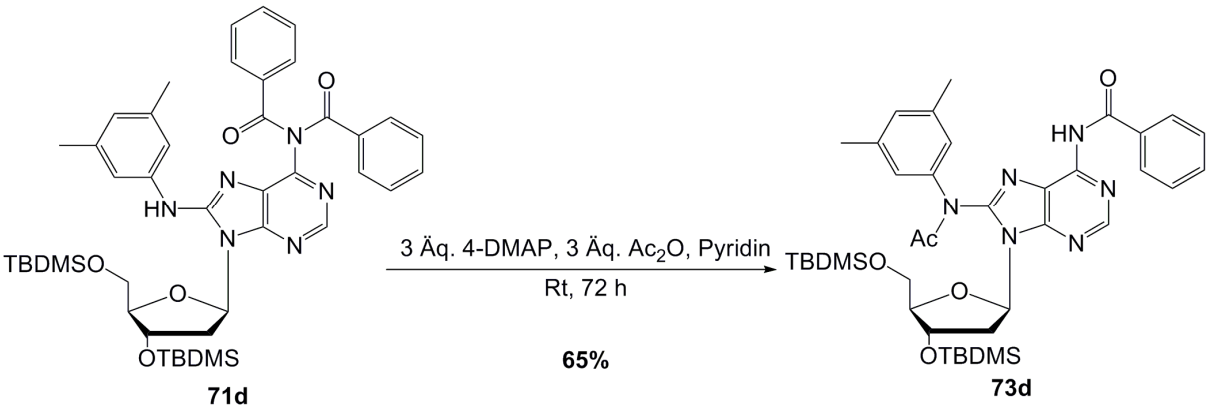


Abb. 45: Acetylierung nach *Höfle, Steglich, Vorbrüggen*[79] durch Verwendung der TBDMS-Schutzgruppe

Ebenso wurde auf die Kühlung verzichtet, um die Reaktion zu beschleunigen. Zunächst wurde das Edukt **71d** in Pyridin vorgelegt und anschließend mit 4-DMAP versetzt. Erst, nachdem sich das 4-DMAP vollständig gelöst hatte, wurde das Essigsäureanhydrid hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde 72 h bei Raumtemperatur gerührt und nach entsprechender Aufarbeitung konnte das gewünschte Produkt **73d** mit 65% Ausbeute rein isoliert werden. Auch eine Erhöhung der verwendeten 4-DMAP Äquivalente (bis zu 6 Äq.) führte nicht zu einer Beschleunigung der Reaktion.

Unumgänglich ist eine Säulenchromatographie mit langsamer Erhöhung des Gradienten, beginnend mit reinem Dichlormethan und Erhöhung des Methanol-Zusatzes in 0.1% Schritten. Auch wurde versucht, zuerst 4-DMAP und Ac_2O in Pyridin zum *N*-Carbamoylpyridiniumion reagieren zu lassen und anschließend das Edukt **71d** hinzuzufügen. Allerdings brauchte auch diese Reaktion, ebenso wie die vorherige Umsetzung ohne Vorreaktion des Steglich-Katalysators mit dem Essigsäureanhydrid, 72 h. Die Reihenfolge der Zugabe der Reagenzien ist in diesem Fall somit irrelevant.

Offensichtlich ist also die Verwendung der TBDMS-Schutzgruppe bei der Acetylierung vorteilhafter. Das Produkt **73d** konnte in guter Ausbeute und bereits nach einmaliger Reinigung rein isoliert werden. Wahrscheinlich sind die TBDMS-Gruppen an der 3´,5´-Position sterisch flexibler und ermöglichen, im Gegensatz zu dem 8-Ring Silylether bei Verwendung von TIPDS, einen leichteren Zugang zu der 8-*N*-Position.

Wird der Mechanismus der Acetylierung näher betrachtet, so ist der Verlust einer Benzoyl-Gruppe an der N^6-Position auffällig. Das freie Elektronenpaar des Stickstoffatoms greift nucleophil am Carbonylkohlenstoff vom Essigsäureanhydrid und vom Benzoyl-Rest an. Dabei bildet sich jeweils das *N*-Carbamoylpyridiniumion, welches schließlich zur Bildung des Produktes beiträgt (Abb. 46, S. 49).[80, 81]

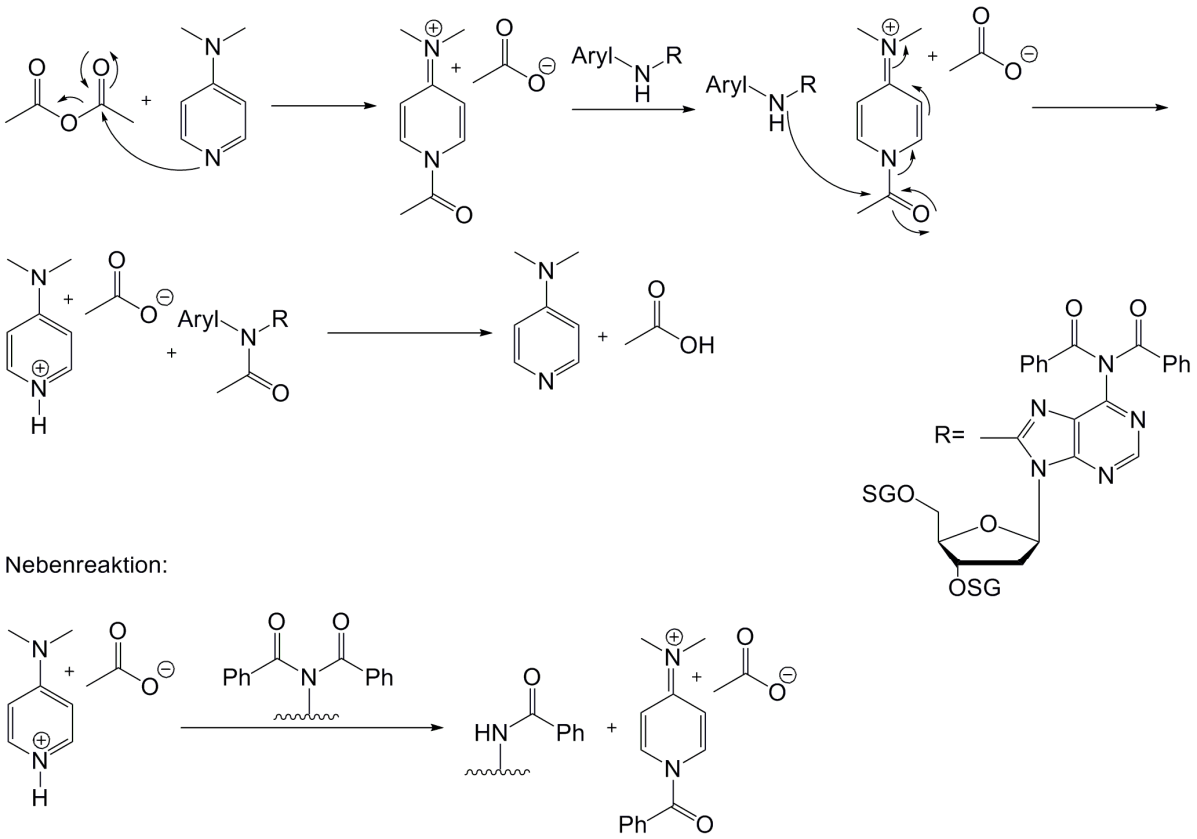


Abb. 46: Mechanismus der 4-DMAP-katalysierten Acetylierung

Obwohl die eben bereits beschriebene Reaktion sehr gut funktionierte, wurden trotzdem noch weitere literaturbekannte Acetylierungsmöglichkeiten erprobt.

Die Acetylierung mittels Acetylchlorid sollte analog einer weiteren Vorschrift von *Gillet* und *Schärer*[63] erfolgen. Hierfür wurde das Edukt **70d** in THF und Pyridin vorgelegt, auf 0 °C gekühlt und mit 1 Äq. AcCl versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 6 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Da nach 24 h keine Umsetzung zu beobachten war, wurden innerhalb dieser 6 Tage insgesamt 24 Äq. AcCl und 4 Äq. Pyridin zugefügt. Trotz dieser Erhöhung der Äquivalente wurde das gewünschte Produkt **74d** nicht gebildet (Abb. 47, S. 50).

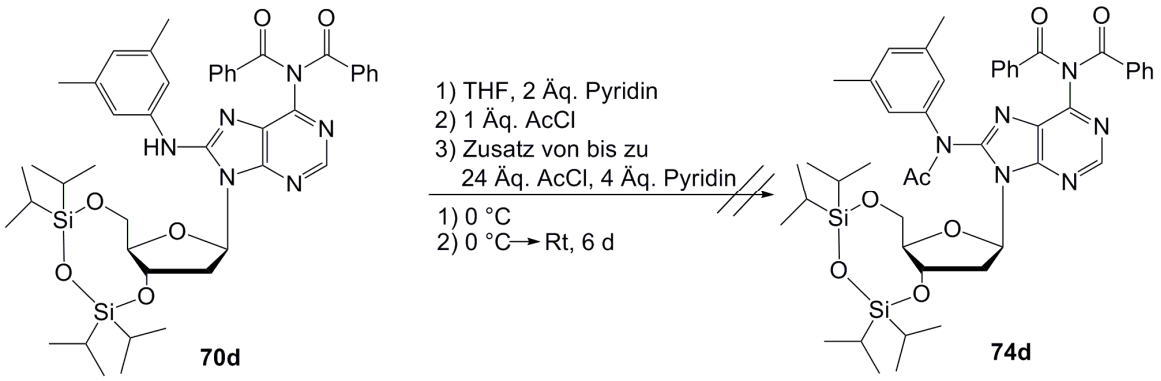


Abb. 47: Versuch zur Acetylierung nach *Gillet* und *Schärer*[63]

Eine weitere Variante der Umsetzung mit AcCl wurde von *Famulok* beschrieben.[82] Auch bei dieser Reaktion wurde das Edukt **70d** in THF, allerdings unter Zusatz von Triethylamin, vorgelegt, auf 0 °C gekühlt und anschließend mit 1 Äq. AcCl versetzt. Auch dieser Ansatz wurde 6 Tage gerührt und innerhalb dieser Zeit noch mit insgesamt 24 Äq. AcCl und 4 Äq. Triethylamin versetzt. Die dünnschicht-chromatographische Kontrolle zeigte auch hier nicht die Bildung des gewünschten Produktes **74d** (Abb. 48).

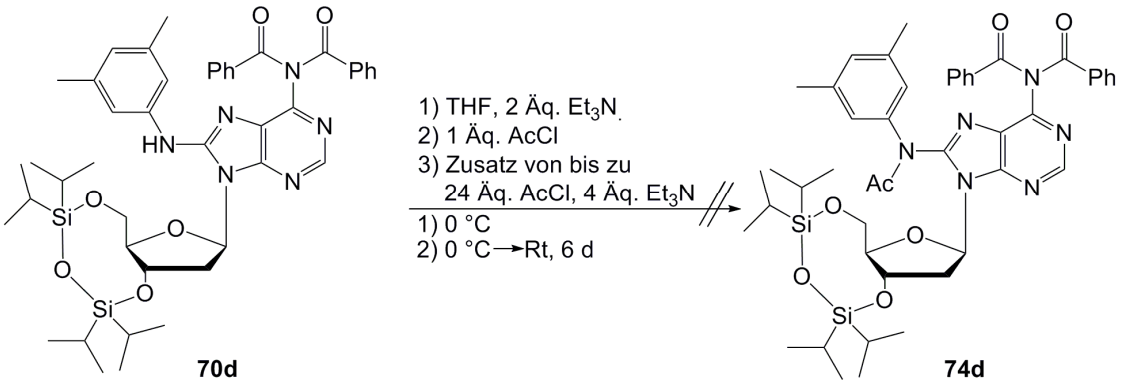


Abb. 48: Versuch zur Acetylierung nach *Famulok*[82]

Eine weitere Acetylierungsmethode stammt von *Eason*.[75] Das Edukt **70d** wurde in einer Mischung aus Diethylether und ges. Natriumhydrogencarbonatlösung vorgelegt, anschließend mit 1 Äq. AcCl in Diethylether versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nur die Zersetzung des Eduktes **70d**, nicht aber die Bildung des gewünschten Produktes **74d** konnte hier beobachtet werden (Abb. 49, S. 51).

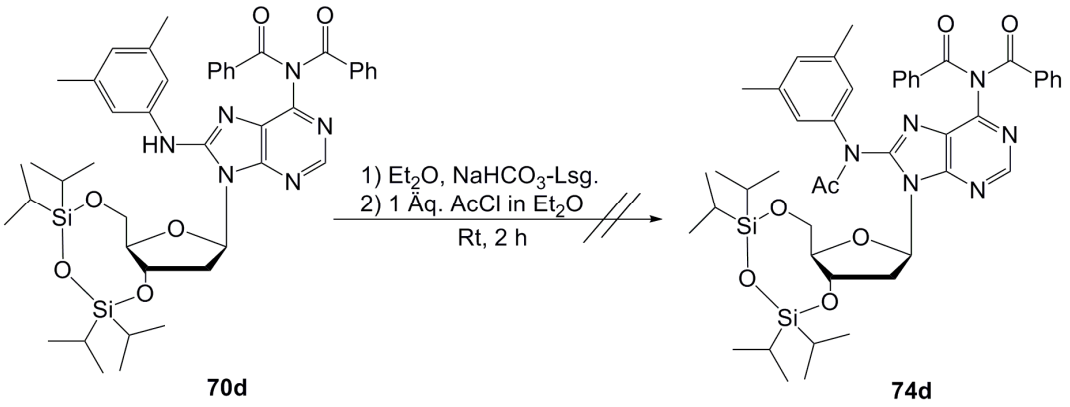


Abb. 49: Versuch zur Acetylierung nach *Eason*[75]

Da die Verwendung der TIPDS-Schutzgruppe keinen Erfolg brachte, wurden die folgenden Reaktionen alle nur noch mit der TBDMS-Gruppe durchgeführt. Die Acetylierung mit 3 Äq. 4-DMAP und 3 Äq. Ac_2O war die erfolgreichste Reaktionsvariante. Deswegen soll im Folgenden stets darauf zurückgegriffen werden.

Um die Reaktion beschleunigen zu können, wurde versucht, diese in der Mikrowelle in einem Testansatz durchzuführen (Abb. 50).

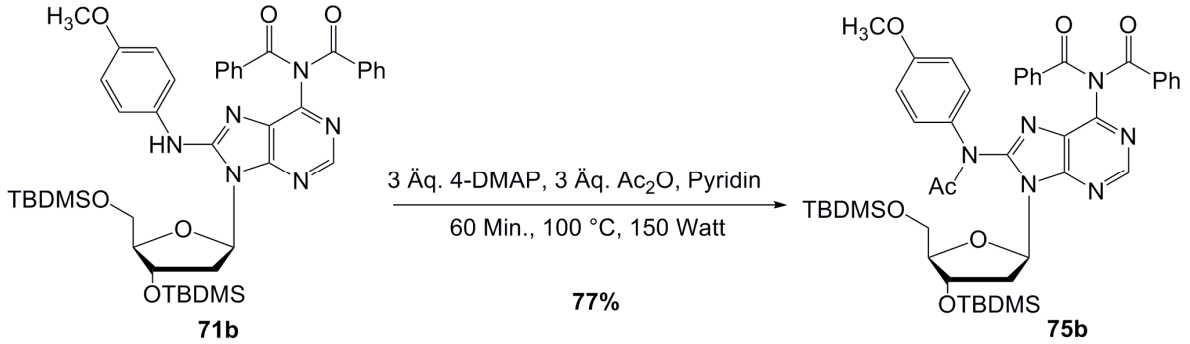


Abb. 50: Acetylierung mit Hilfe der Mikrowelle

Die Reaktion wurde alle 10 Minuten dünnschichtchromatographisch verfolgt und bei geringer oder keiner Umsetzung die Temperatur und die Mikrowellenleistung höher eingestellt. Eine vollständige Umsetzung wurde erst nach 60 Minuten bei 100 °C und bei einer Mikrowellenleistung von 150 Watt erreicht (Tab. 5, S. 52). Offensichtlich läuft die Reaktion in diesem Fall so schnell ab, dass beide Benzoylschutzgruppen erhalten bleiben.

Zeit [Min]	Temperatur [℃]	Leistung [W]	Ergebnis
5	35	20	Farbveränderung von gelb auf orange, nur Edukt **71b** vorhanden
5	45	20	nur Edukt **71b** vorhanden
10	70	50	nur Edukt **71b** vorhanden
5	100	150	Edukt **71b** und Produkt **75b**
10	100	150	Edukt **71b** und Produkt **75b**
10	100	150	Edukt **71b** und Produkt **75b**
15	100	150	Edukt **71b** und Produkt **75b**
20	100	150	nur Produkt **75b**

Tab. 5: Zusammenfassung der Acetylierungsreaktion mittels Mikrowelle

Das hier erreichte Testergebnis konnte nicht reproduziert werden. Ein weiterer Versuch bei 150 ℃, um eine mögliche Beschleunigung der Reaktion zu erreichen, schlug fehl. Es konnte kein Produkt **75b** mehr, lediglich verbrannte Reste im Reaktionsgefäß, vorgefunden werden. Eine höhere Temperatur ist in diesem Fall nicht ratsam.
Ein weiteres Problem ist auch die Ansatzgröße in der Mikrowelle. Bei allen weiteren Versuchen, größere Ansätze reagieren zu lassen, konnte das gewünschte Produkt **75b** nicht erhalten werden.

Weiterhin wurde versucht, das Gemisch aus einfach und doppelt benzoyliertem Edukt **69f**, **71f** zu acetylieren. Das Produkt **73f** konnte trotz mehrfacher Reinigung nicht sauber isoliert werden. Aus diesem Grund wurde die Reaktion nicht weiter verfolgt. Zudem zeigt sie, dass es wichtig ist, mit einem sauberen, doppelt Benzoyl geschütztem Edukt **71** zu beginnen.

Als Alternative sollte die Acetylierung enzymatisch erfolgen. Wie bereits im Metabolismus der aromatischen Amine (S. Kenntnisstand, Abb. 5, S. 7) gezeigt, übernimmt die *N*-Acetyltransferase (NAT1/NAT2) die Acetylierung im Körper. Es war nicht möglich, dieses Enzym direkt zu verwenden, da die Isolierung sehr kostenintensiv ist und somit keine Möglichkeit zum günstigen Erwerb gegeben war.
Es wurde auf Pankreatin ausgewichen. Pankreatin ist ein Enzymgemisch, isoliert aus der Bauchspeicheldrüse des Schweins, das sehr gut für Acetylierungen an OH-Gruppen einsetzbar ist. Es wurde getestet, ob Pankreatin auch in der Lage ist, eine *N*H-Gruppe zu acetylieren (Abb. 51).

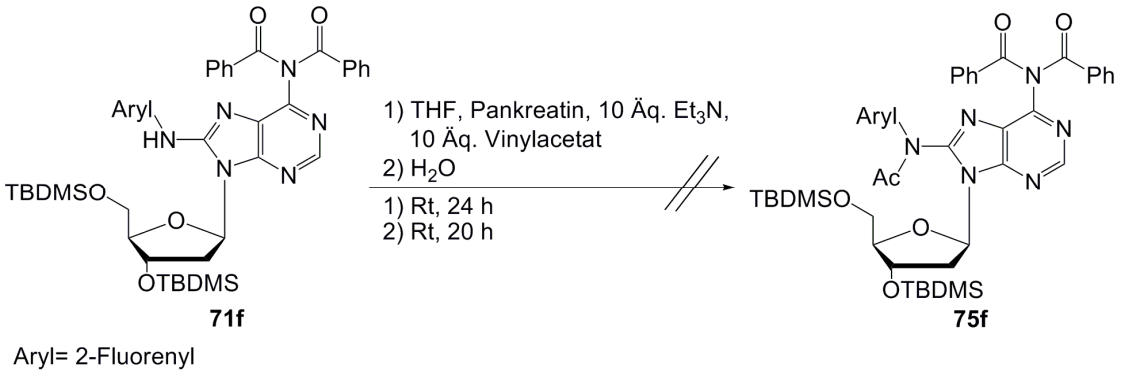


Abb. 51: Versuch zur Acetylierung mittels Pankreatin

Zunächst wurde das Edukt **71f** in THF mit dem Enzymgemisch, Triethylamin und Vinylacetat vorgelegt und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Da nach dieser Zeit dünnschichtchromatographisch keine Umsetzung nachweisbar war, wurde Wasser zur Reaktionslösung gegeben und die Reaktion weitere 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Auch nach dieser Zeit war keine Umsetzung zu sehen und die Reaktion wurde abgebrochen.
Ein zweiter Versuch wurde mit gleichem Ansatz bei 37 ℃ durchgeführt. Auch hier konnte kein Umsatz beobachtet werden und die Reaktion wurde abgebrochen. Offensichtlich überträgt das Enzymgemisch Pankreatin Acetylgruppen spezifisch nur auf OH-Gruppen oder das Enzym konnte aus sterischen Gründen keine Acetylgruppe an die 8-*N*-Position übertragen.

Um zu beweisen, dass die bereits erfolgreich durchgeführte Acetylierung nach der Literatur von *Höfle*, *Steglich* und *Vorbrüggen* am besten funktioniert, wurde versucht, die 8-*N*-Position unter Verwendung verschiedener Arylamine zu acetylieren (Tab. 6). Die Acetylierungsbedingungen 3 Äq. 4-DMAP, 3 Äq. Ac_2O in Pyridin in Kombination mit der TBDMS-Schutzgruppe für die 3´,5´-Position lieferten bereits bei vorherigen Versuchen die besten Ergebnisse (Abb. 45, S. 47).

Produkt	Arylamin	Ausbeute [%]
73a	Phenyl	45 - 81
73b	3,5-Dimethylphenyl	33 - 43
73c	4-Methoxyphenyl	44 - 81
73d	2-Fluorenyl	48 - 63
73e	4-Biphenyl	72 - 80

Tab. 6: Tabellarische Darstellung der Ausbeuten der Acetylierungsreaktion

Zwischen den ersten Versuchen (niedrigste Ausbeute) und den später optimierten Aufarbeitungsschritten (höchste Ausbeute) können deutliche Ausbeuteunterschiede erkannt werden. Zu den optimierten Arbeitsschritten gehört in erster Linie das direkte Entfernen des Lösungsmittels nach Reaktionsende und nicht erst nach wiederholten Wasch- und Extraktionsschritten. Das Entfernen des Lösungsmittels und das mehrfache Coevaporieren mit Toloul führten in Zusammenhang mit der optimierten Säulenchromatographie zu höheren Ausbeuten. Nur das acetylierte 3,5-Dimethylphenyl-modifizierte Addukt **73b** lieferte mittelmäßige Ausbeuten. Eine mögliche Begründung hierfür könnten die vorhandenen Methylgruppen in *meta*-Position liefern.

Eine weitere Problematik ist, dass aufgrund der vorliegenden Rotationsisomere die ^{1}H-NMR-Spektren eine Verbreiterung der Signale aufweisen. Diese Beobachtung wurde bereits von *Beland* gemacht und näher untersucht.[83] Da diese bereits beschriebene Verbreiterung der Signale auch hier aufgetreten ist, sollte diese These anhand von NMR-spektroskopischen, temperaturabhängigen Messungen näher untersucht werden. Diese wurden für eine korrekte NMR-Auswertung mit allen *N*-acetylierten Addukten durchgeführt, sollen aber hier exemplarisch nur an dem C8-(*N*-Acetyl)-phenyl-modifiziertem Addukt **73a** dargestellt werden. Dazu wurde das ^{1}H-NMR-Spektrum in DMSO-d_6 zunächst bei Raumtemperatur (298 K) und anschließend bei erhöhter Temperatur (328 K) gemessen. Da die Aufnahmen der ^{1}H-NMR-Spektren bei Raumtemperatur und bei erhöhter Temperatur erfolgten, kann keine Aussage über die Koaleszenztemperatur gemacht werden. Dies ist diejenige Temperatur, bei der sich die Signale zum ersten Mal zu einem Signal überlagern.

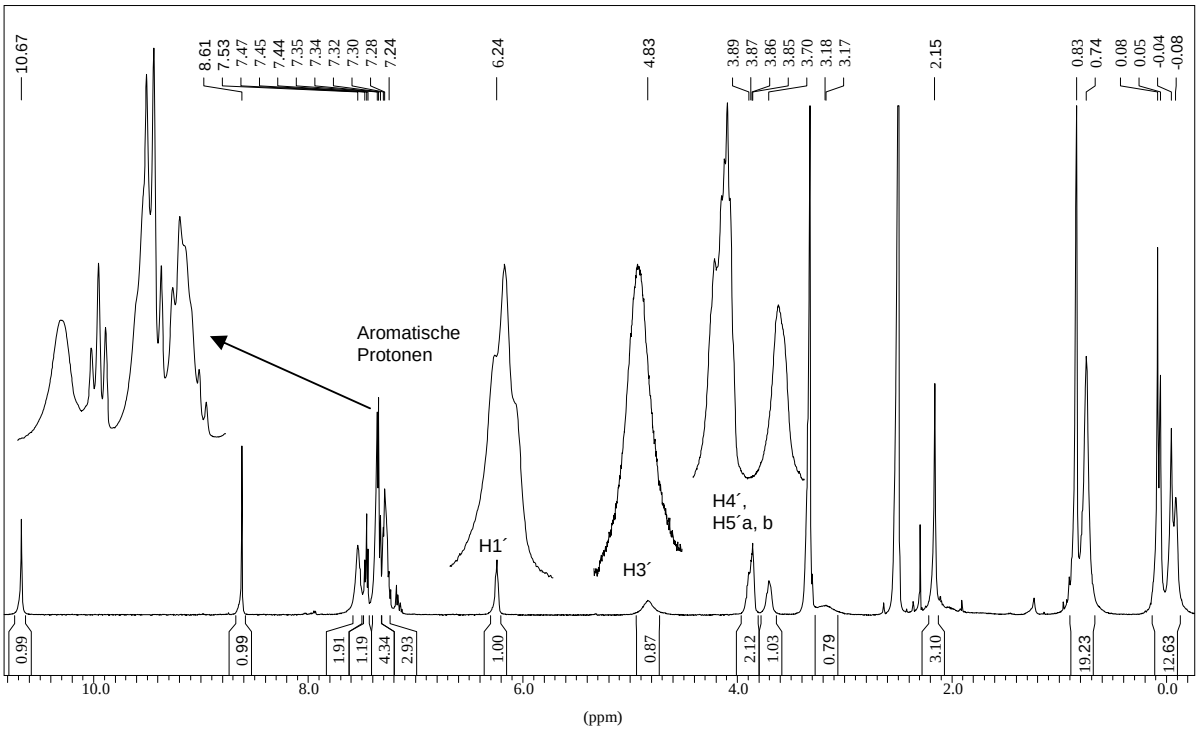


Abb. 52: ^{1}H-NMR-Spektrum von **73a** in DMSO-d_6 bei 298 K

In Abb. 52 ist das ^{1}H-NMR-Spektrum bei Raumtemperatur (298 K) dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Signale verbreitert erscheinen.

Durch Erhöhung der Temperatur auf 328 K (Abb. 53) werden hingegen scharfe Signale mit deutlichen Aufspaltungen erhalten. Diese Aufnahmen bestätigen somit die von *Beland* aufgestellte These. Gleichzeitig wird auch deutlich, dass bei Erhöhen der Temperatur die breiten NMR-Banden verschwinden und scharfe Signale erhalten werden, da durch die rasche Rotation um die C(O)-*N*-Bindung die Signale der Rotationsisomere nicht mehr getrennt auftreten.[84]

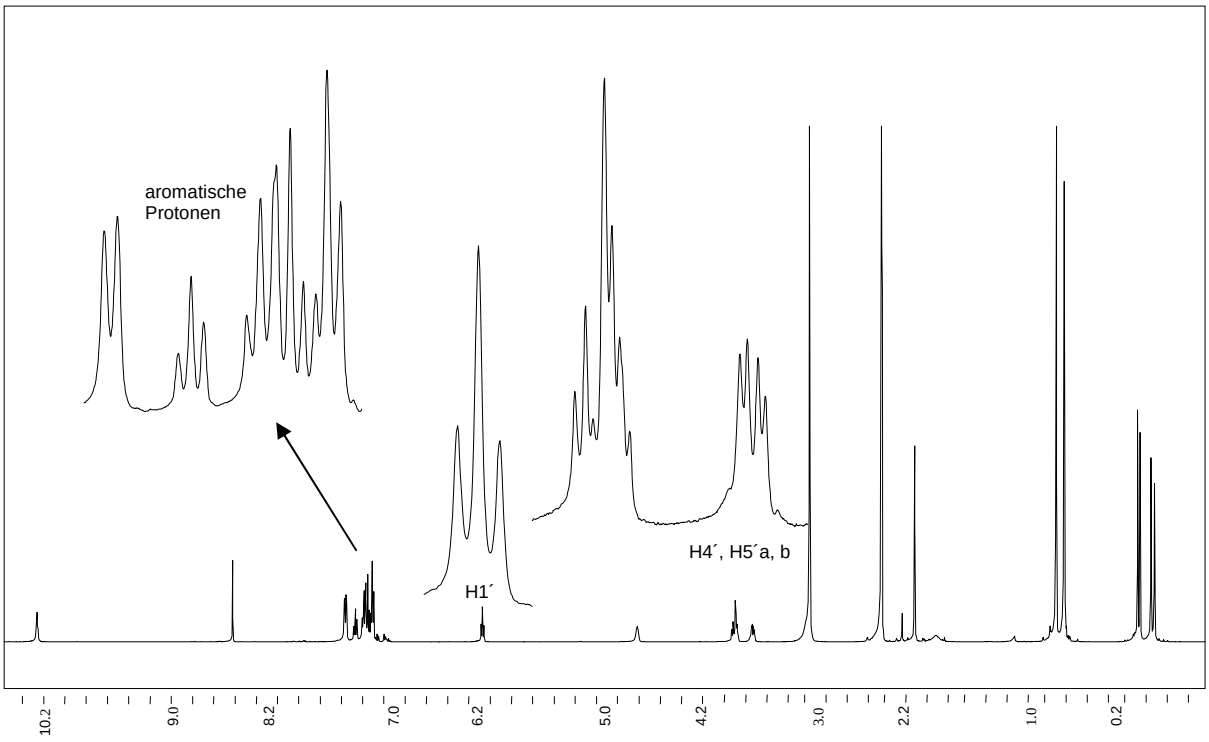


Abb. 53: ^{1}H-NMR-Spektrum von **73a** in DMSO-d_6 bei 328 K

4.2 Synthese der C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten 2´-Desoxyadenosin-Derivate zur Oligonucleotidsynthese **Route 2**

Die zweite Route zur Darstellung C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierter 2´-Desoxyadenosin-Derivate zur Oligonucleotidsynthese berücksichtigt die Verkürzung der unter 4.1 (S. 32) dargestellten Route, indem zuerst das Arylamin *N*-acetyliert und anschließend direkt mittels der Buchwald-Hartwig-Kupplung mit dem geschützten 2´-Desoxyadenosin-Derivat umgesetzt wird.

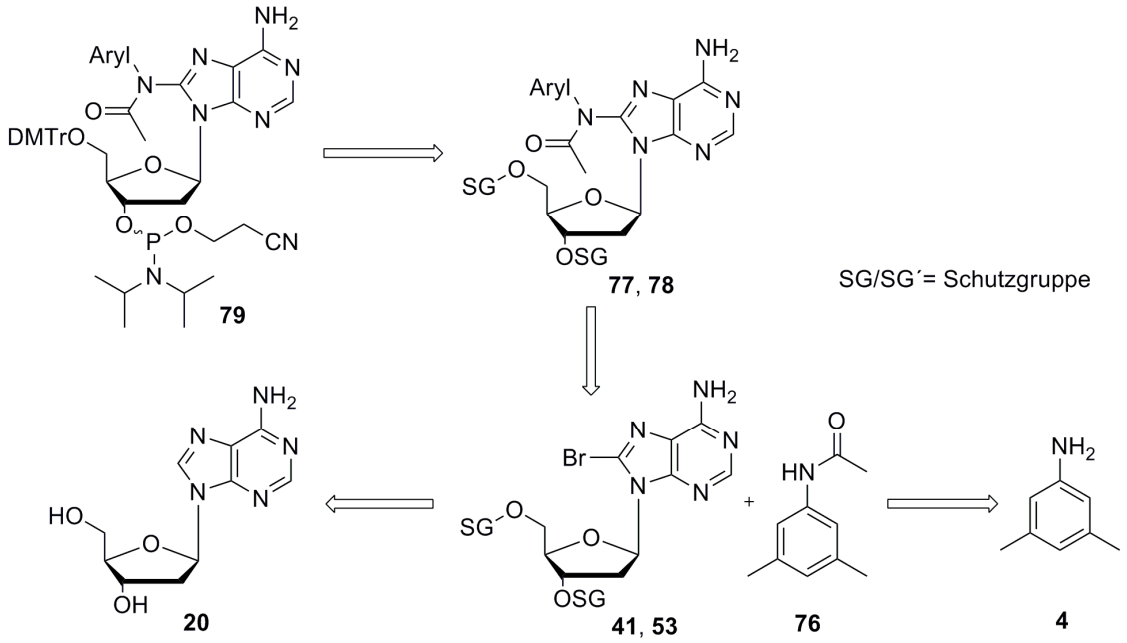


Abb. 54: Retrosynthese zur Darstellung C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierter 2´-Desoxyadenosin-Derivate zur Oligonucleotidsynthese nach **Route 2**

Zunächst wurde 3,5-Dimethylanilin **4** in THF vorgelegt und mit 2 Äq. Pyridin versetzt. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit 1 Äq. AcCl versetzt. Nach entsprechender Aufarbeitung konnte das gewünschte Produkt **76** in 60% Ausbeute erhalten werden (Abb. 55).[63]

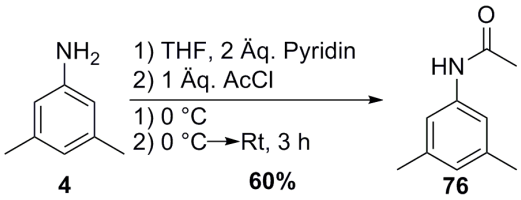


Abb. 55: Synthese von *N*-(3,5-Dimethylphenyl)acetamid **76**

Als nächstes erfolgte die Pd-katalysierte Buchwald-Hartwig-Kupplung. Die Reaktion wurde analog zu früher durchgeführten Reaktionen mit 30 mol% *rac*-BINAP als Ligand, 10 mol% $Pd_2(dba)_3$ als Katalysator und 1.5 Äq. Cs_2CO_3 als Base durchgeführt.

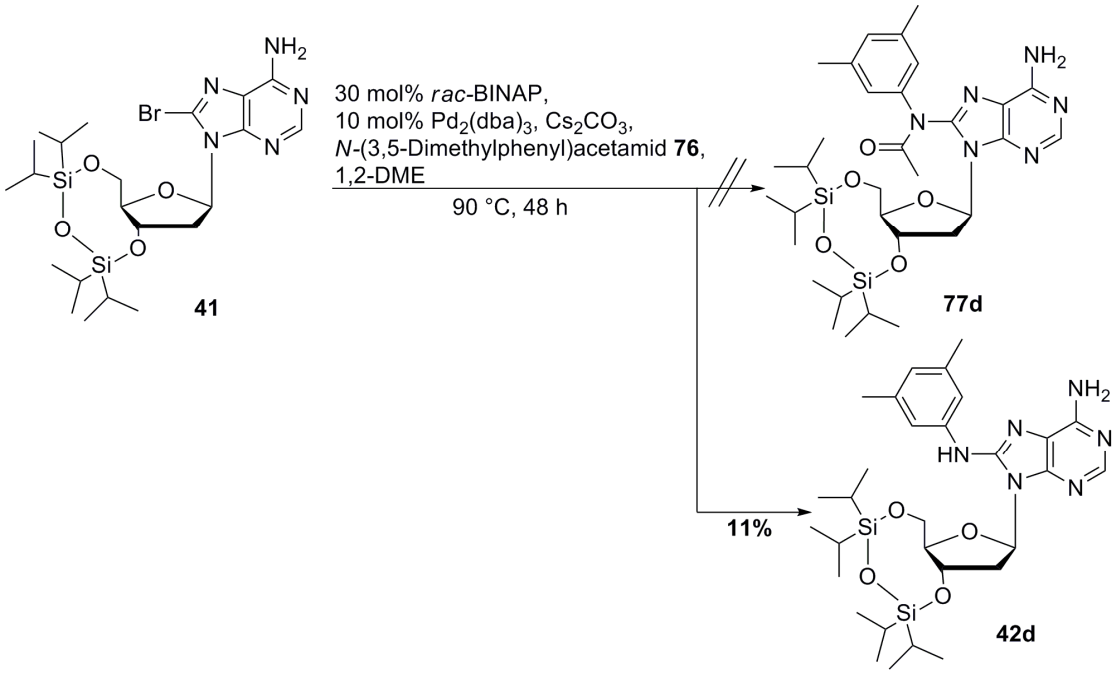


Abb. 56: Versuch zur Synthese von C8-(*N*-Acetyl)-3,5-dimethylphenyl-3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis(*iso*propyl)-disiloxan-2´-desoxyadenosin **77d**

Die Reaktionslösung wurde 48 h unter Rückfluss erhitzt. Nach den dünnschichtchromatographischen Untersuchungen konnte die Entstehung eines Produktes beobachtet werden. Nach der Aufarbeitung konnte allerdings nur das unacetylierte Kupplungsprodukt **42d** mit 11% Ausbeute und das reisolierte Edukt **41** mit 29% Ausbeute erhalten werden.

Diese Reaktion wurde bereits von *Gillet* und *Schärer* bei ihren Versuchen 2´-dG-Derivate zu *N*-acetylieren, erprobt, allerdings mit einem ähnlichen Ergebnis. Auch sie konnten nach der Kupplungsreaktion nur das unacetylierte C8-*N*H-Arylamin modifizierte 2´-dG-Derivat erhalten. Da sie bereits die TBDMS-Schutzgruppe für die Schützung der 3´- und 5´-Positionen verwendeten und auch nur zu den C8-*N*H-Addukten gelangten, wurde diese Variation im Fall von 2´-dA nicht mehr getestet.

Die direkte Kupplung mit einem *N*-acetylierten Arylamin ist also nicht geeignet, um das gewünschte Produkt **77d** zu erhalten. Die Verwendung von **Route 2** zum Verkürzen von **Route 1** war nicht geeignet.

4.3 Synthese der C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten 2´-Desoxyadenosin-Derivate zur Oligonucleotidsynthese **Route 3**

Böge[12] konnte eine effiziente und kurze Syntheseroute zur Darstellung C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierter 2´-dG-Derivate entwickeln und beweisen, dass im Gegensatz zu bisher verwendeten Routen keine komplexe Schutzgruppenstrategie sowie keine metallkatalysierte Kreuzkupplungsreaktion nötig ist.

Der Mechanismus dieser Reaktion ist noch nicht geklärt, es wird aber vermutet, dass zunächst die Hydroxamsäure mit dem Benzotriazol reagiert und unter Abspaltung von Hydroxybenzotriazol sich das hochreaktive Nitreniumion bildet, welches analog zu dem *in vivo* gefundenen Mechanismus zum entsprechenden Addukt reagiert (Abb. 57).

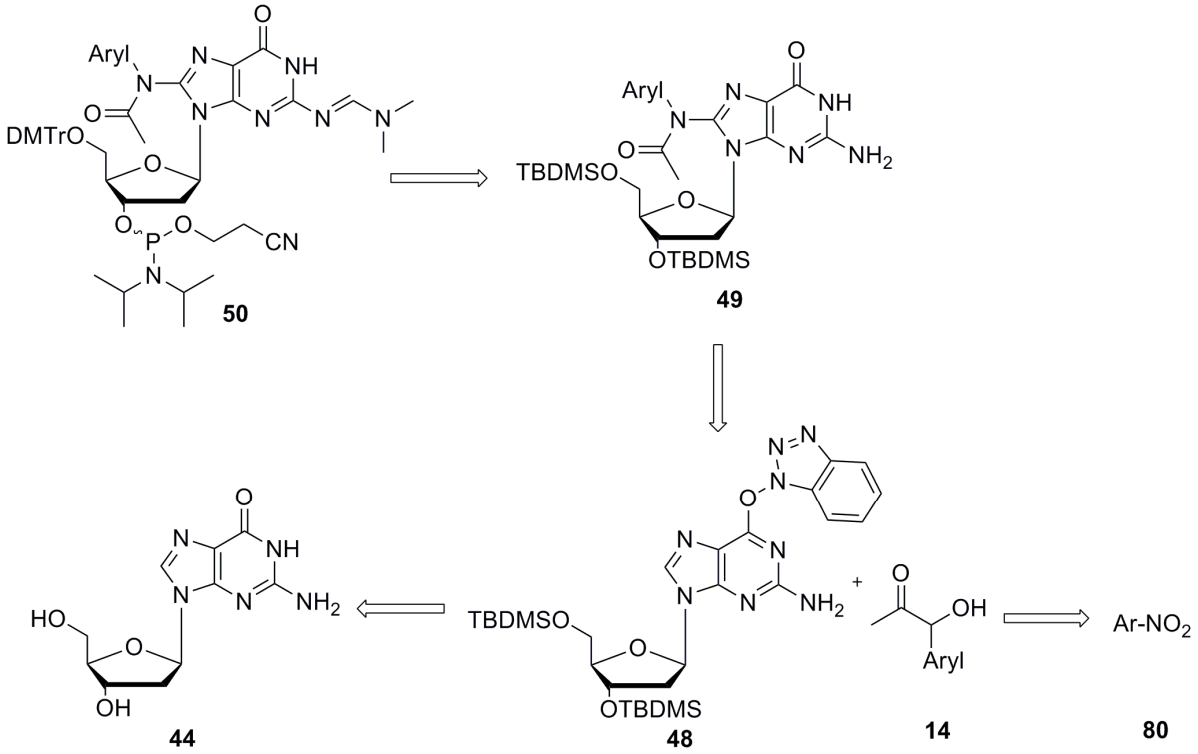


Abb. 57: Retrosynthese zur Darstellung C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierter 2´-dG-Derivate nach *Böge*

In Anlehnung an der hier gezeigten Retrosynthese (Abb. 57, S. 59) sollte die Reaktion ebenfalls mit 2´-dA **20** durchgeführt werden. In diesem Fall steht natürlich keine O^6-Position zur Verfügung. Es sollte lediglich erprobt und bewiesen werden, ob möglicherweise tatsächlich eine Vorreaktion zwischen der Hydroxamsäure **14** und dem Benzotriazol stattfindet und so die Bildung des Nitreniumions garantiert. Dieses müsste schließlich als Beispiel für eine elektrophile Aminierung anschließend am Purin-Ring unabhängig der exocyclischen Aminogruppe angreifen und die bereits unter Abschnitt 2.2 (Abb. 7, S. 10) erwähnte Stevens-ähnliche Umlagerung vollführen.

Für diesen Test musste zunächst 2´-Desoxyadenosin Monohydrat **20** an den 3´,5´-Positionen geschützt werden (Abb. 58).

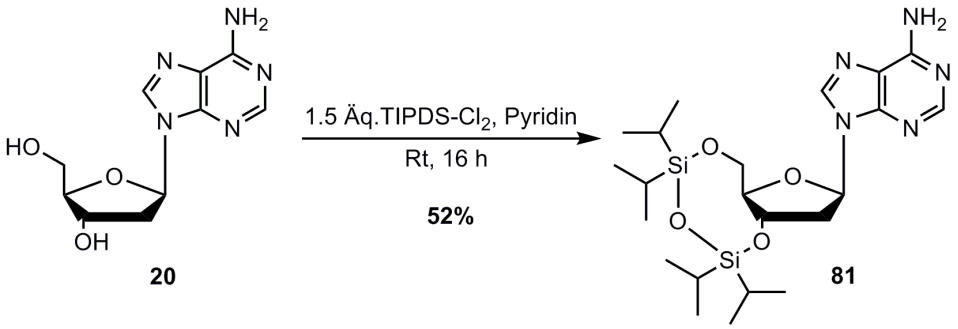


Abb. 58: Synthese von 3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis(*iso*propyl)-1,3-disiloxan-2´-desoxyadenosin **81**

Dazu wurde 2´-dA **20** in Pyridin gelöst und mit TIPDS-Cl versetzt. Nach der entsprechenden Aufarbeitung konnte das Produkt **81** in 52% Ausbeute erhalten werden. Parallel hierzu wurde versucht, *N*-Phenyl-*N*-hydroxyacetamid **14** aus Nitrobenzol **80** mittels Reduktion mit Raney-Nickel und anschließender Acetylierung mit Acetylchlorid zu synthetisieren (Abb. 59).

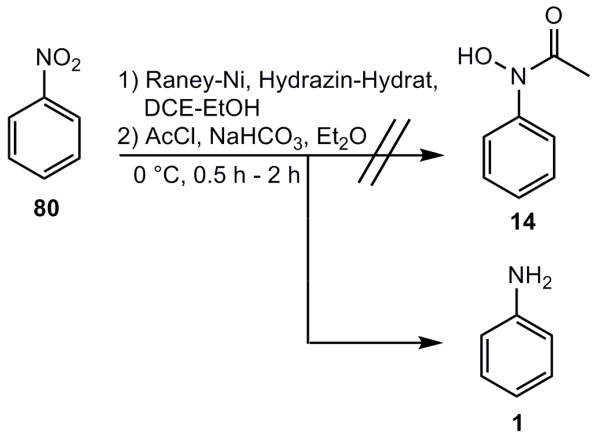


Abb. 59: Versuch zur Darstellung von *N*-Phenyl-*N*-hydroxyacetamid **14**

Die Reaktion führte trotz mehrfacher Versuche immer zu Anilin **1**. Die Hydroxamsäure **14** konnte auf diesem Weg nicht erhalten werden. Aus diesem Grund wurde auf eine im Labor vorhandene, nicht frisch hergestellte Hydroxamsäure **14** zurückgegriffen.

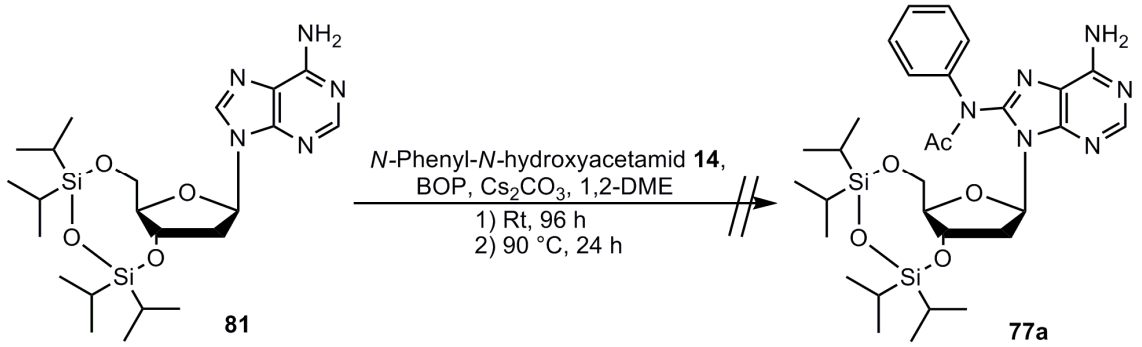


Abb. 60: Versuch zur Darstellung von C8-(*N*-Acetyl)-phenyl-3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-dA **77a**

Zunächst wurde die Reaktion für 96 h bei Raumtemperatur durchgeführt, allerdings zeigte die dünnschichtchromatographische Kontrolle keine Umsetzung des Eduktes **81**. Daraufhin wurde das Reaktionsgemisch für 24 h unter Rückfluss erhitzt. Die Bildung einer neuen Verbindung konnte zwar detektiert werden, diese wurde allerdings nicht isoliert und charakterisiert, da es sich um ein Produkt ohne Zuckergrundgerüst handelte. Offensichtlich zersetzte sich das Edukt bei dieser Reaktion (Abb. 60).

Dieser Syntheseweg eignete sich nicht zur Darstellung von C8-(*N*-Acetyl)-phenyl-3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-dA **77a**. Sollte das Nitreniumion tatsächlich über diesen Weg entstehen, so ist ein Angriff an die Base gehindert.

Zur Darstellung C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierter 2´-Desoxyadenosin-Derivate eignet sich letztendlich am besten **Syntheseroute 1** in Kombination mit der TBDMS-Schutzgruppe für die 3´,5´-Position und die Benzoylgruppe für die N^6-Position. Als Acetylierungsreagenzien lieferten 3 Äq. 4-DMAP und 3 Äq. Ac_2O die besten Ausbeuten. Auf diesem Weg konnte erstmals der Zugang zu C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten 2´-Desoxyadenosin-Derivaten erreicht werden.

Um mehr Informationen über die Struktur des synthetisierten Produkts **73a** zu erhalten, wurde mittels Umkristallisation und verschiedener Diffusionstests versucht, **73a** zu kristallisieren. N^6-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-phenyl-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin **73a** wurde zunächst mit siedendem Ethanol übergossen und bis zum vollständigen Lösen gerührt. Zum Kristallisieren wurde die Mischung bei 4 °C gelagert. [85] Nach 2 Tagen konnte dann die Bildung der Kristalle beobachtet werden. Diese waren allerdings zum Vermessen zu klein und zu instabil, da sie sich bereits nach wenigen Minuten bei Raumtemperatur wieder zersetzten. Auch weitere Diffusionsversuche in Petrolether/Ethylacetat, Petrolether/Dichlormethan, Dichlormethan/Methanol und reinem Methanol führten nicht zur Bildung der gewünschten Kristalle. Somit musste auf diese erhofften Strukturinformationen verzichtet werden.

4.4 Synthese der C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten 2´-Desoxyadenosin-Phosphoramidite

Nach erfolgreicher Acetylierung der C8-*N*-Position konnten die anschließenden Reaktionsschritte zur Synthese der gewünschten Phosphoramidite **84a-e** und damit auch die erstmalige Synthese der C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten Oligonucleotide erfolgen.

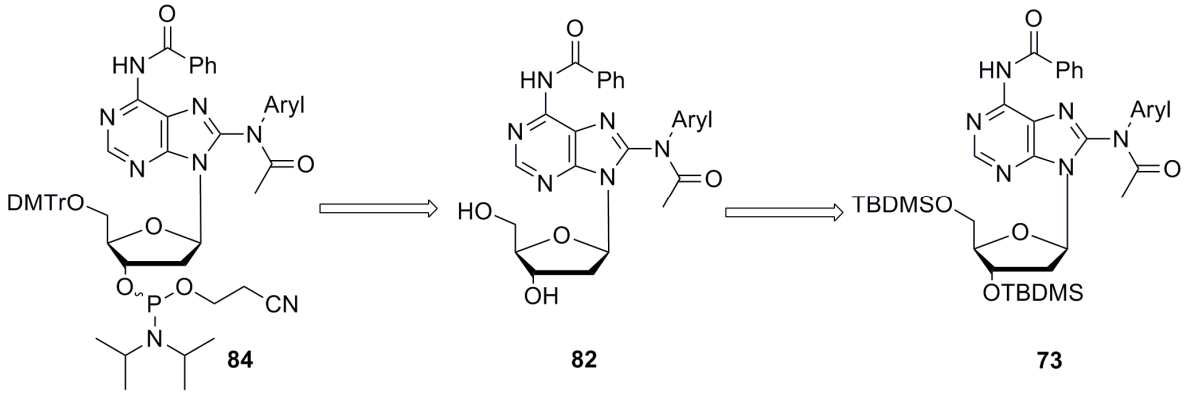


Abb. 61: Retrosynthese zur Darstellung von N^6-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-arylamin-modifizierten 2´-dA Phosphoramiditen **84**

Als erster Syntheseschritt musste die Entschützung der 3´,5´-Positionen erfolgen. Wichtig für diese Abspaltung ist das Vorhandensein von Fluor im Spaltungsreagenz, denn Silicium besitzt eine größere Affinität zu Fluor als zu Sauerstoff, somit kann die Entschützung nach einem einfachen Additions-Eliminierungs-Mechanismus ablaufen. Ohne Vorhandensein der Acetylgruppe wurde bisher Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) als Spaltungsreagenz benutzt. Die Problematik ist allerdings, dass TBAF in THF einen pH-Wert von 8 besitzt und somit möglicherweise auch die Acetylgruppe während der Reaktion spaltet.

Besser geeignet scheint die alternative Entschützungsmethode mit Triethylamin-Trihydrofluorid in THF/Dichlormethan zu sein. Diese Lösung hat einen pH-Wert von 4 und so sollte der Verlust der Acetylgruppe umgänglich sein.

Eine weitere Methode sollte in Anlehnung an die Literatur von *Gillet* und *Schärer*[63] mittels TBAF in THF unter Zugabe von Essigsäure erfolgen. Diese Mischung hat einen pH-Wert von 5 und sollte die Acetylgruppe ebenfalls nicht abspalten. Trotzdem wurden zum Vergleich alle drei Methoden erprobt und auf ihre Tauglichkeit getestet. Bei der ersten Methode konnte tatsächlich, wie bereits vermutet, nur das unacetylierte Produkt **85e** erhalten werden. Die Acetylgruppe wurde während der Entschützung mit TBAF ebenfalls abgespalten (Abb. 62).

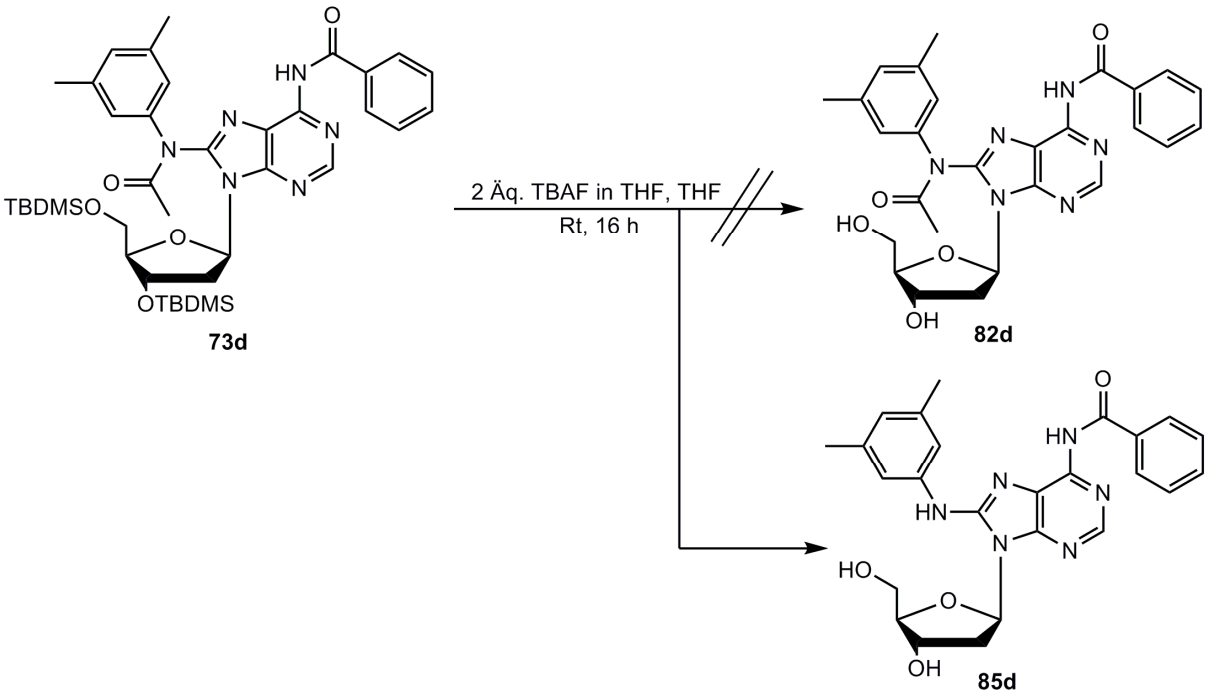


Abb. 62: Versuch zur Entschützung der 3´,5´-Hydroxylgruppen mittel TBAF in THF

Weiterhin wurde auch noch die Methode mittels TBAF und Essigsäure getestet (Abb. 63).

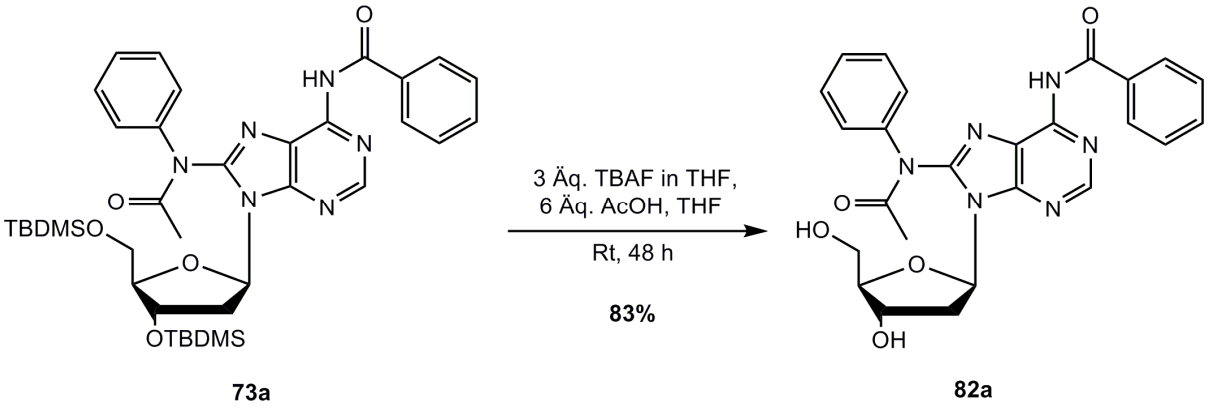


Abb. 63: Entschützung der 3´,5´-Hydroxylgruppen mittel TBAF in THF unter Zusatz von AcOH

Hierfür wurden zunächst 3 Äq. TBAF und 6 Äq. Essigsäure zusammengegeben und anschließend zu dem bereits in THF gelöstem Edukt **73a** gefügt. Die Reaktion wurde 48 h bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Umsetzung gerührt. Das gewünschte Produkt **82a** konnte mit einer Ausbeute von 83% isoliert werden (Abb. 63).
Zuletzt wurde die saure Variante mit Triethylamin-Trihydrofluorid erprobt. Das Edukt **73a** wurde in einer 1:1 Mischung aus Tetrahydrofuran und Dichlormethan vorgelegt und mit 10 Äq. Triethylamin und 12.5 Äq. Triethylamin-Trihydrofluorid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt (Abb. 64).

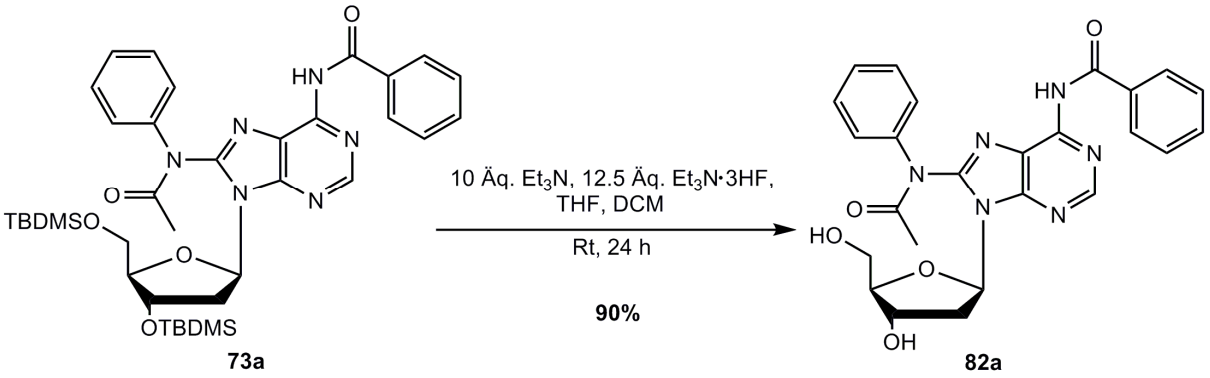


Abb. 64: Entschützung der 3´,5´-Hydroxylgruppen mittels $Et_3N{\cdot}3HF$

Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte das Produkt **82a** in einer sehr guten Ausbeute von 90% erhalten werden.

Beide Methoden mit einem niedrigen pH-Wert eignen sich gut für die Entfernung der 3´,5´-Schutzgruppen, ohne dass die Acetylgruppe abgespalten wird. Die Variante mit dem angesäuerten TBAF ist langsamer, hat aber den Vorteil, dass keine Triethylammoniumsalze abgetrennt werden müssen.

Auch wurde versucht, das Produkt **82a** nach Extraktion mit Wasser mit Hilfe von kaltem Hexan auszufällen und so den säulenchromatographischen Reinigungsschritt zu umgehen. Eine Entfernung der Salze mittels Extraktion war nicht möglich. Sie werden stets mit dem Produkt **82a** gefällt und können nur sehr schwer von diesem befreit werden. Diese Aufarbeitung führte lediglich zu Ausbeuten um die 25%, da ein Großteil des Produktes **82a** in die wässrige Phase übergeht. Für ein sauberes Produkt ist eine mehrfache säulenchromatographische Reinigung unumgänglich.

Produkt (SG=TBDMS)	**Arylamin**	**Ausbeute**
82a	Phenyl	69 - 93%
82b	4-Methoxyphenyl	78 - 90%
82c	4-Methylphenyl	94%
82d	3,5-Dimethylphenyl	74 - 90%
82e	4-Biphenyl	77 - 91%
82f	2-Fluorenyl	79 - 93%

Tab. 7: Spektrum der Entschützung der 3´,5´-Positionen

Nach der Entschützung war es möglich, Informationen mittels NOESY-NMR-Spektroskopie über die Molekül-Konformation bezüglich der *N*-glycosidischen Bindung der in Tab. 7 dargestellten Produkte zu erhalten. Erste Aussagen über den Einfluss der *N*-acetylierten Modifikation auf die Struktur können gemacht werden.

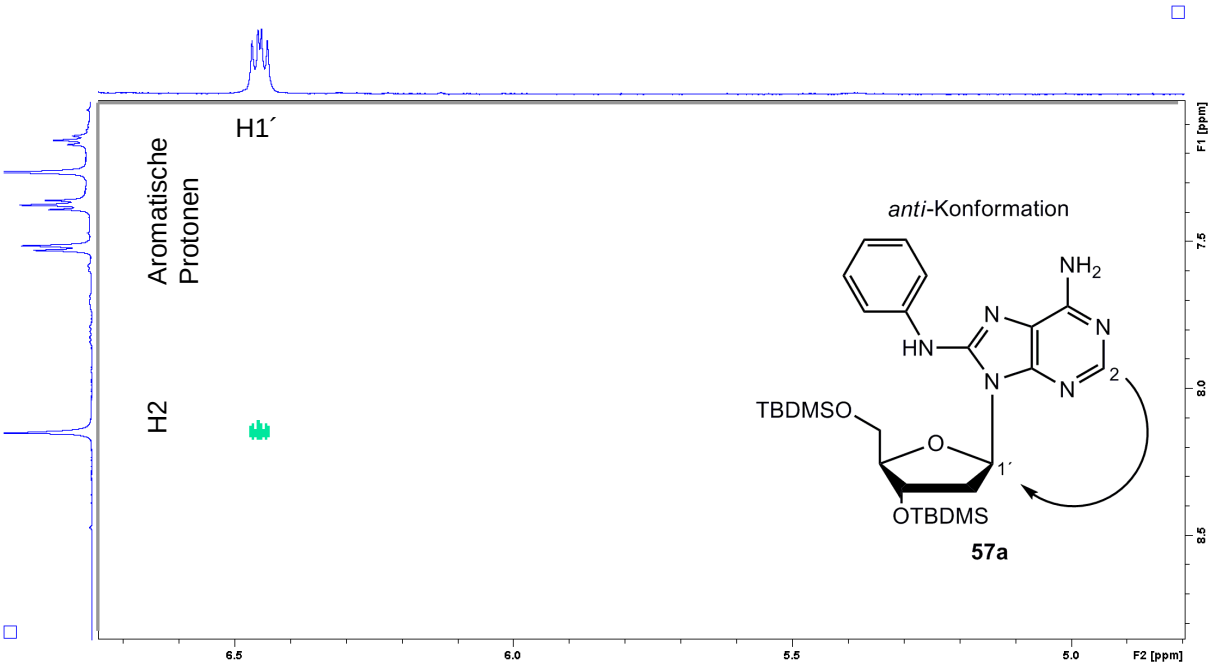


Abb. 65: NOESY-NMR-Spektrum von C8-(*N*H-Phenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin **57a**

Abbildung 65 zeigt das NOESY-NMR-Spektrum von C8-(*N*H-Phenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin **57a**.

Das H1´-Proton des Zuckers koppelt mit dem H2-Proton der Base. Zusätzlich zeigt die Abbildung auch noch die aromatischen Protonen vom Phenylring, um zu verdeutlichen, dass diese keine Kopplung mit dem H1´-Proton eingehen und sich somit räumlich auf einer anderen Ebene erstrecken. Weiterhin sichtbar, aber nicht in der vergrößerten Abbildung gezeigt, ist eine Kopplung zwischen der exocyclischen *N*H_2-Gruppe und dem *N*H- an der C8-Position. Möglicherweise rotieren der Aromat und das Proton um die 8-*N*-Achse.

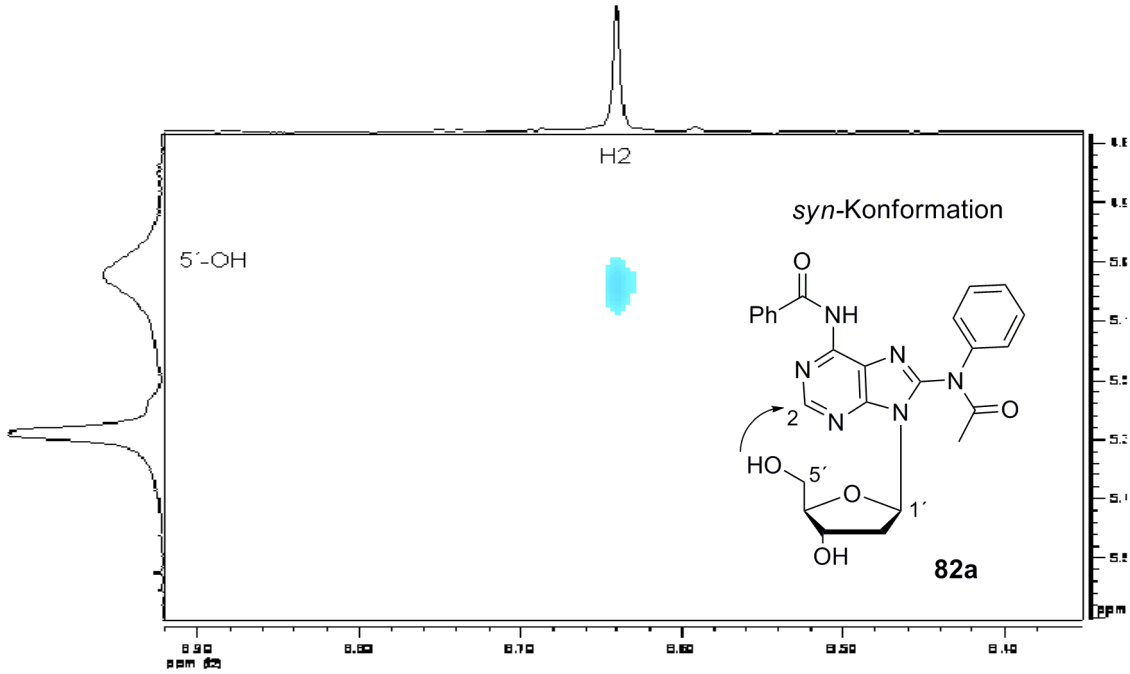


Abb. 66: NOESY-NMR-Spektrum von N^6-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-phenyl-2´-desoxyadenosin **82a**

Abbildung 66 zeigt das NOESY-NMR-Spektrum von N^6-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-phenyl-2´-desoxyadenosin **82a**. Das H2-Proton der Base koppelt im Fall der *syn*-Konformation nicht mehr, wie unter Abb. 65 (S. 66) demonstriert, mit dem H1´-Proton, sondern mit dem 5´-OH-Proton. Noch deutlicher wäre eine Zuordnung zwischen dem H1´-Proton und der *N*-Acetyl-Gruppe, aber diese rotiert mit dem Aromaten um die C8-*N*-Achse und konnte in den NOESY-NMR-Aufnahmen nicht bestätigt werden. Somit kann die These von *Gillet* und *Schärer*[63, 64] bestätigt werden. Sie stellten fest, dass aufgrund einer besseren Stabilisierung, nach Einführung der Acetylgruppe, die *syn*-Konformation der *N*-glycosidischen Bindung bevorzugt wird. Aufgrund der neu vorhandenen Acetylgruppe kann sich das Molekül nicht mehr zwischen der *N*H und der 5´-OH-Position über Wasserstoffbrücken-Bindungen stabilisieren und stabilisiert sich bevorzugt über die Verbindung zu H2.

Vorbereitend zur Oligonucleotidsynthese und der Phosphoramidit-Methode erfolgte als nächstes die DMTr-Schützung der primären 5´-OH-Gruppe. Hierfür musste die Vorstufe 4,4´-Dimethoxytriphenylmethylchlorid **88** aus Bromanisol **86** über 4,4´-Dimethoxytriphenylmethylcarbinol **87** synthetisiert werden (Abb. 67).

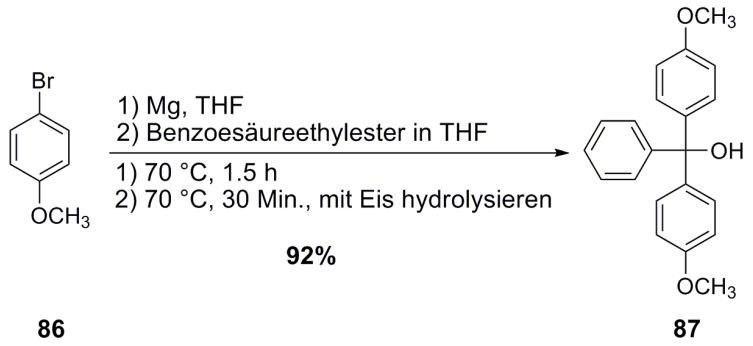


Abb. 67: Synthese von 4,4´-Dimethoxytriphenylmethylcarbinol **87**

Hierfür wurden Magnesiumspäne mit Tetrahydrofuran übergossen und unter Rühren mit Bromanisol **86** versetzt. Nach Starten der Grignard-Reaktion wurde erneut Bromanisol **86** in THF langsam zugetropft und zum Sieden erhitzt. Nach anschließender Zugabe von Benzoesäureethylester in THF wurde weitere 30 Minuten unter Rückfluss erhitzt und schließlich mit Eis hydrolysiert. Nach der Extraktion mit $NaHCO_3$-Lösung wurde der Rückstand in Toluol gelöst und azeotrop destilliert.

Aufgrund der hohen Empfindlichkeit des Produktes wurde dieses *in situ* zum gewünschten Chlorid **88** umgesetzt (Abb. 68). Das frisch synthetisierte 4,4´-Dimethoxytriphenylcarbinol **87** wurde in Toluol gelöst, mit Acetylchlorid versetzt und 2.5 h unter Rückfluss erhitzt.

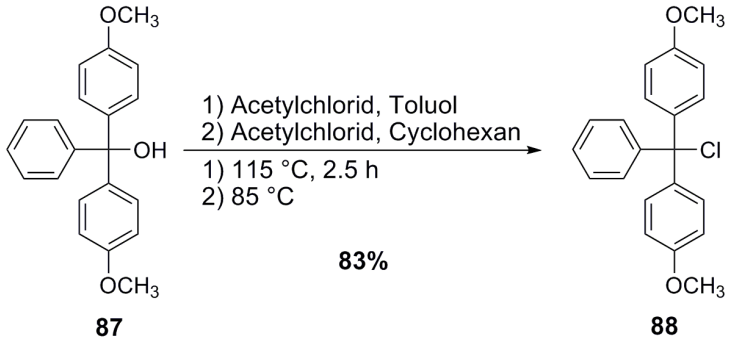


Abb. 68: Synthese von 4,4´-Dimethoxytriphenylmethylchlorid **88**

Anschließend wurde das Lösungsmittel durch Destillation abgetrennt und der Rückstand erneut mit Acetylchlorid und Cyclohexan versetzt. Nach erneutem Erhitzen wurde das Produkt **88** zum Kristallisieren unter Lichtausschluss gelagert. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit des Produktes **88** musste dieses unter Licht- und Luftausschluss aufbewahrt werden. Das Produkt **88** konnte in einer Ausbeute von 83% erhalten werden.

Die DMTr-Schützung der 5´-OH-Funktion der N^6-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-arylamin-modifizierten 2´-dA **82** erfolgte nach einem S_N1-Mechanismus über ein tertiäres Carbeniumion.

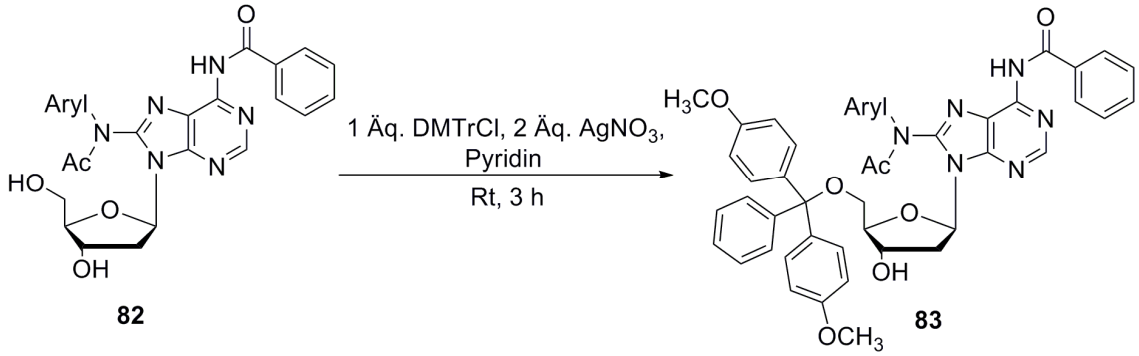


Abb. 69: DMTr-Schützung der 5´-OH-Position

Zunächst wurde das Edukt **82** in Pyridin vorgelegt und mit Silbernitrat versetzt. Anschließend wurde das DMTrCl hinzugefügt und die Reaktionsmischung 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurde das ausgefallene Silberchlorid extrahiert. Die säulenchromatographische Reinigung erwies sich als schwierig. Stets waren noch Verunreinigungen enthalten, die zwar dünnschichtchromatographisch nicht detektierbar, aber NMR-spektroskopisch deutlich vorhanden waren.

Das Problem bei der mehrfachen Reinigung dieser Stufe war auch die Kombination des Kieselgels mit Dichlormethan, denn diese Mischung ist leicht sauer und spaltet somit immer wieder einen Teil der DMTr-Schutzgruppe ab. Die Zugabe von wenig Triethylamin sollte der Spaltung entgegenwirken. Hier wiederum bestand die Gefahr, einen Teil der Acetylgruppe zu verlieren. Die beste Möglichkeit war eine chromatographische Reinigung über Aluminiumoxid (ALOX, neutral, Akt.stufe III).

Je öfter die säulenchromatographische Reinigung erfolgte, desto mehr Edukt **82** konnte anschließend dünnschichtchromatographisch detektiert werden. Das Produkt **83** zerfällt nach mehrfacher Reinigung wieder zum Edukt **82**. Es ist daher nicht möglich diese Stufe, trotz mehrfacher Trennungsversuche, komplett zu reinigen (Tab. 8).

Auch wurde versucht, das Produkt **83** mit kaltem Hexan zu fällen.[86] Dieses gelingt zwar, aber die vorherige Säule zur Abtrennung der restlichen Salze und für eine erste grobe Reinigung ist unumgänglich. Durch das Fällen erniedrigt sich die Ausbeute aber leider um ca. 30%, wobei auch hier kein sauberes Produkt **83** erhalten werden konnte.

Die beste Möglichkeit war somit die Verwendung des unreinen DMTr-geschützten Produktes **83** bei der Folgereaktion, wobei eine Säulenfiltration aufgrund der Silbersalze vorangehen musste.

Produkt (SG=TBDMS)	**Arylamin**	**Ausbeute**
83a	Phenyl	(46 - 52%)
83b	4-Methoxyphenyl	(43 - 62%)
83c	4-Methylphenyl	(49%)
83d	3,5-Dimethylphenyl	(64 - 67%)
83e	4-Biphenyl	(63 - 70%)
83f	2-Fluorenyl	(57 - 76%)

Tab. 8: Spektrum der Ausbeuten der DMTr-Schützung

Als letzte Stufe erfolgte die Überführung von **83** in die Phosphoramidite **84**. Hierfür sollte zunächst Bis-*N,N´*-di*iso*propylamino-(2-*O*-cyanoethyl)phosphit **101** synthetisiert werden. Dazu wurde frisch destilliertes Phosphortrichlorid **99** in Pyridin und Diethylether gelöst, auf -78 °C gekühlt und sehr langsam über einen Zeitraum von 1.5 h mit frisch destilliertem 3-Hydroxypropionitril versetzt (Abb. 70).

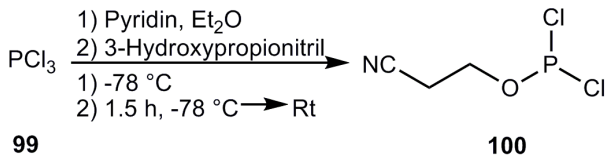


Abb. 70: Synthese von 2-Cyanoethylphosphordichlorit **100**

Nach Erwärmen auf Raumtemperatur und 12-stündigen Rühren wurde der Niederschlag unter Schutzgas filtriert. Das entstandene Produkt **100** wurde aufgrund der starken Licht- und Luftempfindlichkeit ohne weitere Aufarbeitung *in situ* umgesetzt.[87]

Frisch synthetisiertes 2-Cyanoethylphosphordichlorit **100** wurde in Diethylether gelöst und bei -10 ℃ innerhalb einer Stunde mit *N,N´*-Di*iso*propylamin versetzt. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur und 12-stündigen Rühren wurde der Niederschlag unter Schutzgas filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der ölige Rückstand mit Calciumhydrid versetzt und über eine Vigreuxkolonne destilliert (Abb. 71).[87]

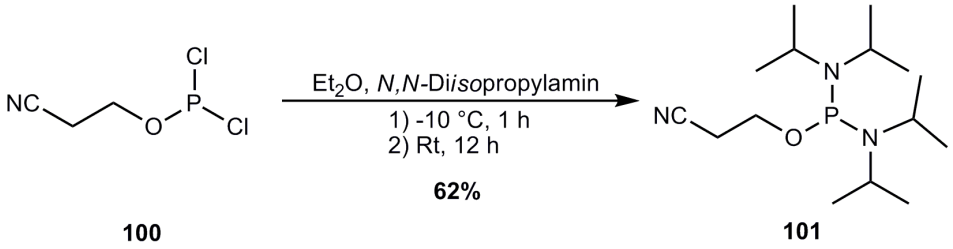


Abb. 71: Synthese von Bis-*N,N´*-di*iso*propylamino-(2-*O*-cyanoethyl)phosphit **101**

Anschließend konnte die Synthese der jeweiligen Phosphoramidite erfolgen. Hierfür wurde das Edukt **83** in Dichlormethan und Acetonitril vorgelegt, mit 4,5-Dicyanoimidazol als Aktivator versetzt und schließlich Bis-*N,N´*-di*iso*propylamino-(2-*O*-cyanoethyl)phosphit **101** zugegeben (Abb. 72).

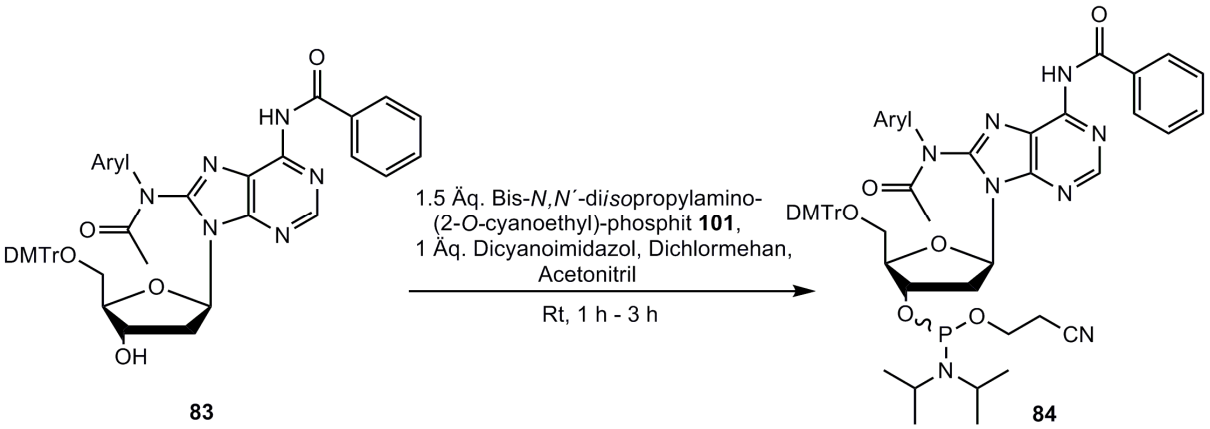


Abb. 72: Synthese von N^6-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-aryl-5´-*O*-dimethoxytrityl-3´-*O*-(*N,N´*-di*iso*propyl)-(2-*O*-cyanoethyl)phosphit-2´-dA **84**

Die Aufarbeitung dieser Reaktion muss aufgrund der Empfindlichkeit der entstandenen P^{III}-Produkte zügig erfolgen. Nach der Extraktion erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung über Aluminiumoxid (Alox, neutral, Akt.stufe III). Eine vollständige Trennung war nicht möglich, da bereits das eingesetzte Edukt **83** schon leichte Verunreinigungen enthielt und sich während der Reinigung stets ein kleiner Teil des Produktes **84** zersetzte. Weiterhin war auch die Anfertigung eines ^{1}H-NMR-Spektrums aufgrund der vorhandenen Rotamere schwierig. Für scharfe Signale wäre eine Aufnahme des ^{1}H-NMR-Spektrums bei erhöhter Temperatur notendig, allerdings waren diese mit den hochempfindlichen Produkten **84** nicht möglich.

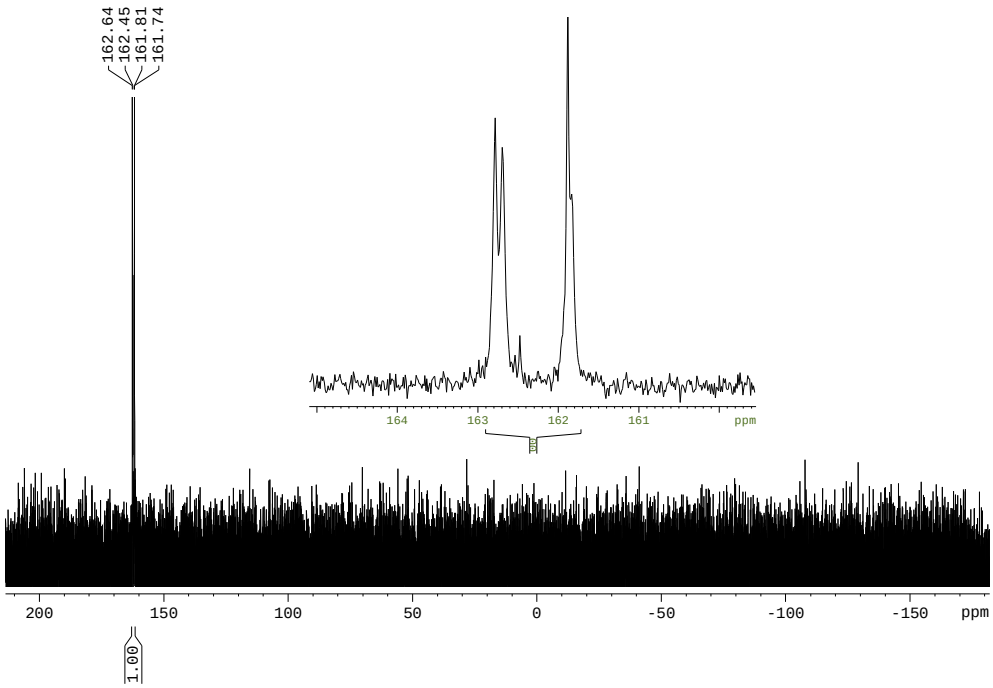


Abb. 73: ^{31}P-NMR-Spektrum von *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-phenyl-5´-*O*-dimethoxytrityl-3´-*O*-(*N,N*-di*iso*propyl)-(2-*O*-cyanoethyl)-phosphit-2´-dA **84a**

Das ^{31}P-NMR-Spektrum (Abb. 73) zeigt die charakteristischen Signale der Phosphoramidite bei einer chemischen Verschiebung von 162 - 161 ppm. Da es sich hierbei um Rotamere handelt, werden 4 Phosphorsignale, die als 1 integriert werden, erhalten. Das in Abb. 74 dargestellte ^{31}P-NMR-Spektrum wurde in der Abteilung für Organische Chemie angefertigt. Dieselbe Verbindung wurde einen Tag später in der Abteilung für Anorganische Chemie untersucht und zeigte bereits einen leichten Zerfall des Produktes **84a** (Abb. 74, S. 73).

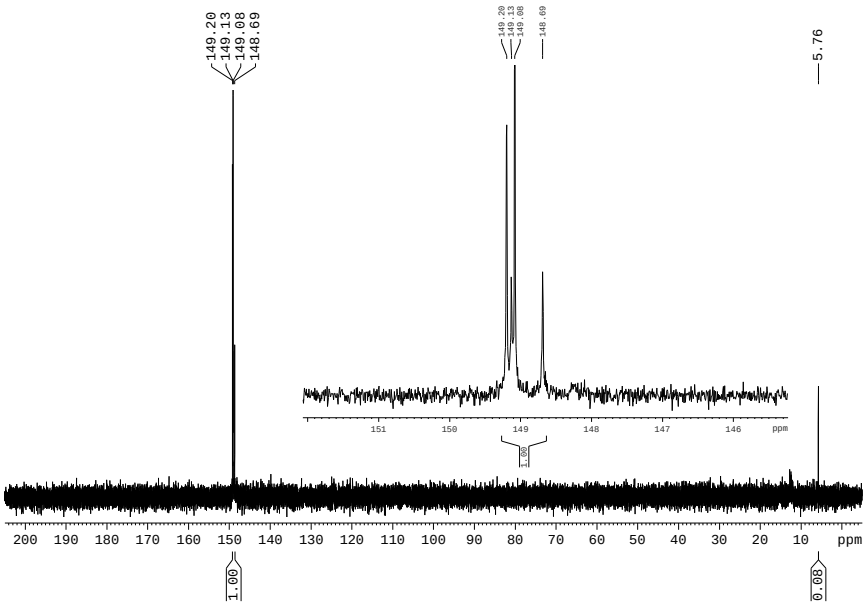


Abb. 74: ^{31}P-Spektrum von *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-aryl-5´-*O*-dimethoxytrityl-3´-*O*-(*N*,*N*-di*iso*propyl)-(2-*O*-cyanoethyl)-phosphit-2´-dA **84a**

Tabelle 9 zeigt die Ausbeuten in Abhängigkeit vom Arylamin.

Produkt (SG=TBDMS)	**Arylamin**	**Ausbeute**
84a	Phenyl	(46 - 66%)
84b	4-Methoxyphenyl	(42 - 63%)
84c	4-Methylphenyl	(42%)
84d	3,5-Dimethylphenyl	(36 - 55%)
84e	4-Biphenyl	(49 - 58%)
84f	2-Fluorenyl	(45 - 66%)

Tab. 9: Spektrum der Ausbeuten der Phosphoramiditierung

Nach der Überführung in die gewünschten Phosphoramitide **84** konnten die Produkte nach einer Gefriertrocknung aus Benzol als farblose Feststoffe erhalten werden.

Nach anfänglichen Schwierigkeiten mit labilen Schutzgruppen an der N^6-Position konnte die Acetylierung in Kombination mit der TBDMS- und der Benzoyl-Schutzgruppe in Anlehnung an die Vorschrift von *Höfle*[79] erfolgreich durchgeführt werden. Unter Beachtung der basenlabilen Eigenschaften der Acetylgruppe und einer orthogonalen Schutzgruppenstrategie war eine Entschützung der 3´,5´-Positionen unter pH 5 - pH 2 möglich. Die anschließende DMTr-Schützung und die Bildung der Phosphoramidite verliefen als schnelle Reaktionen (ca. 3 h) und lieferten erstmalig die gewünschten C8-(*N*-Acetyl)-arylamin modifizierten 2´-Desoxyadenosin Phosphoramidite **84**.

4.5 Synthese von C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten Oligonucleotiden

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten 2´-Desoxyadenosin-Phosphoramidite **84** sollten gezielt in verschiedene Oligonucleotide eingebaut und deren Einfluss auf ihre Eigenschaften untersucht werden.
Zunächst sollte die bereits von *Rizzo* für das heterocyclische Amin IQ **10** verwendete *Nar*I-Sequenz, angepasst an 2´-Desoxyadenosin, verwendet werden.[88] Diese Sequenz ist ein Hotspot für Mutationen am 2´-Desoxyguanosin, die durch induzierte Leserasterverschiebungsmutationen hervorgerufen werden. Das aus vorherigen Arbeiten bekannte 12mer (5´-d(CTC GGC **A**CC ATC)-3´) sollte an der 6. Position, ausgehend von 3´, modifiziert und anschließend der Einfluss der eingeführten Modifikation auf die Schmelztemperatur und die Konformation untersucht werden.
Als weitere Sequenz wurde ein palindromes (selbstkomplementäres) 12mer-Oligonucleotid gewählt, welches eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym EcoRI besitzt. Im Folgenden wird diese als EcoRI-Sequenz (5´-d(GT**A** G**A**A TTC TAC)-3´) bezeichnet. Hier sollten die 8. und die 10. Position, ausgehend von 3´, modifiziert werden. Auf diese Weise liegt eine Modifikation innerhalb und eine Modifikation außerhalb der Schnittstelle und es können anschließend Untersuchungen bezüglich des Einflusses der Modifikation auf den T_m-Wert und die Konformation sowie den Restriktionsabbau durch das EcoRI-Enzym durchgeführt werden.
Um den Einfluss der eingebauten Modifikationen auf längere Oligonucleotide zu untersuchen, wurden diese zusätzlich in ein speziell entwickeltes 20mer (5´-d(ACA T**A**A GCA CTT ACG ACG CG)-3´) eingebaut.

Nach den Standarduntersuchungen, bezüglich T_m-Wert und Konformation, sollten in Kooperation mit Prof. Dr. Marx von der Universität Konstanz Primer-Verlängerungs-Untersuchungen erfolgen.

Die Synthese der modifizierten und unmodifizierten Oligonucleotide wurde mittels Festphasensynthese zunächst nach der Phosphoramiditmethode mit einem DNA-Synthesizer durchgeführt. Es wurden sowohl die Standard-Chemikalien als auch die Syntheseprotokolle des Herstellers verwendet. Als Trägermaterial wurden kommerziell erhältliche Succinyl-CPG-Träger verwendet. Die Kupplungsausbeuten lagen stets zwischen 90-98%. Beim Einbau des modifizierten Phosphoramidits wurde dieses zunächst in Acetonitril in einer Konzentration von 0.1 M gelöst und das Kupplungsprotokoll leicht verändert. Es wurde ein dritter Kupplungsschritt eingefügt und die Kupplungszeit von 15 auf 500 Sekunden verlängert. Alle Synthesen wurden im 1 µM-Maßstab durchgeführt. Die letzte DMTr-Gruppe wurde noch am Synthesizer entfernt. Anschließend wurden die Oligonucleotide manuell vom CPG-Träger und von den restlichen Schutzgruppen abgespalten und unter Vakuum konzentriert. Die erhaltenen Rohprodukte wurden in Reinstwasser aufgenommen und mittels HPLC über eine RP-18 Säule mit einem TEAA-Puffer und einem Acetonitrilgradienten bei Raumtemperatur eluiert. Dieser Lauf konnte bereits über die vorher stattgefundene Entschützung Aufschluss geben. Das Roh-Oligonucleotid wurde anschließend mit dem jeweiligen Gradienten gereinigt. Die Absorption wurde bei 260 nm gemessen. Das Oligonucleotid-Signal wurde in einzelnen Fraktionen aufgefangen und erneut eine Probe von jeder dieser Fraktionen chromatographisch mittels HPLC analysiert. Dabei wurden gleiche Fraktionen vereinigt und bei Bedarf noch mal gereinigt. Anschließend wurden die gereinigten Oligonucleotide in einem Speed-Vac-Probenkonzentrator bis zur Trockne eingeengt. Die gereinigten und getrockneten Oligonucleotide wurden anschließend für die Messung der optischen Dichte in je 100 µL Reinstwasser aufgenommen. Davon wurden 10 µL entnommen und auf 1000 µL mit Reinstwasser wieder aufgefüllt. Von dieser Oligonucleotid-Lösung wurde die Absorption bei 260 nm (A_{260}) gemessen. Aus diesem Wert ließ sich durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor die optische Dichte der Gesamtlösung (OD_{260}) und daraus die Gesamtmenge des erhaltenen Oligonucleotids berechnen (Experimentalteil, S. 178f). Zur Identifizierung der erhaltenen Oligonucleotide wurden jeweils 50 pmol massenspektrometrisch analysiert.

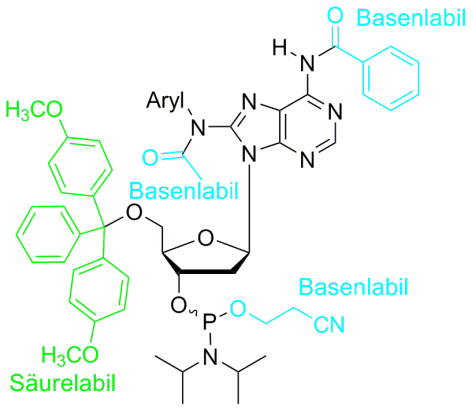


Abb. 75: Zielmolekül und Schutzgruppen

Beim näheren Betrachten der synthetisierten Phosphoramidite **84** fällt sofort auf, dass die gewünschte Acetylgruppe an der 8-*N*-Position bei der folgenden basischen Abspaltung der festen Phase, der ß-Cyanoethylgruppe und der Benzoylgruppe nach dem bisher erfolgreich verwendeten Weg mit Ammoniak wahrscheinlich auch abgespalten wird (Abb. 76).

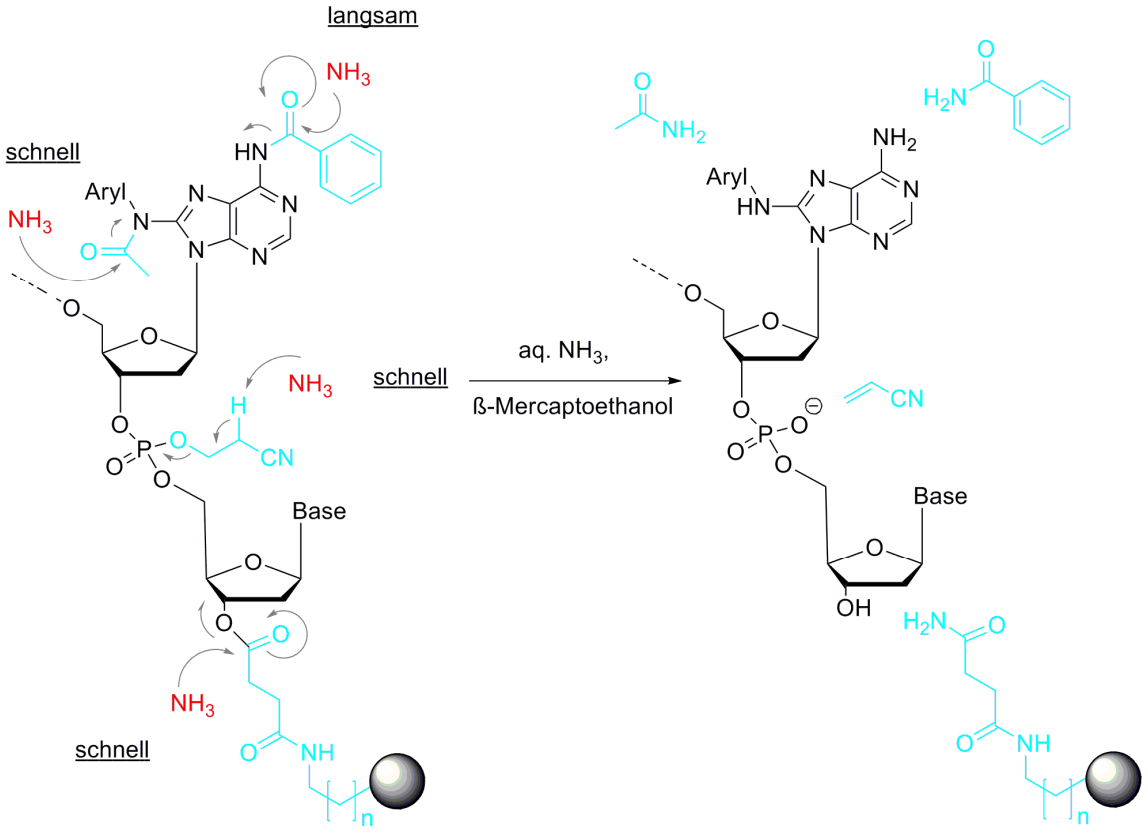


Abb. 76: Abspaltung der Schutzgruppen und der festen Phase

Vorarbeiten von *Böge*[12] zeigten allerdings, dass die Acetylgruppe an der 8-Position des 2´-dGs, trotz Behandlung mit Ammoniak (25%, 4 h, 55 °C), bei der Entschützung von C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten Oligonucleotiden erhalten blieb. Zunächst sollten also auch im Fall der synthetisierten C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten 2´-dA eingebauten Oligonucleotide erste Versuche mit dem bereits bekannten Entschützungsreagenz erprobt werden. Entsprechend *Johnson et al.* findet die Entschützung mit Zugabe von ß-Mercaptoethanol statt.[89, 90] Sie beobachteten eine oxidative Ringöffnung und die Bildung von Spiroverbindungen des C8-*N*H-Aminofluoren 2´-dG Adduktes in Gegenwart von starken Basen und Sauerstoff. Die Zugabe von ß-Mercaptoethanol beugt einer oxidativen Nebenreaktion während der Entschützung vor.

<u>*Nar*I Sequenz (5´-d(CTC GGC **A**CC ATC -3´)) **104**</u>

Zunächst sollte die C8-(*N*-Acetyl)-phenyl-modifizierte *Nar*I-Sequenz 5´-d(CTC GGC [A-(C8-(*N*-Ac)-Phenyl)]CC ATC)-3´ **104a** von der festen Phase und den Schutzgruppen befreit werden. Das modifizierte Phosphoramidit **104a** wurde zunächst zu den unter Abschnitt 4.5 (S. 75) beschriebenen Bedingungen am DNA-Synthesizer in die Sequenz eingebaut. Die anschließende Entschützung wurde in 1 mL NH_4OH (25%) und 17.4 µL ß-Mercaptoethanol als Zusatz für 2 h bei 55 °C im Thermomixer durchgeführt. Abb. 77 zeigt das HPLC-Chromatogramm des Rohgemisches des modifizierten Oligonucleotids **104a**.

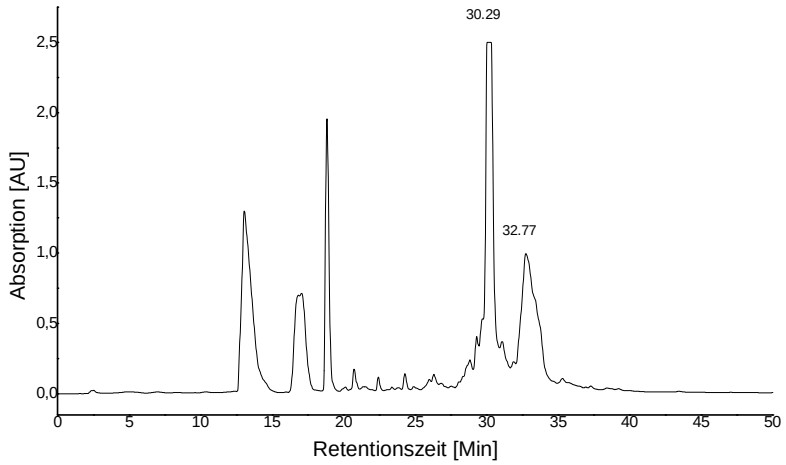


Abb. 77: Rohgemisch des C8-(*N*-Ac)-phenyl-modifizierten Oligonucleotids **104a** nach der Entschützung mit Ammoniak für 2 h bei 55 °C

In dem Bereich zwischen 13 und 20 Minuten kommen zunächst diverse Abbruchstränge und Verunreinigungen von der Säule. Bei 30.29 Minuten und bei 32.77 Minuten sind zwei weitere Banden zu erkennen, wobei nur das Signal bei 30.29 Minuten bei 260 nm absorbiert.

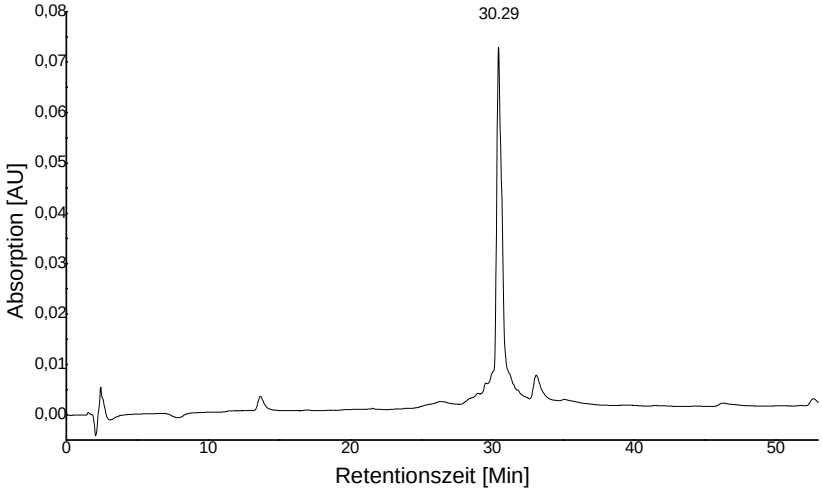


Abb. 78: Isoliertes und gereinigtes, modifiziertes Oligonucleotid 5´-d(CTC GGC [A-(C8-*N*H-Phenyl)]CC ATC)-3´ **104b**

Um eine Zuordnung der einzelnen isolierten Oligonucleotidbanden ermöglichen zu können, müssen diese konzentriert und massenspektrometrisch analysiert werden. Das gereinigte Oligonucleotid wurde in einer 50 pmolaren Konzentration zur ESI-Messung verdünnt und in der analytischen Abteilung am Institut für Organische Chemie vermessen (Abb. 79, 80, S. 79).

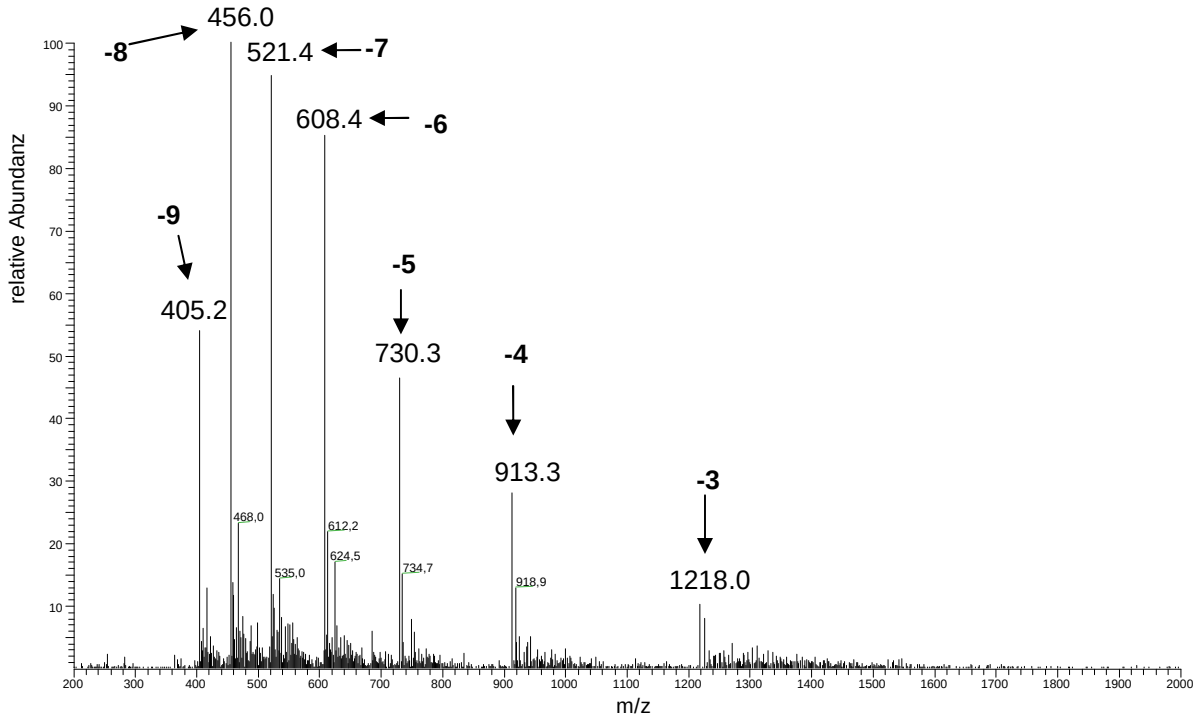
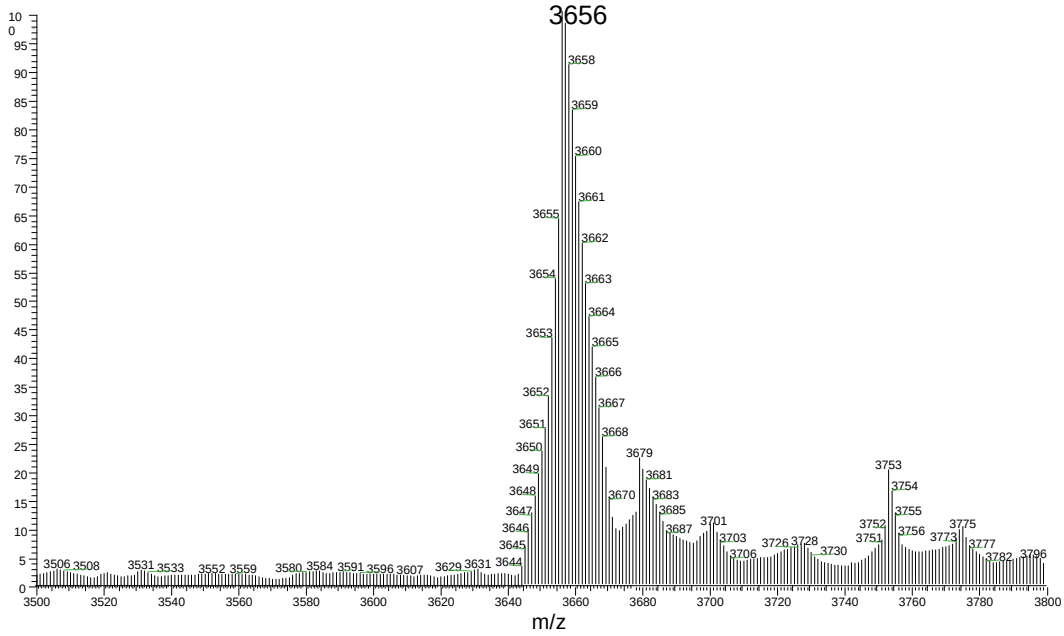


Abb. 79: ESI$^-$-Spektrum des Oligonucleotids 5´-d(CTC GGC [A-(C8-*N*H-Phenyl)]CC ATC)-3´



104b

Abb. 80: Aufsummiertes ESI$^-$-Spektrum des Oligonucleotids 5´-d(CTC GGC [A-(C8-*N*H-Phenyl)]CC ATC)-3´ **104b**

Das ESI⁻-Massenspektrum zeigt die Masse 3656.0, somit handelte es sich um das C8-*N*H-Phenyl-modifizierte Oligonucleotid **104b** und nicht um das gewünschte C8-(*N*-acetylierte) Oligonucleotid **104a**. Offensichtlich ist eine Entschützung mit Ammoniak für 2 h bei 55 ℃ nicht geeignet, um die A cetylgruppe erhalten zu können. Aus diesem Grund erfolgte ein zweiter Entschützungsversuch, unter den gleichen Reaktionsbedingungen, aber nur für 15 Minuten bei 55 ℃ (Abb. 81).

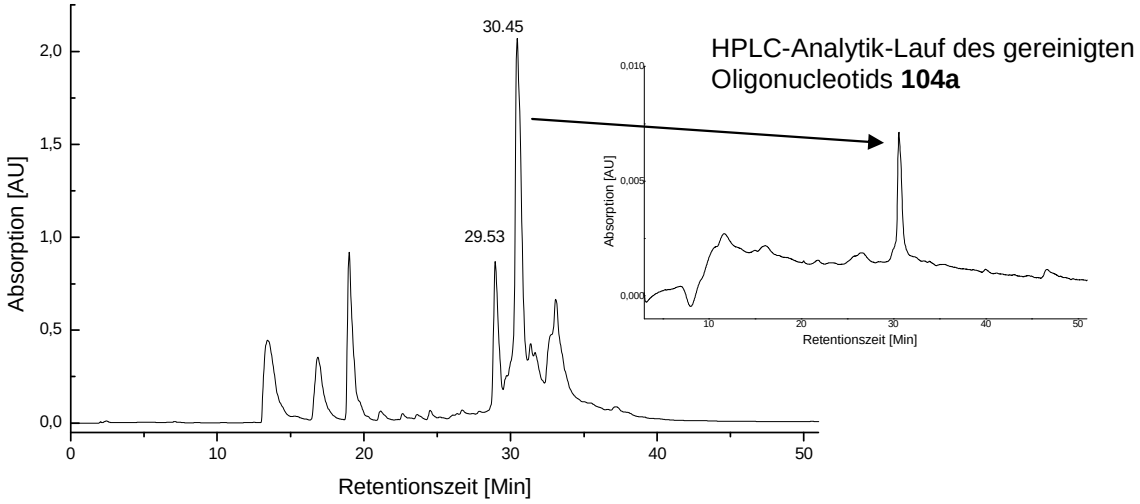


Abb. 81: Rohgemisch des C8-(*N*-Ac)-phenyl-modifizierten Oligonucleotids 5´-d(CTC GGC [A-(C8-(*N*-Ac)-Phenyl)]CC ATC)-3´ **104a** nach der Entschützung mit Ammoniak für 15 Minuten bei 55℃

Auch dieses HPLC-Chromatogramm (Abb. 81) zeigt bereits das charakteristische Signal bei 30.45 Minuten des C8-(*N*H-Phenyl)-modifizierten Oligonucleotids **104b**. Das verkleinerte Chromatogramm innerhalb der Abbildung 81 zeigt den Analytiklauf des gereinigten Oligonucleotids. Aufgrund der geringen aufgetragenen Menge ist die Basislinie schwankend, daraus ergibt sich aber kein Messfehler. Allerdings zeigte das Roh-HPLC-Chromatogramm ein weiteres Signal bei 29.53 Minuten, welches das gewünschte *N*-acetylierte Oligonucleotid **104a**, aufgrund seiner Retentionszeit, sein könnte. Da sich die beiden Oligonucleotide in einer Acetylgruppe unterscheiden, wird aufgrund der Trennung an einer RP-Säule das Signal des *N*-acetylierten Oligonucleotids **104a** vor dem Signal des unacetylierten Oligonucleotids **104b** erwartet. Die massenspektrometrischen Messungen lieferten für das Signal bei 29.53 Minuten jedoch keine Ergebnisse. Dieses kann allerdings aufgrund der geringen Menge des Oligonucleotids durchaus möglich sein.

Sollte bereits hier das gewünschte *N*-acetylierte Oligonucleotid **104a** entstanden sein, so muss die Methode soweit optimiert werden, dass das gewünschte Oligonucleotid in ausreichender Menge für die anschließenden Untersuchungen vorhanden ist. Bei der Entschützung für 15 Minuten bei 55 °C konnte erneut lediglich das C8-(*N*H-Phenyl)-modifizierte Oligonucleotid **104b** isoliert und massenspektrometrisch zugeordnet werden.

Möglicherweise liegt das Problem nicht bei der Entschützung mit Ammoniak, sondern bei der gewählten Temperatur. Aus diesem Grund sollten die Entschützungsreaktionen erneut mit Ammoniak, allerdings bei Raumtemperatur für 3 h, 6 h und 24 h stattfinden.

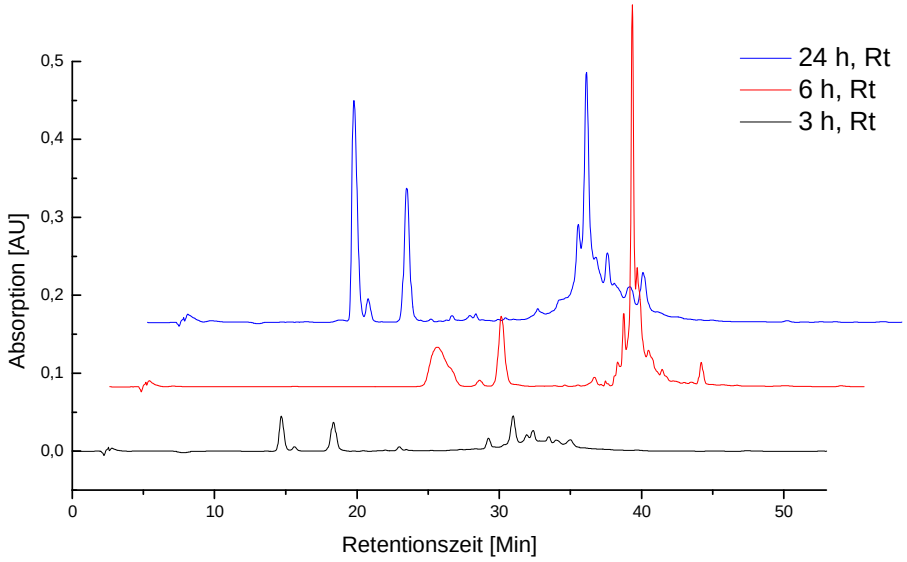


Abb. 82: Rohgemisch des C8-(*N*-Ac)-phenyl-modifizierten Oligonucleotids 5´-d(CTC GGC [A-(C8-(*N*-Ac)-Phenyl)]CC ATC)-3´ **104a** nach der Entschützung mit Ammoniak bei Raumtemperatur für 3 h - 24 h

Das HPLC-Chromatogramm in Abbildung 82 zeigt deutlich, dass eine Entschützung für 3 h mit Ammoniak zu kurz ist, um eine vollständige Abspaltung der Schutzgruppen zu bewirken. Es sind nur wenig scharfe Banden und auch nur in minimaler Menge entstanden. Bei einer Reaktionszeit von 6 h wiederum ist ganz deutlich ein scharfes Signal bei ca. 36 Minuten zu erkennen. Die Verschiebung der Retentionszeiten wird durch Druckschwankungen hervorgerufen. Allerdings spielt die Verschiebung bei der Auswertung der Analytikläufe keine Rolle. Die Entschützung für 24 h zeigte ein ähnliches Spektrum wie das für 6 h.

Auch diese Chromatogramme zeigen ein kleines Signal vor dem intensiven Oligonucleotid-Signal, allerdings konnte auch zu diesen keine Aussagen mittels MS-Analysen über ihre Identitäten gemacht werden.
Abbildung 83 zeigt das gereinigte und isolierte Oligonucleotid.

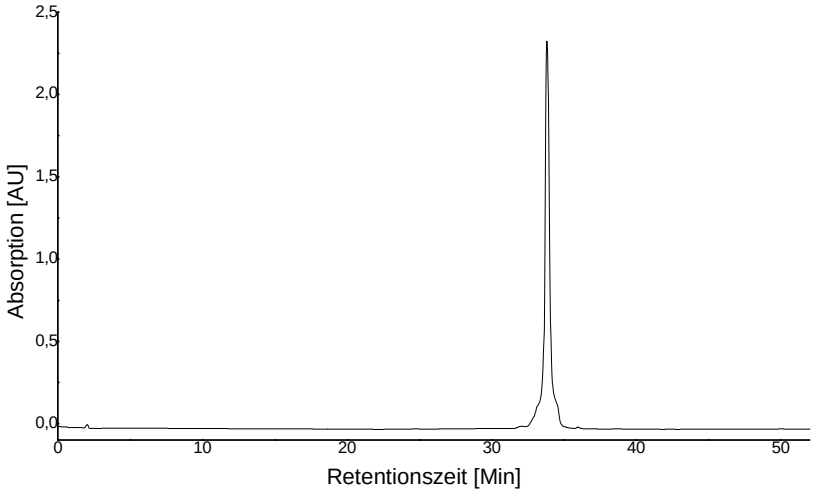


Abb. 83: Isoliertes und gereinigtes modifiziertes Oligonucleotid
5´-d(CTC GGC [A-(C8-*N*H-Phenyl)]CC ATC)-3´ **104b**

Das gereinigte Oligonucleotid hatte erneut die Masse der C8-(*N*H-Phenyl)-Modifikation. Somit konnte die Acetylgruppe in keinem der mit Ammoniak (25%) getesteten Entschützungen erhalten bleiben bzw. massenspektrometrisch analysiert und zugeordnet werden. Tabelle 10 zeigt noch einmal zusammenfassend die bisherige Entschützungsreihe mit Ammoniak (25%).

Entschützung	Reagenzien	Zeit	Temperatur
a	NH_4OH (25%), ß-Mercaptoethanol	2 h	55 ℃
b	NH_4OH (25%), ß-Mercaptoethanol	15 Min.	55 ℃
c	NH_4OH (25%), ß-Mercaptoethanol	3 h	Rt
d	NH_4OH (25%), ß-Mercaptoethanol	6 h	Rt
e	NH_4OH (25%), ß-Mercaptoethanol	24 h	Rt

Tab. 10: Zusammenfassung der Entschützungsreihe mit Ammoniak

Da die Entschützungsreihe mit Ammoniak nicht erfolgreich war, wurde nach alternativen Entschützungsmethoden gesucht.

Zhou und *Romano* lieferten erste Ergebnisse, die sich mit dem Einbau *N*-acetylierter Phosphoramidite beschäftigten, allerdings auch wieder mit 2´-Desoxyguanosin-Derivaten.[61, 62] Sie gründeten ihre Arbeit auf Fmoc-geschützte Phosphoramidite, damit nach der Festphasensynthese eine milde Entschützung folgen und die Acetylgruppe erhalten bleiben konnte. Um Fmoc abspalten zu können, verwendeten sie Piperidin in Methanol (1:9) und ließen die Entschützung bei Raumtemperatur über Nacht ablaufen. Die Entschützung verlief vollständig und die *N*-Acetylgruppe wurde erhalten. Der Nachteil an dieser von *Zhou* und *Romano* entwickelten Route ist allerdings, dass Fmoc-geschützte Phosphoramidite kommerziell nicht erhältlich sind und somit alle für die Festphasensynthese benötigten Reagenzien manuell synthetisiert werden müssten. Aus diesem Grund ist dieser Weg sehr zeitintensiv und hatte sich gegenüber den kommerziell erhältlichen Phosphoramiditen nie durchgesetzt.

Unabhängig von der hier nicht verwendeten Fmoc-Schutzgruppe sollte Piperidin in Methanol trotzdem als Entschützungsreagenz getestet werden. Hierfür wurde die Entschützung unmittelbar nach der Festphasensynthese in Piperidin/Methanol (1:9 v/v) und ß-Mercaptoethanol für 16 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Das HPLC-Chromatogramm in Abb. 84 zeigt das Roh-Oligonucleotid.

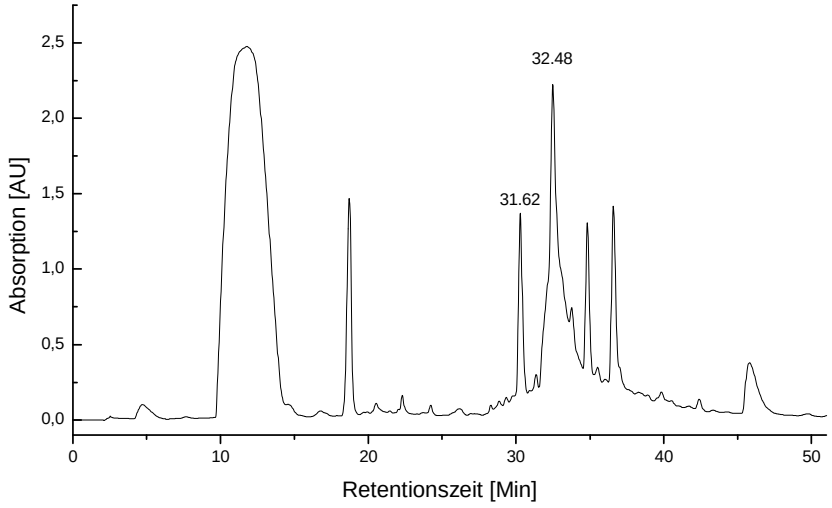


Abb. 84: Rohgemisch des C8-(*N*-Ac)-phenyl-modifizierten Oligonucleotids 5´-d(CTC GGC [A-(C8-(*N*-Ac)-Phenyl)]CC ATC)-3´ **104a** nach der Entschützung mit Piperidin/Methanol (1:9 v/v) bei Raumtemperatur über Nacht

Auffällig ist die breite Bande zwischen 10 und 15 Minuten. Unter diesem Bereich befinden sich erneut unterschiedliche Fragmente und Abbruchstränge. Somit kann hier die These aufgestellt werden, dass möglicherweise bei dieser Entschützung ein Großteil des ursprünglichen Oligonucleotids bricht. Bei keinem der vorher verwendeten Entschützungen wurden so große Abbruchstränge erhalten. Auch hier konnte nur das Signal bei 32.48 Minuten mit einer Absorption bei 260 nm wieder als C8-(*N*H-Phenyl)-modifiziertes Oligonucleotid **104b** identifiziert und isoliert werden. Wieder zeigte sich das Signal bei 31.62 Minuten, welcher von der Verschiebung auf das gewünschte *N*-acetylierte Oligonucleotid **104a** hindeutet. Allerdings konnten auch hier keine massenspektrometrischen Aussagen über dessen Identität gemacht werden. Die Fmoc-Entschützungsstrategie von *Zhou* und *Romano*[61, 62] eignet sich in diesem Fall nicht.

Eine weitere bereits bekannte Entschützungsmethode ist die „Ultra Mild“ Methode von *Gillet* und *Schärer*[64]. Sie verwenden für >24mere (24 h, 55 °C) und für < 24mere (12 h, 55 °C) Di *iso*propylamin in Methanol (1:20 v/v). Werden die pH-Werte der bekannten und teilweise auch schon verwendeten Entschützungsreagenzien verglichen, so zeigt die Ammoniaklösung einen pH-Wert von 12.79 und die DIPA-Lösung einen bei 11.88 liegenden geringeren pH-Wert.

Die erste Entschützung gemäß der „Ultra Mild“ Methode erfolgte zunächst mit 10% DIPA in MeOH, erneut unter Zusatz von ß-Mercaptoethanol für 4 h bei 55 °C und anschließend für 16 h bei Raumtemperatur. Auf diesem Weg wurde gleichzeitig die Abhängigkeit von der Temperatur überprüft (Abb. 85).

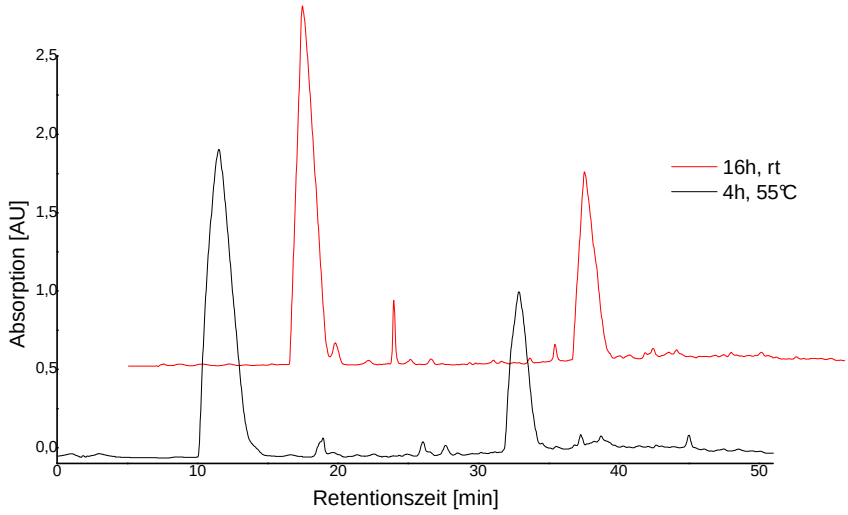


Abb. 85: Rohgemisch des C8-(*N*-Ac)-phenyl-modifizierten Oligonucleotids 5´-d(CTC GGC [A-(C8-(*N*-Ac)-Phenyl)]CC ATC)-3´ **104a** nach der „Ultra Mild“ Entschützung

Erstaunlicherweise spielte die Temperatur in diesem Fall keine Rolle, denn die beiden HPLC-Chromatogramme sahen nahezu identisch aus. Es gibt eine sehr große Bande zwischen 10 und 15 Minuten, wobei dieser vermutlich wieder die entstandenen Abbruchfragmente enthält und ein weiteres breites Signal bei ca. 33 Minuten. Beim Versuch dieses Signal zu isolieren, konnte nur dessen Zerfall beobachtet werden.

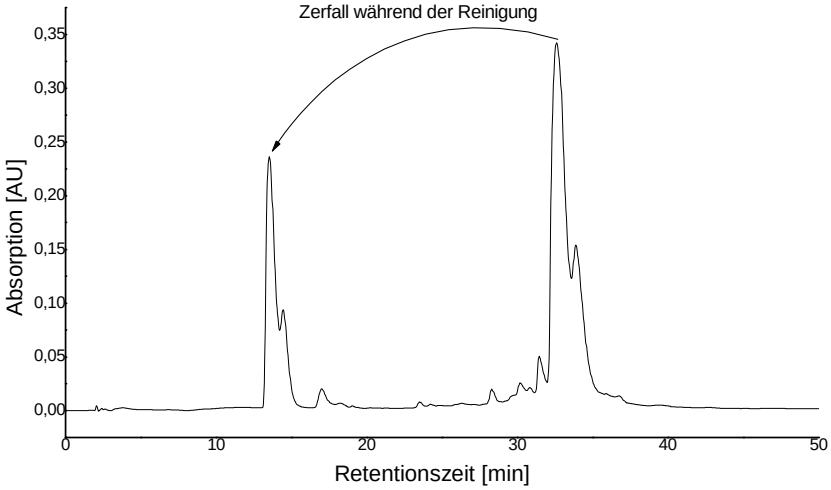


Abb. 86: Reinigung des C8-(*N*-Ac)-phenyl-modifizierten Oligonucleotids 5´-d(CTC GGC [A-(C8-(*N*-Ac)-Phenyl)]CC ATC)-3´ **104b**

Die massenspektrometrische Analyse lieferte keine Ergebnisse, die die Identität der Signale aufdeckte und enthielt auch nicht die typische Aufspaltungsreihe der Oligonucleotide. In diesem Fall, in Kombination mit den Standardreagenzien, konnte die „Ultra Mild“ Methode nicht erfolgreich angewendet werden.

Da die bisherigen Entschützungsmethoden versagt hatten, sollte zunächst ein Vergleich der einzelnen Methoden, beginnend mit der Festphasensynthese, stattfinden. Zusätzlich wurde auch die neu eingeführte „Tac-Chemie“ mit der *tert*Butylphenoxyacetyl-Schutzgruppe in Betracht gezogen, da diese speziell für basenlabile Modifikationen entwickelt wurde und bezogen auf die industrielle Verwendung, die „Pac-Chemie“ ersetzt (Tab. 11, S. 86).

	„Ultra Mild“ DNA Synthese	Fmoc Strategie	„Tac-Chemie“ *(tert-Butylphenoxyacetyl)*	Phosphoramidit Methode
feste Phase	Hydrochinon	CPG	CPG	CPG
Phosphoramidite	dT, dC^{Ac}, dA^{Pac}, dG^{iPrPac} (in CH_3CN)	dT, dC^{Fmoc}, dA^{Fmoc}, dG^{Fmoc} (in CH_2Cl_2)	dT, dA^{Tac}, dC^{Tac}, dG^{Tac} (in CH_3CN)	dT, dA^{Bz}, dG^{dmf}, dC^{Ac} (in CH_3CN)
Modifikation	*i*PrPac geschützt (in CH_2Cl_2)	Fmoc geschützt	Tac geschützt	Bz geschützt (in CH_3CN)
Kupplungszeit	12 Min.	11 Min.	keine Angabe	12 Min.
Aktivator	5-(Ethylthio)-1H-tetrazol (in CH_3CN)	3-8% 5-Methyl-thiotetrazol (in CH_3CN)	keine Angabe	DCI (in CH_3CN)
Oxidationsreagenz	I_2 (0.1 M in THF/Pyridin/H_2O)	aq. Iod	keine Angabe	I_2 (0.1 M in THF/Pyridin/H_2O)
Capping A	*i*PrPac Anhydrid (0.5 M in THF)	Essigsäureanhydrid, 4-DMAP	Tac_2O in THF	Essigsäureanhydrid in THF
Capping B	1-Methylimidazol (2M in THF)	keine Angabe	keine Angabe	1-Methylimidazol in THF/Pyridin
Deblock	DCA (3% in CH_2Cl_2)	DCA (5% in CH_2Cl_2)	keine Angabe	TCA
Entschützung	iPr_2NH/MeOH (1:20 v/v), 0.25 M ß-Mercaptoethanol 12 h, 55 ℃	Piperidin:MeOH (1:9 v/v) 0.25 M ß-Mercaptoethanol, Rt, 36 h oder 55 ℃ für 15 h	25% NH_3 in H_2O mit 40% aq. Methylamin oder 25% NH_3 in H_2O 0.25 M ß-Mercaptoethanol, 2 h bei Rt, oder 15 Min. bei 55 ℃	25% NH_3 in H_2O, 0.25 M ß-Mercaptoethanol, 4 h bei 45 ℃ oder 2 h bei 55℃

Tab. 11: Im Synthesizer verwendete Reagenzien

Tabelle 11 zeigt, dass in der Regel die Verwendung von CPG-Succinyl-Linkern bevorzugt wird. Da die bisherigen Kupplungsergebnisse sehr gut waren, sollte dieser Faktor auch nicht geändert werden. Der naheliegendste Vergleich bei den verwendeten Schutzgruppen erfolgt zwischen der Phosphoramidit-Methode und der „Ultra Mild“ Methode. Unterschiede bestehen lediglich bei den für 2´-dA- und 2´-dG-verwendeten Schutzgruppen. Bei früheren Arbeiten[47] wurden bereits Pac-geschützte 2´-dA und 2´-dG Phosphoramidite verwendet, somit waren diese für erste Arbeiten bereits vorhanden.

Ein mögliches Problem könnte das modifizierte Phosphoramidit darstellen, denn dieses trägt eine Benzoylschutzgruppe statt der hier verwendeten Pac-Gruppe. Allerdings verlief die Darstellung der Pac-geschützten Derivate im Fall der Synthese der C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten Phosphoramidite nicht erfolgreich (Abschnitt 4.1, S. 37), weshalb auf die Verwendung der Benzoylgruppe hier nicht verzichtet werden kann.

Aus diesem Grund sollten für die nächsten Kupplungsversuche dT, dC^{Ac}, dG^{iPrPac} und dA^{Pac} als Kupplungsreagenzien verwendet werden. Lediglich die modifizierte Base sollte weiterhin die Benzoylschutzgruppe tragen. Die Kupplungszeiten sind in allen Fällen nahezu gleich und sollten für eine hohe Kupplungsausbeute auch beibehalten werden. Ein weiterer Unterschied ist der verwendete Aktivator. Die Fmoc-Strategie und die „Ultra Mild“ Methode verwenden Tetrazol. Da Tetrazol explosiv ist, wurde weiterhin mit dem sicheren DCI verfahren. Aufgrund der neu verwendeten Pac-Schutzgruppen sollte möglicherweise als Capping A Reagenz nicht mehr Essigsäureanhydrid verwendet werden. Hier kann auch eine Acetylierung als Nebenreaktion innerhalb des Kupplungszyklus im Synthesizer ausgeschlossen werden. Die „Tac-Chemie“ bietet hier eine schnelle und günstige Variante mit Tac_2O. Da ^{iPr}Pac-Anhydrid nicht erhältlich war, sollte ein Versuch mit Tac_2O erfolgen. Das Oxidationsmittel, das Capping B Reagenz und die Deblock-Lösung konnten, wie bisher, beibehalten werden. Die Entschützung sollte nun, angepasst an die Pac-Schutzgruppen, erneut nach der „Ultra Mild“ Methode erfolgen, allerdings abweichend von den ersten nicht erfolgreichen, bereits beschriebenen Versuchen (S. 82 - 85).

Als nächstes erfolgte erneut der Einbau des N^6-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-phenyl-modifizierten Phosphoramidits **96a** unter Verwendung der neuen Bedingungen. Der Einbau erfolgte mit sehr guten Ausbeuten von 98%. Die Entschützung sollte mit unterschiedlichen Konzentrationen an DIPA in Methanol und DIPA in Wasser erfolgen. Weiterhin sollten auch die Entschützungstemperatur und die Entschützungszeiten variiert werden.

Zunächst sollte eine Konzentration von 10% DIPA in MeOH bei Raumtemperatur und 55 ℃ für 14 h getestet werden. Zusätzlich sollten auch niedrigere Konzentrationen von 5% - 1% erprobt werden.

Tabelle 12 zeigt die zunächst erprobten Entschützungsbedingungen.

Entschützung	Reagenzien	Zeit	Temperatur
A	10% DIPA in MeOH, ß-Merc.	14h	55 ℃
B	10% DIPA in MeOH, ß-Merc.	14h	Rt
C	5% DIPA in MeOH, ß-Merc.	14h	55 ℃
D	5% DIPA in MeOH, ß-Merc.	14h	Rt
E	5% DIPA in MeOH, ß-Merc.	5h	55 ℃
F	2% DIPA in MeOH, ß-Merc.	15h	55 ℃
G	1% DIPA in MeOH, ß-Merc.	15h	55 ℃

Tab. 12: Testreihe zur Entschützung in Anlehnung an die “Ultra Mild” Methode

Zunächst wurden die Varianten **A-D** mit 5% bzw. 10% DIPA in MeOH für 14 h bei Raumtemperatur und 55 ℃ getestet (Abb. 87).

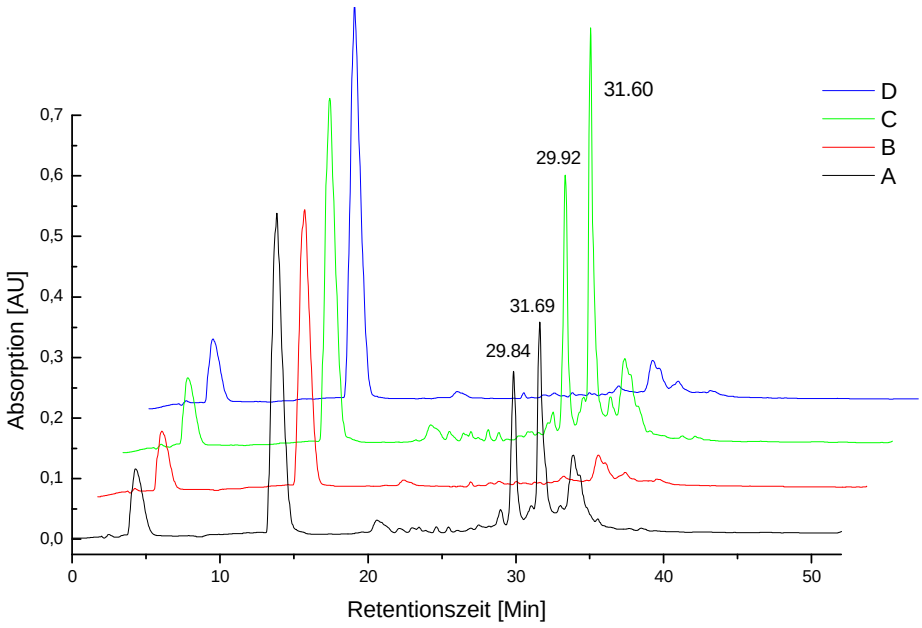


Abb. 87: Rohgemisch des C8-(*N*-Ac)-phenyl-modifizierten Oligonucleotids 5´-d(CTC GGC [A-(C8-(*N*-Ac)-Phenyl)]CC ATC)-3´ **104a**

Das in Abb. 87 (S. 88) dargestellte HPLC-Chromatogramm zeigt, dass bei Raumtemperatur keine Entschützung stattfindet (**B** und **D**). Wiederum sehen die Entschützungen bei 55 ℃ (**A** und **C**), unabhängig von der Konzentration der Entschützungslösung, ähnlich gut aus, mit zwei scharfen Oligonucleotid-Signalen, wobei auch beide bei 260 nm absorbieren.

Abbildung 88 zeigt die isolierten und gereinigten Oligonucleotide mit einer starken Verschiebung des Chromatogramms nach rechts.

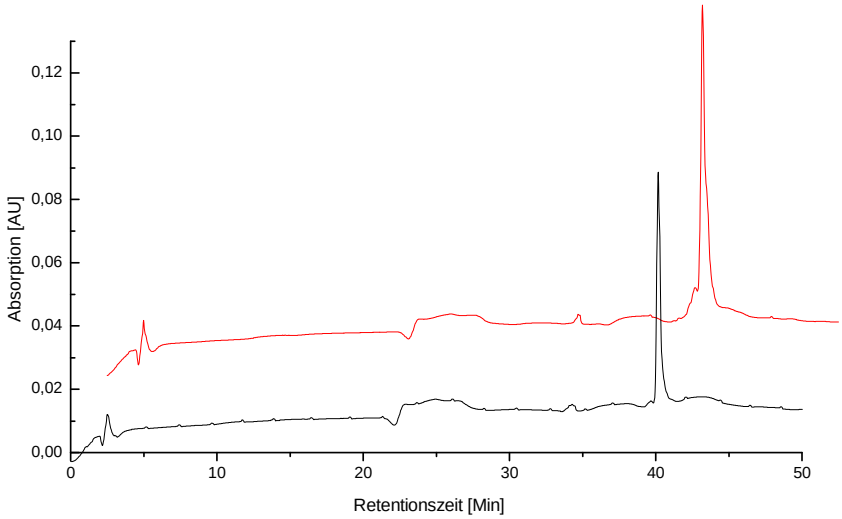


Abb. 88: Gereinigte und isolierte Oligonucleotide **104a** und **104b** aus den Testreihen **A** und **C**

Aufgrund einiger Messschwierigkeiten war es im Folgenden nicht möglich, ESI$^-$-MS zu messen. Aus diesem Grund musste eine alternative Methode gefunden werden, um die Oligonucleotide identifizieren zu können. Die nächste Möglichkeit war es, MALDI-TOF-Messungen zu testen, allerdings musste hier zunächst die Auswahl der richtigen Matrix erfolgen. Das Kriterium für eine kompatible Matrix ist die Möglichkeit der Cokristallisation mit der Probe, damit diese gut vermessen werden kann. Getestet wurden CCA (α-Cyano-4-hydroxyzimtsäure), DHB (2,5-Dihydroxybenzoesäure), ATT (6-Aza-2-thiothymin), THAP (2,4,6-Trihydroxyacetophenon) und HPA (3-Hydroxypicolinsäure). Nur mit HPA als Matrix konnte die Oligonucleotidprobe erfolgreich vermessen werden. Zuerst wurden Tests mit dem unmodifiziertem *Nar*I-Oligonucleotid durchgeführt, um die geeignete Matrix zu finden (Abb. 89, S. 90).

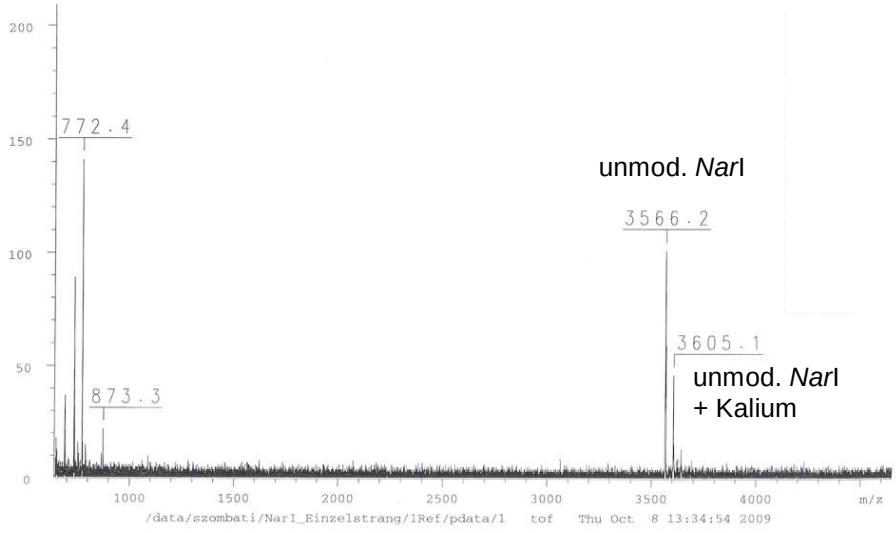


Abb. 89: MALDI-TOF Massenspektrum des unmodifizierten *Nar*I-Stranges **104**

Da diese Messung gut funktionierte, sollten nun die beiden modifizierten, gereinigten und isolierten Oligonucleotide vermessen werden. Auch diese wurden in einer 50 pmol/2 µL Konzentration auf 1 µL vorgelegte Matrix aufgetragen und ca. 2 h bei Raumtemperatur an der Luft zum Cokristallisieren stehen gelassen.

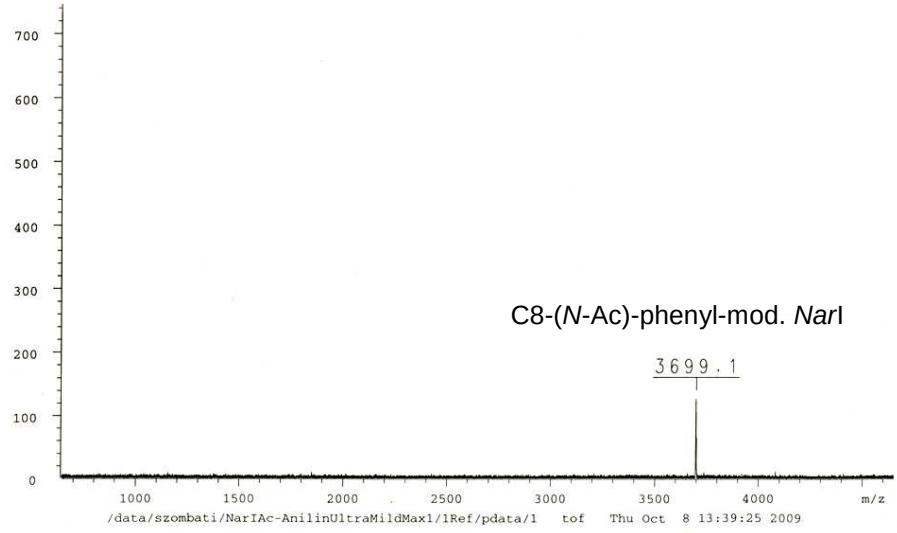


Abb. 90: MALDI-TOF Massenspektrum des modifizierten Oligonucleotids
5´-d(CTC GGC [A-(C8-(*N*-Ac)-Phenyl)]CC ATC)-3´ **104a**

Abbildung 90 zeigt das MALDI-TOF Massenspektrum des ersten isolierten Oligonucleotides bei einer Retentionszeit von ca. 29.9 Minuten (Abb. 87, S. 88).

Hier ist die Masse von 3699.1 zu sehen, welche der exakten Masse des gewünschten C8-(*N*-Acetyl)-phenyl-modifizierten Oligonucleotids **104a** entspricht.
Somit ist zum ersten Mal gelungen, dieses C8-(*N*-Acetyl)-phenyl-modifizierte Oligonucleotid **104a** als Pendant zu den bisher synthetisierten *N*-acetylierten 2´-dG Derivaten zu erhalten.
Da das Roh-Chromatogramm (Abb. 87, S. 88) zwei Signale mit einer Absorption von 260 nm zeigte, sollte auch das zweite Oligonucleotid identifiziert werden (Abb. 91).

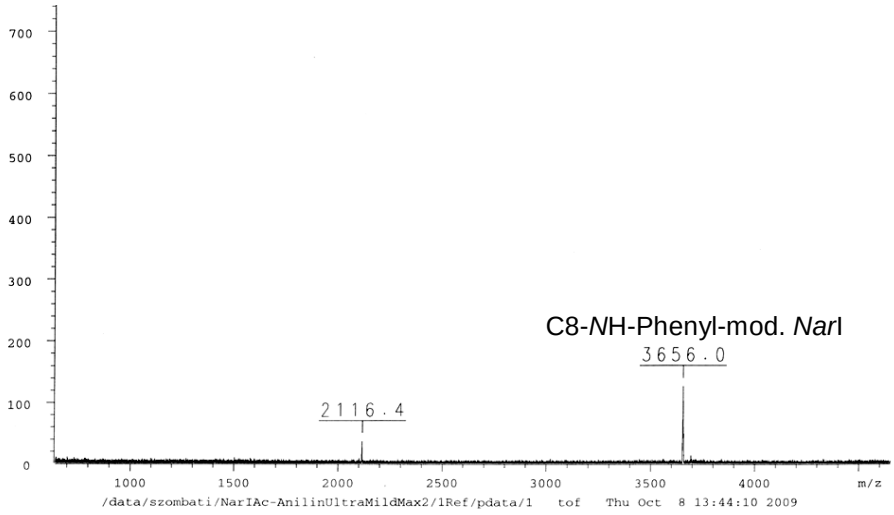


Abb. 91: MALDI-TOF Massenspektrum des modifizierten Oligonucleotids 5´-d(CTC GGC [A-(C8-*N*H-Phenyl)]CC ATC)-3´ **104b**

Abbildung 91 zeigt die Masse des C8-(*N*H-Phenyl)-modifizierten Oligonucleotids **104b**, 3656.0. Somit konnten durch die Verwendung von 10% bzw. 5% DIPA in MeOH für 14 h bei 55 °C gleichzeitig das *N*-acetylierte und das unacetylierte Oligonucleotid **104a**, **b** erhalten werden. Wiederum stellt der Erhalt beider Oligonucleotide einen weiteren Vorteil bei der Charakterisierung und Überprüfung der Eigenschaften bezüglich T_m-Wert und CD-Spektroskopie dar. In diesem Fall kann mit einer Synthese gleichzeitig der Zugang zu beiden Oligonucleotiden erreicht werden. Diese können direkt bei den jeweiligen folgenden Untersuchungen nicht nur mit der unmodifizierten Referenz, sondern auch direkt miteinander verglichen werden.

Um zu überprüfen, ob möglicherweise eine kürzere Reaktionszeit zum alleinigen Erhalt des gewünschten *N*-acetylierten Oligonucleotids führt, wurde die Entschützung mit 5 % DIPA in MeOH für 5 h bei 55 ℃ durchgeführt (s. Tab. 12, S. 88, Versuch **E**).

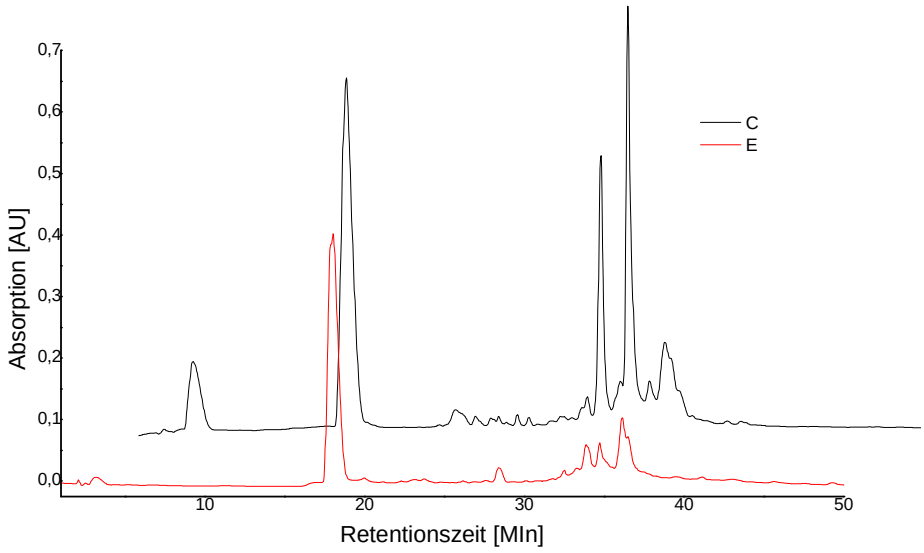


Abb. 92: Rohgemisch des C8-(*N*-Ac)-phenyl-modifizierten Oligonucleotids 5´-d(CTC GGC [A-(C8-(*N*-Ac)-Phenyl)]CC ATC)-3´ **104a** nach der Entschützung **E** im Vergleich zur Entschützung **C**

Abbildung 92 zeigt den Vergleich zwischen dem Rohgemisch des C8-(*N*-Acetyl)-phenyl-modifizierten Oligonucleotids 5´-d(CTC GGC [A-(C8-(*N*-Ac)-Phenyl)]CC ATC)-3´ **104a** nach der Entschützung E mit 5% DIPA in MeOH für 5 h bei 55 ℃ und der Entschützung **C** mit 5% DIPA in MeOH für 14 h bei 55 ℃. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Entschützung nach dieser Zeit noch nicht vollständig abgelaufen ist und somit die Reaktion über Nacht für eine vollständige Entschützung notwendig ist.

Als letzte Variation sollte noch erprobt werden, ob eine geringere Konzentration des Entschützungsreagenzes auch zum gewünschten Ergebnis führt. Dazu wurden 2% und 1% DIPA in MeOH für 15 h bei 55 ℃ verwendet (Abb. 93, S. 93).

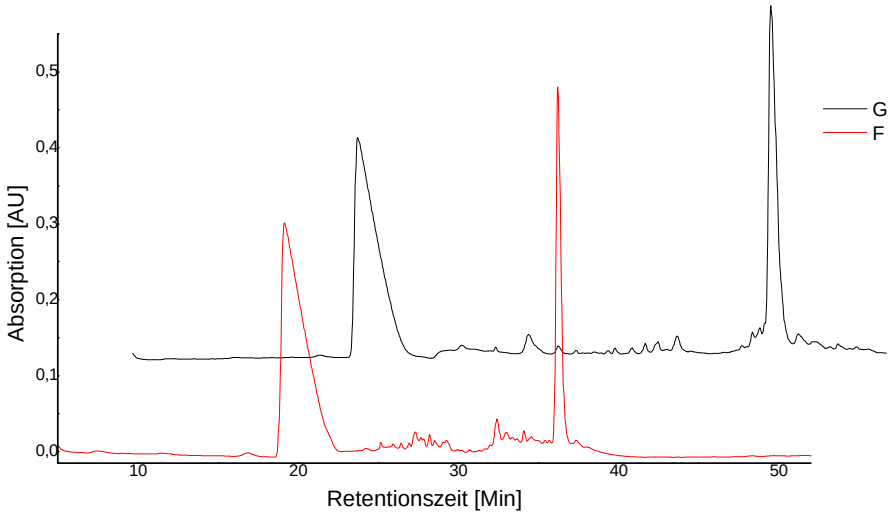


Abb. 93: Rohgemisch des C8-(*N*-Ac)-phenyl-modifizierten Oligonucleotids 5´-d(CTC GGC [A-(C8-(*N*-Ac)-Phenyl)]CC ATC)-3´ **104a** nach der Entschützung **F** im Vergleich zur Entschützung **G**

Abbildung 93 zeigt den Vergleich zwischen dem Rohgemisch nach der Entschützung **F** und der Entschützung **G**. Auffällig ist erneut die breite Bande, dieses Mal bei ca. 20 Minuten und damit auch wieder die starke Verschiebung nach rechts aufgrund des schwankenden Säulendruckes in der HPLC. Das einzige scharfe Signal deutet zwar, trotz der Verschiebung, auf das gewünschte Oligonucleotid hin, aber die MALDI-TOF-Massenanalyse ergab lediglich eine Masse von 1884.6, die keinem Fragment zugeordnet werden konnte. Somit lieferte die Entschützung mit 2% und 1% DIPA und die anschließende Massenspektrometrie keine näheren Aussagen über das entstandene Oligonucleotid. Da es sich nicht um das gewünschte Oligonucleotid handelte, wurde diese Optimierung nicht weiterverfolgt.

Da die Entschützung bei der Phosphoramiditmethode mit Ammoniak/Wasser am Besten funktioniert, sollte auch noch ein letzter Versuch mit DIPA in Wasser statt DIPA in MeOH gestartet werden.

Entschützung	Reagenzien	Zeit	Temperatur
H	5% DIPA in H_2O, ß-Merc.	15 h	55 ℃
I	10% DIPA in H_2O, ß-Merc.	15 h	55 ℃
J	20% DIPA in H_2O, ß-Merc.	15 h	55 ℃
K	25% DIPA in MeOH, ß-Merc.	15 h	55 ℃
L	25% DIPA in MeOH, ß-Merc.	15 h	55 ℃

Tab. 13: Testreihe zur Entschützung in Anlehnung an die „Ultra Mild“ Methode

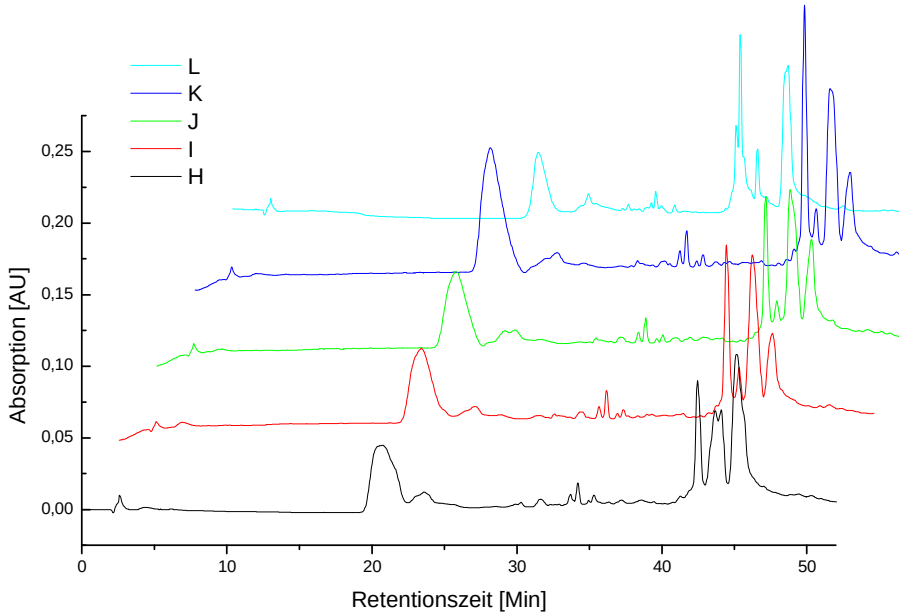


Abb. 94: Rohgemisch des C8-(*N*-Ac)-phenyl-modifizierten Oligonucleotids 5´-d(CTC GGC [A-(C8-(*N*H-Ac)-Phenyl)]CC ATC)-3´ **104a** nach den Entschützungen **H** bis **L**

Das Roh-Chromatogramm in Abb. 94 zeigt erneut die bereits bekannte Verschiebung nach rechts, die aber nicht relevant für die Auswertung und Reinigung der Oligonucleotide ist. Die Entschützungen mit 10%, 20% und 25% sehen sich sehr ähnlich, während die Entschützung mit 5% noch unvollständig wirkt.

Weiterhin wurde auch eine Entschützung mit 25% DIPA in Wasser, aber nur für 5 h bei 55 °C, erprobt. Auch hier scheint nicht das gewünschte Oligonucleotid entstanden zu sein. Allerdings brachten die massenspektrometrischen Analysen keine Informationen über die entstandenen Oligonucleotide. Somit können an dieser Stelle keine Aussagen getroffen werden, ob das gewünschte *N*-acetylierte Oligonucleotid entstanden ist oder nicht. Werden diese Testreihe und die zuvor durchgeführten Testreihen **A-D** verglichen, so wird deutlich, dass die Verwendung von MeOH für eine erfolgreiche Entschützung in Kombination mit DIPA notwendig ist. Da aber bereits eine erfolgreiche Entschützungsmethode erarbeitet wurde, sollte ab jetzt mit diesem Verfahren versucht werden, weitere C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierte Oligonucleotide zu erhalten und sie zu charakterisieren.

Als nächstes erfolgte der Einbau von N^6-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-3,5-dimethylphenyl-5´-*O*-dimethoxytriphenyl-3´-*O*-(*N*,*N*-di*iso*propylamino)-cyanoethylphosphit-2´-dA **84d**.

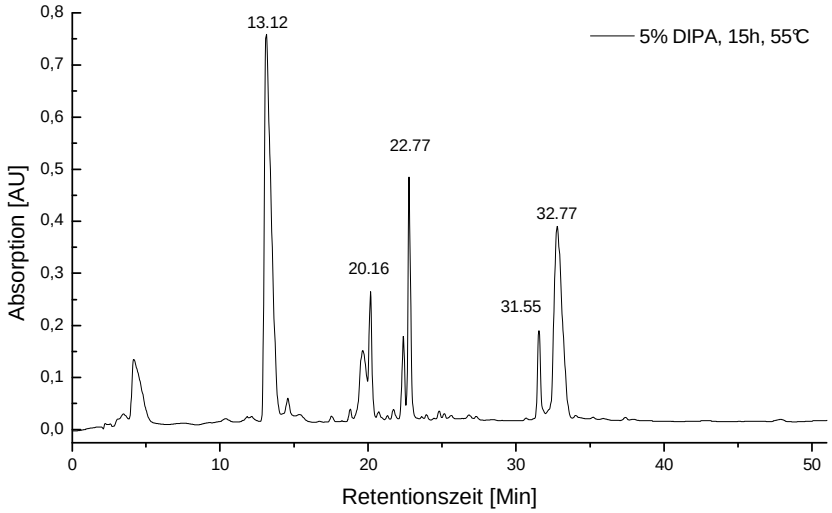


Abb. 95: Rohgemisch des C8-(*N*-Ac)-3,5-dimethylphenyl-modifizierten Oligonucleotids 5´-d(CTC GGC [A-(C8-(*N*-Ac)-3,5-dimethylphenyl)]CC ATC)-3´ **104c** nach der Entschützung mit 10% DIPA in MeOH

Das erste Maximum bei 13.12 Minuten ist wieder der Abbruchstrang, der jede Entschützung begleitet. Ob dieser bereits im Synthesizer, direkt bei der Entschützung oder erst bei der HPLC-Trennung entsteht, lässt sich nicht sagen. Das zweite Maximum bei 20.16 Minuten ist das 5mer 3´-d(CTA CC)-5´. Das bedeutet, der Strangbruch erfolgte direkt an der Position vor der Modifikation. Das dritte Maximum bei 22.77 Minuten konnte als 6mer ohne Modifikation isoliert werden. Die beiden Maxima bei 31.55 und 32.77 Minuten ergaben das gewünschte *N*-acetylierte **104c** und das nicht acetylierte Oligonucleotid **104d**. Auffällig hierbei sind die bisher nicht vorgekommenen Abbruchstränge bei ca. 20 Minuten, welche lediglich das 5mer und das 6mer ohne Modifikation enthielten. Offensichtlich erfolgte hierbei ein Strangbruch, der an dieser Stelle noch nicht näher begründet werden kann.

Weiterhin wurde auch der Einbau mit N^6-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-4-methoxyphenyl-5´-*O*-dimethoxytriphenyl-3´-*O*-(*N*,*N*-di*iso*propylamino)-cyanoethylphosphit-2´-dA **84b** **d**urchgeführt (Abb. 96).

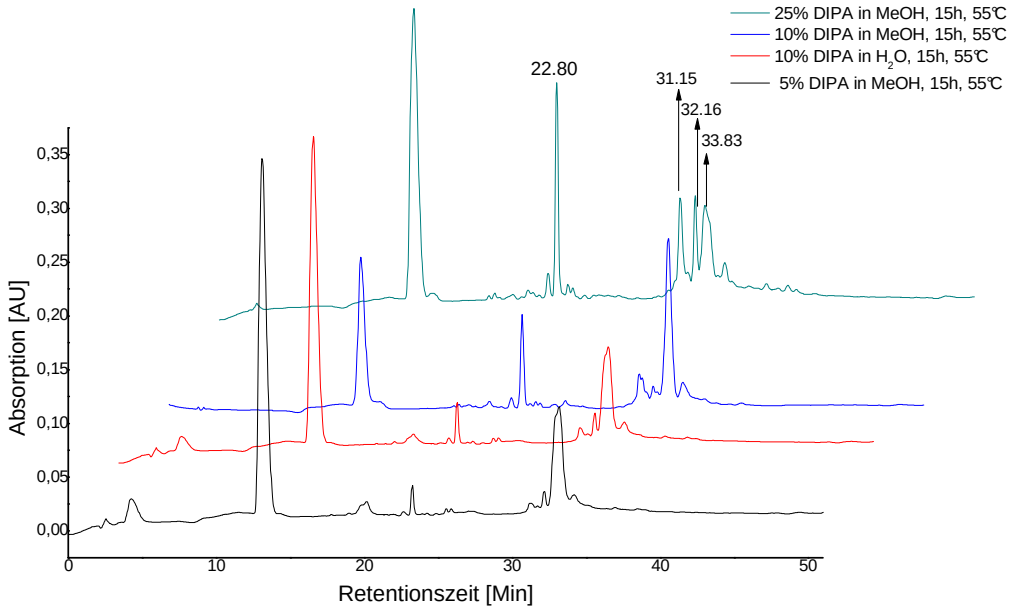


Abb. 96: Rohgemisch des C8-(*N*-Ac)-4-methoxyphenyl-modifizierten Oligonucleotids 5´-d(CTC GGC [A-(C8-(*N*-Ac)-4-methoxyphenyl)]CC ATC)-3´ **104e** nach der Entschützung mit DIPA in MeOH

Abbildung 96 zeigt die Chromatogramme nach der Entschützung bei 55 ℃ für 15 h mit 5%, 10% und 25% DIPA. Ein deutlicher Unterschied im Vergleich zu den anderen Chromatogrammen ist nur bei der Entschützung mit 25% DIPA in MeOH zu erkennen. Dieses zeigt deutlich ein Maximum bei 22.80 Minuten, welches auch hier erneut das 5mer 3´-d(CTA CC)-5´ darstellt. Dieses wird mit zunehmender DIPA-Konzentration immer größer, was darauf hindeutet, dass das vollständige Oligonucleotid während der Entschützung bricht. Das Maximum bei 31.15 Minuten liefert das gewünschte C8-(*N*-Ac)-4-methoxyphenyl-modifizierte Oligonucleotid **104e**. Das Maximum bei 32.16 wiederum lieferte das C8-*N*H-4-methoxyphenyl-modifizierte Oligonucleotid **104f**. Erneut sind wieder beide Oligonucleotide und nicht nur das gewünschte *N*-acetylierte Oligonucleotid entstanden. Werden die anderen Chromatogramme betrachtet, so lässt sich überraschenderweise feststellen, dass die bisher erfolgreich verwendeten Entschützungsmethoden mit 5% bzw. 10% DIPA in diesem Fall nicht ausreichend waren. Hier musste für eine Darstellung beider gewünschten Oligonucleotide eine höhere DIPA-Konzentration gewählt werden.

Eine erfolgreiche Entschützung und Darstellung mittels dieser milden Methode ist offensichtlich vom jeweiligen Arylamin abhängig und kann nicht verallgemeinert werden.

Da die Darstellung der *N*-acetylierten monocyclischen Arylamin-modifizierten Oligonucleotide gut funktionierte, sollte auch der Einbau eines polycyclischen Derivates N^6-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-4-biphenyl-5´-*O*-dimethoxytriphenyl-3´-*O*-(*N*,*N*-di*iso*propylamino)-cyanoethylphosphit-2´-desoxyadenosin **84e** erfolgen (Abb. 97).

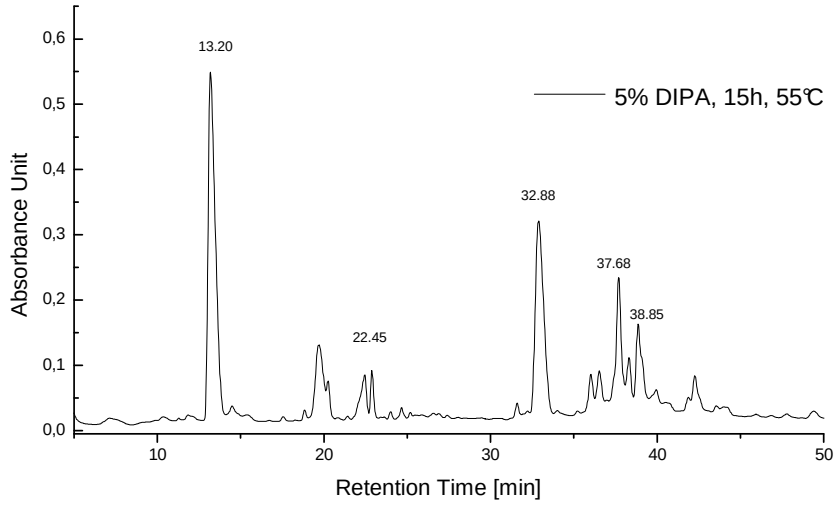


Abb. 97: Rohgemisch des C8-(*N*-Ac)-4-biphenyl-modifizierten Oligonucleotids 5´-d(CTC GGC [A-(C8-(*N*-Ac)-4-biphenyl)]CC ATC)-3´ **104g** nach der Entschützung mit 5% DIPA in MeOH

Erneut handelte es sich beim zweiten Maximum bei 22.45 Minuten um das bereits bekannte 5mer, allerdings auch hier, bei der Verwendung von nur 5% DIPA in minimaler Ausbeute. Diese Tatsache bestätigt die bereits vermutete These, dass die Menge des Abbruchstranges mit der Konzentration des Entschützungsreagenzes DIPA zusammenhängt. Das dritte und vierte Maximum konnten nicht zugeordnet werden, während wiederum die massenspektrometrische Messung beim letzten Maximum bei 38.85 Minuten das 10mer ergab. Es stellt sich die Frage, wieso hier nur Fragmente isolierbar waren und auch nur bis zum 10mer, aber kein vollständiges 12mer-Oligonucleotid erhalten werden konnte. Irreführend ist auch die extrem starke Verschiebung nach rechts, denn unter normalen Umständen würde das 10mer eher in einem Bereich von 28 Minuten auftreten.

Da die *N*-acetylierten Phosphoramidite labil sind und sich bereits bei der Lagerung im Gefrierschrank nach einiger Zeit zersetzen, sollte überprüft werden, ob eine Entschützung mit einem frisch synthetisierten Phosphoramidit womöglich besser läuft. Erneut wurde eine Entschützungsreihe gestartet. So konnten auch gleichzeitig abweichende Bedingungen bei den polycyclischen Modifikationen beobachtet und analysiert werden (Abb. 98).

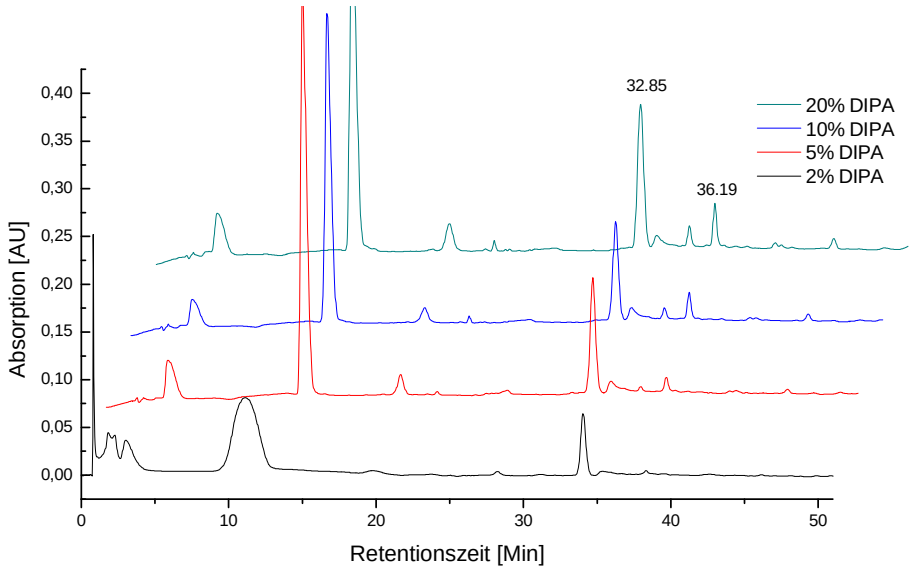


Abb. 98: Rohgemisch des frisch synthetisierten C8-(*N*-Ac)-4-biphenyl-modifizierten Oligonucleotids 5´-d(CTCGGC [A-(C8-(*N*-Ac)-4-biphenyl)]CC ATC)-3´ **104g** nach der Entschützung mit DIPA

Bei dem eingebauten, zuvor frisch synthetisierten Phosphoramidit ist ein deutlicher Unterschied zu den bisherigen HPLC-Chromatogrammen zu erkennen. Hier wurde die Entschützung mit 2%, 5%, 10% und 20% DIPA in MeOH bei 55 ℃ für 15 h durchgeführt. Erneut sind nur Fragmente und das C8-(*N*H-4-Biphenyl)-modifizierte Oligonucleotid **104h** bei 32.85 Minuten entstanden (Abb. 99, S. 99). Interessanterweise ist hier überhaupt kein Oligonucleotid-Signal, welches dem acetyliertem Oligonucleotid entsprechen würde, zu sehen. Möglicherweise war die Reaktionszeit über Nacht in diesem Fall zu lang. Die bisherigen Ergebnisse sprechen für Komplikationen in der Kombination eines polycyclischen Arylamins mit einer Acetylgruppe.

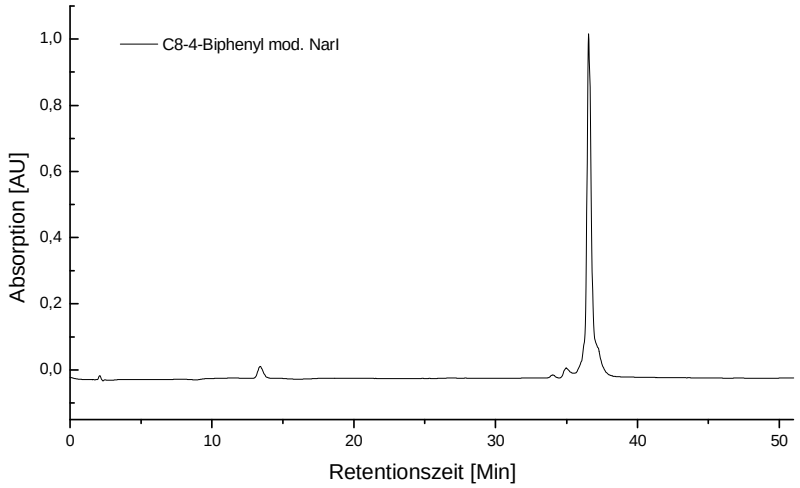


Abb. 99: Isoliertes und gereinigtes C8-(*N*H-4-biphenyl)-modifiziertes Oligonucleotid 5´-d(CTC GGC [A(C8-*N*H-4-biphenyl)]CC ATC)-3´ **104h**

Um auszuschließen, dass eine zu lange Reaktionszeit für den Verlust der Acetylgruppe verantwortlich war, wurden alle bisher getesteten Entschützungsreagenzien auf dieses C8-(*N*-Ac)-4-biphenyl-modifizierte Oligonucleotid **104g** nochmals angewendet. Eine Verkürzung der Reaktionszeit lieferte keine brauchbaren Ergebnisse, da bei der Kombination von DIPA in MeOH definitiv eine längere Reaktionszeit benötigt wird (s. Entschützung **E**, S. 88).

Offensichtlich ist die Darstellung der *N*-acetylierten, polycyclischen Arylamin-modifizierten Oligonucleotide an andere Bedingungen geknüpft. Da die „Ultra Mild“ Methode hier keine Erfolge lieferte, wurde erneut auf die bereits erprobten Varianten mit Ammoniak zurückgegriffen. In Hinblick auf die stets entstandenen kleinen Signale und die Möglichkeit, dass dieses Signal das jeweilig gewünschte *N*-acetylierte Oligonucleotid lieferte, erfolgten weitere Entschützungsversuche zu ähnlichen Bedingungen. Tabelle 14 zeigt die erprobten Entschützungsbedingungen.

Entschützung	Reagenzien	Zeit	Temperatur
M	25% NH_4OH, ß-Merc.	0.5 h	45 ℃
N	10% NH_4OH, ß-Merc.	2 h	45 ℃

Tab. 14: Testreihe zur Entschützung in Anlehnung an die „Ultra Mild“ Methode

Abb. 100 zeigt die Entschützungen mit Ammoniak im Fall des C8-(*N*-Ac)-4-biphenyl-modifizierten Oligonucleotids **104g**.

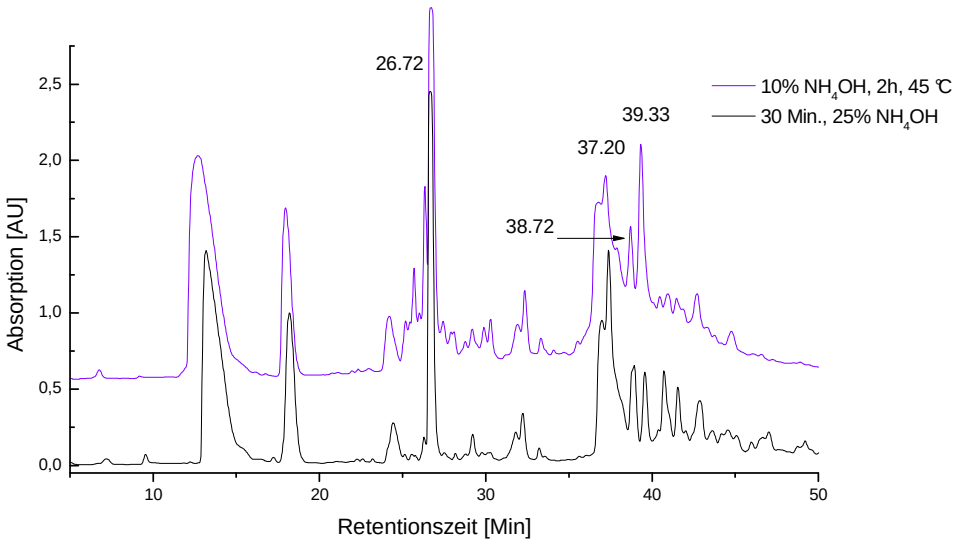


Abb. 100: Rohgemisch des C8-(*N*-Ac)-4-biphenyl-modifizierten Oligonucleotids 5´-d(CTCGGC [A-(C8-(*N*-Ac)-4-biphenyl)]CC ATC)-3´ **104g** nach der Entschützung **M** und **N**

Versuch **M** zur Entschützung mittels Ammoniak-Lösung wurde für 0.5 h bei 45 °C durchgeführt (schwarzes Chromatogramm). Versuch **N** erfolgte wiederum mit einer verdünnten 10%igen Lösung für 2 h bei ebenfalls 45 °C (lila Chromatogramm). Unterschiede sind lediglich in dem Bereich (25 - 35 Minuten) des Abbruchstranges (5 mer bei 26.72 Minuten) zu erkennen. Bei der Behandlung mit der 10%igen Lösung sind deutlich mehr Verunreinigungen zu beobachten als bei der Behandlung mit der 25%igen Lösung. Dafür ist das Entstehen der beiden Oligonucleotide **104g**, **h** bei der Behandlung mit der 10%igen Lösung deutlicher zu erkennen. Das *N*-acetylierte Oligonucleotid **104g** hat eine Retentionszeit von 38.72 Minuten und das unacetylierte Oligonucleotid **104h** von 39.33 Minuten. Tatsächlich ist in Abbildung 101 auch sehr gut die Veränderung des Verhältnisses der beiden gewünschten Oligonucleotide in Abhängigkeit von der Entschützungszeit zu erkennen. Nach bereits 2 h ist nur noch halb so viel *N*-acetyliertes Oligonucleotid vorhanden wie unacetyliertes. Allerdings ist zu keinem Zeitpunkt mehr *N*-acetyliertes **104g** als unacetyliertes Produkt **104h** vorhanden. Eine längere Entschützung führt in diesem Fall lediglich zum Abbau der Acetylgruppe und somit nicht zum gewünschten Oligonucleotid **104g**.

Tatsächlich konnte mittels einer Ammoniak-Entschützung (10%, 2 h) das C8-(*N*-Ac)-4-biphenyl-modifizierte Oligonucleotid 5´-d(CTC GGC [A-(C8-(*N*-Ac)-4-biphenyl)]CC ATC)-3´ erhalten und auf seine Eigenschaften untersucht werden.
Tab. 15 zeigt eine Zusammenfassung der Oligonucleotide der *NarI*-Sequenz **104**.

Oligonucleotid	Modifikation
104	5´-d(CTC GGC ACC ATC)-3´
104a	5´-d(CTC GGC **A**(C8-*N*-Ac-phenyl)CC ATC)-3´
104b	5´-d(CTC GGC **A**(C8-*N*H-Phenyl)CC ATC)-3´
104c	5´-d(CTC GGC **A**(C8-*N*-Ac-3,5-dimethylphenyl)CC ATC)-3´
104d	5´-d(CTC GGC **A**(C8-*N*H-3,5-Dimethylphenyl)CC ATC)-3´
104e	5´-d(CTC GGC **A**(C8-*N*-Ac-4-methoxyphenyl)CC ATC)-3´
104f	5´-d(CTC GGC **A**(C8-*N*H-4-Methoxyphenyl)CC ATC)-3´
104g	5´-d(CTC GGC **A**(C8-*N*-Ac-4-biphenyl)CC ATC)-3´
104h	5´-d(CTC GGC **A**(C8-*N*H-Biphenyl)CC ATC)-3´

Tab. 15: Zusammenfassung der Oligonucleotide der *Nar*I-Sequenz **104**

EcoRI-Sequenz (5´-d(GT**A** G**A**A TTC TAC)-3´) **105**

Bei der EcoRI-Sequenz handelt es sich um eine selbstkomplementäre (palindrome) Sequenz, welche die Erkennungssequenz (5´-d(GAA TTC)-3´) für das EcoRI-Enzym (Restriktionsendonuclease) beinhaltet.[91] Mittels Restriktion kann der Strang somit zu den entsprechenden Tetra- bzw. Octameren mit `sticky-ends` abgebaut werden (Abb. 101).

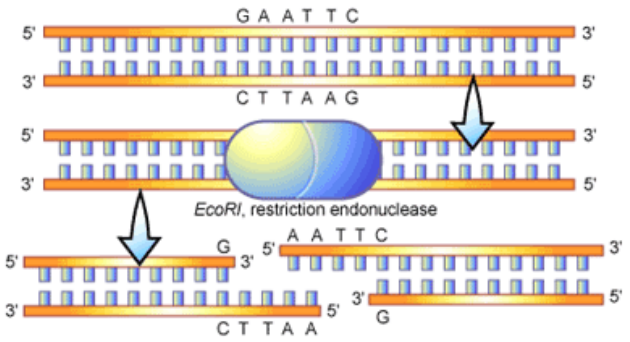


Abb. 101: Restriktionsabbau mittels EcoRI Endonuclease

Um den Einfluss der Modifikation auf die Restriktion durch das EcoRI-Enzym untersuchen zu können, wurden diese an unterschiedlichen Positionen, zunächst direkt an der Schnittstelle (8. Position von 3´) und anschließend außerhalb der Schnittstelle (10. Position von 3´) eingebaut.

Die optimalen experimentellen Bedingungen wurden bereits von *Böge*[12] erprobt. Er erkannte, dass die optimale Temperatur bei 23 °C und nicht, wie *Seela*[91, 92] vermutete, bei 37 °C lag. Bei dieser Temperatur kann das Enzym bereits komplett denaturiert sein. Auch ist das richtige Puffersystem (DTT-Puffer) für die Restriktion ausschlaggebend.[93, 94]

Für den Abbau wurden jeweils 0.4 OD des Oligonucleotids in 100 µL des DTT-Puffers (pH 7.5) gelöst und für 2 Minuten auf 70 °C erhitzt. Das so vorbehandelte Oligonucleotid wurde anschließend in eine Eiskühlung gegeben. Nach Abkühlen erfolgte die Inkubation mit 270 Units EcoRI-Enzym bei 23 °C. Sofort erfolgte die erste Probenentnahme als Nullwert. Nach entsprechenden Reaktionszeiten erfolgten dann weitere Entnahmen und ihre sofortigen Untersuchungen an der HPLC. Abb. 102 zeigt den Abbau des unmodifizierten Oligonucleotids.

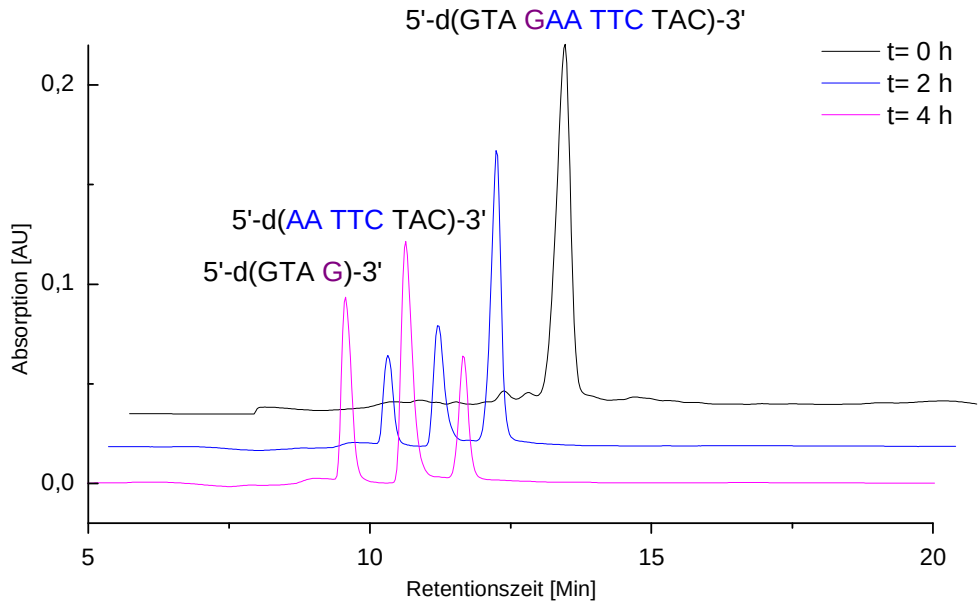


Abb. 102: Restriktionsabbau des unmodifizierten Oligonucleotids

Die Abnahme des 12mers und die Zunahme der neu gebildeten 4 und 8mere sind hier deutlich in Abhängigkeit der Inkubationszeit mit dem Enzym zu erkennen.

Mittels der auf diesem Weg erhaltenen HPLC-Chromatogramme ist es möglich, die Halbwertszeiten mit der unter dem im Experimental Teil (S. 180) angegeben Formel zu bestimmen. Die Halbwertszeit des unmodifizierten Oligonucleotids **105** in Abb. 102 beträgt 2.45 h.

Abb. 103 zeigt die Ergebnisse der Restriktion, wenn sich die Modifikation (C8-(*N*-Ac)-4-methoxyphenyl) innerhalb der Erkennungssequenz befindet.

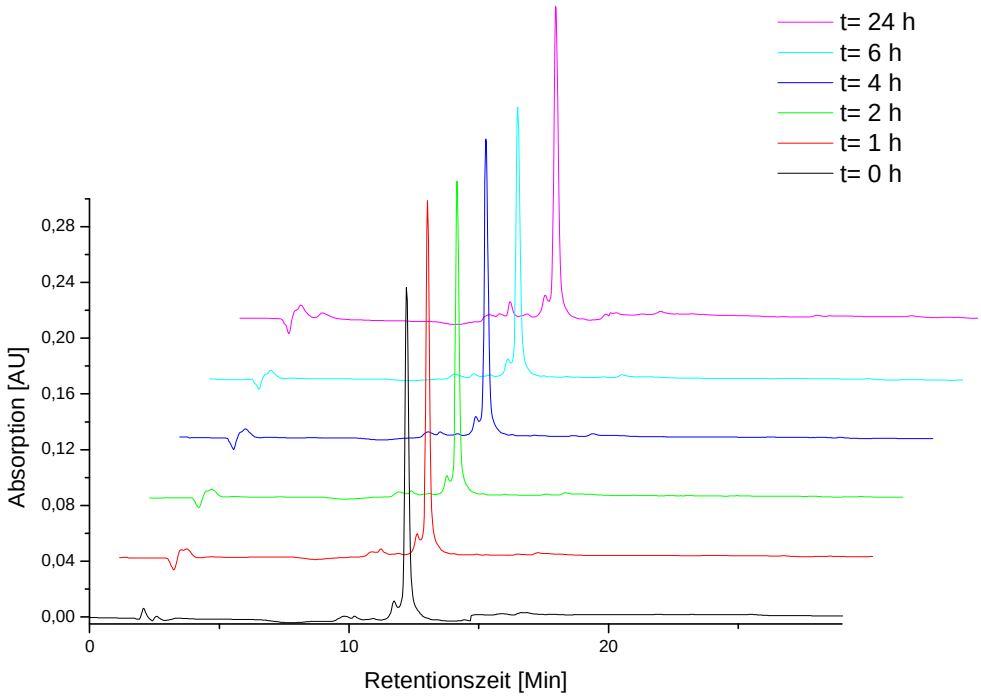


Abb. 103: EcoRI-Restriktion des C8-(*N*-Ac)-4-methoxyphenyl-modifizierten Oligonucleotids 5´-d(GTA G[A-(C8-(*N*-Ac)-4-methoxyphenyl)]A TTC TAC)-3´ **105e**

Dieses direkt an der Schnittstelle modifizierte Oligonucleotid **105e** wurde auch nach einer Inkubationszeit von 24 h nicht gespalten.

Um allgemeine Aussagen über die Auswirkungen der Modifikationen innerhalb der Schnittstelle treffen zu können, sollte auch eine polycyclische Modifikation in die Sequenz eingebaut und mittels Verdau untersucht werden. Hierfür erfolgte der Einbau des C8-(*N*-Ac)-4-biphenyl-modifizierten 2´-dA Phosphoramidits **84e** (Abb. 104, S. 104).

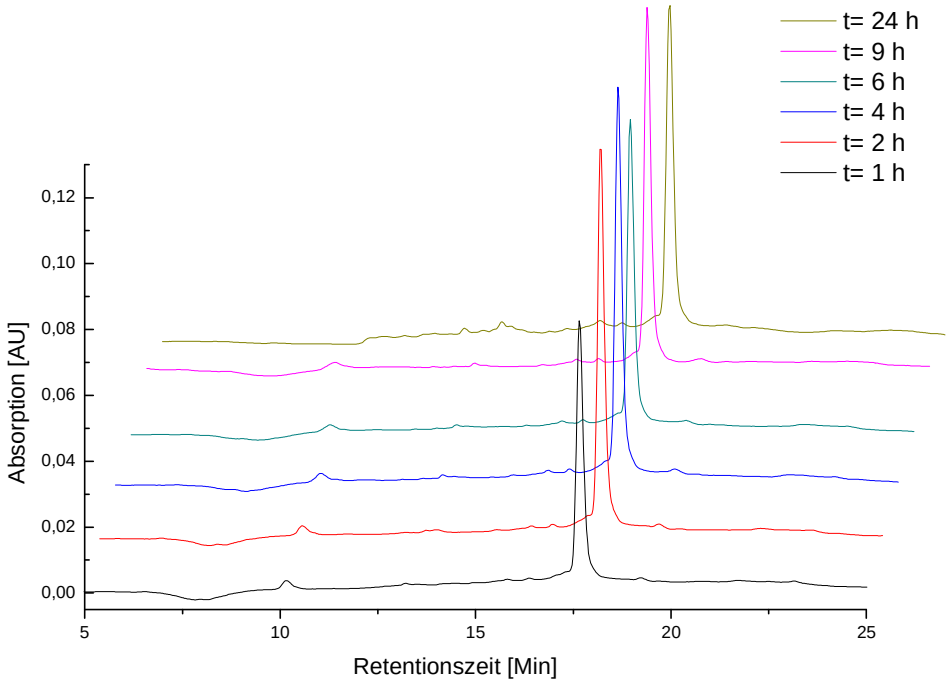


Abb. 104: EcoRI-Restriktion des C8-(*N*-Ac)-biphenyl-modifizierten Oligonucleotids 5´-d(GTA G[A-(C8-(*N*-Ac)-biphenyl)]A TTC TAC)-3´ **105g**

Auch in diesem Fall erfolgte innerhalb der Inkubationszeit kein Abbau. Da sich die Modifikation direkt an der Schnittstelle befindet, ist es wahrscheinlich, dass das EcoRI Restriktionsenzym nicht an den Oligonucleotid-Doppelstrang binden und somit den Verdau nicht durchführen kann. Diese Beobachtung ist in diesem Fall scheinbar unabhängig von der Modifikation. Ebenfalls scheint es keinen Unterschied zwischen den *N*-acetylierten und den C8-*N*H-modifizierten Derivaten zu geben. *Jacobsen*[69] beobachtete ebenfalls keinen Abbau der C8-*N*H-Arylamin-modifizierten Oligonucleotide, wenn die Modifikation innerhalb der Schnittstelle lag. Dieses führt zu dem Ergebnis, dass eine Modifikation an der Schnittstelle den Verdau behindert, da das Enzym nicht mehr mit dem Doppelstrang interagieren kann. Allerdings macht es keinen Unterschied, ob eine *N*-acetylierte mono- bzw. polycyclische oder eine unacetylierte mono- bzw. polycyclische Modifikation an dieser Stelle ist. Tab. 16 (S. 105) zeigt die Ergebnisse des EcoRI-Abbaus, wenn die Modifikation innerhalb der Erkennungssequenz liegt.

Oligonucl.	Modifikation	$\tau_{1/2}$ [h]
105	5´-d(GTA GAA TTC TAC)-3´	2.5
105a	5´-d(GTA G**A**(C8-*N*-Ac-phenyl)A TTC TAC)-3´	kein Abbau
105b	5´-d(GTA G**A**(C8-*N*H-Phenyl)A TTC TAC)-3´	kein Abbau
105e	5´-d(GTA G**A**(C8-*N*-Ac-4-methoxyphenyl)A TTC TAC)-3´	kein Abbau
105f	5´-d(GTA G**A**(C8-*N*H-Methoxyphenyl)A TTC TAC)-3´	kein Abbau
105g	5´-d(GTA G**A**(C8-*N*-Ac-4-biphenyl)A TTC TAC)-3´	kein Abbau
105h	5´-d(GTA G**A**(C8-*N*H-4-Biphenyl)A TTC TAC)-3´	kein Abbau

Tab. 16: Zusammenfassung der EcoRI Restriktionen innerhalb der Erkennungssequenz

Aus diesem Grund sollte die Modifikation in die 10. Position, außerhalb der Erkennungssequenz, eingebaut und erneut dem EcoRI-Restriktionsverdau unterworfen werden.

Um einen Vergleich zwischen dem C8-(*N*H-Phenyl)-modifizierten und dem C8-(*N*-Ac)-Phenyl-modifizierten Oligonucleotid in Bezug auf die Restriktion des EcoRI-Enzyms zu erhalten, musste zunächst der Verdau mit dem unacetylierten Oligonucleotid außerhalb der Erkennungssequenz erfolgen. Abb. 105 zeigt den Verdau von 5´-d(GT[A-(C8-*N*H-phenyl)] GAA TTC TAC)-3´ **106b**.

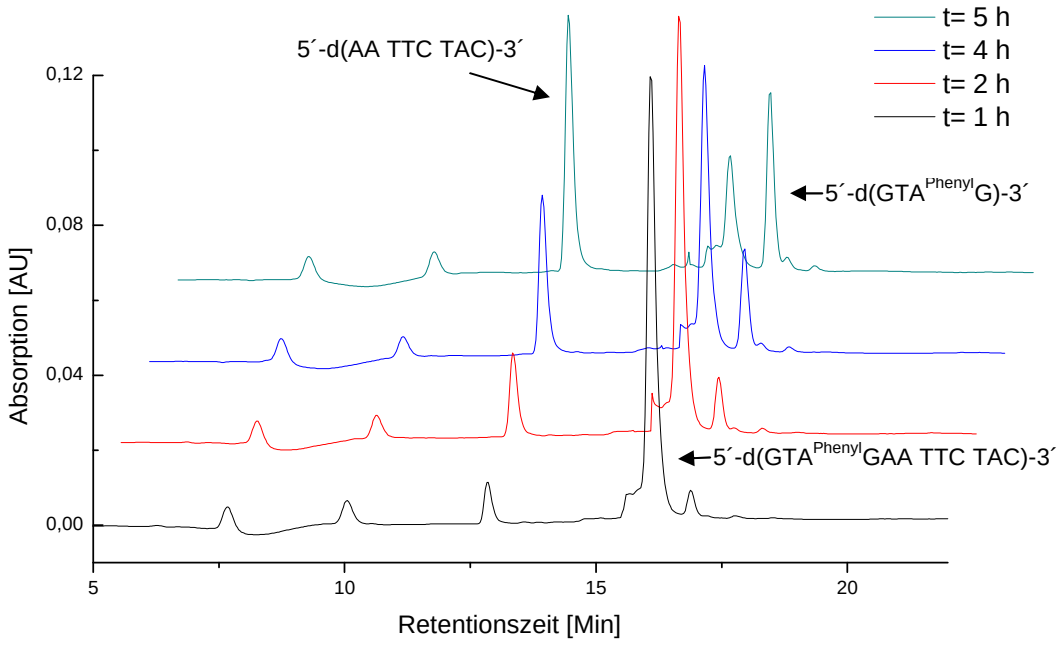


Abb. 105: EcoRI-Restriktion des C8-(*N*H-Phenyl)-modifizierten Oligonucleotids 5´-d(GT[A-C8-*N*H-Phenyl] GAA TTC TAC)-3´ **106b**

In dem in Abb. 105 (S. 105) dargestellten Chromatogramm ist deutlich die Abnahme des 12mer-Oligonucleotids **106b** zu erkennen. Gleichzeitig ist die Zunahme der entstandenen 4mer- und 8mer-Oligonucleotide zu sehen. Interessanterweise ist der Abbau nicht mit dem in Abb. 102 gezeigten Abbau des unmodifizierten Stranges identisch. Das 4mer-Oligonucleotid, welches die Modifikation beinhaltet, hat eine spätere Retentionszeit als das 8mer und das ursprüngliche 12mer-Oligonucleotid. Eine mögliche Erklärung liefert die HPLC-Trennung aufgrund der Polarität. Das 4mer beinhaltet die Modifikation und 4 negative Ladungen und wird folglich erst zu späteren Retentionszeiten von der RP-Säule eluiert.

Mittels der chromatographischen Verfolgung des Enzymabbaus ist es möglich, die Halbwertszeit für den Restriktionsabbau des C8-(*N*H-Phenyl)-modifizierten Oligonucleotids zu berechnen (Abb. 106).

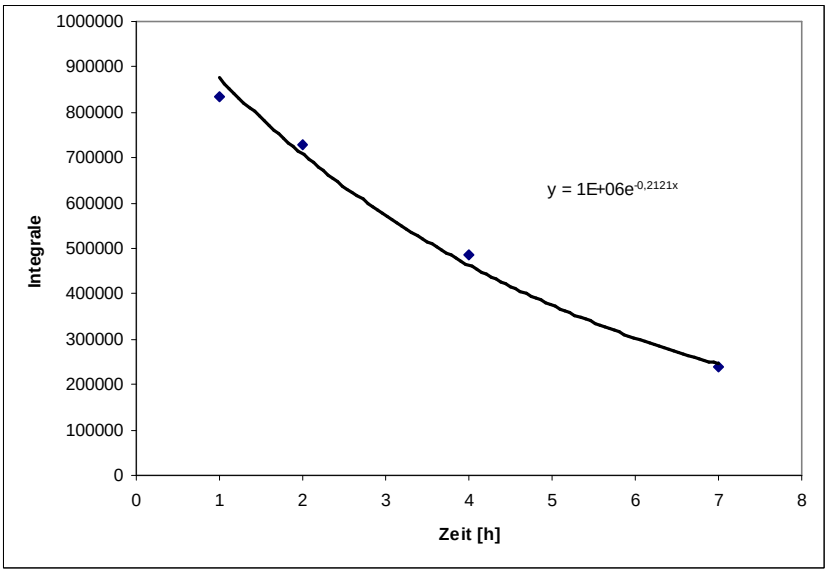


Abb. 106: Graph zur Berechnung der Halbwertszeit für **106b**

Hierbei handelt es sich um eine Reaktion 1. Ordnung, somit ist k die negative Hochzahl. Daraus ergibt sich:

$$\tau_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} = 3.27 \text{ h}$$

Die Halbwertszeit für den Abbau des C8-*N*H-Phenyl-modifizierten Oligonucleotids **106b** beträgt 3.27 h mit einem Fehler von R^2= 0.9933.

Beim Abbau des außerhalb der Schnittstelle C8-(*N*-Acetyl)-phenyl-modifizierten Oligonucleotids **106a** wird aufgrund der modifizierten Position erneut ein Abbau erwartet. Kein Abbau würde wiederum die bereits aufgestellte These (S. 21), dass *N*-acetylierte Modifikationen aufgrund ihrer *syn*-Konformation und ihrer räumlichen Auswirkungen auf den Doppelstrang schneller von Reparaturenzymen erkannt werden, unterstützen. Abbildung 107 zeigt den Verdau des Oligonucleotids **106a**.

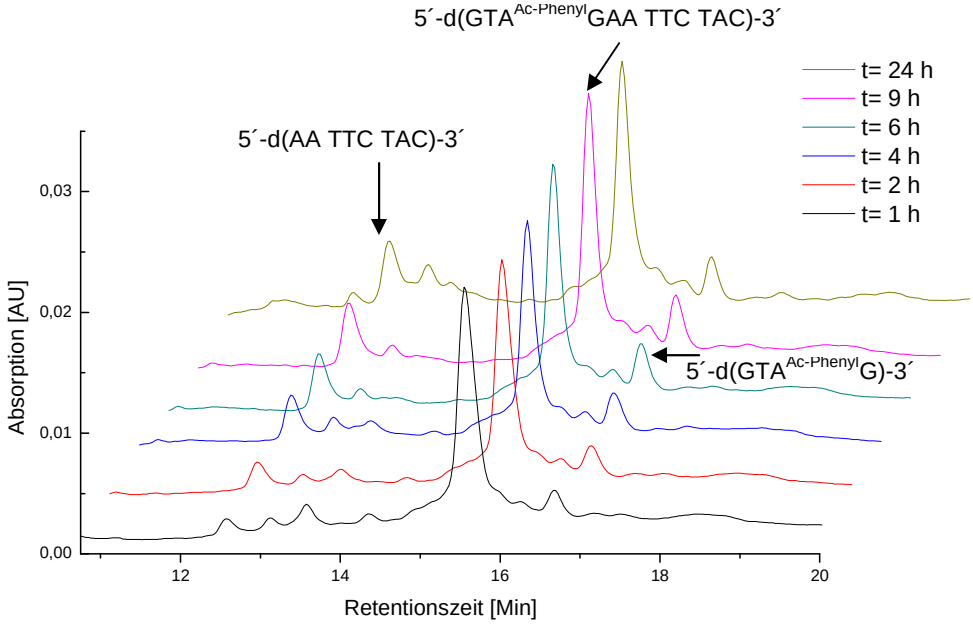


Abb. 107: EcoRI-Restriktion des C8-(*N*-Acetyl)-phenyl-modifizierten Oligonucleotids 5´-d(GT[A-C8-(*N*-Ac)-Phenyl] GA TTC TAC)-3´ **106a**

Bereits nach 1 h sind minimale Banden in dem Bereich zwischen 12 und 14 Minuten und direkt hinter dem 12mer-Oligonucleotid bei ca. 16.5 Minuten zu erkennen. Da bei dem enzymatischen Abbau nur kleine Mengen verwendet werden, ist die Basislinie häufig nicht gerade und von kleinen Schwankungen durchzogen. Vergleicht man diese Restriktion mit dem enzymatischen Abbau des C8-(*N*H-Phenyl)-modifizierten Oligonucleotids (Abb. 105, S. 105) so ist ebenfalls im Bereich von ca. 12 Minuten das erste Fragment (8mer) zu detektieren. Das 4mer-Oligonucleotid hat eine Retentionszeit unmittelbar nach dem 12mer-Oligonucleotid. Bei dem in Abb. 107 gezeigten C8-(*N*-Ac)-phenyl-modifizierten Oligonucleotid konnten diese nach dem Abbau entstandenen Fragmente massenspektrometrisch nicht identifiziert werden. Die Vermutung, dass es sich hierbei erneut um das 4mer- und 8mer-Oligonucleotid handelt, stützt sich auf die zuvor durchgeführten Experimente und den sich ähnelnden Retentionszeiten.

Nach spätestens 6 h war kein weiterer Abbau des 12mer-Oligonucleotids mehr zu erkennen. Offensichtlich war dieser verzögert. Aus diesem Grund wurde erneut nach 24 h eine weitere Probe entnommen. Interessanterweise waren hier keine weitere Abnahme des 12mers und keine weitere Zunahme der anderen neu entstandenen Signale zu beobachten. Dafür scheint mehr Verunreinigung entstanden zu sein. Möglicherweise ist das Enzym zwar in der Lage an dem Strang zu binden, da sich die Modifikation außerhalb der Erkennungssequenz befindet, kann aber nur einen minimalen Teil des Abbaus bewerkstelligen, da offensichtlich eine irreversible Inhibition des Enzyms vorliegt.

Wird das aktive Zentrum des EcoRI Enzyms betrachtet, so befinden sich Aspartat und Glutamin in unmittelbarer Nähe zum Substrat. An dieser Stelle könnte eine mögliche Acetylierung der Aminosäuren stattfinden und das Enzym bei der Reaktion inhibieren.[95]

Ebenso wurde der Verdau mit dem C8-(*N*-Acetyl)-biphenyl-modifizierten Oligonucleotid 5´-d(GT[A-C8-(*N*-Ac)-biphenyl] GA TTC TAC)-3´ **106g** durchgeführt (Abb. 108).

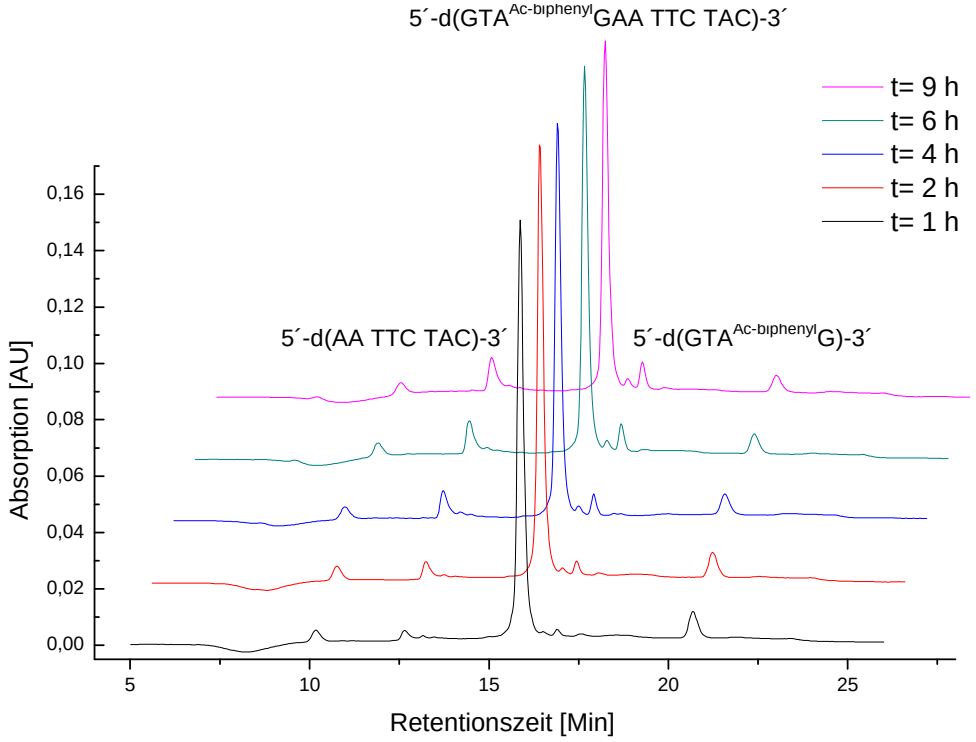


Abb. 108: EcoRI-Restriktion des C8-(*N*-Acetyl)-biphenyl-modifizierten Oligonucleotids 5´-d(GT[A-C8-(*N*-Ac)-biphenyl] GA TTC TAC)-3´ **106g**

Auch hier kann die Restriktion bis zu 6 h beobachtet werden, jedoch nach 9 h ist kein Unterschied mehr zu sehen. Auch in diesem Fall stoppt der Abbau des 12mer Oligonucleotids **106g**. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass das Enzym keinen längeren Zeitraum überlebt. Dieser Vermutung widersprechen die bereits erfolgreich durchgeführten Restriktionstests, bei denen das Enzym ohne Unterbrechung auch länger als 9 h aktiv ist und das 12mer-Oligonucleotid komplett abbaut (Abb. 105, S. 104).

Um diese Theorie oder die mögliche Inhibition des Enzyms zu überprüfen, wurde bei der Restriktion des C8-(*N*-Acetyl)-4-biphenyl-modifizierten EcoRI-Oligonucleotids **106g**, nach 9 h Verdau, erneut Enzym zur Reaktionslösung gegeben (Abb. 109, S. 109).

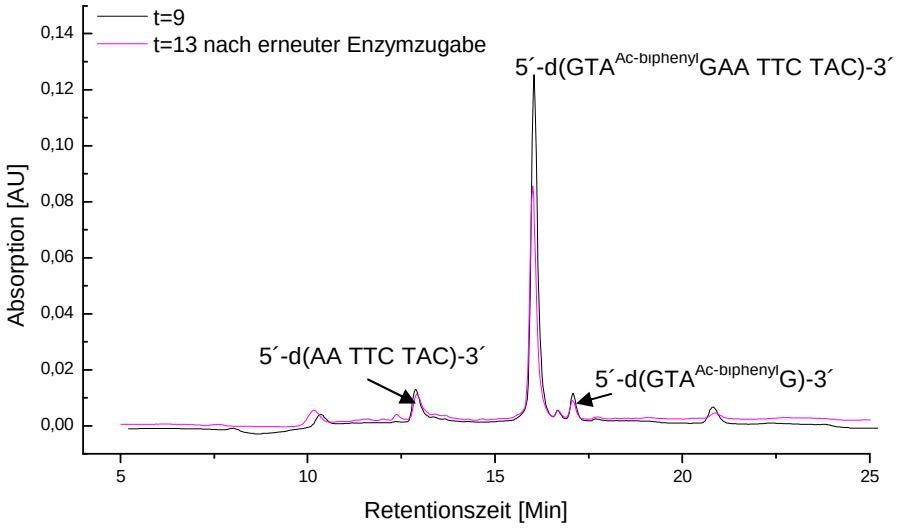


Abb. 109: EcoRI-Restriktion des C8-(*N*-Acetyl)-biphenyl-modifizierten Oligonucleotids 5´-d(GT[A-C8-(*N*-Ac)-biphenyl] GAA TTC TAC)-3´ **106g** nach erneuter Enzymzugabe

Abbildung 110 zeigt das Chromatogramm des bereits in Abbildung 109 (S. 108) gezeigten Abbaus nach 9 h. Zu diesem Zeitpunkt wurde erneut die gleiche Menge an Enzym wieder zu der Reaktionslösung hinzugefügt. Da immer noch dasselbe Aliquot für den HPLC-Lauf entnommen wurde, ist die Abnahme des 12mer Oligonucleotid-Signals selbsterklärend. Aber die Signale der Abbauprodukte sind nahezu genauso groß wie bei der zuvor entnommenen Probe nach 9 h. Das bedeutet, dass eine Zunahme der Abbauprodukte zu verzeichnen ist. Dieses bestätigt die These, dass das Enzym während der Restriktion möglicherweise irreversibel inhibiert wird.

Tab. 17 zeigt die Ergebnisse des EcoRI-Abbaus, wenn die Modifikation ausserhalb der Erkennungssequenz liegt.

Oligonucl.	Modifikation	$\tau_{1/2}$ [h]
106	5´-d(GTA GAA TTC TAC)-3´	2.5
106a	5´-d(GT**A**(C8-*N*-Ac-phenyl) GAA TTC TAC)-3´	Inhibition
106b	5´-d(GT**A**(C8-*N*H-Phenyl) GAA TTC TAC)-3´	3.3
106e	5´-d(GT**A**(C8-*N*-Ac-4-methoxyphenyl) GAA TTC TAC)-3´	Inhibition
106f	5´-d(GT**A**(C8-*N*H-4-Methoxyphenyl) GAA TTC TAC)-3´	3.3
106g	5´-d(GT**A**(C8-*N*-Ac-4-biphenyl) GAA TTC TAC)-3´	Inhibition
106h	5´-d(GT**A**(C8-*N*H-4-biphenyl) GAA TTC TAC)-3´	2.9

Tab. 17: Zusammenfasung der EcoRI Restriktion außerhalb der Erkennungssequenz

Im Fall der C8-*N*H-Arylamin-modifizierten Oligonucleotide **106b**, **f**, **h** erfolgte der Abbau und die jeweiligen Halbwertszeiten konnten ermittelt werden. Dabei liegen die Modifikationen Phenyl **106b** und 4-Methoxyphenyl **106f** mit 3.3 h relativ nah an der Halbwertszeit für den unmodifizierten Strang. Ähnlich verhält es sich auch mit dem C8-(*N*H-4-Biphenyl)-modifizierten Strang **106h**. Hier konnte allerdings eine Halbwertszeit von 2.9 h bestimmt werden. Dieser Wert liegt deutlich näher an der Halbwertszeit des unmodifizierten Doppelstranges. Das bedeutet, wenn die Modifikation sich außerhalb der Erkennungssequenz befindet, erfolgt der Abbau, allerdings ein wenig langsamer als dies im Fall des unmodifizierten Stranges passiert. Hierbei zeigt sich auch ein kleiner Unterschied zwischen den mono- und den polycyclischen Modifikationen. Das polycyclisch (C8-*N*H-4-Biphenyl) modifizierte Oligonucleotid **105h** konnte durch das Enzym jedoch ein wenig schneller abgebaut werden als die monocyclisch modifizierten Oligonucleotide. Dieses Ergebnis konnte bereits von *Böge* ebenfalls durch EcoRI-Restriktionsabbau festgestellt werden, wobei die monocyclisch modifizierten Oligonucleotide die Halbwertszeit bis zu 6.5 h verdoppelten.[12] *Böge* untesuchte die Auswirkungen der Modifikationen am 2´-dG. Die Modifikation bei den eben erwähnten Untersuchungen befanden sich an der ersten Position (G1 von 5´) der Sequenz. Offensichtlich hat eine Modifikation am G1 einen größeren Einfluss auf die Enzymaktivität als eine Modifikation an der 3. Position beim modifizierten 2´-dA (A3 von 5´).

Während die monocyclischen Modifikationen am G1 einen großen Einfluss auf die Enzymaktivität haben, liegen die polycyclischen Modifikationen eher in dem Bereich der Modifikationen am A3. Die Modifikationen am A3 wiederum unterscheiden sich dagegen kaum merklich in ihrem Einfluss auf das Enzym. Weiterhin wird hier deutlich, dass nicht nur die Position der Modifikation für den Restriktionsabbau und seine Halbwertszeiten ausschlaggebend ist, sonder auch, an welcher Base sich die Modifikation befindet. Für eine vollständige Analyse wären weitere Untersuchungen an den modifizierten Basen C und T innerhalb und ausserhalb der Erkennungssequenz notwendig.

Dagegen wirken die *N*-acetylierten Derivate umso mehr auf die Restriktion ausserhalb der Erkennungssequenz ein. Das Enzym kann zwar am Oligonucleotid binden, der Abbau wird aber nach ca. 6 h gestoppt. Wird allerdings der Abbau bis zu diesem Zeitpunkt betrachtet, so fällt auf, dass der Verdau im Gegensatz zu den anderen untersuchten Modifikationen nur sehr langsam voranschreitet.

20mer 5´-d(ACA T**A**A GCA TCT ACG ACG CG) -3´ **107**

Die Sequenz des 20mers wurde von der Arbeitsgruppe Marx von der Universität Konstanz vorgegeben. Mittels Primer-Verlängerungs-Untersuchungen sollte der Einfluss von C8-*N*H- und 8-(*N*-Acetyl)-Arylamin-Modifikationen am 2´-Desoxy-adenosin in Oligonucleotiden auf die Selektivität verschiedener DNA-Polymerasen untersucht werden.[96] Für die Untersuchung der modifizierten Oligonucleotide wurde dieselbe Position verwendet wie für die am 2´-dG-modifizierten Oligonucleotide, um die Auswirkungen der beiden Purinbasen untersuchen und miteinander vergleichen zu können.

Um den Einbau gegenüber der modifizierten Base untersuchen zu können, wurden so genannte „standing-start“-Reaktionen durchgeführt. Hierbei muss die gewählte DNA-Polymerase direkt an der zu untersuchenden Stelle binden und anschließend mit dem komplementären Nucleotideinbau beginnen. Um dieses zu ermöglichen, muss ein Primer verwendet werden, welcher direkt vor dem 2´-dA-Analogon endet.

Auf diese Weise ist es möglich zu untersuchen, welche Auswirkungen die Modifikation innerhalb des 20mer-Oligonucleotids auf die Einbaugenauigkeit des folgenden Nucleotids hat.

Die in dieser Arbeit synthetisierten modifizierten Oligonucleotide wurden mit verschiedenen DNA-Polymerasen aus unterschiedlichen Familien untersucht. Dabei handelte es sich um die thermostabile Polymerase *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*), die Basen reparierende *Pol ß* und die ebenfalls thermostabile Polymerase *Sulfolobus solfataricus Dpo4*[96, 97].

Da es sich bei dem 20mer um eine neue Sequenz handelte, sollte zunächst das unmodifizierte Oligonucleotid **107** synthetisiert werden. Für die Entschützung wurden die Standardbedingungen für unmodifizierte Oligonucleotide mit 25% NH_4OH für 4 h bei 55 °C verwendet.

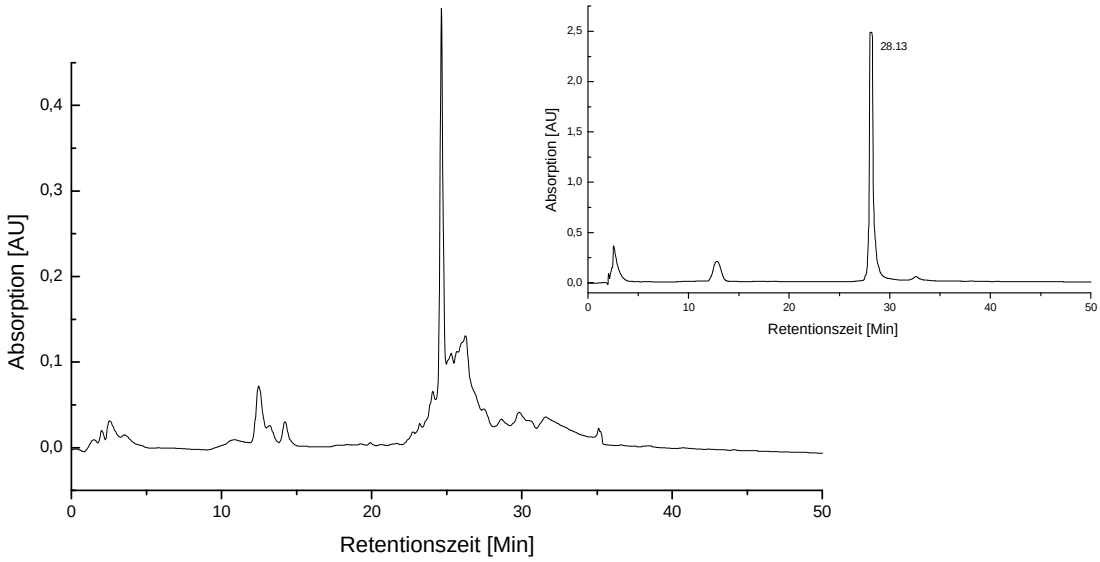


Abb. 110: Unmodifiziertes 20mer-Oligonucleotid **107**

Abbildung 110 links zeigt das HPLC-Chromatogramm direkt nach der Entschützung. Interessanterweise war in diesem Fall kein Abbruchstrang zu beobachten. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass die Abbruchstränge auf jeden Fall mit der eingebauten Modifikation in Zusammenhang stehen. Befindet sich eine Modifikation im Strang, ist dieser an der modifizierten Stelle deutlich labiler als ohne vorhandene Modifikation. Wiederum ist dies ein Indiz dafür, dass die Abbruchstränge nicht bereits im DNA-Synthesizer bei dem Kupplungscyclus entstehen. In Abb. 110 ist lediglich ein breites Signal hinter dem Oligonucleotid-Signal, welches auf eine unvollständige Entschützung hindeutet. Daraus lässt sich schließen, dass aufgrund der längeren Sequenz eine vollständige Entschützung auch mehr als 4 h benötigen würde.

Abbildung 110 (S. 112) rechts zeigt das isolierte und gereinigte Oligonucleotid **107** ohne Modifikation.

Aufgrund der Empfindlichkeit der *N*-acetylierten Modifikationen sollte zunächst eine mildere Herangehensweise erfolgen als bei den unmodifizierten Oligonucleotiden und erneut verschiedene Entschützungen, in Hinblick auf die bereits erfolgreich angewendeten Entschützungsvarianten, erprobt werden.

Zunächst erfolgte der Einbau der *N*-acetylierten, monocyclischen Modifikationen. Auch hier wurde von dem günstigen Fall ausgegangen, dass erneut beide gewünschten Oligonucleotide, *N*-acetyliert und unacetyliert, bei der jeweiligen Entschützung erhalten werden.

Als erstes sollte das C8-(*N*-Ac)-4-Methoxyphenyl-modifizierte Oligonucleotid **107e** entschützt werden. Da das 20mer eine neue Sequenz ist, sollten zunächst erneut diverse Entschützungsbedingungen getestet werden (Tab. 18, Tab. 19, S. 114).

Entschützung	Reagenzien	Zeit	Temperatur
a	25% NH_4OH, ß-Merc., anschließende Neutralisation	5 h	55 °C
b1	25% DIPA in MeOH, ß-Merc.	5 h	55 °C
b2	Siehe b1, anschließende Neutralisation	5 h	55 °C
c1	10% DIPA in MeOH, ß-Merc.	14 h	55 °C
c2	Siehe c1, anschließende Neutralisation	14 h	55 °C
c3	10% DIPA in MeOH, ß-Merc.	24 h	55 °C
c4	Siehe c3, anschließende Neutralisation	24 h	55 °C

Tab. 18: Entschützungsvariationen a-c4

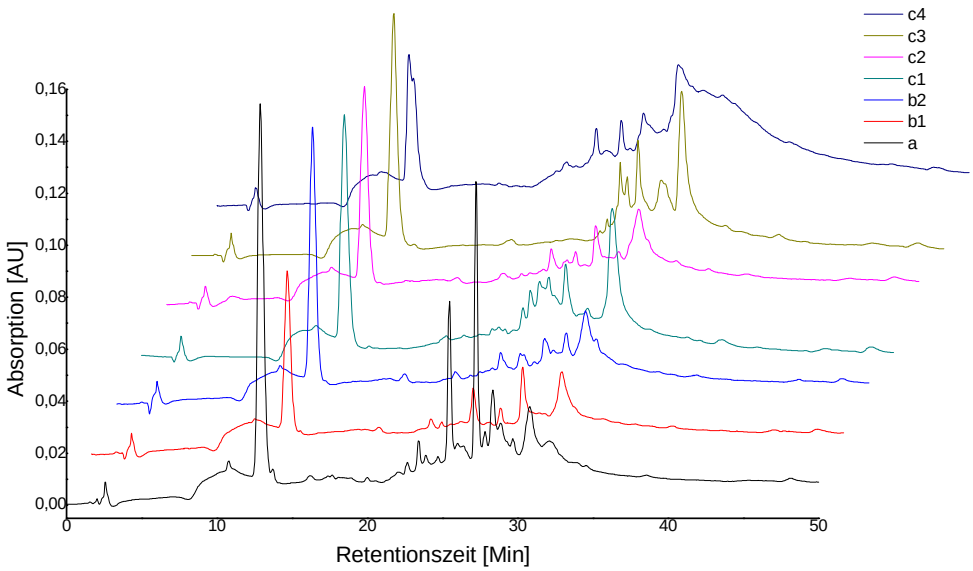


Abb. 111: Entschützungsversuche a-c4 des Oligonucleotids
3´- GC GCA GCA TTC ACG A[A-C8-(*N*-Ac)-4-Methoxyphenyl]T ACA- 5´ **107e**

Entschützung	Reagenzien	Zeit	Temperatur
d1	20% DIPA in MeOH, ß-Merc.	14 h	55 ℃
d2	Siehe d1, anschließende Neutralisation	14 h	55 ℃
d3	20% DIPA in MeOH, ß-Merc.	24 h	55 ℃
d4	Siehe d3, anschließende Neutralisation	24 h	55 ℃
e1	25% DIPA in MeOH, ß-Merc.	14 h	55 ℃
e2	Siehe e1, anschließende Neutralisation	14 h	55 ℃

Tab. 19: Entschützungsvariationen d1-e2

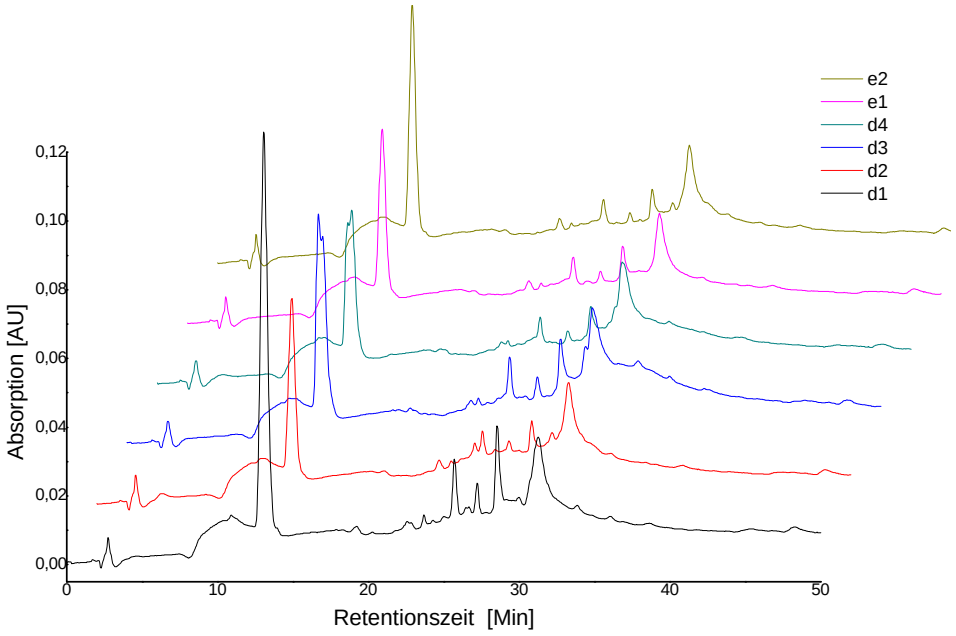


Abb. 112: Entschützungsversuche d1-e2 des Oligonucleotids
3´- GC GCA GCA TTC ACG A[A-C8-(*N*-Ac)-4-methoxyphenyl]T ACA- 5´ **107e**

Tabelle 18 (S. 113) und Tabelle 19 (S. 114) zeigen die Entschützungen **a - e2**. Außer Versuch **a** (NH_4OH) erfolgten alle Reaktionen mit DIPA in unterschiedlichen Konzentrationen, zu unterschiedlichen Reaktionszeiten- und temperaturen. Zusätzlich wurde die Reaktionslösung bei einigen Varianten nach der Entschützung sofort neutralisiert. Der Grund hierfür war die möglicherweise erst in dem Probenkonzentrator stattfindende Abspaltung der Acetylgruppe. Auch diese Möglichkeit sollte ausgeschlossen werden.

Die besten Entschützungen zeigte sich aufgrund der erhaltenen scharfen Signale bei der Methode **a** (Abb. 111, S. 113, schwarzes Chromatogramm) und bei der Methode **d1** (Abb. 112). Bei der Entschützung mit Ammoniak handelte es sich bei dem ersten Maximum bei ca. 27 Minuten um das 15mer-Oligonucleotid und bei dem zweiten Maximum bei ca. 30 Minuten um das C8-*N*H-modifizierte Oligonucleotid.

Erneut erfolgte der Strangbruch an der Position der Modifikation und es konnte lediglich das unacetylierte Oligonucleotid **107f** erhalten werden. Ähnlich verhielt es sich bei der Entschützung **d1**. Auch hier konnten nur das 15mer und das C8-*N*H-modifizierte Oligonucleotid **107f** erhalten werden. Zwar beinhaltet das Chromatogramm noch einige kleinere Signale, allerdings konnten diese massenspektrometrisch nicht zugeordnet werden.

Erneut besteht die Frage, wieso die *N*-acetylierten Oligonucleotide nach der Entschützung nicht mehr analysierbar waren oder ob sie aufgrund der geringen entstandenen Menge nicht detektiert werden konnten. Dieses wäre zusätzlich problematisch, da für die nachfolgenden Untersuchungen mindestens 5 nmol des Oligonucleotids benötigt werden.

Aus diesem Grund wurde ein großer Entschützungsansatz gestartet. In diesem Fall wurde die Entschützung einmal für 30 Minuten bei 45 °C mit 25% Ammoniak und einmal für 2 h bei 45 °C mit 10% Ammoniak durchgefü hrt (Abb. 113).

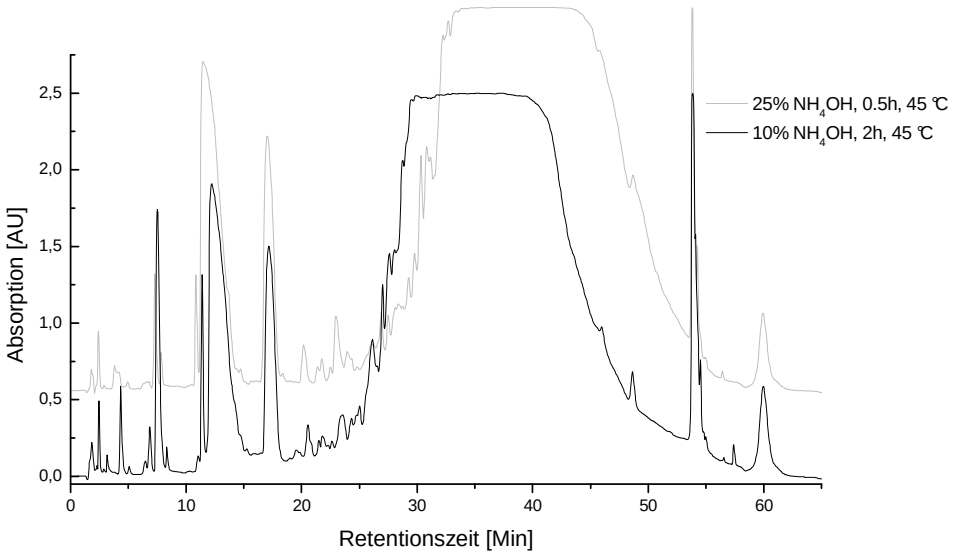


Abb. 113: Entschützungsversuche von einem großen Ansatz des Oligonucleotids 3´- GC GCA GCA TTC ACG A[A-C8-(*N*-Ac)-4-methoxyphenyl]T ACA- 5´ **107e**

Abbildung 113 zeigt, trotz unterschiedlicher Entschützung, nahezu identische Chromatogramme. Sofort ist erkennbar, dass mit der hier eingesetzten Menge keine Trennung erfolgen kann und die Absorption höher ist als die chromatographische Methode überhaupt anzeigen kann. Dieses breite Signal von ca. 30 bis 45 Minuten wurde in mehreren Fraktionen aufgefangen und unmittelbar massenspektrometrisch analysiert. In dem Bereich von 30 bis 33 Minuten konnte eine Masse von 4689.86 gefunden werden. Dieser Wert liegt zwischen der Masse von einem 15mer (4562) und einem 16mer (4875). Das bedeutet, dass auch in diesem Bereich zunächst Abbruchstränge von der Säule eluieren. In den Bereichen von 34 bis 36 Minuten sowie von 38 bis 45 Minuten konnten massenspektrometrisch keine Oligonucleotide detektiert werden. Lediglich wieder das C8-*N*H-modifizierte Oligonucleotid **107e** konnte in dem Bereich zwischen 36 und 38 Minuten identifiziert werden.

Die Bereiche, welche keine massenspektrometrischen Ergebnisse lieferten, wurden dennoch gereinigt und die Oligonucleotide mit einer Absorption von 260 nm aufgefangen, konzentriert und erneut massenspektrometrisch vermessen. Es wurden keine abweichenden Ergebnisse im Gegensatz zur vorherigen Messung gefunden.
Trotzdem sollten auch andere C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierte Phosphoramidite in das 20mer eingebaut und anschließend entschützt werden, um auszuschließen, dass möglicherweise nur bei der Verwendung von C8-(*N*-Acetyl)-4-methoxyphenyl als Modifikation Schwierigkeiten auftreten.
Als nächstes wurde die Entschützung mit dem C8-(*N*-Acetyl)-4-biphenyl-modifizierten Oligonucleotid **107g** getestet. Tab. 20 zeigt die verwendeten Entschützungs-bedingungen.

Versuch	Reagenzien	Zeit	Temperatur
f	25% NH_4OH, ß-Merc.	2 h	55 °C
g	10% DIPA in MeOH, ß-Merc.	24 h	55 °C
h	25% NH_4OH, ß-Merc.	1 h	55 °C

Tab. 20: Entschützungsvariationen f-h

Nun sollten nur noch die Standardbedingungen bei einer höheren Temperatur, aber zu einer verkürzten Reaktionszeit, mit 10% DIPA in MeOH und für 24 h, erprobt werden. Abbildung 114 (S. 118) zeigt die entsprechenden HPLC-Chromatogramme unmittelbar nach der Entschützung.

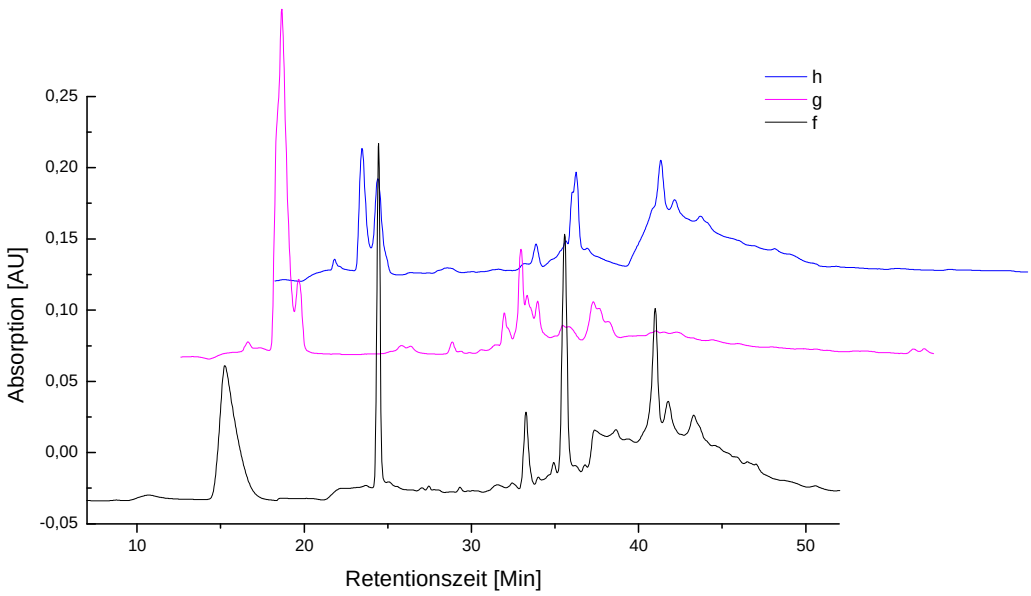


Abb. 114: Entschützungsversuche des C8-(*N*-Acetyl)-4-biphenyl-modifizierten Oligonucleotids 3´- GC GCA GCA TTC ACG A[A-C8-(*N*-Ac)-4-biphenyl]T ACA- 5´ **107g**

Interessant ist, dass die Entschützung **h** bei 55 °C für 1 h keine komplette Entschützung gewährleistet. Damit wird definitiv bestätigt, dass das 20mer-Oligonucleotid eine längere Reaktionszeit bei der Entschützung benötigt. Auch die Entschützung **g** mit DIPA liefert in diesem Fall, trotz 24 h Reaktionszeit, keine gute Entschützung. Scharfe Banden liefert nur Entschützung **f**, wobei erneut nur das C8-(*N*H-Biphenyl)-modifizierte Oligonucleotid **107h** massenspektrometrisch detektiert werden konnte.

In keiner der verwendeten Entschützungsvarianten, auch nicht in Kombination mit anderen bereits in dieser Arbeit verwendeten Arylaminen, konnte das gewünschte C8-*N*-acetylierte Oligonucleotid erhalten werden. Lediglich die C8-*N*H-Arylamin-modifizierten Oligonucleotide konnten vollständig gereinigt und isoliert werden.

Womöglich sind in diesem Fall auch die gewählten Kupplungsreagenzien nicht für den Erhalt der labilen Acetylgruppe geeignet. Zusätzlich wird eine Methode benötigt, welche in der Lage ist, das Oligonucleotid über einen längeren Zeitraum vollständig zu entschützen, aber die Acetylgruppe zu erhalten.

Auffällig ist die starke Fragmentierung der 20mere. Je basischer das Entschützungsregenz (NH_4OH), desto größer ist bereits der Abbruchstrang bei ca. 12 Minuten. Je höher die DIPA-Konzentration, desto deutlicher erfolgt zwar die Differenzierung der einzelnen Oligonucleotid-Banden, aber umso größer wird auch der Anteil an dem 15mer Fragment.

Wiederum, je niedriger die DIPA-Konzentration bei der Entschützung, desto schwächer differenziert sind die einzelnen Signale, was auf eine unvollständige Entschützung hindeutet. Zusätzlich spielt aber auch der Zeitfaktor bei der Entschützung eine große Rolle. Je länger die Entschützung stattfindet, desto mehr Abbruchfragmente können beobachtet werden. Die Abbruchfragmente bzw. Oligonucleotid-Fragmente sind immer in einem deutlich stärkeren Verhältnis vertreten, als die modifizierten Oligonucleotide.

In diesem Fall konnten die Auswirkungen der eingebauten C8-*N*H-Arylamin Modifikationen, nicht aber die ihrer *N*-acetylierten Derivate, auf die Genauigkeit beim komplementären Nucleotideinbau überprüft werden. Zusätzlich können auf diese Weise auch die Polymeraseaktivitäten beim 20mer im Gegensatz zum 30mer, im Bezug auf die Auswirkungen der poly- und monocyclischen Modifikationen, verglichen werden.

Oligonucl.	Modifikation
107	5´-d(ACA TAA GCA TCT ACG ACG CG)-3´
107b	5´-d(ACA T**A**(C8-*N*H-Phenyl)A GCA TCT ACG ACG CG)-3´
107d	5´-d(ACA T**A**(C8-*N*H-3,5-Dimethylphenyl)A GCA TCT ACG ACG CG)-3´
107f	5´-d(ACA T**A**(C8-*N*H-4-Methoxyphenyl)A GCA TCT ACG ACG CG)-3´
107h	5´-d(ACA T**A**(C8-*N*H-4-Biphenyl)A GCA TCT ACG ACG CG)-3´
107j	5´-d(ACA T**A**(C8-*N*H-2-Fluorenyl)A GCA TCT ACG ACG CG)-3´

Tab. 21: Zusammenfassung der synthetisierten 20mer-Oligonucleotide **107 a-j**

Wie bereits auf S. 111 beschrieben, handelt es sich bei den Primer-Verlängerungs-Untersuchungen um „standing start“-Reaktionen. Die gewählte Polymerase muss zunächst an der zu untersuchenden Stelle der DNA binden und erst an der Modifikation mit der Synthese beginnen. Für dieses Verfahren wurde ein spezieller Primer verwendet, der direkt vor dem modifizierten 2´-dA endet.

DNA-Polymerasen lassen sich nach Strukturhomologien in 7 Familien einteilen: A, B, C, D, X, Y und RT. Als erstes wurde die humane Polymerase *ß* aus der Familie X verwendet. Sie ist eine Reparaturpolymerase, die durch Basen-Excisions-Reparatur (BER) Schäden in der DNA beseitigt (Abb. 115, S. 120).

5´-CGC GTC GTA GAT GCT-3´
3´-GCG CAG CAT CTA CGA **A**TA CA-5´

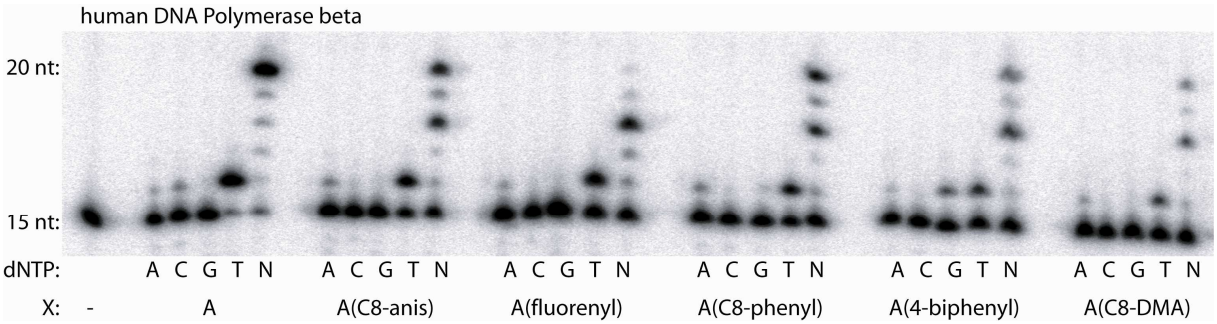


Abb. 115: Polyacrylamid-Gele der Reaktionen mit der DNA Polymerase *ß*

Beschriftung der Gele:

X: Art der Modifikationen

dNTP: 2´-Desoxynucleosidtriphosphate;

C: dCTP, **A**: dATP, **G**: dGTP, **T**: dTTP, **N**: alle dNTP

15 nt: 15 Basenpaare; an 16. Position befindet sich die Modifikation

20 nt: 20 Basenpaare; Länge des Templats und bedeutet, dass die Polymerase das Volllängenprodukt synthetisieren kann

Beim Referenzexperiment mit dem unmodifizierten Strang **A** ist der korrekte Einbau bei Zugabe von dTTP gegenüber der Base A erfolgt. *In vitro* macht die DNA Polymerase *ß* jedoch vergleichsweise sehr viele Deletionen und Einbaufehler (1 Fehler/10^3 Basenpaare)[98], was bereits durch den minimalen nicht-korrekten Einbau von dATP und dCTP demonstriert wird. Bei der Zugabe aller 4 dNTPs ist für das Templat eine vollständige Elongation des Stranges zu beobachten (Abb. 116, **A**). Betrachtet man die monocyclischen Modifikationen (C8-*N*H-4-Methoxyphenyl, C8-*N*H-Phenyl, C8-*N*H-3,5-Dimethylphenyl) erfolgte zwar ebenfalls der korrekte Einbau des komplementären Nucleotids, allerdings auch in geringer Menge der Einbau von dATP als nicht-komplementäres Nucleotid. Auch ist in allen drei Fällen neben einer vollständigen Elongation das Auftreten eines um ein bzw. zwei Nucleotide verkürzten Stranges zu beobachten. Die monocyclischen Modifikationen könnten also zu Ein- bzw. Zwei-Basendeletionen führen. Ebenso führt die polycyclische Modifikation C8-*N*H-2-Fluorenyl interessanterweise zu demselben Ergebnis, wie die monocyclischen Modifikationen.

Lediglich die C8-*N*H-4-Biphenyl Modifikation führt neben dem Einbau des kanonischen Nucleotids dTTP auch zu einem verstärkten Fehleinbau von dGTP. 4-Aminobiphenyl ist das einzige Arylamin, das von den bisher beobachteten geringen Fehleinbauten abweicht und in größeren Mengen dGTP als gegenüberliegendes nicht-komplementäres Nucleotid einbaut.

Wird vergleichend die Auswirkung der C8-*N*H-Arylamin-Addukte auf die von *Jacobsen* synthetisierten 30mere betrachtet, so erfolgt auch hier bereits beim Referenzexperiment **A** neben dem Einbau des kanonischen Nucleotids dTTP auch der geringe Fehleinbau des Nucleotids dATP (Abb. 116).

5´-CGT TGG TCC TGA AGG AGG ATA GGT T-3´
3´-GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CCA A**A**T AAA-5´

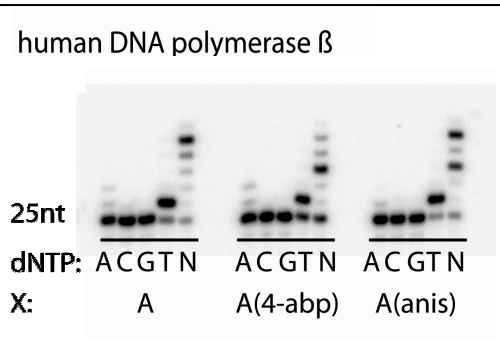


Abb. 116: Polyacrylamid-Gele der Reaktionen mit der DNA Polymerase *ß* in 30mer-Oligonucleotiden

Die DNA Polymerase *ß* baut scheinbar unabhängig der vorhandenen Modifikation (C8-*N*H-4-Biphenyl bzw. C8-*N*H-4-Methoxyphenyl), ebenso wie bereits beim Referenzexperiment **A** mit dem unmodifizierten Strang, die Nucleotide ein. Dieses Ergebnis ist beinahe deckungsgleich mit den Ergebnissen aus Abb. 115 (S. 120) beim 20mer-Oligonucleotid. Ein abweichendes Ergebnis konnte allerdings bei der polycyclischen Modifikation C8-*N*H-4-Biphenyl beobachtet werden. Bei den 20mer-Oligonucleotiden erfolgte in diesem Fall auch der Einbau des nicht-komplementären Nucleotids dGTP.

Des Weiteren wurde die Polymerase *Dpo4* (Y-Familie) aus *Sulfolobus solfataricus* verwendet.[97] Polymerasen dieser Familie polymerisieren Nucleotide in der Regel mit einer Fehlerrate von 1:8 x 10^{-3} bis 3 x 10^{-4}.[97]

5´-CGC GTC GTA GAT GCT-3´
3´-GCG CAG CAT CTA CGA **A**TA CA-5´

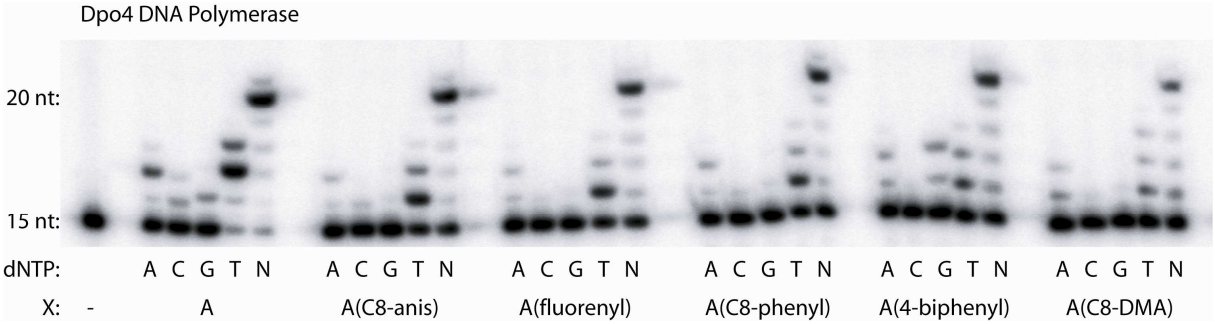


Abb. 117: Polyacrylamid-Gele der Reaktionen mit der DNA Polymerase *Dpo4*

Die Polymerase *Dpo4* zeigt bereits beim Referenzexperiment **A** eine große Fehlerrate (Abb. 117). Der Einbau des komplementären Nucleotids dTTP sowie auch die Fehleinbauten von dCTP und dGTP erfolgen nahezu gleichermaßen. Offensichtlich erkennt die Polymerase einen Fehler bzw. eine Veränderung im Templatstrang, baut aber trotzdem nicht-komplementäre Nucleotide, wie dCTP und dGTP, ein. Allerdings baut sie dann bei der folgenden unmodifizierten Base T, das eigentlich zuvor benötigte Nucleotid dTTP in großer Menge ein und der wiederum an dieser Stelle korrekte Einbau von dATP erfolgt in geringeren Raten. Die nächst folgende Base A wird erneut richtig erkannt und der Einbau des kanonischen Nucleotids dTTP erfolgt. Bei der Zugabe aller 4 dNTPs ist für das Templat eine vollständige Elongation des Stranges zu beobachten.

Interessanterweise erfolgt bei jeder verwendeten Modifikation der korrekte Einbau des Nucleotids dTTP. Bei der nachfolgenden Base baut die Polymerase aber jeweils entsprechend des Referenzexperiments **A** stets das komplementäre Nucleotid dATP und auch in ähnlicher Menge das nicht-komplementäre Nucleotid dTTP ein. Erneut erfolgt bei der polycyclischen Modifikation C8-*N*H-4-Biphenyl, ebenso wie bereits bei der DNA Polymerase *ß* (Abb. 115, S. 120) beobachtet, der Einbau des nicht-komplementären Nucleotids dGTP.

Auch die Versuche mit der Polymerase *Dpo4* lassen lediglich einen Unterschied in dem Einfluss der 4-Aminobiphenyl- und den übrigen Modifikationen erkennen. 4-Aminobiphenyl hat in scheinbar allen hier vorgestellten Experimenten den stärksten Einfluss auf die verwendete Polymerase.

Werden erneut die Auswirkungen der C8-*N*H-Arylamin-Addukte in 30mer-Oligonucleotiden von Jacobsen vergleichend betrachtet, so erfolgt auch hier erneut beim Referenzexperiment **A** neben dem Einbau des kanonischen Nucleotids dTTP auch der geringe Fehleinbau des Nucleotids dATP (Abb. 118).

5´-CGT TGG TCC TGA AGG AGG ATA GGT T-3´
3´-GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CCA A**A**T AAA-5´

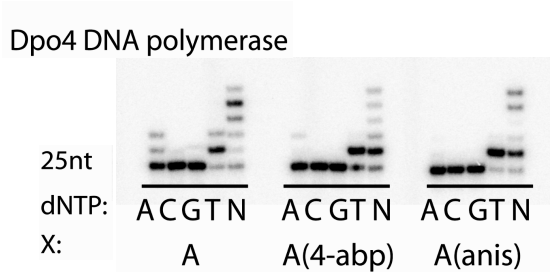


Abb. 118: Polyacrylamid-Gele der Reaktionen mit der DNA Polymerase *Dpo4* in 30mer-Oligonucleotiden

Interessanterweise erfolgt dann aber in Anwesenheit der gewählten Modifikationen dann nur noch der korrekte Einbau des komplementären Nucleotids dTTP. Erneut ist im Fall von C8-*N*H-4-Biphenyl beim 30mer-Oligonucleotid in Gegensatz zu den Verlängerungsexperimenten beim 20mer-Oligonucleotid kein Einbau von dGTP zu erkennen. Weiterhin erfolgt beim 20mer-Oligonucleotid bei Zugabe aller 4 dNTPs für das Templat eine vollständige Elongation des Stranges, während dieses beim 30mer-Oligonucleotid nicht mehr erfolgt.

Die als letztes verwendete *Pfu* DNA Polymerase aus *Pyrococcus pfuriosus* gehört zur Familie B der Polymerasen und damit auch zur gleichen Familie wie die humane DNA Polymerase. Sie ist eine replikative, thermostabile Polymerase, die einen DNA-Strang möglichst schnell synthetisieren soll und mit einer extrem hohen Genauigkeit arbeitet.[95]

5´-CGC GTC GTA GAT GCT-3´
3´-GCG CAG CAT CTA CGA **A**TA CA-5´

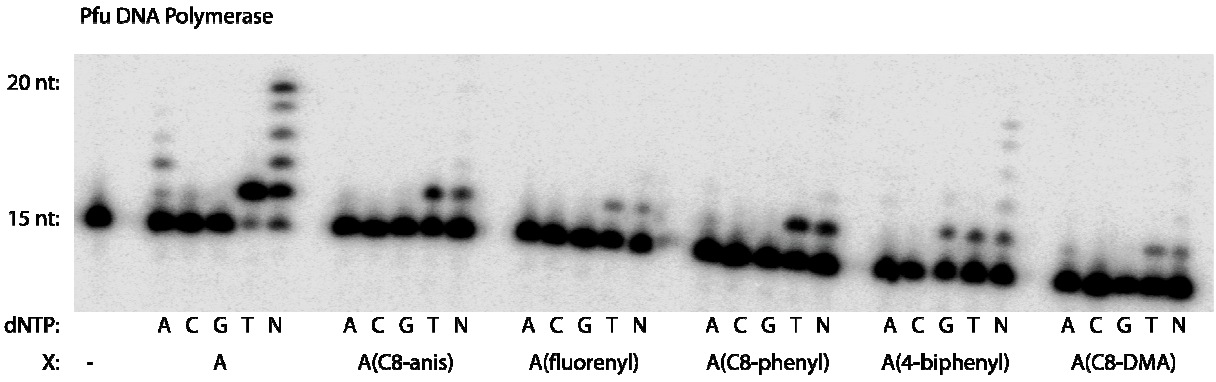


Abb. 119: Polyacrylamid-Gele der Reaktionen mit der *Pfu* DNA Polymerase

Auch die *Pfu* DNA-Polymerase bestätigte die bisherigen Ergebnisse. Stets erfolgte der Einbau des kanonischen Nucleotids dTTP, unabhängig der verwendeten Modifikation. Lediglich bei 4-Aminobiphenyl erfolgte auch hier zu gleichen Teilen der unerwünschte Einbau von dGTP, wie von dTTP. Bei der Zugabe von allen vier dNTPs ist bei der *Pfu* DNA-Polymerase für das Templat keine vollständige Elongation des Stranges zu beobachten. Diese Beobachtung entspricht auch den bei Verwendung der DNA-Polymerase *ß* auftretenden Ergebnissen (Abb. 115).

Werden erneut die Auswirkungen der C8-*N*H-Arylamin-Addukte in 30mer-Oligonucleotiden von *Jacobsen* vergleichend betrachtet, so erfolgt auch hier die Blockade der fortschreitenden DNA-Synthese. Zusätzlich kann hier auch der Einbau des nicht-komplementären Nucleotids dATP im Fall der 4-Methoxyphenyl-Modifikation beobachtet werden. Die stärkste Auswirkung konnte bei dieser längeren Sequenz ebenfalls bei der Modifikation 4-Aminobiphenyl festgestellt werden. Die Polymerase baute zusätzlich zu dem komplementären Nucleotid dTTP und dem nicht-komplementären Nucleotid dATP hier auch noch in geringen Mengen dCTP und dGTP ein (Abb. 120, S. 125).

5´-CGT TGG TCC TGA AGG AGG ATA GGT T-3´
3´-GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CCA A**A**T AAA-5´

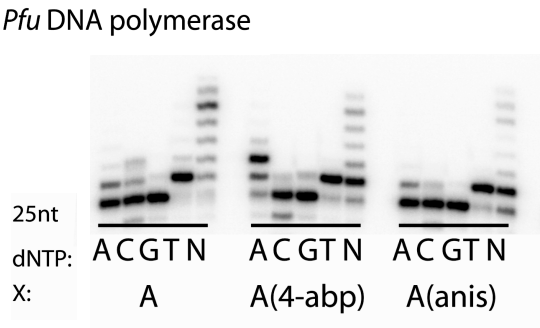


Abb. 120: Polyacrylamid-Gele der Reaktionen mit der DNA Polymerase *Pfu* in 30mer-Oligonucleotiden

Allgemein können aus den hier durchgeführten Experimenten erste Vermutungen hinsichtlich der durch die C8-*N*H-Arylamin Modifikationen verursachten Einflüsse auf die Replikation getätigt werden. Diese Einflüsse sind zum Einen abhängig von der verwendeten Polymerase und zum Anderen vom aromatischen System der Modifikationen. Mono- wie polycylische Amine führten hier gleichermaßen zu Fehleinbauten. Lediglich die polycyclische Modifikation 4-Aminobiphenyl führte verstärkt zu nicht-korrekten Nucleotid-Einbauten.

4.6 Bestimmung der Schmelztemperaturen (T_m-Werte)

Als Schmelztemperatur (T_m) wird die Temperatur definiert, bei der 50% des Doppelstranges in einzelsträngiger Form vorliegen. Wichtigen Einfluss auf die Schmelztemperatur haben Länge, Zusammensetzung und Konzentration eines Oligonucleotids. Bei hohem GC-Gehalt steigt der T_m-Wert, da diese Basenpaare energetisch günstiger liegen als AT-Paare. Die Begründung liegt einerseits in der Anzahl der Wasserstoffbrücken-Bindungen und andererseits in den Basen-Stapelwechselwirkungen. GC-Stapel sind energetisch günstiger und stabilisieren die Doppelhelix stärker als AT-Basenpaare. Zur Berechnung und Vorhersage von Schmelztemperaturwerten werden unterschiedliche Verfahren angewendet.

<u>Wallace-Regel</u>

Die Wallace-Regel ist die so genannte „2+4-Regel“ und wurde für Hybridisierungen an membrangebundene Oligonucleotide erstellt. Sie gilt für kurze (bis ca. 15 Basen) Oligonucleotide und geht von einem Beitrag von 2 ℃ für jedes AT und von 4 ℃ für jedes GC-Paar aus. T_m= 2 ℃ (A+T) + 4 ℃ (G+C)

<u>Howly-GC-Regel</u>

Die Howly-Regel berücksichtigt den GC-Gehalt.

Tm = 81.5 + 0.41 (%GC) + 16.6 log c(M+) - 500/n -0.61 (%F) -1.2 D

%GC = Prozentualer Anteil an G/C-Paaren

%F = Prozentualer Anteil von Formamid im Puffer

c(M+) = Konzentration an monovalenten Kationen

D = Prozentualer Mismatch-Anteil

n = Anzahl der Nucleotide

<u>Nearest-Neighbor-Verfahren</u>

Das Nearest-Neighbor-Verfahren für Oligonucleotide mittlerer Länge (20-60 Basen) berücksichtigt die sequenzabhängigen Stackingeffekte und basiert auf den thermodynamischen Daten benachbarter Nucleotidpaare.

Tm = [(1000 x ΔH°) /(A + ΔS°+ R x ln (C/4))] - 273.15 + 16.6 x log [Na+]

ΔH°= Summe der Enthalpien der Paare

ΔS°= Summe der Entropien der Paare

A = -10.8 cal, Entropie der Helixbildung

R = 1.984 cal/grad x mol, Gaskonstante

c = Oligonucleotidkonzentration (250 pmol/l) \ c(Na+) = Konzentration der Natriumionen in der Oligonucleotidlösung (50 mmol/l)

UV-Absorption

Da einzelsträngige DNA UV-Licht ca. 40% stärker absorbiert als doppelsträngige DNA, kann die Bestimmung der Schmelztemperatur auch mit Hilfe eines UV-Messgerätes erfolgen. Die in dieser Arbeit synthetisierten Oligonucleotide wurden alle in einem 1 µM-Maßstab (1nmol) in einem 10mM Phosphat-Puffer mit 140 mM NaCl und 1 mM EDTA, pH 6.8 vermessen. Die Messungen wurden in einem Temperaturbereich von 5 °C bis 80 °C durchgeführt, wobei jeweils dreimal erhitzt und wieder abgekühlt wurde. Die Heiz- bzw. Kühlrate betrug hierbei 0.5 °C/Min, wobei alle 0.5 °C ein Datenpunkt aufgenommen wurde. Zuvor wurde die Probenlösung zweimal schnell von 5 °C auf 80 °C erhitzt und wieder auf 5 °C abgekühlt. Hierbei lag die Kühl- bzw. Heizrate bei 10 °C/Min. Hiermit wurde die DNA-Struktur zunächst in ihre Einzelstränge geschmolzen, damit sie anschließend bei der Kühlung eine definierte Struktur ausbilden konnte. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm verfolgt. Das Ergebnis ist eine sigmoide Kurve, von welcher das Maximum der 1. Ableitung zur Bestimmung des T_m-Wertes berechnet werden kann. Die während dieser Arbeit angewandte Methode ist die van´t Hoff´sche Kurvenanalyse. Sie lieferte mit einem Fehler von ± 0.5 °C die T_m-Werte der Oligonucleotid-Stränge.
Für alle in dieser Arbeit synthetisierten Oligonucleotid-Stränge wurden anschließend die T_m-Werte bestimmt und mit dem unmodifizierten Strang verglichen.

*Nar*I-Sequenz

5´- d(CTC GGC A*CC ATC) -3´			
Modifikation	**T_m [°C]**	**ΔH [kcal/mol]**	**ΔS [cal/mol/K]**
-	58.2	-79.1	-267.7
C8-*N*H-Phenyl **104b**	50.1	-97.4	-368.5
C8-*N*-Ac-phenyl **104a**	48.2	-143.5	-475.8
C8-*N*H-3,5-Dimethylphenyl **104d**	45.1	-95.4	-338.2
C8-*N*-Ac-3,5-dimethylphenyl **104c**	42.1	-36.5	-84.0
C8-*N*H-4-Methoxyphenyl **104f**	51.0	-92.2	-314.4
C8-*N*-Ac-4-methoxyphenyl **104e**	47.3	-71.8	-191.8
C8-*N*H-4-Biphenyl **104h**	49.0	-101.3	-424.2
C8-*N*-Ac-4-biphenyl **104g**	45.8	-95.8	-332.6

Tab. 22: T_m-Werte der modifizierten und unmodifizierten *Nar*I-Oligonucleotide

Der T_m-Wert des unmodifizierten *Nar*I-Oligonucleotids liegt bei 58.2 °C. Es ist ein deutlicher Einfluss der Modifikationen auf die thermische Stabilität zu erkennen. C8-*N*H-Phenyl **104b** und C8-*N*H-4-Methoxyphenyl **104f** als Modifikationen senken den T_m-Wert um ca. 8 °C, C8-*N*H-3,5-Dimethylphenyl **104d** sogar um 13.1 °C. Dieser Wert liegt sogar unterhalb der Schmelztemperatur des C8-*N*H-4-Biphenyl **104h** modifizierten Stranges, d.h. die beiden Methylgruppen bewirken somit einen größeren Einfluss als ein zweiter Ring. Werden die acetylierten Modifikationen betrachtet, so ist sofort erkennbar, dass diese die ursprünglichen T_m-Werte jeweils um 2-4 °C senken und die thermische Stabilität nochmals schwächen. Diese Senkung der Schmelztemperatur ist durch die mögliche *syn*-Konformation zu erklären. Hierbei ragt die *N*-acetylierte Base in die DNA-Doppelhelix hinein, interkaliert mit den Nachbarbasen und drückt den Heterocyclus in die große Furche der *B*-DNA. Beim unacetylierten Addukt, welches in der *anti*-Konformation vorliegt, liegt der modifizierte Teil in der großen Furche und stört die Basenpaarung nicht.[99]

EcoRI-Sequenz

Zunächst erfolgte der Einbau der Modifikationen innerhalb der Erkennungssequenz des Enzyms. Da es sich bei der EcoRI-Sequenz um eine selbstkomplementäre Sequenz handelt, wurden 2 nmol Oligonucleotid für die Messung der Schmelztemperatur verwendet und kein Gegenstrang hinzugefügt. Tabelle 23 zeigt die gemessenen T_m-Werte.

	5´-d(GTA GA*A TTC TAC)-3´		
Modifikation	**T_m [°C]**	**ΔH [kcal/mol]**	**ΔS [cal/mol/K]**
-	41.7	-65.2	-237.1
C8-*N*H-Phenyl **105b**	41.3	-40.7	-129.4
C8-*N*-Ac-phenyl **105a**	41.5	-14.5	-46.3
C8-*N*H-4-Methoxyphenyl **105d**	32.6	-21.1	-69.4
C8-*N*-Ac-4-methoxyphenyl **105c**	34.3	-6.3	-7.1
C8-*N*H-4-Biphenyl **105f**	42.8	-33.9	-107.8
C8-*N*-Ac-4-biphenyl **105e**	40.2	-60.9	-225.2

Tab. 23: T_m-Werte der modifizierten und unmodifizierten EcoRI-Oligonucleotide

Interessanterweise haben die Modifikationen C8-*N*H-Phenyl **105b** und C8-*N*H-4-Biphenyl **105f** hier keinen Einfluss auf die Schmelztemperatur. Lediglich bei C8-*N*H-4-Methoxyphenyl **105d** wurde die Stabilität und damit der T_m-Wert um ca. 9 ℃ gesenkt. Auch scheint die Acetylgruppe an der 8-*N*-Position keinen Einfluss zu haben. Sie übt hier keine zusätzliche destabilisierende Wirkung aus.
Befindet sich die Modifikation außerhalb der Erkennungssequenz, an Position 3, ist eine stärker destabilisierende Wirkung, im Gegensatz zu den Modifikationen innerhalb der Schnittstelle, zu erkennen. Ausschlaggebend ist die Position der Modifikation. Wieder hat C8-*N*H-4-Methoxyphenyl **106d** den größten Einfluss auf die Schmelztemperatur. Zwischen *N*-acetylierten und unacetylierten Modifikationen kann auch in diesem Fall kein wesentlicher Unterschied bemerkt werden.

5´-d(GTA* GAA TTC TAC)-3´			
Modifikation	**T_m [℃]**	**ΔH [kcal/mol]**	**ΔS [cal/mol/K]**
-	41.7	-65.2	-237.1
C8-*N*H-Phenyl **106b**	30.1	-115.5	-408.3
C8-*N*-Ac-phenyl **106a**	31.5	-78.9	-286.0
C8-*N*H-4-Methoxyphenyl **106d**	29.1	-50.7	-168.5
C8-*N*-Ac-4-methoxyphenyl **106c**	32.0	-26.9	-115.9
C8-*N*H-4-Biphenyl **106f**	33.4	-57.9	-189.0
C8-*N*-Ac-4-biphenyl **106e**	33.6	-60.2	-191.4

Tab. 24: T_m-Werte der modifizierten und unmodifizierten EcoRI-Oligonucleotide

20mer-Oligonucleotide

Weiterhin erfolgte die Untersuchung der neu synthetisierten C8-*N*H-Arylamin-modifizierten 20mere. Die *N*-acetylierten Oligonucleotide konnten nicht erhalten werden. Da allerdings Vorarbeiten von *Jacobsen*[69] zu ähnlichen 30meren bestehen, konnte hier ein Vergleich zwischen diesen beiden unterschiedlich langen Sequenzen und somit zwischen poly- und monocyclischen Modifikationen erfolgen.
Mittels dieser Sequenzen können Einflüsse der Modifikationen auf die verwendeten Polymerasen analysiert und ausgewertet werden. Da es sich nicht um eine palindrome Sequenz handelt, musste für die Messung der Schmelztemperaturen ein Gegenstrang hinzugefügt werden.

Tab. 25 zeigt die T_m-Werte der unmodifizierten und modifizierten 20mer-Oligonucleotide.

5´-d(ACA TA*A GCA TCT ACG ACG CG) -3´			
Modifikation	**T_m [℃]**	**ΔH [kcal/mol]**	**ΔS [cal/mol/K]**
-	64.8	-150.1	-415.3
C8-*N*H-Phenyl **107b**	61.1	-107.7	-351.5
C8-*N*H-3,5-Dimethylphenyl **107d**	57.8	-85.7	-288.7
C8-*N*H-4-Methoxyphenyl **107f**	60.8	-88.9	-237.5
C8-*N*H-4-Biphenyl **107h**	58.7	-78.2	-206.9
C8-*N*H-2-Fluorenyl **107j**	61.6	-93.1	-249.4

Tab. 25: T_m-Werte der modifizierten und unmodifizierten 20mer-Oligonucleotide

Den größten Einfluss hat hier erneut die C8-*N*H-4-Methoxyphenyl Modifikation. Sie senkt den T_m-Wert um 6 ℃. Wieder zeigen die monocyclischen Modifikationen einen größeren Einfluss als die polycyclischen Modifikationen. Werden als Vergleich die modifizierten 30mere betrachtet, so haben die Modifikationen in dem längeren Doppelstrang kaum einen Einfluss auf die Schmelztemperatur.
Tab. 26 zeigt die T_m-Werte der modifizierten 30mer-Oligonucleotide.[69]

5'-d(AAA TA*A ACC TAT CCT CCT TCA GGA CCA ACG)-3'			
Modifikation	**T_m [℃]**	**ΔH [kcal/mol]**	**ΔS [cal/mol/K]**
-	59.3	-58.1	-195.5
C8-*N*H-4-Methoxyphenyl **108f**	58.8	-36.1	- 77.1
C8-*N*H-3,5-Dimethylphenyl **108d**	57.5	-92.6	- 305.6
C8-*N*H-4-Biphenyl **108h**	57.2	-25.3	- 47.0

Tab. 26: T_m-Werte der modifizierten und unmodifizierten 30mer-Oligonucleotide

Während diese den T_m-Wert nur um 2 ℃ senken und keine Unterschiede zwischen mono- und polycyclischer Modifikation festzustellen sind, senken die Modifikationen innerhalb des 20mers die Schmelztemperatur um 3 ℃ bis 6 ℃. Interessanterweise hat C8-*N*H-4-Biphenyl **108h** einen ähnlichen Einfluss beim 30mer, wie C8-*N*H-3,5-Dimethylphenyl **108d**.

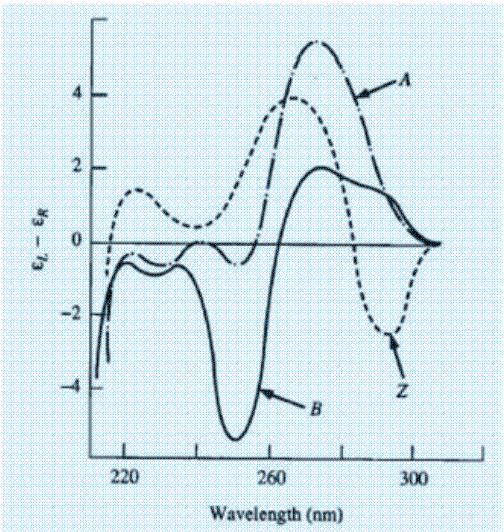
4.7 Messung des zirkularen Dichroismus (CD)

Zirkularer Dichroismus ist eine Form der Absorptionsspektroskopie, bei der die unterschiedliche Absorption von links- und rechts zirkular polarisiertem Licht einer optisch aktiven Substanz gemessen wird.

Wird zirkular polarisiertes Licht durch ein absorbierendes, optisch aktives Medium gesendet, so unterscheiden sich sowohl die Geschwindigkeit der rechten bzw. linken Polarisation ($c_L \neq c_R$) als auch ihre Wellenlänge ($\lambda_L \neq \lambda_R$) und somit auch ihre Absorption ($\varepsilon_L \neq \varepsilon_R$). Zirkularer Dichroismus entspricht somit $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$[100] und kann zur Bestimmung der Konfiguration angewendet werden.

CD-Spektroskopie gehört zu den wichtigsten Methoden zur Konformationsanalyse von Peptiden und Oligonucleotiden. Obwohl in Oligonucleotiden nur das Zuckergrundgerüst chiral ist, spielen die Wechselwirkungen mit den jeweiligen Nucleobasen, die als Chromophore konformativ fixiert sind, auch eine wichtige Rolle. Bei Einzelsträngen wiederum liegt eine statistische Verteilung der Basenorientierung vor.[100]

Abb. 121 zeigt die CD-Spektren der verschiedenen DNA-Konformationen.



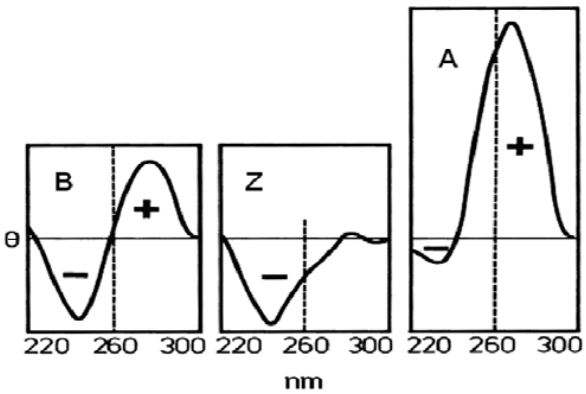


Abb. 121: CD-Spektren der verschiedenen DNA-Konformationen[100, 101]

An Stelle von $\Delta\varepsilon$ wird häufig die molare Elliptizität $[\Theta]_M$ in Abhängigkeit von der Wellenlänge aufgetragen. Sie ist definiert als: $[\Theta]_M = \frac{\Theta \cdot M}{100 \cdot c \cdot l} = \frac{[\Theta]_\lambda^T \cdot M}{100}$ [102]

Welche DNA-Konformation vorliegt, kann anhand der charakteristischen Lage der Maxima und Minima (vgl. Abb. 121, links) und der Größe der molaren Elliptizität (Abb. 121, rechts) zugeordnet werden. Dabei handelt es sich bei der *B*-DNA um die natürlich vorkommende DNA-Konformation, während die *A*-DNA-Konformation nur in dehydratisierter DNA und die *Z*-DNA-Konformation nur in stark salzhaltigen Lösungen und Sequenzen mit alternierenden Pyrimidin- und Purinbasen vorliegen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten CD-Messungen wurden mit der gleichen Lösung durchgeführt, wie für die T_m-Wert-Bestimmung. Um auszuschließend, dass die Stränge möglicherweise nach der T_m-Messung nicht mehr der ursprünglichen Form entsprechen, erfolgte die CD-Messung vor und auch nach der Schmelztemperaturbestimmung. Die Absorption wurde in einem Bereich von 220-320 nm bei Raumtemperatur gemessen. Mit Hilfe dieser Konformationsanalyse kann die vorliegende DNA-Konformation der modifizierten Stränge im Gegensatz zu den unmodifizierten Strängen bestimmt werden. Weiterhin lassen Verschiebungen zu höheren bzw. niedrigeren Wellenlängen auch eine Vergrößerung / Verkleinerung des π-Systems durch das Vorhandensein einer Modifikation erkennen.

Die gemessenen CD-Spektren der Oligonucleotide der *Nar*I-Sequenz sind in Abb. 122 dargestellt. Für eine bessere Übersicht sind nur die CD-Spektren der C8-*N*H-Phenyl **104b** und C8-(*N*-Ac)-phenyl **104a** modifizierten Oligonucleotide (1 nmol) im Vergleich zum unmodifizierten *Nar*I-Oligonucleotid **104** gezeigt. Sie stehen stellvertretend auch für die anderen monocyclischen Modifikationen. Für die Messung des circularen Dichroismus muss ein Gegenstrang hinzugefügt werden.

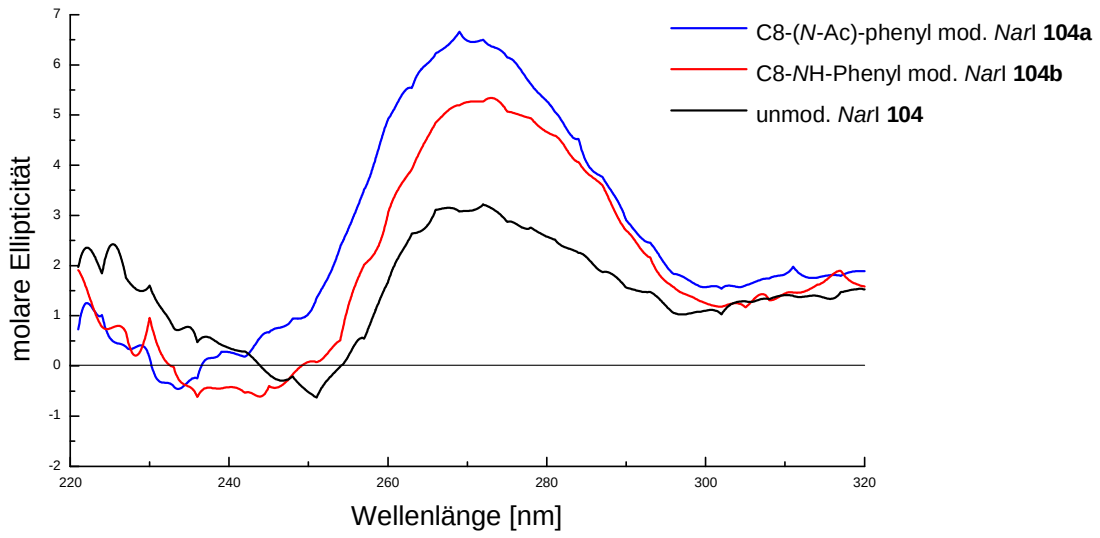


Abb. 122: CD-Spektren der unmodifizierten und Phenyl modifizierten *Nar*I-Sequenzen

Die CD-Spektren der unmodifizierten und modifizierten *Nar*I-Sequenzen zeigen im Duplex die gleichen charakteristischen Konformationen. Werden nur die Minima und Maxima betrachtet, so kann die Konformation der *B*-DNA (Abb. 121, S. 131) zugeordnet werden.

Das charakteristische Minimum dieser liegt bei einer Wellenlänge von ca. 250 nm und das charakteristische Maximum bei einer Wellenlänge von ca. 270 nm. Werden wiederum die Minima und Maxima der molaren Elliptizität Θ betrachtet, so kann die Konformation der *A*-DNA zugeordnet werden, da der positive Bereich des Diagramms deutlich ausgeprägt ist und lediglich eine kleine Kurve den negativen Bereich kreuzt. Es kann also keine eindeutige Aussage über die Konformation getroffen werden. Möglicherweise liegt hier ein Gleichgewicht der Konformationen zwischen *A*- und *B*-DNA vor. Unterschiede zwischen den modifizierten und der unmodifizierten Sequenz liegen nicht vor. Lediglich eine leichte Verschiebung der lokalen Minima und Maxima zu höherer Elliptizität (hyperchromer Effekt) lässt sich durch das Vorhandensein der Modifikation (Vergrößerung des π-Systems und Destabilisierung der Basenstapelung) erkennen.[103] Eine Konformationsänderung aufgrund der vorhandenen Acetylgruppe lässt sich nicht erkennen.

Ebenso wurden auch die Konformationen der C8-*N*H- und C8-(*N*-Acetyl)-4-biphenyl-modifizierten *Nar*I-Oligonucleotide **104h**, **g** untersucht (Abb. 123).

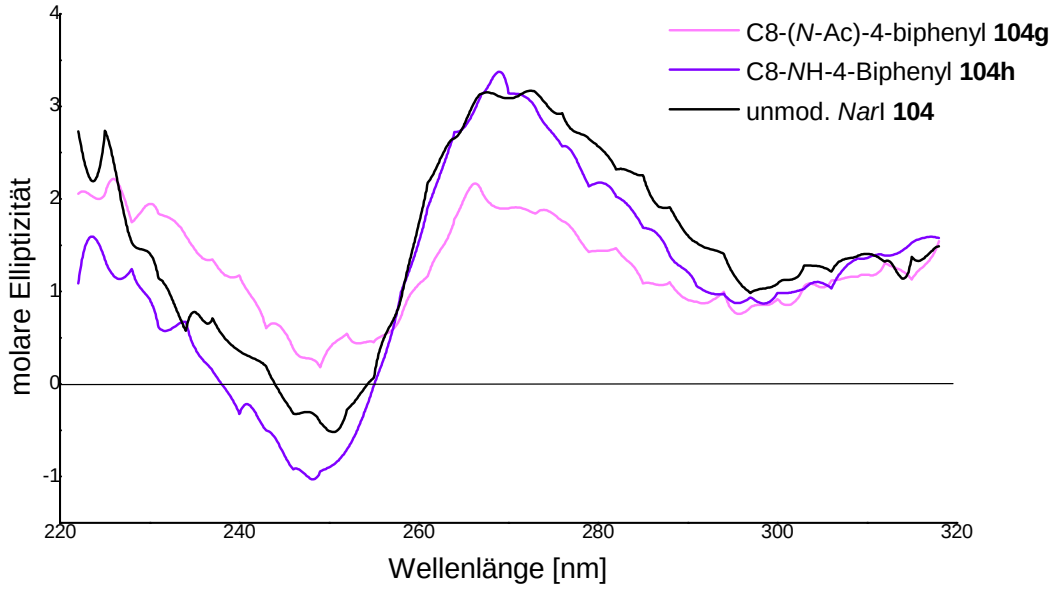


Abb. 123: CD-Spektren der unmodifizierten **104** und 4-Biphenyl **104g**, **h** modifizierten *Nar*I-Sequenzen

Erneut zeigen die CD-Spektren der unmodifizierten und modifizierten *Nar*I-Sequenzen im Duplex die gleichen charakteristischen Verläufe. Erneut kann die Konformation anhand der charakteristischen Minima und Maxima der *B*-DNA zugeordnet werden. Unterschiede bezüglich der Wellenlängen-Minima und -Maxima zwischen den modifizierten C8-*N*H und C8-*N*-(Ac) und der unmodifizierten Sequenz liegen nicht vor. Lediglich eine Intensitätsabnahme beim C8-*N*H-4-biphenyl-modifizierten Strang **104g** wird beobachtet. Eine Konformationsänderung aufgrund der vorhandenen Acetylgruppe lässt sich auch in diesem Fall nicht erkennen.

Ebenso wurden die CD-Spektren der modifizierten und unmodifizierten EcoRI-Sequenzen gemessen. Da es sich hierbei um eine selbstkomplementäre Sequenz handelt, wurden 2 nmol der Oligonucleotide verwendet.

Für eine übersichtliche Darstellung wird auch in diesem Fall nur eine Modifikation gezeigt (Abb. 124).

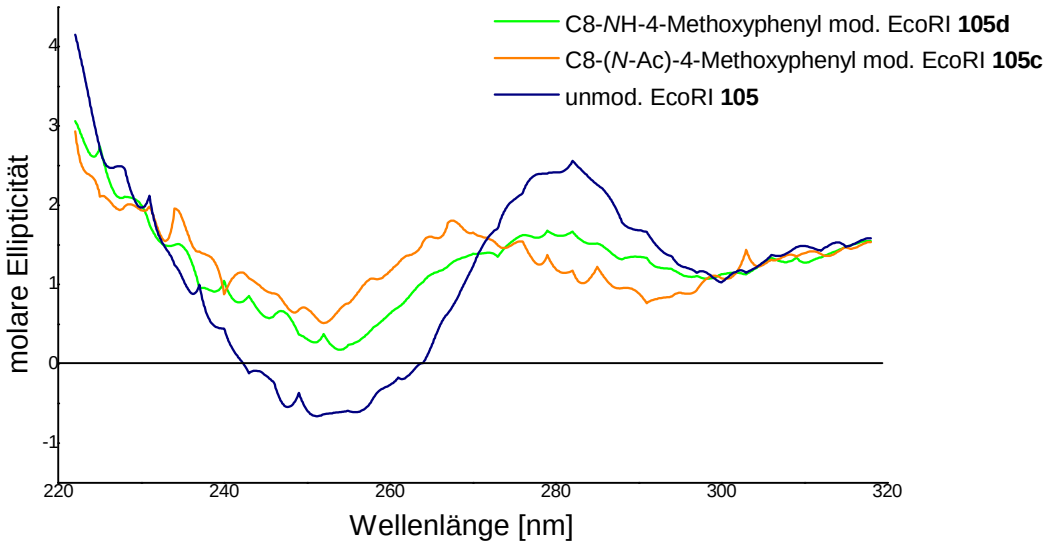


Abb. 124: CD-Spektren der unmodifizierten **105** und modifizierten EcoRI-Sequenzen **105c**, **d**

Zunächst wurde die Modifikation innerhalb der Erkennungssequenz vermessen. Deutlich ist die bathochrome Verschiebung aufgrund der Modifikation zu sehen. Die Acetylgruppe hat auch in diesem Fall keine Auswirkungen auf die vorhandene Konformation. Obwohl jeweils 2 nmol vermessen wurden, ist ein starker Unterschied zwischen der Intensität der molaren Elliptizität zwischen dem unmodifizierten und dem modifizierten Strang zu sehen.

Ebenso konnte keine konformative Veränderung festgestellt werden, wenn sich die Modifikationen außerhalb der Erkennungssequenz befinden.

Abbildung 125 zeigt die CD-Spektren der unmodifizierten **107** und modifizierten 20mer-Oligonucleotide **107b**, **h**. Der Übersichtlichkeit halber werden erneut nur drei CD-Spektren in einer Abbildung gezeigt.

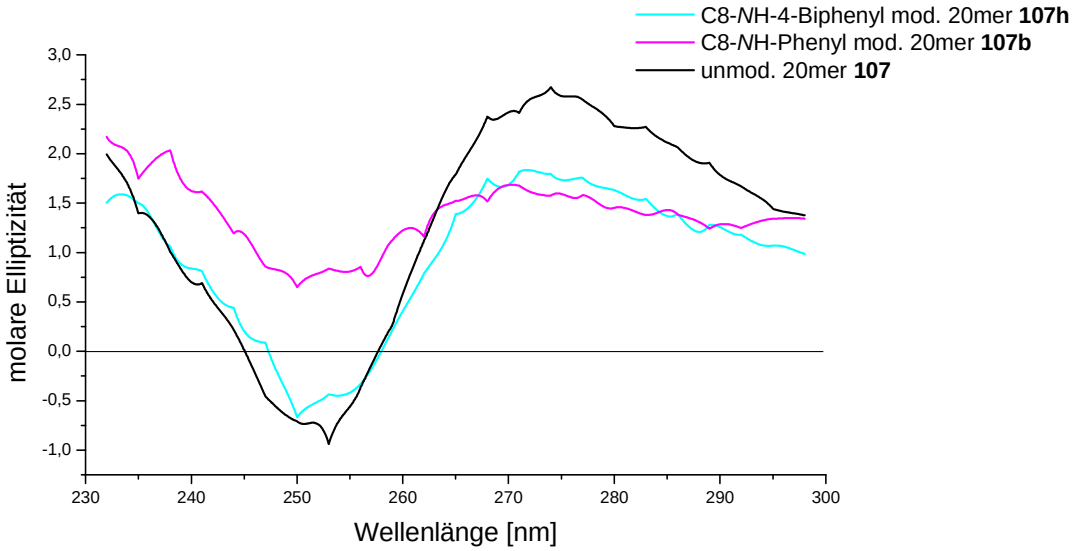


Abb. 125: CD-Spektren der unmodifizierten und modifizierten 20mere **107**, **107b**, **h**

Auch hier ist lediglich ein Unterschied in der molaren Elliptizität zu erkennen, aber nicht in der Position der Minima und Maxima.

In keinem der aufgenommenen CD-Spektren konnte eine konformative Änderung festgestellt werden. Die *N*-acetylierten und unacetylierten Modifikationen scheinen keinen Einfluss auf die Konformation auszuüben. Selbst das Vorhandensein der *syn*-Konformation im Fall der *N*-acetylierten Modifikationen scheint hier keine Rolle zu spielen. Demnach sind die carcinogenen Wirkungen der Modifikationen auf lokale strukturelle Veränderungen oder auf unterschiedliche Interaktionen mit Enzymen zurückzuführen. Diese wurden bereits mittels Restriktion durch das EcoRI-Enzym und Primer-Verlängerungs-Experimente mittels Polymerasen untersucht.

5. Erste Versuche zur Darstellung von IQ modifizierten 2´-Desoxyadenosin-Phosphoramiditen

Mitte der 70er Jahre wurden die ebenfalls mutagenen und carcinogenen ***h**eterocyclic aromatic **a**mines* (HCA) in gekochtem Fisch und Fleisch identifiziert, die während der Pyrolyse von Kreatin, Aminosäuren und Proteinen entstehen. Die größte Unterklasse machen die Aminoimidazoazaarene (AIA) aus, zu der u.a. das 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]chinolin (IQ) **10** gehört, welches als eines der ersten HCAs in gekochtem Essen nachgewiesen worden war. Dieses so genante Nahrungsmittel-carcinogen verursacht, in Tierversuchen nachgewiesen, Tumore in Leber, Dick- und Dünndarm, Lunge und Brust von Nagetieren und konnte positiv auf ihre krebserzeugende Wirkung bei Affen getestet werden.[66, 16]

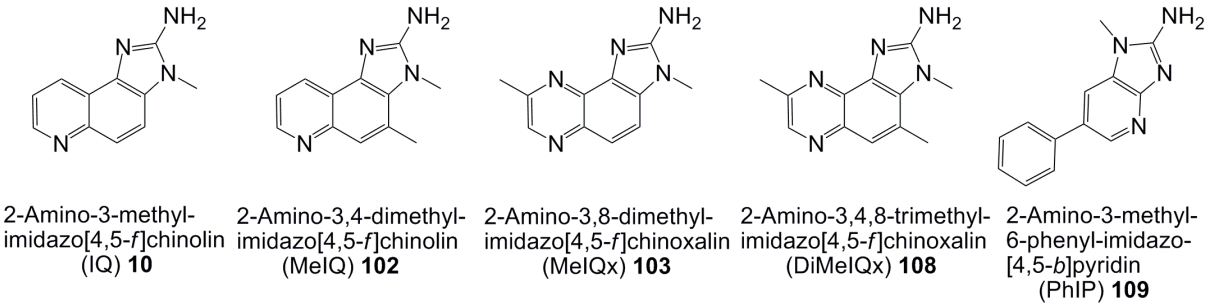


Abb. 126: Chemische Struktur einiger heterocyclischer aromatischer Amine

Die hohe Mutagenität der heterocyclischen aromatischen Amine konnte ebenfalls an *Salmonella Typhimurium* Test-Stämmen bewiesen werden.

Weiterhin ist bereits bekannt, dass das heterocyclische Amin IQ **10** zelluläre DNA angreifen und ebenfalls mit ihr Addukte bilden kann, die vorwiegend am C8 des 2´-Desoxyguanosins gebildet werden. Zusätzlich kann die Modifikation an der N^2-Position stattfinden, wobei als Nebenprodukt das dG-N^2-IQ **110** entsteht. Hier findet die Reaktion interessanter Weise mit der exocyclischen Aminogruppe und nicht mit der C8-Position des 2´-dGs oder mit der Aminogruppe des IQs **10** statt (Abb. 127, S. 137).

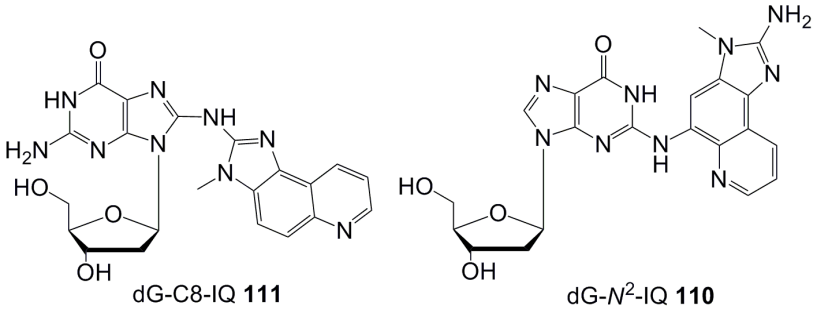


Abb. 127: C8- und N^2- IQ-Addukte des 2´-Desoxyguanosins **111, 110**

Elmquist et al. zeigten 2004 in ihrer Arbeit die Synthese von C8-IQ-2´-dG **111**. Ausgehend von 8-Brom-2´-dG wurden zuerst die 3´-und 5´-Hydroxylgruppen als cyclischer Disilylether, die O^6-Position als Benzylether und die exocyclische Aminogruppe mit Tetramethyldisilylazacyclopentan geschützt. Mittels Buchwald-Hartwig-Kupplung wurde **112** zum IQ-Derivat **113** umgesetzt. Auch hierbei wurden 10 mol% $Pd_2(dba)_3$ und 30% *rac*-BINAP verwendet, aus denen sich der Katalysator-Ligand-Komplex(0) bildet. Als Base wurden zwei Äquivalente LiHMDS verwendet. Bei einer Reaktionszeit von 20 Minuten in Toluol bei 110 °C wurde das Zielmolekül in 68%iger Ausbeute erhalten (Abb. 128). Ebenso erfolgreich war die Synthese ohne vorherige Schützung der N^2-Position, in diesem Fall konnte die Zielverbindung in 62%iger Ausbeute synthetisiert werden. Auch gelang der Einbau des IQ-modifizierten 2´-dG-Phosphoramidits in Oligonucleotid Stränge.[66]

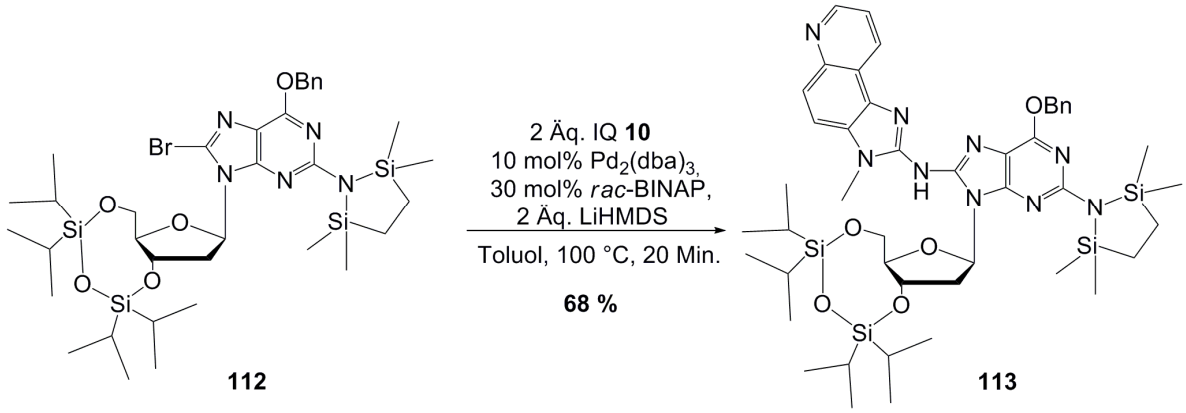


Abb. 128: Synthese des C8-IQ-2´-dG **113** nach Elmquist *et al.*[4]

Takamura-Enya et al. beschrieben in ihrer Arbeit 2006 die Synthese des C8-IQ-2´-dGs **115** ausgehend vom 3´,5´-TBDMS geschützten 2´-Desoxyguanosin **114**. Die Buchwald-Hartwig-Kupplung wurde mit 10 mol% $Pd_2(dba)_3$, 30 mol% Xantphos und 1 Äq. Cäsiumcarbonat als Base in Toluol durchgeführt. Die Reaktionszeit wurde nicht angegeben. Hierbei wurde das Zielmolekül in einer Ausbeute von 77% erhalten (Abb. 129).[48]

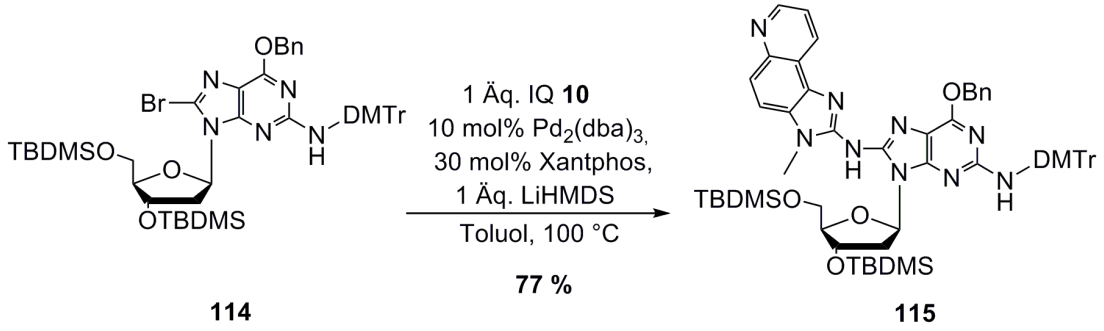


Abb. 129: Synthese des C8-IQ-2´-dG **115** nach Takamura-Enya *et al.*[48]

Ausgehend von dem geschützten 2´-Desoxyguanosin-Derivat gelang auch *Bonala et al.* 2006 in einer Buchwald-Hartwig-Kupplung die Synthese des C8-IQ-2´-dGs **116** mit einer Ausbeute von 94%, wenn die exocyclische Aminogruppe mit Tetramethyldisilylazacyclopentan, die O^6-Position als Benzylether und die 3´,5´-OH-Gruppen als TBDMS-Ether geschützt wurden. Die Buchwald-Hartwig-Kupplung wurde mit 10 mol% $Pd_2(dba)_3$, 30 mol% Xantphos und LiHMDS in Toluol für 20 Minuten und bei einer Temperatur von 100 °C durchgeführt (Abb. 130). Nach Überführung in das Phosphoramidit erfolgte auch hier der Einbau in die Oligonucleotide.[104]

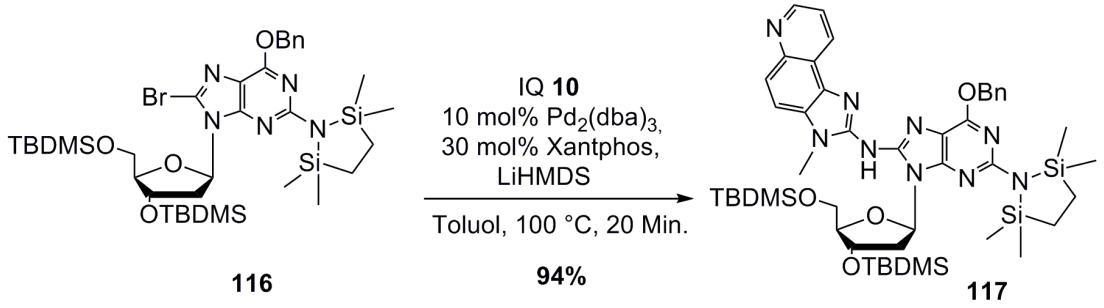


Abb. 130: Buchwald-Hartwig-Kupplung des geschützten Br-2´-dG **116** mit IQ **10** nach *Bonala et al.*[104]

Die Palladium-katalysierten Kreuzkupplungsreaktionen zur C-*N* Bindungsknüpfung unter Verwendung der Mesylat-Abgangsgruppe wurde ebenfalls in einer Arbeit von *Buchwald et al*. 2008 beschrieben. Hierbei wurde der Ligand **118** eingesetzt, wobei Ausbeuten von 82 - 99% erreicht werden konnten, wenn z.B. Palladium-Acetat als Pd-Quelle verwendet wurde. Die Katalysator-Menge variierte dabei zwischen 0.01 mol% und 1 mol%. Es konnten sowohl elektronenreiche als auch elektronenarme Aryl-Mesylate mit hohen Ausbeuten gekuppelt werden (Abb. 131).[105]

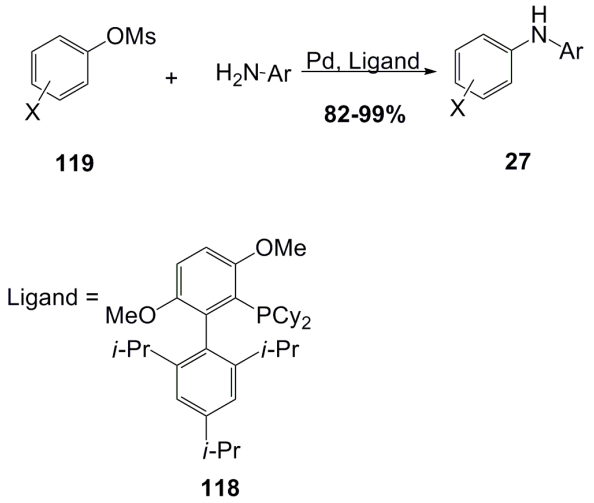


Abb. 131: Palladium-katalysierte C-*N*-Kreuzkupplung von Aryl-Mesylaten mit Arylaminen

Da es bisher keinen synthetischen Zugang und keine Untersuchungen zu IQ-modifizierten 2´-Desoxyadenosin-Derivaten gibt, sollte für erste Synthesen zunächst das Lebensmittelcarcinogen 2-Amino-3-methylimidazo-[4,5-*f*]chinolin (IQ) **10** in drei Stufen aus 5-Methoxychinolin **120** synthetisiert werden (Abb. 132).

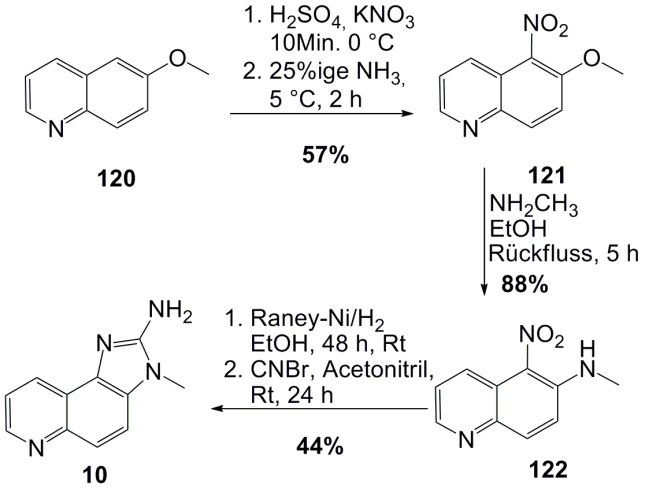


Abb. 132: Synthese von IQ **10** aus 5-Methoxychinolin **120** in drei Stufen

Ausgehend von 5-Methoxychinolin **120** wurde im ersten Schritt eine Nitrierung durchgeführt, die mit 57% Ausbeute zu **121** führte. Dabei findet die Nitrierung bevorzugt an Position 6 statt, da nach Ausbildung des σ-Komplexes fünf Resonanzformeln formuliert werden können, von denen zwei die aromatische Struktur des Pyridinringes beibehalten. Bei einer Nitrierung an Position 4 können ebenfalls fünf mesomere Grenzstrukturen aufgestellt werden, jedoch wird hier nur bei einer Struktur die Aromatizität des Pyridin-Ringes beibehalten. Die anschließende Umwandlung in das 5-Methylamino-6-nitrochinolin **122** erfolgte mit wässrigem Methylamin in Ethanol mit 88% Ausbeute. Durch Reduktion mit Raney-Nickel und Wasserstoff wurde die Nitrogruppe zunächst zum Amin reduziert und die anschließende Addition von Bromcyan führte zum Ringschluss. Durch Tautomerie wird schließlich die gewünschte Zielverbindung **10** erhalten.[106]

5.1 Syntheseroute I

Syntheseroute I verfolgt den Weg ausgehend vom 8-Brom-2´-dA **56** mittels der Palladium-katalysierten Buchwald-Hartwig-Kupplung (Abb. 133).

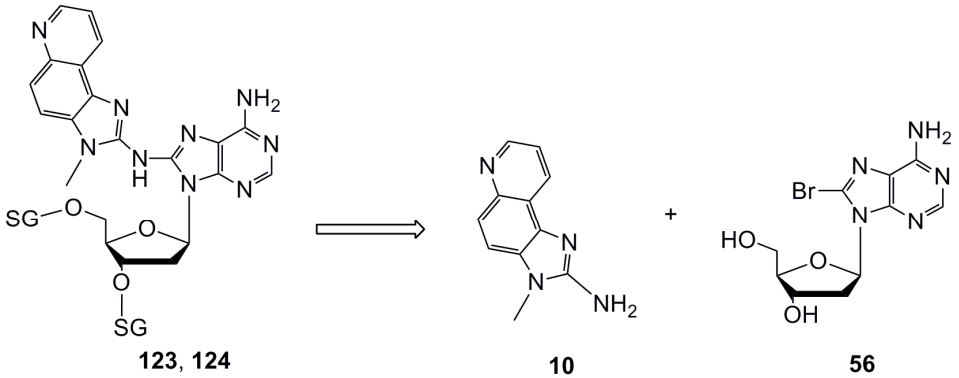


Abb.133: Retrosynthetische Darstellung der Syntheseroute I

Da keine Literaturvorschrift für die Synthese des 8-IQ-2´-dAs **123**, **124** existierte, wurden verschiedene Kupplungsbedingungen erprobt (Abb. 134, S. 141).

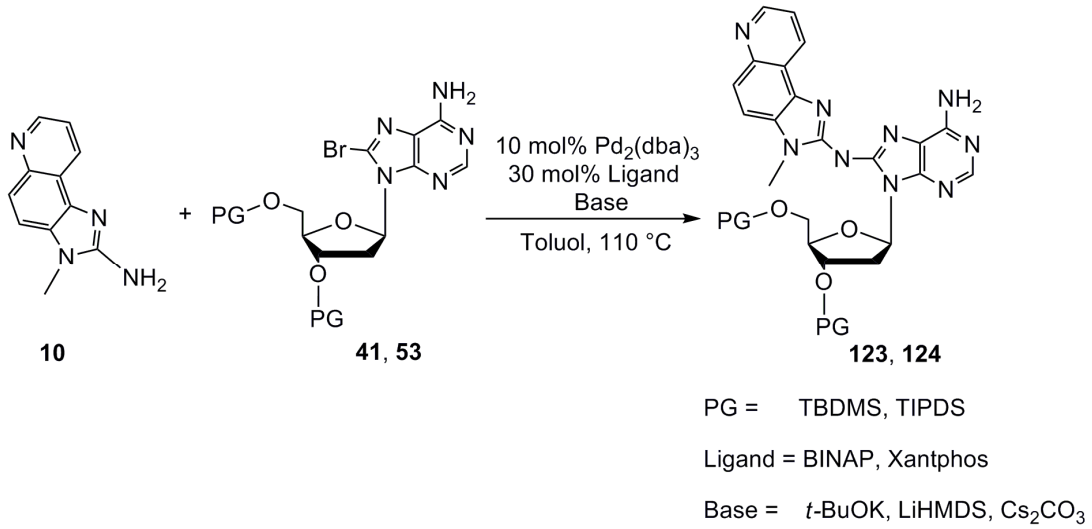


Abb. 134: Buchwald-Hartwig-Kupplung

Für die Buchwald-Hartwig-Kupplung wurden jeweils 30 mol% Ligand und 10 mol% $Pd_2(dba)_3$ eingesetzt. Die Reaktion fand in Toluol bei einer Temperatur von 110 ℃ statt. Die Ergebnisse der Kreuzkupplung sind in Tab. 27 zusammengefasst.

Kupplung	SG	Ligand	Base	Reaktionsbed.	Ergebnis
a	TBDMS	Xantphos	LiHMDS	Toluol, 110 ℃, 4d anschl. Mikrowelle, 1 h, 150 W, 150 ℃	Edukt **53**
b	TBDMS	Xantphos	Cs_2CO_3	Toluol, 110 ℃, 4d anschl. Mikrowelle, 1 h, 150 W, 150 ℃	Edukt **53**
c	TBDMS	BINAP	LiHMDS	Toluol, 110 ℃, 3d, anschl. Mikrowelle, 1 h, 150 W, 150 ℃	Edukt **53**
d	TBDMS	BINAP	*t*-BuOK	Toluol, 110 ℃, 4 d	C8-H **125**
d'	TBDMS	BINAP	*t*-BuOK	Mikrowelle, 150 W, 150 ℃, 1 h	C8-H **125**
e	TIPDS	BINAP	*t*-BuOK	Toluol, 110 ℃, 18 h	Spuren **124**
f	TIPDS	BINAP	LiHMDS	Toluol, 110 ℃, 24 h	Zersetzung
g	TIPDS	Xantphos	LiHMDS	Toluol, 110 ℃, 24 h	Zersetzu ng
h	TIPDS	Xantphos	Cs_2CO_3	Toluol, 110 ℃, 48 h	Spuren **124**

Tab. 27: Zusammenfassung der Buchwald-Hartwig-Kupplung zwischen dem geschützten 8-Br-2´-dA **41**, **53** und IQ **10**

Bei Reaktionsvariante **a** wurde Xantphos als Ligand und LiHMDS als Base verwendet. Nach 24 h war die minimale Bildung einer neuen Verbindung dünnschichtchromatographisch detektierbar, jedoch setzte sich das Edukt **53** auch nach weiteren 3 Tagen Reaktionszeit nicht weiter um. Daraufhin wurden einige Aliquote aus der Reaktionslösung entnommen und 1 h bei 150 W und 150 °C in der Mikrowelle erwärmt. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung der Reaktionsmischung ergab keine weitere Umsetzung des Eduktes **53**. Das gewünschte Produkt **123** konnte nicht erhalten werden. Stattdessen wurde das Edukt **53** reisoliert.

Reaktionsvariante **b** wurde mit Xantphos als Ligand aber mit Cäsiumcarbonat als Base durchgeführt. Erneut konnte nach dünnschichtchromatographischer Analyse nur die geringfügige Bildung einer weiteren Verbindung beobachtet werden. Daraufhin wurde auch in diesem Fall ein Aliquot entnommen und 1 h bei 150 W und 150 °C in der Mikrowelle erhitzt. Die dünnschichtch romatographische Untersuchung der Reaktionslösung zeigte auch hier keine weitere Veränderung. Erneut konnte kein Produkt **123** erhalten werden. Es wurde auch hier lediglich das Edukt **53** reisoliert.

Bei Reaktionsweg **c** unter Verwendung der Base LiHMDS mit dem Liganden *rac*-BINAP ergab, wie bereits bei Variante **a** und **b**, nach 3 Tagen Reaktionszeit nur eine geringe Bildung einer weiteren Verbindung, welche auch hier dünnschichtchromatographisch detektiert werden konnte. Die nachfolgende, einstündige Mikrowellenumsetzung eines 2 mL Aliquots ergab auch hier keine weitere Veränderung. Erneut konnte nur das Edukt **53** reisoliert werden.

Für die Reaktion **d** von 8-Br-2´-dA **53** mit IQ **10** wurde der Ligand *rac*-BINAP eingesetzt. Als Base wurde *t*-BuOK verwendet. Die Reaktion wurde für 4 Tage auf 110 °C erwärmt, wobei schon nach 24 h die Bildung e iner weiteren Verbindung dünnschichtchromatographisch zu erkennen war. Nach 4 Tagen wurde die Reaktion abgebrochen, da kein Produkt mehr gebildet wurde. Nach säulenchromatographischer Reinigung über Kieselgel konnte nur noch 3´,5´-*O*-Bis(TBDMS)-2´-dA **125** erhalten werden. Offensichtlich erfolgte hier die Abspaltung des Broms an C8. Es können keine Aussagen darüber gemacht werden, ob bereits dieses Produkt von Anfang an entstanden war oder ob es während der Aufarbeitung entstanden ist. Da hier allerdings eine Dehalogenierung stattfindet, bedeutet es, dass der erste Schritt der Reaktion offensichtlich funktioniert.

Da es sich bei diesem Weg scheinbar um die beste Variante handelte, wurde die Reaktion bei gleichem Ansatz von Base und Ligand in der Mikrowelle bei 150 W und 150 °C und 1 h Reaktionszeit wiederholt (Reaktionsv ariante **d´**). Die dünnschicht-chromatographische Untersuchung der Reaktion zeigte einen quantitativen Umsatz des Eduktes **53**. Um auszuschließen, dass sich das eventuell gebildete Produkt auf der Säule zersetzt, wurde Aluminiumoxid (Alox, neutral, Akt. Stufe III) zur säulen-chromatographischer Reinigung verwendet. Aber auch hier konnte nur das 3´,5´-TBDMS geschützte 2´-Desoxyadenosin **125** isoliert werden (Abb. 135).

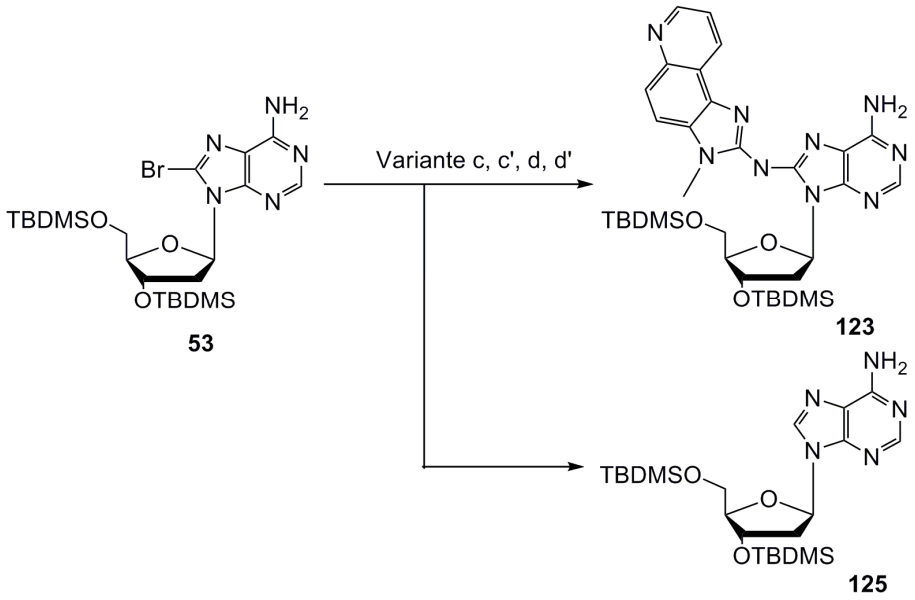


Abb. 135: Reaktionsvarianten **c**, **c´**, **d** und **d´** der Buchwald-Hartwig-Kupplung

Da die Bildung des C8-IQ-2´-dAs **123** unter Verwendung der TBDMS-Schutzgruppe offensichtlich nicht erfolgte bzw. lediglich das 3´,5´-Bis(TBDMS)-2´-dA **125** erhalten werden konnte, wurden die Reaktionen unter Verwendung des TIPDS-geschützten Nucleosids **41** wiederholt.

Bei den Reaktionswegen **f** und **g**, welche die Verwendung der Base LiHMDS gemeinsam hatten und sich nur in dem Einsatz des Liganden für die Buchwald-Hartwig-Kupplung unterschieden, konnten nach dünnschichtchromatographischer Untersuchung nach 24 h Reaktionszeit weder Edukt **41** noch Produkt **124** detektiert werden. Anscheinend wirkt die Base LiHMDS in Kombination mit der TIPDS-Schutzgruppe zu stark und führt sogar zur Zersetzung des Eduktes **41**.

Die Synthesevarianten **e** und **h** führten zur fast quantitativen Bildung eines Produktes. Synthese **e**, mit *t*-BuOK als Base und *rac*-BINAP als Ligand, konnte bereits nach 18 h aufgearbeitet und gereinigt werden. Die ^{1}H-NMR spektroskopische Untersuchung ergab das Vorhandensein von Signalen im aromatischen Bereich, die von der chemischen Verschiebung dem IQ-Substituenten **10** entsprechen würden, aber keine eindeutige Zuordnung zuließen. Außerdem konnte das H1´-Proton eindeutig identifiziert werden. Die anderen an der 2´-Desoxyribose befindlichen Protonen konnten allerdings nicht zugeordnet werden. Selbst die erneute chromatographische Reinigung führte zu keiner Verbesserung des ^{1}H-NMR Spektrums.

Variante **h** führte nach 48 h Reaktionszeit zu dem gleichen Resultat. Auch hier konnten nach säulenchromatographischer Reinigung nur Spuren des Produkts **124** identifiziert werden. Diese reichen allerdings nicht, um weitere Reaktionsschritte durchführen zu können.

Zuletzt wurde die Kupplung mit den bereits mit den Arylaminen erfolgreich verwendeten Kupplungsbedingungen erprobt (Abb. 136).

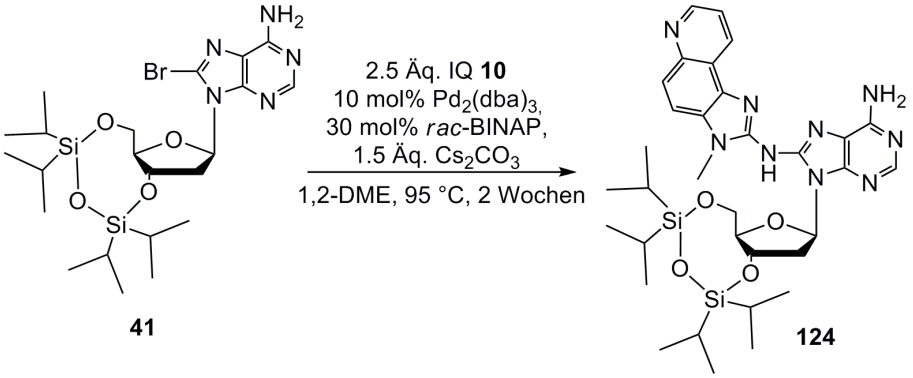


Abb. 136: Buchwald-Hartwig-Kupplung

Aber auch in diesem Fall konnte das Produkt **124** nicht erhalten werden. Die Reaktion wurde nach 2 Wochen abgebrochen, da keine weitere Umsetzung des Eduktes **41** detektierbar war. Trotz mehrfacher Reinigung zeigte das ^{1}H-NMR-Spektrum erneut nur Spuren des Produktes **124**.

Da die Buchwald-Hartwig-Kupplung zwischen IQ **10** und dem 3´,5´-geschützten 8-Br-2´-dA **41** weder unter Verwendung der TBDMS- noch der TIPDS-Schutzgruppe zu den gewünschten Produkten **123**, **124** führte, wurde die Kupplung mit Brombenzol **26** durchgeführt.

Somit konnte ein Hinweis darauf erhalten werden, ob die sterische Hinderung zwischen dem Heterocyclus und den 3´,5´-geschützten 2´-Desoxyadenosin **41**, **53** der Grund für das Scheitern der Synthese ist. Weiterhin konnte dadurch überprüft werden, ob Brom an der C8-Position mit dem Heterocyclus IQ **10** kompatibel ist oder eine ganz andere Syntheseroute ausprobiert werden muss.

Zur Darstellung des 2-*N*-Phenyl-3-methylimidazo-[4,5-*f*]chinolins **126** wurden 3 Äq. Brombenzol **26**, 10 mol% $Pd_2(dba)_3$, 30 mol% *rac*-BINAP und 1.5 Äq. *t*-BuOK als Base eingesetzt. Nach 48 h Reaktionszeit bei 110 °C in Toluol konnte 2-*N*-Phenyl-3-methylimidazo-[4,5-*f*]chinolin **126** in 34% Ausbeute erhalten werden (Abb. 137).

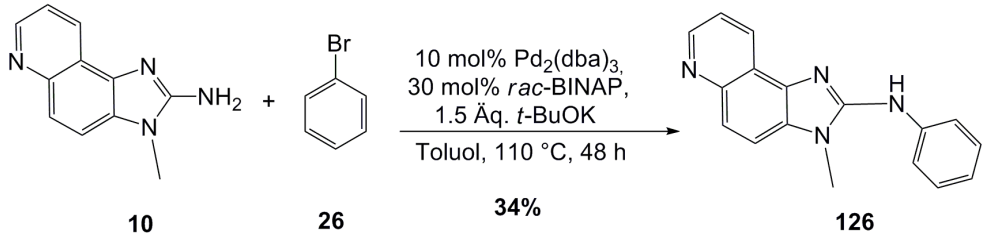


Abb. 137: Darstellung von 2-*N*-Phenyl-3-methylimidazo-[4,5-*f*]chinolin **126** durch die Buchwald-Hartwig-Kupplung

Da das Produkt **126** in nur 34% Ausbeute entstanden ist, kann dieses ein Hinweis darauf sein, dass die Buchwald-Hartwig-Kupplung mit einer Imidazol-analogen Verbindung erschwert ist.

Allerdings zeigt die Reaktion deutlich, dass es möglich ist, unter den gegebenen Bedingungen die beiden Reaktanden miteinander zu kuppeln.

Da die Umsetzung von 8-Br-2´-dA **41**, **53** mit IQ **10** nicht zum Kupplungsprodukt führte, wurde eine Testreaktion mit dem weniger sterisch gehinderten 2-Amino-1-methylimidazol **127** durchgeführt.

Das TBDMS geschützte 8-Br-2´-dA **53** wurde mit 3 Äq. 2-Amino-1-methylimidazol **127**, 30 mol% $Pd_2(dba)_3$, 10 mol% *rac*-BINAP und 1.5 Äq. *t*-BuOK in 20 mL Toluol gelöst und für 72 h bei 110 °C unter Rückfluss erhitzt (Abb. 138, S. 146). Die dünnschichtchromatographische Untersuchung der Reaktionslösung zeigte aber nur eine geringfügige Umsetzung vom Edukt **53**. Die Reaktion wurde nach 72 h abgebrochen.

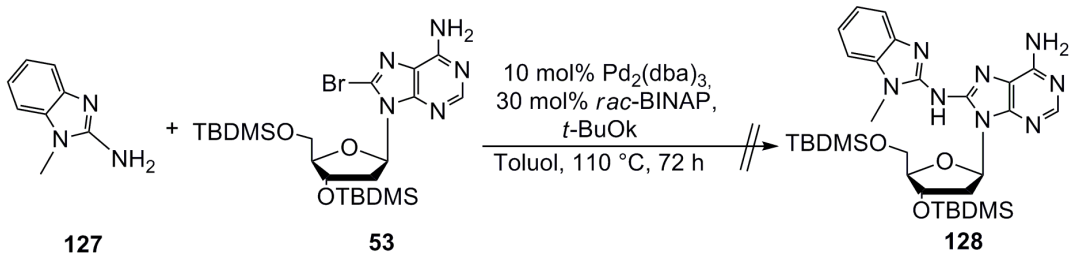


Abb. 138: Versuch zur Darstellung von 8-(2-*N*-3-Methylbenzimidazol)-3´,5´-*O*-bis(TBDMS)-2´-desoxyadenosin **128**

Das Ergebnis dieser Reaktion führte ebenso zu der Erkenntnis, dass die sterische Hinderung nicht der Hauptgrund des Scheiterns der Reaktion ist, da die Kupplung zwischen dem Brombenzol **26** und IQ **10** erfolgreich verlief. Vielmehr könnten die elektronischen Effekte des Imidazol-Ringes ausschlaggebend sein. Ebenso könnte Bromid als Ausgangsgruppe nicht ideal für die Buchwald-Hartwig-Kupplung mit IQ **10** sein.

Die Darstellung des 8-(2-*N*-3-methylimidazol)-3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-desoxyadenosins **129** fand analog zur Synthese von 8-(2-*N*-3-methylbenzimidazol)-3´,5´-*O*-bis(TBDMS)-2´-desoxyadenosin **128** statt (Abb. 139).

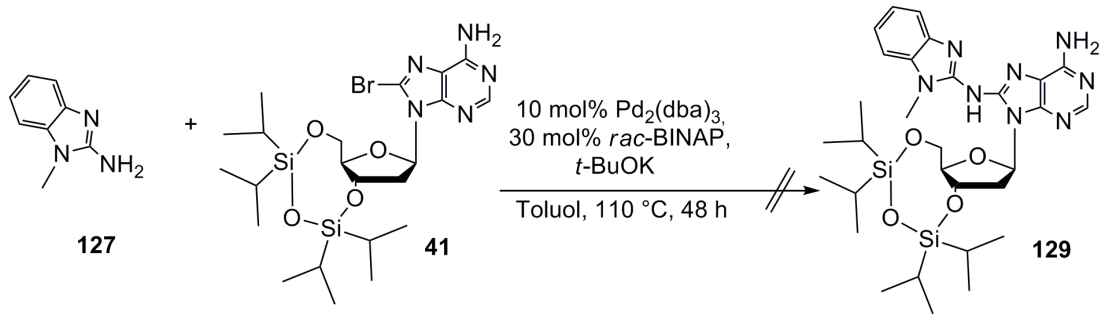


Abb. 139: Versuch zur Darstellung von 8-(2-*N*-3-methylimidazol)-3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-desoxyadenosin **129**

Wie bei der Synthese des 8-(2-*N*-3-methylimidazo[4,5-*f*]chinolin)-3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-desoxyadenosins **124** (vgl. S. 138, **e, h**) konnten auch hier nur Spuren der Zielverbindung **129** mittels ^{1}H-NMR-Spektroskopie identifiziert werden. Dieses Ergebnis stützte die Annahme, dass die erst vermutete sterische Hinderung nicht primär für das Misslingen der Reaktion verantwortlich ist.

5.2 Syntheseroute II

Da die Buchwald-Hartwig-Kupplung zwischen dem 3´,5´-OH geschützten 8-Br-2´-dA **41**, **53** mit Brom als Abgangsgruppe in der Kreuzkupplung nicht zum gewünschten Produkt **123**, **124** führte, sollte 8-Br-2´-dA **56** in 8-Mesyl-2´-dA **130**, **131** überführt werden. Dieses sollte dann nach der Methode von *Buchwald* in der Kreuzkupplung mit IQ **10** eingesetzt werden.[105]

Mit dem Versuch, eine andere Austrittsgruppe für die Buchwald-Hartwig-Kupplung einzuführen, sollte ermittelt werden, ob die Kupplungsreaktion am Vorhandensein der Br-Austrittsgruppe scheitert und sich eventuell Mesylat besser eignet (Abb. 140).

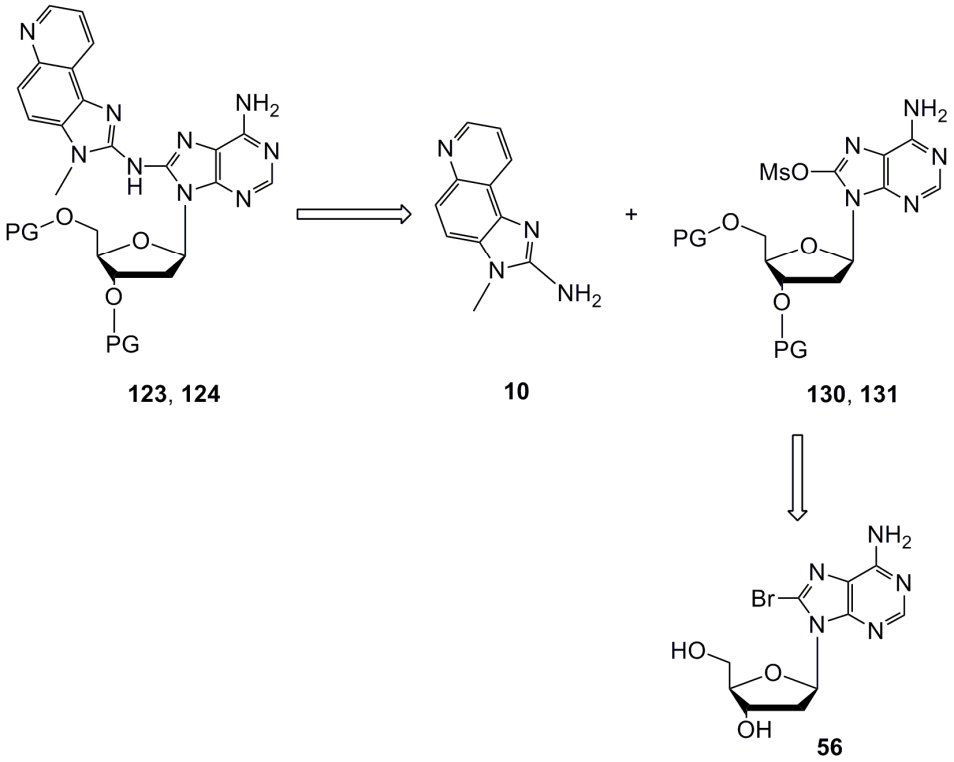


Abb. 140: Retrosynthetische Darstellung der Syntheseroute II

Der erste Schritt zur Synthese von 8-Mesyl-2´-dA **130**, **131** beinhaltete die Darstellung von 8-Oxo-2´-dA **133**. Hierbei wurde versucht, die Zielverbindung auf zwei verschiedenen Synthesewegen darzustellen: Zuerst nach der Route von *Bodepudi et al.*, welche über den 3´,5´-Bis(TBDMS)-geschützten 2´-dA Benzylether **132** und dessen anschließende Reduktion, Verbindung **133** liefern sollte.[107] Des Weiteren wurde die Synthese nach *Chatgilialogu et al.* angewendet.[108]

Diese Syntheseroute beinhaltete eine zwei Stufen Reaktion ausgehend von 8-Br-3´,5´-bis(TBDMS)-2´-dA **53**. Im ersten Schritt sollte das Brom durch Benzylalkoholat substituiert werden. Dieses wurde vorher *in situ* aus Benzylalkohol und elementarem Natrium bzw. NaH hergestellt. Daraufhin sollte die Reduktion des Benzylethers **132** folgen (Abb. 141).[106]

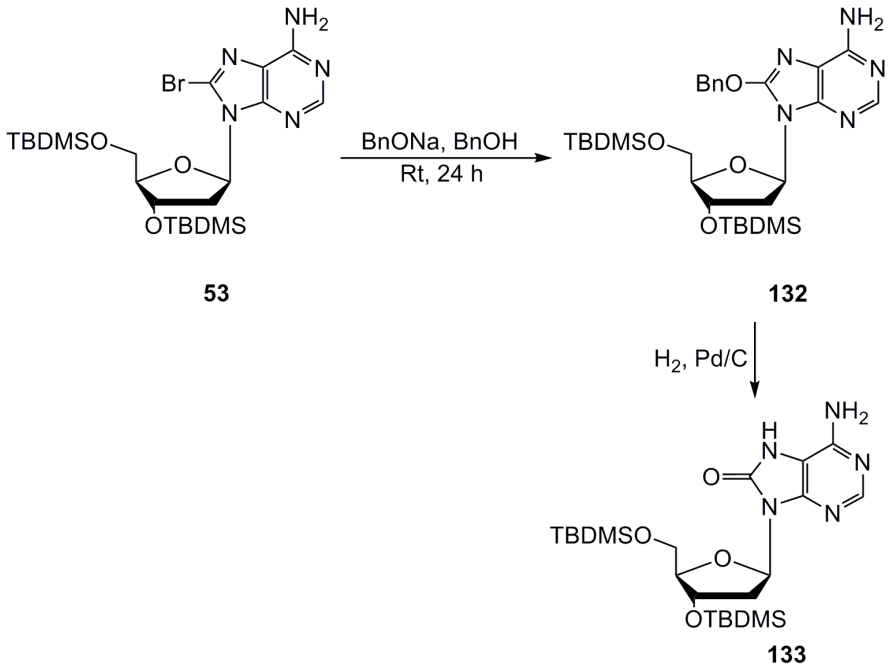


Abb. 141: Darstellung des 8-Oxo-3´,5´-bis(TBDMS)-2´-dA **133**

Zur Darstellung von **132** sollte aus elementarem Natrium und Benzylalkohol das Natriumbenzylalkoholat dargestellt und anschließend mit **53** versetzt werden. Die Reaktionsmischung wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde mit konzentrierter Salzsäure neutralisiert. Nach Destillation des Lösungsmittels sollte die Verbindung mit einer Mischung aus MeOH, EE und PE kristallisiert werden, wobei jedoch kein Feststoff ausfiel. Auch die ^{1}H-NMR-spektroskopische Untersuchung zeigte keine für die Verbindung charakteristischen Signale.

Versuch	Einwaage	
	1.	**2.**
1	Na (100 mg)	Benzylalkohol (20 mL)
2	Benzylalkohol (20 mL)	Na (100 mg)
3	Benzylalkohol (20 mL) über Molsieb getrocknet	Na (100 mg)
4	Natriumspiegel	
5	NaH (105 mg)	Benzylalkohol (20 mL)

Tab. 28: Darstellung von Natriumbenzylalkoholat

Es wurde vermutet, dass bereits die Bildung des Benzylalkoholats nicht quantitativ erfolgte, so dass es zu keiner Umsetzung zum gewünschten Produkt **132** kam. Dieser Ansatz wurde noch zwei Mal durchgeführt, um das Ergebnis überprüfen zu können. Ein weiteres Mal wurde versucht, einen Natriumspiegel herzustellen. Dieser Weg war ebenfalls nicht erfolgreich. Daraufhin wurde die Synthese mit NaH anstelle von elementarem Na wiederholt. Wieder zeigte das ^{1}H-NMR-Spektrum keine Signale, die der Zielverbindung **132** zugeordnet werden konnten. Bei beiden Synthesen konnte nur das Startmaterial identifiziert werden. Somit ist die Methode nach *Bodepudi et al.* nicht geeignet, um das 8-Br-3´,5´-bis(TBDMS)-2´-dA **56** in das 8-Oxo-3´,5´-bis(TBDMS)-2´-dA **132** zu überführen, da diese Reaktion offensichtlich schon bei der Synthese der ersten Stufe scheitert.

Da der von *Bodepudi et al.* beschriebene Weg über das Benzylalkoholat nicht erfolgreich war, wurde die Synthese nach *Chatgilialogu et al.* verwendet.

8-Oxo-2´-dA **134** konnte aus 8-Br-2´-dA **56**, 3 Äq. β-Mercaptoethanol und 10 Äq. Triethylamin in Wasser bei einer Reaktionszeit von 48 h bei 100 °C mit einer Ausbeute von 76% erhalten werden (Abb. 142).

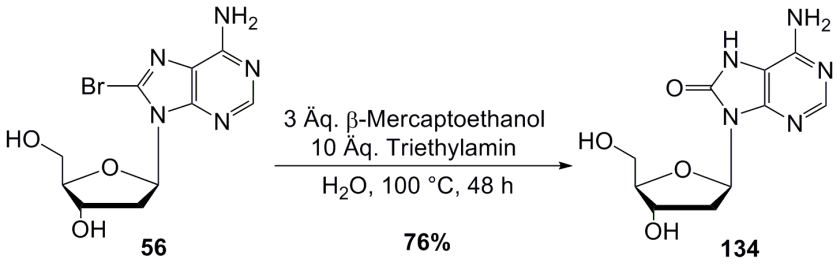


Abb. 142: Darstellung von 8-Oxo-2´-dA **134**

Die Bildung des 8-Oxo-2´-dA **134** aus 8-Br-2´-dA **56** lässt sich durch folgenden Mechanismus (Abb. 143) erklären.

Aus β-Mercaptoethanol bildet sich durch Deprotonierung mit Triethylamin das Thionat-Anion **II**, welches in der Lage ist, nucleophil an C8 des Desoxyadenosins **I** anzugreifen, wobei sich das Intermediat **III** bildet. Die Abspaltung des Bromid-Anions führt zum Thio-Analogon **IV**. Dieses kann durch ein weiteres Äquivalent Triethylamin an der Hydroxylgruppe deprotoniert werden **V** und durch intramolekularen Ringschluss das Thio-Oxa-Cyclopropyl-Derivat **VI** ergeben. Dieses ist in der Lage durch eine Ringöffnungsreaktion zum Oxa-gebundenen Intermediat **VII** zu reagieren. Intramolekulare nucleophile Substitution führt schließlich zum gewünschten 8-Oxo-2´-dA **VIII** und Thiocyclopropan. Ebenso kann die direkte Substitution von **IV** durch OH^- zur Bildung des Produkts **VIII** führen.[108]

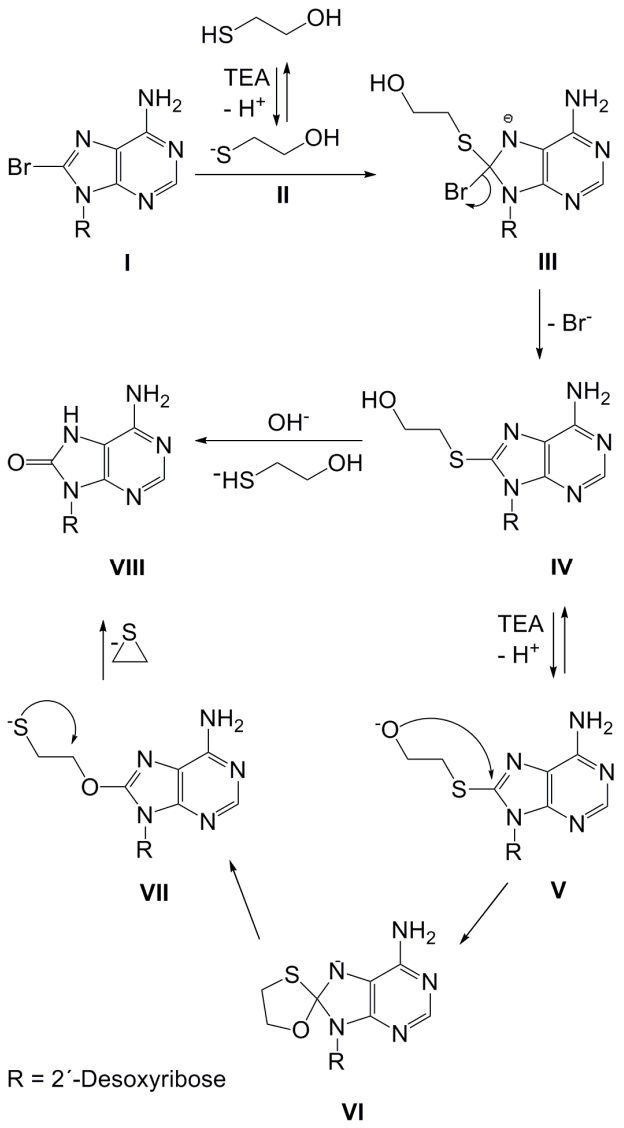


Abb. 143: Reaktionsmechanismus der Bildung von 8-Oxo-2´-dA[108]

Bevor die Mesylierung erfolgen konnte, musste im nächsten Schritt erst die Schützung der 3´,5´-Hydroxylgruppen erfolgen. Diese wurde mit TBDMS-Cl durchgeführt (Abb. 144).

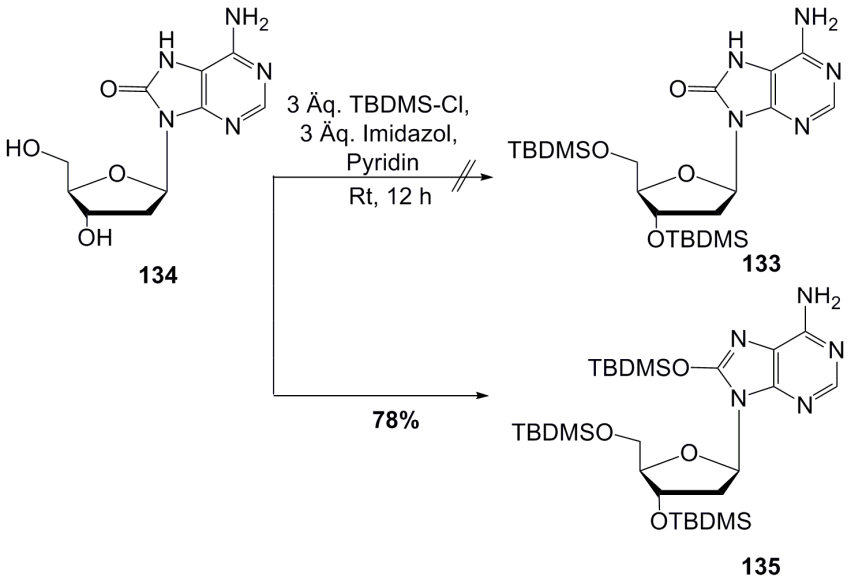


Abb. 144: Versuch zur Synthese von 8-Oxo-3´,5´-*O*-bis(TBDMS)-2´-desoxyadenosin **133**

Nach 12 h Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde das Hauptprodukt **135** aus dem Reaktionsgemisch mittels Chromatotron isoliert. Die Untersuchung der Substanz mittels ^{1}H-NMR-Spektroskopie ergab, dass es sich hierbei um das dreifach TBDMS-geschützte 8,3´,5´-*O*-Tris(TBDMS)-2´-dA **135** handelte. Sogar der Einsatz von wenigeren Äquivalenten an TBDMS-Cl führte stets zu Mehrfachsubstitutionen. Auch war es nicht möglich, die TBDMS-Schutzgruppe selektiv von der C8-Position wieder abzuspalten.

Da die Reaktion von 8-Oxo-2´-dA **134** mit TBDMS-Cl zum dreifach geschützten 8,3´,5´-*O*-Tris(TBDMS)-2´-dA **135** führte, wurde die Schützung des 8-Oxo-2´-dAs **134** mit 1.5 Äq. TIPDS-Cl wiederholt.

Die Reaktion wurde in Pyridin bei Raumtemperatur durchgeführt und dünnschichtchromatographisch verfolgt (Dichlormethan/MeOH, 9:1). Da nach einer Woche Reaktionszeit noch keine weitere Entwicklung bei der dünnschicht-chromatographischen Untersuchung erkennbar war, wurde ein weiteres Äquivalent TIPDS-Cl hinzugegeben. Schließlich wurde die Reaktion abgebrochen. Es konnte nur das Edukt **134** reisoliert werden (Abb. 145, S. 152).

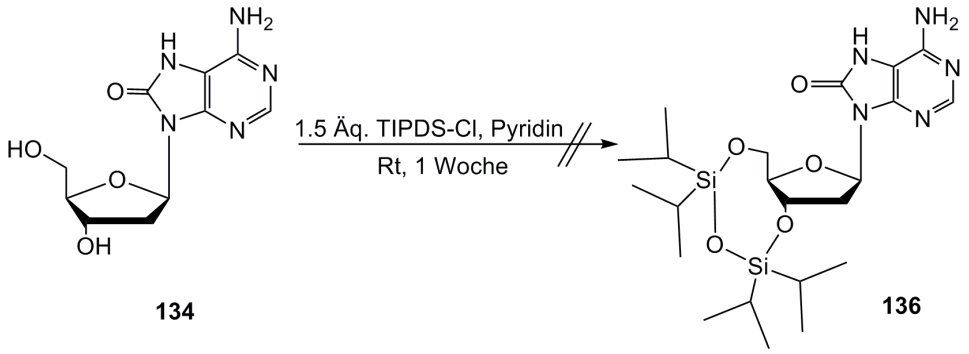


Abb. 145: Versuch zur Darstellung von 8-Oxo-3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-dA **136**

Da eine Schützung der 3´,5´-Hydroxylgruppen am 8-Oxo-2´-dA **134** weder mit der TBDMS- noch mit der TIPDS-Schutzgruppe möglich war, sollte versucht werden, alle OH-Gruppen in die Mesylate zu überführen. Dadurch könnte ebenfalls ermittelt werden, ob die Reaktion von Mesylchlorid mit 8-Oxo-2´-dA **134** zu einer Mesylierung an C8 führt. Auch könnte die Kupplung immer noch stattfinden, die nun an den Positionen C8 und 3´,5´ möglich wäre.

8-Oxo-2´-desoxyadenosin **134** wurde mit 3 Äq. Mesylchlorid in Pyridin bei Raumtemperatur versetzt und für eine Woche gerührt, wobei nach dünnschichtchromatographischer Untersuchung des Reaktionsgemisches keine Umsetzung zum Produkt **137** beobachtet werden konnte. Somit konnte auch hier keine selektive Schützung erreicht werden (Abb. 146).

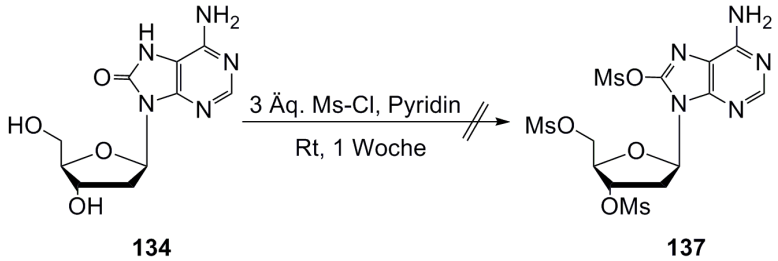


Abb. 146: Versuch zur Darstellung von 8,3´,5´-Tri-*O*-mesyl-2´-desoxyadenosin **137**

Das gewünschte 8-IQ-2´-dA **123**, **124** konnte mittels Buchwald-Hartwig-Kupplung aus 8-Br-2´-dA **56** und IQ **10** nicht synthetisiert werden. Auch konnte das geschützte 8-Mesyl-2´-dA **137** nicht erhalten werden, um eine erneute Buchwald-Hartwig-Kupplung mit Mesylat als Ausgangsgruppe durchführen zu können.

6. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Kenntnisse über die Auswirkungen sequenzspezifisch in modifizierte Oligonucleotide eingebaute 2´-Desoxyadenosin Arylamin-Addukte zu erlangen.

Aromatische Amine sind indirekte Carcinogene, die erst durch Metabolisierung mit den Nucleobasen der DNA reagieren können und über die gebildeten Arylamin-Addukte zu unterschiedlichen Mutationen führen können. Bereits beim Eintritt in die Leber findet eine Acetylierung mittels der *N*-Acetyltransferase statt. Findet die zur Wasserlöslichkeit und somit zur Ausscheidung des Giftstoffes führende *N*-Glucuronierung nicht statt, erfolgt der Transport über den Blutweg in die Harnblase und führt ebenso zu den hochreaktiven Nitrenium-Ionen **19** und damit zu den DNA-Addukten. Aufgrund der vorhandenen Acetylgruppe wird die *syn*-Konformation der glycosidischen Bindung bevorzugt. Die daraus resultierende Folge ist, dass die acetylierte Base in die DNA-Doppelhelix hinein ragt, mit den Nachbarbasen interkaliert und den Heterocyclus in die große Furche der *B*-DNA drückt. Beim unacetylierten Addukt, welches in der *anti*-Konformation vorliegt, liegt der modifizierte Teil in der großen Furche und stört die Basenpaarung nicht. Auf diesem Weg ist eine Erklärung für die höhere Persistenz der C8-*N*H-Addukte in der DNA gefunden, da diese schlechter von den Reparaturenzymen erkannt werden.

Um diese Auswirkungen der Modifikationen untersuchen zu können, wurden die C8-*N*H- und die C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten Addukte zunächst präparativ synthetisiert und anschließend in die entsprechenden Phosphoramidite überführt.

Bisherige Arbeiten zu den *N*-acetylierten Addukten existieren lediglich für die 2´-Desoxyguanosin-Derivate. Hinsichtlich der *N*-acetylierten 2´-dA-Derivate wurden noch keine Synthesen, bzw. Untersuchungen durchgeführt. Durch einen erstmaligen präparativen Zugang zu diesen Addukten können die einzelnen Derivate tatsächlich erst hinsichtlich ihrer Eigenschaften untersucht werden. Besteht, wie bereits in der Literatur zu 2´-dG-Derivaten erwähnt, eine *syn*-Konformation der *N*-acetylierten Addukte, können weitere Untersuchungen auf Oligonucleotid-Ebene erfolgen und die Auswirkungen sowohl enzymatisch, als auch hinsichtlich der thermischen Stabilitäten untersucht werden.

Für eine umfassende Kenntnis aller Addukte ist es wichtig, den synthetischen Weg zu so vielen Addukten wie möglich zu legen und diese hinsichtlich ihrer Eigenschaften auf Oligonucleotidebene miteinander vergleichen zu können.

Der erste Teil der Arbeit bestand darin, C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierte 2´-Desoxyadenosin-Derivate zu synthetisieren. Zunächst musste eine Synthese- und Schutzgruppenstrategie für eine optimale Acetylierung an der 8-*N*-Position entwickelt werden.

Eine direkte Pd-katalysierte Buchwald-Hartwig-Kupplung mit einem bereits *N*-acetylierten Arylamin und einem geschütztem und bromierten 2´-dA-Derivat führte lediglich zur Bildung vom C8-*N*H-Arylamin-2´-dA-Addukt **42** in 11% Ausbeute und dem reisolierten Edukt **41** (S. 58).

Weiterhin wurde die Bildung des Nitreniumions, analog zu dem postulierten Mechanismus von *Böge*, mit BOP als Aktivierungsreagenz und einer Arylhydroxamsäure zur Bildung der *N*-acetylierten 2´-dG Derivate unter Verwendung der 2´-dA-Derivate, probiert. Hierbei sollte das entstandene Nitreniumion als Beispiel für eine elektrophile Aminierung am Purinring unabhängig von der exocyclischen Aminogruppe angreifen und die bereits unter Abschnitt 2.2 (Abb. 7, S. 10) erwähnte Stevens-ähnliche Umlagerung durchlaufen. Die Reaktion führte allerdings zu einer Depurinierung und Zersetzung des glycosidischen Grundgerüstes (S. 59ff).

Zusätzlich wurde eine lineare Syntheseroute mit orthogonaler Schutzgruppenstrategie erarbeitet. Die Grundidee war die Schützung aller freien Positionen, um für die anschließende Acetylierungsreaktion nur die 8-*N*-Position frei zu lassen. Die erste Orientierung fand in Anlehnung an die bereits veröffentlichte Arbeit von *Gillet* und *Schärer* statt. Sie verwendeten Pac-geschützte 2´-dG Derivate, welche nach erfolgter Buchwald-Hartwig-Kupplung mittels 4-DMAP und Essigsäureanhydrid an der 8-*N*-Position acetyliert werden. Auf diesem Weg konnten sie aus den *N*-acetylierten 2´-dG-Derivaten die jeweiligen Phosphoramidite synthetisieren (S. 37f). Analoge Versuche mit 8-Brom-3´,5´-geschützten 2´-dA-Derivaten führten zunächst zwar zur erfolgreichen Pac-Schützung der exocyclischen Aminogruppe, jedoch nicht zum *N*-acetylierten Produkt. Die Verwendung der in der Literatur angegebenen Bedingungen für die *N*-Acetylierung führte im Fall des 2´-dA-Analogons zu keinem Ergebnis.

Aus diesem Grund wurden die Reaktionsbedingungen zu Gunsten einer *N*-Acetylierung verändert, allerdings wurde zu diesen Bedingungen die neu eingeführte Pac-Schutzgruppe abgespalten und das dreifach acetylierte Produkt **61** erhalten (S. 39).

Weitere Schutzgruppen, wie das *N,N*-Dimethylformamiddimethylacetal und der *Iso*buttersäureanhydrid wurden erprobt. Allerdings war die *iso*Butyryl-Schutzgruppe schon bei der ersten Reinigung so labil, dass stets nur das ungeschützte Edukt **42**, **57** erhalten werden konnte (S. 44). Wiederum konnte bei der Verwendung der *N,N*-Dimethylformamiddimethylacetal-Schutzgruppe keine erfolgreiche Acetylierung durchgeführt werden (S. 41f).

Erst durch die Verwendung der Benzoylschutzgruppe konnte eine Schützung ohne folgende Komplikationen erreicht werden (S. 44f). Eine doppelte Schützung der exocyclischen Aminofunktion lässt nur noch die 8-*N*-Position für eine folgende Acetylierung offen.

Die beste Acetylierungsreaktion konnte mittels 4-DMAP und Essigsäureanhydrid in Pyridin für 72 h bei Raumtemperatur in Kombination mit der TBDMS-Schutzgruppe für die 3´,5´-Positionen erreicht werden. Hierbei wurden Ausbeuten zwischen 33% und 81% erreicht, wobei das Arylamin 3,5-Dimethylanilin **4** moderate Ausbeuten lieferte. Hier konnten stets nur Ausbeuten zwischen 33% - 43% erreicht werden. Durch Verwendung des Steglich-Katalysators wurde allerdings nicht nur der Essigsäureanhydrid, sondern auch eine der beiden Benzoylschutzgruppen an N^6 gespalten (S. 49).

Die Einführung der Acetylgruppe lieferte rotamere Moleküle, welche auch NMR-spektroskopisch erfasst werden konnten. Messungen bei Raumtemperatur lieferten verbreiterte Signale und erschwerten das Auswerten der Ergebnisse. Durch Aufnahmen von NMR-Spektren bei erhöhter Temperatur (328 K) konnten schließlich sich überlagernde, scharfe NMR-Signale erhalten werden (S. 56).

Somit konnten zum ersten Mal erfolgreich und in guten Ausbeuten C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierte 2´-dA-Derivate erhalten werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Synthese der jeweiligen *N*-acetylierten Phosphoramidite für die Oligonucleotide erfolgen. Dafür wurden zunächst die 3´,5´-Positionen entschützt. Aufgrund der neu eingeführten basenlabilen Acetylgruppe konnte die Entfernung der Silylschutzgruppen nicht mehr, wie bisher mit TBAF (pH 8), erfolgen. Alternativ wurden Reaktionsmischungen aus TBAF und Essigsäure (pH 5) oder $Et_3N{\cdot}3HF$ (pH 4) als Entschützungsreagenzien verwendet.
Beide Methoden lieferten Ausbeuten >80%. Sie unterscheiden sich lediglich in der Reaktionszeit und in dem Umfang der Aufarbeitung (S. 64).
Diese Entschützung der 3´,5´-Positionen lieferte mit Hilfe von NOESY-NMR spektroskopischen Untersuchungen den Beweis der bereits vermuteten *syn*-Konformation der glycosidischen Bindung. Diese wird aufgrund der neu eingeführten Acetylgruppe bevorzugt eingenommen, da eine Stabilisierung des Moleküls in der bis dahin bevorzugten *anti*-Konformation nicht mehr gegeben ist (S. 66f).
Für die Umsetzung zum gewünschten acetylierten Phosphoramidit musste noch die DMTr-Schützung der primären 5´-OH-Funktion und die anschließende Phosphitylierung der 3´-OH-Funktion erfolgen. Mit Hilfe von Silbernitrat erfolgte die DMTr-Schützung der 5´-OH-Gruppe binnen 3 h. Allerdings mussten diese Salze für die folgende Reaktion abgetrennt werden, was wiederum einige Probleme mit sich brachte. Da die Kombination von Kieselgel und Dichlormethan sauer ist, erfolgte stets die Abspaltung der neu eingeführten DMTr-Schutzgruppe während der säulenchromatographischen Reinigung. Durch Zugabe von Triethylamin wiederum wurde stets ein Teil der Acetylgruppe abgespalten und nur das C8-*N*H-Arylamin-Addukt wurde erhalten. Selbst die Reinigung über Aluminiumoxid (Alox, neutral, Akt.stufe III) führte immer wieder zum Zerfall des *N*-acetylierten Produktes. So musste auf eine komplette Reinigung verzichtet und nur mittels einer Säulenfiltration die Salze entfernt werden (S. 69).
Auch die Bildung der Phosphoramidite musste zügig erfolgen und die Reaktion wurde stets nach ca. 2 h abgebrochen. Eine längere Reaktion führte stets zur langsamen Oxidation des P^{III} zu P^{V}. Auch hier bestanden die Probleme bei der Reinigung der gewünschten *N*-acetylierten Phosphoramidite. Aufgrund ihrer Labilität konnte nur eine schnelle und zeitlich begrenzte säulenchromatographische Reinigung über Aluminiumoxid (Alox, neutral, Akt.stufe III) erfolgen. Eine vollständige Reinigung war auf dieser Ebene nicht ohne Verlust der Acetylgruppe oder Oxidation des Phosphors möglich (S. 72).

Der dritte Teil der Arbeit bestand in der Untersuchung der neu eingeführten Modifikationen im Hinblick auf ihre Eigenschaften. Dazu wurden diese mit Hilfe eines DNA-Synthesizers in unterschiedliche Sequenzen eingebaut.

Mit den C8-*N*H- und C8-(*N*-Acetyl)-modifizierten Phosphoramiditen wurden unter Verwendung eines abgewandelten Standard-Syntheseprotokolls verschiedene, modifizierte Oligonucleotide synthetisiert.

Für die C8-(*N*-Acetyl)-modifizierten Oligonucleotide wurde zunächst eine geeignete Methode zur Abspaltung der festen Phase und der basenlabilen Schutzgruppen ohne Abspaltung der basenlabilen Acetylgruppe etabliert. Da unter Verwendung der Standard-Entschützungsbedingungen (25% NH_4OH, 4 h, 45 °C) stets nur das C8-*N*H-Arylamin-modifizierte Oligonucleotid erhalten werden konnte, wurden diverse mildere Bedingungen zur Entfernung der jeweiligen Schutzgruppen und der festen Phase verwendet. Die besten Ergebnisse konnten durch die Verwendung von 5-10% Di*iso*propylamin in MeOH für 14 h bei 55 °C erhalten werden. Somit konnte zum ersten Mal ein C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifiziertes Oligonucleotid analog zu den 2´-dG-Derivaten erhalten werden. Gleichzeitig wurde durch diese neue Entschützungsmethode auch das C8-*N*H-Arylamin-2´-dA modifizierte Oligonucleotid erhalten. Somit konnten gleichzeitig beide gewünschten modifizierten Phosphoramidite in einem Schritt erhalten werden (S. 88).

Problematisch war die Entschützung der *N*-acetylierten, polycyclischen Derivate. Überraschenderweise brachte hier erst die Verwendung einer 10%-igen NH_4OH-Lösung für 2 h bei 45 °C die gewünschten Ergebnisse. Erneut wurden beide Oligonucleotide erhalten.

Bei den gewählten Sequenzen handelte es sich zunächst um die *Nar*I-Sequenz 5´-d(CTCGGC**A**CCATC)-3´, einen Hotspot für Arylamin Modifikationen. Hier konnten die C8-(*N*-Acetyl)-arylamin Modifikationen erfolgreich in Position 6, ausgehend von 3´, eingebaut und anhand von Schmelzpunktexperimenten und CD-spektroskopischer Untersuchungen ihr Einfluss auf das Hybridisierungsverhalten oder die Konformation der entstehenden DNA-Helix festgestellt werden. Dabei konnte festgestellt werden, dass die monocyclische 3,5-Dimethylphenyl Modifikation einen großen Einfluss auf den T_m-Wert hat und zu einer deutlicheren Senkung dieser führt. Diese Tatsache ist insofern überraschend, als dass die Erwartung des größten Einflusses auf Seiten der polycyclischen Modifikation 4-Biphenyl lag.

Scheinbar haben die beiden Methylgruppen in *meta*-Stellung im 3,5-Dimethylphenyl-Rest einen größeren Einfluss als ein zweiter aromatischer Ring. Interessanterweise senken die *N*-acetylierten Modifikationen die jeweiligen T_m-Werte lediglich um 2-4 °C im Vergleich zu ihren nicht acetylierten Derivaten. Ein Einfluss eines Schadens auf die Konformation konnte in keinem der Fällen beobachtet werden.

Als zweite Sequenz wurde ein selbstkomplementäres 12mer-Oligonucleotid mit der Sequenz 5´-d(GT**A**G**A**ATTCTAC)-3´ gewählt. Dieses besitzt eine Erkennungssequenz für das Enzym EcoRI. Ebenfalls wurden hier die C8-(*N*-Acetyl)-arylamin Modifikationen eingebaut. Zusätzlich zu dem Einfluss auf den T_m-Wert und die Konformation konnten hier auch die Auswirkungen auf die Aktivität des Restriktionsenzyms EcoRI durch einen entsprechenden Abbau untersucht werden (S. 102ff). Befindet sich die Modifikation innerhalb der Erkennungssequenz des EcoRI-Enzyms, so haben Phenyl und 4-Biphenyl in ihrer *N*-acetylierten und unacetylierten Form beinahe gar keinen Einfluss auf die Schmelztemperatur, während die monocyclische 4-Methoxyphenyl Modifikation eine Temperaturerniedrigung von ca. 9 °C bewirkt. Befindet sich die Modifikation außerhalb der Erkennungssequenz, so haben interessanterweise die monocyclischen Modifikationen mit einer Temperaturerniedrigung von bis zu 12 °C einen viel größeren Einfluss als die polycyclische 4-Biphenyl Modifikation mit einer Temperaturerniedrigung um 8 °C.

Ein Einfluss auf die Konformation jedoch war in keinem der Fälle zu beobachten. Bei den außerhalb und innerhalb der Erkennungssequenz modifizierten Oligonucleotiden ergaben sich allerdings einige Rückschlüsse auf den Einfluss der Modifikationen auf Enzyme durch den durchgeführten Restriktionsabbau. Eine Modifikation innerhalb der Schnittstelle führt zu einer kompletten Inaktivität des EcoRI-Enzyms. Offensichtlich ist das Enzym, aufgrund der eingeführten Modifikation, nicht in der Lage an seinem Erkennungspunkt zu binden bzw. den nachfolgenden Abbau durchzuführen. Eine C8-*N*H-Arylamin Modifikation außerhalb der Schnittstelle hat eine Erniedrigung der Enzym-Aktivität im Fall der C8-*N*H-Arylamin Modifikationen zur Folge. Wieder war der Einfluss der monocyclischen Modifikationen mit 3.3 h Halbwertszeit größer als der der polycyclischen Modifikationen mit 2.9 h.

Eine C8-(*N*-Acetyl)-arylamin Modifikation außerhalb der Schnittstelle bewirkt zunächst ebenfalls eine Erniedrigung der Enzymaktivität, blockiert aber bereits nach einem Zeitraum zwischen 4 - 6 h komplett das Enzym und es findet kein weiterer Abbau statt. In diesem Fall scheint eine mögliche irreversible Inhibierung des EcoRI-Enzyms vorzuliegen.

Zur Klärung der Auswirkungen von C8-*N*H-Arylamin Modifikationen auf die Funktion verschiedener DNA-Polymerasen wurden modifizierte 20mer-Oligonucleotide mit der Sequenz 5´-d(ACA T**A**A GCA TCT ACG ACG CG)-3´ synthetisiert und als Templat in Primer-Verlängerungs-Untersuchungen mit verschiedenen DNA-Polymerasen (Pol *ß*, *Pfu*, Dpo4) eingesetzt. In diesem Fall der längeren Sequenz war es nicht möglich, die *N*-acetylierten Oligonucleotide nach der Festphasensynthese zu erhalten. Weitere Entschützungsmöglichkeiten wurden erprobt und führten trotz immer neuer Varianten stets zu den C8-*N*H-Arylamin Modifikationen. Hier konnte allerdings eine Abhängigkeit der Fragmentierung des 20mers, während der Entschützung, von der verwendeten Base und der Reaktionszeit festgestellt werden. Das 20mer Oligonucleotid fragmentiert stärker bei längerer Entschützungszeit und Verwendung stärkere Basen. Wiederum erfolgte keine vollständige Entschützung bei Verwendung weniger basischen Reagenzien und Verkürzung der Reaktionszeit. Ebenfalls wurden die Abbruchfragmente immer in stärkerer Anzahl isoliert, als die modifizierten 20mer Oligonucleotide. Hier konnte ein Vergleich lediglich zwischen den mono- und polycyclischen Derivaten erfolgen. Aus diesem Grund wurden alle bisher verwendeten Arylamine eingebaut, um auch kleinste Unterschiede innerhalb der mono- bzw. polycyclischen Arylaminklassen feststellen zu können. Als Ergebnis lässt sich festhalten, dass die Addukte mono- und polycyclischer Arylamine, mit Ausnahme von 4-Biphenyl, eine gleiche Rate an Fehleinbauten besitzen. So findet neben dem komplementären Einbau des kanonischen dTTP auch stets der nicht-komplementäre Einbau von geringer Menge an dATP statt. Lediglich bei der polycyclischen Modifikation 4-Biphenyl findet auch stets ein zusätzlicher nicht-komplementärer Einbau von dGTP statt (S. 120ff.).

Insgesamt konnten im Rahmen dieser Arbeit wichtige Anhaltspunkte bezüglich der Auswirkungen der mono- und polycyclischen aromatischen Amine auf Oligonucleotidebene erkannt werden. Zusätzlich konnten auch erste Vergleiche der bisher nicht bekannten *N*-acetylierten Modifikationen, bezogen auf kürzere Sequenzen, im Gegensatz zu den nicht acetylierten Modifikationen erfolgen.

So haben die monocyclischen Modifikationen (C8-*N*H- und C8-(*N*-Acetyl) einen stärkeren Einfluss auf die Schmelztemperatur und auf enzymatische Aktivitäten als die polycyclischen Modifikationen. Dieser Einfluss führt möglicherweise zu einer schnelleren Erkennung eines Schadens und damit zu einer schnelleren Reparatur als dieses bei polycyclischen Derivaten der Fall ist. Ebenfalls einen stärkeren Einfluss auf enzymatische Aktivitäten, bezogen auf die EcoRI Restriktion, haben die *N*-acetylierten Modifikationen ausserhalb der Erkennungssequenz. Hier liegt möglicherweise eine irreversible Inhibierung des Enzyms vor, die den enzymatischen Abbau nach ca. 6 h stoppt. Ob die *N*-acetylierten Modifikationen aufgrund ihrer *syn*-Konformation schneller von Reparatursystemen erkannt werden und der Abbau deswegen zunächst verlangsamt und anschließend ganz zum Erliegen kommt, kann an dieser Stelle noch nicht bestätigt werden.

Weiterhin sollten als letzter Teil dieser Arbeit zum ersten Mal heterocyclische aromatische Amine (HCAs) an 2´-Desoxyadenosin gekuppelt werden. Die bereits mehrfach erfolgreich durchgeführte Pd-katalysierte Buchwald-Hartwig-Kupplung brachte in diesem Fall in keiner der angewendeten Varianten Erfolg. Es konnten lediglich Spuren des gewünschten Produktes mittels ^{1}H-NMR-Spektroskopie in zwei Kupplungsvarianten nachgewiesen werden. Um zu prüfen, ob möglicherweise eine Kupplung über Brom oder eine sterische Hinderung zwischen dem Heterocyclus und dem 3´,5´-geschützten 2´-Desoxyadenosin **41**, **53** der Grund für das Scheitern der Synthese ist, wurde zunächst 2-*N*-Phenyl-3-methylimidazo-[4,5-*f*]chinolin **126** mit Brombenzol **26** umgesetzt. Das Produkt konnte in 34% Ausbeute erhalten werden (S. 146). Zusätzlich wurde auch 2-*N*-3-Methylimidazol mit dem geschützten 2´-dA-Derivat umgesetzt und lieferte erneut nur Spuren des Produktes **129**. Auch eine zweite Route über eine Mesylat-Zwischenstufe führte nicht zum gewünschten HCA gekuppelten Produkt.

7. Summary

Aromatic amines are indirect carcinogens, so they just react after metabolic activation with the nucleobases of the DNA. After passing the bladder, an acetylation of the arylamine with the *N*-acetyltransferase follows and led in several following steps also to the highly reactive nitreniumions like the non-acetylated derivatives. Because of the acetyl group the *syn* conformation of the glycosydic binding is preferred. So, the acetylated base intercalates with the neighbour bases and pushes the heterocycle in the major groove of the *B*-DNA. In the case of the C8-*N*H-adducts the *anti* conformation is preferred; the modificated base is in the major groove and doesn't interrupt the base pairing. This is the reason, why the C8-*N*H-adducts have a higher persistence in the DNA and will be hardly recognized.

To determine the effects of the C8-*N*H- and C8-(*N*-acetyl) adducts, first they had to be synthesized and then transformed to the phosphoramidites. Known publications just exist for the acetylated 2´-dG derivatives, but not for the 2´-dA-derivatives. In the first part of this work a synthetic pathway to the acetylated 2´-dA derivatives has to be developed.

A direct Pd-catalyzed Buchwald-Hartwig coupling between a brominated and protected 2´-dA derivative and an acetylated arylamine didn´t take place and gave just the C8-*N*H-arylamine adduct (11%) and the reisolated starting material (29%).

Even the building of the nitrenium ion was tried with the reaction between BOP as activation reagent and an arylhydroxamic acid. The builded nitrenium ion should act as an example for an electrophilic amination. But the reaction just led to a depurination and cleavage of the glycosydic backbone.

The last route worked with an orthogonale protecting group strategy. Several protecting groups, like the PacCl, *N,N*-dimethylformamide diethylacetale, *iso*butyric acid anhydride and benzoylchloride were tested. Just with benzoylchloride as protecting group the following acetylation reaction could be performed to give good yields and reproduceable reaction conditions.

The introduction of the acetyl group led to rotamere molecules, which could be also detected with ^{1}H-NMR spectroscopy. Measurements at room temperature showed broad signals and led to difficulties of the interpretations of these spectra. Performing high-temperature NMR measurements at 328 K highly separated NMR signals were observed.

For the first time it was possible to synthesize C8-(*N*-acetyl)-arylamine modified 2´-dA-derivatives.

The second part of this work was the synthesis of the *N*-acetylated phosphoramidites for incorporation into oligonucleotides. After deprotection of the 3´,5´-positions with TBAF and AcOH or $Et_3N{\cdot}3HF$, the reprotection of the primary 5´-OH-function followed in using DMTrCl. At least the building of the phosphoramidite followed on the 3´-position. The builded acetylated products were labile and need to incorporated into oligonucleotides as soon as possible.

The third part of this work was the reseach of the new incorporated modifications. Three different sequences, the *Nar*I sequence, the EcoRI sequence for enzyme restriction assays and a 20mer oligonucleotide for primer elongation tests were used. First a milder deprotection method as the use of ammonia was needed because of losing the acetyl group during the deprotection. The best results could be achieved using 5-10% DIPA in MeOH for 14 h at 55 °C. With this method, both oligonucleotides the acetylated and non-acetylated could be isolated.

First the *Nar*I sequence and the self complementery EcoRI sequence were used to investigate the effects of the modifications on hybridisation and structure of the resulting DNA-helices. The results of the CD and Tm value studies have shown, that no difference in structure exists, but a higher decrease of the monocyclic modification of the T_m value. The influence of the *N*-acetylated modification was nearly the same like the C8-*N*H-modifications.

A total prevention was achieved by modifying the EcoRI sequence at the cleavage site. When the modification was outside the recognition sequence a higher influence, leading to higher half-lives, for the monocyclic modified oligonucleotides than for the polycyclic modified one was observed. In case of the *N*-acetylated modifications a possible inhibition of the enzyme could be observed.

To study the influence of these adducts on the effectiveness of DNA-polymerases, oligonucleotides of the 20mer sequence were synthesized and used as templates in primer-extension experiments. Two different polymerases were used, Pol *ß* and Dpo4. None of the *N*-acetylated oligonucleotides could be performed in this long sequence. In all the cases of a deprotection just the C8-*N*H-arylamine modified oligonucleotides could be isolated. The strong carcinogen modification 4-biphenyl has a higher impact on replication error and misinsertion of nucleotides as it was found for the other modifications.

8. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine neue und effiziente Syntheseroute zur Darstellung von C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten 2´-Desoxyadenosin-Derivaten entwickelt werden. Die *N*-Acetylierung konnte bis zu Ausbeuten zwischen 65 - 80%, mit Ausnahme des Arylamins 3,5-Dimethylanilin, optimiert werden. Dabei konnte die Umwandlung der bisher bevorzugten *anti*-Konformation der glycosidischen Bindung zur *syn*-Konformation NOESY-NMR-spektroskopisch bewiesen werden. Weiterhin konnten die jeweiligen *N*-acetylierten Phosphoramidite gebildet und in Oligonucleotide eingebaut werden. Diese wurden sowohl strukturell als auch molekularbiologisch untersucht. Durch die auf diese Weise erhaltenen Ergebnisse konnten erste Hinweise auf die unterschiedlichen Auswirkungen der mono- und polycyclischen sowie der *N*-acetylierten Modifikationen auf Oligonucleotidebene, bezogen auf 12mer-Oligonucleotide, erhalten werden. Ausschlaggebend waren dabei nicht nur das jeweilige aromatische System des Arylamins oder eine vorhandene Acetylierung sondern auch hauptsächlich die Art und die Lage der Modifikation. Um aber hierüber vollständige Ergebnisse erhalten zu können, müsste ebenso ein geeigneter Syntheseweg zur Darstellung acetylierter N^6-Addukte erarbeitet werden (Abb. 147). Bereits *Bonela et al.*[104] berichteten von der Synthese N^6-acetylierter Derivate. Allerdings wurde diese nicht zu den entsprechenden Phosphoramiditen umgesetzt und auch nicht in Oligonucleotide eingebaut.

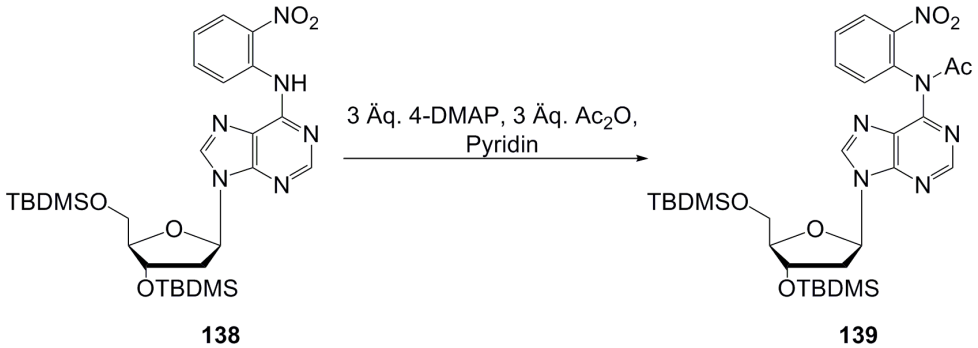


Abb. 147: Synthesemöglichkeit zur Darstellung N^6-Acetyl-N^6-arylamin-modifizierter 2´-dA-Addukte

Eine vorherige Reduktion der Nitrogruppe und eine anschließende Acetylierung führte bereits bei *Jacobsen* ausschließlich zur Acetylierung der *ortho*-Position, nicht aber der gewünschten exocyclischen Aminofunktion.[68]

Aus diesem Grund muss die Acetylierung vor der Reduktion stattfinden. Ob sie überhaupt zu den in Abb. 147 (S. 163) vorgestellten Bedingungen funktioniert, müsste erprobt werden. Die anschließende Reduktion der Nitrogruppe, entweder auf Phosphoramidit- oder auf Oligonucleotid-Ebene, müsste ebenfalls getestet werden, um einer möglichen Reduktion oder einer hydrolytischen Spaltung der Acetylgruppe entgegen zu wirken. Weiterhin müssten erneut alle bisherigen Entschützungsmethoden erprobt werden, um die gewünschten *N*-acetylierten Oligonucleotide erhalten zu können. In diesem Fall befände sich die Modifikation nicht in der großen Furche, wie bei der C8-(*N*-Acetyl) Modifikationen, sondern an einer Position, die sonst Wasserstoffbrückenbindungen eingeht. Sollte die gewünschte Modifikation erhalten werden, so könnten Untersuchungen bezüglich der Konformation und der Basenverknüpfungen stattfinden.

Um eine möglichst große Bandbreite an Addukten abdecken zu können, sollten auch Arbeiten mit Pyrimidin-Derivaten stattfinden. Auch hier wurden bereits Addukte *in vivo* (S. 8) gefunden und könnten zu neuen Kenntnissen über Arylamin-Addukte an den verschiedenen Basen führen.

Weiterhin sollte die Darstellung der *N*-acetylierten, längerkettigen Oligonucleotide (20mere) für Primer-Verlängerungsuntersuchungen optimiert werden. Es muss eine geeignete Entschützung entwickelt werden, bei der die Acetylgruppe erhalten bleibt und bei der mindestens 5 nmol Oligonucleotid erhalten werden, um diese Untersuchungen durchführen zu können.

Der Schwerpunkt der Untersuchungen sollte selbstverständlich auf der Ebene der Oligonucleotide liegen, um weitere Auswirkungen der Modifikationen festhalten zu können. Nicht nur Restriktions- und Primer-Verlängerungstest, sondern auch Reparatur-Untersuchungen müssen noch folgen, um genauere Daten über die Reparaturmechanismen einer Zelle erhalten können.

Experimentalteil

9. Allgemeines

9.1 Lösungsmittel und Reagenzien

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

a) puriss. Absolut, über Molsieb, H_2O: 0.001%; Fluka Nr.0069
b) zur Synthese; Merck Nr. 800015
c) technische Qualität; über Calciumhydrid getrocknet und bei Normaldruck destilliert

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

a) puriss. Absolut, über Molsieb, H_2O: 50 ppm; Fluka Nr. 66749
b) technische Qualität; über Calciumchlorid getrocknet und bei Normaldruck destilliert

Diethylether: $C_4H_{10}O$ [74.12]; Sdp.: 34.5 °C, d= 0.867

a) technische Qualität; über Kalium getrocknet und bei Normaldruck destilliert

1,2-Dimethoxyethan: $C_4H_{10}O_2$ [90.12]; Sdp.: 84-86 °C; d= 0.867

a) technische Qualität; über Natrium getrocknet und bei Normaldruck destilliert

N,*N*-Dimethylformamid: $C_3H_7N_1O_1$ [73.09]; Sdp.: 153 °C; d= 0.94

a) puriss. Absolut, über Molsieb, H_2O: 0.001%; Fluka Nr. 40248

1,4-Dioxan: $C_4H_8O_2$ [88.11]; Sdp.: 101 °C; d= 1.030

a) technische Qualität; über Natrium getrocknet und bei Normaldruck destilliert

Essigsäureethylester: $C_4H_8O_2$ [88.11]; Sdp.: 77 °C; d= 0.902

a) technische Qualität; über Calciumchlorid getrocknet und bei Normaldruck destilliert

n-Hexan: N_6H_{14} [86.17]; Sdp.: 68.7 °C; d= 0.65

a) technische Qualität; über Normaldruck destilliert

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

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

Petrolether (50-70): Sdp.: 50-70 °C;

a) technische Qualität; über Normaldruck destilliert

Pyridin: C_5H_5N [79.10]; Sdp.: 115 °C; d= 0.980

a) puriss. Absolut, über Molsieb, H_2O: 50 ppm; Fluka Nr. 82704
b) technische Qualität; über Calciumhydriddispersion getrocknet und bei Normaldruck destilliert

Tetrahydrofuran: C_4H_8O [72.11]; Sdp.: 65-66 °C; d= 0.890

a) puriss. Absolut, über Molsieb, H_2O: 50 ppm; Fluka Nr. 87371
b) technische Qualität; über Kalium getrocknet und bei Normaldruck destilliert

Toluol: C_7H_8 [92.14]; Sdp.: 110 °C; d= 0.990

a) technische Qualität; über Natrium getrocknet und bei Normaldruck destilliert

Triethylamin: $C_6H_{15}N$ [101.19]; Sdp.: 89 °C; d= 0.72

a) technische Qualität; über Natrium getrocknet und bei Normaldruck destilliert

racemisches 2,2´-Bis(diphenylphosphino)-1,1´-binaphthyl:

$C_{44}H_{32}P_2$ [633.70], Acros Nr.368640050, luftdicht verpackt unter Argon

Tris(dibenzylidenaceton)-dipalladium(0):

$C_{51}H_{42}O_3Pd_2$ [915.70], Strem Nr. 463000, luftdicht verpackt unter Argon

Alkalische Phosphatase:

aus Kalb-Darm [Grade I]; Roche Applied Science, 4000 Units, 23.4 mg Lyo.

EcoRI-Enzym: aus Escherichia Coli BS5; fermentas ER 0271; 5000 Units

Nuclease P1: aus Penicillium citrinum, Roche Applied Science, 1000 Units

^{i}Pr-Pac-dG-CE Phosphoramidit
(*N*-*p*-*Iso*propyl-phenoxyacetyl-5´-*O*-(4,4´-dimethoxy-triphenylmethyl)-2´-desoxyguanosin-3´-*O*-[(2-cyanoethyl)-(*N*,*N*-di*iso*propyl)]phosphoramidit):

$C_{51}H_{60}N_7O_9P_1$ [946.037], Pharmacia, CAS-Nr.: 150065-82-0, luftdicht verpackt unter Argon

Pac-dA-β-CE Phosphoramidit
(N^6-Phenoxyacetyl-5´-*O*-(4,4´-dimethoxy-triphenylmethyl)-2´-desoxyadenosin-3´-*O*-[(2-cyanoethyl)-(*N*,*N*-di*iso*propyl)]phosphoramidit):

$C_{48}H_{54}N_7O_8P_1$ [887.958], Pharmacia, CAS-Nr.: 110543-74-3, luftdicht verpackt unter Argon

dG-CE Phosphoramidit
(N^2-*Iso*butyryl-5´-*O*-(4,4´-dimethoxytrityl)-2´-desoxyguanosin-3´-*O*-[(2-cyanoethyl)-(*N*,*N*-di*iso*propyl)]phosphoramidit):

$C_{44}H_{54}N_7O_8P_1$ [839.915], Ellabiotech, CAS-Nr.: 93183-15-4, luftdicht verpackt unter Argon

dA-CE Phosphoramidit
(N^6-Benzoyl-5´-*O*-(4,4´-dimethoxytrityl)-2´-desoxyadenosin-3´-*O*-[(2-cyanoethyl)-(*N*,*N*-di*iso*propyl)]-phosphoramidit):

$C_{47}H_{52}N_7O_7P_1$ [857.932], Ellabiotech, CAS-Nr.: 98796-53-3, luftdicht verpackt unter Argon

dC-CE Phosphoramidit
(N^4-Benzoyl-5´-*O*-(4,4´-dimethoxytrityl)-2´-desoxycytidin-3´-*O*-[(2-cyanoethyl)-(*N*,*N*-di*iso*propyl)]-phosphoramidit):

$C_{46}H_{52}N_5O_8P_1$ [833.908], Ellabiotech, CAS-Nr.: 102212-98-6, luftdicht verpackt unter Argon, bei -20 °C aufbewah rt

dT-CE Phosphoramidit
(5´-*O*-(4,4´-Dimethoxytriphenylmethyl)-2´-desoxythymidin-3´-*O*-[(2-cyanoethyl)-(*N*,*N*-di*iso*propyl)]-phosphoramidit):

$C_{40}H_{49}N_4O_8P_1$ [744.813], Ellabiotech, CAS-Nr.: 98796-51-1, luftdicht verpackt unter Argon, bei -20 °C aufbewah rt

dT-CPG-1000Å, dG-CPG-1000 Å, dA-CPG-1000 Å, dC-CPG-1000 Å:

Ellabiotech, c= 29 µmol

DTT-Puffer (pH= 7.5) für den EcoRI-Restriktionsabbau:

Es wurden 190.4 mg Magnesiumchlorid, 1.17 g Natriumchlorid und 1.21 g Tris-(hydroxymethyl)aminomethan in ca. 180 mL Reinstwasser gelöst, mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH-Wert von 7.5 eingestellt und auf 200 mL mit Reinstwasser aufgefüllt. Anschließend wurden noch 15.4 mg DTT hinzugefügt.

Triethylammoniumacetat-Puffer (TEAA-Puffer) pH= 6.9 für die HPLC
(Trennung der Oligonucleotide):

Es wurden 5.88 mL Eisessig und 10.12 mL Triethylamin in ca. 900 mL Reinstwasser gelöst und auf einen pH-Wert von 6.9 eingestellt und mit Reinstwasser auf 1000 mL aufgefüllt.

Triethylammoniumacetat-Puffer (TEAA-Puffer) pH= 8.0 für die HPLC (EcoRI-Abbau):

Es wurden 3.0 mL Eisessig und 5.0 mL Triethylamin sowie 50 mL Acetonitril in ca. 900 mL Reinstwasser gelöst und auf einen pH-Wert von 8.0 eingestellt und mit Reinstwasser auf 1000 mL aufgefüllt.

Ionenaustauscher Dowex® 50W-X8 (stark saurer Kationenaustauscher, H^+-Form):

Der Dowex® Ionenaustauscher wurde in einer Pipette solange mit gesättigter Ammoniumacetat-Lösung gespült, bis die Lösung basisch war. Anschließend wurde der Ionenaustauscher solange mit Reinstwasser gewaschen, bis der neutrale pH-Wert 7 erreicht war.

6-Aza-2-thiothymin-Matrix (ATT):

Es wurde eine gesättigte Lösung von 6-Aza-2-thiothymin in Acetonitril/Ethanol (1:1 v/v) frisch hergestellt, filtriert und anschließend mit einer Spatelspitze des vorbehandelten Ionenaustauschers über Nacht im Thermomixer bei 10 °C inkubiert.

3-Hydroxypicolinsäure-Matrix (HPA):

Es wurden 20 mg 3-Hydroxypicolinsäure in 1 mL Reinstwasser mit 26 mg Ammoniumcitrat zusammengegeben und anschließend mit dem vorbehandelten Ionenaustauscher bei 10 °C über Nacht im Thermomixer inkubiert.

α-Cyano-4-hydroxyzimtsäure-Matrix (CCA):

Es wurde eine gesättigte Lösung von α-Cyano-4-hydroxyzimtsäure in Wasser/Ethanol (1:1 v/v) frisch hergestellt, filtriert und anschließend mit einer Spatelspitze des vorbehandelten Ionenaustauschers über Nacht im Thermomixer bei 10 °C inkubiert.

2,5-Dihydroxybenzoesäure-Matrix (DHB):

Es wurde eine gesättigte Lösung von 2,5-Dihydroxybenzoesäure in Wasser/Ethanol (1:1 v/v) frisch hergestellt, filtriert und anschließend mit einer Spatelspitze des vorbehandelten Ionenaustauschers über Nacht im Thermomixer bei 10 °C inkubiert.

9.2 Chromatographie und Geräte

9.2.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Es wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator (Merck Nr. 5554; Schichtdicke 0.2 mm) verwendet. Die Platten wurden auf eine Größe von 1-8 x 10 cm zugeschnitten; die Laufstrecke betrug 5-10 cm. Alle R_f-Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt. Die Detektion der UV-aktiven Substanzen erfolgte mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm. Die Detektion der nicht UV-aktiven Substanzen erfolgte in einer Iodkammer.

9.2.2 Präparative Säulenchromatographie

Substanzgemische zwischen 0.1 g - 10 g Rohausbeute wurden über eine Säule mit leichtem Überdruck gereinigt. Als Trennmaterial wurde Kieselgel mit einer Korngröße von 0.035 - 0.070 mm, 60 Å [60.08]; SiO_2 (Acros Organics / Merck) verwendet. Bei säure- bzw. basenlabilen Verbindungen wurde Aluminiumoxid 90 aktiv, neutral, Aktivitätsstufe III mit der Korngröße 0.063 - 0.200 mm (70-230 mesh ASTM) (Merck) verwendet.

9.2.3 Zirkulare präparative Dünnschichtchromatographie (Chromatotron)

Unempfindliche Substanzgemische mit weniger als 1 g Rohausbeute wurden über eine Platte mit einer Schichtdicke von 1 - 4 mm gereinigt. Als Trennmaterial wurde Kieselgel Merck Typ 7749 mit Gipszusatz und Fluoreszenzindikator [60 PF_{254}] verwendet.

9.2.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Hochleistungschromatographie wurde an einer Merck-Hitachi-Anlage mit der Software Chromatography Data Station Software HPLC System Manager Version 3.1.1. durchgeführt. Bei dem Interface handelte es sich um das Model L-7000, bei der Pumpe um das Model L-7100, bei dem automatischen Probenwechsler um das Model L-7200 und bei dem Dioden Array Detektor um das Model L-7455. Es wurde eine RP-18 endcapped 5 µm Li Chrosphor 100, EcoCART 125-3 Säule verwendet.

HPLC-Methoden:

1) Reinigung 12mere: Acetonitril-Gradient von 0-23% in TEAA-Puffer (pH 6.9) bis 50 Minuten, dann 100% Acetonitril für 5 Minuten und anschließend 100% TEAA-Puffer für 10 Minuten.

2) Reinigung 20mere: Acetonitril-Gradient von 0-26% in TEAA-Puffer (pH 6.9) bis 50 Minuten, dann 100% Acetonitril für 5 Minuten und anschließend 100% TEAA-Puffer für 10 Minuten.

3) Enzymatischer Abbau durch EcoRI:
Acetonitril-Gradient von 0-25% in Triethylammonium-acetat-Puffer (pH 8.0) bis 20 Minuten, dann für 5 Minuten 100% Acetonitril und abschließend 100% Triethylammoniumacetat-Puffer für 10 Minuten.

9.2.5 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden in der spektroskopischen Abteilung der Universität Hamburg in den Instituten für Organische und Anorganische Chemie aufgenommen. Es standen folgende Geräte zur Verfügung:

<u>^{1}H-NMR</u>

Bruker AMX 400 (400 MHz), Bruker DMX 500 (500 MHz), Bruker AV 400 (400 MHz). Die Standardisierung erfolgte gegen DMSO-d_6 (δ= 2.50 ppm), $CDCl_3$ (δ= 2.50 ppm), CD_3OD (δ= 3.31 ppm) und C_6D_6 (δ= 7.26 ppm). Die Aufnahmen erfolgten bei 400 MHz in 5 mm Röhrchen über einen Messbereich von -2 bis +14 ppm.

^{13}C-NMR

Bruker AMX 400 (101 MHz), Bruker AV 400 (101 MHz). Die Standardisierung erfolgte gegen DMSO-d_6 (δ= 39.52 ppm), $CDCl_3$ (δ= 77.16 ppm), CD_3OD (δ= 49.00 ppm) und C_6D_6 (δ= 128.00 ppm). Die Aufnahmen erfolgten bei 100.6 MHz in einem Messbereich von 0 bis 200 ppm.

^{31}P-NMR

Bruker DMX 500 (202 MHz).
Die Standardisierung erfolgte gegen einen externen Standard (85% Phosphorsäure).

Zur Wiedergabe der Multiplizitäten in den ^{1}H-, ^{13}C- und ^{31}P-NMR-Spektren finden folgende Abkürzungen Verwendung:
s= Singulett, d= Dublett, dd= doppeltes Dublett, ddd= dreifaches Dublett, dt= Dublett vom Triplett, t= Triplett, q= Quadruplett, quin= Quintett, sept= Septett, m= Multiplett. Die Zuordnung der Signale erfolgte durch die Aufnahme zweidimensionaler Spektren (H,H-COSY, HSQC, HMBC, NOESY).

9.2.6 Massenspektrometrie (MS)

FAB (*Fast Atom* Bombardement):

Die FAB-Massenspektren wurden an der Universität Hamburg am Institut für Organische Chemie mit einem doppelfokussierenden Spektrometer VG/70-250 F der Firma VG Analytical gemessen. Als Stoßgas wurde Xenon, als Matrix *m*-Nitrobenzylalkohol verwendet.

EI (Elektronenstoß-Ionisation):

Die EI-Massenspektren wurden an der Universität Hamburg am Institut für Organische Chemie mit einem doppelfokussierenden VG Analytical VG/70-250S-Spektrometer aufgenommen.

ESI (Elektrospray-Ionisation):

Die ESI-Massenspektren wurden an der Universität Hamburg am Institut für Organische Chemie mit einem ThermoQuest Spektrometer der Marke Finnigan, Modell MAT 95 XL gemessen.

HPLC-ESI-MS: Die HPLC-ESI-MS Spektren wurden an der Universität Hamburg am Institut für Organische Chemie mit einem Agilent Technologies 6224 TOF LC/MS 1200 Series gemessen.

MALDI-TOF (*Matrix-Assisted LASER Desorption Ionization Time of Flight)*:

Die MALDI-TOF-Spektren wurden an der Universität Hamburg am Institut für Organische Chemie mit einem Bruker BIFLEX III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) Spektrometer mit einem Delay von 30000 und einer Attenuation von 25 aufgenommen. Die Ionisation erfolgte mittels eines 337 nm Stickstoff-Lasers (3-5 ns). Ein Micro channel Plate (MCP) dient als Detektor. Als Software wurden xacq tof 4.0 und xmass 5.1.0 verwendet.

9.2.7 Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden in einseitig offenen Schmelzpunktröhrchen mit einem Schmelzpunkt-Bestimmungsgerät apotec der Firma Otto Stein ermittelt.

9.2.8 Infrarot-Spektrometer

Die IR-Spektren wurden an einem IR-Spektrometer AVATAR 370 FT-IR und an einem IR-Spektrometer Bruker Alpha P ATR bei Raumtemperatur in einem Messbereich von 400 - 4000 cm^{-1} aufgenommen. Die Substanzen wurden als Pulver, Flüssigkeit, KBr - Presslinge sowie mit Hilfe von NaCl-Platten gemessen.

9.2.9 Polarimeter

Der Drehwert der chiralen Verbindungen wurde an einem Perkin Elmer Polarimeter 341 mit einer Hg-Lampe (546 nm) und an einem Perkin Elmer Polarimeter mit einer Na-Lampe (598 nm, *D*-Linie) bei Raumtemperatur aufgenommen. Der am Polarimeter abgelesene Wert ist der optische Drehwert α, welcher in den spezifischen Drehwert $|\alpha|_{\lambda}^{t}$ mit der Formel $|\alpha|_{\lambda}^{t} = \frac{\alpha * 100}{c * l}$ umgerechnet werden muss.

9.2.10 Zentrifuge

Das Absetzen fester Rückstände erfolgte mit Hilfe einer Biofuge der Firma Heraeus, Modell Pico.

9.2.11 UV-Spektrometer

Die UV-Spektren wurden an einem UV-Spektralphotometer (CARY 1E) der Firma Varian aufgenommen.

9.2.12 Thermomixer

Die Abspaltung der Oligonucleotide vom festen Träger wurde in einem Eppendorf Thermomixer, Modell 5436, bei Raumtemperatur und wahlweise bei 45 °C oder 55 °C durchgeführt. Die Inkubation der Oligonucleotid- bzw. der Matrix-Lösung mit dem vorbehandelten Ionenaustauscher bei 10 °C wurde ebenfalls in einem Eppendorf Thermomixer, Modell 5436 durchgeführt. Da der Thermomixer diese Temperatur nicht halten kann, wurde dieser über Nacht in den Kühlschrank gestellt.

9.2.13 Speed-Vac-Probenkonzentrator

Die Oligonucleotide wurden in einem Speed-Vac-Probenkonzentrator, einer Zentrifuge mit integrierter Membranpumpe, der Firma Eppendorf getrocknet.

9.2.14 DNA/RNA-Synthesizer

Die modifizierten und unmodifizierten Oligonucleotide wurden in einem DNA-Synthesizer der Firma Applied Biosystems, Modell 394 DNA/RNA Synthesizer, synthetisiert. Die Synthesen wurden dabei nach der Phosphoramidit-Methode durchgeführt.

9.2.15 Zirkularer Dichroismus (CD)

Die Messungen des zirkularen Dichroismus wurden an einem CD Instrument Model 215 der Firma AVIV durchgeführt.

9.3 Synthese von Oligonucleotiden

9.3.1 Synthese

Die Synthese der DNA-Oligonucleotide wurde im Maßstab 1 µM mit Hilfe der Phosphoramiditmethode durchgeführt. Für unmodifizierte DNA-Stränge wurde das Standardprotokoll der DNA-Synthese verwendet (s. Anhang).
Für die Synthese der modifizierten DNA-Oligonucleotide wurde dieses Protokoll abgewandelt und ein weiterer Kupplungsschritt eingeführt, sowie die Kupplungszeit erhöht (s. Anhang).
Für den Einbau der C8-(*N*-Acetyl)-arylamin modifizierten Phosphoramidite wurde als Capping-Reagenz CAP A (Tac_2O, *tert*-Butylphenoxyacetyl Anhydrid in THF) für *fast deprotection* verwendet.

9.3.2 Entschützung und Trägerabspaltung

Am Ende der DNA-Synthese wurde von allen Oligonucleotiden die letzte DMTr-Schutzgruppe mit dem Synthesemodus „Trityl-off“ entfernt. Die weitere Entschützung und die Abspaltung vom Träger wurden manuell durchgeführt.
Für die Abspaltung von der festen Phase sowie der Schutzgruppen der Nucleobasen wurden unterschiedliche Methoden angewandt.

Die noch festphasengebundenen unmodifizierten und C8-modifizierten Oligonucleotide wurden mit 1 mL 25% Ammoniak-Lösung und 17.5 µL ß-Mercaptoethanol versetzt und für mindestens 4 h im Thermomixer bei 55 °C geschüttelt. Der Überstand wurde mit Hilfe des Speed-Vac Probenkonzentrators entfernt, der Rückstand dreimal mit Reinstwasser gewaschen, mittels Spritzenfilter von der festen Phase befreit und in einem Speed-Vac-Probenkonzentrator getrocknet.
Die noch festphasengebundenen 8-(*N*-Acetyl)-arylamin modifizierten Oligonucleotide wurden mit 1 mL 5% - 25% Di*iso*propylamin in Methanol und 17.5 µL ß-Mercapto-ethanol versetzt und für mindestens 5 h bis maximal 24 h im Thermomixer bei 55 °C geschüttelt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog der C8-modifizierten Oligonucleotide.

9.3.3 Reinigung der Oligonucleotide

Das getrocknete Roh-Oligonucleotid wurde in 100 µL Reinstwasser aufgenommen und über die Säule an der HPLC gereinigt. Hierbei wurden manuell jeweils ~ 1.0 mL Fraktionen in Eppendorf-Caps aufgefangen und anschließend mittels analytischen Läufen die Reinheit der Fraktionen untersucht. Gleiche Fraktionen wurden vereinigt, an einem Speed-Vac-Probenkonzentrator bis zur Trockne eingeengt, und bei Bedarf noch einmal getrennt.

9.4 Analytik der Oligonucleotide

9.4.1 Bestimmung der optischen Dichte (OD_{260})

Eine OD_{260} - Einheit ist die Menge, die in 1.0 mL Wasser gelöst, im Spektral-photometer (1 cm Küvettendicke) bei 260 nm einen Absorptionswert von 1.0 erzeugt. Um die OD_{260} - Menge zu bestimmen, wurde das gereinigte Oligonucleotid in 100 µL Reinstwasser gelöst und 10 µL davon mit 990 µL Reinstwasser auf 1000 µL Gesamtlösung verdünnt. Diese Lösung wurde in einer Quarzküvette in einem UV/VIS-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen. Der Absorptionswert (A_{260}) wurde mit dem Faktor 10 (für zehnfache Verdünnung) multipliziert und ergibt so den OD_{260} - Wert.

Mittels des Oligo Calculators 3.1 der Firma Northwestern (http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html) wurden die Stoffmengen sowie die Mengen der Oligonucleotide ausgehend vom gemessenen OD_{260} - Wert berechnet. Bei modifizierten Basen wurde dieser Wert durch die zuvor berechnete Masse des Oligonucleotids dividiert und somit die Menge des tatsächlich vorhandenen Oligonucleotids ermittelt.

9.4.2 Präparation der Oligonucleotide für das ESI - MS

Es erfolgte eine Verdünnung der Oligonucleotide mit einer Lösung aus 20% *Isop*ropanol in Wasser und 1% Triethylamin auf eine Konzentration von 50 pmol/µL. Für die Verdünnung der acetylierten Oligonucleotide wurde nur Wasser auf eine Konzentration von 50 pmol/ µL verwendet.

9.4.3 Präparation der Oligonucleotide für das HPLC-ESI - MS

Es erfolgte eine Verdünnung der Oligonucleotide mit Wasser auf eine Konzentration von 50 pmol/µL.

9.4.4 Präparation der Oligonucleotide für die MALDI-TOF Messung

Es wurden 2 µL einer 50 pmolaren Oligonucleotid-Lösung in Reinstwasser mit einer Spatelspitze des vorbehandelten Dowex® Ionenaustauschers über Nacht bei 10 °C im Thermomixer inkubiert. Nach anschließender Zugabe von 2 µL Matrix-Lösung und Vortexten wurde die gesamte Lösung auf den Probenteller aufgetragen und zum Co-Kristallisieren stehen gelassen.

9.4.5 Bestimmung der Schmelztemperatur (T_m-Wert)

Die T_m - Werte wurden im 1 µM-Maßstab (1 nmol je Strang, gelöst in 1 mL Puffer) in einem 10 mM Phosphat-Puffer mit 140 nM NaCl und 1 mM EDTA, pH 6.8 vermessen. Die Messungen wurden in einem Temperaturbereich von 5 °C bis 80 °C durchgeführt. Die Probe wurde jeweils dreimal von 5 °C auf 80 °C erhitzt und dreimal von 80 °C auf 5 °C abgekühlt. Die Heiz- bzw. Kühlra te betrug hierbei 0.5 °C/min., wobei alle 0.5 °C ein Datenpunkt aufgenommen wurde. Die Absorption der Probelösung wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm verfolgt. Von der resultierenden sigmoiden Kurve wurde das Maximum der 1. Ableitung zur Bestimmung des Schmelzpunktes berechnet und die einzelnen Werte gemittelt.

9.4.6 Messung des zirkularen Dichroismus

Für die Messung des zirkularen Dichroismus wurden die verwendeten Lösungen der Schmelzpunktbestimmung auf 3 mL mittels des Phosphatpuffers (pH= 6.8) verdünnt und die molare Elliptizität zwischen 350 - 200 nm gemessen.

9.4.7 Enzymatischer Abbau der Oligonucleotide mittels des EcoRI Restriktions-enzyms

Es wurden jeweils so viele µL wässrige Oligonucleotid-Lösung eingesetzt, dass mit einem OD von 0.4 gearbeitet werden konnte. Nach der Aufkonzentration wurde das Oligonucleotid in 100 µL DTT-Puffer aufgenommen, für ca. 2 Minuten auf 70 °C erhitzt und durch Eiskühlung wieder abgekühlt. Es folgte die Inkubation mit 27 µL EcoRI (270 Units) bei ca. 23 °C im Thermomixer. Je Probe wurden 20 µL Reaktionslösung und 40 µL Reinstwasser verwendet und sofort an der HPLC vermessen. Für die Bestimmung der Halbwertszeit wurden die Integrale des Oligonucleotids und der beiden Restriktionsprodukte bestimmt und die Menge des geschnittenen Oligonucleotids zu den jeweiligen Zeitpunkten mittels der folgenden Formel bestimmt:[109]

$$\mu M_{\text{geschnittenes Oligonucleotid}} = \frac{[\text{Integral d(GTAG)}][\varepsilon_{260}(\text{GTAGAATTCTAC})][\mu M\, d(\text{GTAGAATTCTAC})_{orig.}]}{[(\text{Summe aller Integrale})^* [\varepsilon_{260}[d(\text{GTAG})]]]}$$

Nach Auftragen des natürlichen Logarithmus der berechneten Menge gegen die Zeit konnte, unter der Annahme einer Reaktion 1. Ordnung, die Halbwertszeit nach folgender Formel berechnet werden:

$$\tau_{1/2} = \ln 2 / k$$

k ergibt sich aus der Gleichung des Graphen

9.4.8 Primer Extension Bedingungen

Für die Primer Extension Reaktionen wurden 10 µl Reaktionsvolumen, 200 µM dNTPs, 100 nM ^{32}P-markierter Primer (15 nt, 5'-CGC GTC GTA GAT GCT-3'), 150 nM Templat in 1x Reaktionspuffer verwendet.

<u>1x Reaktionspuffer</u>

human DNA polymerase *β*: 50 mM TrisHCl (pH 8.0), 10 mM $MgCl_2$, 2 mM DTT, 20 mM NaCl, 20 mM KCl, 1%(v/v) glycerol

Dpo4 DNA polymerase: 50 mM TrisHCl (pH 7.8), 5 mM DTT, 50 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 5%(v/v) glycerol)

<u>Polymerase Bedingungen</u>

human DNA polymerase *β*: 50 nM, 37℃ @ 30 min Reaktionszeit

Dpo4 DNA polymerase: 200 nM, 37℃ @ 30 min Reaktionszei t

10. Synthesen

10.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Reaktionen unter Stickstoffatmosphäre und mit getrockneten Lösungsmitteln durchgeführt.

Darstellung der C8-*N*H-Arylamin-Addukte mittels Buchwald-Hartwig-Kupplung **(AAV 1)**

Es wurden 10 mol% $Pd_2(dba)_3$ und 30 mol% racemisches BINAP in 1,2-Dimethoxyethan vorgelegt und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 1 Äq. 8-Brom-3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-desoxyadenosin **41** bzw. 1 Äq. 8-Brom-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin **53**, 1.5 Äq. Cs_2CO_3 und 2.5 Äq. Arylamin zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 24 - 72 h bei 95 °C unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (PE/EE; 2:1 v/v).
Nach Reaktionsende wurde die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur gekühlt und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt. Nach Zugabe von gesättigter Natriumchloridlösung wurden die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen anschließend zweimal mit gesättigter Natriumchloridlösung und einmal mit einer Mischung aus gesättigter Natriumchloridlösung und Wasser gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE; 5% → 30% v/v) und lieferte das gewünschte C8-*N*H-Arylamin-Addukt.

Einfache Benzoylschützung der C8-*N*H-Arylamin-modifizierten 2´-Desoxyadenosin-Derivate **(AAV 2)**

Das C8-*N*H-Arylamin-modifizierte, geschützte 2´-dA-Derivat **42**, **57** wurde, nach dreimaliger Coevaporation mit Pyridin, in 10 mL Pyridin pro mmol gelöst, mit 1.5 Äq. Benzoylchlorid versetzt und bei Raumtemperatur 24 h gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 19:1 v/v). Die Reaktion wurde durch Zugabe von Dichlormethan beendet. Die organische Phase wurde zweimal mit Wasser gewaschen und die wässrige Phase anschließend dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden von Lösungsmittel befreit und der Rückstand dreimal mit Toluol coevaporiert.
Das erhaltene Gemisch aus einfach und zweifach benzoyliertem Produkt wurde in einem Pyridin/Wasser/Ammoniaklösung (25 %) - Gemisch (4:2:1) aufgenommen und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet. Das Produkt wurde erneut dreimal mit Toluol coevaporiert. Anschließend erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung (DCM/MeOH; 19:1 v/v).

Doppelte Benzoylschützung der C8-*N*H-Arylamin-modifizierten 2´-Desoxyadenosin-Derivate **(AAV 2.1)**

Das C8-*N*H-Arylamin-modifizierte, geschützte 2´-dA-Derivat **42**, **57** wurde, nach dreimaliger Coevaporation mit Pyridin, in 10 mL Pyridin pro mmol gelöst, mit 5 Äq. Benzoylchlorid versetzt und bei Raumtemperatur 17 h gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 19:1 v/v). Die Reaktion wurde durch Zugabe von Dichlormethan beendet. Die organische Phase wurde zweimal mit Wasser gewaschen und die wässrige Phase anschließend dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden von Lösungsmittel befreit und der Rückstand dreimal mit Toluol coevaporiert. Anschließend erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung (DCM/MeOH; 0% → 1% v/v).

Acetylierung der C8-(*N*H-Aryl)-Position des modifizierten 2´-Desoxyadenosin-Derivats **(AAV 3)**

Es wurde 1 Äq. des N^6-Dibenzoyl geschütztem C8-*N*H-Arylamin-modifiziertem 2´-Desoxyadenosins in Pyridin gelöst und mit jeweils 3 Äq. 4-DMAP und Essigsäureanhydrid versetzt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend bei Raumtemperatur zwischen 30 - 72 h, abhängig vom verwendeten Arylamin, gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 99:1 v/v). Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand dreimal mit Toluol coevaporiert. Anschließend erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung (DCM/MeOH, 0% → 0.5 % v/v).

Entfernung der Silylether-Schutzgruppe der Benzoyl-geschützten Arylamin - modifizierten 2´-Desoxyadenosin-Derivate **(AAV 4)**

Es wurde 1 Äq. des N^6-Benzoyl / N^{6-}Dibenzoyl geschütztem Arylamin-modifiziertem 2´-Desoxyadenosins in 15 mL THF pro mmol gelöst und langsam mit 2 Äq. TBAF in THF versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 - 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 9:1 v/v). Nach Beenden der Reaktion wurde das Lösungsmittel entfernt und das Produkt säulenchromatographisch (DCM/MeOH; 0% → 15% v/v) gereinigt.

Entfernung der Silylether-Schutzgruppe der Benzoyl-geschützten Arylamin-modifizierten 2´-Desoxyadenosin-Derivate und der Benzoyl-geschützen C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten 2´-Desoxyadenosin-Derivate **(AAV 4.1)**

Es wurde 1 Äq. des N^6-Benzoyl / N^6-Dibenzoyl geschütztem Arylamin-modifiziertem 2´-Desoxyadenosins in 12 mL THF/DCM (1:1 v/v) pro mmol gelöst, mit 10 Äq. Triethylamin und 12.5 Äq. Triethylamin-Trihydroflourid versetzt und bis zur vollständigen Umsetzung des Eduktes bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 9:1 v/v). Nach Ende der Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand säulenchromatographisch (DCM/MeOH; 0% → 40% v/v) gereinigt.

Entfernung der Silylether-Schutzgruppe der Benzoyl-geschützten C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten 2´-Desoxyadenosin-Derivate **(AAV 4. 2)**

Es wurde 1 Äq. des N^6-Benzoyl geschütztem C8-(*N*-Acetyl)-arylamin modifiziertem 2´-Desoxyadenosins in 15 mL THF pro mmol gelöst, auf 0 °C gekühlt und langsam mit 3 Äq. TBAF in THF und 6 Äq. Essigsäure versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 24 - 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 9:1 v/v). Nach Beenden der Reaktion wurde das Lösungsmittel entfernt und das Produkt säulenchromatographisch (DCM/MeOH; 0 % → 15 % v/v) gereinigt.

Entfernung der Silylether-Schutzgruppe der Benzoyl-geschützten Arylamin-modifizierten 2´-Desoxyadenosin-Derivate und der Benzoyl-geschützen C8-(*N*-Acetyl)-arylamin-modifizierten 2´-Desoxyadenosin-Derivate **(AAV 4.3)**

Es wurde 1 Äq. des N^6-Benzoyl geschütztem Arylamin-modifiziertem 2´-Desoxy-adenosins in 12 mL THF/DCM (1:1 v/v) pro mmol gelöst, mit 12.5 Äq. Triethylamin-Trihydrofluorid versetzt und bis zur vollständigen Umsetzung des Eduktes (16 h) bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromato-graphisch (DCM/MeOH; 9:1 v/v). Nach der Zugabe von gesättigter NaCl-Lösung erfolgte die Phasentrennung. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt mit vorgekühltem Hexan ausgefällt.

DMTr-Schützung der Arylamin-modifizierten 2´-Desoxyadenosin-Derivate **(AAV 5)**

Es wurde 1 Äq. Arylamin-modifiziertes 2´-dA dreimal mit Pyridin coevaporiert und der Rückstand in 15 mL Pyridin pro mmol Edukt gelöst. Anschließend wurden 1 Äq. DMTrCl **88** und 2 Äq. Silbernitrat zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt und im Fall von noch vorhandenem Edukt mit weiteren 0.5 Äq. DMTrCl versetzt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 9:1 v/v). Nach Reaktionsende wurde Dichlormethan zugegeben und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM/MeOH; 0% → 4%, 0.1% Et_3N v/v) gereinigt. Bei den C8-(*N*-Acetyl)-arylamin modifizierten Derivaten wurde die säulenchromatographische Reinigung über Aluminiumoxid (Alox, neutral, Akt.stufe III) ohne Zusatz von Triethylamin durchgeführt.

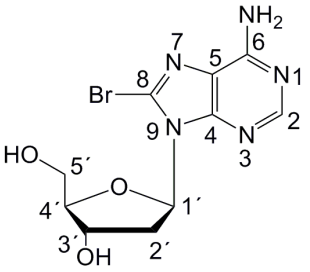
Umsetzung zum Phosphoramidit **(AAV 6)**

Es wurde 1 Äq. DMTr-geschütztes Arylamin-modifiziertes 2´-Desoxyadenosin-Derivat in einem Lösungsmittelgemisch aus 6 mL Dichlormethan und 6 mL Acetonitril pro mmol vorgelegt und mit 1 Äq. DCI versetzt. Es wurden 1.5 Äq. Bis(*N,N´*-di*iso*propylamino)-2-*O*-cyanoethylphosphit **101** unter Rühren zugetropft. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 9:1 v/v). Nach vollständiger Umsetzung wurde Wasser zugegeben. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Rotationsverdampfer auf Aluminiumoxid (neutral, Akt.stufe III) aufgetragen und anschließend säulenchromatographisch über Aluminiumoxid (DCM/MeOH; 0% → 1% v/v) gereinigt. Das Produkt wurde anschließend durch Gefriertrocknung aus Benzol isoliert.

10.2 Synthese der Substanzen

Die Nummerierung der Atome kann von der IUPAC-Nomenklatur abweichen.

Synthese von 8-Brom-2´-desoxyadenosin 56[75]

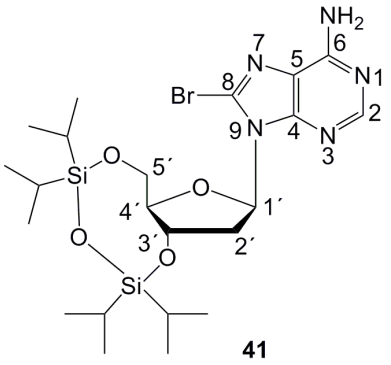


56

Es wurden 16.1 g (59.9 mmol) 2´-Desoxyadenosin-Monohydrat **20** in 350 mL frisch zubereiteten 0.5 M Natriumacetatpuffer pH 5.0 suspendiert und langsam mit 6.20 mL (9.57 g, 120 mmol, 2 Äq.) Brom in 600 mL Wasser versetzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 4:1 v/v). Der Reaktionsabbruch erfolgte durch Zugabe von gesättigter Natriummetabisulfitlösung und Neutralisation mit 2 N NaOH. Das Produkt **56** wurde filtriert, mit Wasser gewaschen und im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 13.9 g (42.0 mmol, 70 %) eines beige-farbenen Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{10}H_{12}BrN_5O_3$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 4:1 v/v): 0.20. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{22°C}$: -19.0 ° (c= 0.6, CH_2Cl_2/CH_3OH; 1:1 v/v). - **Smp.:** Die Substanz zersetzt sich oberhalb von 197.6 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 8.11 (s, 1H, H2), 7.51 (bs, 2H, N**H**$_2$), 6.29 (dd, $^3J_{HH}$= 7.9 Hz, $^3J_{HH}$= 6.6 Hz, 1H, H1´), 5.33 (bs, 2H, 3´-O**H**, 5´-O**H**), 4.51 - 4.46 (m, 1H, H3´), 3.88 (dt, $^3J_{HH}$= 4.6 Hz, $^3J_{HH}$= 2.7 Hz, 1H, H4´), 3.65 (dd, $^2J_{HH}$= 11.8 Hz, $^3J_{HH}$= 4.5 Hz, 1H, H5´a), 3.48 (dd, $^2J_{HH}$= 11.8 Hz, $^3J_{HH}$= 4.7 Hz, 1H, H5´b), 3.28 - 3.21 (m, 1H, H2´a), 2.19 (ddd, $^2J_{HH}$= 13.2 Hz, $^3J_{HH}$= 6.4 Hz, $^3J_{HH}$= 2.6 Hz, 1H, H2´b). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 154.9 (C6), 152.2 (C2), 149.7 (C4), 126.5 (C8), 119.5 (C5), 88.1 (C4´), 86.2 (C1´), 71.0 (C3´), 61.9 (C5´), 36.8 (C2´). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr-Pressling): 3897, 3878, 3850, 3813, 3799, 3748, 3742, 3731, 3708, 3686, 3673, 3667, 3646, 3626, 3479, 1905, 1667, 1651, 1633, 1557, 1455, 1336, 1118, 991, 956, 911, 872, 834, 795, 766, 666, 524, 463, 431. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 329.0124 [M], 330.0202 [M+H]$^+$, gef.: 330.0185 [M+H]$^+$.

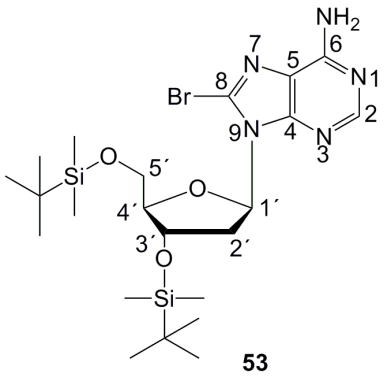
Synthese von 8-Brom-3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-desoxyadenosin 41[66]



Es wurden 10.0 g (30.3 mmol) 8-Brom-2´-dA **56** dreimal mit Pyridin coevaporiert, anschließend in 40 mL Pyridin gelöst, mit 18.2 mL (17.4 g, 60.6 mmol, 2 Äq.) TIPDS-Cl_2 versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 4:1 v/v). Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wurden die vereinigten wässrigen Phasen dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die wiederum vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde dreimal mit Toluol coevaporiert. Das Produkt **41** wurde über Nacht bei -20 °C aus Petrolether gefällt, filtriert und anschließend im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 17.0 g (29.7 mmol, 98%) eines farblosen Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{22}H_{38}BrN_5O_4Si_2$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 4:1 v/v): 0.80. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{22°C}$: -36.7 ° (c= 0.5, $CHCl_3$). - **Smp.:** 155 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.22 (s, 1H, H2), 6.28 (dd, $^3J_{HH}$= 8.9 Hz, $^3J_{HH}$= 2.8 Hz, 1H, H1´), 5.60 (bs, 2H, N**H**$_2$), 5.49 (dd, $^3J_{HH}$= 14.9 Hz, $^3J_{HH}$= 8.0 Hz, 1H, H3´), 3.99 - 3.95 (m, 2H, H4´, H5´a), 3.93 - 3.86 (m, 1H, H5´b), 3.22 (ddd, $^2J_{HH}$= 13.5 Hz, $^3J_{HH}$= 8.1 Hz, $^3J_{HH}$= 2.8 Hz, 1H, H2´a), 2.64 - 2.55 (m, 1H, H2´b), 1.15 - 1.11 (m, 10H, *iso*prop.-**H**), 1.08 - 1.03 (m, 18 H, *iso*prop.-**H**). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$): 154.3 (C6), 152.9 (C2), 150.0 (C4), 127.8 (C8), 120.5 (C5), 85.6 (C4´), 84.4 (C1´), 72.4 (C3´), 63.3 (C5´), 38.7 (C2´), 17.7, 17.6, 17.5, 17.5, 17.4, 17.3, 17.2, 17.2, 17.1 (*iso*prop.-**C**H$_3$), 13.4, 13.3, 12.9, 12.7 (*iso*prop.-**C**H). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr-Pressling): 3326, 3182, 2945, 2725, 1661, 1604, 1573, 1491, 1463, 1429, 1387, 1351, 1322, 1300, 1252, 1177, 1095, 946, 920, 885, 820, 797, 768, 692, 604. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 571.1646 [M], 572.1724 [M+H]$^+$, gef.: 572.1685 [M+H]$^+$.

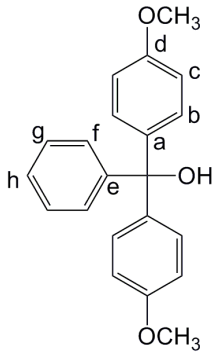
Synthese von 8-Brom-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin 53 [76]



Es wurden 3.00 g (9.09 mmol) 8-Brom-2´-dA **56** dreimal mit Pyridin coevaporiert und anschließend in 30 mL Pyridin gelöst. Es wurden 1.86 g (27.3 mmol, 3 Äq.) Imidazol und 4.11 g (27.3 mmol, 3 Äq.) TBDMSCl zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 19:1 v/v). Nach Zugabe von Wasser erfolgte die Phasentrennung. Die organische Phase wurde einmal mit Wasser und einmal mit einer gesättigten NaCl-Lösung extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die wiederum vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und anschließend vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde dreimal mit Toluol coevaporiert. Das Produkt **53** wurde durch Zugabe von Acetonitril bei -20 °C gefällt, filtriert und anschließend im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 3.35 g (7.78 mmol, 85%) eines beige-farbenen Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{22}H_{40}BrN_5O_3Si_2$. - **R_f-Wert:** 0.85 (DCM/MeOH; 9:1 v/v). - **Drehwert:** $[a]_{589nm}^{22°C}$: -8.21° (c= 0.67, $CHCl_3$). - **Smp.:** 139 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.25 (s, 1H, H2), 6.34 (t, $^3J_{H,H}$= 6.7 Hz, 1H, H1´), 5.59 (s, 2H, N**H**$_2$), 4.87 (dt, $^3J_{HH}$= 5.8 Hz, $^3J_{HH}$= 3.8 Hz, 1H, H3´), 3.88 - 3.97 (m, 2H, H4´, H5´a), 3.62 - 3.69 (m, 2H, H5´b, H2´a), 2.23 (ddd, $^2J_{HH}$= 13.2 Hz, $^3J_{HH}$= 6.9 Hz, $^3J_{HH}$= 4.3 Hz, 1H, H2´b), 0.93 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.82 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.14 (s, 6H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), -0.01 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), -0.05 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$). - **^{13}C-NMR**: δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$): 154.3 (C6), 152.7 (C2), 151.2 (C8), 128.5 (C4), 116.1 (C5), 87.9 (C4´), 86.5 (C1´), 72.5 (C3´), 62.8 (C5´), 36.9 (C2´), 26.0 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 25.8 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 18.2 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$), 18.1 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$), -4.7 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), -4.8 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), -5.0 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), -5.1 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr-Pressling): 3830, 3182, 2954, 2884, 2856, 1661, 1570, 1492, 1320, 1257, 1110, 838, 776, 669, 597, 554. - **MS (FAB, m/z):** ber.: 557.1853 [M], gef.: 557.12 [M].

Synthese von 4,4´-Dimethoxytriphenylcarbinol 87[110]

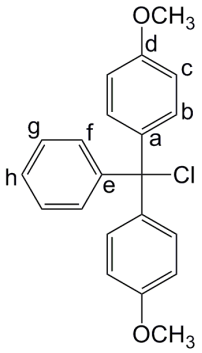


87

Es wurden 1.76 g (72.4 mmol) Magnesiumspäne mit 7.00 mL Tetrahydrofuran übergossen und unter Rühren mit 0.70 mL (1.05 g, 5.61 mmol) Bromanisol **86** versetzt. Nach Erwärmen der Lösung, durch Starten der Grignard-Reaktion, wurden 8.00 mL (12.0 g, 64.2 mmol) Bromanisol **86** in 17.5 mL Tetrahydrofuran langsam zugetropft und 1.5 h zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung langsam, unter sehr starkem Rühren mit 4.30 mL (4.50 g, 30.0 mmol) Benzoesäureethylester in 4.30 mL Tetrahydrofuran versetzt, 30 Minuten unter Rückfluss erhitzt und mit Eis hydrolysiert. Durch Zugabe von ca. 40.0 mL 10%iger Schwefelsäure wurde der entstandene Niederschlag gelöst, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase zweimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und einmal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde in 15.0 mL Toluol gelöst und azeotrop destilliert. Das Produkt **87** wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 8.81 g (27.5 mmol, 92% bezogen auf Benzoesäureethylester) eines gelb-orange-farbenen Sirups. - **Summenformel:** $C_{21}H_{20}O_3$. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 7.28 - 7.26 (m, 2H, Hf), 7.23 - 7.20 (m, 3H, Hg, Hh), 7.11 - 7.07 (m, 4H, Hb), 6.87 - 6.83 (m, 4H, Hc), 6.24 (s, 1H, O**H**), 3.73 (s, 6H, O-C**H**$_3$). - **^{13}C-NMR** δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d_6): 157.8 (Cd), 148.3 (Ce), 140.2 (Ca), 128.9 (Cb), 127.6 (Cf), 127.4 (Cg), 126.4 (Ch), 112.7 (Cc), 79.9 (**C**$_{quart.}$-OH), 54.9 (O-**C**H$_3$). - **IR**: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr-Pressling): 3485, 3058, 3032, 3001, 2954, 2933, 2835, 1608, 1509, 1463, 1445, 1298, 1250, 1177, 1157, 830.

Synthese von 4,4´-Dimethoxytriphenylmethylchlorid 88[110]

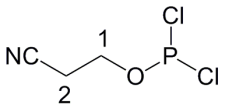


88

Es wurden 8.71 g (27.2 mmol) 4,4´-Dimethoxytriphenylcarbinol **87** in 8.00 mL Toluol gelöst, mit 7.00 mL (7.70 g, 98.0 mmol) Acetylchlorid versetzt und ca. 2.5 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel durch Kältedestillation abgetrennt und der Rückstand mit 0.20 mL (0.22 g, 28.0 mmol) Acetylchlorid und 8.60 mL Cyclohexan versetzt, zum Sieden erhitzt und zum Kristallisieren unter Lichtausschluss 18 h stehen gelassen. Die gelblichen Kristalle wurden viermal mit jeweils ca. 10 mL Cyclohexan gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit des Produktes **88** konnte keine vollständige Charakterisierung stattfinden.

Ausbeute: Es wurden 7.67 g (22.7 mmol, 83%) eines farblosen kristallinen Feststoffs erhalten. - **Summenformel:** $C_{21}H_{19}ClO_2$. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 7.30 - 7.26 (m, 2H, Hf), 7.23 - 7.17 (m, 3H, Hg, Hh), 7.09 - 7.05 (m, 4H, Hb), 6.86 - 6.82 (m, 4H, Hc), 3.72 (s, 6H, O-C**H**$_3$). - **^{13}C-NMR** δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d_6): 157.8 (Cd), 148.3 (Ce), 140.2 (Ca), 128.9 (Cb), 127.6 (Cf), 127.4 (Ch), 126.4 (Cg), 112.8 (Cc), 79.9 (**C**$_{quart.}$-Cl), 55.0 (O-**C**H$_3$).

Synthese von 2-Cyanoethylphosphordichlorit 100[87]

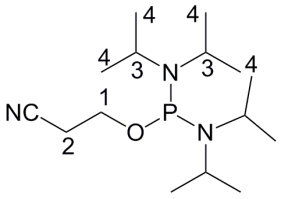


100

Es wurden 8.60 mL (13.7 g, 0.10 mol) frisch destilliertes Phosphortrichlorid **99** in 8.10 mL Pyridin und 20.0 mL Diethylether gelöst, auf -78 °C gekühlt und tropfenweise über einen Zeitraum von 1.5 h mit 6.80 mL (7.10 g, 0.10 mol) frisch destilliertem 3-Hydroxypropionitril versetzt. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur und 12 h Rühren wurde der Niederschlag unter Schutzgas filtriert und zehnmal mit je 10.0 mL Diethylether gewaschen. Das entstandene Produkt wurde ohne weitere Aufarbeitung *in situ* umgesetzt.

Eine Charakterisierung konnte nicht erfolgen, da die Substanz licht- und luftempfindlich ist und somit gleich umgesetzt werden musste.

Synthese von Bis-*N,N´*-di*iso*propylamino-(2-*O*-cyanoethyl)-phosphit 101[87]



101

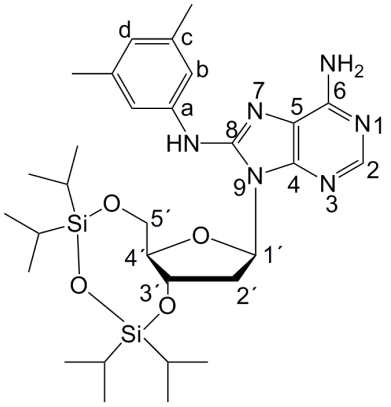
Das frisch hergestellte 2-Cyanoethylphosphordichlorit **100** wurde in 100 mL Diethylether gelöst und bei -10 °C innerhalb 1 h mit 86.7 mL (62.1 g, 0.61 mol) *N,N´*-Di*iso*propylamin versetzt. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur und 12 h Rühren wurde der Niederschlag unter Schutzgas filtriert und dreimal mit Diethylether gewaschen. Die Reaktionsmischung wurde im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der ölige Rückstand wurde mit 200 mg Calciumhydrid versetzt und im Ölpumpenvakuum bei 109 - 111 °C über eine Vigreuxkolonne destilliert.

Ausbeute: 18.8 g (62.3 mmol, 62%) eines farblosen Öls über zwei Stufen. - **Summenformel:** $C_{15}H_{32}N_3OP$. - **Sdp.:** 110 °C im Ölpumpenvakuum. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, Benzol-d_6): 3.51 - 3.43 (m, 4H, H3), 3.32 - 3.24 (m, 2H, H1), 1.79 - 1.74 (m, 2H, H2), 1.22 - 1.08 (m, 24H, H4). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, Benzol-d_6): 117.8 (**C**N), 59.5 (C1), 44.9 (C3), 44.8 (C3), 24.7 (C4), 24.6 (C4), 24.1 (C4), 24.0 (C4), 20.3 (C2). - **^{31}P-NMR:** δ [ppm] (202 MHz, Benzol-d_6): 121.14. - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (NaCl-Plättchen): 3194, 2967, 2930, 2871, 2720, 2609, 2487, 2358, 2252, 1739, 1606, 1458, 1414, 1391, 1378, 1362, 1326, 1308, 1243, 1219, 1183, 1157, 1117, 1076, 1059, 954, 889, 867, 845, 719. - **MS** (FAB, m/z): ber.. 203.2283 [M], gef.: 203.5 [M].

Synthese von C8-*N*H-(3,5-Dimethyphenyl)-3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-desoxyadenosin 42d[40, 41]

Die Reaktion wurde nach **AAV 1** durchgeführt.

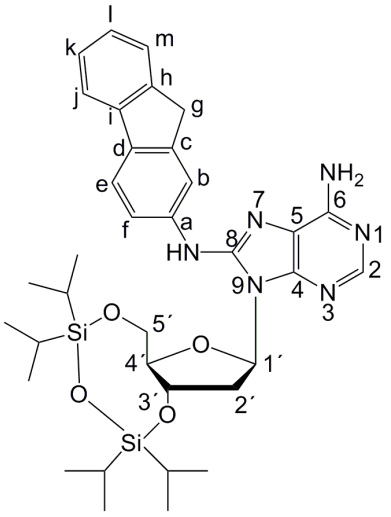
Es wurden 320 mg (0.30 mmol) $Pd_2(dba)_3$, 261 mg (1.00 mmol) *rac*-BINAP, 2.00 g (3.50 mmol) 3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-dA **41**, 1.70 g (5.20 mmol) Cs_2CO_3 und 1.00 mL (1.10 g, 8.70 mmol) 3,5-Dimethylanilin **4** in 50 mL 1,2-DME verwendet. Die Reaktionsmischung wurde 72 h bei 95 ℃ unter Rückfluss erhitzt.



42d

Ausbeute: 2.10 g (3.40 mmol, 96 %) eines gelb-braunen kristallinen Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{30}H_{48}N_6O_4Si_2$. - **DC:** R_f-Wert (PE/EE; 2:1 v/v): 0.10. - **Smp.:** 184 ℃. - **Drehwert:** $[\alpha]^{22°C}_{589nm}$: -37 ° (c= 1, $CHCl_3$). - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.18 (s, 1H, H2), 7.40 (bs, 1H, N**H**), 7.19 (s, 2H, Hb), 6.70 (s, 1H, Hd), 6.29 (dd, $^3J_{HH}$= 7.5 Hz, $^3J_{HH}$= 3.9 Hz, 1H, H1´), 5.28 (s, 2H, N$\mathbf{H}_2$), 4.88 (dd, $^3J_{HH}$= 14.2 Hz, $^3J_{HH}$= 7.6 Hz, 1H, H3´), 4.16 - 4.09 (m, 2H, H4´, H5´a), 3.96 - 3.90 (m, 1H, H5´b), 3.1 (ddd, $^2J_{HH}$= 13.4 Hz, $^3J_{HH}$= 8.0 Hz, $^3J_{HH}$= 3.9 Hz, 1H, H2´a), 2.58 - 2.49 (m, 1H, H2´b), 2.32 (s, 6H, 2 x C$\mathbf{H}_3$), 1.10 - 1.01 (m, 20H, *iso*propyl.-**H**), 0.96 - 0.91 (m, 8H, *iso*propyl.-**H**). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (100 MHz, $CDCl_3$): 152.5 (C6), 150.5 (C2), 149.3 (C4), 139.1 (Ca), 138.9 (Cc), 127.9 (C8), 126.0 (Cd), 117.5 (C5), 116.9 (Cb), 85.4 (C4´), 84.0 (C1´), 70.9 (C3´), 62.3 (C5´), 38.9 (C2´), 21.6 (**C**H_3), 17.6, 17.5, 17.3, 17.3, 17.3, 17.2, 17.1, 17.1 (*iso*prop.-**C**H_3), 13.3, 13.3, 12.8, 12.6 (*iso*prop.-**C**H). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr-Pressling): 3376, 2944, 2866, 1635, 1567, 1464, 1386, 1333, 1288, 1250, 1185, 1139, 1115, 1087, 1034, 947, 885, 694. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 612.3276 [M], 613.3354 $[M+H]^+$, gef.: 613.3339 $[M+H]^+$.

Synthese von C8-*N*H-(2-Fluorenyl)-3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-desoxyadenosin 42f



42f

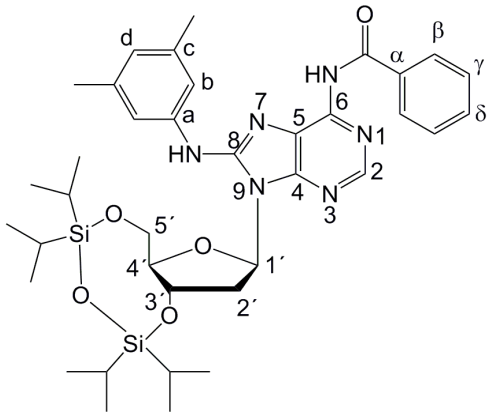
Die Reaktion wurde nach **AAV 1** durchgeführt.

Es wurden 292 mg (0.30 mmol) $Pd_2(dba)_3$, 655 mg (1.10 mmol) *rac*-BINAP, 2.00 g (3.50 mmol) 3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-dA **41**, 1.80 g (5.60 mmol) Cs_2CO_3 und 1.60 g (8.80 mmol) 2-Aminofluoren **3** verwendet und in 40 mL 1,2-DME gelöst. Die Reaktionsmischung wurde 72 h bei 95 °C unter Rückfluss erhitzt.

Ausbeute: 2.20 g (3.30 mmol, 94 %) eines orange-braunen Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{35}H_{48}N_6O_4Si_2$. - **DC:** R_f-Wert (PE/EE; 2:1 v/v): 0.11. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{22°C}$: -27 °(c= 0.1, $CHCl_3$). - **Smp.:** 99 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.20 (s, 1H, H2), 7.90 (s, 1H, Hb), 7.77 (bs, 1H, N**H**), 7.70 (dd, $^3J_{HH}$= 7.0 Hz, $^3J_{HH}$= 7.0 Hz, 2H, He, Hf), 7.54 - 7.49 (m, 2H, Hk, Hl), 7.37 - 7.32 (m, 1H, Hj/Hm), 7.27 - 7.23 (m, 1H, Hj/Hm), 6.34 (dd, $^3J_{HH}$= 7.6 Hz, $^3J_{HH}$= 3.8 Hz, 1H, H1´), 5.44 (bs, 2H, N$\mathbf{H}_2$), 4.91 (dd, $^3J_{HH}$= 15.1 Hz, $^3J_{HH}$= 7.8 Hz, 1H, H3´), 4.17 - 4.13 (m, 2H, H5´a, H4´), 4.06 - 4.01 (m, 1H, H5´b), 3.88 (s, 2H, Hg), 3.13 - 3.05 (m, 1H, H2´a), 2.60 - 2.52 (m, 1H, H2´b), 1.13 - 1.03 (m, 20H, *iso*prop.-**H**), 0.95 - 0.91 (m, 8H, *iso*prop.-**H**). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$): 152.6 (C6), 150.5 (C2), 149.2 (C4), 148.2 (C8), 144.6 (Ch), 143.0 (Cb), 141.7 (Ca), 138.3 (Ci), 136.7 (Cd), 126.8 (Cc), 126.5 (Cj), 125.0 (Cl), 120.3 (Ck), 119.4 (Cl), 118.1 (C5), 115.7 (Cf, Ce), 85.3 (C4´), 84.1 (C1´), 70.4 (C3´), 61.9 (C5´), 38.9 (Cg), 37.1 (C2´), 17.6, 17.4, 17.3, 17.2, 17.2, 17.1, 17.0 (*iso*prop.-**C**H_3), 13.5, 13.2, 12.8, 12.6 (*iso*prop.-**C**H). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr-Pressling): 3347, 3173, 2943, 2865, 1635, 1598, 1557, 1457, 1350, 1330, 1114, 1090, 1074, 1029, 992, 919, 884, 764, 729, 693. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 672.3276 [M], 673.3354 $[M+H]^+$, gef.: 673.3370 $[M+H]^+$.

Synthese von *N*^{6}-Benzoyl-8-*N*H-(3,5-dimethylphenyl)-[3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan]-2´-desoxyadenosin 68d[78]

Die Reaktion wurde nach **AAV 2** durchgeführt. Es wurden 1.00 g (1.60 mmol) C8-*N*H-(3,5-Dimethyphenyl)-3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-dA **42d** und 0.40 mL (484 mg, 2.90 mmol) Benzoylchlorid verwendet.

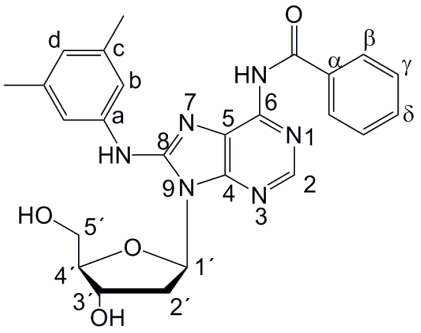


68d

Ausbeute: 828 mg (1.20 mmol, 71 %) eines gelben, kristallinen Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{37}H_{52}N_6O_5Si_2$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 19:1 v/v): 0.70. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{22°C}$: -10 ° (c= 0.14, $CHCl_3$). - **Smp.:** 135 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.42 (s, 1H, H2), 8.19 - 8.15 (m, 2H, Hβ), 7.92 (s, 1H, Hd), 7.71 - 7.66 (m, 2H, Hγ), 7.35 - 7.30 (m, 1H, Hδ), 7.24 (s, 2H, Hb), 6.61 (bs, 1H, N**H**), 6.30 (dd, $^3J_{HH}$= 7.6 Hz, $^3J_{HH}$= 3.3 Hz, 1H, H1´), 4.82 (dd, $^3J_{HH}$= 15.5 Hz, $^3J_{HH}$= 7.9 Hz, 1H, H3´), 4.11 - 4.17 (m, 1H, H5´a), 4.08 - 3.80 (m, 2H, H4´, H5´b), 3.07 (ddd, $^2J_{HH}$= 13.4 Hz, $^3J_{HH}$= 7.7 Hz, $^3J_{HH}$= 3.2 Hz, 1H, H2´a), 2.63 - 2.53 (m, 1H, H2´b), 2.09 (s, 6H, 2 x C**H**$_3$), 1.15 - 1.00 (m, 20H, *iso*propyl.-**H**), 0.93 - 0.83 (m, 8H, *iso*propyl.-**H**). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$): 172.5 (C=O), 151.1 (C6), 149.3 (C2), 148.5 (C4), 138.6 (Ca), 138.4 (Cα), 134.9 (Cc), 134.7 (**C**H-arom.), 133.7 (C8), 132.6 (**C**H-arom.), 129.4 (**C**H-arom.), 129.0 (**C**H-arom.), 128.6 (**C**H-arom.), 116.8 (C5), 85.5 (C4´), 85.0 (C1´), 69.8 (C3´), 61.5 (C5´), 39.1 (C2´), 21.4 (**C**H$_3$), 17.7, 17.5, 17.4, 17.3, 17.2, 17.1, 17.1 (*iso*prop.-**C**H$_3$), 12.7, 12.6 (*iso*prop.-**C**H). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr-Pressling): 2943, 2865, 1687, 1615, 1573, 1438, 1388, 1334, 1299, 1258, 1166, 1108, 1073, 1028, 884, 839, 777, 690, 659, 597, 451. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 716.3538 [M], 717.3616 [M+H]$^+$, gef.: 717.3610 [M+H]$^+$.

Synthese von *N*^{6}-Benzoyl-8-*N*H-(3,5-dimethylphenyl)-2´-desoxyadenosin 85d[63]

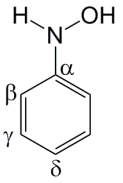
Die Reaktion wurde nach **AAV 4** durchgeführt.
Es wurden 828 mg (1.20 mmol) *N*^{6}-Benzoyl-8-*N*H-(3,5-dimethylphenyl)-[3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis-(*iso*-propyl)-1,3-disiloxan]-2´-dA **68d** und 4.10 mL (4.00 mmol) TBAF in 30 mL THF verwendet. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/ MeOH; 9:1 v/v).



85d

Ausbeute: 422 mg (0.90 mmol, 77 %) eines gelben kristallinen Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{25}H_{26}N_6O_4$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 9:1 v/v): 0.31. - **Smp.:** 89.3 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{22°C}$: -12 ° (c= 1, DCM/MeOH; 1:1). - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 9.21 (s, Benzoyl-N**H**), 8.40 (s, 1H, H2), 7.82 - 7.77 (m, 3H, Hd, 2 x Benzoyl-**H**), 7.51 - 7.46 (m, 1H, Hδ), 7.04 - 7.34 (m, 2H, 2 x Benzoyl-**H**), 7.20 (s, 2H, Hb), 6.69 (dd, $^3J_{HH}$= 9.4 Hz, $^3J_{HH}$= 5.8 Hz, 1H, H1´), 6.64 (bs, 1H, N**H**), 4.62 - 4.59 (m, 2H, 3´-O**H**, 5´-O**H**), 4.14 - 4.10 (m, 1H, H4´), 3.99 - 3.93 (m, 1H, H5a´), 3.92 - 3.68 (m, 1H, H5´b), 2.80 - 2.70 (m, 1H, H2´a), 2.24 - 2.21 (m, 1H, H2´b), 2.12 (s, 6H, 2 x C**H**$_3$). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d_6): 164.4 (**C**=O), 152.2 (C6), 149.7 (C4), 145.4 (C2), 140.6 (Cα), 139.9 (**C**H-arom.), 139.8 (**C**H-arom.), 139.7 (**C**H-arom.), 139.5 (**C**H-arom.), 135.5 (**C**H-arom.), 134.2 (Cc), 133.8 (C8), 129.7 (**C**H-arom.), 129.2 (**C**H-arom.), 119.9 (C5), 89.2 (C4´), 86.7 (C1´), 73.3 (C3´), 62.8 (C5´), 39.7 (C2´), 21.3 (2 x **C**H$_3$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr-Pressling): 3801, 3612, 2372, 2241, 2191, 2145, 2056, 2016, 1965, 1618, 1570, 1508, 1276, 1081, 750, 446, 428, 401. - **MS** (ESI+, m/z): ber.: 474.2016 [M], 475.2094 [M+H]$^+$, gef.: 475.2 [M+H]$^+$.

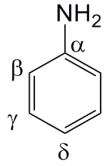
Versuch zur Darstellung von *N*-Phenyl-*N*-hydroxylamin 13[111]



13

Es wurden katalytische Mengen (Spatelspitze; ~ 0.10 g) Raney-Nickel (Typ W-4) vorgelegt und unter Vakuum getrocknet. Unter Rühren wurden 30 mL einer vorgekühlten 1:1 Ethanol/Dichlorethan Lösungsmittel-Mischung zugegeben und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 2.50 mL (3.00 g, 24.4 mmol) Nitrobenzol **80** zugegeben. Für die darauf folgende Reduktion wurden 2.47 mL (2.50 g, 48.7 mmol, 2 Äq.) einer 80% Hydrazin-Hydrat-Lösung sehr langsam zugetropft. Die Temperatur sollte 0 °C nicht übersteigen. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (Toluol, Iodkammer). Der Katalysator wurde durch Filtration entfernt. Nach Entfernen des Lösungsmittels erfolgte die Umkristallisation aus Toluol.

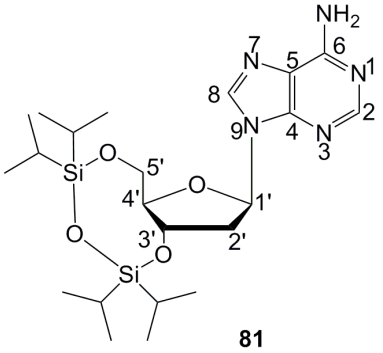
Das gewünschte Produkt konnte nicht erhalten werden. Es erfolgte eine vollständige Reduktion zum Anilin **1** .



1

Ausbeute: 1.63 g (17.5 mmol, 73%) eines gelben Öls. - **Summenformel:** C_6H_7N. - **DC:** R_f-Wert (Toluol, I_2) : 0.38. - **Sdp.:** 184°C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 6.99 (dd, 2H, $^3J_{HH}$= 7.9 Hz, $^3J_{HH}$= 7.9 Hz, Hγ), 6.54 (dd, 2H, $^3J_{HH}$= 8.5 Hz, $^4J_{HH}$= 1.1 Hz, Hβ), 6.47 (tt, 1H, $^3J_{HH}$= 7.2 Hz, $^3J_{HH}$= 7.2 Hz, Hδ), 4.99 (s, 2H, N**H**$_2$). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 148.5 (Cα), 128.7 (Cβ), 115.6 (Cδ), 113.8 (Cγ). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (NaCl-Plättchen): 3431, 3355, 3213, 3071, 3036, 3010, 1620, 1601, 1499, 1466, 1311, 1276, 1175, 1153, 1027, 996, 881, 753, 693. - **MS** (EI, m/z): ber.: 93.0578 [M], gef.: 93.0 [M].

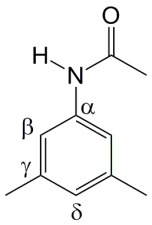
Synthese von 3´,5´-*O*-(1,1,3,3-Tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-desoxy-adenosin 81[66]



Es wurden 3.04 g (11.1 mmol) 2´-Desoxyadenosin-Monohydrat **20** dreimal mit Pyridin coevaporiert und anschließend in 13 mL Pyridin gelöst. Schließlich wurden 5.00 mL (4.80 g, 16.7 mmol, 1.5 Äq.) TIPDS-Cl_2 zugegeben und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 4:1 v/v). Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit Wasser gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, vom Lösungsmittel befreit und anschließend das Produkt **81** säulenchromatographisch gereinigt (DCM).

Ausbeute: 3.14 g (6.36 mmol, 57%) eines gelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{22}H_{39}N_5O_4Si_2$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 4:1 v/v): 0.80. - **Drehwert:** $[\alpha]^{20°C}_{546nm}$: -20.6° (c= 0.3; $CHCl_3$). - **Smp.:** 54.6 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 8.31 (s, 1H, H8), 8.02 (s, 1H, H2), 6.29 (dd, 1H, $^3J_{HH}$= 7.4 Hz, $^3J_{HH}$= 2.5 Hz, H1´), 5.80 (bs, 2H, N**H**$_2$), 4.95 (dd, 1H, $^3J_{HH}$= 16.4 Hz, $^3J_{HH}$= 7.5 Hz, H3´), 4.05 - 4.04 (m, 2H, H4´, H5´a), 3.89 (dd, 1H, $^3J_{HH}$= 3.9 Hz, $^2J_{HH}$= 7.6 Hz, H5´b), 2.75 - 2.60 (m, 2H, H2´a, H2´b), 1.11 - 1.03 (m, 28H, *iso*prop.-**H**). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (125 MHz, DMSO-d_6): 155.4 (C6), 152.9 (C2), 149.8 (C4), 149.1 (C8), 120.3 (C5), 85.2 (C4´), 83.2 (C1´), 69.9 (C3´), 61.8 (C5´), 40.1 (C2´), 17.5, 17.4, 17.2, 17.1, 17.0, 16.9 (*iso*prop.-**C**H$_3$), 13.4, 13.1, 12.9, 12.5 (*iso*prop.-**C**H). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr-Pressling): 3323, 3164, 2944, 2893, 2867, 1651, 1598, 1576, 1465, 1425, 1386, 1365, 1331, 1300, 1248, 1214, 1176, 1115, 1036, 950, 885, 777, 694, 649. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 493.2541 [M], 494.2619 [M+H]$^+$, gef.: 494.2611 [M+H]$^+$.

Synthese von *N*-(3,5-Dimethylphenyl)acetamid 76



76

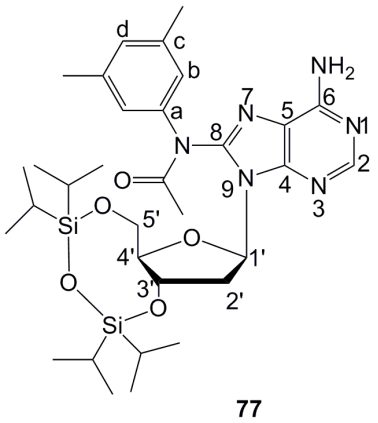
Es wurden 2.06 mL (2.00 g, 16.5 mmol) 3,5-Dimethylanilin **4** in 4 mL THF vorgelegt und mit 2.67 mL (33.0 mmol, 2 Äq.) Pyridin versetzt. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt und anschließend langsam 1.20 mL (1.30 g, 16.5 mmol, 1 Äq.) frisch destilliertes Acetylchlorid zugetropft und bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 9:1 v/v). Der Niederschlag wurde filtriert, das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Anschließend wurde mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung gewaschen. Die Reinigung erfolgte chromatographisch (DCM).

Ausbeute: 1.61 g (9.88 mmol, 60%) eines hellgelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{10}H_{13}N_5O_4Si_2$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 9:1 v/v): 0.72. - **Smp.:** 128.3 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 7.18 (bs, 1H, N**H**), 7.12 (s, 2H, Hβ), 6.75 (s, 1H, Hδ), 2.29 (s, 6H, 2 x CH_3), 2.15 (s, 3H, C(O)C**H**$_3$). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 167.9 (**C**=O), 139.0 (Cα), 137.3 (Cγ), 124.3 (Cδ), 116.5 (Cβ), 20.9 (C(O)**C**H_3). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr-Pressling): 3320, 3100, 3017, 2916, 2858, 1661, 1615, 1565, 1417, 1367, 1328, 1281, 1257, 1168, 1157, 1037, 999, 919, 873, 830, 756, 726, 686, 610, 528. - **MS** (EI, m/z): ber.: 163.0997 [M], gef.: 163.0 [M].

Versuch zur Darstellung von C8-(*N*-Acetyl)-3,5-dimethylphenyl)-3´,5´-*O*-(1,1,3,3)-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-desoxyadenosin 77

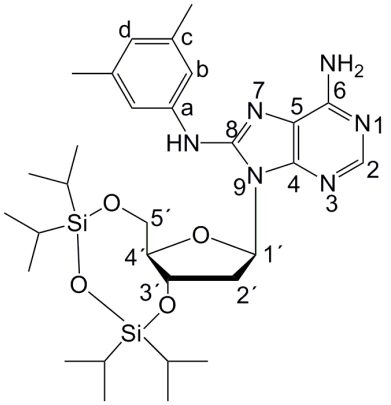
Die Reaktion wurde nach **AAV 1** durchgeführt.

Es wurden 653 mg (1.05 mmol) *rac*-BINAP, 320 mg (0.35 mmol) $Pd_2(dba)_3$, 1.25 g (2.19 mmol) 8-Brom-3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tertrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-dA **41**, 1.19 g (3.65 mmol) Cs_2CO_3 und 0.89 g (5.47 mmol) *N*-(3,5-Dimethylphenyl)-acetamid **76** in 50 mL 1,2-DME verwendet. Die Reaktionsmischung wurde 48 h bei 95 °C unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (PE/EE; 1:1 v/v). Anschließend erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung (PE/EE; 30% → 100% v/v). Das gewünschte Produkt **77** konnte nicht erhalten werden.



77

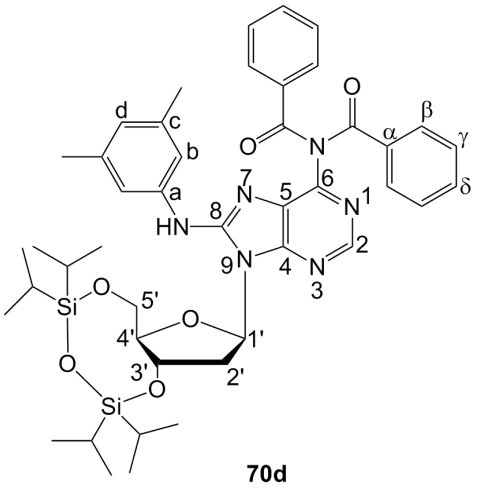
Isoliert wurden 360 mg (0.64 mmol, 29%) **41** (Charakterisierung: S. 186) und 160 mg (0.24 mmol 11%) unreines C8-*N*H-(3,5-Dimethylphenyl)-3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2‘-dA **42d** (Charakterisierung: S. 191).



42d

Synthese von *N*^{6}-Dibenzoyl-8-*N*H-(3,5-dimethylphenyl)-3´,5´-*O*-(1,1,3,3)-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-desoxyadenosin 70d

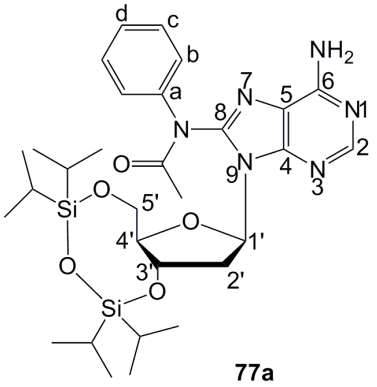
Die Reaktion wurde nach **AAV 2.1** durchgeführt. Es wurden 1.70 g (2.77 mmol) C8-*N*H-(3,5-Dimethylphenyl)-3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-dA **42d** und 1.88 mL (13.9 mmol) Benzoylchlorid in 30 mL Pyridin verwendet. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 19:1 v/v).



70d

Ausbeute: 2.05 g (2.49 mmol, 90%) eines gelben, kristallinen Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{44}H_{56}N_6O_6Si_2$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 19:1 v/v): 0.98. - **Drehwert:** $[\alpha]^{20°C}_{589nm}$: -16 °(c= 0.3; $CHCl_3$). - **Smp.:** 78.9 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.56 (s, 1H, H2), 7.70 - 7.66 (m, 2H, **H**-Benzoyl), 7.55 - 7.51 (m, 6H, **H**-Benzoyl.), 7.31 - 7.28 (m, 2H, **H**-Benzoyl.), 6.92 (s, 1H, Hd), 6.80 (s, 1H, Hb), 6.03 (dd, 1H, $^3J_{HH}$= 8.7 Hz, $^3J_{HH}$= 2.7 Hz, H1´), 5.35 (dd, 1H, $^3J_{HH}$= 15.4 Hz, $^3J_{HH}$= 8.0 Hz, H3´), 4.15 - 4.10 (m, 1H, H5´a), 4.02 - 3.99 (m, 1H, H5´b), 3.85 - 3.80 (m, 1H, H4´), 2.83 - 2.80 (m, 1H, H2´a), 2.26 (s, 6H, 2 x C**H**$_3$), 1.11 - 1.01 (m, 28H, *iso*propyl.-C**H**$_3$, *iso*propyl.-C**H**). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 172.5 (**C**=O), 152.7 (C6), 152.3 (C2), 151.3 (**C**-arom.), 150.5 (C4), 140.1 (Ca), 139.7 (Cc), 134.9 (**C**H-arom.), 134.6 (C8), 130.9 (**C**H-arom.), 129.3 (**C**H-arom.), 126.9 (C5), 124.6 (Cd), 117.1 (Cb), 85.8 (C4‘), 83.3 (C1´), 72.2 (C3´), 61.7 (C5´), 38.9 (C2´), 21.6 (2 x C**H**$_3$), 17.9, 17.7, 17.6, 17.5, 17.5, 17.4, 17.4, 17.3, 17.3 (*iso*propyl-C**H**$_3$), 13.6, 13.5, 13.2, 13.1 (*iso*propyl-C**H**). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr-Pressling): 3367, 3061, 3031, 2944, 1866, 1700, 1573, 1536, 1464, 1449, 1386, 1248, 1176, 1033, 949, 930, 885, 839, 813, 783, 693, 599, 561, 455. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 820.3800 [M], 821.3878 $[M+H]^+$, gef.: 821.4 $[M+H]^+$.

Versuch zur Darstellung von C8-(*N*-Acetyl)-phenyl-3´,5´-*O*-(1,1,3,3)-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-desoxyadenosin 77a

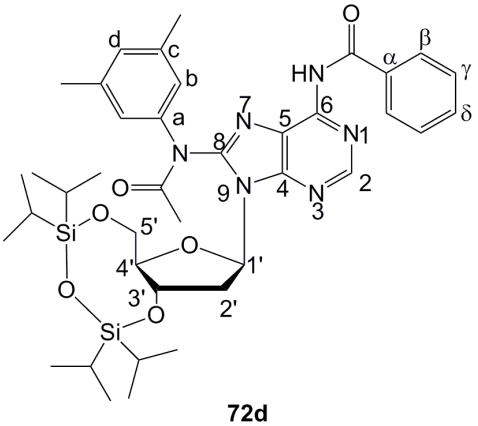


Es wurden zunächst 70.0 mg (0.61 mmol, 2 Äq.) Benzotriazol und 93.0 mg (0.61 mmol, 2 Äq.) *N*-Phenyl-*N*-hydroxyacetamid (Hydroxamsäure) **76** in 3 mL 1,2-DME gelöst und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach dünnschichtchromatographischer Verfolgung der Reaktion (DCM/MeOH; 19:1 v/v) wurden 200 mg (0.61 mmol, 2 Äq.) Cs_2CO_3 und 50.0 mg (0.31 mmol, 1 Äq.) 3´,5´-*O*-(1,1,3,3-Tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan) -2´-dA **81** zugegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 96 h war keine Umsetzung erkennbar und nach weiteren 24 h bei 90 °C konnte die Zersetzung des Eduktes **81** detektiert werden.

Das gewünschte Produkt **77a** konnte auf diesem Weg nicht erhalten werden.

Synthese von *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-Acetyl)-3,5-dimethylphenyl-3´,5´-*O*-(1,1,3,3)-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-desoxyadenosin 72d[63]

Reaktion A



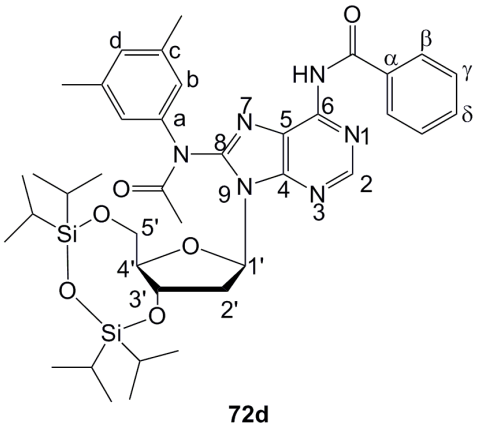
Es wurden zunächst 220 mg (0.27 mmol) *N*^{6}-Dibenzoyl-8-*N*H-(3,5-dimethylphenyl)-3´,5´-*O*-(1,1,3,3)-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-dA **70d** in 10 mL Pyridin gelöst, mit 16.4 mg (0.13 mmol, 0.5 Äq.) 4-DMAP und 187 µL (136.0 mg, 1.30 mmol, 5 Äq.) Triethylamin versetzt und auf 0 ℃ gekühlt. Dann erfolgte eine langsame Zugabe von 127 µL (137 mg, 1.34 mmol, 5 Äq.) Essigsäureanhydrid. Die Reaktionslösung wurde je nach Ansatzgröße zwischen 5 h und 7 d bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 30:1 v/v).

Nach Reaktionsende wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in DCM aufgenommen und gesättigte $NaHCO_3$-Lösung zugegeben. Die organische Phase wurde dreimal mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung und die wässrige Phase dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Anschließend erfolgte die säulenchromatographische Reinigung (DCM/MeOH; 0% → 30% v/v). Das gewünschte Produkt konnte trotz mehrfacher Reinigung nicht sauber erhalten werden.

Ausbeute: 65.9 mg (0.09 mmol, 32%) eines gelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{37}H_{50}N_6O_6Si_2$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 30:1 v/v): 0.49. - **Drehwert:** $[\alpha]_{546nm}^{20°C}$: +59 ° (c= 0.11; $CHCl_3$). - **Smp.:** 84.7 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 10.41 (bs, 1H, N**H**-Benzoyl), 8.51 (s, 1H, H2), 7.56 (d, $^3J_{HH}$= 5.8 Hz, 2H, **H**-Benzoyl), 7.45 - 7.42 (m, 1H, Hδ), 7.38 - 7.32 (m, 2H, **H**-Benzoyl), 6.92 (bs, 3H, Hb, Hd), 6.28 (dd, 1H, $^3J_{HH}$= 5.3 Hz, $^3J_{HH}$= 1.8 Hz, H1´), 5.37 (dd, 1H, $^3J_{HH}$= 6.5 Hz, $^3J_{HH}$= 5.8 Hz, H3´), 4.00 - 3.97 (m, 1H, H4´), 3.93 - 3.40 (m, 2H, H5´a, H5´b), 3.85 - 3.81 (m, 1H, H2´a), 2.89 - 2.80 (m, 1H, H2´b), 2.21 (s, 6H, 2 x C**H**$_3$), 2.20 (s, 3H, C(O)C**H**$_3$), 1.11 - 1.01 (m, 28H, *iso*propyl.-C**H**$_3$, *iso*propyl.-C**H**). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 172.1 (**C**=O), 151.7 (C6), 151.4 (C2), 150.5 (Cα), 149.6 (C4), 138.7 (Cβ), 134.5 (Cγ), 134.0 (C8), 128.6 (Ca), 128.3 (Cc), 126.3 (C5), 124.4 (Cd), 123.9 (**C**(O)CH$_3$), 121.7 (Cγ), 116.5 (Cb), 84.3 (C4´), 82.4 (C1´), 72.4 (C3´), 61.2 (C5´), 48.6 (C2´), 24.3 (C(O)**C**H$_3$), 20.7 (2 x **C**H$_3$), 17.9, 17.7, 17.6, 17.5, 17.5, 17.4, 17.4, 17.3, 17.3 (*iso*propyl-C**H**$_3$), 13.6, 13.5, 13.2, 13.1 (*iso*propyl-C**H**). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr-Pressling): 3447, 2945, 2867, 1706, 1611, 1522, 1464, 1354, 1284, 1088, 1035, 885, 694. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 730.3330 [M], 731.3409 [M+H]$^+$, gef.: 731.4 [M+H]$^+$.

Reaktion B.1[79]

Es wurden zunächst 1.80 g (2.19 mmol) N^6-Dibenzoyl-8-*N*H-(3,5-dimethylphenyl)-3´,5´-*O*-(1,1,3,3)-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-dA **70d** in 20 mL Pyridin gelöst. Im Anschluss wurden 804.0 mg (6.58 mmol, 3 Äq.) 4-DMAP zugegeben und die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt. Dann erfolgte eine langsame Zugabe von 622 µL (672 mg, 6.58 mmol, 3 Äq.) Essigsäureanhydrid. Die Reaktionslösung wurde 5 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 30:1 v/v). Aufarbeitung: siehe Reaktion A (S. 200/201). Auch in diesem Fall konnte das Produkt nicht rein isoliert werden.



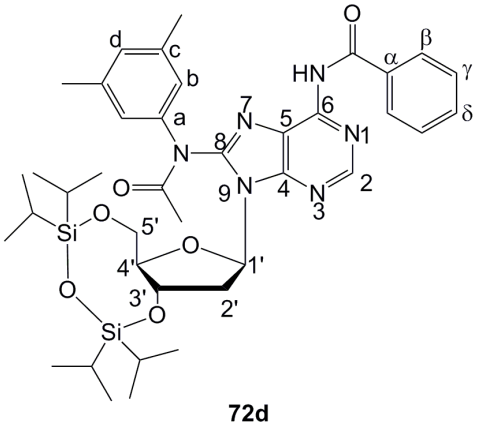
72d

Ausbeute: 965.9 mg (1.274 mmol, 58%) eines gelben, kristallinen Feststoffs.

Weitere Charakterisierung siehe Reaktion A.

Reaktion B.2[79]

Es wurden zunächst 50.0 mg (0.06 mmol) N^6-Benzoyl-8-*N*H-(3,5-dimethylphenyl)-3´,5´-*O*-(1,1,3,3)-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-dA **70d** in 4 mL Pyridin gelöst. Im Anschluss wurden 22.3 mg (0.18 mmol, 3 Äq.) 4-DMAP zugegeben und die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt. Dann erfolgte eine langsame Zugabe von 17.3 µL (18.7 mg, 0.18 mmol, 3 Äq.) Essigsäureanhydrid. Die Reaktionslösung wurde 5 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 30:1 v/v). Aufarbeitung: siehe Reaktion A (S. 200/201). Auch in diesem Fall konnte das Produkt **72d** nicht rein isoliert werden.



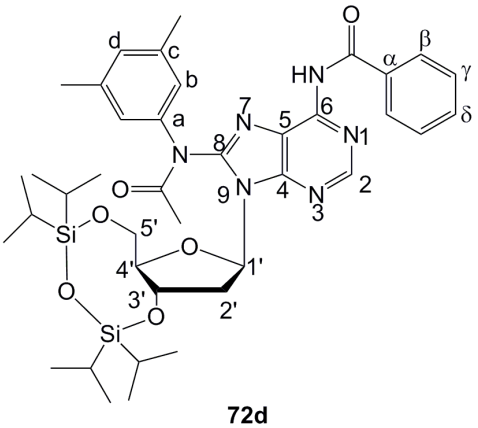
72d

Ausbeute: 30.2 mg (0.04 mmol, 65%) eines gelben, kristallinen Feststoffs.

Weitere Charakterisierung siehe Reaktion A.

Reaktion C[13]

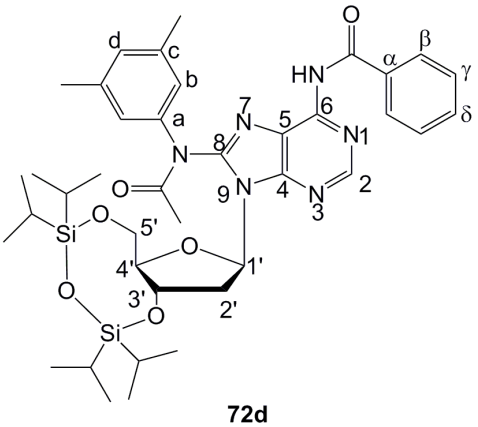
Es wurden zunächst 20.0 mg (0.02 mmol) N^6-Dibenzoyl-8-*N*H-(3,5-dimethylphenyl)-3´,5´-*O*-(1,1,3,3)-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-dA **70d** in 3 mL THF gelöst. Im Anschluss wurden 3.95 µL (3.86 mg, 0.05 mmol, 2 Äq.) Pyridin zugegeben und die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt. Dann erfolgte eine langsame Zugabe von 1.73 µL (1.92 mg, 0.02 mmol, 1 Äq.) Acetylchlorid. Die Reaktionslösung wurde 6 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 30:1 v/v). Während der 6 Tage wurden noch weitere 24 Äq. Acetylchlorid und 4 Äq. Pyridin zugegeben. Der Niederschlag wurde filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Aufarbeitung: siehe Reaktion A, S. 200/201. Nach 6 Tagen konnte immer noch Edukt und eine Reihe von Nebenprodukten, die nicht isoliert werden konnten, detektiert werden. Es fand keine Acetylierung nach dieser Methode statt. Das gewünschte Produkt **72d** konnte nicht erhalten werden.



72d

Reaktion D[36]

Es wurden zunächst 20.0 mg (0.02 mmol) N^6-Dibenzoyl-8-*N*H-(3,5-dimethylphenyl)-3´,5´-*O*-(1,1,3,3)-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-dA **70d** in 3 mL THF gelöst. Im Anschluss wurden 6.80 µL (4.94 mg, 0.05 mmol, 2 Äq.) Triethylamin zugegeben und die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt. Dann erfolgte eine langsame Zugabe von 1.73 µL (1.92 mg, 0.02 mmol, 1 Äq.) Acetylchlorid. Die Reaktionslösung wurde 6 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktions-kontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 30:1 v/v). Während dieser Tage wurden noch zusätzlich 24 Äq. Acetylchlorid und 4 Äq. Triethylamin zugegeben. Der Niederschlag wurde filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Aufarbeitung: siehe Reaktion A, S. 200/201.

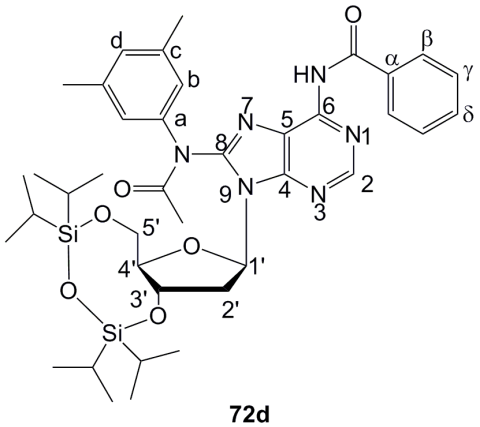


72d

Nach 6 Tagen konnte immer noch Edukt detektiert werden und eine Reihe von Nebenprodukten. Es fand keine Acetylierung nach dieser Methode statt.

Reaktion E[75]

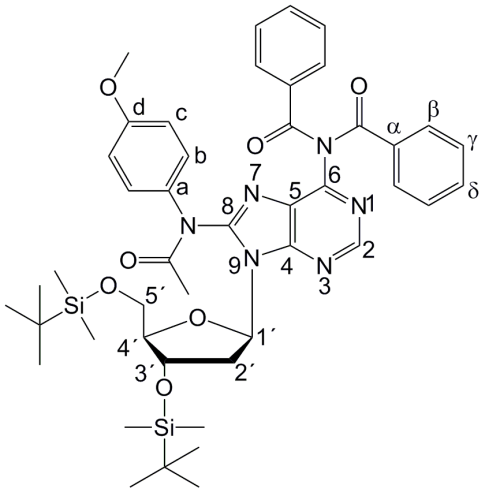
Es wurden zunächst 20.0 mg (0.02 mmol) N^6-Dibenzoyl-8-*N*H-(3,5-dimethylphenyl)-3´,5´-*O*-(1,1,3,3)-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-dA **70d** in 3 mL Diethylether und1 mL gesättigter $NaHCO_3$-Lösung vorgelegt und 1.73 µL (1.92 mg, 0.024 mmol, 1 Äq.) Acetylchlorid in Diethylether innerhalb von 15 Minuten zugetropft. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 30:1 v/v). Nach 2 h bei Raumtemperatur konnte die Zersetzung des Eduktes **70d** beobachtet werden. Es fand keine Acetylierung nach dieser Methode statt.



72d

Reaktion F

Die Reaktion erfolgte als geschlossene Reaktion in der Mikrowelle. Es wurden 100 mg (0.12 mmol) **71b** in 1.5 ml Pyridin gelöst und mit 45.3 mg (0.37 mmol, 3 Äq.) 4-DMAP und 0.04 mL (37.9 mg, 0.37 mmol, 3 Äq.) Essigsäureanhydrid versetzt. Die Reaktionszeit wurde zwischen 5-60 Minuten, die Reaktionstemperatur zwischen 35-100℃ und die Mikrowellenleistung zwischen 0-150 Watt variiert. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 30:1 v/v). Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch mit einem DCM/MeOH-Gradienten.



75b

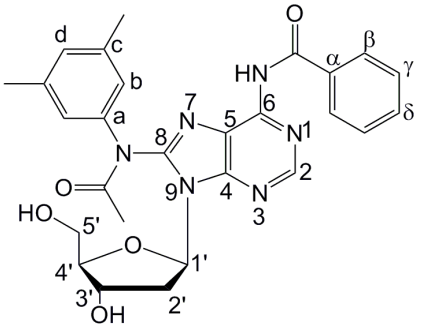
Ausbeute: 81.0 mg (0.10 mmol, 77%) eines gelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{45}H_{58}N_6O_7Si_2$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 30:1 v/v): 0.82. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$, 323 K): 8.60 (s, 1H, H2), 8.12 - 8.09 (m, 2H, Hb), 7.61 - 7.55 (m, 3H, **H**-Bz), 7.46 (t, $^3J_{HH}$= 7.9 Hz, 2H, Hc), 7.21 (t, $^3J_{HH}$= 7.4 Hz, 1H, **H**-Bz), 7.30 - 7.21 (m, 4H, **H**-Bz), 6.86 - 6.82 (m, 2H, **H**-Bz), 6.26 (dd, $^3J_{HH}$= 10.4 Hz, $^3J_{HH}$= 6.6 Hz, 1H, H1´), 4.77 - 4.72 (m, 1H, H3´), 4.03 - 3.93 (m, 2H, H4´, H5´a), 3.77 (s, 3H, O-C**H**$_3$), 3.73 (dd, $^2J_{HH}$= 9.5 Hz, $^3J_{HH}$= 3.8 Hz, 1H, H5´b), 3.50 - 3.30 (m, 1H, H2´a), 2.55 (s, 3H, C(O)C**H**$_3$), 2.45 - 2.25 (m, 1H, H2´b), 0.88 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$), 0.86 (s, 9H,

$Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.11 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.08 (s, 3H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.03 (s, 3H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.01 (s, 3H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$, Rt): 170.8 (**C**=O), 159.0 (**C**(O)CH_3), 152.8 (C6), 152.2 (C2), 150.1 (C4), 148.8 (**C**$_{quart.}$-Benzoyl), 133.6 (**C**H-arom.), 132.6 (C8), 131.8 (**C**H-arom.), 131.7 (**C**H-arom.), 130.2 (**C**H-arom.), 129.8 (C5), 129.1 (**C**H-arom.), 128.6 (**C**H-arom.), 128.3 (**C**H-arom.), 120.3 (**C**$_{quart.}$ arom.), 114.9 (**C**H-arom.), 88.3 (C4´), 85.4 (C1´), 72.8 (C3´), 63.9 (C5´), 55.6 (O-**C**H_3), 36.6 (C2´), 25.9 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), 25.8 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), 25.6 (C(O)**C**$H_3$), 18.4 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$), 18.0 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$), -4.6 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), -4.8 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), -5.2 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), -5.3($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr): 3196, 3063, 2954, 2856, 1701, 1612, 1584, 1510, 1463, 1250, 1175, 1109, 1070, 1032, 1005, 949, 837, 778, 714, 695, 665, 582, 551. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 850.3906 [M], gef.: 851.3984 $[M+H]^+$.

Synthese von *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-3,5-dimethylphenyl-2´-desoxyadenosin 82d

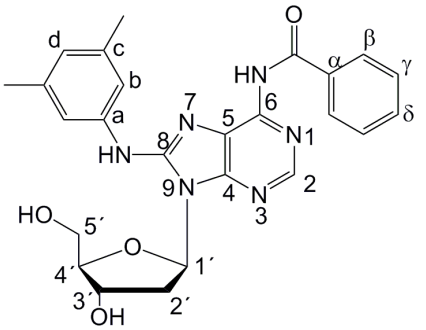
Reaktion A

Es wurden zunächst 20.0 mg (0.02 mmol) *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-3,5-dimethylphenyl-3´,5´-*O*-(1,1,3,3)-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-dA **72d** in 3 mL THF vorgelegt und mit 5 µL (12.1 mg, 0.05 mmol) TBAF in THF versetzt und bis zur vollständigen Umsetzung des Eduktes bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 9:1 v/v). Nach Ende der Reaktion wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH; 0% → 15% v/v). Das gewünschte Produkt **82d** konnte nicht erhalten werden.



82d

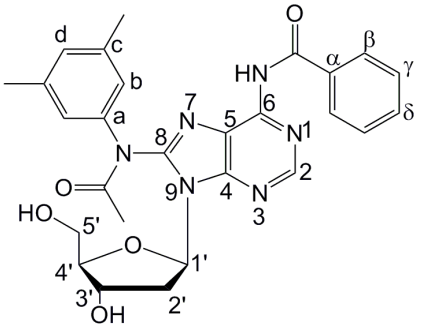
Die Acetyl-Gruppe wurde durch das basische Milieu abgespalten. Isoliert werden konnte lediglich das *N*^{6}-Benzoyl-8-*N*H-(3,5-dimethylphenyl)-3´,5´-*O*-(1,1,3,3)-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-dA **85de**. Charakterisierung S. 194.



85d

Reaktion B

Es wurden 20.0 mg (0.02 mmol) N^6-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-3,5-dimethylphenyl-3´,5´-*O*-(1,1,3,3)-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-dA **72d** in 0.5 mL THF und 0.5 mL DCM im Verhältnis 1:1 (v/v) (20 mL/mmol Edukt) gelöst, mit 32.3 µL (23.5 mg, 0.23 mmol, 10 Äq.) Triethylamin und 47.3 µL (46.8 mg, 0.29 mmol) Triethylamin-Trihydrofluorid versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 9:1 v/v). Nach Ende der Reaktion wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH; 0% → 10% v/v). Charakterisierung: S. 256.

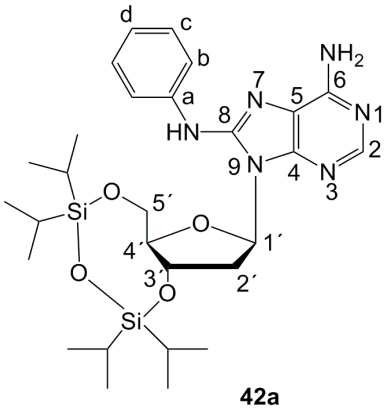


82d

Synthese von C8-(*N*H-Phenyl)-3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-desoxyadenosin 42a

Die Reaktion wurde nach **AAV 1** durchgeführt.

Es wurden 320 mg (0.35 mmol) $Pd_2(dba)_3$, 653 mg (1.05 mmol) *rac*-BINAP, 2.00 g (3.49 mmol) **41**, 1.71 g (5.24 mmol) Cs_2CO_3 und 0.80 mL (0.81 g, 8.73 mmol) Anilin **1** in 50 mL 1,2-DME verwendet. Die Reaktionsmischung wurde 48 h bei 95 °C unter Rückfluss erhit zt.

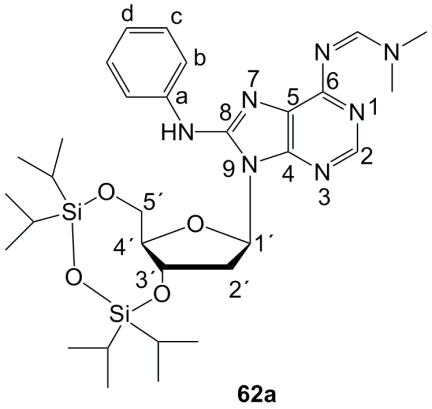


42a

Ausbeute: 0.91 g (1.49 mmol, 43 %) eines gelb-braunen, kristallinen Feststoffes. - **Summenformel:** $C_{28}H_{44}N_6O_4Si_2$. - **DC:** R_f-Wert: (PE/EE; 2:1 v/v): 0.10. - **Smp.:** 92.0 °C. - **Drehwert:** $[\alpha]^{22°C}_{589nm}$: -34 ° (c= 1, $CHCl_3$). - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.19 (s, 1H, H2), 7.64 - 7.60 (m, 3H, N**H**, Hb), 7.37 - 7.31 (m, 2H, Hc), 7.08 - 7.02 (m, 1H, Hd), 6.33 (dd, $^3J_{HH}$= 7.4 Hz, $^3J_{HH}$= 3.9 Hz, 1H, H1´), 5.23 (bs, 2H, N**H**$_2$), 4.88 (dd, $^3J_{HH}$= 14.7 Hz, $^3J_{HH}$= 7.7 Hz, 1H, H3´), 4.14 - 4.10 (m, 1H, H5´a), 4.03 - 3.91 (m, 2H, H4´, H5´b), 3.09 (ddd, $^2J_{HH}$= 13.3 Hz, $^3J_{HH}$= 8.0 Hz, $^3J_{HH}$= 3.9 Hz, 1H, H2´a), 2.60 - 2.51 (m, 1H, H2´b), 1.11 - 1.03 (m, 20H, *iso*propyl.-C**H**$_3$), 0.95 - 0.92 (m, 8H, *iso*propyl.-C**H**). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (100 MHz, $CDCl_3$): 152.5 (C6), 150.5 (C2), 149.2 (C4), 139.3 (Ca), 129.2 (Cb), 127.9 (C8), 122.8 (Cd), 118.9 (Cc), 117.5 (C5), 85.4 (C4´), 84.2 (C1´), 70.6 (C3´), 82.1 (C5´), 39.0 (C2´), 17.6, 17.5, 17.3, 17.3, 17.3, 17.2,

17.1, 17.1 (*iso*prop.-**C**H_3), 13.6, 13.3, 12.9, 12.6 (*iso*prop.-**C**H). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr-Pressling): 3370, 3184, 2945, 2893, 2867, 1636, 1600, 1558, 1499, 1465, 1451, 1387, 1348, 1285, 1249, 1117, 1078, 1034, 886, 749, 692. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 584.2963 [M], 585.3041 $[M+H]^+$, gef.: 585.3339 $[M+H]^+$.

Synthese von *N*^{6}-Formamidin-8-(*N*H-phenyl)-3´,5´-*O*-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan- 2´-desoxyadenosin 62a



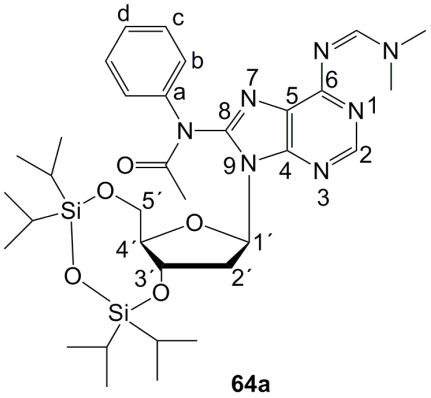
62a

Es wurden 857 mg (1.40 mmol) **42a** dreimal in Pyridin coevaporiert und anschließend in 20 mL Pyridin gelöst. Es wurden 1.20 mL (1.03 g, 7.00 mmol, 5 Äq.) *N,N*-Dimethylformamid-diethylacetal zugegeben und die Reaktionsmischung 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/ MeOH; 30:1 v/v). Nach Reaktionsende wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand mit Toluol coevaporiert. Das Produkt **62a** wurde säulenchromatographisch mit einem DCM/MeOH; 0% → 2% (v/v) Gradienten gereinigt.

Ausbeute: 719 mg (1.12 mmol, 77%) eines gelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{31}H_{49}N_7O_4Si_2$. - **DC:** R_f-Wert: (DCM/MeOH; 30:1 v/v): 0.86. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.39 (s, 1H, N=C**H**), 8.03 (s, 1H, H2), 7.65 (dd, $^3J_{HH}$= 8.3 Hz, $^3J_{HH}$= 7.8 Hz, 2H, Hb, Hb´), 7.40 - 7.10 (m, 3H, NH, Hc, Hc´), 7.12 - 7.08 (m, 1H, Hd), 6.40 (dd, $^3J_{HH}$= 7.6 Hz, $^3J_{HH}$= 3.3 Hz, 1H, H1´), 4.85 (dd, $^3J_{HH}$= 15.5 Hz, $^3J_{HH}$= 7.9 Hz, 1H, H3´), 4.15 (dd, $^3J_{HH}$= 12.6 Hz, $^2J_{HH}$= 3.3 Hz, 1H, H5´a), 4.10 - 4.00 (m, 1H, H5´b), 3.95 (dt, $^3J_{HH}$= 7.4 Hz, $^3J_{HH}$= 3.7 Hz, $^3J_{HH}$= 3.7 Hz, 1H, H4´), 3.03 (ddd, $^3J_{HH}$= 13.2 Hz, $^3J_{HH}$= 8.1 Hz, $^3J_{HH}$= 3.4 Hz, 1H, H2´a), 2.96 (s, 3H, N-C$\mathbf{H}_3$), 2.88 (s, 3H, N-C$\mathbf{H}_3$), 2.67 - 2.53 (m, 1H, H2´b), 1.11 - 1.02 (m, 20H, *iso*propyl-C$\mathbf{H}_3$), 0.94 - 0.87 (m, 8H, *iso*propyl-C**H**). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$): 151.1 (C6), 149.7 (C2), 149.1 (C4), 129.3 (Ca), 129.0 (Cb, Cb´), 126.9 (C8), 123.5 (Cd), 122.9 (C5), 119.3 (Cc, Cc´), 85.5 (C4´), 84.7 (C1´), 74.7 (C3´), 69.7 (2 x N-**C**H_3), 61.3 (C5´), 39.1 (C2´), 17.6, 17.5, 17.5, 17.4, 17.4, 17.3, 17.2, 17.1, 17.0 (8 x *iso*propyl-C$\mathbf{H}_3$), 13.4, 13.5, 13.2, 13.1 (4 x *iso*propyl-C**H**). - **MS** (FAB, m/z): ber.: 639.3385 [M], 640.3463, gef.: 640.3 $[M+H]^+$.

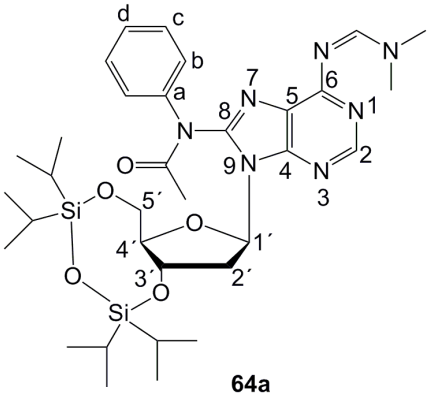
Versuch zur Darstellung von *N*^{6}-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-phenyl-3´,5´-*O*-tetrakis(*iso*propyl)-1,3-disiloxan- 2´-desoxyadenosin 64a

Reaktion A



Es wurden 656 mg (0.98 mmol) **62a** dreimal in Pyridin coevaporiert und anschließend in 20 mL Pyridin gelöst. Es wurden 359 mg (2.94 mmol, 3 Äq.) 4-DMAP und 0.28 mL (300 mg, 2.84 mmol, 3 Äq.) Essigsäureanhydrid zugegeben und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 30:1 v/v). Da kein Unterschied zwischen dem Edukt-Signal **62a** und dem Produkt-Signal **64a** zu sehen war, wurde die Reaktion abgebrochen und aufgearbeitet. Das Reaktionsgemisch wurde mit Dichlormethan versetzt und anschließend mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Anschließend erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung (DCM/MeOH; 0% → 5% v/v). Das gewünschte Produkt **64a** konnte nicht erhalten werden. Lediglich das eingesetzte Edukt **62a** wurde reisoliert.

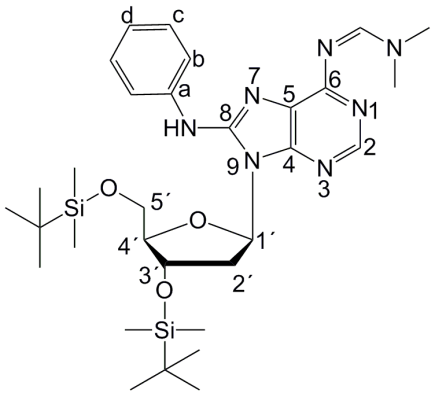
Reaktion B



Es wurden 55.1 mg (0.08 mmol) **62a** dreimal in Pyridin coevaporiert und anschließend in 2 mL Pyridin gelöst. Es wurden 0.08 mL (83.7 mg, 0.08 mmol, 1 Äq.) Essigsäureanhydrid zugegeben und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/ MeOH; 30:1 v/v). Da nach dieser Reaktionszeit keine Umsetzung zu sehen war, wurde 1 Äq. 4-DMAP zur Reaktionsmischung gegeben.

Nach erneuter dünnschichtchromatographischer Untersuchung wurde die Reaktion abgebrochen und entsprechend Reaktion A aufgearbeitet. Das gewünschte Produkt **64a** konnte nicht erhalten werden.

Synthese von *N*[6]-Formamidin-8-(*N*H-phenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin 63a



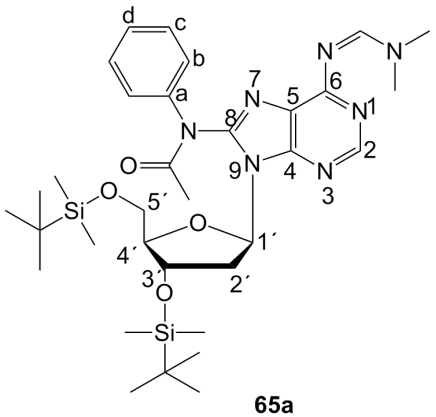
63a

Verbindung **57a** (2.04 g, 3.58 mmol) wurde dreimal mit Pyridin coevaporiert. Anschließend wurde 20 mL Pyridin zugegeben und mit 3.10 mL (18.0 mmol, 5 Äq.) Dimethylformamiddiethylacetal versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (DCM/ MeOH; 30:1 v/v). Nach Entfernung des Lösungsmittels erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung (DCM/MeOH; 100:0 → 50:1 v/v).

Ausbeute: 1.93 g (3.08 mmol, 86%) eines gelb-orangen Feststoffes. - **Summenformel:** $C_{31}H_{51}N_7O_3Si_2$. - **DC:** R_f-Wert: 0.54 (DCM/MeOH; 30:1 v/v). - **Smp.:** 82 °C. - **Drehwert**: $[a]_{589nm}^{20°C}$: -223.89° (c=0.18, $CHCl_3$). - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 9.01 (s, 1H, Formamidin-**H**), 8.40 (s, 1H, H2), 7.91 (s, 1H, N**H**), 7.66 (t, $^3J_{HH}$= 7.6 Hz, 2H, Hb, Hb´), 7.30 (t, $^3J_{HH}$= 8.0 Hz, 2H, Hc, Hc´), 7.02 (t, $^3J_{HH}$= 7.4 Hz, 1H, Hd), 6.50 (dd, $^3J_{HH}$= 8.1 Hz, $^3J_{HH}$= 5.6 Hz, 1H, H1´), 4.58 - 4.55 (m, 1H, H3´), 4.06 (dd, $^3J_{HH}$= 6.6 Hz, $^3J_{HH}$= 3.3 Hz, 1H, H4´), 3.99 - 3.96 (m, 1H, H5´a), 3.87 (dd, $^2J_{HH}$= 11.4 Hz, $^3J_{HH}$= 3.6 Hz, 1H, H5´b), 3.22 (s, 3H, *N*-C**H$_3$**), 3.15 (s, 3H, *N*-C**H$_3$**), 2.81 - 2.31 (m, 1H, H2´a), 2.34 (ddd, $^2J_{HH}$= 13.1 Hz, $^3J_{HH}$= 5.7 Hz, $^3J_{HH}$= 2.8 Hz, 1H, H2´b), 0.93 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.83 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.11 (s, 6H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.03 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.02 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (100 MHz, $CDCl_3$): 158.2 (Formamidin-**C**), 150.2 (C2), 128.9 (Cc,Cc´), 120.1 (Cd), 119.7 (Cb,Cb´), 87.9 (C4´), 84.8 (C1´), 72.1 (C3´), 63.1 (C5´), 41.2 (C2´), 35.1 (-*N*-**C**H$_3$), 35.0 (-*N*-**C**H$_3$), 26.1 (-**C**H$_3$), 26.1 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), 25.9 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), 18.5 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$), 18.6 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$), -4.4 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), -4.6 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), -5.1 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), -5.2 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr-Pressling): 691, 750, 778, 836, 881, 951, 1005, 1030, 1109, 1252, 1348, 1416, 1450, 1471, 1499, 1564, 1635, 1705, 2856, 2929, 2954, 3356. - **MS** (ESI, m/z): ber.: 625.3592 [M], 626.3670 $[M+H]^+$, gef.: 626 $[M+H]^+$.

Versuch zur Darstellung von *N*^{6}-Formamidin-8-(*N*-acetyl)-phenyl-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin 65a

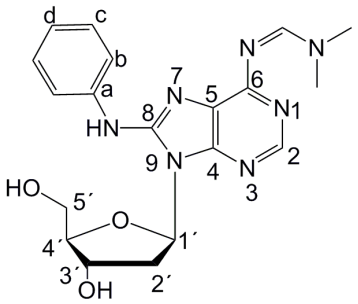
Die Reaktion wurde nach **AAV 3** durchgeführt.
Es wurden 1.92 g (3.07 mmol) **63a**, 1.12 g (9.21 mmol, 3 Äq.) 4-DMAP und 0.86 mL (939 mg, 9.20 mmol) Essigsäureanhydrid verwendet. Das gewünschte Produkt **65a** konnte nicht erhalten werden.



65a

Synthese von *N*^{6}-Formamidin-8-(*N*H-phenyl)-2´-desoxyadenosin 140a

Die Reaktion wurde nach **AAV 4.1** durchgeführt.
Es wurden 3.34 g (5.34 mmol) *N*^{6}-Formamidin-8-(*N*H-phenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **63a**, 6.21 mL (4.52 g, 53.4 mmol) Triethylamin und 8.43 mL (8.99 g, 66.7 mmol) Triethylamin-Trihydrofluorid in 50 mL THF/DCM (1:1, v/v) verwendet. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/ MeOH; 9:1 v/v). Nach Ende der Reaktion wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH; 0%→ 10% v/v).



140a

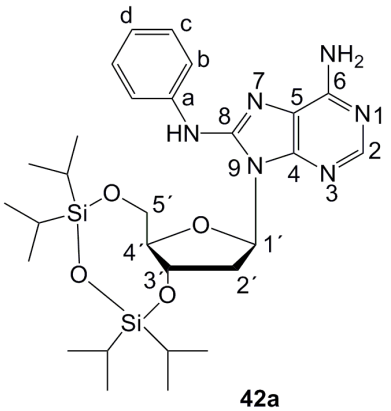
Ausbeute: 2.12 g (5.34 mmol, 100%) eines hellgelben Feststoffs. - **Rf-Wert**: 0.15 (DCM/MeOH; 19:1 v/v). - **Summenformel:** $C_{19}H_{23}N_7O_3$. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 9.03 (s, 1H, Formamidin-**H**), 8.39 (s, 1H, H2), 7.88 - 7.84 (m, 2H, Hb, Hb´), 7.35 (t, $^3J_{HH}$= 7.9 Hz, 2H, Hc, Hc´), 7.04 (t, $^3J_{HH}$= 7.3 Hz, 1H, Hd), 6.79 (s, 1H, *N***H**), 6.65 (dd, $^3J_{HH}$= 8.1 Hz, $^3J_{HH}$= 5.6 Hz, 1H, H1´), 6.00 - 5.93 (m, 1H, 5´-O**H**), 5.44 - 5.35 (m, 1H, 3´-O**H**), 4.49 - 4.44 (m, 1H, H3´), 4.00 (dd, $^3J_{HH}$= 6.6 Hz, $^3J_{HH}$= 3.3 Hz, 1H, H4´), 3.80 - 3.74 (m, 2H, H5´a, H5´b), 2.79 (s, 6H, 2 x *N*-C**H$_3$**), 2.74 - 2.67 (m, 1H, H2´a), 2.14 - 2.08 (m, 1H, H2´b). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (100 MHz, $CDCl_3$): 158.2 (Formamidin-**C**), 151.7 (C6), 150.2 (C2), 148.9 (C4), 128.7 (Cc, Cc´), 122.4 (Cd), 119.1 (C8), 118.3 (Cb, Cb´), 111.5 (C5), 87.7 (C4´), 83.4 (C1´), 71.2 (C3´), 61.4 (C5´), 45.6 (C2´), 35.1 (-*N*-**C**H$_3$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr-Pressling): 3320, 3065, 2938, 2802, 2739, 2668, 2601, 2571, 2528, 1698, 1622, 1567, 1499, 1475, 1434, 1398, 1384, 1364, 1347, 1307, 1280, 1239, 1171, 1121, 1036, 990, 904, 879,

850, 765, 643, 619, 582, 482, 457. - **MS** (ESI, m/z): ber.: 397.1862 [M], 398.1941 $[M+H]^+$, gef.: 398 $[M+H]^+$.

Synthese von C8-(*N*H-Phenyl)-3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-desoxyadenosin 42a

Die Reaktion wurde nach **AAV 1** durchgeführt.

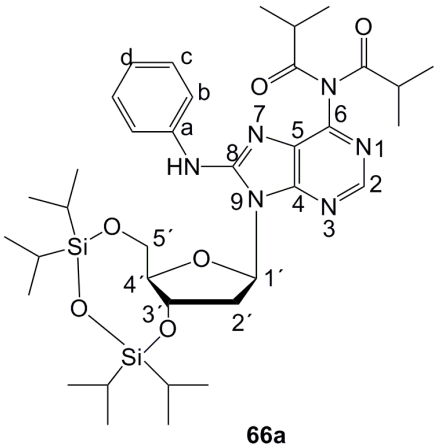
Es wurden 979 mg (1.57 mmol) *rac*-BINAP, 480 mg (0.52 mmol) $Pd_2(dba)_3$, 3.00 g (5.24 mmol) 8-Brom-3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-dA **41**, 2.56 g (7.86 mmol) Cs_2CO_3 und 1.19 mL (1.22 g, 13.1 mmol) Anilin **1** in 60 mL 1,2-DME verwendet.



42a

Ausbeute: 1.88 g (3.19 mmol, 85 %) eines gelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{28}H_{44}N_6O_4Si_2$. - **DC:** R_f-Wert: 0.16 (DCM/MeOH, 19:1 v/v). - **Drehwert:** $[a]^{20°C}_{589nm}$: 230 ° (c= 0.21, $CHCl_3$). - **Smp.:** 150.4 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.17 (s, 1H, H2), 6.30 (dd, $^3J_{HH}$= 7.2 Hz, $^3J_{HH}$= 3.4 Hz, 1H, H1´), 5.36 (bs, 2 H, N**H**$_2$), 4.88 (dd, $^3J_{HH}$= 14.9 Hz, $^3J_{HH}$= 7.5 Hz, 1H, H3´), 4.13 (dd, $^3J_{HH}$= 12.08 Hz, $^3J_{HH}$= 2.9 Hz, 2H, H4, H5´a), 3.91 - 4.01 (m, 1H, H5´b), 3.04 - 3.10 (m, 1H, H2´a), 2.51 - 2.58 (m, 1H, H2´b), 1.03 - 1.07 (m, 10H, *iso*prop.-**H**), 0.92 - 0.93 (m, 18H, *iso*prop.-**H**). - **^{13}C-NMR**: δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$): 152.4 (C6), 150.3 (C2), 147.3 (C8), 138.1 (C4), 134.6 (Cc, Cc´), 129.0 (Ca, Ca´), 122.7 (Cd), 118.8 (Cb, Cb´), 85.3 (C4´), 84.0 (C1´), 70.5 (C3´), 61.9 (C5´), 38.8 (C2´), 17.5, 17.3, 17.1, 17.1, 17.1, 17.0, 16.9 (SiC(**C**H$_3$)$_2$), 13.39, 13.14, 12.76, 12.49 (Si**C**(CH$_3$)$_2$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr-Pressling): 3373, 2944, 2867, 2893, 1639, 1600, 1498, 1464, 1348, 1139, 1035, 885, 692. - **MS (FAB, m/z):** ber.: 584.2963 [M], 585.3041 $[M+H]^+$, gef.: 585 $[M+H]^+$.

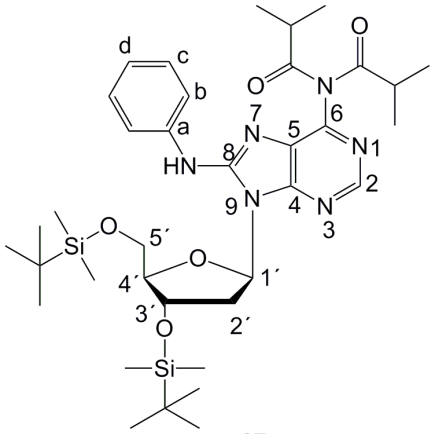
Versuch zur Synthese von *N*^{6}-Di*iso*butyryl-8-(*N*H-phenyl)-3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-desoxyadenosin 66a



66a

Es wurden 1.87 g (3.05 mmol) **42a** dreimal mit Pyridin coevaporiert und anschließend in 30 mL Pyridin gelöst. Es wurden 2.53 mL (2.41 g, 15.2 mmol) *Iso*buttersäureanhydrid zugegeben und die Reaktionsmischung 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 19:1 v/v). Da auch nach 36 h immer noch viel Edukt **42a** vorhanden war, wurde die Reaktionsmischung mit Hilfe eines Wasserbades auf 50 °C erwärmt. Da die dünnschichtchromatographische Verfolgung keine Veränderung mehr anzeigte, wurde die Reaktion abgebrochen, das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH; 0% → 10% v/v). Das gewünschte Produkt **66a** konnte nicht erhalten werden.

Versuch zur Synthese von *N*^{6}-Di*iso*butyryl-8-(*N*H-phenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin 67a



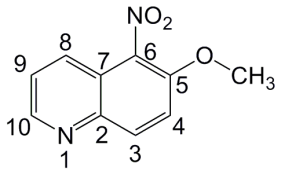
67a

Es wurden 3.50 g (6.19 mmol) **57a** dreimal mit Pyridin coevaporiert und anschließend in 60 mL Pyridin gelöst. Es wurden 5.15 mL (4.90 g, 30.5 mmol) *Iso*buttersäureanhydrid zugegeben und die Reaktionsmischung 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschicht-chromatographisch (DCM/MeOH; 19:1 v/v). Da auch nach 24 h immer noch viel Edukt **57a** vorhanden war, wurden 0.81 mL (0.743 g, 6.13 mmol) Collidin zugegeben.

Da die dünnschichtchromatographische Verfolgung keine Veränderung mehr anzeigte, wurde die Reaktion abgebrochen, das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH; 0% → 10%).

Zwar zeigte die dünnschichtchromatographische Kontrolle das Entstehen des einfach und des zweifach geschützten Produktes, diese konnten aber nach der chromatographischen Reinigung nicht isoliert werden. Das gewünschte Produkt **67a** konnte nicht erhalten werden.

Synthese von 5-Methoxy-6-nitrochinolin 121

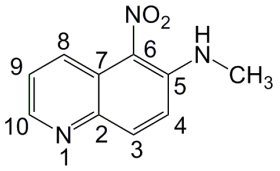


121

Unter Eiskühlung wurden 104 mL (190 g, 1.94 mol) Schwefelsäure langsam mit 11.0 mL (13.0 g, 79.0 mmol) 5-Methoxychinolin **120** versetzt. Anschließend wurden 11.4 g (113 mmol) Kaliumnitrat hinzugefügt. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten durch Zugabe von 400 g Eis abgebrochen. Zu der Eislösung wurden unter Temperaturkontrolle (5 °C) tropfenweise ca. 260 mL Ammoniaklösung (25 %) gegeben. Der entstandene Niederschlag wurde filtriert, mit kaltem Wasser gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 9.89 g (48.5 mmol, 62 %) eines braunen Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{10}H_8N_2O_3$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/EE; 1:1 v/v): 0.43. - **Smp:** 100.5 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 8.94 (dd, $^4J_{HH}$= 1.5 Hz, $^3J_{HH}$= 4.3 Hz, 1H, H10), 8.32 (dd, $^4J_{HH}$= 0.8 Hz, $^3J_{HH}$= 9.5 Hz, 1H, H8), 8.15 - 8.11 (m, 1H, H3), 7.96 (d, $^3J_{HH}$= 9.3 Hz, 1H, H4), 7.71 (dd, $^3J_{HH}$= 4.3 Hz, $^3J_{HH}$= 8.8 Hz, 1H, H9), 4.08 (s, 3H, OC**H**$_3$). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 149.6 (C10), 148.9 (C6), 141.2 (C2,C7), 133.7 (C8), 128.9 (C3), 124.3 (C9), 120.3 (C5), 117.8 (C4), 57.5 (O**C**H$_3$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr-Pressling): 3267, 3094, 2951, 2850, 1624, 1521, 1502, 1465, 1326, 1269, 1141, 1073, 879, 830, 809, 797. - **MS:** (FAB, m/z): ber.: 204.0535 [M], 205.0613 $[M+H]^+$, gef.: 205.0613 $[M+H]^+$.

Synthese von 5-Methylamino-6-nitrochinolin 122

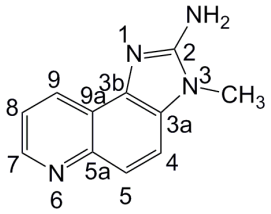


122

Es wurden 9.89 g (48.5 mmol) 5-Methoxy-6-nitrochinolin **121** in 230 mL Ethanol gelöst und unter Rückfluss erhitzt. Während dessen wurden 66.0 mL (94.0 g, 2.90 mol) Methylaminlösung (50 % in Wasser) tropfenweise hinzugefügt. Nach 5 h wurde die Lösung auf 200 g Eis gegeben. Der entstandene Niederschlag wurde filtriert und aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 7.52 g (37.1 mmol, 76 %) eines orangen Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{10}H_9N_3O_2$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/EE; 1:1 v/v): 0.35. - **Smp:** 197.2 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 9.00 - 8.95 (m, 1H, N**H**), 8.94 (dd, $^4J_{HH}$= 1.5 Hz, $^3J_{HH}$= 4.3 Hz, 1H, H10), 8.32 (dd, $^4J_{HH}$= 0.7 Hz, $^3J_{HH}$= 9.5 Hz, 1H, H8), 8.15 - 8.11 (m, 1H, H3), 7.96 (d, $^3J_{HH}$= 9.3 Hz, 1H, H4), 7.71 (dd, $^3J_{HH}$= 4.3 Hz, $^3J_{HH}$= 8.8 Hz, 1H, H9), 4.08 (s, 3H, N-C**H**$_3$). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 149.6 (C10), 148.9 (C6), 141.2 (C2,C7), 133.7 (C8), 128.9 (C3), 124.3 (C9), 120.3 (C5), 117.8 (C4), 57.5 (CO**C**H$_3$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr-Pressling): 3267, 3094, 2951, 2850, 1624, 1521, 1502, 1465, 1326, 1269, 1141, 1073, 879, 830, 809, 797. - **MS:** (FAB, m/z): ber.: 203.0695 [M], 204.0773 $[M+H]^+$, gef.: 204.0613 $[M+H]^+$.

Synthese von 2-Amino-3-Methylimidazo[4,5-*f*]chinolin 10

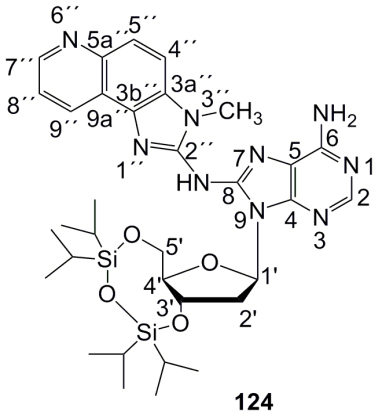


10

Es wurden 7.50 g (37.0 mmol) **122** in 300 mL Ethanol gelöst. Eine große Spatelspitze Raney-Nickel wurde zugegeben. Unter H_2-Atmosphäre wurde die orange-farbene Suspension 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltene schwarze Suspension wurde unter N_2-Atmosphäre filtriert. Zu der Lösung wurde eine 5 M Bromcyan-Lösung in Acetonitril (10.5 g in 20 mL) getropft. Die Reaktionsmischung wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 5 mL Ammoniaklösung (25%) zugegeben. Der entstandene Niederschlag wurde vom Lösungsmittel befreit, in DCM aufgenommen und säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH; 1% → 20%). Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (PE/EE, 2:1 v/v).

Ausbeute: 6.00 g (30.0 mmol, 82 %) eines schwarzen Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{11}H_{10}N_4$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 9:1 v/v): 0.51. - **Smp:** 271.8 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 8.86 (dd, $^4J_{HH}$= 1.7 Hz, $^3J_{HH}$= 4.3 Hz, 1H, H7), 8.74 - 8.71 (m, 1H, H9), 7.95 (s, 2H, N**H**$_2$), 7.91 (d, $^3J_{HH}$= 8.8 Hz, 1H, H4), 7.81 (d, $^3J_{HH}$= 9.1 Hz, 1H, H5), 7.59 (dd, $^3J_{HH}$= 8.4 Hz, $^3J_{HH}$= 4.3 Hz, 1H, H8), 3.73 (s, 3H, N-C**H**$_3$). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 151.9 (C2), 148.5 (C7), 144.3 (C3a/b), 129.7 (C9), 128.2 (C9a), 122.3 (C5), 121.2 (C8), 116.5 (C5a), 113.4 (C4), 29.6 (N**C**H$_3$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr-Pressling): 3307, 3034, 2914, 2868, 2168, 1948, 1667, 1619, 1598, 1510, 1378, 1338, 845, 809, 771. - **MS:** (FAB, m/z): ber.: 198.0905 [M], 199.0984 [M+H]$^+$, gef.: 199.0984 [M+H]$^+$.

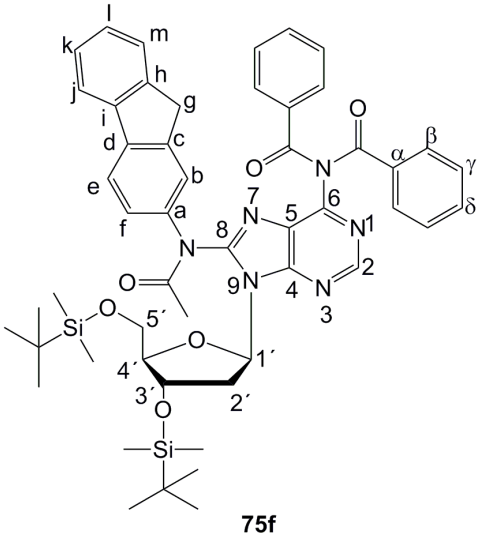
Versuch zur Synthese von C8-*N*H-(3-Methylimidazo[4,5-*f*]chinolin)-3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-desoxyadenosin 124



Die Reaktion wurde nach **AAV 1** durchgeführt.
Es wurden 655.0 mg (1.05 mmol) *rac*-BINAP, 269.0 mg (0.32 mmol) $Pd_2(dba)_3$, 2.00 g (3.49 mmol) 8-Brom-3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-dA **41**, 1.83 g (5.62 mmol) Cs_2CO_3 und 1.73 g (8.73 mmol) IQ **10** in 60 mL 1,2-DME verwendet. Da kein Produkt entstanden war, wurde die Reaktionszeit auf 14 Tagen erhöht. Danach wurde die Reaktion abgebrochen, da die dünnschichtchromatographische Kontrolle (DCM/MeOH; 4:1) eine weitere Verbindung anzeigte. Die Reaktion wurde aufgearbeitet und säulenchromatographisch gereinigt. Es konnten 75% (1.52 g, 2.66 mmol) des Eduktes 8-Brom-3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-dA **41** reisoliert werden. Das gewünschte Produkt **124** konnte nicht erhalten werden.

Versuch zur Synthese von *N*^{6}-Dibenzoyl-8-(*N*-acetyl)-2-fluorenyl-3´,5´-*O*-bis-(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin 75f

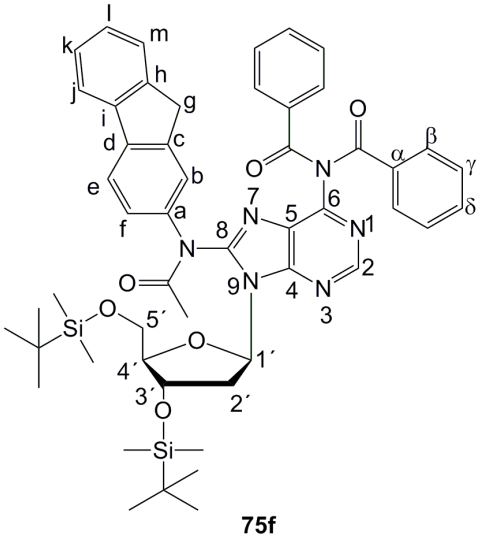
<u>Versuch A</u>



Es wurden 0.10 g (0.12 mmol) *N*^{6}-Dibenzoyl-8-(*N*-2-fluorenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **71f** in 10 mL THF gelöst und mit 104 mg Pankreatin, 0.16 mL (10 Äq.) Et_3N und 0.11 mL (10 Äq.) Vinylacetat versetzt. Die Reaktion wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Da die dünnschichtchromatographische Kontrolle (DCM/MeOH; 30:1 v/v) keine Umsetzung zeigte, wurden 5 mL dest. Wasser zur Reaktionsmischung gegeben und weitere 20 h gerührt. Die dünnschichtchromatographische Kontrolle zeigte auch hier keine Umsetzung. Das gewünschte Produkt **75f** konnte nicht erhalten werden.

Versuch B

Es wurden 0.10 g (0.12 mmol) N^6-Dibenzoyl-8-(*N*-2-fluorenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **71f** in 10 mL THF gelöst und mit 102 mg Pankreatin, 0.16 mL (10 Äq.) Et_3N und 0.11 mL (10 Äq.) Vinylacetat versetzt. Die Reaktion wurde 21 h bei 37 °C gerührt. Da die dünnschicht-chromatographische Kontrolle (DCM/MeOH; 30:1 v/v) keine Umsetzung zeigte, wurden 5 mL dest. Wasser zur Reaktionsmischung gegeben und weitere 20 h gerührt. Die dünnschichtchromato-graphische Kontrolle zeigte auch hier keine Umsetzung. Das gewünschte Produkt **75f** konnte nicht erhalten werden.

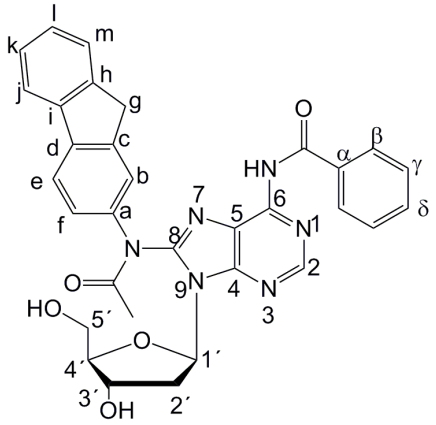


75f

Darstellung von N^6-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-2-fluorenyl-2´-desoxyadenosin 82f

Die Reaktion wurde nach **AAV 4.2** durchgeführt.

Es wurden 0.74 g (0.81 mmol) N^6-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-2-fluorenyl-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **73f**, 0.27 mL Essigsäure und 0.86 mL 1 M TBAF-Lösung in 23 mL THF verwendet.



82f

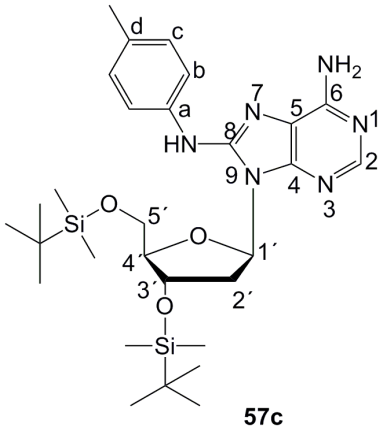
Ausbeute: 0.49 g (0.73 mmol, 90%) eines gelben, kristallinen Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{32}H_{28}N_6O_5$. - **DC:** R_f-Wert: (DCM/MeOH; 19:1 v/v): 0.53. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{26\,°C}$: 187.2 ° (c=0.11; $CHCl_3$). - **Smp.:** 62.7 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 10.69 (s, 1H, N**H**-Benzoyl), 8.66 (s, 1H, H2), 7.96 - 7.86 (m, 2H, H-arom.), 7.67 - 7.51 (m, 4H, H-arom.), 7.49 - 7.43 (m, 1H, H-arom.), 7.42 - 7.27 (m, 5H, H-arom.), 6.42 - 6.31 (m, 1H, H1´), 5.40 - 5.20 (m, 1H, 3´-O**H**), 5.21 - 4.95 (m, 1H, 5´-O**H**), 4.56 - 4.82 (m, 1H, H3´), 3.99 - 3.87 (m, 4H, H5´a, H5´-b, Hg), 3.78 - 3.72 (m, 1H, H2´a), 3.62 - 3.52 (m, 1H, H2´b), 2.17 (s, 3H, Ac-C**H$_3$**). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 168.8 (C=O), 144.3 (C4), 143.4 (C5), 140 (C8), 131.8, 128.7, 128.5, 127.2, 126.9, 125.2, 120.7, 120.4, 117.5 (arom.-**C**H), 88.5 (C4´), 73.4 (C1´), 73.4 (C1´), 70.9 (C3´), 65 (C5´), 62 (C2´), 36.4 (Cg), 24.3 (Ac-**C**H$_3$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 3201, 3059, 2929, 2630, 1682, 1608, 1583,

1524, 1485, 1451, 1402, 1355, 1313, 1271, 1175, 1098, 1061, 1025, 1000, 958, 940, 908, 862, 832, 797, 767, 734, 710, 671, 649, 603, 544, 460, 450, 422, 401. - **MS:** (FAB, m/z): ber.: 576.2121 [M], 577.2199 $[M+H]^+$, gef.: 577.3 $[M+H]^+$.

Synthese von 8-(*N*H-4-Methylphenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin 57c

Die Reaktion wurde nach **AAV 1** durchgeführt.

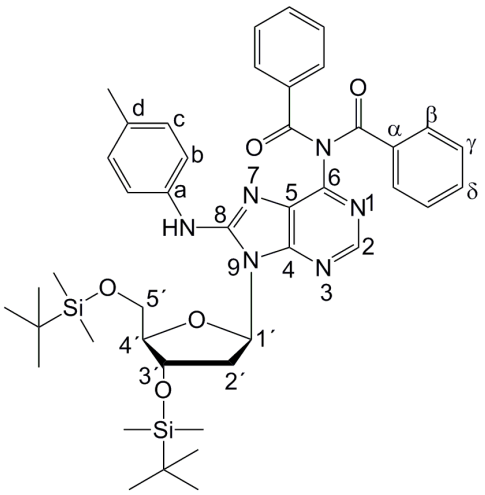
Es wurden 3.00 g (5.37 mmol) 8-Brom-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **53**, 1.14 g (5.83 mmol) *rac*-BINAP, 2.66 g (0.61 mmol) Pd_2(dba), 2.66 g (8.16 mmol) Cäsiumcarbonat und 1.46 g (4.47 mmol) 4-Toluidin in 50 mL 1,2-DME verwendet.



57c

Ausbeute: 2.03 g (3.42 mmol, 64%) eines gelb-goldenen, kristallinen Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{29}H_{48}N_6O_3Si_2$. - **DC**: R_f-Wert (PE/EE; 2:1 v/v): 0.59. - **Smp**.: 87.8 °C. - **Drehwert**: $[\alpha]_{589nm}^{20°C}$ = +80 ° (c = 0.09, $CHCl_3$). - **^{1}H-NMR**: δ [ppm] (400.1 MHz, $CDCl_3$): 8.18 (s, 1H, H2), 7.75 (s, 1H, N**H**), 7.43 (d, $^3J_{HH}$= 8.5 Hz, 2H, Hb, Hb´), 7.14 (d, $^3J_{HH}$= 8.2 Hz, 2H, Hc, Hc´), 6.43 (dd, $^3J_{HH}$= 8.2 Hz, $^3J_{HH}$= 5.7 Hz, 1H, H1´), 5.70 (s, 2H, N$\mathbf{H}_2$), 4.57 (ddd, $^3J_{HH}$= 5.8 Hz, $^3J_{HH}$= 2.8 Hz, $^3J_{HH}$= 2.8 Hz, 1H, H3´), 4.05 (dd, $^3J_{HH}$= 6.0 Hz, $^3J_{HH}$= 3.2 Hz, 1H, H4´), 3.96 (dd, $^2J_{HH}$= 11.3 Hz, $^3J_{HH}$= 3.2 Hz, 1H, H5´a), 3.84 (dd, $^2J_{HH}$= 11.3 Hz, $^3J_{HH}$= 3.2 Hz, 1H, H5´b), 2.85 (ddd, $^2J_{HH}$= 13.2 Hz, $^3J_{HH}$= 7.9 Hz, $^3J_{HH}$= 6.0Hz, 1H, H2´a), 2.33 (s, 3H, C$\mathbf{H}_3$), 2.32 - 2.29 (m, 1H, H2´b), 0.92 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.82 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.12 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.11 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), -0.00 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), -0.02 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$). - **^{13}C-NMR**: δ [ppm] (100.6 MHz, $CDCl_3$): 151.3 (C6), 150.0 (C2), 149.5 (C8), 136.5 (Ca), 133.1 (Cd), 129.7 (Cb, Cb´), 120.5 (Cc, Cc´), 118 (C4), 108.4 (C5), 88.0 (C4´), 84.8 (C1´), 72.1 (C3´), 63.0 (C5´), 39.6 (C2´), 26.1 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), 25.9 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), 21.0 (Cd-$\mathbf{C}H_3$), 18.7 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$), 18.2 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$), -4.4 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), -4.6 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), -5.2 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), -5.3 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$). - **IR**: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 2928, 2856, 1636, 1602, 1557, 1515, 1471, 1339, 1289, 1251, 1108, 950, 833, 812, 775, 669, 578, 503. - **MS:** (FAB, m/z): ber.: 584.3326 [M], 585.3405 $[M+H]^+$, gef.: 585.3 $[M+H]^+$.

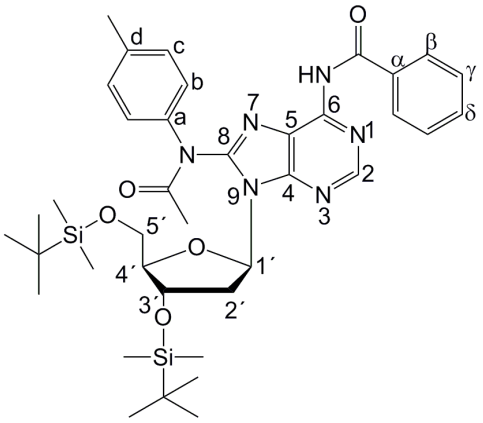
Synthese von N^6-Dibenzoyl-8-(*N*H-4-methylphenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyl-dimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin 71c



71c

Die Reaktion wurde nach **AAV 2** durchgeführt. Es wurden 2.00 g (3.37 mmol) C8-(*N*H-4-Methylphenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **57c** und 1.96 mL (2.37 g, 16.9 mmol) Benzoylchlorid in 50 mL Pyridin verwendet. **Ausbeute**: 2.16 g (2.70 mmol, 80%) eines hellgelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{43}H_{56}N_6O_5Si_2$. - **DC**: R_f-Wert (DCM/MeOH 19:1 v/v): 0.89. - **Smp.**: 83.8 °C. - **Drehwert**: $[\alpha]^{20°C}_{589nm}$ = +290 ° (c= 0.2, $CHCl_3$). - **^{1}H-NMR**: δ [ppm] (400.1 MHz, $CDCl_3$): 8.58 (s, 1H, H2), 8.08 (d, $^3J_{HH}$= 7.33 Hz, 2H, H-aromat.), 7.85 (d, $^3J_{HH}$= 7.33 Hz, 2H, H-aromat.), 7.66 - 7.64 (m, 3H, N**H**, 2 x H-aromat.), 7.51 - 7.42 (m, 6H, H-aromat.), 7.34 - 7.23 (m, 2H, H-aromat.), 6.16 (t, $^3J_{HH}$= 7.0 Hz, 1H, H1´), 4.62 - 4.57 (m, 1H, H3´), 3.94 - 3.84 (m, 2H, H4´, H5´a), 3.74 (dd, $^2J_{HH}$= 9.0 Hz, $^3J_{HH}$= 3.7 Hz, 1H, H5´b), 3.11 - 3.09 (m, 1H, H2´a), 2.34 (s, 3H, CH_3), 0.87 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.85 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.02 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.01 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.01 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.00 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$). - **^{13}C-NMR**: δ [ppm] (100.6 MHz, $CDCl_3$): 172.2 (**C**=O), 155.0 (C6),149.2 (C8), 148.0 (C4), 137.7 (Ca), 136.0, 133.0 (C-arom.), 133.7 (Cd), 131.9 (CH-arom.), 131.0 (CH-arom.), 130.0 (CH-arom.), 129.5 (CH-arom.), 129.0 (CH-arom.), 128.0 (CH-arom.), 127.8 (CH-arom.), 127.6 (CH-arom.), 127.5 (CH-arom.), 127.0 (CH-arom.), 129.5 (Cb, Cb´), 120.0 (Cc, Cc´), 119 (C5), 88.4 (C4´), 85.5 (C1´), 72.8 (C3´), 63.3 (C5´), 36.7 (C2´), 26.1 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), 26.0 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), 20.6 ($Cd\text{-}CH_3$), 18.7 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$), 18.2 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$), -4.4 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), -4.6 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), -5.2 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), -5.3 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$). - **IR**: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 2964,1684, 1606, 1508, 1446, 1286,1247, 1176, 1029, 829, 700, 582. - **MS:** (FAB, m/z): ber.: 792.3851 [M], 793.3929 $[M+H]^+$, gef.: 821.3 $[M+Na+2H]^+$.

Synthese von *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-4-methylphenyl-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyl-dimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin 73c



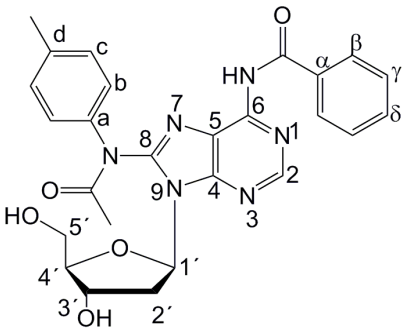
73c

Die Reaktion wurde nach **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 2.13 g (2.66 mmol) *N*^{6}-Dibenzoyl-8-(*N*H-4-methylphenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **71c**, 0.97 g (7.97 mmol) 4-DMAP und 0.75 mL (0.81 g, 7.90 mmol) Essigsäureanhydrid in 50 mL Pyridin verwendet. **Ausbeute**: 584 mg (0.79 mmol, 30%) eines hellgelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{38}H_{54}N_6O_5Si_2$. - **DC**: R_f-Wert (DCM/MeOH 50:1 v/v): 0.31. - **Smp**.: 76.1 °C. - **Drehwert**: $[\alpha]^{20°C}_{589nm}$: +452 °(c = 0.1, $CHCl_3$). - **^{1}H-NMR**: δ [ppm] (400.1 MHz, $CDCl_3$): 8.50 (s, 1H, H2), 8.00 (d, $^3J_{HH}$= 7.6 Hz, 1H, H-arom.), 7.48 (t, $^3J_{HH}$= 7.1 Hz, 2H, H-arom.), 7.37 (t, $^3J_{HH}$= 7.7 Hz, 1H, H-arom.), 7.31 - 7.27 (m, 2H, H-arom.), 7.03 (bs, 3H, H-arom.), 6.14 (t, $^3J_{HH}$= 6.6 Hz, 1H, H1´), 4.64 - 4.59 (m, 1H, H3´), 3.90 - 3.84 (m, 2H, H4´, H5´a), 3.66 - 3.58 (m, 1H, H5´b),3.27 - 3.19 (m, 1H, H2a´), 2.43 (s, 3H, Ac-CH_3), 2.22 (s, 3H, CH_3), 0.78 - 0.74 (m, 18H, 2 x $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.00 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), -0.55 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), -0.75 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), -0.88 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$). - **^{13}C-NMR**: δ [ppm] (100.6 MHz, $CDCl_3$): 152.1 (C6), 149.8 (C2), 149.0 (C8), 137.3, 136.0 (C-arom.), 133 (C-arom.), 127.0 (C-arom.), 131.7 (**C**H-arom.), 131.1 (**C**H-arom.), 130.4 (**C**H-arom.), 129.4 (**C**H-arom.), 129.2 (**C**H-arom.), 128.6 (**C**H-arom.), 128.5 , (**C**H-arom.) 128.4 (**C**H-arom.), 128.1 (**C**H-arom.), 88.3 (C4´), 85.5 (C1´), 72.8 (C3´), 63.1 (C5´), 36.6 (C2´), 26.1 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), 26.0 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), 21.2 (Ac-$\mathbf{C}H_3$), 18.7 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$), 18.5 ($\mathbf{C}H_3$), 18.2 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$), -4.4 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), -4.6 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), -5.2 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), -5.3 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$). - **IR**: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 2927, 2855, 2169, 1984, 1687, 1608, 1582, 1510, 1462, 1354, 1251, 1176, 1065, 1028, 946, 834, 775, 710, 667, 549, 509. - **MS:** (FAB, m/z): ber.: 730.3604 [M], 731.3772 $[M+H]^+$, gef.: 731.3 $[M+H]^+$.

Synthese von N^6-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-4-methylphenyl-2´-desoxyadenosin 82c

Die Reaktion wurde nach **AAV 4** durchgeführt.

Es wurden 2.13 g (2.66 mmol) N^6-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-4-methylphenyl-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **73c**, 1.03 mL (754 mg, 7.45 mmol) Triethylamin und 1.52 mL (1.50 g, 9.31 mmol) Triethylamin-Trihydrofluorid in einer 1:1 (v/v) DCM/THF-Lösung (20 mL) verwendet.



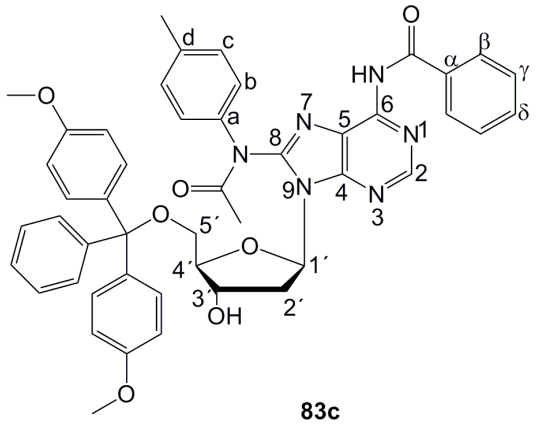
82c

Ausbeute: 352 mg (0.70 mmol, 94%) eines gelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{26}H_{26}N_6O_5$. - **DC**: R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.58. - **Smp**.: Das Produkt zersetzte sich bei 273 °C. - **Drehwert**: $[\alpha]_{589nm}^{20°C}$: +320 ° (c = 0.4, DCM/MeOH; 1:1 v/v). - **^{1}H-NMR**: δ [ppm] (400.1 MHz, DMSO-d_6): 10.68 (s, 1H, N**H**-Benzoyl), 8.64 (s, 1H, H2), 7.60 - 7.50 (m, 2H, H-aromat.), 7.48 - 7.43 (m, 1H, H-aromat.), 7.36 (t, $^3J_{HH}$= 7.6 Hz, 2H, H-aromat.), 7.30 - 7.13 (m, 4H, H-aromat.), 6.36 - 6.24 (m, 1H, H1´), 5.30 (bs, 1H, 3´-O**H**), 5.02 (bs, 1H, 5´-O**H**), 4.50 - 4.46 (m, 1H, H3´), 3.92 - 3.87 (m, 1H, H4´), 3.73 - 3.65 (m, 1H, H5´a), 3.58 - 3.52 (m, 1H, H5´b), 2.28 (s, 3H, C(O)C**H**$_3$), 2.18(s, 3H, C**H**$_3$). - **^{13}C-NMR**: δ [ppm] (100.6 MHz, DMSO-d_6): 149.4 (C2), 137.0 (**C**H-aromat.), 131.6 (**C**H-aromat.), 131.1 (**C**H-aromat.), 130.4 (**C**H-aromat.), 129.9 (**C**H-aromat.), 129.2 (**C**H-aromat.), 128.6 (**C**H-aromat.), 128.5 (**C**H-aromat.), 128.4, (**C**H-aromat.), 88.4 (C4´), 84.9 (C1´), 71.6 (C3´), 62.1 (C5´), 39.6 (C2´), 24.3 (Ac-**C**H$_3$), 20.5 (CH$_3$). - **IR**: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 2926, 2361, 2235, 2161, 2092, 2034, 2011, 1983, 1922, 1682, 1609, 1584, 1509, 1462, 1276, 1178, 1100, 943, 803, 714, 662, 605, 584, 566, 551, 509, 456, 437,413. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 502.1965 [M], 503.2043 [M+H]$^+$, gef.: 503.2058 [M+H]$^+$.

Synthese von *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-4-methylphenyl-5´-*O*-dimethoxytrityl-2´-desoxyadenosin 83c

Die Reaktion wurde nach **AAV 5** durchgeführt.

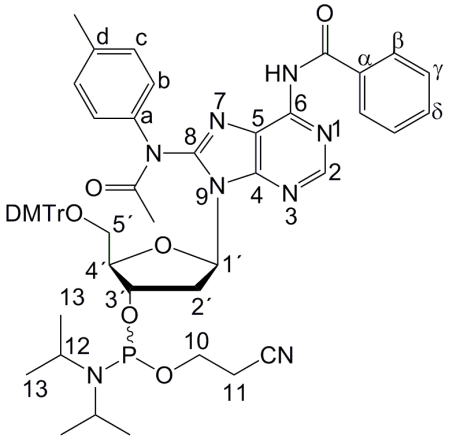
Es wurden 326 mg (0.65 mmol) *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-4-methylphenyl-2´-dA **82c**, 220 mg (0.65 mmol) DMTrCl, 228 mg (1.30 mmol) Silbernitrat und 1.30 mL (1.20 g, 1.30 mmol) Collidin in 20 mL Pyridin verwendet.



83c

Ausbeute: 258 mg (0.32 mmol, 49%) eines gelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{47}H_{44}N_6O_7$. - **DC**: R_f-Wert: (DCM/MeOH; 9:1 v/v): 0.92. - **Smp**.: 123.8 °C. - **Drehwert**: $[\alpha]^{20°C}_{589nm}$: +148.8 ° (c = 0.05, DCM/MeOH; 1:1). - **^{1}H-NMR**: δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.33 (s, 1H, H2), 7.57 (d, $^3J_{HH}$= 7.5 Hz, 2H, H-arom.), 7.43 - 7.37 (m, 3H, H-arom.), 7.30 - 7.28 (m, 2H, H-arom.), 7.28 - 7.25 (m, 2H, H-arom.), 7.21 - 7.17 (m, 4H, H-arom.), 7.16 - 7.11 (m, 5H, H-arom.), 6.75 (dd, $^3J_{HH}$= 6.9 Hz, $^3J_{HH}$= 2.1 Hz, 2H, H-arom.), 6.70 (dd, $^3J_{HH}$= 7.0 Hz, $^3J_{HH}$= 2.0 Hz, 2H, H-arom.), 6.28 (t, $^3J_{HH}$= 6.4 Hz, 1H, H1´), 4.89 (bs, 1H, 3´-O**H**), 4.14 (dd, $^3J_{HH}$= 10.3 Hz, $^3J_{HH}$= 6.3 Hz, 1H, H3´), 3.76 (s, 3H, O-C**H**$_3$), 3.75 (s, 3H, O-C**H**$_3$), 3.75 - 3.71 (m, 1H, H4´), 3.53 - 3.45 (m, 1H, H5´a), 3.45 - 3.39 (m, 1H, H5´b), 3.24 - 3.17 (m, 1H, H2´a), 2.56 (s, 3H, C(O)C**H**$_3$), 2.32 - 2.28 (m, 1H, H2´b), 2.31 (s, 3H, C**H**$_3$). - **^{13}C-NMR**: δ [ppm] (100.7 MHz, $CDCl_3$): 151.8 (C6), 150.0 (C2), 149.3 (C8), 131.9 (**C**H-arom.), 130.6 (**C**H-arom.), 130.5 (**C**H-arom.), 130.2 (**C**H-arom.), 130.1(**C**H-arom.), 129.3 (**C**H-arom.), 129.2 (**C**H-arom.), 128.6 (**C**H-arom.), 128.5 (**C**H-arom.), 128.3 (**C**H-arom.), 128. (**C**H-arom.), 127.9 (**C**H-arom.), 127.8 (**C**H-arom.), 127.2 (**C**H-arom.), 126.8 (**C**H-arom.), 89.7 (C4´), 87.0 (C1´), 73.4 (C3´), 63.6 (C5´), 55.4 (2 x O-**C**H$_3$), 40.0 (C2´), 25.9 (Ac-**C**H$_3$), 21.3 (**C**H$_3$). - **IR**: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 2931, 1681, 1607, 1581, 1507, 1460, 1352, 1279, 1246, 1174, 1030, 827, 754, 699, 661, 580, 546, 512. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 804.3271 [M], 805.3350 [M+H]$^+$, gef.: 805.3368 [M+H]$^+$.

Synthese von N^6-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-4-methoxyphenyl-3´-*O*-[(2-cyanoethyl)-(*N,N´*-di*iso*propylamino)-phosphinyl]-5´-*O*-dimethoxytrityl-2´-desoxyadenosin 84c



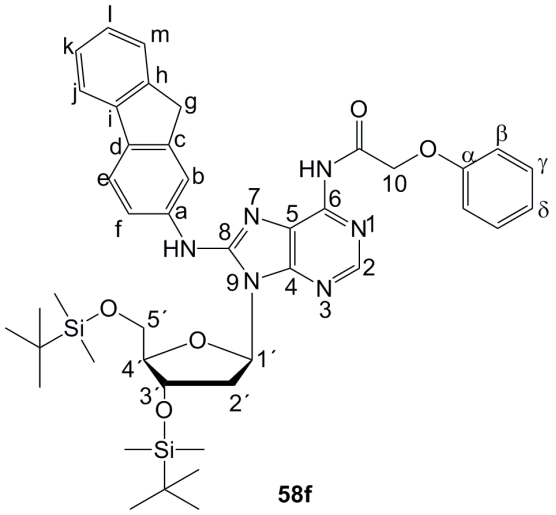
84c

Die Reaktion wurde nach **AAV 6** durchgeführt.

Es wurden 530 mg (0.65 mmol) N^6-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-4-methoxyphenyl-5´-*O*-dimethoxytrityl-2´-dA **83c**, 75.0 mg (0.64 mmol) 4,5-Dicyanoimidazol und 0.15 mL (2.50 mg, 8.30 mmol) Bis(*N,N´*-di*iso*propyl-amino)-(2-*O*-cyanoethyl)phosphit **101** in 10 mL einer 1:1 (v/v) Lösung aus Dichlormethan und Acetonitril verwendet.

Ausbeute: 274 mg (0.27 mmol, 42%) einer farblosen Watte. - **Summenformel:** $C_{56}H_{61}N_8O_8P$. - **DC**: R_f-Wert (DCM/MeOH; 19:1 + 1 Tropfen NEt_3 v/v): 0.22. - **Smp**.: 121 °C. - **Drehwert**: $[\alpha]^{20°C}_{589nm}$: +428 ° (c= 0.05, $CHCl_3$). - **^{31}P-NMR**: δ [ppm] (400 MHz, Benzol-d_6): 149.5, 149.4, 148.1, 148.0. - **IR**: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 1607, 1508, 1445, 1291, 1247, 1176, 1031, 827, 702, 582, 523. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 1004.4350 [M], 1005.4428 $[M+H]^+$, gef.: 1005.7 $[M+H]^+$. Aufgrund der starken Verunreinigungen konnte keine weitere Charakterisierung stattfinden.

Synthese von *N*^{6}-Phenoxyacetyl-8-(*N*H-2-fluorenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyl-dimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin 58f



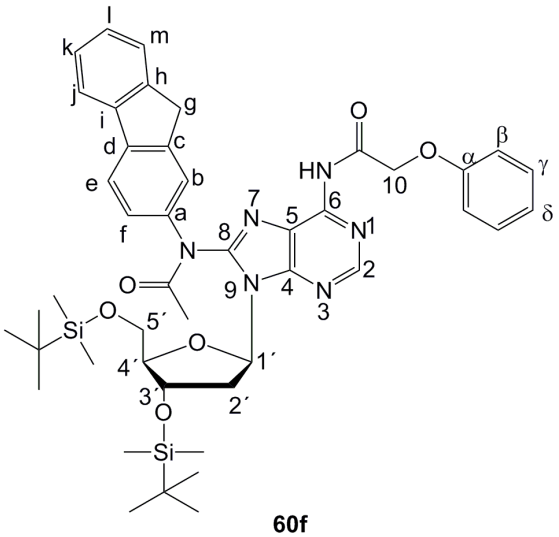
Es wurden 1.62 g (2.45 mmol) C8-*N*H-(2-fluorenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **57f** dreimal mit Pyridin coevaporiert und anschließend in 40 mL Pyridin gelöst. Weiterhin wurden 0.51 mL (0.63 g, 3.68 mmol, 1.5 Äq.) Phenoxyacetylchlorid zugegeben und die Reaktionsmischung 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschicht-chromatographisch (DCM/MeOH; 29:1 v/v). Durch Zugabe von gesättigter NaCl-Lösung erfolgte die Phasentrennung. Die organische Phase wurde zweimal mit Wasser, die vereinigten wässrigen Phasen wiederum dreimal mit Dichlormethan gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden schließlich über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde dreimal mit Toluol coevaporiert. Anschließend erfolgten mehrere säulenchromatographische Reinigungen (DCM/MeOH; 0% → 1% v/v).

Ausbeute: 1.47 g (1.86 mmol, 76 %) eines gelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{43}H_{56}N_6O_5Si_2$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 29:1 v/v): 0.83. - **Drehwert:** $[\alpha]^{25°C}_{589nm}$: +3.4 ° (c= 0.32, $CHCl_3$). - **Smp.:** 103.9 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.57 (s, 1H, H2), 7.94 (bs, 1H, N**H**), 7.75 (dd, 2H, $^3J_{HH}$= 8.0 Hz, $^3J_{HH}$= 4.4 Hz, He, Hf), 7.56 - 7.52 (m, 2H, Hb, Hδ), 7.41 - 7.26 (m, 5H, H-arom.), 7.06 - 7.01 (m, 3H, H-arom.), 6.5 (dd, $^3J_{HH}$= 7.8 Hz, $^3J_{HH}$= 5.7 Hz, 1H, H1´), 4.90 - 4.83 (m, 2H, H10), 4.60 (dt, $^3J_{HH}$= 5.9 Hz, $^3J_{HH}$= 2.8 Hz, 1H, H3´), 4.11 (dd, $^3J_{HH}$= 6.1 Hz, $^3J_{HH}$= 3.0 Hz 1H, H4´), 4.01 (dd, $^2J_{HH}$= 11.5 Hz, $^3J_{HH}$= 3.2 Hz, 1H, H5´a), 3.93 (s, 2H, Hg), 3.87 (dd, $^2J_{HH}$= 11.6 Hz, $^3J_{HH}$= 3.5 Hz, 1H, H5´b), 2.89 (dt, $^2J_{HH}$= 13.6 Hz, $^3J_{HH}$= 6.8 Hz, 1H, H2´a), 2.41 (ddd, $^2J_{HH}$= 13.1 Hz, $^3J_{HH}$= 5.7 Hz, $^3J_{HH}$= 2.9 Hz, 1H, H2´b), 0.94 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.81 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.14 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.13 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.00 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), -0.01 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$): 152.5 (C6), 151.5 (C2), 150.3 (C4), 144.8 (Ca), 130.2 (C**H**-arom.), 130.0 (C**H**-arom.), 127.0 (C**H**-arom.), 125.9 (C**H**-arom.), 125.1 (C**H**-arom.), 122.7 (C**H**-arom.), 120.0 (C**H**-arom.), 119.6

(C**H**-arom.), 115.1 (C5), 114.7 (C**H**-arom.), 88.3 (C4´), 87.5 (C1´), 72.9 (C3´), 68.2 (C10), 63.1 (C5´), 39.8 (C2´), 37.2 (Cg), 26.1 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 26.0 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 17.8 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$, 17.7 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$, -4.6 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), -4.8 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 3348, 2952, 2927, 2893, 2856, 1715, 1623, 1600, 1563, 1490, 1456, 1432, 1387, 1355, 1281, 1247, 1172, 1108, 1060, 1028, 1006, 949, 875, 832, 777, 764, 750, 729, 688, 670, 614, 570, 553, 524, 503, 459, 448, 421, 406. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 792.3851 [M], 793.9 $[M+H]^+$, gef.: 793.3960 $[M+H]^+$.

Versuch zur Synthese von *N*^{6}-Phenoxyacetyl-8-(*N*-acetyl)-2-fluorenyl-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin 60f[13]

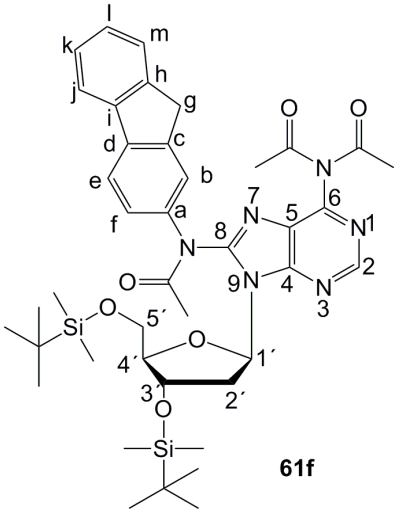
Es wurden 300 mg (0.28 mmol) *N*^{6}-Phenoxyacetyl-8-*N*H-(2-fluorenyl)-3´,5´-*O*-bis (*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **57f** dreimal mit Pyridin coevaporiert und anschließend in 25 mL Pyridin gelöst. Zu dieser Lösung wurden 0.87 mL (936 mg, 9.17 mmol, 5 Äq.) Essigsäureanhydrid und 112 mg (0.92 mmol, 0.5 Äq.) 4-DMAP gegeben und 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschicht-chromatographisch (DCM/MeOH; 30:1 v/v). Da nach 7 h immer noch Edukt **57f** vorhanden war, wurden erneut 0.5 Äq. 4-DMAP zugegeben und insgesamt 24 h bei Raumtemperatur gerührt.



60f

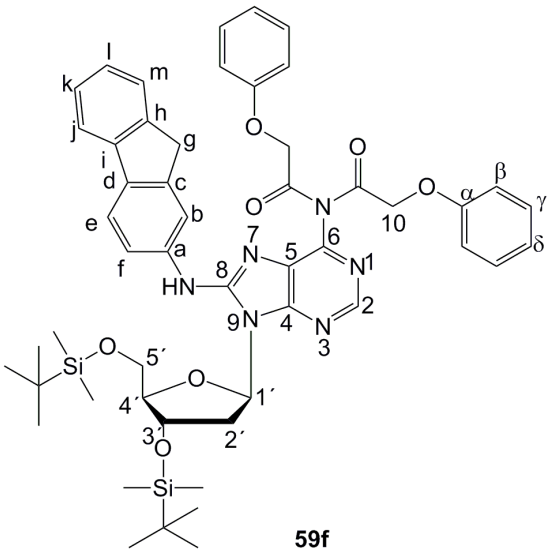
Das gewünschte Produkt **60f** konnte nicht erhalten werden.

Entstanden ist N^6-Diacetyl-8-(*N*-acetyl)-2-fluorenyl-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin **61f**.



Ausbeute: 0.65 g (0.83 mmol, 45 %) eines gelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{41}H_{56}N_6O_6Si_2$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 30:1 v/v): 0.90. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{25°C}$: +118.4 ° (c= 0.32, $CHCl_3$). - **Smp.:** 94.2 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 8.98 (s, 1H, H2), 7.94 (dd, 2H, $^3J_{HH}$= 8.0 Hz, $^3J_{HH}$= 4.4 Hz, He, Hf), 7.68 (s, 1H, Hb), 7.59 (dd, 1H, $^3J_{HH}$= 7.3 Hz,H-arom.), 7.52 - 7.48 (m, 1H, H-arom.), 7.41 - 7.35 (m, 2H, H-arom.), 6.31 (t, $^3J_{HH}$= 6.3 Hz, 1H, H1´), 4.97 - 4.93 (m, 1H, H3´), 3.93 (s, 2H, Hg), 3.88 - 3.82 (m, 2H, H4´, H5´a), 3.73 - 3.67 (m, 1H, H5´b), 3.25 - 3.22 (m, 1H, H2´a), 2.25 (s, 6H, 2 x N^6-Ac-CH_3), 2.15 (s, 3H, 8-*N*-Ac-CH_3), 0.89 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.71 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.12 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.10 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), -0.11 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), -0.12 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$): 152.5 (C6), 151.5 (C2), 150.3 (C4), 144.8 (Ca), 130.2 (C**H**-arom.), 130.0 (C**H**-arom.), 127.0 (C**H**-arom.), 125.9 (C**H**-arom.), 125.1 (C**H**-arom.), 122.7 (C**H**-arom.), 120.0 (C**H**-arom.), 119.6 (C**H**-arom.), 115.1 (C5), 114.7 (C**H**-arom.), 86.9 (C4´), 84.0 (C1´), 71.2 (C3´), 62.0 (C5´), 36.8 (C2´), 36.4 (Cg), 25.8 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 25.5 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 22.8 (Ac-$CH_3$), 17.8 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$, 17.6 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$, -4.8 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), -4.9 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 2953, 2928, 2884, 2856, 1712, 1602, 1575, 1513, 1471, 1454, 1404, 1347, 1274, 1176, 1110, 1074, 1005, 989, 957, 938, 879, 833, 775, 734, 696, 632, 596, 545, 421. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 784.3800 [M], 785.3878 $[M+H]^+$, gef.: 785.3884 $[M+H]^+$.

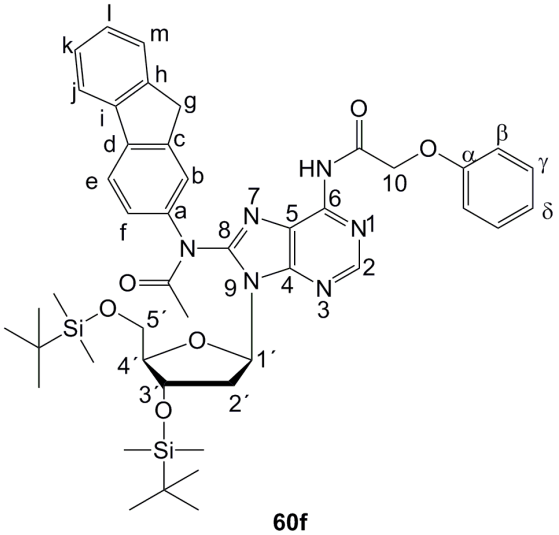
Synthese von *N*^{6}-Diphenoxyacetyl-8-*N*H-(2-fluorenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyl-dimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin 59f



Es wurden 858 mg (1.43 mmol) C8-*N*H-(2-fluorenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **57f** dreimal mit Pyridin coevaporiert und in 20 mL Pyridin gelöst. Anschließend wurden 0.99 mL (1.22 g, 7.14 mmol, 5 Äq.) Phenoxyacetylchlorid zugegeben und die Reaktionsmischung 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 19:1 v/v). Durch Zugabe von gesättigter NaCl-Lösung erfolgte die Phasentrennung. Die organische Phase wurde zweimal mit dest. Wasser und die vereinigten wässrigen Phasen wiederum dreimal mit Dichlormethan gewaschen. Die vereinigten gesammelten organischen Phasen wurden schließlich über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde dreimal mit Toluol coevaporiert. Anschließend erfolgten mehrere säulenchromatographische Reinigungen (DCM/MeOH; 0% → 1% v/v).

Das gewünschte Produkt **59f** konnte zwar erhalten werden, allerdings nur als ein Gemisch des einfach und zweifach geschützten Produktes. Auch die mehrmalige chromatographische Reinigung führte nicht zur Trennung der beiden Produkte **59f**, **60f**. Eine Charakterisierung konnte nicht stattfinden. Das entstandene Produktgemisch wurde ungereinigt in die nächste Stufe eingesetzt.

Synthese von *N*^{6}-Phenoxyacetyl-8-(*N*-acetyl)-2-fluorenyl-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyl-dimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin 60f



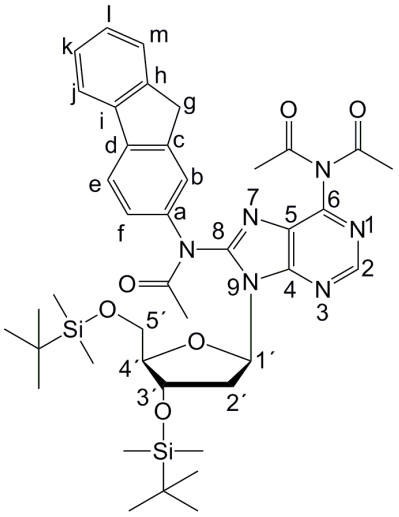
60f

Es wurden 732 mg des Gemisches aus *N*^{6}-Phenoxyacetyl-8-*N*H-(2-fluorenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **60f** und *N*^{6}-Diphenoxyacetyl-8-*N*H-(2-fluorenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **59f** dreimal mit Pyridin coevaporiert und anschließend in 20 mL Pyridin gelöst. Zu dieser Lösung wurden 103 mg (0.84 mmol, 1 Äq.) 4-DMAP und 0.08 mL (86.0 mg, 0.84 mmol, 1 Äq.) Essigsäureanhydrid gegeben und die Reaktionsmischung 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 30:1 v/v). Es konnten zwei verunreinigte Produkte isoliert werden. Das gewünschte Produkt **60f** und das *N*^{6}-Diacetyl-8-(*N*-acetyl)-2-fluorenyl-3´,5´-*O*-bis-(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **61f**. Eine Reinigung war auch nach mehrfacher chromatographischer Trennung nicht möglich.

Rohausbeute *N*^{6}-Phenoxyacetyl-8-(*N*-acetyl)-2-fluorenyl-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyl-dimethylsilyl)-2´-dA 60f: 89.2 mg (0.11 mmol, 13 %) eines gelben Feststoffs bezogen auf *N*^{6}-Diphenoxyacetyl-8-(*N*-acetyl)-2-fluorenyl-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyl-dimethylsilyl)-2´-dA **59f**. Aufgrund der starken Verunreinigungen konnte keine vollständige Charakterisierung stattfinden.

Rohausbeute *N*^{6}-Diacetyl-8-(*N*-acetyl)-2-fluorenyl-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA 61f: 221 mg (0.28 mmol) eines gelben Feststoffs, bezogen auf *N*^{6}-Diphenoxyacetyl-8-(*N*-acetyl)-2-fluorenyl-3´,5´-*O*-bis-(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **59f**.

.

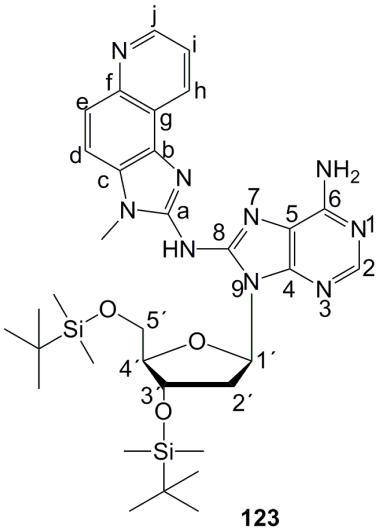


61f

Versuch zur Synthese von C8-(2-*N*-3-Methylimidazo[4,5-*f*]chinolin)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin 123

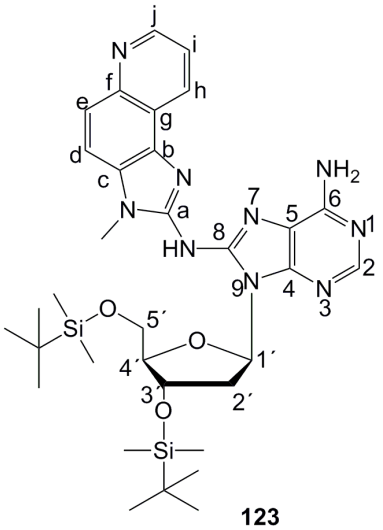
Versuch A [104]

Es wurden 100 mg (0.36 mmol) **53** mit 81.9 mg (0.90 mmol, 2.5 Äq.) IQ **10**, 16.0 mg (0.02 mmol, 10 mol%) $Pd_2(dba)_3$, 31.0 mg (0.05 mmol, 30 mol%) Xantphos und 45.0 mg (0.54 mmol, 1.5 Äq.) LiHMDS in 20 mL Toluol gelöst und für 72 h auf 110 °C erhitzt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (DCM/MeOH; 9:1 v/v). Da während der Reaktionszeit von 72 h nur minimale Umsetzung beobachtet werden konnte, wurde das Reaktionsgemisch noch zusätzlich in der Mikrowelle bei 150 W, 150 °C für 1 h erwärmt. Es konnte keine weitere Umsetzung beobachtet werden. Das gewünschte Produkt **123** konnte nicht erhalten werden. Es konnte lediglich das Edukt **53** reisoliert werden.



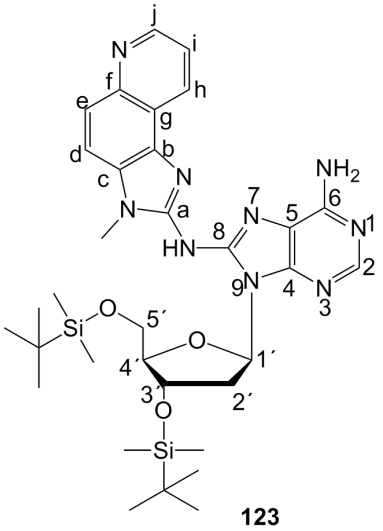
Versuch B [112]

Es wurden 100 mg (0.36 mmol) der Verbindung **53** mit 65.6 mg (0.18 mmol, 1 Äq.) IQ **10**, 16.0 mg (0.02 mmol, 10 mol%) $Pd_2(dba)_3$, 31.0 mg (0.05 mmol, 30 mol%) Xantphos und 58.3 mg (0.18 mmol, 1 Äq.) Cs_2CO_3 in 20 mL Toluol gelöst und für 72 h auf 110 °C erhitzt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 9:1 v/v) verfolgt. Da während der Reaktionszeit von 72 h nur eine minimale Umsetzung beobachtet werden konnte, wurde das Reaktionsgemisch anschließend auch in der Mikrowelle erwärmt (150 W, 150 °C, 1 h). Es konnte keine weitere Umsetzung beobachtet werden. Es konnte lediglich das Edukt **53** reisoliert werden.



Versuch C [49]

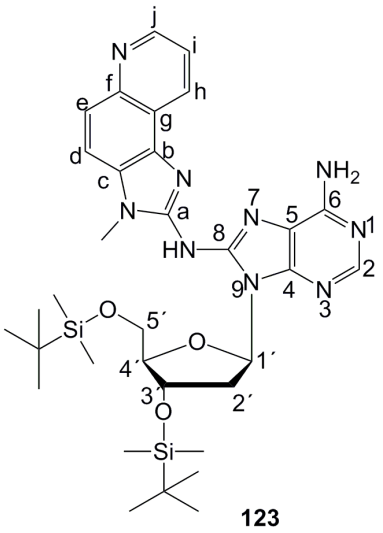
Es wurden 100 mg (0.36 mmol) der Verbindung **53** mit 81.9 mg (0.90 mmol, 2.5 Äq.) IQ 10, 16.0 mg (0.02 mmol, 10 mol%) $Pd_2(dba)_3$, 31.0 mg (0.05 mmol, 30 mol%) *rac*-BINAP und 30.0 mg (0.27 mmol, 1.5 Äq.) *t*-BuOK in 20 mL Toluol gelöst und für 72 h auf 110 °C erhitzt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (DCM/MeOH; 9:1 v/v). Nach einer Reaktionszeit von 72 h wurde ein weiteres Äquivalent IQ **10** zugegeben. Da sich auch nach dieser Zugabe keine Veränderung dünnschichtchromatographisch detektieren ließ, wurde die Reaktion abgebrochen.



Versuch C'

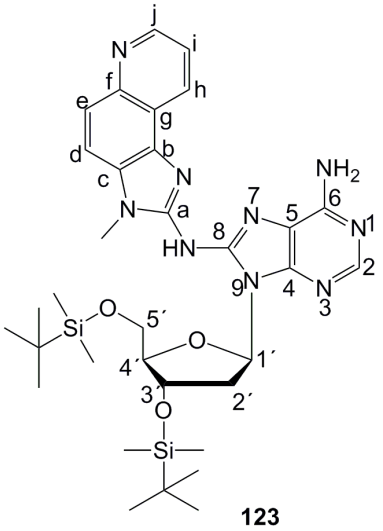
Die Reaktion wurde in der Mikrowelle (150 °C, 150 W , 1 h) durchgeführt. Alle Reagenzien wurden unter N_2-Atmosphäre in eine Mikrowellen-Tube überführt.

Es wurden 50.0 mg (0.09 mmol) **53** mit 40.0 mg (0.22 mmol, 2.5 Äq.) IQ **10,** 8.00 mg (0.01 mmol, 10 mol%) $Pd_2(dba)_3$, 15.0 mg (0.03 mmol, 30 mol%) *rac*-BINAP und 15.0 mg (0.14 mmol, 1.5 Äq.) *t*-BuOK in 2 mL Toluol gelöst. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 9:1 v/v). Da nach 1 h Reaktionszeit in der Mikrowelle nur ein kleiner Schatten einer neuer Verbindung dünnschichtchromatographisch detektiert werden konnte, wurde die Reaktion abgebrochen.



Versuch D [88]

Es wurden 100 mg (0.36 mmol) **53** mit 81.9 mg (0.90 mmol, 2.5 Äq.) IQ **10**, 16.0 mg (0.02 mmol, 10 mol%) $Pd_2(dba)_3$, (33.0 mg, 0.05 mmol, 30 mol%) *rac*-BINAP und 45.0 mg (0.54 mmol,1.5 Äq.) LiHMDS in 20 mL Toluol gelöst und für 72 h auf 110 °C erhitzt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 9:1 v/v). Da während der Reaktionszeit von 72 h nur minimale Umsetzung beobachtet werden konnte, wurde das Reaktionsgemisch in der Mikrowelle erwärmt (150 W, 150 °C, 1 h).

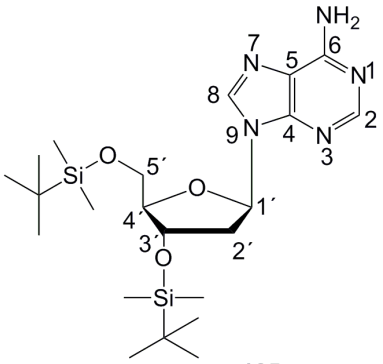


123

Anschließend wurde die Reaktionslösung mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung gewaschen und die wässrige Phase mehrfach mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Zur Reinigung erfolgte eine säulenchromatographische (ALOX, neutral, Akt.stufe III, DCM/MeOH; 100% → 0% v/v) Reinigung.

Die ^{1}H-NMR-spektroskopische Untersuchung ergab das Vorhandensein von 3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin **125** als Produkt.

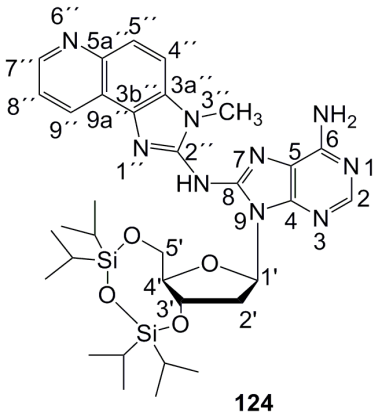
Ausbeute: Da es sich um eine Testreaktion handelt, wurde keine Ausbeutebestimmung und keine vollständige Charakterisierung durchgeführt. - **Summenformel:** $C_{22}H_{41}N_5O_3Si_2$. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.34 (s, 1H, H8), 8.14 (s, 1H, H2), 6.45 (t, $^3J_{HH}$= 6.4 Hz, 1H, H1´), 5.86 (bs, 2H, N**H**$_2$), 4.60 (dt, $^3J_{HH}$= 5.6 Hz, $^3J_{HH}$= 3.6 Hz, 1H, H3´), 4.01 (dd, 1H, $^3J_{HH}$= 6.9 Hz, $^3J_{HH}$= 3.4 Hz, H4´), 3.87 (dd, 1H, $^2J_{HH}$= 11.2 Hz, $^3J_{HH}$= 4.2 Hz, H5´a), 3.77 (dd, 1H, $^2J_{HH}$= 11.2 Hz, $^3J_{HH}$= 3.1 Hz, H5´b), 2.66 - 3.57 (m, 1H, H2´a), 2.43 (ddd, 1H, $^2J_{HH}$= 13.1 Hz, $^3J_{HH}$= 6.0 Hz, $^3J_{HH}$= 4.0 Hz, H2´b), 0.91 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.90 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.09 (s, 6H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.08 (s, 6H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$).



125

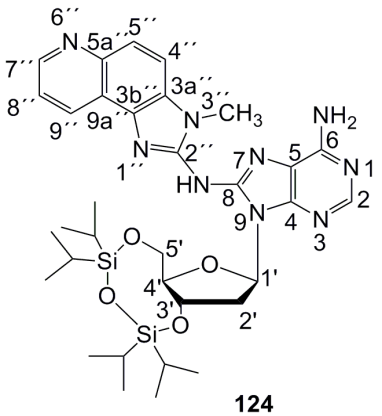
Versuch zur Synthese von C8-(2-*N*-3-Methylimidazo[4,5-*f*]chinolin)-3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-desoxyadenosin 124

Versuch E [49]



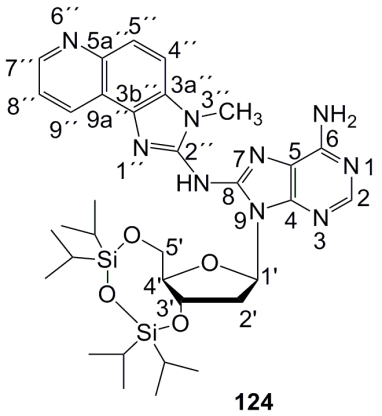
Es wurden 50.0 mg (0.09 mmol) **41** mit 48.0 mg (0.26 mmol, 3 Äq.) IQ **10**, 8.00 mg (0.01 mmol, 10 mol%) $Pd_2(dba)_3$, 16.0 mg (0.05 mmol, 30 mol%) *rac*-BINAP und *t*-BuOK 15.0 mg (0.14 mmol, 1.5 Äq.) in 20 mL Toluol gelöst und für 72 h auf 110 °C erhitzt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (DCM/ MeOH; 9:1 v/v). Die Reaktionslösung wurde mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung und anschließend die wässrige Phase mit Ethylacetat gewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und am Chromatotron gereinigt (DCM/MeOH; 100% → 0% v/v). Trotz mehrfacher chromatographischer Reinigung zeigte die anschließende ^{1}H-NMR-spektroskopische Untersuchung nur Spuren der zu synthetisierenden Verbindung **124**. Es wurde keine weitere Reinigung vorgenommen.

Versuch F [88]



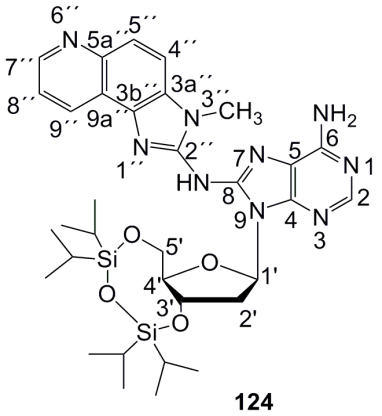
Verbindung **41** (50.0 mg, 0.09 mmol) wurde mit 40.0 mg (0.22 mmol, 2.5 Äq.) IQ **10**, 8.00 mg (0.01 mmol, 10 mol%) $Pd_2(dba)_3$, 16.0 mg (0.03 mmol, 30 mol%) *rac*-BINAP und 22.0 mg (0.13 mmol,1.5 Äq.) LiHMDS in 20 mL Toluol gelöst und für 24 h auf 110 °C erhitzt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (DCM/MeOH; 9:1 v/v). Da weder Edukt **41** noch Produkt **124** mittels Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden konnten, wurde die Reaktion nach 24 h abgebrochen.

Versuch G [104]



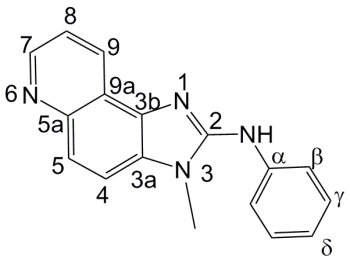
Es wurden 50.0 mg (0.09 mmol) **41** mit 40.0 mg (0.22 mmol, 2.5 Äq.) IQ **10**, 8.00 mg (0.01 mmol, 10 mol%) $Pd_2(dba)_3$, 16.0 mg (0.03 mmol, 30 mol%) Xantphos und 22.0 mg (0.13 mmol, 1.5 Äq.) LiHMDS in 20 mL Toluol gelöst und für 24 h auf 110 °C erhitzt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 9:1 v/v). Die Reaktion wurde nach 24 h abgebrochen, da weder Edukt **41** noch Produkt **124** dünnschichtchromatographisch detektiert werden konnten.

Versuch H [112]



Es wurden 50.0 mg (0.09 mmol) der Verbindung **41** mit 40.0 mg (0.22 mmol, 2.5 Äq.) IQ **10**, 8.00 mg (0.01 mmol,10 mol%) $Pd_2(dba)_3$, 16.0 mg (0.03 mmol, 30 mol%) Xantphos und 43.0 mg (0.13 mmol, 1.5 Äq.) Cs_2CO_3 in 20 mL Toluol gelöst und für 48 h auf 110 °C erhitzt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (DCM/MeOH; 9:1 v/v). Anschließend wurden die Reaktionslösung mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und die wässrige Phase mit Ethylacetat gewaschen. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (MeOH/DCM; 0% → 100% v/v). Die ^{1}H-NMR spektroskopische Untersuchung ergab, wie bereits bei Versuch E nur das Vorhandensein von Produktspuren. Auf weitere Reinigungsschritte wurde daher verzichtet.

Synthese von 2-*N*-Phenyl-3-methylimidazo-[4,5-*f*]chinolin 126



126

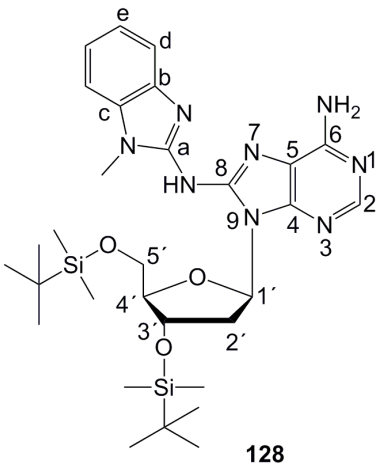
Brombenzol **26** (38.0 µL, 57.0 mg, 0.36 mmol) wurde mit 200 mg (1.09 mmol, 3 Äq.) IQ **10**, 33.0 mg (0.04 mmol) $Pd_2(dba)_3$, 67.0 mg (0.11 mmol) *rac*-BINAP und 60.0 mg (0.54 mmol, 1.5 Äq.) *t*-BuOK in 20 mL Toluol gelöst und 48 h bei 110 °C erhitzt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 9:1 v/v). Anschließend wurde die Reaktionslösung mit gesättigter $NaHCO_3$-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit Ethylacetat extrahiert. Die wiederum vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Die Reinigung des Produktes **126** erfolgte am Chromatotron (MeOH/DCM; 0% → 100% v/v).

Ausbeute: 37.0 mg (0.13 mmol, 36%) eines braunen Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{17}H_{14}N_4$. - **DC:** R_f-Wert: 0.36 (DCM/MeOH; 9:1 v/v). - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 8.81 - 8.80 (m, 1H, H9), 8.79 - 8.78 (m, 1H, H7), 7.80 (d, $^3J_{HH}$ = 8.9 Hz, 1H, H4), 7.47 (d, $^3J_{HH}$ = 8.9 Hz, 1H, H5), 7.39 - 7.35 (m, 3H, H-Phenyl) 7.23 - 7.20 (m, 2H, H-Phenyl), 7.04 (s, 1H, N**H**), 6.93 - 6.91 (m, 1H, H8). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d_6): 149.5 (C2), 147.8 (C9), 140.9 (C3a, C3b), 131.3 (C9a), 129.3 (**C**H-Phenyl), 128.2 (**C**H-Phenyl), 127.9 (C7), 127.8 (**C**H-Phenyl), 127.3 (**C**H-Phenyl), 126.5 (**C**-Phenyl) 122.1 (C5), 112.4 (C4), 117.7 (C8), 29.6 (**C**H_3).

Da es sich hierbei um eine Testreaktion handelte, wurde keine weitere Charakterisierung durchgeführt.

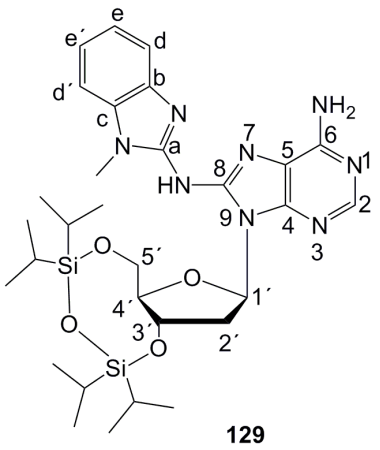
Versuch zur Synthese von C8-(2-*N*-3-Methylbenzimidazol)-3´,5´-*O*-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin 128

Es wurden 50.0 mg (0.09 mmol) **53** mit 39.5 mg (0.27 mmol) 2-Amino-1-methylbenzimidazol, 16.0 mg (0.02 mmol) $Pd_2(dba)_3$, 33.4 mg (0.05 mmol) *rac*-BINAP und 15.0 mg (0.14 mmol) *t*-BuOK in 20 mL Toluol gelöst und für 72 h bei 110 °C erhitzt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (DCM/MeOH; 9:1 v/v). Da nach 72 h Reaktionszeit nur eine minimale Bildung einer weiteren Verbindung dünnschicht-chromatographisch detektierbar war, wurde die Reaktion abgebrochen.

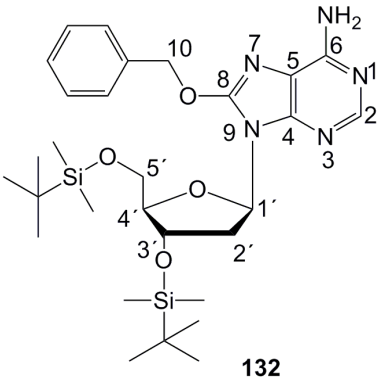


Versuch zur Synthese von C8-(2-*N*-3-Methylimidazol)-3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-desoxyadenosin 129

Die Verbindung **41** (50.0 mg, 0.09 mmol) wurde mit 3.08 mg (0.26 mmol) 2-Amino-1-methylbenzimidazol, 14.0 mg (0.13 mmol) *t*-BuOK, 8.00 mg (0.01 mmol) $Pd_2(dba)_3$ und 16.0 mg (0.05 mmol) *rac*-BINAP in 20 mL Toluol gelöst und bei 110 °C 72 h erhitzt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromato-graphisch (DCM/MeOH; 9:1 v/v). Die Reaktions-mischung wurde am Chromatotron gereinigt (MeOH/DCM; 0%→ 100%). Die erhaltene Substanz wurde ^{1}H-NMR spektroskopisch untersucht, wobei auch nach mehrmaliger chromatographischer Reinigung nur Produktspuren identifiziert werden konnten.

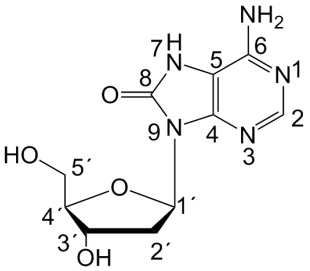


Versuch zur Synthese von C8-*O*-Benzyl-3´,5´-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin 132[107]



Elementares Natrium (100 mg, 4.55 mmol) wurde in 20 mL Benzylalkohol unter Kühlung gelöst und anschließend mit 8-Br-3´,5´-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **53** versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (DCM/MeOH; 9:1 v/v). Anschließend wurde die Reaktionslösung mit konz. HCL neutralisiert und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat extrahiert. Nach Destillation des Lösungsmittels wurde der Rückstand mit einer Mischung aus MeOH/EE/PE (1:1:1) v/v/v versetzt, wobei ein Feststoff ausfallen sollte. Die Synthese wurde mehrfach wiederholt, erneut fiel bei der Zugabe von MeOH/EE/PE kein Feststoff aus. Auch zeigte in beiden Fällen das ^{1}H-NMR Spektrum keine Signale, die der Zielverbindung zugeordnet werden konnten, es wurde nur das Edukt **53** reisoliert.

Darstellung von C8-Oxo-2´-desoxyadenosin 134[108]



C8-Brom-2´-dA **56** (560 mg, 1.69 mmol) wurde in 200 mL dest. Wasser suspendiert, mit 0.36 mL (5.10 mmol, 3 Äq.) β-Mercaptoethanol und 2.40 mL (17.0 mmol, 10 Äq.) Triethylamin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 24 h auf 100 °C erhitzt. Die Reaktion wurde dünnschicht-chromatographisch verfolgt (Acetonitril/Wasser; 1:3 v/v) und anschließend mittels RP-Säulenchromatographie gereinigt (Wasser/Acetonitril; 100% → 90% v/v).

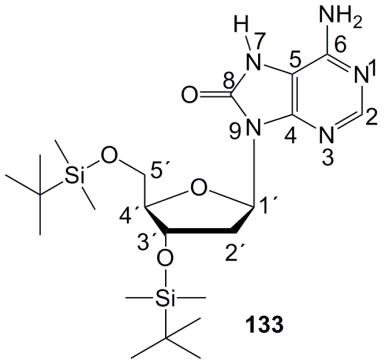
Ausbeute: 346 mg (1.30 mmol, 76%) eines farblosen Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{10}H_{13}N_5O_4$. - **DC:** R_f-Wert: 0.36 (Wasser/Acetonitril; 3:1 v/v). - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 10.3 (s, 1H, N**H**), 8.01 (s, 1H, H2), 6.14 (dd, $^{3}J_{HH}$= 8.2 Hz, $^{3}J_{HH}$= 6.6 Hz, 1H, H1´), 5.19 (s, 1H, 3´-O**H**), 5.14 (s, 1H, 5´-O**H**), 4.39 - 4.37 (m, 1H, H3´), 3.80 (dd, $^{3}J_{HH}$= 6.5 Hz, $^{3}J_{HH}$= 4.28 Hz, 1H, H4´), 3.63 - 3.59 (m, 2H,

H5´a, H5´b), 3.00 - 2.93 (m, 1H, H2´a), 1.99 (ddd, $^2J_{HH}$= 12.8 Hz, $^3J_{HH}$= 6.4 Hz, $^3J_{HH}$= 2.3 Hz, 1H, H2´b).

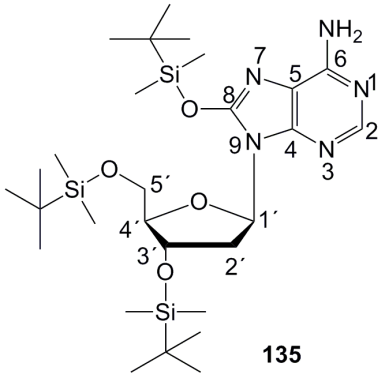
Da es sich hierbei lediglich um einen Testansatz handelte, erfolgte keine weitere Charakterisierung.

Versuch zur Synthese von C8-Oxo-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin 133

Es wurden 346 mg (1.21 mmol) **53** mit 547 mg (3.63 mmol, 3 Äq.) TBDMS-Cl und 247 mg (3.63 mmol, 3 Äq.) Imidazol in 20 mL Pyridin gelöst und für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt (DCM/ MeOH; 9:1 v/v). Im Anschluss erfolgte die Reinigung mittels Chromatotron, wobei nur das dreifach geschützte 8,3´,5´-*O*-tris(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **135** identifiziert werden konnte.

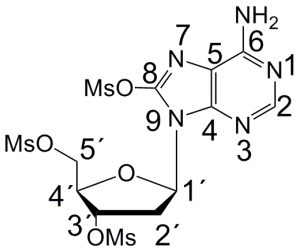


^{1}H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.42 (s, 2H, N**H**$_2$), 8.12 (s, 1H, H2), 6.33 (dd, $^3J_{HH}$= 6.8 Hz, 1H, H1´), 4.79 - 4.75 (m, 1H, H3´), 3.76 - 3.69 (m, 1H, H4´), 3.43 (dt, $^2J_{HH}$= 13.1 Hz, $^3J_{HH}$= 6.7 Hz, 1H, H5´a), 3.33 - 3.25 (m, 2H, H5´b, H2´a), 2.17 - 2.06 (m, 1H, H2´b), 1.00 - 0.82 (m, 30H, 3 x $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H_3})_3$), 0.13 - 0.02 (m, 15H, 6 x $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$).



Da es sich hierbei lediglich um einen Testansatz handelte, erfolgte keine weitere Charakterisierung.

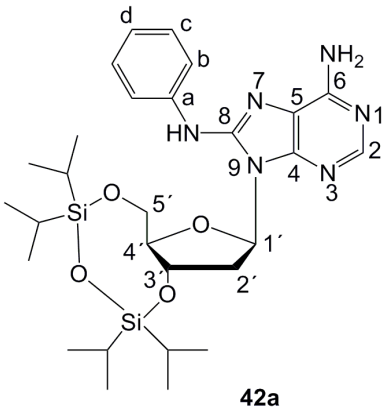
Versuch zur Synthese von 8,3´,5´-Tri-*O*-mesyl-2´-desoxyadenosin 137



137

Es wurden 100 mg 8-Oxo-2´-dA **134** in 10 mL Pyridin gelöst und mit 87.0 µL (127 mg, 11.0 mmol) Mesylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde für eine Woche bei Raumtemperatur gerührt. Nach dünnschichtchromatographischer Untersuchung ergab sich keine Bildung des Produktes **137**. Die Reaktion wurde abgebrochen. Es konnte lediglich das Edukt **134** reisoliert werden. Das gewünschte Produkt **137** konnte nicht erhalten werden.

Synthese von C8-(*N*H-Phenyl)-3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-desoxyadenosin 42a



42a

Die Reaktion wurde nach **AAV 1** durchgeführt.

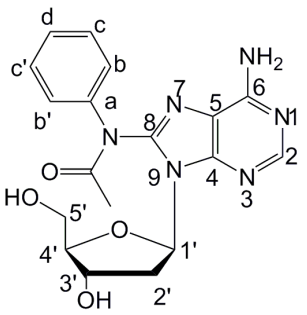
Es wurden 979 mg (1.57 mmol) *rac*-BINAP, 480 mg (0.52 mmol) $Pd_2(dba)_3$, 3.00 g (5.24 mmol) 8-Brom-3´,5´-*O*-(1,1,3,3-tetrakis-(*iso*propyl)-1,3-disiloxan)-2´-dA **41**, 2.56 g (7.86 mmol) Cs_2CO und 1.19 mL (1.22 g, 13.1 mmol) Anilin **1** in 60 mL 1,2-DME verwendet. Die Reaktionsmischung wurde bei 95 °C für 48 h unter Rückfluss erhitzt.

Ausbeute: 1.88 g (3.19 mmol, 85 %) eines gelb-orangen, kristallinen Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{28}H_{44}N_6O_4Si_2$. - **DC:** R_f-Wert: 0.16 (PE/EE, 2:1 v/v). - **Drehwert:** $[a]_{589nm}^{22°C}$: +230 ° (c= 0.21, $CHCl_3$). - **Smp.:** 150.4 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.17 (s, 1 H, H2), 7.64 - 7.60 (m, 3H, NH, Hb, Hb´), 7.37 - 7.31 (m, 2H, Hc, Hc´), 7.08 - 7.02 (m, 1H, Hd), 6.30 (dd, $^3J_{HH}$= 7.2 Hz, $^3J_{HH}$= 3.4 Hz, 1H, H1´), 5.36 (bs, 2H, N**H**$_2$), 4.88 (dd, $^3J_{HH}$= 14.9 Hz, $^3J_{HH}$= 7.5 Hz, 1H, H3´), 4.13 (dd, $^3J_{HH}$ = 12.1 Hz**,** $^3J_{HH}$ = 2.9 Hz, 2H, H4´, H5´a), 3.91 - 4.01 (m, 1H, H5´b), 3.04 - 3.10 (m, 1H, H2´a), 2.51 - 2.58 (m, 1H, H2´b), 1.03 - 1.07 (m, 10H, *iso*prop.-**H**), 0.92 - 0.93 (m, 18H, *iso*prop.-**H**). - **^{13}C-NMR**: δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$): 152.4 (C6), 150.3 (C2), 147.3 (C8), 138.1 (C4), 134.6 (Cc, Cc´), 129.0 (Ca, Ca´), 122.7 (Cd), 118.8 (Cb, Cb´), 85.3 (C4´), 84.0 (C1´), 70.5 (C3´), 61.9 (C5´), 38.8 (C2´), 17.5, 17.3, 17.1, 17.1, 17.1, 17.0, 16.9 (*iso*prop.-SiC(**C**H$_3$)$_2$), 13.39, 13.14, 12.76, 12.49 (*iso*prop.-Si**C**(CH$_3$)$_2$). - **IR:**

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr-Pressling): 3373, 2944, 2867, 2893, 1639,1600, 1498, 1464, 1348, 1139, 1035, 885, 692. - **MS (FAB, m/z):** ber.: 585.8739 [M], gef.: 585 [M].

Versuch zur Synthese von C8-(*N*-Acetyl)-phenyl-2´-desoxyadenosin 141a

Reaktion A

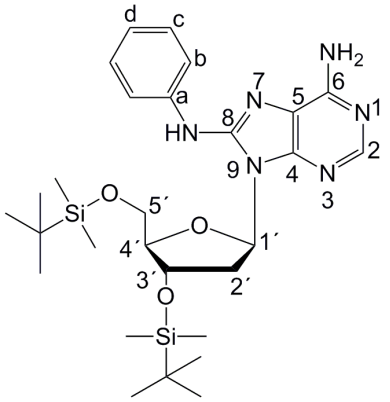


Es wurden 20 mg (0.03 mmol) **141a** in 1 mL NH_3 und 17.4 µL β-Mercaptoethanol gelöst und 4 h bei 45 °C gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH; 9:1 v/v).Nach Reaktionsende wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand gefriergetrocknet. Da es sich hierbei lediglich um einen Testansatz handelte und keine Reinigung des entstandenen Produktes erfolgt war, konnte keine Ausbeute bestimmt werden und keine vollständige Charakterisierung stattfinden.

Das gewünschte Produkt ist nicht entstanden. Verunreinigt isoliert werden konnte das C8-(*N*H-Phenyl)-2´-desoxyadenosin **142**. Da es sich um ein Roh-NMR handelt, ist eine Auswertung nicht möglich, da noch die abgespaltene Benzoyl-Gruppe im Gemisch vorhanden war und das NMR verunreinigte. Die Acetyl-Gruppe an der 8-*N*-Position wurde abgespalten. Das bedeutet, eine spätere Entschützung nach dieser Methode wird möglicherweise nicht erfolgreich gelingen.

Ausbeute: Testansatz - keine Ausbeutebestimmung. - **Summenformel:** $C_{18}H_{20}N_6O_4$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 4:1 v/v): 0.30. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 9.02 (s, 1H, NH), 8.01 (s, 1H, H2), 7.85 (d, $^3J_{HH}$= 7.9 Hz, 2H, Hb, Hb´), 7.32 - 7.27 (m, 2H, Hc, Hc´), 6.70 - 6.94 (m, 1H, Hd), 6.82 (bs, 2H, NH_2), 6.53 (dd, $^3J_{HH}$= 9.4 Hz, $^3J_{HH}$= 5.8 Hz, 1H, H1´), 6.01 - 5.98 (m, 1H, H3´), 5.37 (d, $^3J_{HH}$= 3.8 Hz, 1H, 3´-OH), 4.50 - 4.42 (m, 1H, 5´-OH), 4.16 - 4.04 (m, 1H, H5´a), 3.99 - 3.94 (m, 1H, H4´), 3.14 - 3.12 (m, 1H, H5´b), 3.74 - 3.64 (m, 1H, H2´a), 2.14 - 2.06 (m, 1H, H2´b). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 153.2 (C6), 149.9 (C2), 148.5 (C4), 146.5 (C8), 140.4 (C5), 128.7 (Cb Cb´), 121.5 (Cd), 118.3 (Cc, Cc´), 114.4 (Ca), 87.6 (C4´), 83.3 (C1´), 71.4 (C3´), 59.6 (C5´), 38.1 (C2´).

Synthese von C8-(*N*H-Phenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxy-adenosin 57a



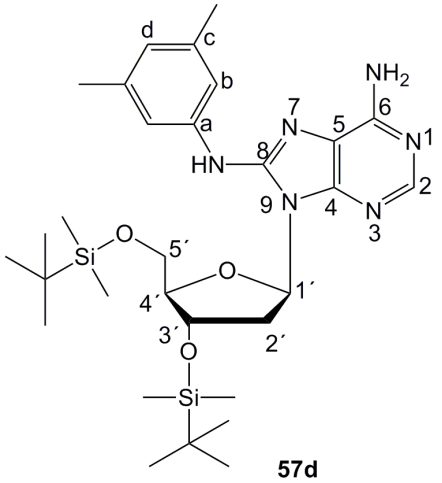
57a

Die Reaktion wurde nach **AAV 1** durchgeführt.

Es wurden 493 mg (0.54 mmol) $Pd_2(dba)_3$, 1.01 g (1.62 mmol) *rac*-BINAP, 3.00 g (5.38 mmol) 8-Brom-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **53**, 2.63 g (8.08 mmol) Cs_2CO_3 und 1.23 mL (1.25 g, 13.46 mmol) Anilin **1** in 50 mL 1,2-DME verwendet.

Ausbeute: 2.36 g (4.13 mmol, 77 %) eines gold-gelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{28}H_{46}N_6O_3Si_2$. - **DC:** R_f-Wert (PE/EE; 2:1 v/v): 0.12. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{20°C}$: 11.4 ° (c= 0.25, $CHCl_3$). - **Smp.:** 70 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.19 (s, 1H, H2), 7.87 (s, 1H, N**H**), 7.57 (d, $^3J_{HH}$= 8.0 Hz, 2H, Hb, Hb´), 7.34 (t, $^3J_{HH}$= 7.7 Hz, 2H, Hc, Hc´), 7.08 (t, $^3J_{HH}$= 7.3 Hz, 1H, Hd), 6.45 (dd, $^3J_{HH}$= 8.5 Hz, $^3J_{HH}$= 5.3 Hz, 1H, H1´), 4.55 (dt, $^3J_{HH}$= 5.4 Hz, $^3J_{HH}$= 2.6 Hz, $^3J_{HH}$= 2.6 Hz, 1H, H3´), 4.13 (dd, $^3J_{HH}$= 5.3 Hz, $^3J_{HH}$= 2.7 Hz, 1H, H4´), 3.99 (dd, $^2J_{HH}$= 11.7 Hz, $^3J_{HH}$= 2.7 Hz, 1H, H5´a), 3.87 (dd, $^2J_{HH}$= 11.7 Hz, $^3J_{HH}$= 2.8 Hz, 1H, H5´b), 2.76 (ddd, $^2J_{HH}$= 13.2 Hz, $^3J_{HH}$= 8.2 Hz, $^3J_{HH}$= 5.5 Hz, 1H, H2´a), 2.35 (ddd, $^2J_{HH}$= 13.0 Hz, $^3J_{HH}$= 5.4 Hz, $^3J_{HH}$= 2.5 Hz, 1H, H2´b), 0.93 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.79 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.13 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.12 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), -0.02 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), -0.04 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$): 151.3 (C6), 149.9 (C2), 149.2 (C4), 139.0 (Ca), 129.2 (Cc, Cc´), 123.4 (Cd), 120.1 (Cb, Cb´), 119.8 (C8), 116.2 (C5), 88.7 (C4´), 85.5 (C1´), 72.1 (C3´), 63.0 (C5´), 40.2 (C2´), 26.1 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 25.9 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 17.8 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$, 17.7 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$, -4.4 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), -4.6 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), -5.1 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), -5.2 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 3331, 3184, 2952, 2928, 2885, 2856, 1742, 1636, 1599, 1557, 1498, 1471, 1450, 1346, 1282, 1251, 1108, 1058, 1028, 1006, 951, 883, 831, 775, 747, 690, 668, 577, 538, 521, 498. - **MS** (ESI^+, m/z): ber.: 570.3170 [M], 571.3248 $[M+H]^+$, 593.3068 $[M+Na]^+$, 609.2807 $[M+K]^+$, gef.: 571.3254 $[M+H]^+$, 593.3066 $[M+Na]^+$, 609.2817 $[M+K]^+$.

Synthese von C8-(*N*H-3,5-Dimethylphenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin 57d



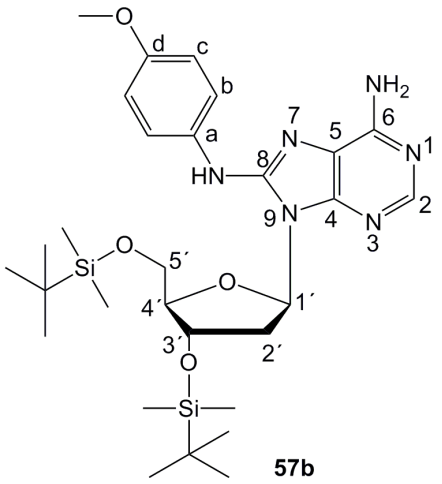
57d

Die Reaktion wurde nach **AAV 1** durchgeführt.

Es wurden 493 mg (0.54 mmol) $Pd_2(dba)_3$, 1.01 g (1.62 mmol) *rac*-BINAP, 3.00 g (5.38 mmol) 8-Brom-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **53**, 2.63 g (8.08 mmol) Cs_2CO_3 und 1.68 mL (1.63 g, 13.5 mmol) 3,5-Dimethylanilin **4** in 50 mL 1,2-DME verwendet.

Ausbeute: 2.35 g (3.93 mmol, 73 %) eines goldgelben, kristallinen Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{30}H_{50}N_6O_3Si_2$. - **DC:** R_f-Wert (PE/EE; 2:1 v/v): 0.22. - **Drehwert:** $[\alpha]^{20°C}_{589nm}$: 5 ° (c= 0.25, $CHCl_3$). - **Smp.:** 68 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.15 (s, 1H, H2), 7.90 (bs, 1H, N**H**), 7.08 (s, 2H, Hb, Hb´), 6.86 (bs, 2H, N$\mathbf{H}_2$), 8.78 (s, 1H, Hd), 6.44 (dd, $^3J_{HH}$= 5.4 Hz, $^3J_{HH}$= 8.4 Hz, 1H, H1´), 4.55 (dt, $^3J_{HH}$= 2.7 Hz, $^3J_{HH}$= 2.7 Hz, $^3J_{HH}$= 5.6 Hz, 1H, H3´), 4.09 (dd, $^3J_{HH}$= 2.9 Hz, $^3J_{HH}$= 5.7 Hz, 1H, H4´), 3.97 (dd, $^2J_{HH}$= 11.6 Hz, $^3J_{HH}$= 3.1 Hz, 1H, H5´a), 3.85 (dd, $^2J_{HH}$= 11.6 Hz, $^3J_{HH}$= 3.0 Hz, 1H, H5´b), 2.78 (ddd, $^2J_{HH}$= 13.0 Hz, $^3J_{HH}$= 8.4Hz, $^3J_{HH}$= 5.9 Hz, 1H, H2´a), 2.36 - 2.27 (m, 1H, H2´b), 2.32 (s, 6H, 2 x CH_3), 0.93 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.79 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.13 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.11 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), -0.03 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), -0.04 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$): 150.1 (C6), 149.9 (C2), 149.0 (C4), 140.0 (Cd), 139.1 (C8), 129.0 (Ca), 119.2 (Cb, Cb´), 119.0 (C5), 118.7 (Cc, Cc´), 88.4 (C4´), 85.1 (C1´), 72.2 (C3´), 62.4 (C5´), 39.8 (C2´), 26.0 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 25.9 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 21.6 (2 x $\mathbf{C}H_3$), 17.8 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$, 17.7 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$, -4.6 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), -5.7 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 3451, 3332, 3186, 2953, 2927, 2856, 1647, 1615, 1595, 1567, 1545, 1462, 1333, 1290, 1253, 1184, 1109, 1072, 1026, 1006, 971, 945, 871, 831, 775, 718, 686, 665, 574, 540, 504, 403. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 598.3483 [M], 599.3561 $[M+H]^+$, gef.: 599.3562 $[M+H]^+$.

Synthese von C8-(*N*H-4-Methoxyphenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin 57b

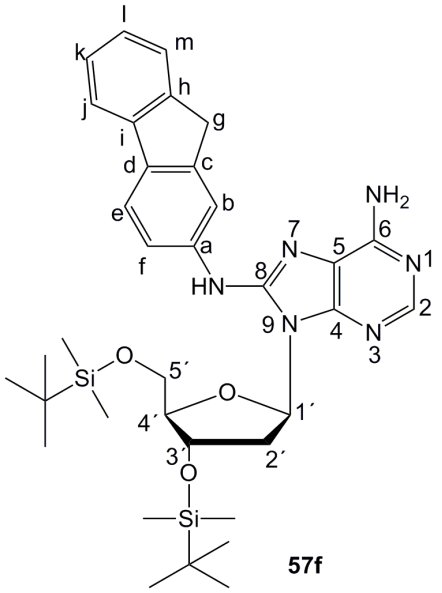


Die Reaktion wurde nach **AAV 1** durchgeführt.

Es wurden 656 mg (0.72 mmol) $Pd_2(dba)_3$, 1.34 g (2.15 mmol) *rac*-BINAP, 4.00 g (7.16 mmol) 8-Brom-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **53**, 3.50 g (10.7 mmol) Cs_2CO_3 und 2.21 g (17.9 mmol) 4-Methoxyanilin **6** in 60 mL 1,2-DME verwendet.

Ausbeute: 3.86 g (6.42 mmol, 90 %) eines goldenen, kristallinen Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{29}H_{48}N_6O_4Si_2$. - **DC:** R_f-Wert (PE/EE; 2:1 v/v): 0.07. - **Drehwert:** $[\alpha]^{22°C}_{589nm}$: 21.0 ° (c= 0.5, CH_3Cl). - **Smp.:** 87 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.15 (s, 1H, H2), 7.84 (bs, 1H, N**H**), 7.42 - 7.36 (m, 2H, Hb, Hb´), 6.93 - 6.86 (m, 2H, Hc, Hc´), 6.47 (dd, $^3J_{HH}$= 8.6 Hz, $^3J_{HH}$= 5.5 Hz, 1H, H1´), 6.45 (bs, 2H, N**H**$_2$), 4.58 - 4.52 (m, 1H, H3´), 4.08 (dd, $^3J_{HH}$= 5.3 Hz, $^3J_{HH}$= 2.7 Hz, 1H, H4´), 3.99 (dd, $^2J_{HH}$= 11.6 Hz, $^3J_{HH}$= 2.7 Hz, 1H, H5´a), 3.85 (dd, $^2J_{HH}$= 11.7 Hz, $^3J_{HH}$= 42.8 Hz, 1H, H5´b), 2.76 (ddd, $^2J_{HH}$= 13.0 Hz, $^3J_{HH}$= 8.6 Hz, $^3J_{HH}$= 6.0 Hz, 1H, H2´a), 2.30 (ddd, $^2J_{HH}$= 13.0 Hz, $^3J_{HH}$= 5.5 Hz, $^3J_{HH}$= 2.4 Hz, 1H, H2´b), 0.93 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.79 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.13 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.11 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), -0.03 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), -0.06 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$): 156.9 (Cd), 150.8 (C6), 150.0 (C2), 149.6 (C4), 131.4 (Ca), 123.8 (C5), 123.8 (Cb, Cb´), 116.8 (116.8), 114.5 (Cc, Cc´), 88.3 (C4´), 84.9 (C1´), 72.2 (C3´), 63.1 (C5´), 55.7 (O-CH_3), 39.8 (C2´), 26.1 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 25.9 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 18.8 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$, 18.2 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$, -4.4 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), -4.6 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), -5.2 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), -5.2 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 3332, 3179, 2952, 2928, 2856, 1637, 1604, 1561, 1509, 1463, 1440, 1419, 1390, 1340, 1285, 1245, 1180, 1107, 1059, 1033, 1006, 970, 951, 938, 883, 827, 775, 719, 668, 577, 536, 505, 459. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 600.3276 [M], 601.3354 $[M+H]^+$, gef.: 601.3354 $[M+H]^+$.

Synthese von C8-(*N*H-2-Fluorenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxy-adenosin 57f

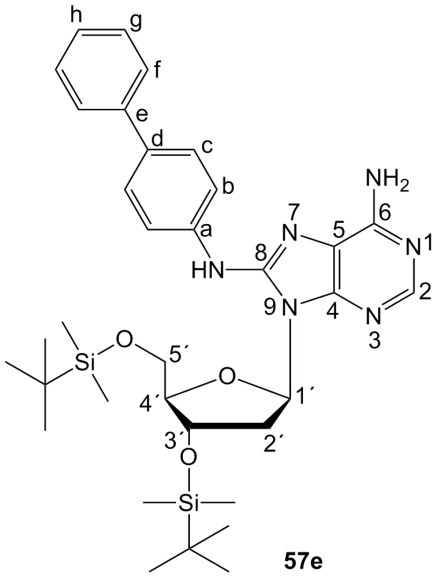


Die Reaktion wurde nach **AAV 1** durchgeführt.

Es wurden 493 mg (0.54 mmol) $Pd_2(dba)_3$, 1.01 g (1.62 mmol) *rac*-BINAP, 3.00 g (5.38 mmol) 8-Brom-3´,5´-*O*-bis*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **53**, 2.63 g (8.08 mmol) Cs_2CO_3 und 2.44 g, (13.5 mmol) 2-Aminofluoren **3** in 50 mL 1,2-DME verwendet.

Ausbeute: 3.22 g (4.90 mmol, 91 %) eines gold-gelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{35}H_{50}N_6O_3Si_2$. - **DC:** R_f-Wert (PE/EE; 2:1 v/v): 0.12. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{22°C}$: 6 ° (c= 0.5, CH_3Cl). - **Smp.:** 55 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.15 (s, 1H, H2), 8.11 (bs, 1H, N**H**), 7.74 (bs, 2H, He, Hf), 7.72 (s, 1H, Hb), 7.53 (d, $^3J_{HH}$= 7.4 Hz, 1H, Hj), 7.46 (d, $^3J_{HH}$= 7.6 Hz, 1H, Hm), 7.37 (t, $^3J_{HH}$= 7.2 Hz, $^3J_{HH}$= 7.3 Hz, 1H, Hk), 7.29 (t, $^3J_{HH}$= 7.2 Hz, $^3J_{HH}$= 7.3 Hz, 1H, Hl), 6.67 (bs, 2H, N**H**$_2$), 6.47 (dd, $^3J_{HH}$= 8.3 Hz, $^3J_{HH}$= 5.6 Hz, 1H, H1´), 4.60 - 4.54 (m, 1H, H3´), 4.14 - 4.09 (m, 1H, H4´), 4.02 (dd, $^2J_{HH}$= 11.7 Hz, $^3J_{HH}$= 2.3 Hz, 1H, H5´a), 3.90 (s, 2H, Hg), 3.92 - 3.85 (m, 1H, H5´b), 2.79 (ddd, $^2J_{HH}$= 13.3 Hz, $^3J_{HH}$= 7.9 Hz, $^3J_{HH}$= 5.8 Hz, 1H, H2´a), 2.38 - 2.29 (m, 1H, H2´b), 0.94 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.80 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.14 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.12 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), -0.00 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), -0.03 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$): 150.2 (C6), 149.5 (C2), 149.0 (C4), 144.6 (Ca), 144.2 (Cc), 141.5 (Ci), 138.1 (Ch), 137.3 (Cd), 127.0 (Ck), 126.5 (Cl), 125.8 (C8), 125.1 (Cj), 120.4 (Cm), 119.7 (Cb), 117.9 (C5), 117.8 (Ce, Cf), 88.4 (C4´), 85.2 (C1´), 72.2 (C3´), 63.1 (C5´), 40.0 (C2´), 37.2 (Cg), 26.1 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 25.9 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 18.7 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$, 18.2 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$, -4.4 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), -4.6 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), -5.1 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), -5.2 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 3345, 3167, 2953, 2927, 2855, 1636, 1599, 1557, 1492, 1458, 1430, 1404, 1356, 1332, 1289, 1253, 1180, 1108, 1059, 1026, 1006, 948, 910, 874, 831, 776, 764, 729, 668, 629, 602, 577, 539, 421, 400. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 658.3483 [M], 659.3561 $[M+H]^+$, gef.: 659.5 $[M+H]^+$.

Synthese von C8-(*N*H-4-Biphenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxy-adenosin 57e

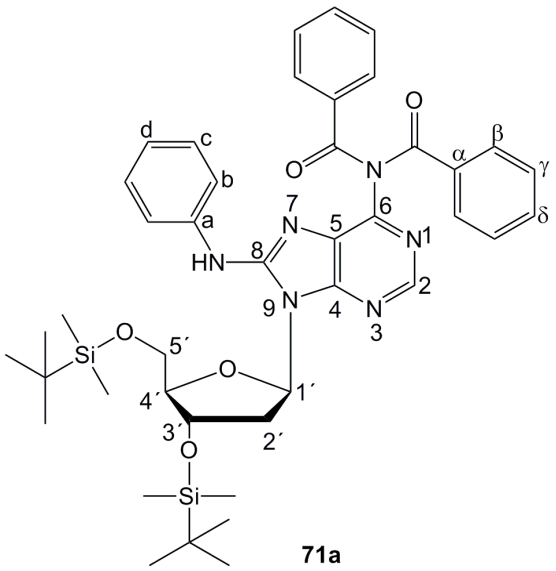


Die Reaktion wurde nach **AAV 1** durchgeführt.

Es wurden 1.01 g (1.62 mmol) *rac*-BINAP, 493 mg (0.54 mmol) $Pd_2(dba)_3$, 3.00 g (5.38 mmol) 8-Brom-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **53**, 2.63 g (8.08 mmol) Cs_2CO_3 und 2.28 g (13.5 mmol) 4-Aminobiphenyl **2** in 40 mL 1,2-DME verwendet.

Ausbeute: 2.85 g (4.41 mmol, 82 %) eines gold-braunen Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{34}H_{50}N_6O_3Si_2$. - **DC:** R_f-Wert (PE/EE; 2:1 v/v): 0.30. - **Drehwert:** $[a]^{20°C}_{589nm}$: 33.6 ° (c = 1.1, $CHCl_3$). - **Smp.:** 85 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.18 (s, 1H, H2), 8.07 (bs, 1H, N**H**), 7.65 - 7.61 (m, 2H, H Hb, Hb´), 7.61 - 7.56 (m, 4H, Hc, Hc´, Hf, Hf´), 7.47 - 7.41 (m, 2H, H Hg, Hg´), 7.36 - 7.30 (m, 1H, Hh), 6.46 (dd, $^3J_{HH}$= 8.3 Hz, $^3J_{HH}$= 5.5 Hz, 1H, H1´), 6.44 (bs, 2H, N**H**$_2$), 4.57 (dt, $^3J_{HH}$= 5.7 Hz, $^3J_{HH}$= 2.8 Hz, $^3J_{HH}$= 2.8 Hz, 1H, H3´), 4.11 (dd, $^3J_{HH}$= 5.8 Hz, $^3J_{HH}$= 2.9 Hz, 1H, H4´), 4.00 (dd, $^2J_{HH}$= 11.6 Hz, $^3J_{HH}$= 3.0 Hz, 1H, H5´a), 3.87 (dd, $^2J_{HH}$= 11.6 Hz, $^3J_{HH}$= 3.1 Hz, 1H, H5´b), 2.82 (ddd, $^2J_{HH}$= 13.1 Hz, $^3J_{HH}$= 8.1 Hz, $^3J_{HH}$= 5.9 Hz, H2´a), 2.35 (ddd, $^2J_{HH}$= 13.0 Hz, $^3J_{HH}$= 5.5 Hz, $^3J_{HH}$= 2.7 Hz, 1H, H2´b, 0.93 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.82 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.13 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.12 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.02 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.00 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$): 150.0 (C6), 149.7 (C2), 149.0 (C4), 140.7 (Ca), 138.0 (Cg), 136.7 (Cd), 129.0 (Cg, Cg´), 127.8 (Cf, Cf´), 127.0 (C5), 127.2 (Ch), 126.9 (Cc, Cc´), 120.7 (Cb, Cb´), 117.3 (C8), 88.4 (C4´), 85.3 (C1´), 72.1 (C3´), 63.0 (C5´), 40.0 (C2´), 26.1 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 25.9 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 18.7 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$, 18.2 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$, -4.4 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), -4.6 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), -5.1 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), -5.2 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 3345, 2952, 2927, 2884, 2856, 1636, 1598, 1575, 1551, 1487, 1470, 1449, 1411, 1339, 1288, 1252, 1108, 1058, 1025, 1006, 951, 876, 831, 776, 760, 717, 696, 667, 577, 548, 499. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 646.3483 [M], 647.3561 $[M+H]^+$, gef.: 647.3554 $[M+H]^+$.

Synthese von *N*^{6}-Dibenzoyl-8-(*N*H-phenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin 71a

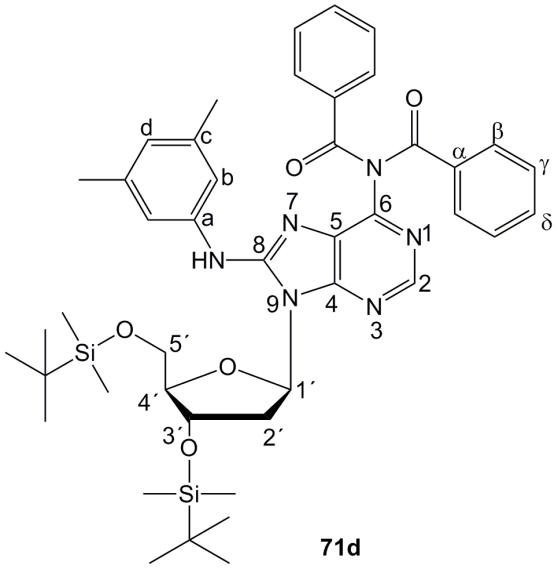


Die Reaktion wurde nach **AAV 2.1** durchgeführt.

Es wurden 2.34 g (4.09 mmol) C8-(*N*H-Phenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **57a** und 2.36 mL (2.88 g, 20.5 mmol) Benzoylchlorid in 40 mL Pyridin verwendet.

Ausbeute: 2.82 g (3.62 mmol, 85 %) eines hellgelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{42}H_{54}N_6O_5Si_2$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 19:1 v/v): 0.94. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{20°C}$: 29.2 ° (c= 0.5, $CHCl_3$). - **Smp.:** 96 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.59 (s, 1H, H2), 7.68 - 7.63 (m, 3H, N**H**, 2 * Benzoyl-H), 7.52 - 7.48 (m, 2H, Hb, Hb´), 7.48 - 7.38 (m, 3H, Benzoyl-H), 7.40 - 7.32 (m, 2H, Hc, Hc´), 7.31 - 7.26 (m, 4H, Benzoyl-H), 7.20 - 7.16 (m, 2H, Hd, Benzoyl-H), 6.16 (dd, $^3J_{HH}$= 6.2 Hz, $^3J_{HH}$= 7.9 Hz, 1H, H1´), 4.64 - 4.56 (m, 1H, H3´), 3.97 - 3.88 (m, 2H, H4´, H5´a), 3.73 (dd, $^2J_{HH}$= 9.0 Hz, $^3J_{HH}$= 3.7 Hz, 1H, H5´b), 3.15 - 3.06 (m, 1H, H2´a), 1.75 - 1.60 (m, 1H, H2´b), 0.86 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.85 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.06 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.02 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.01 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), -0.01 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$): 172.2 (2 x C=O), 152.0 (C6), 150.5 (C2), 149.0 (C4), 139.5 (Ca), 134.5 (C-α), 132.7 (**C**H-Benzoyl), 131.5 (**C**H-Benzoyl), 129.7 (Cc, Cc´), 129.4 (**C**H-Benzoyl), 128.8 (Cb, Cb´), 128.7 (**C**H-Benzoyl), 128.4 (**C**H-Benzoyl), 127.7 (Cd), 119.0 (C5), 118.7 (C8), 88.4 (C4´), 85.3 (C1´), 72.7 (C3´), 63.2 (C5´), 36.7 (C2´), 26.0 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 25.9 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 17.8 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$, 17.7 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$, -4.6 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), -5.2 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 2952, 2928, 2885, 2855, 1699, 1600, 1575, 1515, 1491, 1471, 1448, 1404, 1350, 1278, 1238, 1177, 1070, 1026, 1003, 984, 933, 909, 834, 775, 753, 715, 692, 617, 602, 579, 506. - **MS** (ESI^+, m/z): ber.: 778.3694 [M], 779.3772 $[M+H]^+$, 801.3592 $[M+Na]^+$, 817.3331 $[M+K]^+$, gef.: 779.3771 $[M+H]^+$, 801.3584 $[M+Na]^+$, 817.3311 $[M+K]^+$.

Synthese von N^6-Dibenzoyl-8-(*N*H-3,5-dimethylphenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyl-dimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin 71d

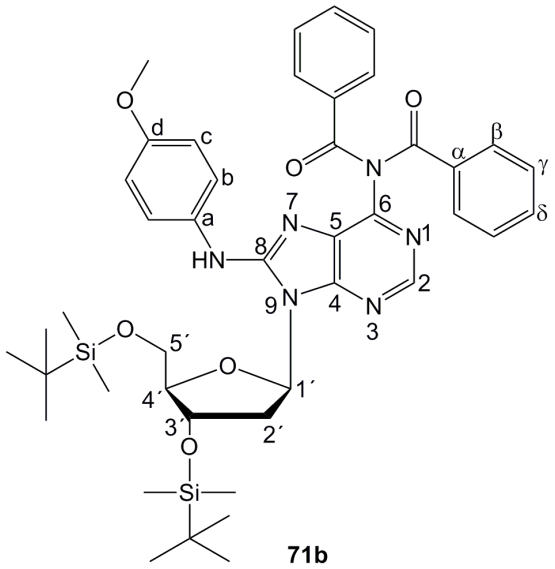


Die Reaktion wurde nach **AAV 2.1** durchgeführt.

Es wurden 2.34 g (3.91 mmol) C8-(*N*H-3,5-Dimethylphenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **57d** und 2.27 mL (2.75 g, 19.5 mmol) Benzoylchlorid in 40 mL Pyridin verwendet.

Ausbeute: 2.81 g (3.49 mmol, 89 %) eines hellgelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{44}H_{58}N_6O_5Si_2$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 19:1 v/v): 0.94. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{22°C}$:160.6 ° (c= 0.5, $CHCl_3$). - **Smp.:** 90 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.58 (s, 1H, H2), 8.12 - 8.08 (m, 1H, Benzoyl-H), 7.65 - 7.62 (m, 4H, Benzoyl-H), 7.50 - 7.36 (m, 6H, Benzoyl-H, N**H**), 6.91 (s, 1H, Hd), 6.80 (s, 2H, Hb, Hb´), 6.13 (dd, $^3J_{HH}$= 6.3 Hz, $^3J_{HH}$= 7.8 Hz, 1H, H1´), 4.65 - 4.60 (m, 1H, H3´), 3.96 - 3.90 (m, 2H, H4´, H5´a), 3.87 (dd, $^2J_{HH}$= 13.9 Hz, $^3J_{HH}$= 8.6 Hz, 1H, H5´b), 3.10 (ddd, $^2J_{HH}$= 13.2 Hz, $^3J_{HH}$= 7.6 Hz, $^3J_{HH}$= 5.6 Hz, 1H, H2´a), 2.26 (s, 6H, 2 x CH_3), 1.76 - 1.68 (m, 1H, H2´b), 0.87 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.85 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.07 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.03 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.02 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), -0.01 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$): 172.2 (2 x C=O), 152.0 (C6), 150.5 (C2), 149.0 (C4), 140.0 (C-Benzoyl), 139.4 (C8), 134.5 (C-Benzoyl), 132.7 (**C**H-Benzoyl), 131.4 (**C**H-Benzoyl), 130.3 (**C**H-Benzoyl), 129.8 (Cd), 128.7 (**C**H-Benzoyl), 128.3 (**C**H-Benzoyl), 124.2 (Cb, Cb´), 119.0 (C5), 118.7 (C8), 88.5 (C4´), 85.1 (C1´), 72.8 (C3´), 63.5 (C5´), 36.4 (C2´), 26.1 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 25.9 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 21.2 (2 x $\mathbf{C}H_3$), 17.8 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$, 17.7 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$, -4.6 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), -4.8 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 2952, 2928, 2884, 2856, 1700, 1599, 1575, 1515, 1471, 1462, 1449, 1404, 1350, 1302, 1278, 1238, 1176, 1072, 1027, 1003, 984, 936, 909, 867, 832, 798, 775, 713, 693, 635, 615, 580, 548, 513, 406. - **MS** (ESI^+, m/z): ber.: 806.4007 [M], 807.4085 $[M+H]^+$, gef.: 807.4090 $[M+H]^+$.

Synthese von *N*^{6}-Dibenzoyl-8-(*N*H-4-methoxyphenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyl-dimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin 71b

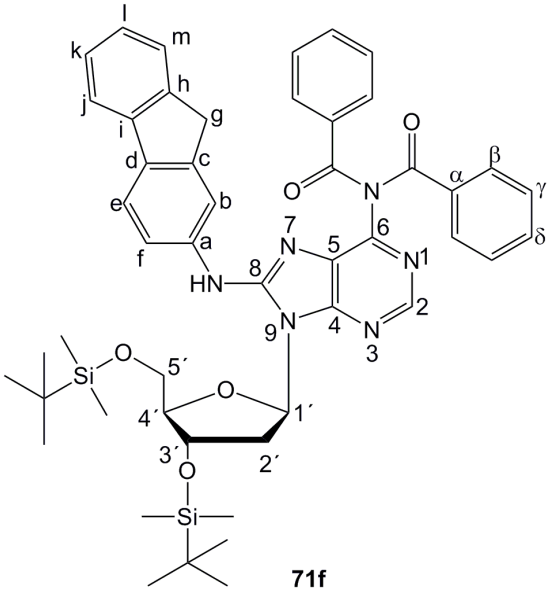


Die Reaktion wurde nach **AAV 2.1** durchgeführt.

Es wurden 3.84 g (6.38 mmol) C8-(*N*H-4-Methoxyphenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **57b** und 4.50 mL (5.47 g, 31.9 mmol) Benzoylchlorid in 60 mL Pyridin verwendet.

Ausbeute: 5.06 g (6.25 mmol, 98 %) eines hellgelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{43}H_{56}N_6O_6Si_2$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 19:1 v/v): 0.94. - **Drehwert:** $[\alpha]^{25°C}_{589nm}$: 167.8 ° (c= 0.5, $CHCl_3$). - **Smp.:** 79 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.59 (s, 1H, H2), 8.13 - 8.09 (m, 1H, Benzoyl-H), 7.69 - 7.64 (m, 4H, Benzoyl-H), 7.51 - 7.37 (m, 6H, 5 * Benzoyl-H, N**H**), 7.13 (d, 2H, $^3J_{HH}$= 8.8 Hz, Hb, Hb´), 6.84 (d, 2H, $^3J_{HH}$= 9.0 Hz, Hc, Hc´), 6.18 (dd, $^3J_{HH}$= 6.6 Hz, $^3J_{HH}$= 7.5 Hz, 1H, H1´), 4.66 - 4.58 (m, 1H, H3´), 3.98 - 3.88 (m, 2H, H4´, H5´a), 3.80 (s, 3H, O-CH_3), 3.73 (dd, $^2J_{HH}$= 9.6 Hz, $^3J_{HH}$= 4.2 Hz, 1H, H5´b), 3.18 - 3.06 (m, 1H, H2´a),1.82 - 1.62 (m, 1H, H2´b), 0.86 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.85 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.07 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.03 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.01 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), -0.01 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$): 172.2 (2 x C=O), 156.9 (Cd), 152.8 (C6), 151.5 (C2), 149.6 (C4), 134.5 (Ca), 132.7 (**C**H-Benzoyl), 130.9 (Cα), 130.3 (**C**H-Benzoyl), 129.4 (**C**H-Benzoyl), 128.7 (**C**H-Benzoyl), 128.6 (**C**H-Benzoyl), 128.3 (Cb, Cb´), 123.8 (C5), 119.0 (C5), 118.7 (C8), 114.9 (Cc, Cc´), 88.4 (C4´), 85.3 (C1´), 72.8 (C3´), 63.3 (C5´), 55.6 (O-CH_3), 36.7 (C2´), 26.1 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 25.9 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 18.3 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$, 17.6 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$, -4.4 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), -4.6 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), -5.2 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), -5.2 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 2952, 2928, 2884, 2855, 1694, 1601, 1575, 1509, 1449, 1351, 1280, 1246, 1175, 1108, 1092, 1071, 1026, 984, 934, 910, 866, 832, 775, 693, 664, 641, 606, 580, 549, 528. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 808.3800 [M], 809.3878 $[M+H]^+$, gef.: 809.1 $[M+H]^+$.

Synthese von *N*^{6}-Dibenzoyl-8-(*N*H-2-fluorenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin 71f



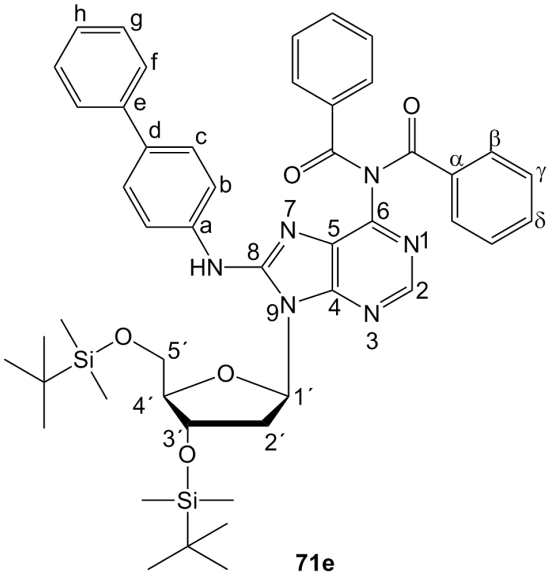
71f

Die Reaktion wurde nach **AAV 2.1** durchgeführt.

Es wurden 3.21 g (4.88 mmol) C8-(*N*H-2-Fluorenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **57f** und 2.83 mL (3.43 g, 24.4 mmol) Benzoylchlorid in 50 mL Pyridin verwendet.

Ausbeute: 3.82 g (4.40 mmol, 90 %) eines hellgelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{49}H_{58}N_6O_5Si_2$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 19:1 v/v): 0.94. - **Drehwert:** $[\alpha]^{22°C}_{589nm}$: 39.4 ° (c= 0.5, $CHCl_3$). - **Smp.:** 82 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.61 (s, 1H, H2), 8.12 - 8.08 (m, 1H, N**H**), 7.76 (d, $^3J_{HH}$= 7.4 Hz, 1H, He), 7.71 (d, $^3J_{HH}$= 8.1 Hz, 1H, Hf), 7.68 - 7.62 (m, 5H, Hb, 4 * Benzoyl-H), 7.56 - 7.51 (m, 2H, H-Aminofluoren), 7.50 - 7.45 (m, 2H, H-Benzoyl), 7.44 - 7.38 (m, 2H, H-Benzoyl), 7.38 - 7.30 (m, 3H, NH, H-Aminofluoren), 7.29 - 7.18 (m, 2H, Benzoyl-H), 6.21 (dd, $^3J_{HH}$= 6.3 Hz, $^3J_{HH}$= 7.7 Hz, 1H, H1´), 4.66 - 4.59 (m, 1H, H3´), 3.95 (s, 2H, Hg), 3.87 - 3.81 (m, 2H, H4´, H5´a), 3.79 - 3.71 (m, 1H, H5´b), 3.18 - 3.07 (m, 1H, H2´a), 1.86 - 1.65 (m, 1H, H2´b), 0.89 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.80 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.04 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.02 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.00 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), -0.02 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$): 172.1 (2 x C=O), 152.1 (C6), 151.1 (C2), 150.1 (C4), 144.6 (Ca), 143.7 (Cc), 141.5 (Ci), 137.7 (Ch), 134.4 (Cd), 133.8 (Cα), 132.7 (C**H**-arom.), 131.5 (C**H**-arom.), 130.3 (C**H**-arom.), 129.4 (C**H**-arom.), 128.9 (C**H**-arom.), 128.7 (Ck), 128.6 (Cl), 128.4 (C8), 127.4 (Cj), 127.1 (Cm), 125.2 (Cb), 120.7 (C5), 120.3 (Ce, Cf), 88.4 (C4´), 85.3 (C1´), 72.7 (C3´), 63.2 (C5´), 37.1 (C2´), 36.7 (Cg), 26.1 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 25.8 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 17.8 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$, 17.7 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$, 4.0 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), 3.9 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 3059, 2953, 2928, 2884, 2855, 1789, 1757, 1699, 1600, 1575, 1514, 1488, 1470, 1449, 1402, 1350, 1278, 1236, 1176, 1149, 1073, 1023, 987, 935, 909, 832, 774, 731, 694, 670, 611, 578, 546, 511, 423, 415. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 866.4007 [M], 867.4085 $[M+H]^+$, gef.: 867.2 $[M+H]^+$.

Synthese von *N*^{6}-Dibenzoyl-8-(*N*H-4-biphenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin 71e

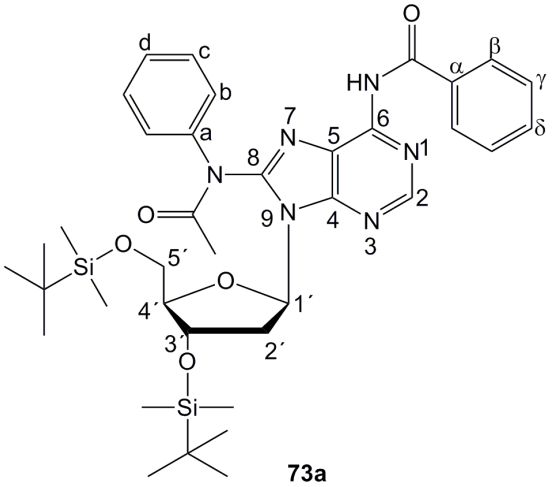


Die Reaktion wurde nach **AAV 2.1** durchgeführt.

Es wurden 2.84 g (4.39 mmol) C8-(*N*H-4-Biphenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **57e** und 2.55 mL (3.09 g, 21.9 mmol) Benzoylchlorid in 40 mL Pyridin verwendet.

Ausbeute: 3.40 g (3.98 mmol, 91 %) eines hellgelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{48}H_{58}N_6O_5Si_2$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 19:1 v/v): 0.87. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{25°C}$: 172.2 ° (c= 0.5, $CHCl_3$). - **Smp.:** 122 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.60 (s, 1H, H2), 7.59 - 7.50 (m, 6H, Hb, Hb´, Hc, Hc´, Hf, Hf´), 7.49 - 7.41 (m, 5H, Hg, Hg´, 3 x Benzoyl-H), 7.39 - 7.34 (m, 1H, Hh), 7.32 - 7.21 (m, 8H, 7 x Benzoyl-H, N**H**), 6.19 (dd, $^3J_{HH}$= 6.7 Hz, $^3J_{HH}$= 7.5 Hz, 1H, H1´), 4.68 - 4.58 (m, 1H, H3´), 3.99 - 3.87 (m, 2H, H4´, H5´a), 3.74 (dd, $^2J_{HH}$= 9.4 Hz, $^3J_{HH}$= 4.0 Hz, 1H, H5´b), 3.19 - 3.08 (m, 1H, H2´a), 1.80 - 1.64 (m, 1H, H2´b), 0.86 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.83 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.07 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.06 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.01 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), -0.01 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$): 172.2 (2 x C=O), 152.6 (C6), 151.8 (C2), 150.3 (C4), 140.6 (Ca), 140.1 (C-α), 139.4 (C8), 134.5 (Cd, Ce), 132.8 (**C**H-Benzoyl), 131.6 (Cb, Cb´), 129.8 (Cd), 129.0 (**C**H-Benzoyl), 128.8 (**C**H-Benzoyl), 128.7 (**C**H-Aminobiphenyl), 128.4 (**C**H-Benzoyl), 128.3 (**C**H-Benzoyl), 127.9 (Cc, Cc´), 127.2 (**C**H-Aminobiphenyl), 119.0 (C5), 88.4 (C4´), 85.3 (C1´), 72.7 (C3´), 63.2 (C5´), 36.7 (C2´), 26.1 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 25.9 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 17.8 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$, 17.7 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$, -4.6 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), -5.2 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 2952, 2927, 2855, 1700, 1600, 1575, 1517, 1486, 1471, 1448, 1348, 1278, 1248, 1178, 1072, 1026, 1007, 984, 932, 910, 832, 775, 763, 720, 693, 667, 642, 604, 568, 553, 503, 411. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 854.4007 [M], 855.4085 $[M+H]^+$, gef.: 856.2 $[M+2H]^+$.

Synthese von *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-phenyl-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethyl-silyl)-2´-desoxyadenosin 73a



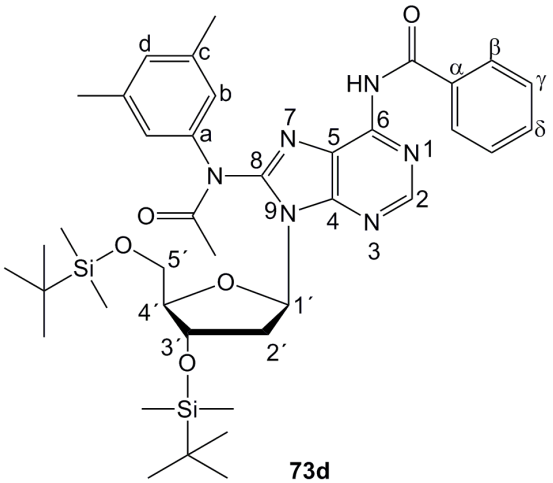
73a

Die Reaktion wurde nach **AAV 3** durchgeführt.

Es wurden 0.71 g (0.92 mmol) *N*^{6}-Dibenzoyl-8-(*N*H-Phenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*-butyldimethylsilyl)-2´-dA **71a**, 1.31 g (10.7 mmol) 4-DMAP und 1.18 mL (1.10 g, 10.7 mmol) Essigsäureanhydrid in 40 mL Pyridin verwendet.

Ausbeute: 633 mg (0.88 mmol, 81 %) eines hellgelben, kristallinen Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{37}H_{52}N_6O_5Si_2$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 50:1 v/v): 0.91. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{25°C}$: 12.8 ° (c= 0.5, $CHCl_3$). - **Smp.:** 87 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.63 (s, 1H, H2), 7.60 - 7.55 (m, 2H, Hβ, Hβ´), 7.49 - 7.44 (m, 1H, Hδ), 7.43 - 7.37 (m, 1H, Hd), 7.35 - 7.30 (m, 2H, Hγ, Hγ´), 7.30 - 7.23 (m, 4H, Hb, Hb´, Hc, Hc´), 6.23 (t, $^3J_{HH}$= 6.9 Hz, 1H, H1´), 4.76 - 4.68 (m, 1H, H3´), 4.01 - 3.93 (m, 2H, H4´, H5´a), 3.72 (dd, $^2J_{HH}$= 14.2 Hz, $^3J_{HH}$= 8.5 Hz, 1H, H5´b), 3.42 - 3.28 (m, 1H, H2´a), 2.53 (s, 3H, C(O)C**H**$_3$), 1.97 - 1.81 (m, 1H, H2´b), 0.84 (s, 9H, Si(CH$_3$)$_2$C(C**H**$_3$)$_3$), 0.83 (s, 9H, Si(CH$_3$)$_2$C(C**H**$_3$)$_3$), 0.09 (s, 3H, Si(C**H**$_3$)$_2$C(CH$_3$)$_3$), 0.04 (s, 3H, Si(C**H**$_3$)$_2$C(CH$_3$)$_3$), 0.02 (s, 3H, Si(C**H**$_3$)$_2$C(CH$_3$)$_3$), 0.01 (s, 3H, Si(C**H**$_3$)$_2$C(CH$_3$)$_3$). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$): 172.2 (C=O), 168.7 (C=O), 152.0 (C6), 150.5 (C2), 149.0 (C4), 139.5 (Ca), 134.5 (C-α), 132.7 (**C**H-Benzoyl), 131.5 (**C**H-Benzoyl), 129.7 (Cc, Cc´), 129.4 (**C**H-Benzoyl), 128.8 (Cb, Cb´), 128.7 (**C**H-Benzoyl), 128.4 (**C**H-Benzoyl), 127.7 (Cd), 119.0 (C5), 118.7 (C8), 88.4 (C4´), 85.3 (C1´), 72.7 (C3´), 63.2 (C5´), 36.7 (C2´), 26.0 (Si(CH$_3$)$_2$C(**C**H$_3$)$_3$), 25.9 (Si(CH$_3$)$_2$C(**C**H$_3$)$_3$), 24.3 (Ac-CH$_3$), 17.8 (Si(CH$_3$)$_2$**C**(CH$_3$)$_3$, 17.7 (Si(CH$_3$)$_2$**C**(CH$_3$)$_3$, -4.6 (Si(**C**H$_3$)$_2$C(CH$_3$)$_3$), -5.2 (Si(**C**H$_3$)$_2$C(CH$_3$)$_3$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 2952, 2928, 2885, 2856, 1682, 1609, 1582, 1524, 1493, 1471, 1462, 1406, 1354, 1279, 1250, 1176, 1009, 1066, 1029, 1004, 948, 833, 775, 752, 712, 693, 669, 617, 597, 573, 548, 504. - **MS** (ESI$^+$, m/z): ber.: 716.3538 [M], 717.3616 [M+H]$^+$, gef.: 717.3611 [M+H]$^+$.

Synthese von *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-3,5-dimethylphenyl-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyl-dimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin 73d

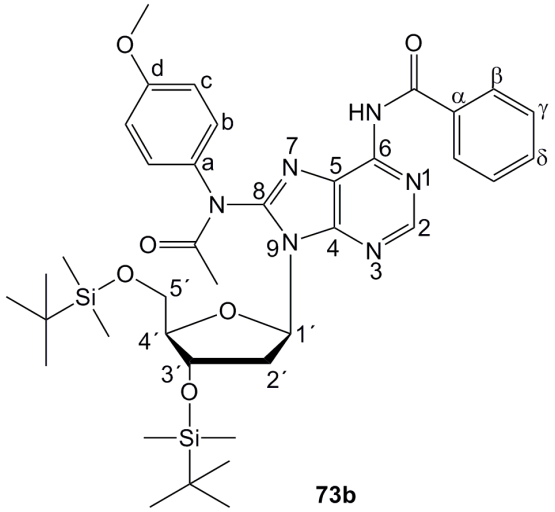


Die Reaktion wurde nach **AAV 3** durchgeführt.

Es wurden 2.79 g (3.46 mmol) *N*^{6}-Dibenzoyl-8-(*N*H-3,5-dimethylphenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **71d**, 1.27 g (10.4 mmol) 4-DMAP und 0.98 mL (1.06 g, 10.4 mmol) Essigsäureanhydrid in 40 mL Pyridin verwendet.

Ausbeute: 1.10 g (1.48 mmol, 43 %) eines hellgelben, kristallinen Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{39}H_{56}N_6O_5Si_2$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 50:1 v/v): 0.86. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{25°C}$: 269.6 ° (c= 0.5, $CHCl_3$). - **Smp.:** 82 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6): 10.68 (s, 1H, N**H**-Benzoyl), 8.61 (s, 1H, H2), 7.64 - 7.59 (m, 1H, Hδ), 7.49 - 7.44 (m, 2H, Hβ, Hβ´), 7.36 - 7.32 (m, 2H, Hγ, Hγ´), 6.93 (s, 1H, Hd), 6.88 (s, 2H, Hb, Hb´), 6.21 (t, $^3J_{HH}$= 6.5 Hz, 1H, H1´), 4.90 - 4.56 (m, 1H, H3´), 3.95 - 3.83 (m, 2H, H4´, H5´a), 3.74 - 3.68 (m, 1H, H5´b), 3.22 - 3.03 (m, 1H, H2´a), 2.19 (s, 6H, 2 x CH_3), 2.16 (s, 3H, C(O)C**H**$_3$), 1.97 - 1.81 (m, 1H, H2´b), 0.82 (s, 9H, Si(CH$_3$)$_2$C(C**H**$_3$)$_3$), 0.80 (s, 9H, Si(CH$_3$)$_2$C(C**H**$_3$)$_3$), 0.07 (s, 3H, Si(C**H**$_3$)$_2$C(CH$_3$)$_3$), 0.05 (s, 3H, Si(C**H**$_3$)$_2$C(CH$_3$)$_3$), 0.03 (s, 3H, Si(C**H**$_3$)$_2$C(CH$_3$)$_3$), 0.01 (s, 3H, Si(C**H**$_3$)$_2$C(CH$_3$)$_3$).- **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$): 172.2 (C=O), 168.7 (C=O), 150.8 (C6), 150.1 (C2), 149.4 (C4), 140.3 (Ca), 138.7 (C-α), 131.6 (**C**H-Benzoyl), 131.5 (**C**H-Benzoyl), 128.9 (Cb, Cb´), 128.5 (**C**H-Benzoyl), 128.4 (**C**H-Benzoyl), 128.2 (**C**H-Benzoyl), 127.7 (Cd), 119.0 (C5), 118.7 (C8), 88.4 (C4´), 84.9 (C1´), 70.9 (C3´), 61.9 (C5´), 38.9 (C2´), 26.0 (Si(CH$_3$)$_2$C(**C**H$_3$)$_3$), 25.9 (Si(CH$_3$)$_2$C(**C**H$_3$)$_3$), 24.3 (Ac-CH$_3$), 20.6 (2 x CH$_3$), 17.8 (Si(CH$_3$)$_2$**C**(CH$_3$)$_3$, 17.7 (Si(CH$_3$)$_2$**C**(CH$_3$)$_3$, -4.6 (Si(**C**H$_3$)$_2$C(CH$_3$)$_3$), -5.2 (Si(**C**H$_3$)$_2$C(CH$_3$)$_3$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 2952, 2928, 2855, 1691, 1609, 1583, 1525, 1462, 1407, 1353, 1281, 1251, 1176, 1110, 1066, 1029, 1005, 939, 834, 775, 710, 669, 611, 571, 543. - **MS** (ESI$^+$, m/z): ber.: 744.3851 [M], 745.3929 [M+H]$^+$, gef.: 745.3926 [M+H]$^+$.

Synthese von *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-4-methoxyphenyl-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyl-dimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin 73b



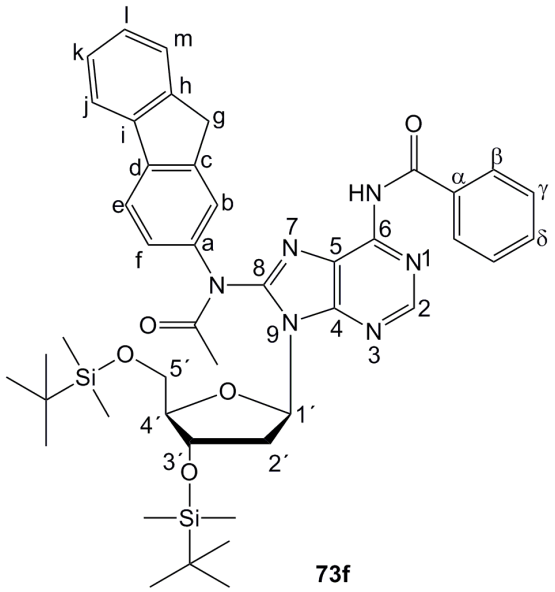
Die Reaktion wurde nach **AAV 3** durchgeführt.

Es wurden 1.01 g (1.17 mmol) *N*^{6}-Dibenzoyl-8-(*N*H-4-methoxyphenyl)-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **71b**, 429 mg (3.51 mmol) 4-DMAP und 0.33 mL (358 mg, 3.51 mmol) Essigsäureanhydrid in 25 mL Pyridin verwendet.

Ausbeute: 1.03 g (1.29 mmol, 81 %) eines hellgelben, kristallinen Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{38}H_{54}N_6O_6Si_2$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 50:1 v/v): 0.91. - **Drehwert:** $[\alpha]^{25°C}_{589nm}$: 34.4 ° (c= 0.5, $CHCl_3$). - **Smp.:** 95 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.63 (s, 1H, H2), 7.54 (d, $^3J_{HH}$= 6.7 Hz, 2H, Hβ, Hβ´), 7.45 (t, $^3J_{HH}$= 7.4 Hz, 1H, Hδ), 7.36 (t, $^3J_{HH}$= 7.6 Hz, 2H, Hγ, Hγ´), 7.25 (d, $^3J_{HH}$= 8.8 Hz, 2H, Hb, Hb´), 6.94 (d, $^3J_{HH}$= 8.4 Hz, 2H, Hc, Hc´), 6.33 (dd, $^3J_{HH}$= 7.0 Hz, $^3J_{HH}$= 6.9 Hz, 1H, H1´), 4.55 - 4.46 (m, 1H, H3´), 3.92 (dd, $^3J_{HH}$= 7.7 Hz, $^3J_{HH}$= 4.7 Hz, 1H, H4´), 3.73 (s, 3H, O-CH_3), 3.74 - 3.69 (m, 1H, H5´a), 3.57 (ddd, $^2J_{HH}$= 11.7 Hz, $^3J_{HH}$= 5.9 Hz, $^3J_{HH}$= 4.8 Hz, 1H, H5´b), 3.06 - 2.93 (m, 1H, H2´a), 2.20 (s, 3H, Ac-C**H**$_3$), 2.02 - 1.91 (m, 1H, H2´b), 0.87 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.85 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.07 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.03 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.02 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), -0.01 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$): 172.1 (C=O), 168.6 (C=O), 151.4 (C6), 150.7 (C2), 149.3 (C4), 147.5 (Ca), 139.4 (C8), 134.5 (Cα), 133.8 (**C**H-Benzoyl), 133.5 (**C**H-Benzoyl), 133.0 (**C**H-Benzoyl), 131.3 (Cd), 128.3 (**C**H-Benzoyl), 128.1 (**C**H-Benzoyl), 127.8 (Cb, Cb´), 121.7 (C5), 114.6 (C8), 88.3 (C4´), 84.8 (C1´), 70.8 (C3´), 61.8 (C5´), 55.2 (O-CH_3), 37.1 (C2´), 26.1 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 25.9 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 24.1 (Ac-**C**$H_3$), 17.8 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$, 17.7 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$, -4.6 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$), -4.8 ($Si(\mathbf{C}H_3)_2C(CH_3)_3$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 2953, 2929, 2885, 2856, 2165, 2054, 2037, 2018, 1983, 1951, 1747, 1679, 1610, 1583, 1528, 1509, 1462, 1408, 1374, 1356, 1319, 1283, 1246, 1182, 1108, 1065, 1031, 1000, 950, 891, 831, 803, 774, 719, 692,

661, 608, 580, 550, 526. - **MS** (ESI$^+$, m/z): ber.: 746.3634 [M], 747.3722 [M+H]$^+$, gef.: 747.3713 [M+H]$^+$.

Synthese von *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-2-fluorenyl-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethyl-silyl)-2´-desoxyadenosin 73f



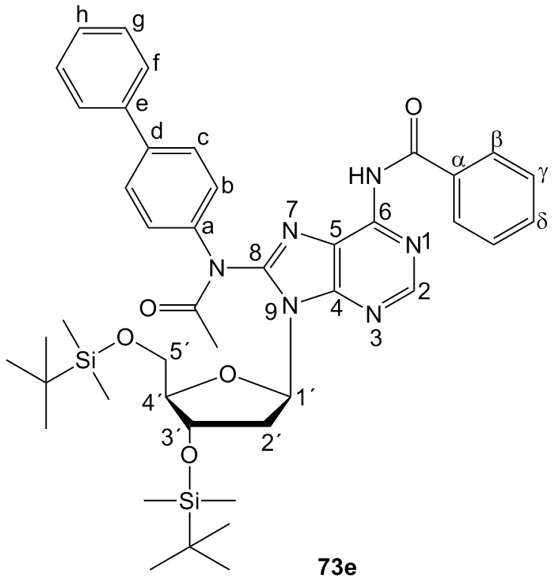
Die Reaktion wurde nach **AAV 3** durchgeführt.

Es wurden 3.80 g (4.38 mmol) *N*^{6}-Dibenzoyl-8-(*N*H-2-fluorenyl)-3´,5´-*O*-bis (*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **71f**, 1.61 g (13.1 mmol) 4-DMAP und 1.21 mL (1.32 g, 13.1 mmol) Essigsäureanhydrid in 90 mL Pyridin verwendet.

Ausbeute: 1.69 g (2.10 mmol, 48 %) eines hellgelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{44}H_{56}N_6O_5Si_2$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 50:1 v/v): 0.94. - **Drehwert:** $[\alpha]^{25°C}_{589nm}$: 179 °(c= 0.5, $CHCl_3$). - **Smp.:** 60 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.64 (s, 1H, H2), 8.09 - 8.05 (m, 1H, H-arom.), 7.73 (t, 2H, $^3J_{HH}$= 8.4 Hz, H-arom.), 7.64 - 7.56 (m, 2H, H-arom.), 7.52 (d, 1H, $^3J_{HH}$= 7.3 Hz, H-arom.), 7.48 - 7.42 (m, 2H, H-arom.), 7.42 - 7.34 (m, 2H, H-arom.), 7.34 - 7.24 (m, 2H, H-arom.), 6.29 (t, $^3J_{HH}$= 6.9 Hz, 1H, H1´), 4.78 - 4.68 (m, 1H, H3´), 4.03 - 3.96 (m, 2H, H4´, H5´a), 3.94 - 3.80 (m, 2H, Hg), 3.79 - 3.72 (m, 1H, H5´b), 3.43 - 3.29 (m, 1H, H2´a), 2.52 (s, 3H, C(O)C**H**$_3$), 2.07 - 1.84 (m, 1H, H2´b), 0.86 (s, 9H, Si(CH$_3$)$_2$C(C**H**$_3$)$_3$), 0.80 (s, 9H, Si(CH$_3$)$_2$C(C**H**$_3$)$_3$), 0.07 (s, 3H, Si(C**H**$_3$)$_2$C(CH$_3$)$_3$), 0.04 (s, 3H, Si(C**H**$_3$)$_2$C(CH$_3$)$_3$), 0.02 (s, 3H, Si(C**H**$_3$)$_2$C(CH$_3$)$_3$), -0.01 (s, 3H, Si(C**H**$_3$)$_2$C(CH$_3$)$_3$). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$): 172.2 (C=O), 168.6 (C=O), 151.5 (C6), 150.5 (C2), 149.3 (C4), 144.6 (Ca), 144.1 (Cc), 143.2 (Ci), 137.7 (Ch), 134.4 (Cd), 133.8 (Cα), 132.7 (C**H**-arom.), 131.4 (C**H**-arom.), 130.3 (C**H**-arom.), 129.4 (C**H**-arom.), 128.9 (C**H**-arom.), 128.7 (Ck), 128.6 (Cl), 128.4 (C8), 128.3 (Cj), 128.2 (Cm), 126.7 (Cb), 120.4 (Ce, Cf), 120.1 (C5), 88.3 (C4´), 84.9 (C1´), 70.8 (C3´), 61.8 (C5´), 39.0 (C2´), 36.3 (Cg), 24.1 (Ac-**C**H$_3$), 26.1 (Si(CH$_3$)$_2$C(**C**H$_3$)$_3$), 25.9 (Si(CH$_3$)$_2$C(**C**H$_3$)$_3$), 21.2 (2 x **C**H$_3$), 17.8 (Si(CH$_3$)$_2$**C**(CH$_3$)$_3$, 17.7 (Si(CH$_3$)$_2$**C**(CH$_3$)$_3$, -4.6 (Si(**C**H$_3$)$_2$C(CH$_3$)$_3$), -4.8 (Si(**C**H$_3$)$_2$C(CH$_3$)$_3$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 2953, 2928,

2884, 2855, 1789, 1757, 1699, 1600, 1575, 1514, 1488, 1470, 1449, 1402, 1350, 1278, 1236, 1176, 1149, 1073, 1023, 987, 935, 909, 832, 774, 731, 694, 670, 611, 578, 546, 511, 423, 415. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 804.3851 [M], 805.3929 $[M+H]^+$, gef.: 805.3924 $[M+H]^+$.

Synthese von *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-4-biphenyl-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-desoxyadenosin 73e



73e

Die Reaktion wurde nach **AAV 3** durchgeführt.

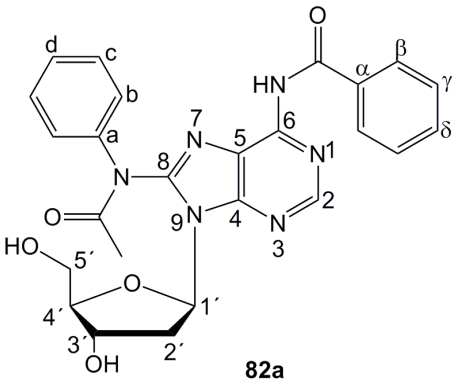
Es wurden 1.63 g (1.91 mmol) *N*^{6}-Dibenzoyl-8-(*N*H-4-biphenyl)-3´,5´-*O*-bis (*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **71e**, 701 mg (5.74 mmol) 4-DMAP und 0.53 mL (575 mg, 5.74 mmol) Essigsäureanhydrid in 40 mL Pyridin verwendet.

Ausbeute: 1.22 g (1.53 mmol, 80 %) eines hellgelben, kristallinen Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{43}H_{56}N_6O_5Si_2$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 50:1 v/v): 0.89. - **Drehwert:** $[\alpha]^{25°C}_{589nm}$: 164.4 ° (c= 0.5, $CHCl_3$). - **Smp.:** 65 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.66 (s, 1H, H2), 7.71 (d, $^3J_{HH}$= 6.6 Hz, 1H, H-arom.), 7.66 (d, $^3J_{HH}$= 7.3 Hz, 2H, H-arom.), 7.61 (d, $^3J_{HH}$= 7.3 Hz, 2H, H-arom.), 7.49 - 7.42 (m, 3H, H-arom.), 7.40 - 7.34 (m, 5H, H-arom.), 6.27 (t, $^3J_{HH}$= 7.0 Hz, 1H, H1´), 4.78 - 4.67 (m, 1H, H3´), 4.21 - 3.92 (m, 2H, H4´, H5´a), 3.78 - 3.69 (m, 1H, H5´b), 3.43 - 3.29 (m, 1H, H2´a), 2.53 (s, 3H, Ac-CH_3), 1.96 - 1.88 (m, 1H, H2´b), 0.85 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.84 (s, 9H, $Si(CH_3)_2C(C\mathbf{H}_3)_3$), 0.09 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.07 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.03 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$), 0.02 (s, 3H, $Si(C\mathbf{H}_3)_2C(CH_3)_3$). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$): 172.2 (C=O), 168.6 (C=O), 151.6 (C6), 149.4 (C2), 149.1 (C4), 138.9 (**C**-arom.), 138.6 (**C**-arom.), 131.7 (**C**-arom.), 131.5 (**C**-arom.), 131.4 (C**H**-arom.), 128.8 (C**H**-arom.), 128.3 (C**H**-arom.), 128.2 (C**H**-arom.), 127.6 (C**H**-arom.), 127.4 (C**H**-arom.), 126.5 (C**H**-arom.), 126.4 (C**H**-arom.), 119.0 (C5), 118.7 (C8), 88.3 (C4´), 84.9 (C1´), 70.8 (C3´), 61.8 (C5´), 39.0 (C2´), 26.1 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 25.9 ($Si(CH_3)_2C(\mathbf{C}H_3)_3$), 24.1 (Ac-$\mathbf{C}H_3$), 17.8 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$, 17.7 ($Si(CH_3)_2\mathbf{C}(CH_3)_3$,

-4.6 (Si(**C**H_3)$_2$C(CH_3)$_3$), -4.8 (Si(**C**H_3)$_2$C(CH_3)$_3$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 3033, 2952, 2928, 2884, 2856, 1687, 1612, 1583, 1520, 1486, 1462, 1450, 1434, 1408, 1356, 1317, 1277, 1175, 1109, 1067, 1027, 1006, 949, 833, 776, 762, 710, 695, 666, 555, 505. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 792.3851 [M], 793.3929 $[M+H]^+$, gef.: 93.3921 $[M+H]^+$.

Synthese von *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-phenyl-2´-desoxyadenosin 82a

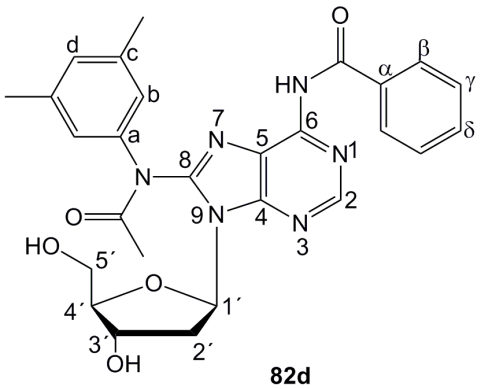
Die Reaktion wurde nach **AAV 4.2** durchgeführt.
Es wurden 0.47 g (0.67 mmol) *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-phenyl-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **73a**, 0.57 mL (0.52 g, 1.98 mmol) TBAF in THF und 0.23 mL (0.24 g, 3.96 mmol) Essigsäure in 20 mL THF verwendet.



82a

Ausbeute: 270 mg (0.55 mmol, 83 %) eines hellgelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{25}H_{24}N_6O_5$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 9:1 v/v): 0.58. - **Drehwert:** $[\alpha]^{20°C}_{589nm}$: 23.6 ° (c= 0.5, $CHCl_3/CH_3OH$; 1:1 v/v). - **Smp.:** 143 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6, 323K): 10.51 (s, 1H, N**H**-Benzoyl), 8.63 (s, 1H, H2), 7.56 (d, $^3J_{HH}$= 7.5 Hz, 2H, Hβ, Hβ´), 7.48 - 7.44 (m, 1H, Hδ), 7.40 (t, $^3J_{HH}$= 7.8 Hz, 2H, Hγ, Hγ´), 7.38 - 7.34 (m, 2H, H b, Hb´), 7.33 - 7.27 (m, 3H, Hc, Hc´, Hd), 6.31 (t, $^3J_{HH}$= 7.0 Hz, 1H, H1´), 5.18 (d, $^3J_{HH}$= 3.7 Hz, 1H, 3´-OH), 4.94 - 4.85 (m, 1H, 5´-OH), 4.52 - 4.45 (m, 1H, H3´), 3.91 (dd, $^3J_{HH}$= 7.8 Hz, $^3J_{HH}$= 4.9 Hz, 1H, H4´), 3.71 (ddd, $^2J_{HH}$= 11.6 Hz, $^3J_{HH}$= 6.1 Hz, $^3J_{HH}$= 4.7 Hz, 1H, H5´a), 3.56 (ddd, $^2J_{HH}$= 12.0 Hz, $^3J_{HH}$= 6.1 Hz, $^3J_{HH}$= 5.8 Hz, 1H, H5´a), 3.05 - 2.90 (m, 1H, H2´a), 2.20 (s, 3H, C(O)C**H**$_3$), 2.00 - 1.86 (m, 1H, H2´b). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 168.7 (C=O), 167.3 (C=O), 151.3 (C6), 150.8 (C2), 150.6 (C4), 139.5 (Ca), 135.4 (C-α), 131.9 (**C**H-Benzoyl), 129.5 (**C**H-Benzoyl), 128.6 (Cc, Cc´), 128.4 (**C**H-Benzoyl), 127.4 (Cb, Cb´), 126.7 (**C**H-Benzoyl), 126.4 (**C**H-Benzoyl), 125.7 (Cd), 119.0 (C5), 118.7 (C8), 88.4 (C4´), 84.9 (C1´), 70.9 (C3´), 61.9 (C5´), 38.9 (C2´), 24.3 (Ac-CH_3). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 3247, 2919, 1674, 1609, 1583, 1526, 1493, 1456, 1352, 1274, 1176, 1096, 1053, 1028, 986, 943, 907, 880, 855, 782, 753, 728, 693, 677, 647, 616, 597, 569, 548, 504, 462, 416, 390. - **UV** ($CHCl_3/CH_3OH$; 1:1 v/v): λ_{max} [nm]:240.4806, 286.5065. - **MS** (ESI^+, m/z): ber.: 488.1808 [M], 489.1886 $[M+H]^+$, gef.: 489.1877 $[M+H]^+$.

Synthese von N^6-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-3,5-dimethylphenyl-2´-desoxyadenosin 82d



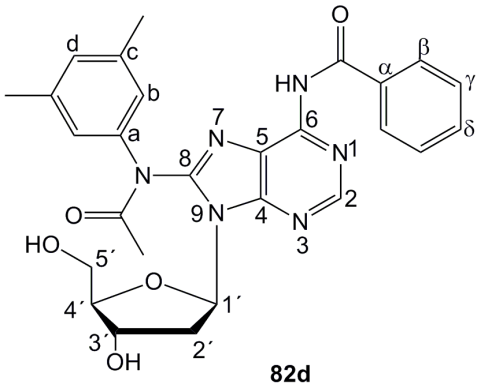
82d

Die Reaktion wurde nach **AAV 4** durchgeführt.
Es wurden 1.09 g (1.46 mmol) N^6-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-3,5-dimethylphenyl-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **73d**, 2.03 mL (1.48 g, 14.6 mmol) Triethylamin und 2.97 mL (2.94 g, 18.2 mmol) Triethylamin-Trihydrofluorid in 36 mL THF/DCM (1:1 v/v) verwendet.

Ausbeute: 0.68 g (1.31 mmol, 90 %) eines hellgelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{27}H_{28}N_6O_5$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 9:1 v/v): 0.49. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{20°C}$: 220.6 ° (c= 0.5, $CHCl_3/CH_3OH$; 1:1 v/v). - **Smp.:** 144.4 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6, 323K): 10.48 (s, N**H**-Benzoyl), 8.63 (s, 1H, H2), 7.56 (d, $^3J_{HH}$= 7.6 Hz, 2H, Hβ, Hβ´), 7.45 (t, $^3J_{HH}$= 7.4 Hz, 1H, Hδ), 7.36 (t, $^3J_{HH}$= 7.7 Hz, 2H, Hγ, Hγ´), 6.94 (s, 1H, Hd), 6.91 (s, 2H, Hb, Hb´), 6.29 (t, $^3J_{HH}$= 7.0 Hz, 1H, H1´), 5.18 (d, $^3J_{HH}$= 4.4 Hz, 1H, 3´-OH), 4.99 - 4.89 (m, 1H, 5´-OH), 4.53 - 4.44 (m, 1H, H3´), 3.92 (dd, $^3J_{HH}$= 7.8 Hz, $^3J_{HH}$= 4.8 Hz, 1H, H4´), 3.72 (ddd, $^2J_{HH}$= 11.7 Hz, $^3J_{HH}$= 4.7 Hz, $^3J_{HH}$= 4.7 Hz, 1H, H5´a), 3.57 (ddd, $^2J_{HH}$= 11.9 Hz, $^3J_{HH}$= 7.0 Hz, $^3J_{HH}$= 5.1 Hz, 1H, H5´b), 3.04 - 2.94 (m, 1H, H2´a), 2.21 (s, 6H, 2 x CH_3), 2.20 (Ac-C**H**$_3$), 1.99 - 1.84 (m, 1H, H2´b). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 172.2 (C=O), 168.7 (C=O), 150.8 (C6), 150.1 (C2), 149.4 (C4), 140.3 (Ca), 138.7 (C-α), 131.6 (**C**H-Benzoyl), 131.5 (**C**H-Benzoyl), 128.9 (Cb, Cb´), 128.5 (**C**H-Benzoyl), 128.4 (**C**H-Benzoyl), 128.2 (**C**H-Benzoyl), 127.7 (Cd), 119.0 (C5), 118.7 (C8), 88.4 (C4´), 84.9 (C1´), 70.9 (C3´), 61.9 (C5´), 38.9 (C2´), 24.3 (Ac-CH_3), 20.6 (2 x CH_3). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 3302, 3248, 3101, 2919, 2864, 2363, 2339, 1681, 1609, 1583, 1526, 1498, 1463, 1447, 1350, 1302, 1283, 1263, 1178, 1099, 1082, 1058, 1037, 986, 961, 936, 904, 852, 825, 797, 777, 739, 705, 684, 651, 631, 612, 575, 537, 515, 491, 479, 467, 450, 432, 415, 404, 390. - **UV** ($CHCl_3/CH_3OH$; 1:1 v/v): λ_{max} [nm]: 229.9445, 284.0429. - **MS** (ESI^+, m/z): ber.: 516.2121 [M], 517.2199 $[M+H]^+$, gef.: 517.2193 $[M+H]^+$.

Synthese von *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-3,5-dimethylphenyl-2´-desoxyadenosin 82d

Die Reaktion wurde nach **AAV 4.2** durchgeführt. Es wurden 0.69 g (0.93 mmol) *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-3,5-dimethylphenyl-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **73d**, 0.32 mL (5.60 mmol) Essigsäure und 0.80 mL (2.80 mmol) TBAF in 15 mL THF verwendet.

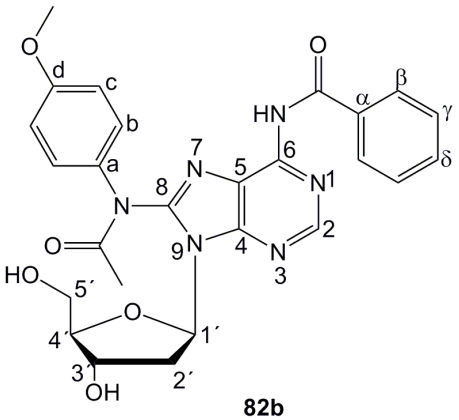


82d

Ausbeute: 0.37 g (0.71 mmol, 76 %) eines hellgelben Feststoffs. - **Charakterisierung:** Seite 256.

Synthese von *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-4-methoxyphenyl-2´-desoxyadenosin 82b

Die Reaktion wurde nach **AAV 4** durchgeführt. Es wurden 1.02 g (1.37 mmol) *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-4-methoxyphenyl-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **73b**, 1.90 mL (1.38 g, 13.7 mmol) Triethylamin und 2.78 mL (2.75 g, 17.1 mmol) Triethylamin-Trihydrofluorid in 32 mL THF/DCM (1:1 v/v) verwendet.



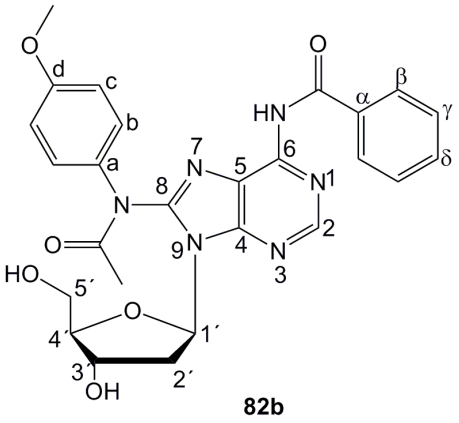
82b

Ausbeute: 0.55 g (1.06 mmol, 78 %) eines hellgelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{26}H_{26}N_6O_6$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 9:1 v/v): 0.54. - **Drehwert:** $[\alpha]^{20°C}_{589nm}$: 227.2 ° (c= 0.5, $CHCl_3/CH_3OH$; 1:1 v/v). - **Smp.:** 151 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6, 323K): 10.49 (s, 1H, N**H**-Benzoyl), 8.63 (s, 1H, H2), 7.54 (d, $^3J_{HH}$= 6.7 Hz, 2H, Hβ, Hβ´), 7.45 (t, $^3J_{HH}$= 7.4 Hz, 1H, Hδ), 7.36 (t, $^3J_{HH}$= 7.6 Hz, 2H, Hγ, Hγ´), 7.25 (d, $^3J_{HH}$= 8.8 Hz, 2H, Hb, Hb´), 6.94 (d, $^3J_{HH}$= 8.4 Hz, 2H, Hc, Hc´), 6.33 (dd, $^3J_{HH}$= 7.0 Hz, $^3J_{HH}$= 6.9 Hz, 1H, H1´), 5.20 (d, 1H, $^3J_{HH}$= 4.4 Hz, 3´-O**H**), 4.95 - 4.89 (m, 1H, 5´-O**H**), 4.55 - 4.46 (m, 1H, H3´), 3.92 (dd, $^3J_{HH}$= 7.7 Hz, $^3J_{HH}$= 4.7 Hz, 1H, H4´), 3.73 (s, 3H, O-CH_3), 3.74 - 3.69 (m, 1H, H5´a), 3.57 (ddd, $^2J_{HH}$= 11.7 Hz, $^3J_{HH}$= 5.9 Hz, $^3J_{HH}$= 4.8 Hz, 1H, H5´b), 3.06 - 2.93 (m, 1H, H2´a), 2.20 (s, 3H, Ac-C**H**$_3$), 2.02 - 1.91 (m, 1H, H2´b). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 172.1 (C=O), 168.6 (C=O), 151.4 (C6), 150.7 (C2), 149.3 (C4),

147.5 (Ca), 139.4 (C8), 134.5 (Cα), 133.8 (**C**H-Benzoyl), 133.5 (**C**H-Benzoyl), 133.0 (**C**H-Benzoyl), 131.3 (Cd), 128.3 (**C**H-Benzoyl), 128.1 (**C**H-Benzoyl), 127.8 (Cb, Cb´), 121.7 (C5), 114.6 (C8), 88.3 (C4´), 84.8 (C1´), 70.8 (C3´), 61.8 (C5´), 55.2 (O-CH_3), 37.1 (C2´), 24.1 (Ac-**C**H_3). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 3247, 2931, 2837, 1670, 1607, 1584, 1530, 1507, 1462, 1441, 1355, 1283, 1243, 1172, 1136, 1096, 1053, 1027, 987, 943, 908, 879, 863, 831, 797, 775, 719, 661, 608, 581, 548, 527, 491, 455, 432, 417, 390, 381. - **UV** ($CHCl_3$/CH_3OH; 1:1 v/v): λ_{max} [nm]: 248.7985, 307.5786. - **MS** (ESI^+, m/z): ber.: 518.1914 [M], 519.1992 $[M+H]^+$, gef.: 519.1981 $[M+H]^+$.

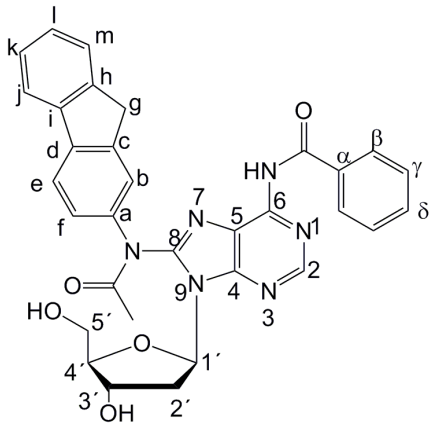
Synthese von *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-4-methoxyphenyl-2´-desoxyadenosin 82b

Die Reaktion wurde nach **AAV 4.2** durchgeführt.
Es wurden 0.91 g (1.22 mmol) *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-4-methoxyphenyl-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **73b**, 0.42 mL (7.32 mmol) Essigsäure und 1.04 mL (3.66 mmol) TBAF in 20 mL THF verwendet.
Ausbeute: 0.66 g (1.22 mmol, quant.) eines hellgelben Feststoffs. - **Charakterisierung:** S. 257.



82b

Synthese von N^6-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-2-fluorenyl-2´-desoxyadenosin 82f



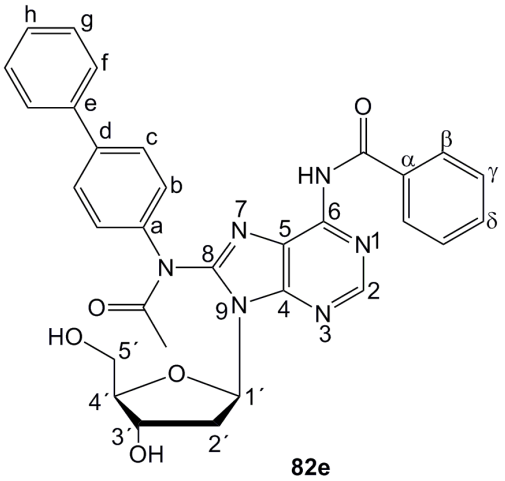
82f

Die Reaktion wurde nach **AAV 4** durchgeführt.

Es wurden 1.67 g (2.08 mmol) N^6-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-2-fluorenyl-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **73f**, 2.90 mL (2.10 g, 20.8 mmol) Triethylamin und 4.23 mL (4.19 g, 26.0 mmol) Triethylamin-Trihydrofluorid in je 25 mL THF/DCM (1:1 v/v) verwendet.

Ausbeute: 0.94 g (1.64 mmol, 79 %) eines hellgelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{32}H_{28}N_6O_5$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 9:1 v/v): 0.62. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{25°C}$: 172.4 ° (c= 0.5, $CHCl_3/CH_3OH$; 1:1 v/v). - **Smp.:** 152 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6, 323K): 10.70 (N**H**-Benzoyl), 8.66 (s, 1H, H2), 7.90 - 7.86 (m, 2H, H-Benzoyl), 7.61 (d, $^3J_{HH}$= 7.4 Hz, 2H, He, Hf), 7.57 (d, $^3J_{HH}$= 7.5 Hz, 1H, Hj oder Hm), 7.54 (s, 1H, Hb), 7.45 (t, $^3J_{HH}$= 7.4 Hz, 1H, Hδ), 7.41 - 7.31 (m, 4H, Hm, Hj, 2 x Benzoyl-H), 7.32 – 7.29 (m, 1H, Hm oder Hj), 6.38 (t, $^3J_{HH}$= 7.0 Hz, 1H, H1´), 5.18 (bs, 1H, 3´-OH), 4.93 (bs, 1H, 5´-OH), 4.58 - 4.48 (m, 1H, H3´), 3.96 - 3.88 (m, 3H, H4´, Hg), 3.77 - 3.70 (m, 1H, H5´a), 3.62 - 3.51 (m, 1H, H5´b), 3.13 - 2.91 (m, 1H, H2´a), 2.19 (s, 3H, Ac-C**H**$_3$), 2.05 - 1.84 (m, 1H, H2´b). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 172.2 (C=O), 168.6 (C=O), 151.5 (C6), 150.5 (C2), 149.3 (C4), 144.6 (Ca), 144.1 (Cc), 143.2 (Ci), 137.7 (Ch), 134.4 (Cd), 133.8 (Cα), 132.7 (C**H**-arom.), 131.4 (C**H**-arom.), 130.3 (C**H**-arom.), 129.4 (C**H**-arom.), 128.9 (C**H**-arom.), 128.7 (Ck), 128.6 (Cl), 128.4 (C8), 128.3 (Cj), 128.2 (Cm), 126.7 (Cb), 120.4 (Ce, Cf), 120.1 (C5), 88.3 (C4´), 84.9 (C1´), 70.8 (C3´), 61.8 (C5´), 39.0 (C2´), 36.3 (Cg), 24.1 (Ac-**C**H$_3$). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR):3301, 3248, 3160, 3117, 3055, 3020, 2919, 1673, 1606, 1582, 1525, 1455, 1428, 1402, 1353, 1269, 1220, 1178, 1154, 1094, 1052, 1027, 1000, 958, 936, 904, 871, 860, 800, 769, 733, 712, 670, 649, 607, 584, 568, 544, 526, 478, 461, 448, 417, 390. - **UV** ($CHCl_3/CH_3OH$; 1:1 v/v): λ_{max} [nm]: 252.6802, 318.6691. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 576.2121 [M], 577.2199 $[M+H]^+$, gef.: 577.5 $[M+H]^+$.

Synthese von N^6-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-4-biphenyl-2´-desoxyadenosin 82e



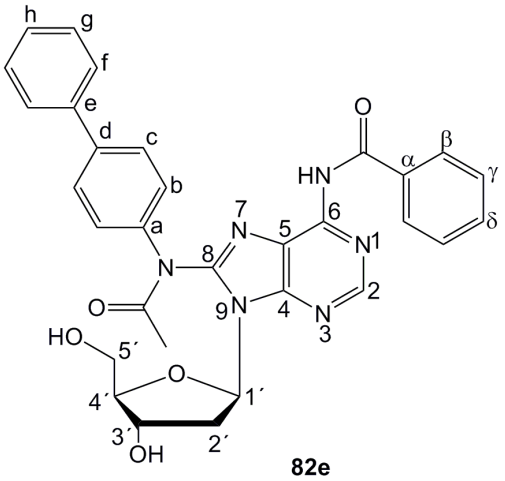
82e

Die Reaktion wurde nach **AAV 4** durchgeführt. Es wurden 1.20 g (1.51 mmol) N^6-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-4-biphenyl-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **73e**, 2.11 mL (1.53 g, 15.1 mmol) Triethylamin und 3.08 mL (3.05 g, 18.9 mmol) Triethylamin-Trihydrofluorid in 18 mL THF und 18 mL DCM (1:1 v/v) verwendet.

Ausbeute: 0.78 g (1.38 mmol, 91 %) eines hellgelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{31}H_{28}N_6O_5$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 9:1 v/v): 0.54. - **Drehwert:** $[\alpha]^{25°C}_{589nm}$: 183.8 ° (c= 0.5, $CHCl_3/CH_3OH$; 1:1 v/v). - **Smp.:** 147 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6, 323K): 10.54 (s, 1H, NH-Benzoyl), 8.64 (s, 1H, H2), 7.71 (d, $^3J_{HH}$= 6.6 Hz, 1H, H-arom.), 7.66 (d, $^3J_{HH}$= 7.3 Hz, 2H, H-arom.), 7.61 (d, $^3J_{HH}$= 7.3 Hz, 2H, H-arom.), 7.49 - 7.42 (m, 3H, H-arom.), 7.40 - 7.34 (m, 5H, H-arom.), 6.34 (dd, $^3J_{HH}$= 7.0 Hz, $^3J_{HH}$= 6.9 Hz, 1H, H1´), 5.20 (bs, 1H, 3´-OH), 4.90 (bs, 1H, 5´-OH), 4.51 - 4.47 (m, 1H, H3´), 3.92 (dd, $^3J_{HH}$= 7.9 Hz, $^3J_{HH}$= 4.9 Hz, 1H, H4´), ´), 3.72 (dd, $^2J_{HH}$= 11.7 Hz, $^3J_{HH}$= 4.4 Hz, 1H, H5´a), 3.59 - 3.54 (m, 1H, H5´b), 3.05 - 2.96 (m, 1H, H2´a), 2.20 (s, 3H, Ac-CH_3), 2.01 - 1.90 (m, 1H, H2´b). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d_6): 172.2 (C=O), 168.6 (C=O), 151.6 (C6), 149.4 (C2), 149.1 (C4), 138.9 (**C**-arom.), 138.6 (**C**-arom.), 131.7 (**C**-arom.), 131.5 (**C**-arom.), 131.4 (C**H**-arom.), 128.8 (C**H**-arom.), 128.3 (C**H**-arom.), 128.2 (C**H**-arom.), 127.6 (C**H**-arom.), 127.4 (C**H**-arom.), 126.5 (C**H**-arom.), 126.4 (C**H**-arom.), 119.0 (C5), 118.7 (C8), 88.3 (C4´), 84.9 (C1´), 70.8 (C3´), 61.8 (C5´), 39.0 (C2´), 24.1 (Ac-**C**H_3). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 3270, 3063, 3031, 2933, 2861, 1678, 1607, 1583, 1518, 1485, 1460, 1448, 1402, 1348, 1319, 1276, 1176, 1098, 1055, 1025, 1007, 988, 944, 839, 788, 763, 719, 694, 665, 640, 596, 555, 503, 466, 398. - **UV** ($CHCl_3/CH_3$=H; 1:1 v/v): λ_{max} [nm]: 249.9076, 302.0333. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 564.2121 [M], 565.2199 $[M+H]^+$, gef.: 565.2196 $[M+H]^+$.

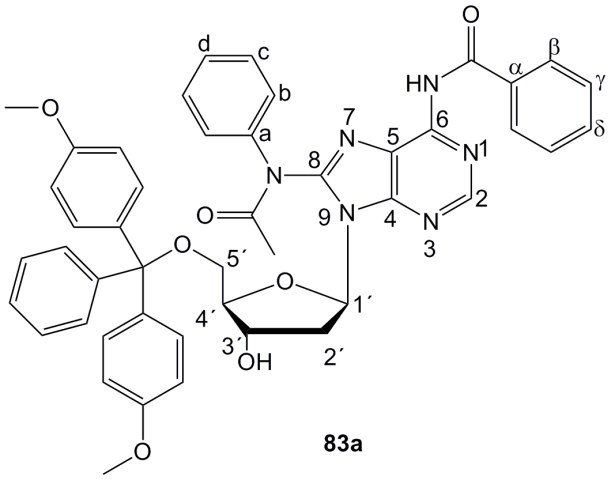
Synthese von N^6-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-4-biphenyl-2´-desoxyadenosin 82e

Die Reaktion wurde nach **AAV 4.2** durchgeführt.
Es wurden 2.27 g (2.87 mmol) N^6-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-4-biphenyl-3´,5´-*O*-bis(*tert*butyldimethylsilyl)-2´-dA **73e**, 0.99 mL (17.2 mmol) Essigsäure und 2.45 mL (8.60 mmol) TBAF in 30 mL THF verwendet.
Ausbeute: 0.78 g (1.38 mmol, 91 %) eines hellgelben Feststoffs. - **Charakterisierung:** siehe S. 260.



Synthese von N^6-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-phenyl-5´-*O*-dimethoxytrityl-2´-desoxyadenosin 83a

Die Reaktion wurde nach **AAV 5** durchgeführt.
Es wurden 0.28 g (0.58 mmol) N^6-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-phenyl-2´-dA **82a**, 195.5 mg (0.58 mmol) DMTr-Cl und 196.0 mg (1.15 mmol), Silbernitrat in 30 mL Pyridin verwendet.
Ausbeute: 322 mg (0.41 mmol, 71 %) eines hellgelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{46}H_{42}N_6O_7$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 19:1 v/v): 0.82. - **Drehwert:** $[\alpha]^{20°C}_{589nm}$: 104.4 °(c= 0.5, $CHCl_3$/CH_3OH; 1:1 v/v). - **Smp.:** 128 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.60 (s, 1H, H2), 7.56 - 7.51 (m, 2H, Hβ, Hβ´), 7.31 - 7.25 (m, 8H, H-arom.), 7.22 - 7.18 (m, 3H, H-arom.), 7.18 - 7.11 (m, 5H, H-arom.), 7.84 - 7.78 (m, 5H, H-arom.), 6.38 (dd, $^3J_{HH}$= 7.0 Hz, $^3J_{HH}$= 5.8 Hz, 1H, H1´), 4.71 (d, $^3J_{HH}$= 3.7 Hz, 1H, 3´-OH), 4.22 - 4.15 (m, 1H, H3´), 3.78 (s, 6H, 2 x O-CH_3), 3.57 (dd, $^3J_{HH}$= 7.8 Hz, $^3J_{HH}$= 4.9 Hz, 1H, H4´), 3.12 - 3.04 (m, 3H, H5´a, H5´b, H2´a), 2.57 (s, 3H, C(O)C**H**$_3$), 1.46 - 1.41 (m, 1H, H2´b). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$): 139.5 (Ca), 131.9 (**C**H-arom.), 130.1 (**C**H-arom.), 129.8 (**C**H-arom.), 129.1 (**C**H-Benzoyl), 128.5 (**C**H-

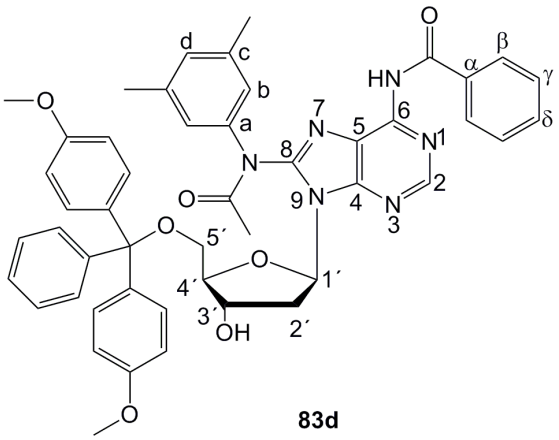


arom.), 127.9 (**C**H-arom.), 127.8 (**C**H-arom.), 127.7 (**C**H-arom.), 127.1 (**C**H-arom.), 89.4 (C4´), 86.8 (C1´), 73.1 (C3´), 63.3 (C5´), 55.3 (O-CH_3), 24.3 (Ac-CH_3). - **^{13}C-NMR:** (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm]= 159.2 (C-quart., DMTr), 159.1 (C.-quart, DMTr), 145.9 (C.-quart, DMTr), 151.6 (C6), 136.6 (C5), 131.6 (**C**Harom), 131.4 (**C**Harom), 130.8 (**C**Harom), 130.6 (**C**Harom), 130.6 (**C**H-arom), 130.5 (**C**Harom), 129.8 (**C**H-arom), 129.6 (**C**Harom), 129.5 (**C**Harom), 128.8 (**C**Harom), 128.7 (**C**Harom), 128.6 (**C**Harom), 128.3 (**C**Harom), 113.6 (**C**Harom), 113.5 (**C**Harom), 86.8 (C4‘), 85.6 (C1‘), 75.1 (C3‘), 54.8 (O-**C**H_3), 43.5 (C5‘), 36.1 (C2‘), 24.7 (Ac-CH_3). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 3277, 2933, 2836, 1682, 1608, 1582, 1508, 1459, 1400, 1352, 1281, 1247, 1175, 1063, 1030, 951, 828, 790, 755, 726, 696, 644, 581, 549, 504. - **MS** (ESI^+, m/z): ber.: 790.3115 [M], 791.3193 $[M+H]^+$, gef.: 791.5 $[M+H]^+$.

Synthese von *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-3,5-dimethylphenyl-5´-*O*-dimethoxytrityl-2´-desoxyadenosin 83d

Die Reaktion wurde nach **AAV 5** durchgeführt.

Es wurden 0.66 g (1.29 mmol) *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-3,5-dimethylphenyl-2´-dA **82d**, 0.44 g (1.29 mmol) DMTr-Cl und 0.44 g (2.57 mmol), Silbernitrat in 50 mL Pyridin verwendet.



83d

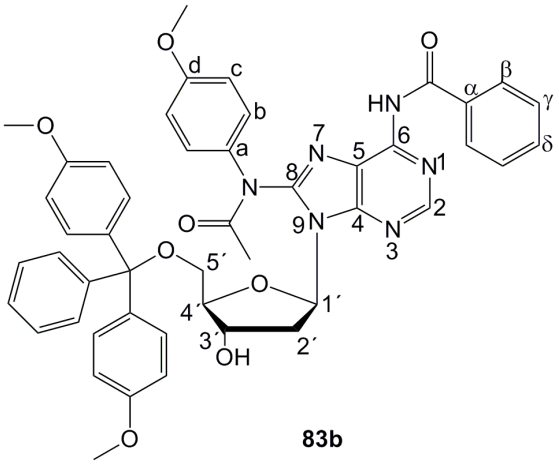
Ausbeute: 677 mg (0.83 mmol, 64 %) eines hellgelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{48}H_{46}N_6O_7$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 19:1 v/v): 0.80. - **Drehwert:** $[\alpha]^{20°C}_{589nm}$: 144.6 ° (c= 0.5, $CHCl_3$/CH_3OH; 1:1 v/v). - **Smp.:** 137 °C. - **^{1}H-NMR:** (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm]= 8.60 (s, 1H, H-2), 7.29 - 7.27 (m, 4H, H-arom), 7.18 - 7.15 (m, 7H, H-arom), 7.03 (s, 1H, Hd), 6.95 (s, 2H, Hb, Hb´), 6.85 - 6.81 (m, 7H, H-arom), 6.30 (dd, $^3J_{HH}$= 9.8 Hz, $^3J_{HH}$= 5.3 Hz, 1H, H-1´), 4.83 - 4.76 (m, 1H, H3´), 4.27 - 4.23 (m, 1H, H4´), 4.02 - 3.94 (m, 2H, H5´a, H5´b), 3.77 (s, 6H, O-C**H**$_3$), 3.57 - 3.50 (m, 1H, H-2´a), 2.29 - 2.23 (m, 1H, H2´b), 2.18 (s, 6H, 2 x CH_3), 2.01 (s, 3H, Ac-C**H**$_3$). - **^{13}C-NMR:** (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm]= 160.4 (C-quart., DMTr), 159.9 (C.-quart, DMTr), 159.8 (C.-quart, DMTr), 152.3 (C6), 151.2 (C2), 150.1 (C8), 146.7 (C4), 141.0 (Cc), 140.9 (Cc‘), 137.1 (C5), 133.0 (**C**Harom), 132.7 (**C**Harom), 131.4 (**C**Harom),

131.4 (**C**Harom), 131.1 (**C**H-arom), 131.0 (**C**Harom), 130.6 (**C**Harom), 130.3 (**C**Harom), 130.1 (**C**Harom), 129.9 (**C**Harom), 129.5 (**C**Harom), 129.3 (**C**Harom), 128.5 (**C**Harom), 127.8 (**C**Harom), 113.9 (**C**Harom), 113.8 (**C**Harom), 113.8 (**C**Harom), 113.7 (**C**Harom), 88.8 (C4´), 86.6 (C1´), 73.4 (C3´), 55.7 (O-**C**H_3), 55.6 (O-**C**H_3), 47.1 (C5´), 38.0 (C2´), 24.7 (Ac-**C**H_3), 21.2 (**C**H_3), 21.2 (**C**H_3). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 2930, 2835, 1693, 1608, 1582, 1507, 1461, 1368, 1349, 1281, 1245, 1174, 1109, 1073, 1051, 1029, 961, 916, 827, 800, 790, 754, 726, 697, 642, 581, 542, 488, 466, 389. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 818.3428 [M], 819.3506 $[M+H]^+$, gef.: 819.3479 $[M+H]^+$.

Synthese von *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-*p*-methoxyphenyl-5´-*O*-dimethoxytrityl-2´-desoxyadenosin 83b

Die Reaktion wurde nach **AAV 5** durchgeführt.

Es wurden 0.54 g (1.03 mmol) *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-*p*-methoxyphenyl-2´-dA **82b**, 0.35 g (1.03 mmol) DMTr-Cl und 0.35 g (2.07 mmol), Silbernitrat in 40 mL Pyridin verwendet.



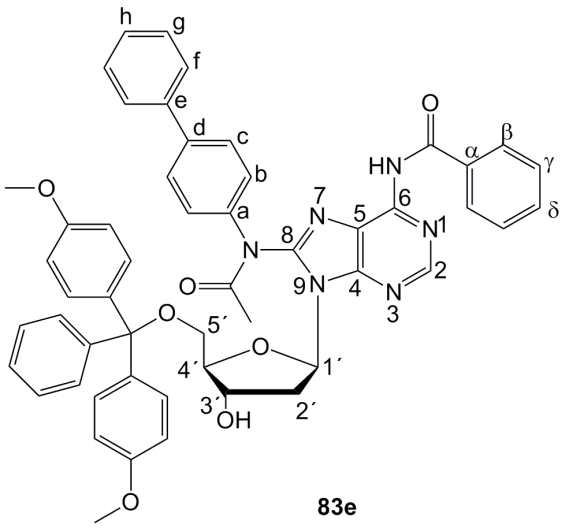
Ausbeute: 368 mg (0.45 mmol, 43 %) eines hellgelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{47}H_{44}N_6O_8$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 19:1 v/v): 0.80. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{20°C}$: 139.4 ° (c= 0.5, $CHCl_3/CH_3OH$; 1:1 v/v). - **Smp.:** 139.9 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.61 (s, 1H, H2), 7.57 - 7.53 (m, 2H, H-arom.), 7.44 - 7.38 (m, 1H, H-arom.), 7.32 - 7.27 (m, 7H, Harom.), 7.19 - 7.13 (m, 6H, H-arom.), 6.85 – 6.81 (m, 6H, H-arom.), 6.40 (dd, $^3J_{HH}$= 9.7 Hz, $^3J_{HH}$= 5.3 Hz, 1H, H1´), 4.76 - 4.71 (m, 1H, H3´), 4.23 - 4.20 (m, 1H, H4´), 4.01 - 3.95 (m, 2H, H5´a, H5´b), 3.80 (s, 6H, O-C**H**$_3$), 3.78 (s, 3H, O-C**H**$_3$), 2.58 (s, 3H, Ac-C**H**$_3$). - **^{13}C-NMR:** (100 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm]= 165.3 (C=O), 158.0 (C-arom.), 154.7 (C6), 152.8 (C2), 150.4 (C4), 147.9 (C8), 145.0 (C-arom.), 144.6 (C-arom.), 135.8 (C-arom.), 135.6 (C-arom.), 134.0 (C-arom.), 132.8 (C-arom.), 129.7 (C-arom.), 129.6 (C-arom.), 128.4 (C-arom.), 128.3 (C-arom.), 127.6 (C-arom.), 126.5 (C-arom.), 126.2 (C-arom.), 120.8 (C5), 113.8 (C-arom.), 113.0 (C-arom.), 86.6 (C4´), 84.7 (C1´), 74.7 (C3´), 64.1 (C5´), 55.2 (O-CH_3,

Anis.), 55.1 (O-CH_3, DMTr), 35.1 (C2´), 24.7 (Ac-CH_3). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR):3356, 3057, 2999, 2932, 2835, 2361, 1735, 1670, 1609, 1563, 1462, 1444, 1372, 1301, 1177, 1034, 910, 828, 791, 754, 726, 617, 584. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 820.3221 [M], 821.3299 $[M+H]^+$, gef.: 821.6 $[M+H]^+$.

Synthese von *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-4-biphenyl-5´-*O*-dimethoxytrityl-2´-desoxyadenosin 83e

Die Reaktion wurde nach **AAV 5** durchgeführt.

Es wurden 0.77 g (1.36 mmol) *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-4-biphenyl-2´-dA **82e**, 0.46 g (1.37 mmol) DMTr-Cl und 0.46 g (2.71 mmol) Silbernitrat in 50 mL Pyridin verwendet.

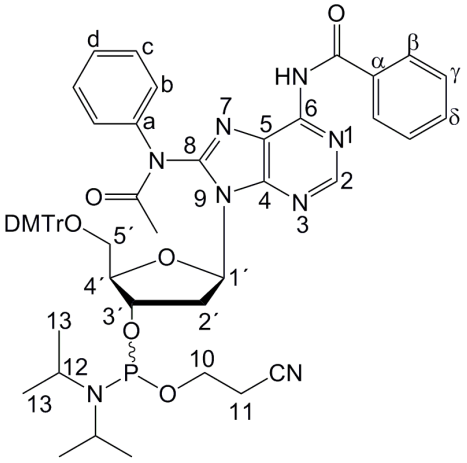


Ausbeute: 737 mg (0.85 mmol, 63 %) eines hellgelben Feststoffs. - **Summenformel:** $C_{52}H_{46}N_6O_7$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 19:1 v/v): 0.85. - **Drehwert:** $[\alpha]^{20°C}_{589nm}$: 145.8 ° (c= 0.5, $CHCl_3/CH_3OH$; 1:1 v/v). - **Smp.:** 160 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$): 8.52 (s, 1H, H2), 7.52 - 7.43 (m, 8H, H-arom.), 7.35 - 7.30 (m, 4H, H-arom.), 7.28 - 7.23 (m, 4H, H-arom.), 7.19 - 7.17 (m, 3H, H-arom.), 7.09 - 7.05 (m, 4H, DMTr-H), 6.75 - 6.72 (m, 4H, DMTr-H), 6.32 (dd, $^3J_{HH}$= 9.7 Hz, $^3J_{HH}$= 5.3 Hz, 1H, H1´), 4.66 - 4.61 (m, 1H, H3´), 4.13 - 4.10 (m, 1H, H4´), ´), 3.92 - 3.83 (m, 2H, H5´a, H5´b), 3.70 (s, 6H, O-CH_3), 2.49 (s, 3H, Ac-CH_3). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, $CDCl_3$): 163.1 (C=O), 152.4 (C6), 147.1 (C4), 142.1 (**C**-arom.), 140.9 (**C**-arom.), 139.8 (**C**-arom.), 139.6 (**C**-arom.), 133.9 (**C**-arom.), 131.5 (C**H**-arom.), 129.9 (C**H**-arom.), 129.3 (C**H**-arom.), 129.2 (C**H**-arom.), 129.0 (C**H**-arom.), 128.2 (C**H**-arom.), 128.1 (C**H**-arom.), 128.0 (C**H**-arom.), 128.0 (C**H**-arom.), 127.9 (C**H**-arom.), 127.3 (C**H**-arom.), 127.2 (C**H**-arom.), 113.3 (C5), 87.5 (C4´), 82.8 (C1´), 67.1 (C3´), 61.1 (C5´), 55.4 (O-CH_3), 31.1 (Ac-**C**H_3). - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 3033, 2966, 2932, 2837, 2251, 1682, 1608, 1583, 1508, 1487, 1461, 1447, 1409, 1353, 1319, 1281, 1247, 1176, 1157, 1127, 1065, 1029, 1008, 976, 901, 828, 790, 764, 724, 698, 666, 640, 581, 562, 523. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 866.3428 [M], 867.3506 $[M+H]^+$, gef.: 867.5 $[M+H]^+$.

Synthese von *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-phenyl-5´-*O*-dimethoxytrityl-3´-*O*-(*N,N´*-di*iso*propyl)-cyanoethylphosphit-2´-desoxyadenosin 84a

Die Reaktion wurde nach **AAV 6** durchgeführt.

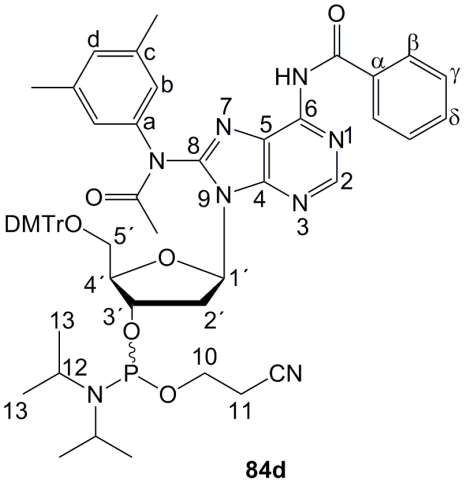
Es wurden 312 mg (0.40 mmol) *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-phenyl-5´-*O*-dimethoxytrityl-2´-dA **83a**, 46.7 mg (0.40 mmol) DCI und 0.19 mL (179 mg, 0.59 mmol) Bis-*N,N´*-di*iso*propylamino-(2-*O*-cyanoethyl)phosphit **101** in10 mL DCM und 10 mL Acetonitril (1:1 v/v) verwendet.



84a

Ausbeute: 296 mg (0.30 mmol, 76 %) einer farblosen Watte. - **Summenformel:** $C_{55}H_{59}N_8O_8P$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 19:1 v/v): 0.95. - **Smp.:** 94.5 °C. - **^{1}H-NMR:** δ [ppm] (400 MHz, C_6D_6): 8.33 (s, 1H, H2), 7.72 - 7.65 (m, 5H, H-arom.), 7.55 - 7.47 (m, 5H, H-arom.), 7.15 - 7.10 (m, 4H, H-arom.), 6.77 - 6.62 (m, 9H, H-arom.), 6.63 - 6.55 (m, 1H, H1´), 5.18 - 5.00 (m, 1H, H3´), 4.75 - 4.62 (m, 1H, H4´), 3.88 - 3.76 (m, 2H, H5´a, H5´b), 3.56 - 3.42 (m, 2H, H12), 3.33 (s, 6H, O-CH_3), 3.27 - 3.17 (m, 2H, H10), 2.39 (s, 3H, Ac-CH_3), 1.82 - 1.67 (m, 2H, H11), 1.09 - 0.98 (m, 12H, H13). - **^{13}C-NMR:** δ [ppm] (101 MHz, C_6D_6): 163.8 (C=O), 159.2 (**C**-arom.), 151.7 (C6), 151.6 (C2), 149.9 (C4), 146.7 (C8), 145.8 (**C**-arom.), 136.5 (**C**-arom.), 136.4 (**C**-arom.), 134.5 (**C**-arom.), 133.9 (**C**-arom.), 131.9 (C**H**-arom.), 131.6 (C**H**-arom.), 131.5 (C**H**-arom.), 130.7 (C**H**-arom.), 130.5 (C**H**-arom.), 129.7 (C**H**-arom.), 129.5 (C**H**-arom.), 128.6 (C**H**-arom.), 128.5 (C**H**-arom.), 127.4 (C**H**-arom.), 127.1 (C**H**-arom.), 122.6 (C5), 113.3 (C**H**-arom.), 86.9 (C4´), 85.6 (C1´), 74.9 (C3´), 64.8 (C5´), 59.0 (C10), 54.8 (O-CH_3), 43.6 (C12), 36.1 (C2´), 31.1 (Ac-**C**H_3), 24.7, 24.6 (C13), 20.0 (C11). - **^{31}P-NMR:** δ [ppm] (162 MHz, C_6D_6): 162.78, 162.69, 161.88, 161.83. - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 2965, 2931, 2836, 1678, 1635, 1604, 1578, 1508, 1460, 1446, 1410, 1396, 1366, 1327, 1293, 1248, 1200, 1177, 1155, 1125, 1057, 1030, 1002, 977, 900, 879, 828, 791, 754, 725, 697, 643, 582, 551, 521. - **MS** (ESI^+, m/z): ber.: 990.4193 [M], 991.4272 $[M+H]^+$, gef.: 990.5 $[M+H]^+$.

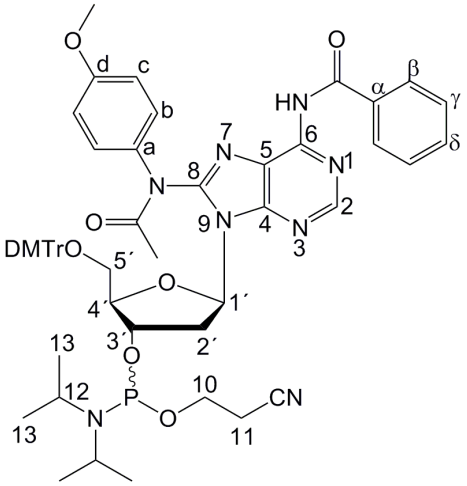
Synthese von *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-3,5-dimethylphenyl-5´-*O*-dimethoxytrityl-3´-*O*-(*N,N´*-di*iso*propyl)-cyanoethylphosphit-2´-desoxyadenosin 84d



Die Reaktion wurde nach **AAV 6** durchgeführt. Es wurden 0.66 g (0.81 mmol) *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-3,5-dimethylphenyl-5´-*O*-dimethoxytrityl-2´-dA **83d**, 0.10 g (0.81 mmol) DCI und 0.38 mL (0.37 g, 1.21 mmol) Bis-*N,N´*-di*iso*propylamino-(2-*O*-cyanoethyl)phosphit **101** in 20 mL DCM und 20 mL Acetonitril (1:1 v/v) verwendet.

Ausbeute: 293 mg (0.29 mmol, 36 %) einer farblosen Watte. - **Summenformel:** $C_{57}H_{63}N_8O_8P$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 19:1 v/v): 0.94. - **Drehwert:** $[\alpha]^{20°C}_{589nm}$: 304.0 ° (c= 0.5, $CHCl_3$). - **Smp.:** 103 °C. - **^{1}H-NMR:** (400 MHz, C_6D_6): δ [ppm]= 8.26 (s, 1H, H2), 7.70 - 7.68 (m, 2H, H-Benzoyl), 7.53 - 7.51 (m, 4H, H-DMTr), 7.13 - 7.09 (m, 3H, H-Benzoyl), 7.05 - 7.02 (m, 2H, H-DMTr), 6.94 - 6.80 (m, 3H, Hb, Hb´, Hd), 6.72 - 6.62 (m, 6H, H-DMTr), 6.56 - 6.48 (m, 1H, H-1´), 5.20 - 4.91 (m, 3H, C=O-C**H**$_3$), 4.69 (m, 1H, H3´), 4.00 - 3.75 (m, 2H, P-O-C**H**$_2$), 3.50 - 3.40 (m, 2H, H4´, H5´a), 3.33 (s, 6H, 2 x O-C**H**$_3$), 3.30 - 3.20 (m, 2H, H5´b, H2´a), 1.90 (s, 6H, C-c-CH_3), 1.80 - 1.63 (m, 2H, N-C**H**$(CH_3)_2$), 1.19 - 1.15 (m, 1H, H2´b), 1.12 (s, 3H, N-CH(C**H**$_3)_2$), 1.10 (s, 3H, N-CH(C**H**$_3)_2$), 1.11 (s, 3H, N-CH(C**H**$_3)_2$), 0.99 (s, 3H, N-CH(C**H**$_3)_2$). - **^{13}C-NMR:** (100 MHz, C_6D_6): δ [ppm]= 159.2 (C-quart., DMTr), 159.1 (C-quart., DMTr), 155.6 (C6), 153.3 (C2), 146.0 (Cd), 139.5 (Cc, Cc‘), 136.7 (C-quart., DMTr), 136.6 (C-quart., DMTr), 131.4 (CH-arom, DMTr), 130.8 (CH-arom., DMTr), 130.7 (CH-arom., DMTr), 129.4 (CH-arom, DMTr), 129.3 (CH-arom., DMTr), 128.5 (CH-arom., Bz), 127.0 (CH-arom., Bz), 113.6 (CH-arom., DMTr), 113.5 (CH-arom., DMTr), 87.9 (C4‘), 86.1 (C1‘), 77.4 (C3‘), 59.1 (C5´), 54.8 (O-CH_3), 43.6 (N-CH-$(CH_3)_2$), 36.3 (C2‘), 24.7 (N-CH-$(CH_3)_2$), 24.6 (N-CH-$(CH_3)_2$), 24.5 (N-CH-$(CH_3)_2$), 24.5 (N-CH-$(CH_3)_2$), 21.1 (2 x CH_3). - **^{31}P-NMR**: δ [ppm] (162 MHz, C_6D_6): 162.60, 162.58, 161.77, 161.72. - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 2965, 2929, 2872, 2836, 1697, 1634, 1607, 1508, 1462, 1445, 1396, 1365, 1327, 1296, 1248, 1200, 1177, 1156, 1116, 1073, 1031, 976, 899, 879, 828, 800, 770, 754, 725, 703, 681, 641, 583, 521, 463, 393. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 1018.4506 [M],1019.4585 $[M+H]^+$, gef.: 1019.1 $[M+H]^+$.

Synthese von *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-*p*-methoxyphenylphenyl-5´-*O*-dimethoxytrityl-3´-*O*-(*N,N´*-di*iso*propyl)-cyanoethylphosphit-2´-desoxyadenosin 84b



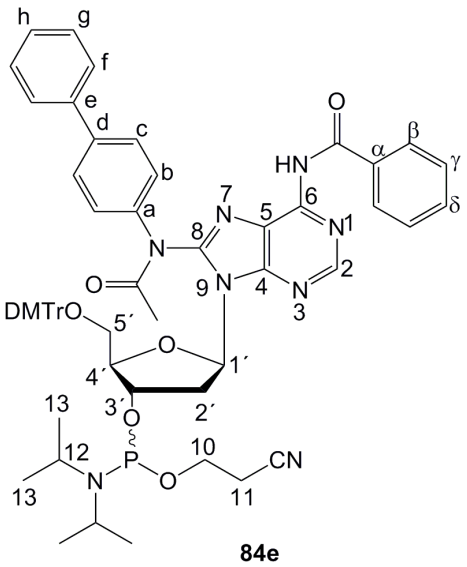
84b

Die Reaktion wurde nach **AAV 6** durchgeführt. Es wurden 0.35 g (0.43 mmol) *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-4-methoxyphenyl-5´-*O*-dimethoxytrityl-2´-dA **83b**, 0.05 g (0.43 mmol) DCI und 0.20 mL (0.20 g, 0.65 mmol) Bis-*N,N´*-di*iso*propylamino-(2-*O*-cyanoethyl)phosphit **101** in 10 mL DCM und 10 mL Acetonitril (1:1 v/v) verwendet.

Ausbeute: 277.5 mg (0.27 mmol, 63 %) einer farblosen Watte. - **Summenformel:** $C_{56}H_{61}N_8O_9P$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 19:1 v/v): 0.92. - **Drehwert:** $[\alpha]^{20°C}_{589nm}$: 84.6 ° (c= 0.5, $CHCl_3$). - **Smp.:** 96.4 °C. - **^{1}H-NMR:** (400 MHz, C_6D_6): δ [ppm]= 8.29 (s, 1H, H2), 7.91 - 7.89 (m, 2H, H-arom.), 7.67 - 7.51 (m, 6H, H-arom), 7.48 - 7.31 (m, 10H, H-arom.), 7.13 - 6.91 (m, 12H, H-arom.), 6.78 - 6.75 (m, 12H, H-arom.), 6.56 - 6.48 (m, 1H, H-1´), 5.20 - 4.91 (m, 1H, H3´), 4.00 - 3.75 (m, 2H, P-O-CH_2), 3.50 - 3.40 (m, 2H, H4´, H5´a), 3.33 (s, 6H, 2 x O-C**H**$_3$), 3.30 - 3.20 (m, 2H, H5´b, H2´a), 1.90 (s, 6H, C-c-C**H**$_3$), 1.80 - 1.63 (m, 2H, N-C**H**$(CH_3)_2$), 1.19 - 1.15 (m, 1H, H2´b), 1.12 (s, 3H, N-CH(C**H**$_3)_2$), 1.10 (s, 3H, N-CH(C**H**$_3)_2$), 1.11 (s, 3H, N-CH(C**H**$_3)_2$), 0.99 (s, 3H, N-CH(C**H**$_3)_2$). - **^{13}C-NMR:** (100 MHz, C_6D_6): δ [ppm]= 159.2 (C-quart., DMTr), 159.1 (C-quart., DMTr), 155.6 (C6), 153.3 (C2), 146.0 (Cd), 139.5 (Cc, Cc´), 136.7 (C-quart., DMTr), 136.6 (C-quart., DMTr), 131.4 (CH-arom, DMTr), 130.8 (CH-arom., DMTr), 130.7 (CH-arom., DMTr), 129.4 (CH-arom, DMTr), 129.3 (CH-arom., DMTr), 128.5 (CH-arom., Bz), 127.0 (CH-arom., Bz), 113.6 (CH-arom., DMTr), 113.5 (CH-arom., DMTr), 87.9 (C4´), 86.1 (C1´), 77.4 (C3´), 59.1 (C5´, 54.8 (O-**C**H_3), 43.6 (N-CH-$(CH_3)_2$), 36.3 (C2´), 24.7 (N-CH-$(CH_3)_2$), 24.6 (N-CH-$(CH_3)_2$), 24.5 (N-CH-$(CH_3)_2$), 24.5 (N-CH-$(CH_3)_2$), 21.1 (2 x **C**H_3). - **^{31}P-NMR**: δ [ppm] (162 MHz, Benzol-d_6): 162.64, 162.45, 161.81, 161.74. - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 3033, 2964, 2932, 2836, 2545, 2389, 2250, 2220, 2181, 2163, 2143, 2111, 2049, 2008, 1977, 1894, 1680, 1607, 1582, 1508, 1461, 1446, 1396, 1364, 1286, 1246, 1201, 1176, 1156, 1126, 1029, 977, 900, 828, 791, 772, 754, 724, 701, 681, 664, 641, 581,

548, 523, 461, 428, 410, 392. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 1020.4299 [M],1021.4377 $[M+H]^+$, gef.: 1022.3 $[M+2H]^+$.

Synthese von *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-4-biphenyl-5´-*O*-dimethoxytrityl-3´-*O*-(*N,N´*-di*iso*propyl)-cyanoethylphosphit-2´-desoxyadenosin 84e



Die Reaktion wurde nach **AAV 6** durchgeführt. Es wurden 0.72 g (0.83 mmol) *N*^{6}-Benzoyl-8-(*N*-acetyl)-4-biphenyl-5´-*O*-dimethoxytrityl-2´-dA **83e**, 0.10 g (0.83 mmol) DCI und 0.39 mL (0.38 g, 1.25 mmol) Bis-*N,N´*-di*iso*propylamino-(2-*O*-cyanoethyl)phosphit **101** in 25 mL DCM und 25 mL Acetonitril (1:1 v/v) verwendet.

Ausbeute: 512 mg (0.48 mmol, 58 %) einer farblosen Watte. - **Summenformel:** $C_{61}H_{63}N_8O_8P$. - **DC:** R_f-Wert (DCM/MeOH; 19:1 v/v): 0.91. - **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{22°C}$: 166.7 ° (c= 0.5, $CHCl_3$). - **Smp.:** 60.4 °C. - **^{1}H-NMR:** (400 MHz, C_6D_6): δ [ppm]= 8.05 (s, 1H, H2), 7.71 - 7.63 (m, 2H, H-arom.), 7.54 - 7.46 (m, 4H, H-arom.), 7.33 - 7.20 (m, 4H, H-arom.), 7.20 - 6.99 (m, 12H, H-arom.), 6.95 - 6.88 (m, 3H, H-arom.), 6.72 - 6.60 (m, 6H, H-arom., H1´), 4.78 - 4.70 (m, 1H, H3´), 3.86 - 3.75 (m, 2H, H4´, H5´a), 3.48 - 3.39 (m, 1H, H5´b), 3.30 (s, 3H, O-CH_3), 3.28 (s, 3H, O-CH_3), 3.15 - 3.01 (m, 2H, H11), 2.96 - 2.88 (m, 2H, H12), 2.38 (s, 3H, Ac-CH_3), 1.53 - 1.46 (m, 2H, H10), 1.09 - 0.99 (m, 12H, H13). - **^{13}C-NMR:** (100 MHz, C_6D_6): δ [ppm]= 159.2 (C=O), 149.7 (C2), 141.1 (**C**-arom.), 136.0 (**C**-arom.), 135.9 (**C**-arom.), 134.9 (**C**-arom.), 132.6 (**C**-arom.), 131.9 (**C**-arom.), 130.8 (**C**-arom.), 130.6 (**C**-arom.), 129.0 (CH-arom.), 128.8 (CH-arom.), 128.7 (CH-arom.), 128.6 (CH-arom.), 127.9 (CH-arom.), 127.1 (CH-arom.), 127.0 (CH-arom.), 119.7 (C5), 117.6 (CN), 113.6 (C-arom.), 87.0 (C4´), 85.8 (C1´), 59.3 (C11), 58.0 (O-CH_3), 45.4 (C12), 20.6 (10). - **^{31}P-NMR**: δ [ppm] (162 MHz, Benzol-d_6): 162.71, 162.67, 161.91, 161.84. - **IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (ATR): 3033, 2966, 2932, 2837, 2251, 1682, 1608, 1583, 1508, 1487, 1461, 1447, 1409, 1353, 1319, 1281, 1247, 1176, 1157, 1127, 1065, 1029, 1008, 976, 901, 828, 790, 764, 724, 698, 666, 640, 581, 562, 523. - **MS** (FAB, m/z): ber.: 1066.4506 [M],1067.4585 $[M+H]^+$, gef.: 1068.2 $[M+2H]^+$.

10.3 Oligonucleotide

***Nar*I-Sequenz**

Synthese des unmodifizierten Oligonucleotids **104**

5´- d(CTC GGC ACC ATC) -3´

M= 3566.4

HPLC:Retentionszeit (Methode 1): 27.28 min

MS: MALDI-TOF, m/z (Ladung): 3566.2 [M], 3605.1 $[M+K]^+$

Synthese des C8-(*N*-Acetyl)-phenyl modifizierten Oligonucleotids **104a**

5´- d(CTC GGC [A-Ac-phenyl]CC ATC) -3´

M= 3700.4

HPLC:Retentionszeit (Methode 1): 29.92 min

MS: MALDI-TOF, m/z (Ladung): 3699.1

Synthese des C8-*N*H-Phenyl modifizierten Oligonucleotids **104b**

5´- d(CTC GGC [A-Phenyl]CC ATC) -3´

M= 3657.0

HPLC:Retentionszeit (Methode 1): 31.60 min

MS: MALDI-TOF, m/z (Ladung): 3656.0

Synthese des C8-(*N*-Acetyl)-3,5-dimethylphenyl modifizierten Oligonucleotids **104c**

5´- d(CTC GGC [A-Ac-3,5-dimethylphenyl]CC ATC) -3´

M= 3729.5

HPLC:Retentionszeit (Methode 1): 31.55 min

MS: MALDI-TOF, m/z (Ladung): 3729.0

Synthese des C8-*N*H-3,5-Dimethylphenyl modifizierten Oligonucleotids **104d**

5´- d(CTC GGC [A-3,5-Dimethylphenyl]CC ATC) -3´

M= 3686.5

HPLC:Retentionszeit (Methode 1): 32.77 min

MS: MALDI-TOF, m/z (Ladung): 3685.0

Synthese des C8-(*N*-Acetyl)-4-methoxyphenyl modifizierten Oligonucleotids **104e**

5´- d(CTC GGC [A-Ac-4-methoxyphenyl]CC ATC) -3´

M= 3730.4

HPLC:Retentionszeit (Methode 1): 31.15 min

MS: MALDI-TOF, m/z (Ladung): 3729.1

Synthese des C8-*N*H-4-Methoxyphenyl modifizierten Oligonucleotids **104f**

5´- d(CTC GGC [A-4-Methoxyphenyl]CC ATC) -3´

M= 3687.5

HPLC:Retentionszeit (Methode 1): 32.16 min

MS: MALDI-TOF, m/z (Ladung): 3688.1

Synthese des C8-(*N*-Ac)-4-biphenyl modifizierten Oligonucleotids **104g**

5´- d(CTC GGC [A-4-Biphenyl]CC ATC) -3´

M= 3776.4

HPLC:Retentionszeit (Methode 1): 38.73 min

MS: MALDI-TOF, m/z (Ladung): 3777.1

Synthese des C8-*N*H-4-Biphenyl modifizierten Oligonucleotids **104h**

5´- d(CTC GGC [A-4-Biphenyl]CC ATC) -3´

M= 3733.5

HPLC:Retentionszeit (Methode 1): 39.33 min

MS: MALDI-TOF, m/z (Ladung): 3735.0

EcoRI-Oligonucleotide

Synthese des unmodifizierten Oligonucleotids **105**

5´- d(GTA GAA TTC TAC) -3´

M= 3644.5

HPLC:Retentionszeit (Methode 1): 22.91 min

MS: (ESI^-), m/z (Ladung): 3644 (-1), 1214 (-3), 910 (-4), 728 (-5), 606 (-6)

Synthese des C8-(*N*-Acetyl)-phenyl modifizierten Oligonucleotids **105a**

5´- d(GTA G[A-Ac-Phenyl]A TTC TAC) -3´

M= 3778.5

HPLC:Retentionszeit (Methode 3): 12.87 min

MS: (ESI^-MS-HPLC), m/z (Ladung): 1888.82 (-2)

Synthese des C8-*N*H-Phenyl modifizierten Oligonucleotids **105b**

5´- d(GTA G[A-Phenyl]A TTC TAC) -3´

M= 3735.5

HPLC:Retentionszeit (Methode 1): 29.80 min

MS: (ESI^-), m/z (Ladung): 3735 (-1), 933 (-4), 746 (-5), 621 (-6), 532 (-7)

Synthese des C8-(*N*-Acetyl)-4-methoxyphenyl modifizierten Oligonucleotids **105c**

5´- d(GTA G[A-Ac-4-Methoxyphenyl]A TTC TAC) -3´

M= 3808.5

HPLC:Retentionszeit (Methode 3): 12.13 min

MS: (ESI^-), m/z (Ladung): 1268.2364 (-3)

Synthese des C8-*N*H-4-Methoxyphenyl modifizierten Oligonucleotids **105d**

5´- d(GTA G[A-4-Methoxyphenyl]A TTC TAC) -3´

M= 3765.5

HPLC:Retentionszeit (Methode 3): 13.05 min

MS: (ESI^-), m/z (Ladung):1255.1667 (-3)

Synthese des C8-(*N*-Acetyl)-4-biphenyl modifizierten Oligonucleotids **105e**

5´- d(GTA G[A-Ac-4-biphenyl]A TTC TAC) -3´

M= 3854.5

HPLC:Retentionszeit (Methode 3): 17.92 min

MS: (ESI^-), m/z (Ladung): 1284.8364 (-3)

Synthese des C8-*N*H-4-biphenyl modifizierten Oligonucleotids **105f**

5´- d(GTA G[A-4-biphenyl]A TTC TAC) -3´

M= 3811.5

HPLC:Retentionszeit (Methode 3): 18.68 min

MS: (ESI^-), m/z (Ladung):1270.5667 (-3)

Synthese des C8-(*N*-Acetyl)-phenyl modifizierten Oligonucleotids **106a**

5´- d(GT[A-Ac-Phenyl] GAA TTC TAC) -3´

M= 3778.5

HPLC:Retentionszeit (Methode 1): 28.91 min

MS: (ESI^-MS-HPLC), m/z (Ladung): 1888.82 (-2), 1257.5405 (-3)

Synthese des C8-*N*H-Phenyl modifizierten Oligonucleotids **106b**

5´- d(GT[A-Phenyl] GAA TTC TAC) -3´

M= 3735.5

HPLC:Retentionszeit (Methode 1): 33.63 min

MS: (ESI^-MS-HPLC), m/z (Ladung): 1244.2265 (-3)

Synthese des C8-(*N*-Acetyl)-4-Methoxyphenyl modifizierten Oligonucleotids **106c**

5´- d(GT[A-Ac-4-Methoxyphenyl] GAA TTC TAC) -3´

M= 3808

HPLC:Retentionszeit (Methode 1): 36.08 min

MS: (ESI^-), m/z (Ladung): 1268.2364 (-3)

Synthese des C8-*N*H-4-Methoxyphenyl modifizierten Oligonucleotids **106d**

5´- d(GT[A-4-Methoxyphenyl] GAA TTC TAC) -3´

M= 3765

HPLC:Retentionszeit (Methode 1): 38.59 min

MS: (ESI^--MS-HPLC), m/z (Ladung): 1255.8992 (-3)

Synthese des C8-(*N*-Acetyl)-4-biphenyl modifizierten Oligonucleotids **106e**

5´- d(GT[A-Ac-4-biphenyl] GAA TTC TAC) -3´

M= 3854.5

HPLC:Retentionszeit (Methode 3): 17.92 min

MS: (ESI^-), m/z (Ladung): 1284.8364 (-3)

Synthese des C8-*N*H-4-biphenyl modifizierten Oligonucleotids **106f**

5´- d(GT[A-4-biphenyl] GAA TTC TAC) -3´

M= 3811.5

HPLC:Retentionszeit (Methode 3): 18.68 min

MS: (ESI^-), m/z (Ladung):1270.5667 (-3)

20mer-Oligonucleotide

Synthese des unmodifizierten Oligonucleotids **107**

5´- d(ACA TAA GCA TCT ACG ACG CG) -3´

M= 6095

HPLC:Retentionszeit (Methode 2): 24.64 min

MS: (ESI$^-$-MS-HPLC), m/z (Ladung): 2030.3528 (-3), 1522.5162 (-4)

Synthese des C8-*N*H-Phenyl modifizierten Oligonucleotids **107b**

5´- d(ACA T[A-Phenyl]A GCA TCT ACG ACG CG) -3´

M= 6186

HPLC:Retentionszeit (Methode 2): 32.00 min

MS: (ESI$^-$), m/z (Ladung): 2061.0001 (-2), 1545.2446 (-3)

Synthese des C8-*N*H-3,5-Dimethylphenyl modifizierten Oligonucleotids **107d**

5´- d(ACA T[A-3,5-Dimethylphenyl]A GCA TCT ACG ACG CG) -3´

M= 6215.1

HPLC:Retentionszeit (Methode 1): 31.87 min

MS: (ESI$^-$-MS-HPLC), m/z (Ladung): 1552.7080 (-4)

Synthese des C8-*N*H-4-Methoxyphenyl modifizierten Oligonucleotids **107f**

5´- d(ACA T[A-4-Methoxyphenyl]A GCA TCT ACG ACG CG) -3´

M= 6216.1

HPLC:Retentionszeit (Methode 2): 26.93 min

MS: (ESI$^-$-MS-HPLC), m/z (Ladung): 2070.7028 (-3), 1227.8908 (-4)

Synthese des C8-*N*H-4-Biphenyl modifizierten Oligonucleotids **107h**

5´- d(ACA T[A-4-Biphenyl]A GCA TCT ACG ACG CG) -3´

M= 6262.1

HPLC:Retentionszeit (Methode 2): 30.00 min

MS: (ESI$^-$-MS-HPLC), m/z (Ladung): 2086.0451 (-3), 1564.2797 (-4)

Synthese des C8-*N*H-2-Fluorenyl Oligonucleotids **107j**

5´- d(ACA T[A-2-Fluorenyl]A GCA TCT ACG ACG CG) -3´

M= 6274.1

HPLC:Retentionszeit (Methode 2): 30.32 min

MS: (ESI$^-$-MS-HPLC), m/z (Ladung): 2090.0474 (-3), 1567.5348 (-4)

11. Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahren-symbole	R-Sätze	S-Sätze	KMR-Kategorie
Aceton	F, X_i	11-36-66-67	(2-)9-16-26-46	-
Acetonitril	F, Xn	11-20/21/22-36	(1/2-)16-36/37	-
Acetylchlorid	F, C	11-14-34	(1/2-)9-16-26-45	-
alkalische Phosphatase	A	-	24/25	-
4-Aminobiphenyl	T	45-22	53-45	1a
2-Aminofluoren	X_n	40-68	36/37-45	2
Ammoniak	C, N	34-50	(1/2-)26-36/37/39-45/61	-
Ammoniumchlorid	X_n	22-36	(2-)22	-
*di*Ammoniumhydrogencitrat	X_i	36	26	-
Ammoniumsulfat	X_i	36/37/38	26-37/39	-
Anilin	T, N	23/24/25-40-41-43-48-68-50	(1/2-)26-27-36/37/39-45-46-61-63	2
p-Anisidin	T^+, N	26/27/28-33-50	(1/2-)28-36/37-45-61	-
6-Aza-2-thiothymin	F, X_n	11-20/21/22	16-22-26-36/37/39	-
Benzol	T, F	45-46-11-36-38-48/23/24/25-65	53-45	1a
Benzoylchlorid	C	20/21/22/34-43	(1/2-)26-36/37/39-45	-
Benzylalkohol	X_n	20/22	(2-)26	-
Bis(*N,N´*-di*iso*propylamino)-2-*O*-cyanoethylphosphit	X_i	5-36/37/38	3-26-36	-
BOP	X_i	36/37/38	24/25	-
Brom	T^+, C, N	26-35-50	(1/2-)7/9-26-45-61	-
*tert*Butylphenoxyacetyl Anhydrid	F, X_i	11-19-36/37/38-43	26-36/37	-
Cäsiumcarbonat	X_i	36/37/38	26-36/37/39	-

Chloroform	Xn	63-68-45-22-38-40-48/20/22	(2-)36/37	1b
α-Cyano-4-hydroxyzimtsäure	X_n	20/21/22	36/37	-
dA-CE Phosphoramidit	A	-	-	-
2´-Desoxyadenosin-Monohydrat	X_n	22	24/25	-
DCI	F, T	11-23/24/25	16-28-36/37-39-45	-
Dichlormethan	X_n	40	(2-)23-24/25-36/37	2
Diethylether	F^+, X_n	12-19-22-66-67	(2-)9-16-29-33	-
2,5-Dihydroxybenzoesäure	X_i	36/37/38	26-37/39	-
Di*iso*propylamin	F, C	11-20/22-34	(1/2-)16-26-36/37/39-45	-
1,2-Dimethoxyethan	F, T	60-61-11-19-20	53-45	-
4,4´-Dimethoxytriphenylmethylchlorid	X_i	36/37/38	26-37/39	-
4-Dimethylaminopyridin	T	24/25-36/38	26-28A-36/37/39-45	-
3,5-Dimethylanilin	T, N	23/24/25-33-51/53	(1/2-)28-36/37-45-61	-
N,N-Dimethylformamiddiethylacetal	X_i	10-36/37/38	16-26-36	-
N,N-Dimethylformamid	T	61-20/21-36	53-45	-
1,4-Dioxan	F, X_n	11-19-36/37-40-66	(2-)9-16-36&37-46	2
DMSO	X_i	38/38	24/25	-
Dowex® 50W-X8	-	-	24/25	-
DTT	X_n	22-36/38	26-37/39	-
Essigsäure	C	10-35	(1/2-)23-26-45	-
Essigsäureanhydrid	C	10-20/22-34	(1/2-)26-36/37/39-45	-
Ethanol	F	11	(2-)7-16	-
Essigsäureethylester	F, X_i	11-36-66-67	(2-)16-26-33	-

Hexan	F, X_n, N	11-38-48/20-51/53-62-65-67	(2-)9-16-29-33-36/37-61-62	-
3-Hydroxypicolinsäure	X_n	20/22-36/37/38	26-36/37/39	-
Imidazol	C, X_n	22-34-63	22-26-36/37/39-45	-
^{i}Pr-Pac-dG-CE Phosphor-amidit	A	-	-	-
KBr	X_i	36	26-39	-
Kaliumcarbonat	X_i	36/37/38	26-37/39	-
Kalium-*tert*butanolat	C, F, X_n	11-14-22-35	8-16-26-36/37/39-45	-
Kieselgel	X_i	36/37	26-37/39	-
Methansulfonylchlorid	T^+, C, N	21/22-26-34-37-52/53	26-28A-36/37/39-45	-
Methanol	F, T	11-23/24/25-39	(1/2-)7-16-36/37-45	-
Methylamin	F^+, X_n	12-20-37/38-41	(2-)16-26-29	-
ß-Mercaptoethanol	T, C, N	22-24-34-51/53	23-26-29-36/37/39-61	-
Natriumacetat	-	-	24/25	-
Natriumcacodylat	N, T	23/25-50/53	(1/2-)20/21-28-45-60-61	-
Natriumhydrogencarbonat	-	-	24/25	-
Natriumhydrid	F	15	(2-)7/8-24/25-43	-
Natriumhydroxid	C	35	(1/2-)26-36/37/39-45	-
Natriumsulfat	-	-ö	24/25	-
m-Nitrobenzylalkohol	X_n	20/21/22-36/37/38	26-36/37/39	-
Pac-dA-β-CE Phosphoramidit	A	-	-	-
$Pd_2(dba)_3$	X_n	22	24/25	-
Petrolether	A	-	-	-
Phosphorsäure	C	34	(1/2-)26-45	-
Pyridin	F, X_n	11-20/21/22	(2-)26-28	-
rac-BINAP	X_i	36/37/38	26-37/39	-
Salzsäure	C	34-37	(1/2-)26-45	-

Silbernitrat	O, C, N	8-34-50/53	(1/2-)26-36/37/39-45-60-61	-
TBDMS-Cl	C	34	16-25-36/37/39-45	-
TBAF	C, F	11-19-34	16-26-29-33-36/37/39-45	-
Tetrahydrofuran	F, X_i	11-19-36/37	(2-)16-29-33	-
TIPDS-Cl	C	34	26-28A-7	-
p-Toluidin	T, N	23/24/25-36-40-43-50	(1/2-)28-36/37-45-61	2
Toluol	F, X_n	11-38-48/20-63-65-67	(2-)36/37-62	-
Triethylamin	F, C	11-20/21/22-35	(1/2-)2-16-26-29-36/37/39-45	-
Triethylamin-Trihydrofluorid	T^+, C	26/27/28-35	7/9-26-36/37/39-45	-
Trifluoressigsäure	C	20-35-52/53	(1/2-)9-26-27-28-45-61	-
Tris	X_i	36/37/38	24/25	-

KMR-Kategorie:
1a) im Menschen nachgewiesen
1b) im Tierversuch nachgewiesen
2) Verdachtsstoffe

12. Literatur

[1] Marquardt, H., Schäfer, S.G., *Lehrbuch der Toxikologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin **1997**, 124-146.

[2] Cairns, J., *Krebs-Tumoren, Zellen, Gene,* Spektrum der Wissenschaft - Verlagsgesellschaft Heidelberg **1990**, 4. Auflage, 10-21.

[3] http://www.helmberg.at/krebsentstehung.html, *Skriptum Krebsentstehung*, Version 2.3, letzter Zugriff 04.03.2009.

[4] Jemal, A., Sigel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Thun, M.J., Cancer Statistics, *CA Cancer J. Clin.* **2007**, 57, 43-66.

[5] http://www.wdr.de/tv/quarks/global/pdf/krebs.pdf, Version 2008, letzter Zugriff 04.03.2009.

[6] Spivak, J.L., The Anaemia of Cancer: Death by a thousand Cuts, *Nature Reviews Cancer* **2005**, *5*, 543-555.

[7] Tas, M., Eralp, Y., Basaran, M., Sakar, B., Alici, S., Argon, A., Bulutlar, G., Camlica, H., Aydiner, A. Topuz, E., Anemia in Oncology Practice, *Am. J. Clin. Oncol.* **2002**, *25*, 371-379.

[8] *Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie*, Herder **1995**, 2, 267-269.

[9] Rehn, L., Blasengeschwülste bei Fuchsin-Arbeitern, *Archiv für klinische Chirurgie* **1895**, *50*, 588-600.

[10] Stöhrer, G. Krebserzeugende Chemikalien, *Chemie unserer Zeit* **1970**, *4*, 109-114.

[11] Luceri, F., Primary aromatic amines from side-stream cigarette smoke are common contaminants of indoor air, *Toxicology and Industrial Health* **1993**, *9*, 405-413.

[12] Böge, N., Synthese von Arylamin-modifizierten 2´-dG-Phosphoramiditen und deren Einbau in Oligonucleotide, *Dissertation*, Hamburg **2008**.

[13] Gillet, L.C.J., Schärer, O.D., Preparation of C8-Amine and Acetylamine Adducts of 2´-Deoxyguanosine Suitably Protected for DNA Synthesis, *Org. Lett.* **2002**, Vol. *4*, No. 24, 4205-4208.

[14] Schut, H.A.J., Snyderwine, E.G., DNA adducts of heterocyclic amine food mutagens: implications for mutagenesis and carcinogenesis, *Carcinogenesis* **1999**, *20*, 353-368.

[15] Randel, G., Drusch, S., Schwarz, K., Beeinflussung der Bildung von heterozyklischen Aminen während der Fleischzubereitung, *Arbeitsgruppe für Lebensmittelqualität und -sicherheit*, Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde, Christian-Albrechts-Universität Kiel **2002**.

[16] Turesky, R.J., Box, R.M., Markovic, J., Gremaud, E., Snyderwine, E., Formation and persistance of DANN adducts of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline in the rat and nonhuman primates, *Mutation Research* **1997**, *376*, 235-241.

[17] Cramer, J.W., Miller, J.A., Miller, E.C., *N*-Hydroxylation: A New Metabolic Reaction Observed in the Rat with the Carcinogen 2-Acetylaminofluorene, *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 885-888.

[18] Borosky, G.L., Ultimate Carcinogenic Metabolites from Aromatic and Heterocyclic Aromatic Amines: A Computational Study in Relation to their Mutagenic Potential, *Chemical Research in Toxicology* **2006**, *20*, 171-180.

[19] Frederick, C.B., Mays, J.B., Ziegler, D.M., Guengerich, F.P., Kadlubar, F.F., Cytochrome P-450- and Flavin-Containing Monooxygenase-Catalyzed Formation of the Carcinogen *N*-Hydroxy-2-aminoflourene and Its Covalent Binding to Nuclear DNA*, Cancer Res.* **1982**, *42*, 2671-2677.

[20] Neumann, H.G., The role of DNA damage in chemical carcinogenesis of aromatic amines, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1986**, *112*, 100-106.

[21] Boteju, L.W., Hanna, P.E., Bioactivation of *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorenes by *N,O*-acyltransferase: substituent effects on covalent binding to DNA, *Carcinogenesis* **1993**, *14*, 1651-1657.

[22] Bartsch, H., Dworkin, M., Miller, J.A., Miller, E. C., Electrophilic *N*-acetoxyaminoarenes Derived from Carcinogenic *N*-hydroxy-*N*-acetylaminoarenes by Enzymatic Deacetylation and Transacetylation in Liver, *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, *286*, 272-298.

[23] Cui, L., Sun, H.-L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., Skipper, P.L., Identification of Adducts Formed by Reaction of *N*-Acetoxy-3,5-dimethylaniline with DNA *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 1730-1736.

[24] Kumar, N.V.A., Rangappa, K.S., Synthesis and Characterization of Thymidine Adducts of Arylamines *Synth. Comm.* **2003**, *33*, 259-264.

[25] Gupta, R.C., Dighe, N.R., Formation and removal of DNA adducts in rat liver

Treated with *N*-hydroxy derivates of 2-acetylaminoflourene, 4-acetyl-aminobiphenyl and 2-acetylaminophenanthrene, *Carcinogensis* **1984**, *5*, 343-349.

[26] Zajc, B., Lakshman, M.K., Sayer, J.M., Jerina, D.M., Epoxide and Diol Epoxide Adducts of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons at the Exocyclic Amino Group of Deoxyguanosine, *Tetrah. Lett.* **1992**, *239*, 3409-3412.

[27] Saffhill, R., Margison, G.P., O'Connor, P.J., Mechanisms of Carcinogenesis Induced by Alkylating Agents, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *823*, 111-145.

[28] Humphreys, W.G., Kadlubar, F.F., Guengerich, F.P., Mechanism of C8 alkylation of guanine residues by activated arylamines: Evidence for initial adduct formation at the *N*7 position, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA **1992**, *89*, 8278-8282.

[29] Novak, M., Kennedy, S.A., Selective Trapping of *N*-Acetyl-*N*-(4-biphenyl)-nitrenium and *N*-Acetyl-*N*-(2-fluorenyl)nitrenium Ions by 2´-dG in Aqueous Solution, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 574-575.

[30] Randerath, K., Reddy, M.V., Gupta, R.C., ^{32}P-labeling test for DNA damage, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1981,** *78*, 6126-6129.

[31] Ames, B.N., Lee, F.D., Durston, W.E., Improves Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens, *Proc. Natl. Acad. Sci*. **1973**, *70*, 782-786.

[32] Ames, B.N., McCann, J., Yamasaki, E., Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.* **1975**, *31*, 347-364.

[33] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=iga&part=A2745#A2747, letzter Zugriff am 10.02.2010.

[34] Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E., Carcinogens are Mutagens: A simple Test System Combining Liver Homogenates for Activation and Bacteria for Detection, *Proc. Natl. Acad. Sci*., **1973** *70*, 2281-2285.

[35] Debnath, A.K., Debnath, G., Shustermann, A.J., Hansch, C., A QSAR Investigation of the role of Hydrophobicity in Regulating Mutagenicity in the Ames Test, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1992, *19*, 37-52.

[36] Famulok, M., Synthese von *N*-Acetoxyverbindungen carcinogener Arylamine und ihre *in vitro*-Reaktion mit (Bio)Nukleophilen: Entscheidende elektrophile

Metaboliten Aromatischer Amine, *Dissertation*; Philips-Universität Marburg/Lahn **1989**.

[37] Famulok, M., Bosold, F., Boche, G., Synthese von *O*-Acetyl-*N*-(4-biphenyl)hydroxylamin (*N*-Acetoxy-4-aminobiphenyl), einem entscheidenden Metaboliten des carcinogenen 4-Aminobiphenyls und seine Reaktion mit Desoxyguanosin, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 349-350.

[38] Kriek, E., Miller, J.A., Juhl, U., Miller, E., C8-(*N*-2-Fluorenylacetamido)-guanosine, an Arylamination Reaction Product of Guanosine and the Carcinogen *N*-Acetoxy-*N*-2-fluorenylacetamide in Neutral Solution, *Biochemistry* **1967**, *6(1)*, 177-182.

[39] Kosugi, M., Kameyama, M., Migita, T., Palladium-catalyzed Aromatic Amination of Aryl Bromides with *N*,*N*-Diethylamino-tributyltin, *Chem. Lett* **1983**, 927-928.

[40] Louie, J., Hartwig, J.F., Palladium-catalyzed synthesis of arylamines from aryl halides. Mechanistic studies lead to coupling in the absence of tin reagents, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3609-3612.

[41] Guran, A.S., Rennels, R.A., Buchwald, S.L., Eine einfache katalytische Methode zur Synthese von Arylaminen aus Arylbromiden, *Angew. Chem.* **1995**, *107,* 1456 - 1459; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *32,* 1455.

[42] De Riccardis, F., Bonala, R.R., Johnson, F., A General Method for the Synthesis of the N^2- and N^6-Carcinogenic Amine Addukts of 2'-Deoxyguanosine and 2'-Deoxyadenosine, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10453-10460.

[43] Laksham, M.K., Keeler, J.C., Hilmer, J.H., Martin, J.Q., Palladium-Catalyzed C-*N*-Bond Formation: Facile and General Synthesis of N^6-Aryl-2'-Deoxyguanosine, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6090-6091.

[44] Wang, Z., Rizzo, C.J., Synthesis of the C8-Deoxyguanosine Adduct of the Food Mutagen IQ, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *3*, 565-568.

[45] Meier, C., Gräsl, S., Synthesis of Oligonucleotide Building Blocks of 2'-Deoxyguanosine Bearing a C8-Arylamine Modification, *Nucleoside, Nucleotide and Nucleic Acids* **2003**, *22*, 1119-1121.

[46] Meier, C., Gräsl, S., Dettmer, I., Marx, A., Synthesis of Oligonucleotides bearing an Arylamine Modification in the C8-Position of 2'-Deoxyguanosine, *Nucleoside, Nucleotide and Nucleic Acids* **2005**, *24*, 691-694.

[47] Gräsl, S.; Synthese Arylamin-modifizierter 2´-Desoxyguanosin-Derivate und deren Einbau in Oligonucleotide, *Dissertation*, Universität Hamburg **2005**.

[48] Takamura-Enya, T., Ishikawa, S. Mochizuki, M., Wakabayashi, K., A practical approach for the chemical synthesis of 2´-doxyguanosine-C8 adducts with mutagenic/carcinogenic amino- or nitro-arenes, *Tetrahedron Letters* **2003**.

[49] Schoffers, E., Olsen, P.D., Means, J.C., Synthesis of C8-Adenosine Adducts of Arylamines Using Palladium Catalysis, *Org. Let.* **2001**, *3*, 4221-4223.

[50] Lermer, L., Roupioz, Y., Ting, R. Perrin, D.M., Towards an RNaseA Mimic: A DNAzyme with Imidazoles and Cationic Amines, *J. Am. Chem.* **2002**, *124*, 9960-9961.

[51] Jacobsen, M.I., Meier, C., First Synthesis of C8-Arylamine Adducts of 2´-Deoxyadenosine and Incorporation of the Phosphoramidite into an Oligonucleotide, *Template for SYNLETT and SYNTHESIS* **2006**.

[52] Szombati, Z., Reaktionsoptimierung und Darstellung von Arylamin modifizierten 2´-Desoxyadenosin-Derivaten zur oligonucleotiden, *Diplomarbeit*, Universität Hamburg **2007**.

[53] Takamura-Enya, T., Enomoto, S., Wakabayashi, K., Palladium-Catalyzed Direct *N*-Arylation of Nucleosides, Nucleotides, and Oligonucleotides for Efficient Preparation of dG-N^2 Adducts with Carcinogenic Amino-/Nitroarenes, *J. Org. Chem.* **2006**.

[54] Cho, B.P., Beland, F.A., Marques, M.M., NMR Structural Studies of a 15-mer DNA Sequence from a *ras* Protooncogene, Modified at the First Base of Codon 61 with the Carcinogen 4-Aminobiphenyl, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9587-9602.

[55] Cho, B.P., Beland, F.A., Marques, M.M., NMR Structural Studies of a 15-mer DNA Duplex from a *ras* Protooncogene Modified with the Carcinogen 2-Aminofluorene: Conformational Heterogenity, *Biochemistry* **1994**, *33*, 1373-1384.

[56] Hoffmann, G.R., Fuchs, R.P.P., Mechanism of Frameshift Mutations: Insight from Aromatic Amines, *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10,* 347-359.

[57] Shibutani, S., Grollmann, A.P., On the Mechanism of Frameshift (Deletion) Mutagenesis *in Vitro*, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268,* 11703-11710.

[58] Shibutani, S., Grollmann, A.P., Molecular Mechanism of Mutagenesis by Aromatic Amines and Amides, *Mutat. Res.* **1997**, *376*, 71-78.

[59] Marroquin, F., Coyote, N., Binding of radioactive *N*-hydroxyacetylamino-fluorene to synthetic polyribonucleotides, *Chem-Biol Interactions* **1970**, *2*, 151-153.

[60] Saffhill, R., Abbott, P.J., The Formation of Acetylaminofluorene Adducts in Poly(dC-dG) and Poly(dA-dT) on Reaction with *N*-Acetoxy-2-aminofluorene and the Effect of such Modification upon the Polymers as Templates for DNA Polymerases, *Chem.-Biol. Interactions* **1983**, *44,* 95-110.

[61] Zhou, Y., Romano, L.J., Solid-Phase Synthesis of Oligonucleotides Containing Site-Specific *N*-(2´-Deoxyguanosin-8-yl)-2-(acetylamino)-fluorene Adducts Using 9-Fluorenylmethoxycarbonyl as the Base-Protecting Group, *Biochemistry* **1993**, *32*, 14043-14052.

[62] Zhou, Y., Chladek, S. Romano, L.J., Synthesis of Oligonucleotides Containing Site-Specific Carcinogen Adducts. Preparation of the 2-Cyanoethyl-*N,N*-Di*iso*propylphosphoramidite of *N*-(2´-Deoxyguanosin-8-yl)-2-(acetylamino)-fluorene with Fmoc as the Base-Protecting Group, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 556-563.

[63] Gillet, L.C.J., Schärer, O.D., Preparation of C8-Amine and Acetylamine Adducts of 2´-Deoxyguanosine Suitably Protected for DNA Synthesis, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 4205-4208.

[64] Gillet, L.C.J., Alzeer, J., Schärer, O.D., Site-specific incorporation of *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-2-acetylaminofluorene (dG-AAF) into oligonucleotides using modified ´ultra-mild´ DNA synthesis, *Nucleic Acids Research,* **2005** *33*, 1961-1969.

[65] Böge, N., Meier, C., A New and Efficient Synthetic Route to C8-N-Acetylarylamine 2´-Deoxyguanosine Phosphoramidites, *Synthesis*, **2007**, *24*, *3907-3914.*

[66] Elmquist, C.E., Stover, J.S., Wang, Z., Rizzo, C.J., Site-Specific Synthesis and Properties of Oligonucleotides Containing C8-Deoxyguanosine Adducts of the Dietary Mutagen IQ, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11189-11201.

[67] Gill, J.P., Romano, L.J., Mechanism for *N*-Acetyl-2-Aminofluorene-Induced Frameshift Mutagenesis by Escherichia coli DNA Polymerase I (Klenow Fragment), *Biochemistry* **2005*,*** *44*, 15387-15395.

[68] Jacobsen, M.I., Synthese und Untersuchung von C8- und N^6-Arylamin-2'-Desoxyadenosin-modifizierten Oligonucleotiden, *Dissertation* **2010**.

[69] Böge, N., Jacobsen, M.I., Szombati, Z., Bärns, S., Di Pasquale, F., Marx, A., Meier, C., Synthesis of DNA strands site-specifically damaged by C8-arylamine purine adducts and effects on various DNA polymerases, *Chemistry- A European Journal* **2008**, *14*, 11194-11208.

[70] Hess, M.T., Gunz, D., Luneva, N., Geacintov, N.E., Naegeli, H., Base pair conformation-dependent excision of benzo[a]pyrene diol epoxide-guanine adducts by human nucleotide excision repair enzymes, *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 7069-7076.

[71] Lin, J., Kadlubar, F.F., Spitz, M.R., Zhao, H., Wu, X., A mofified Host Cell Reactivation Assay to Measure DNA Repair Capacity for Removing 4-Aminobiphenyl Adducts: A Pilot Study of Bladder Cancer, *Canc. Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2005**, *14*, 1832-1836.

[72] Khorana, H.G., Studies on nucleic acids: Total synthesis of a biologically functional gene, *Bioorg. Chem.* **1978**, *7*, 351-393.

[73] Heidmann, W., Köster, H., Oligonucleotidsynthese an einem polymeren Träger unter Vermeidung von Fehlsequenzen, *Angew. Chem.* **1976**, *13*, 576.

[74] Beaucage, S.L., Caruthers, M.H., Desoxynucleoside Phosphoramidites - A new class of key intermediates for Desoxypolynucleotide synthesis, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859-1862.

[75] Eason, R.G., Burkhardt, D.M., Phillips, S.J., Smith, D.P., David, S.S., Synthesis and characterization of 8-methoxy-2´-deoxyadenosine-containing oligonucleotides to probe the *syn* glycosidic conformation of 2´-deoxyadenosine within DNA, *Nucleic Acids Research* **1996**.

[76] Woo, J., Sigurdsson, S.T., Hopkins, P.B., DNA Interstrand Cross-Linking Reactions of Pyrrole-Derived, Bifunctional Electrophiles: Evidence for a Common Target Site in DNA, *J. Am. Chem.Soc.* **1993**, *115*, 3407-3415.

[77] Wolfe, S., Wagaw, S., Buchwald, S.L., An Improved Catalyst System for Aromatic Carbon-Nitrogen Bond Formation: The possible Involvement of Bis(Phosphine) Palladium Complexes as Key Intermediates, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118,* 7215 - 7216.

[78] Kierzek, R., The synthesis of 5´-*O*-Dimethoxytrityl-*N*-Acyl-2´-deoxy-nucleosides, *Nucleosides & Nucleotides* **1985**, *4* (5), 641-649.

[79] Höfle, G., Steglich, W., Vorbrüggen, H., 4-Dialkylaminopyridine als hochwirksame Acylierungskatalysatoren, *Angewandte Chemie* **1978**, *90*, 602-615.

[80] Brückner, R., Reaktionsmechanismen, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag **2007**.

[81] Xu, S., Held, I., Kempf, B., Mayr, H., Steglich, W., Zipse, H., The DMAP-Catalyzed Acetylation of Alcohols – A Mechanistic Study, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 4751-4757.

[82] Famulok, M., Synthese von *N*-Acyloxyverbindungen carcinogener Arylamine und ihre *in vitro* Reaktion mit (Bio)Nucleophilen: Entscheidende elektrophile metaboliten aromatischer Amine, *Dissertation,* Mai **1989**.

[83] Evans, F.E., Miller, D.W., Beland, F.A., Sensitivity of the conformation of deoxyguanosine to binding at the C8-Position by *N*-acetylated and unacetylated 2-aminofluorene, *Carcinogenesis* **1980**, *1*, 955-959.

[84] Möhrle, H., Ehrhardt, H., Kilian, R., Spillmann, P., Rotamere Amide, *Pharm. Chem.* **1970**, *6*, 531-544.

[85] Connoly, B.A., Oligonucleotides and Analogues; A practical Approach **1991**, 160.

[86] Mizukoshi, T., Hitomi, K., Todo, T., Iwai, S., Studies on the chemical synthesis of oligonucleotides containing the (6-4) photoproduct of thymine-cytosine and its repair by (6-4) photolyase, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10634-10642.

[87] Yu Hua, J., Bauuwarth, W., Luu, B., Application of the Phosphoramidite-phosphite trimester approach for the synthesis of combinations between oxygenated sterols and nucleoside analogues linked by phosphodiester bonds, *Tetrahedron* **1990**, *46*.

[88] Elmquist, C.E., Wang, F., Stover, J.S., Stone, M.P., Rizzo, C.J., Conformational Differences of the C8-Deoxyguanosine Adduct of 2-Amino-3-methylimidazo[4,5,*f*]quinoline (IQ) within the *Nar*I Recognition Sequence, *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 445-454.

[89] F. Johnson, C.Y., Huang, P.L. Yu, Synthetic and oxidative studies on 8-(arylamino)-2'-deoxyguanosine and -guanosine derivatives, *Environ. Health Perspect*. **1994**, *102*, 143-149.

[90] S. Shibutani, R. Gentles, F. Johnson, A.P. Grollmann, Isolation and characterization of oligodeoxynucleotides containing dG-N2-AAF and oxidation products of dG-C8-AF, *Carcinogenesis* 1991, *12*, 813-818.

[91] Seela, F., Driller, H., Herdering, W., De Clerq, E., Dodecanucleotides containing (E)-5-(3-Bromovinyl)-2´-deoxyuridine: Influence of a bulky majr groove substituent on duplex stability and endodeoxyribonuclease EcoRI recognition, *Nucl. & Nucl.* **1988**, *7*, 347-363.

[92] Seela, F., Grein, T., Samnick, S., 3-Deaza-2´-deoxyadenosine: Synthesis *via* 4-(Methylthio)-1*H*-imidazo[4,5-*c*]pyridine 2´-Deoxyribonucleosides and Properties of Oligonucleotides, *Helv. Chim. Acta* **1992**, *75*, 1639-1650.

[93] Lavery, D.J., Lopez-Molina, L., Fleury-Olela, F., Schibler, U., Selective amplification *via* biotin- and restriction-mediated enrichmanet (SABRE), a novel selective amplification procedure for detection of differentially expressed mRNAs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 6831-6826.

[94] Niemann, G., von Besser, H., Walter, R.D., *Panagrellus redivivus* ornithine decarboxylase: structure of the gene, expression in *Echerichia coli* and characterization of the recombinant protein, *Biochem. J*. **1996**, *317*, 135-140.

[95] Pingoud, A., Jeltsch, A., Structure and function of type II restriction endonucleases, *Nucleic Acids Research* **2001**, *29*, 3705-3727.

[96] Lundberg, K.S., High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from Pyrococcus furiosus, *Gene* **1991**, *108*, 1-6.

[97] Boudsocq, F., Iwai, S., Hanaoka, F., Woodgate, R., Sulfolobus solfataricus P2 DNA Polymerase IV (Dpo4): an archaeal DinB-like DNA polymerase with lesion-bypass properties akin to eukaryotic polŋ, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29,* 4607-4616.

[98] Rattray, A.J., Strathern, J.N., Error-prone DNA polymerases: when making a mistake is the only way to get ahead, *Annu. Rev. Genet.* **2003**, *37*, 31-66.

[99] Hoffmann, G.R., Fuchs, R.P.P., Mechanism of Frameshift Mutations: Insight from Aromatic Amines *Chem. Res. Toxicol.* **1997***, 10(4),* 347-359.

[100] Berova, N., Nakanishi, K., Woody, R.W., Circular Dichroism: Principles and Application - 2. Edition, New York, Wiley-VCH **2000**.

[101] www.uni-greifswald.de/~chemie/~biochemIII/doc/CD-Skript_ISA_2009.pdf, letzter Zugriff: 17.08.2010.

[102] Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B., Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 7. überarbeitete Auflage Thieme Verlag **2005**.

[103] Zollinger, H., Iqbal, A., Color Chemistry: Syntheses, Properties, and Applications of Organic Dyes and Pigments., 3. Aufl. *Helv. Chim. Acta*, Wiley-VCH, Weinheim **2003**.

[104] Bonela, R., Torres, M., Charles. R., Johnson, F., Synthesis of the PhIP Adduct of 2'-Deoxyguanosine and Its Incorporation into Oligomeric DNA, *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19*, 734-738.

[105] Fors, B. P., Watson, D. A., Donald, A., Biscoe, M., Buchwald, S. L., A Highly Active Catalyst for Pd-Catalyzed Amination Reactions: Cross-Coupling Reactions Using Aryl Mesylates and the Highly Selective Monoarylation of Primary Amines Using Aryl Chlorides, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13552-13554.

[106] Ronne, E., Grivas, S., Olsson, K., Synthetic routes to the carcinogen IQ and related 3H-imidazo[4,5-f]quinolines, *Acta Chim. Scan.* **1994**, *48*, 823-830.

[107] Bodepudi, V., Shibutani, S., Johnson, F., Synthesis of 2´-deoxy-7,8-dihydro-8-oxoguanosine and 2'-deoxy-7,8-dihydro-8-oxoadenosine and their incorporation into oligomeric DNA, *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5*, 608-617.

[108] Chatgilialoglu, C., Navacchia, M. L., Postigo, A., A facile one-pot synthesis of 8-oxo-7,8-dihydro-(2'-deoxy)adenosine in water, *Tet. Lett.* **2006**, *47*, 711-714.

[109] Dwyer-Hallquist, P, Kezdy, F.J., Agarwal, K.L., Interaction of the Hpal endonuclease with synthetic oligonucleotides, *Biochemistry* **1982**, *21*, 4693 - 4700.

[110] Organikum, 23. Auflage, Wiley-VCH, **2009,** 92 - 94.

[111] Ayyangar, N.R., Brahme, K.C., Kalkote, U.R., Srinivasan, K.V., Facile Transfer-reduction of Nitroarenes to *N*-Arylhydroxylamines with Hydrazine in the Presence of Raney-Nickel, *Communications,* **1984**, *11*, 938-941.

[112] Takamura-Enya, T., Ishikawa, S., Mochizuki, M., Wakabayashi, K., Chemical Synthesis of 2´-Deoxyguanosine-C8 Adducts with Heterocyclic Amines: An Application to Synthesis of Oligonucleotides Site-Specifically Adducted with 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, *Chemical Research in Toxicology* **2006**, *19*, 770-778.

13. Anhang

Synthese-Protokoll für unmodifizierte Phosphoramidite

Schritt	Funktion	Zeit [s]
1	Begin	
2	MeCN to waste	3
3	MeCN to Column	10
4	Reverse Flush	10
5	Block Flush	4
6	Phos Prep	3
7	Column 1 On	
8	Block Vent	2
9	DCI to Waste	1.7
10	Base+DCI to Column	5
11	DCI to Column	2
12	Base+DCI to Column	5
13	DCI to Column	2
14	Base+DCI to Column	5
15	Push to Column	
16	Column 1 Off	
17	Wait	25
18	Cap Prep	3
19	MeCN to Waste	4
20	Reverse Flush	7
21	Block Flush	3
22	Cap to Column	10
23	Wait	5
24	MeCN to Waste	4
25	Reverse Flush	7
26	Block Flush	3
27	Ox. to Column	8
28	MeCN to Waste	4
29	Block Flush	3
30	Wait	15
31	MeCN to Column	10
32	Flush to Waste	6
33	MeCN to Column	10
34	Reverse Flush	7
35	Block Flush	3
36	Start Detrityl	
37	MeCN to Waste	4
38	MeCN to Column	10
39	Reverse Flush	7
40	Block Flush	3
41	If Monitoring	
42	DCM to Column	35
43	Deblok. to Column	3
44	Monitor Trityl	

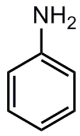
45	Deblok. to Column	85
46	Monitor Noise	
47	Deblok. to Column	10
48	Stop Monitor	
49	MeCN to Column	10
50	Reverse Flush	8
51	If not Monitoring	
52	Deblok. to Column	6
53	Trityl Flush	5
54	Deblok. to Column	6
55	Wait	5
56	Trityl Flush	5
57	Deblok. to Column	6
58	Wait	5
59	Trityl Flush	5
60	Deblok. to Column	6
61	Wait	5
62	Trityl Flush	5
63	MeCN to Column	10
64	Trityl Flush	8
65	End Monitoring	
66	MeCN to Column	8
67	Reverse Flush	7
68	Block Flush	4
69	End	

Synthese-Protokoll für modifizierte Phosphoramidite

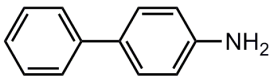
Schritt	Funktion	Zeit [s]
1	Begin	
2	MeCN to waste	3
3	MeCN to Column	10
4	Reverse Flush	10
5	Block Flush	4
6	Phos Prep	3
7	Column 1 On	
8	Block Vent	2
9	DCI to Waste	2
10	DCI to Column	3
11	Base+DCI to Column	5
12	Base+DCI to Column	5
13	Wait	500
14	DCI to Column	3
15	Base+DCI to Column	5
16	Base+DCI to Column	5
17	Wait	500
18	MeCN to Column	5
19	Push to Column	
20	Block Vent	2
21	DCI to Waste	2
22	DCI to Column	3
23	Base+DCI to Column	5
24	Base+DCI to Column	5
25	Wait	500
26	DCI to Column	3
27	Base+DCI to Column	5
28	Base+DCI to Column	5
29	Wait	500
30	MeCN to Column	5
31	Push to Column	
32	Block Vent	2
33	DCI to Waste	2
34	DCI to Column	3
35	Base+DCI to Column	5
36	Base+DCI to Column	5
37	Wait	500
38	DCI to Column	2
39	Base+DCI to Column	5
40	Base+DCI to Column	5
41	Wait	500
42	MeCN to Column	5
43	Push to Column	
44	Block Vent	2
45	Wait	30
46	Cap Prep	3
47	MeCN to Waste	4
48	Reverse Flush	7
49	Block Flush	3

50	Cap to Column	10
51	Wait	5
52	MeCN to Waste	4
53	Reverse Flush	7
54	Block Flush	3
55	Ox. to Column	8
56	MecN to Waste	4
57	Block Flush	3
58	Wait	15
59	MeCN to Column	10
60	Flush to Waste	6
61	MeCN to Column	10
62	Reverse Flush	7
63	Block Flush	3
64	Start Detrityl	
65	MeCN to Waste	4
66	MeCN to Column	10
67	Reverse Flush	7
68	Block Flush	3
69	If Monitoring	
70	DCM to Column	35
71	Deblok. to Column	3
72	Monitor Trityl	
73	Deblok. to Column	85
74	Monitor Noise	
75	Deblok. to Column	10
76	Stop Monitor	
77	MeCN to Column	10
78	Reverse Flush	8
79	If not Monitoring	
80	Deblok. to Column	6
81	Trityl Flush	5
82	Deblok. to Column	6
83	Wait	5
84	Trityl Flush	5
85	Deblok. to Column	6
86	Wait	5
87	Trityl Flush	5
88	Deblok. to Column	6
89	Wait	5
90	Trityl Flush	5
91	MeCN to Column	10
92	Trityl Flush	8
93	End Monitoring	
94	MeCN to Column	8
95	Reverse Flush	7
96	Block Flush	4
97	End	

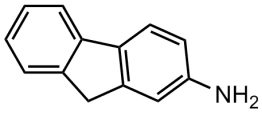
Verbindungsliste



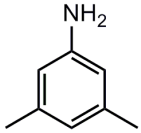
1



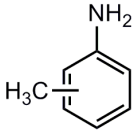
2



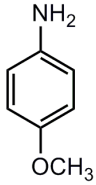
3



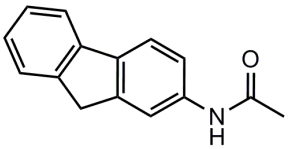
4



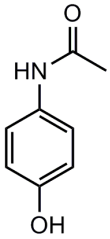
5



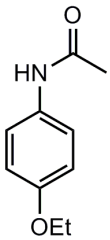
6



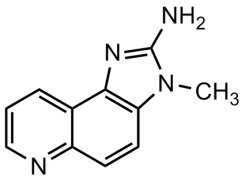
7



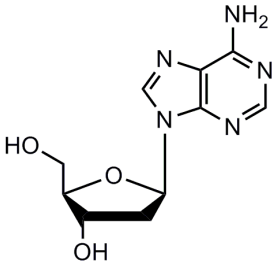
8



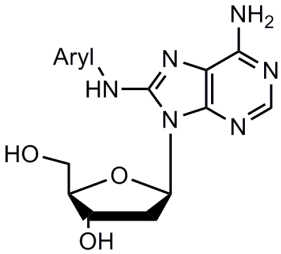
9



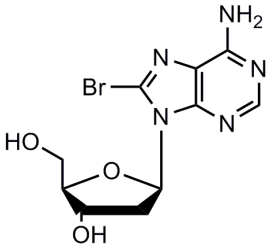
10



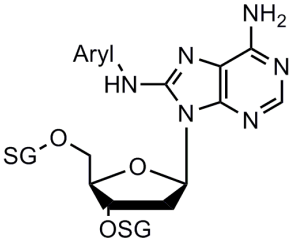
20



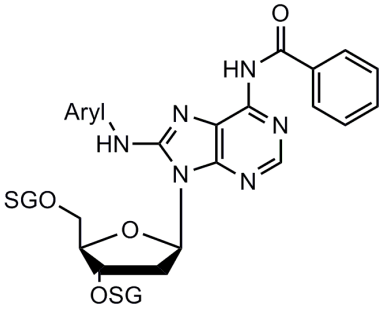
21



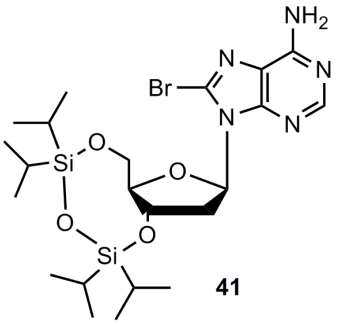
56



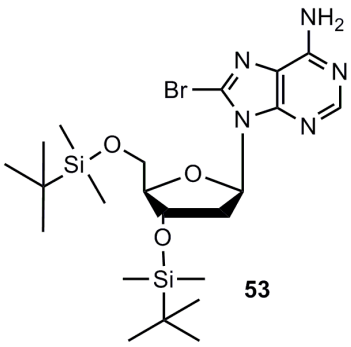
42, 57



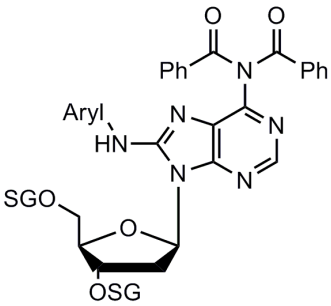
68, 69



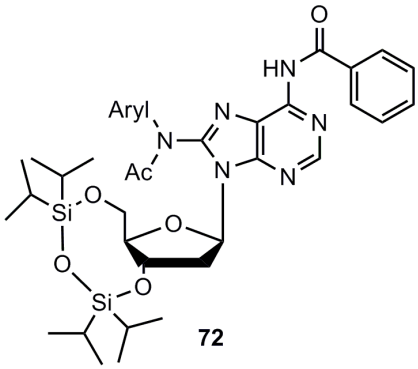
41



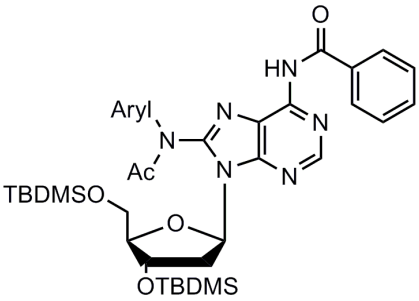
53



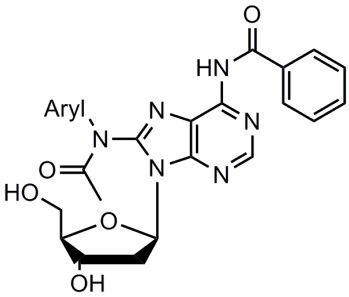
70, 71



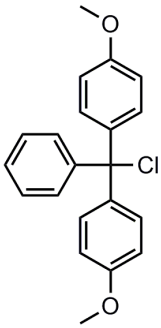
72



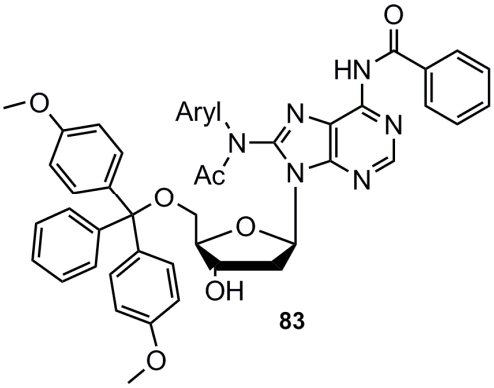
73



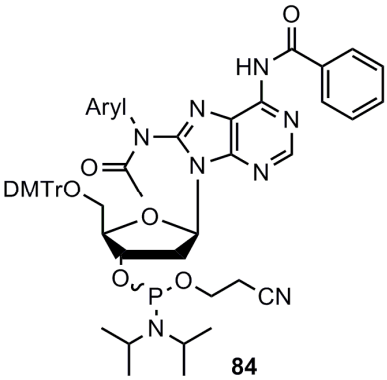
82



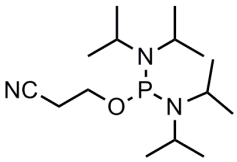
88



83



84



101

Persönliches

Veröffentlichungen

- Böge, N.; Szombati, Z.; Meier, C., Synthesis of DNA-Oligonucleotides Damaged by Arylamine-Modified 2´-Deoxyguanosine, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, *Nucl., Nucl.* **2007**, *26*, 705-708.
- Böge, N., Jacobsen, M.I., Szombati, Z., Bärns, S., Di Pasquale, F., Marx, A., Meier, C., Synthesis of DNA strands site-specifically damaged by C8-arylamine purine adducts and effects on various DNA polymerases, *Chemistry- A European Journal* **2008**, *14*, 11194-11208.
- Synthesis of Arylamine modified 2´-Deoxyadenosine and 2´-Deoxyguanosine Phosphoramidites and their site-specifically Incorporation into Oligonucleotides, *Nucleic Acids Symposium Series* **2010,** 136-137.

Posterbeiträge

Synthesis of Arylamine modified 2´-Deoxyadenosine Phosphoramidites and their site-specifically Incorporation into Oligonucleotides, XIX. International Roundtable, Lyon, 2010.

Persönliche Daten

Zita Szombati

am 21.1.1981 in Mátészalka (Ungarn) geboren

Schul- und Hochschulausbildung

1987-1992	Besuch der Allgemeinen Schule Rákóczi Ferenc II in Mátészalka
1992-1994	Besuch der OS Dorum
1994-2001	Besuch des Kreisgymnasiums Wesermünde
2001	Abschluss Abitur
2001-2006	Beginn des Chemie-Studiums an der Universität Hamburg

2007	Abschluss Diplom (Diplomarbeit: Reaktionsoptimierung und Darstellung von Arylamin-modifizierten 2´-Desoxyadenosin-Derivaten zur Oligonucleotidsynthese) im Arbeitskreis von Prof. Dr. C. Meier im Institut für Organische Chemie an der Universität Hamburg
2007-2010	Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. C. Meier im Institut für Organische Chemie an der Universität Hamburg

Universitäre Arbeiten

2007	Betreuung des Medizienerpraktikums
2007-2010	Betreuung des „Integrierten Synthesepraktikums“
	Betreuung des „Fortgeschrittenenpraktikum in Organischer Chemie“
	Betreuung von Praktikanten im fortgeschrittenem Studium
	Betreuung des „Nebenfachpraktikums“ für Nebenfächler in Chemie

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwandt habe.
Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.
Ich habe früher außer mit den im Zulassungsversuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Hamburg, den 01.03.2011