

**Synthese C8-Arylamin-modifizierter  
2'-Desoxyguanosinderivate und deren Einbau in  
Oligonucleotide**



**Dissertation**

**zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades**

von

Sonja Gräsl

vorgelegt dem Fachbereich Chemie  
der Universität Hamburg

Hamburg

2005

**Synthese C8-Arylamin-modifizierter  
2'-Desoxyguanosinderivate und deren Einbau in  
Oligonucleotide**



**Dissertation**

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

von

Sonja Gräsl

vorgelegt dem Fachbereich Chemie  
der Universität Hamburg

Hamburg

2005



1. Gutachter: Prof. Dr. C. Meier

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

Datum der Disputation: 08.04.2005



*meinen Eltern und Christian*



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Chris Meier am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg in der Zeit von Mai 2000 bis September 2004 angefertigt.

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. C. Meier für die Überlassung des interessanten und abwechslungsreichen Themas sowie für die Freiheiten bei der Bearbeitung desselben. Ferner danke ich ihm für die gute Betreuung der Arbeit und für die hervorragenden experimentellen Bedingungen zu ihrer Durchführung sowie für zahlreiche Diskussionen und Anregungen.

Für die Durchführung und Hilfe bei den molekularbiologischen Untersuchungen danke ich Herrn Prof. Dr. A. Marx sowie Frau Dipl. Chem. I. Detmer und Herrn M. Wieland von der Universität Konstanz.

Den Firmen Proligo in Hamburg und Biospring in Frankfurt danke ich für die Synthese einiger Oligonucleotide.

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

Frau Meiners und Herrn Dr. N. Nagorny von der Universität Hamburg und Frau Feiling von der Universität Osnabrück danke ich für die Messung zahlreicher Massenspektren.

Für die Anfertigung der Röntgenstrukturanalysen danke ich Herrn Dr. G. Adiwidjaja, Herrn Dipl. Chem. B. Wilde und Frau Dipl. Chem. A. Jaenschke von der Universität Hamburg.

Mein Dank gilt allen aktiven und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises Meier für die gute Zusammenarbeit, stete Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima, und besonders meinen Laborkolleginnen Mirjam Rose und Christine Griebel für das gute Laborklima und ihre tatkräftige Hilfe bei meiner Arbeit.

Herrn Dipl. Chem. A. Hohlfeld danke ich für die gute Zusammenarbeit im Bereich der Oligonucleotidsynthese und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Meinem Freund, Dr. Christian Müller, danke ich für seine Geduld, für die kritische Durchsicht des Manuskripts, sowie seine fortwährende Unterstützung und kritische Anteilnahme an dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich meine gesamte Ausbildung hindurch unterstützt haben.





## Abkürzungen und Symbole

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
Bn	Benzyl
BOC <sub>2</sub> O	Di- <i>tert</i> -Butyldicarbonat
CPE	Cyanophenylethyl
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett
dA	2'-Desoxyadenosin
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
dC	2'-Desoxycytosin
dG	2'-Desoxyguanosin
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
1,2-DME	1,2-Dimethoxyethan
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimethylsulfoxid (sechsfach deuteriert)
DMTr	4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dT	2'-Desoxythymidin
ESI	Elektrosprayionisierung
FAB	fast atom bombardment
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
<i>i</i> Bu	<i>iso</i> -Butyryl
IQ	2-Amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]quinolin
<i>J</i>	skalare Kern-Kern-Kopplungskonstante
m	Multipllett
M	Molar
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MS	Massenspektrometrie
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PhIP	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin
PPh <sub>3</sub>	Triphenylphosphin

ppm	parts per million
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
R <sub>t</sub>	Raumtemperatur
s	Singulett
sept	Septett
t	Triplett
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
t <sub>R</sub>	Retentionszeit
UV	Ultraviolett



## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>KENNTNISSTAND</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>VORKOMMEN UND STRUKTUR AROMATISCHER AMINE</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>METABOLISMUS AROMATISCHER AMINE</b>	<b>5</b>
2.2.1	OXIDATION (PHASE I)	6
2.2.2.	AKTIVIERUNG ZU ULTIMATEN CARCINOGENEN (PHASE II)	6
2.2.3	REAKTIONEN ULTIMALER CARCINOGENE MIT DER DNA	9
2.2.4	MECHANISMUS DER ADDUKTBILDUNG IN VIVO	11
2.2.5	NACHWEIS DER MUTAGENITÄT UND CANCEROGENITÄT	12
2.2.6.	AUSWIRKUNGEN DER C8-ADDUKTE AUF DNA-EBENE	13
<b>2.3</b>	<b>CHEMISCHE SYNTHESE VON ARYLAMIN-ADDUKTEN</b>	<b>16</b>
2.3.1	ELEKTROPHILE ARYLAMINIERUNG	16
2.3.2	NUCLEOPHILE ARYLAMINIERUNG	18
2.3.3	PALLADIUM-KATALYSIERTE C-N-BINDUNGSKNÜPFUNG	20
<b>2.4.</b>	<b>SYNTHESE VON OLIGONUCLEOTIDEN</b>	<b>21</b>
<b>3.</b>	<b>AUFGABENSTELLUNG</b>	<b>25</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTATE UND DISKUSSION</b>	<b>27</b>
<b>4.1</b>	<b>SYNTHESE DER C8-ARYLAMIN-MODIFIZIERTEN OLIGONUCLEOTID- BAUSTEINE</b>	<b>27</b>
4.1.1	EINFÜHRUNG DER ARYLAMINGRUPPE DURCH ELEKTROPHILE AMINIERUNG	28
4.1.2	C-N-BINDUNGSKNÜPFUNG DURCH BUCHWALD-HARTWIG-REAKTION	31
4.1.2.1	Versuch der katalytischen Arylaminierung mit Acetyl-Schutzgruppen	32
4.1.2.2	Palladium-katalysierte C-N-Bindungsknüpfung unter Verwendung eines <i>O</i> <sup>6</sup> -benzylierten 2'-Desoxyguanosinderivates	35
4.1.2.3	Palladium-katalysierte C-N-Bindungsknüpfung unter Verwendung eines <i>O</i> <sup>6</sup> -(4-Cyanophenyl)ethyl-geschützten 2'-Desoxyguanosinderivates	65
<b>4.2</b>	<b>OLIGONUCLEOTIDE</b>	<b>71</b>
4.2.1	SYNTHESE VON STANDARD-OLIGONUCLEOTIDEN	71
4.2.2	SYNTHESE VON MODIFIZIERTEN OLIGONUCLEOTIDEN	72
4.2.3	ENTSCHÜTZUNG UND ISOLIERUNG DER OLIGONUCLEOTIDE	73

4.2.4	REINIGUNG DER OLIGONUCLEOTIDE	74
4.2.4.1	Analytische HPLC	74
4.2.4.2	Reinigung der Oligonucleotide mittels semipräparativer HPLC	74
4.2.5	IDENTIFIZIERUNG DURCH MASSENSPEKTROMETRIE	76
4.2.6	MESSUNG DER SCHMELZTEMPERATUREN ( $T_M$ -WERTE)	76
4.2.7	MESSUNG DER CD-SPEKTREN	80
4.2.8	MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DER 37MERE	84
4.2.8.1	„ständig-start“-Primer-Verlängerung	86
4.2.8.2	„standing-start +1“-Primer-Verlängerung	90
4.2.8.3	Kinetikmessung von „standing-start +1“-Primer-Verlängerungen durch <i>Pol β</i>	93
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>95</b>
<b>6.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>100</b>
<b>7.</b>	<b>AUSBLICK</b>	<b>102</b>
<b>8.</b>	<b>EXPERIMENTALTEIL</b>	<b>104</b>
<b>8.1</b>	<b>ALLGEMEINES</b>	<b>104</b>
8.1.1	LÖSUNGSMITTEL	104
8.1.2	VERWENDETE PUFFER UND REAGENZIEN	105
8.1.3	CHROMATOGRAPHIE	106
8.1.3.1	Dünnschichtchromatographie (DC)	106
8.1.3.2	Zirkulare, zentrifugale Dünnschichtchromatographie (CCTLIC)	106
8.1.3.3	Präparative Säulenchromatographie (Flash-Chromatographie)	107
8.1.3.4	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	107
8.1.4	KERNRESONANZSPEKTROSKOPIE (NMR)	109
8.1.5	MASSENSPEKTROMETRIE (MS)	109
<b>8.2</b>	<b>GERÄTE</b>	<b>110</b>
8.2.1	GEFRIERTROCKNUNG	110
8.2.2	THERMOMIXER	110
8.2.3	SPEED-VAC-PROBENKONZENTRATOR	110
8.2.4	ZENTRIFUGE	110
8.2.5	DNA-SYNTHESIZER	110
8.2.6	UV-SPEKTROMETER	110
8.2.7	CD-SPEKTROMETER	110
<b>8.3</b>	<b>OLIGONUCLEOTIDE</b>	<b>111</b>

8.3.1	SYNTHESE VON OLIGONUCLEOTIDEN	111
8.3.2	ENTSCHÜTZUNG UND TRÄGERABSPALTUNG	111
8.3.3	FESTPHASENEXTRAKTION	112
8.3.4	AUFREINIGUNG DER OLIGONUCLEOTIDE	112
8.3.5	ANALYTIK DER OLIGONUCLEOTIDE	112
8.3.5.1	Bestimmung der Optischen Dichte (OD260)	112
8.3.5.2	Bestimmung der Reinheit per analytischer HPLC	113
8.3.5.3	Bestimmung der Schmelztemperaturen (T <sub>m</sub> -Werte)	113
8.3.5.4	Messung der CD-Spektren	114
8.3.6	MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	114
8.3.6.1	Methoden	114
8.3.6.2	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	116
<b>8.4</b>	<b>DARSTELLUNGEN</b>	<b>117</b>
8.4.1	ALLGEMEINE ARBEITSVORSCHRIFTEN	117
8.4.1.1	Darstellung der Arylamin-Addukte durch Buchwald-Hartwig-Reaktion (AAV 1)	117
8.4.1.2	Desilylierung der <i>N</i> <sup>2</sup> - <i>i</i> -Butyryl- <i>O</i> <sup>6</sup> -benzyl-8- <i>N</i> -arylamino-3',5'-bis( <i>t</i> -butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosinderivate (AAV 2)	118
8.4.1.3	Debenzylierung der <i>N</i> <sup>2</sup> - <i>i</i> -Butyryl- <i>O</i> <sup>6</sup> -benzyl-8- <i>N</i> -arylamino-3',5'-bis( <i>t</i> -butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosinderivate (AAV 3)	118
8.4.1.4	Debenzylierung der <i>N</i> <sup>2</sup> - <i>i</i> -Butyryl- <i>O</i> <sup>6</sup> -benzyl-8- <i>N</i> -arylamino-2'-desoxyguanosinderivate (AAV 4)	119
8.4.1.5	Desilylierung der <i>N</i> <sup>2</sup> - <i>i</i> -Butyryl-8- <i>N</i> -arylamino-3',5'-bis( <i>t</i> -butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosinderivate (AAV 5)	119
8.4.1.6	Dimethoxytritylierung der <i>N</i> <sup>2</sup> - <i>i</i> -Butyryl-8- <i>N</i> -arylamino-2'-desoxyguanosinderivate (AAV 6)	120
8.4.1.7	Phosphitylierung der <i>N</i> <sup>2</sup> - <i>i</i> -Butyryl-8- <i>N</i> -arylamino- <i>O</i> 5'-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosinderivate (AAV 7)	120
8.4.2	SYNTHESE VON <i>N</i> -(4-METHYLPHENYL)-PIVALOYLHYDROXAMSÄURE <b>58</b>	121
8.4.3	VERSUCH DER SYNTHESE VON 8- <i>N</i> -(4-METHYLPHENYLAMINO)-2'-DESOXYGUANOSIN <b>59</b>	122
8.4.4	VERSUCH DER SYNTHESE VON <i>N</i> <sup>2</sup> - <i>i</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -(4-METHYLPHENYLAMINO)-2'-DESOXYGUANOSIN <b>60</b>	123
8.4.5.	SYNTHESE VON 3',5'-BISACETYL-2'-DESOXYGUANOSIN <b>64</b>	124

8.4.6	BROMIERUNG VON 3',5'-BISACETYL-2'-DESOXYGUANOSIN <b>64</b>	125
8.4.7	SYNTHESE VON <i>N</i> <sup>2</sup> - <i>I</i> -BUTYRYL-8-BROM-3',5'-BISACETYL-2'- DESOXYGUANOSIN <b>62</b>	126
8.4.8	VERSUCHTE SYNTHESE VON <i>N</i> <sup>2</sup> - <i>I</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -(4-METHYLPHENYLAMINO)- 3',5'-BISACETYL-2'-DESOXYGUANOSIN <b>65</b>	127
8.4.9	Synthese von 8-Brom-2'-desoxyguanosin (Br-dG) <b>70</b>	127
8.4.10	Synthese von 8-Brom-3',5'-bis( <i>t</i> -butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin <b>69</b>	128
8.4.11	Synthese von <i>O</i> <sup>6</sup> -Benzyl-8-brom-3',5'-bis( <i>t</i> -butyldimethylsilyl)-2'- desoxyguanosin <b>68</b>	129
8.4.12	SYNTHESE VON <i>N</i> <sup>2</sup> -BIS( <i>T</i> -BUTYLOXYCARBONYL)- <i>O</i> <sup>6</sup> -BENZYL-8-BROM-3',5'- BIS( <i>T</i> -BUTYLDIMETHYLSILYL)-2'-DESOXYGUANOSIN <b>67</b>	130
8.4.13	SYNTHESE VON <i>N</i> <sup>2</sup> - <i>T</i> -BUTYLOXYCARBONYL- <i>O</i> <sup>6</sup> -BENZYL-8-BROM-3',5'- BIS( <i>T</i> -BUTYLDIMETHYLSILYL)-2'-DESOXYGUANOSIN <b>71</b>	131
8.4.14	SYNTHESE VON <i>N</i> <sup>2</sup> -BIS( <i>T</i> -BUTYLOXYCARBONYL)- <i>O</i> <sup>6</sup> -BENZYL-8- <i>N</i> -(4- METHYLPHENYLAMINO)-3',5'-BIS( <i>T</i> -BUTYLDIMETHYLSILYL)-2'- DESOXYGUANOSIN <b>72</b>	132
8.4.15	VERSUCH DER SYNTHESE VON <i>O</i> <sup>6</sup> -BENZYL-8- <i>N</i> -(4-METHYLPHENYLAMINO)- 3',5'-BIS( <i>T</i> -BUTYLDIMETHYLSILYL)-2'-DESOXYGUANOSIN <b>73</b>	133
8.4.16	SYNTHESE VON <i>N</i> <sup>2</sup> -BIS( <i>I</i> -BUTYRYL)- <i>O</i> <sup>6</sup> -BENZYL-3',5'-BIS( <i>T</i> - BUTYLDIMETHYLSILYL)-2'-DESOXYGUANOSIN <b>74</b>	134
8.4.17	SYNTHESE VON <i>N</i> <sup>2</sup> -BIS( <i>I</i> -BUTYRYL)- <i>O</i> <sup>6</sup> -BENZYL-8- <i>N</i> -(4- METHYLPHENYLAMINO)-3',5'-BIS( <i>T</i> -BUTYLDIMETHYLSILYL)-2'- DESOXYGUANOSIN <b>75</b>	135
8.4.18	SYNTHESE VON <i>N</i> <sup>2</sup> - <i>I</i> -BUTYRYL- <i>O</i> <sup>6</sup> -BENZYL-8-BROM-3',5'-BIS( <i>T</i> - BUTYLDIMETHYLSILYL)-2'-DESOXYGUANOSIN <b>77</b>	136
8.4.19	SYNTHESE VON <i>N</i> <sup>2</sup> - <i>I</i> -BUTYRYL- <i>O</i> <sup>6</sup> -BENZYL-8- <i>N</i> -PHENYLAMINO-3',5'-BIS( <i>T</i> - BUTYL-DIMETHYLSILYL)-2'-DESOXYGUANOSIN <b>78</b>	137
8.4.20	SYNTHESE VON <i>N</i> <sup>2</sup> - <i>I</i> -BUTYRYL- <i>O</i> <sup>6</sup> -BENZYL-8- <i>N</i> -(4-METHYLPHENYLAMINO)- 3',5'-BIS( <i>T</i> -BUTYLDIMETHYLSILYL)-2'-DESOXYGUANOSIN <b>76</b>	138
8.4.21	SYNTHESE VON <i>N</i> <sup>2</sup> - <i>I</i> -BUTYRYL- <i>O</i> <sup>6</sup> -BENZYL-8- <i>N</i> -(4- METHOXYPHENYLAMINO)-3',5'-BIS( <i>T</i> -BUTYLDIMETHYLSILYL)-2'- DESOXYGUANOSIN <b>79</b>	139
8.4.22	SYNTHESE VON <i>N</i> <sup>2</sup> - <i>I</i> -BUTYRYL- <i>O</i> <sup>6</sup> -BENZYL-8- <i>N</i> -(4-CYANOPHENYLAMINO)- 3',5'-BIS( <i>T</i> -BUTYLDIMETHYLSILYL)-2'-DESOXYGUANOSIN <b>80</b>	140



8.4.23	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL- $O^6$ -BENZYL-8- <i>N</i> -(2-FLUORENYLAMINO)-3',5'-BIS( <i>T</i> -BUTYLDIMETHYLSILYL)-2'-DESOXYGUANOSIN <b>81</b>	141
8.4.24	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL- $O^6$ -BENZYL-8- <i>N</i> -(4-BIPHENYLAMINO)-3',5'-BIS( <i>T</i> -BUTYLDIMETHYLSILYL)-2'-DESOXYGUANOSIN <b>82</b>	143
8.4.25	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL- $O^6$ -BENZYL-8- <i>N</i> -(3-PYRIDINYLAMINO)-3',5'-BIS( <i>T</i> -BUTYLDIMETHYLSILYL)-2'-DESOXYGUANOSIN <b>83</b>	144
8.4.26	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL- $O^6$ -BENZYL-8- <i>N</i> -PHENYLAMINO-2'-DESOXYGUANOSIN <b>85</b>	145
8.4.27	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL- $O^6$ -BENZYL-8- <i>N</i> -(4-METHYLPHENYLAMINO)-2'-DESOXYGUANOSIN <b>84</b>	146
8.4.28	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL- $O^6$ -BENZYL-8- <i>N</i> -(4-METHOXYPHENYLAMINO)-2'-DESOXYGUANOSIN <b>86</b>	147
8.4.29	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL- $O^6$ -BENZYL-8- <i>N</i> -(4-CYANOPHENYLAMINO)-2'-DESOXYGUANOSIN <b>87</b>	148
8.4.30	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL- $O^6$ -BENZYL-8- <i>N</i> -(4-BIPHENYLAMINO)-2'-DESOXY-GUANOSIN <b>88</b>	149
8.4.31	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -PHENYLAMINO-3',5'-BIS( <i>T</i> -BUTYLDIMETHYLSILYL)-2'-DESOXYGUANOSIN <b>93</b>	150
8.4.32	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -(4-METHYLPHENYLAMINO)-3',5'-BIS( <i>T</i> -BUTYLDIMETHYL-SILYL)-2'-DESOXYGUANOSIN <b>92</b>	151
8.4.33	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -(4-METHOXYPHENYLAMINO)-3',5'-BIS( <i>T</i> -BUTYL-DIMETHYLSILYL)-2'-DESOXYGUANOSIN <b>94</b>	152
8.4.34	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -(4-CYANOPHENYLAMINO)-3',5'-BIS( <i>T</i> -BUTYLDI-METHYLSILYL)-2'-DESOXYGUANOSIN <b>95</b>	153
8.4.35	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -(2-FLUORENYLAMINO)-3',5'-BIS( <i>T</i> -BUTYLDIMETHYLSILYL)-2'-DESOXYGUANOSIN <b>96</b>	154
8.4.36	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -(4-BIPHENYLAMINO)-3',5'-BIS( <i>T</i> -BUTYLDIMETHYLSILYL)-2'-DESOXYGUANOSIN <b>97</b>	155
8.4.37	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -(3-PYRIDINYLAMINO)-3',5'-BIS( <i>T</i> -BUTYLDIMETHYLSILYL)-2'-DESOXYGUANOSIN <b>98</b>	156
8.4.38	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -PHENYLAMINO-2'-DESOXYGUANOSIN <b>89</b> DURCH DEBENZYLIERUNG	157
8.4.39	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -(4-METHYLPHENYLAMINO)-2'-DESOXYGUANOSIN <b>60</b> DURCH DEBENZYLIERUNG	158

8.4.40	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -(4-METHOXYPHENYLAMINO)-2'- DESOXYGUANOSIN <b>90</b> DURCH DEBENZYLIERUNG	159
8.4.41	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -(4-BIPHENYLAMINO)-2'- DESOXYGUANOSIN <b>91</b> DURCH DEBENZYLIERUNG	160
8.4.42	VERSUCHTE SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -(4-CYANOPHENYLAMINO)- 2'-DESOXYGUANOSIN <b>122</b> DURCH DEBENZYLIERUNG	161
8.4.43	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -PHENYLAMINO-2'-DESOXYGUANOSIN <b>89</b> DURCH DESILYLIERUNG	161
8.4.44	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -(4-METHYLPHENYLAMINO)-2'- DESOXYGUANOSIN <b>60</b> DURCH DESILYLIERUNG	162
8.4.45	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -(4-METHOXYPHENYLAMINO)-2'- DESOXYGUANOSIN <b>90</b> DURCH DESILYLIERUNG	162
8.4.46	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -(4-BIPHENYLAMINO)-2'- DESOXYGUANOSIN <b>91</b> DURCH DESILYLIERUNG	163
8.4.47	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -(3-PYRIDINYLAMINO)-2'- DESOXYGUANOSIN <b>99</b> DURCH DESILYLIERUNG	164
8.4.48	VERSUCHTE SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -(4-CYANOPHENYLAMINO)- 2'-DESOXY-GUANOSIN <b>100</b>	165
8.4.49	SYNTHESE VON 8- <i>N</i> -PHENYLAMINO-2'-DESOXYGUANOSIN <b>101</b> DURCH ENTSCHÜTZUNG DER EXOCYCLISCHEN AMINOGRUPPE	167
8.4.50	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -PHENYLAMINO- $O5'$ -DIMETHOXYTRITYL- 2'-DESOXY-GUANOSIN <b>107</b>	168
8.4.51	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -(4-METHYLPHENYLAMINO)- $O5'$ - DIMETHOXYTRITYL-2'-DESOXYGUANOSIN <b>106</b>	169
8.4.52	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -(4-METHOXYPHENYLAMINO)- $O5'$ - DIMETHOXYTRITYL-2'-DESOXYGUANOSIN <b>108</b>	170
8.4.53	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -(4-BIPHENYLAMINO)- $O5'$ - DIMETHOXYTRITYL-2'-DESOXYGUANOSIN <b>109</b>	171
8.4.54	SYNTHESE DES PHOSPHITYLIERUNGSREAGENZES BIS- $N,N'$ - DIISOPROPYLAMINO-(2-CYANOETHYL)-PHOSPHIT <b>112</b>	172
8.4.54.1	Synthese von 2-Cyanoethylphosphordichlorid <b>111</b>	172
8.4.54.2	Synthese von Bis- $N,N'$ -Diisopropylamino-(2-cyanoethyl)-phosphit <b>112</b>	173

8.4.55	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -PHENYLAMINO- $O3'$ -[(2-CYANOETHOXY)-( <i>N,N</i> -DIISOPROPYLAMINO)PHOSPHINYL]- $O5'$ -DIMETHOXYTRITYL- $2'$ -DESOXYGUANOSIN <b>103</b>	174
8.4.56	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -(4-METHYLPHENYLAMINO)- $O3'$ -[(2-CYANOETHOXY)-( <i>N,N</i> -DIISOPROPYLAMINO)PHOSPHINYL]- $O5'$ -DIMETHOXYTRITYL- $2'$ -DESOXYGUANOSIN <b>102</b>	175
8.4.57	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -(4-METHOXYPHENYLAMINO)- $O3'$ -[(2-CYANOETHOXY)-( <i>N,N</i> -DIISOPROPYLAMINO)PHOSPHINYL]- $O5'$ -DIMETHOXYTRITYL- $2'$ -DESOXYGUANOSIN <b>104</b>	177
8.4.58	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -(4-BIPHENYLAMINO)- $O3'$ -[(2-CYANOETHOXY)-( <i>N,N</i> -DIISOPROPYLAMINO)PHOSPHINYL]- $O5'$ -DIMETHOXYTRITYL- $2'$ -DESOXYGUANOSIN <b>105</b>	178
8.4.59	SYNTHESE VON $O^6$ -(4-CYANOPHENYL)ETHYL-8-BROM- $3',5'$ -BIS( <i>T</i> -BUTYLDIMETHYLSILYL)- $2'$ -DESOXYGUANOSIN <b>115</b>	180
8.4.60	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL- $O^6$ -(4-CYANOPHENYL)ETHYL-8-BROM- $3',5'$ -BIS( <i>T</i> -BUTYLDIMETHYLSILYL)- $2'$ -DESOXYGUANOSIN <b>114</b>	181
8.4.61	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL- $O^6$ -(4-CYANOPHENYL)ETHYL-8- <i>N</i> -(4-METHYLPHENYLAMINO)- $3',5'$ -BIS( <i>T</i> -BUTYLDIMETHYLSILYL)- $2'$ -DESOXYGUANOSIN <b>113</b>	182
8.4.62	DARSTELLUNG VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL-8- <i>N</i> -(4-METHYLPHENYLAMINO)- $3',5'$ -BIS( <i>T</i> -BUTYLDIMETHYLSILYL)- $2'$ -DESOXYGUANOSIN <b>92</b> DURCH ABSPALTUNG DER CPE-SCHUTZGRUPPE	184
8.4.63	DARSTELLUNG VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL- $O^6$ -(4-CYANOPHENYL)ETHYL-8- <i>N</i> -(4-METHYLPHENYLAMINO)- $2'$ -DESOXYGUANOSIN <b>118</b> DURCH ABSPALTUNG DER TBDMS-SCHUTZGRUPPEN	185
8.4.64	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL- $O^6$ -(4-CYANOPHENYL)ETHYL-8- <i>N</i> -(4-METHYLPHENYLAMINO)- $O5'$ -DIMETHOXYTRITYL- $2'$ -DESOXYGUANOSIN <b>119</b>	186
8.4.65	SYNTHESE VON $N^2$ - <i>I</i> -BUTYRYL- $O^6$ -(4-CYANOPHENYL)ETHYL-8- <i>N</i> -(4-METHYLPHENYLAMINO)- $O3'$ -[(2-CYANOETHOXY)-( <i>N,N</i> -DIISOPROPYLAMINO)PHOSPHINYL]- $O5'$ -DIMETHOXYTRITYL- $2'$ -DESOXYGUANOSIN <b>120</b>	187
<b>8.5</b>	<b>OLIGONUCLEOTIDE</b>	<b>189</b>
8.5.1	SYNTHESE DER STANDARD-OLIGONUCLEOTIDE	189
8.5.1.1	Synthese des Standard-Oligonucleotids <b>133</b>	189

8.5.1.2	Synthese des Standard-Oligonucleotids <b>134</b>	189
8.5.1.3	Synthese des Standard-Oligonucleotids <b>135</b>	189
8.5.1.4	Synthese des Standard-Oligonucleotids <b>136</b>	190
8.5.1.5	Synthese des Standard-Oligonucleotids <b>137</b>	190
8.5.1.6	Synthese des Standard-Oligonucleotids <b>138</b>	190
8.5.1.7	Synthese des Standard-Oligonucleotids <b>139</b>	191
8.5.1.8	Synthese des Standard-Oligonucleotids <b>140</b>	191
8.5.2	SYNTHESE DER MODIFIZIERTEN OLIGONUCLEOTIDE	191
8.5.2.1	Synthese des Anilin-modifizierten Oligonucleotids <b>123</b>	191
8.5.2.2	Synthese des p-Toluidin-modifizierten Oligonucleotids <b>124</b>	192
8.5.2.3	Synthese des p-Anisidin-modifizierten Oligonucleotids <b>125</b>	192
8.5.2.4	Synthese des 4-Aminobiphenyl-modifizierten Oligonucleotids <b>126</b>	192
8.5.2.5	Synthese des p-Toluidin-modifizierten Oligonucleotids <b>127</b>	193
8.5.2.6	Synthese des 4-Aminobiphenyl-modifizierten Oligonucleotids <b>128</b>	193
8.5.2.7	Synthese des Anilin-modifizierten Oligonucleotids <b>129</b>	193
8.5.2.8	Synthese des p-Toluidin-modifizierten Oligonucleotids <b>130</b>	194
8.5.2.9	Synthese des p-Anisidin-modifizierten Oligonucleotids <b>131</b>	194
8.5.2.10	Synthese des 4-Aminobiphenyl-modifizierten Oligonucleotids <b>132</b>	194
<b>9.</b>	<b>GEFAHRSTOFFE</b>	<b>195</b>
<b>10.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>196</b>
	<b>AUSKLAPPTAFEL</b>	<b>207</b>
	<b>ANHANG</b>	<b>209</b>
	<b>PUBLIKATIONSLISTE</b>	<b>211</b>
	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>212</b>
	<b>EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>214</b>

## 1. Einleitung

In Deutschland steht Krebs als Todesursache hinter Herz- und Kreislauferkrankungen an zweiter Stelle. Heute stirbt bereits jeder vierte Bundesbürger an einem Krebsleiden und in zehn Jahren, so prognostizieren Experten, wird Krebs die häufigste Todesursache in der Bundesrepublik sein.<sup>[1]</sup> Die Krankheit ist aufgrund ihrer Häufigkeit und ihres oft langwierigen und qualvollen Verlaufs wie kaum eine andere mit Ängsten und Hoffnungslosigkeit verbunden. Den weltweiten Bemühungen zur Erforschung und zur Bekämpfung der Krankheit stehen ihr vielseitiges Erscheinungsbild und ihre unzähligen und oftmals noch unbekanntem Auslöser gegenüber.

Mit dem Wort „Krebs“ bezeichnet man bösartige (maligne) Tumore, die sich von gutartigen Tumoren folgendermaßen unterscheiden lassen: Gutartige Tumore bestehen aus Zellen, die sich wie gesunde Zellen verhalten, sich jedoch in ihrem verstärkten Wachstum von gesunden Zellen unterscheiden. Dies ist ungefährlich, solange sie nicht aufgrund ihrer Größe lebenswichtige Organe in ihrer Funktion einschränken. Bösartige Tumore dagegen greifen beim Wachstum gesundes Gewebe an, zerstören es und wandern vom Ursprungsort über die Blutbahnen und Lymphsysteme in andere Organe, wo sie sich als Tochtergeschwülste, sogenannten Metastasen, weiter vermehren.<sup>[2]</sup>

Als Auslöser der Krebserkrankungen spielen dabei endogene Faktoren vor allem Umweltfaktoren eine große Rolle. Hierbei handelt es sich um physikalische (Strahlung), biologische (onkogene Viren) oder chemische Ursachen. Dabei scheinen Chemikalien bei der Induktion von Krebs beim Menschen die größte Rolle zu spielen. Die ersten Befunde über einen Zusammenhang zwischen bestimmten Chemikalien und Krebs stammen aus dem Jahr 1775.<sup>[3]</sup> So berichtete *P. Pott* von einem durch Ruß und Teer verursachten erhöhten Auftreten der sogenannten Rußwarze bei Schornsteinfegern. Der erste Bericht über aromatische Amine als krebsauslösende Substanzen stammt von *L. Rehn* aus dem Jahr 1895.<sup>[4]</sup> Er beobachtete eine merkwürdige Zunahme von Harnblasenkarzinomen bei Arbeitern die in der Produktion von Magenta (Fuchsin) beschäftigt waren. Ausgangsverbindung für die Magenta-Synthese ist Anilin **1**. *Rehn* prägte daraufhin die Bezeichnung „Anilin-Krebs“, die, wie sich später herausstellte, allerdings falsch war, da es sich bei den krebsauslösenden Substanzen um Nebenprodukte der Anilinherstellung, wie 2-Naphthylamin **2**, Benzidin **3**, und 4-Aminobiphenyl **4** handelt (s. Abb. 1, S. 2).

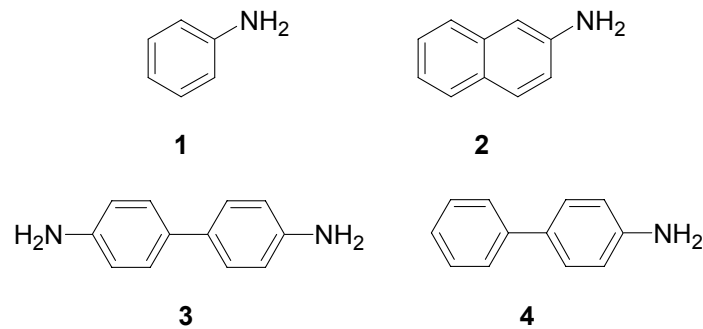


Abb. 1            *Potentiell cancerogene aromatische Amine*

Seither sind neben den aromatischen Aminen auch eine Vielzahl anderer chemischer Verbindungen als Carcinogene identifiziert worden. Hierbei handelt es sich z.B. um polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe<sup>[5]</sup>, heterocyclische aromatische Amine<sup>[6]</sup>, *N*-Nitrosoverbindungen<sup>[7]</sup> oder auch um Alkylierungsreagentien.<sup>[8]</sup>

Dennoch spielen Verbindungen dieser Art in industriellen Prozessen, wie z.B. bei der Herstellung von Farbstoffen, Medikamenten, Kunststoffen oder Sprengstoffen immer noch eine wichtige Rolle.<sup>[9]</sup>

Die chemischen Carcinogene können entweder direkt oder nach Metabolisierung im Körper an die DNA binden und sogenannte DNA-Addukte bilden.<sup>[10]</sup> Da sich diese Arbeit mit der Darstellung und Untersuchung von Addukten von Arylaminen befasst, soll im folgenden bei der Betrachtung der Cancerogenität chemischer Carcinogene der Schwerpunkt auf die aromatischen Amine gelegt werden.

Aromatische Amine werden zu elektrophilen Nitreniumionen metabolisiert, die dann an nucleophilen Stellen der DNA binden können. Durch die entstehenden Addukte kann die Struktur der DNA soweit verändert werden, dass es bei der Transkription zu Mutationen und in deren Folge zu Krebs kommen kann, wenn die zelleigenen Reparaturmechanismen die Veränderung nicht rechtzeitig erkennen und ausschneiden.

Chemisch betrachtet ist der Begriff „DNA-Addukt“ missverständlich, denn bei der Reaktion zwischen Carcinogen und Nucleobase handelt es sich nicht um eine Additionsreaktion, sondern um eine Substitutionsreaktion. Da die Verwendung dieses Begriffs jedoch in diesem Zusammenhang, in der biochemischen Terminologie gebräuchlich ist, und nach wie vor in der Literatur Verwendung findet, wird sie auch hier verwandt.

## 2. Kenntnisstand

### 2.1 Vorkommen und Struktur aromatischer Amine

Aromatische Amine sind in den Industrieländern ubiquitäre Umweltgifte. Sie werden zum Teil schon seit Ende des 19. Jahrhunderts zur Synthese von Substanzen wie Azo-Farbstoffen, Pharmaka, Pestiziden und Polyurethanen benötigt. Noch bis weit in die Mitte des 20. Jahrhunderts hinein waren aromatische Amine aufgrund unzureichender Trennmethode und mangelnden Risikobewusstseins als Verunreinigungen in Farbstoffen oder dem damals verwendeten Straßenteer enthalten.

Auch als Abbauprodukte entstehen aromatische Amine durch Reduktion polycyclischer Nitroaromaten aus Dieselabgasen und synthetischen Treibstoffen. Mehr als ein Dutzend verschiedene heterocyclische, aromatische Amine wurden in gekochtem Fisch oder Fleisch nachgewiesen, meist entstanden durch Pyrolyse von Aminosäuren wie z.B. Tryptophan. Die bekanntesten Vertreter dieser Substanzklasse sind das 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolin (IQ) **5** und 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin (PhIP) **6**<sup>[6, 11]</sup> (s. Abb. 2).

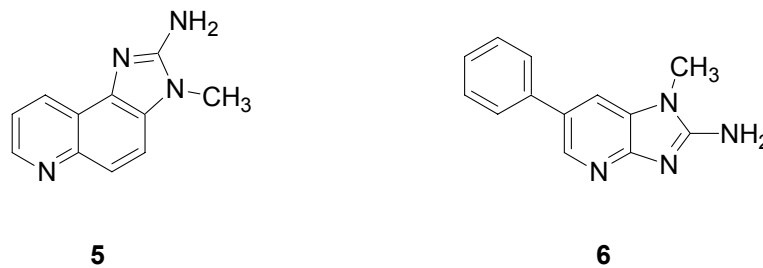


Abb. 2 Carcinogene aromatische Amine in gekochtem Fleisch und Fisch

Zu den am umfangreichsten untersuchten aromatischen Aminen gehören 4-Aminobiphenyl **4** (ABP) und 2-Aminofluoren (2-AF) **7**, sowie dessen acetylierte Form *N*-Acetyl-2-aminofluoren (2-AAF) **8** (s. Abb. 3).

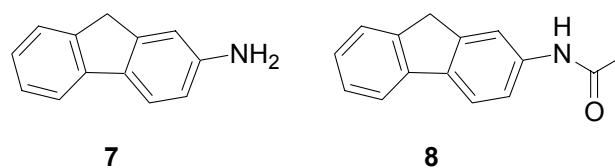


Abb. 3 2-Aminofluoren (2-AF) **7** und *N*-Acetyl-2-aminofluoren (2-AAF) **8**

Dieses wurde bereits 1940 als Pestizid patentiert, gelangte jedoch nie auf den Markt, da bei der Prüfung auf chronische Toxizität an Ratten eine starke carcinogene Wirkung festgestellt wurde.

Neben polycyclischen aromatischen Aminen sind auch monocyclische aromatische Amine für die Carcinogenese von Bedeutung, wenngleich sie in der Regel eine geringere Cancerogenität aufweisen. So ist Anilin **1** ein typisches Grenzcarcinogen. Diese Substanzklasse wird dadurch charakterisiert, dass ihre Fähigkeit zur Tumorindikation nur unter ganz bestimmten Bedingungen, wie hohe Dosierung, Gabe über einen langen Zeitraum, oder die Zugabe eines Comutagens zum Ausdruck kommt.

Monocyclische aromatische Amine wurden unter anderem im Tabakrauch nachgewiesen. So sind neben 2-Naphthylamin **2** auch 4-Aminobiphenyl **4** und zahlreiche Methyl-, Dimethyl-, und Ethylderivate des Anilins **1** Hauptbestandteile der Arylaminfraktion des Tabakrauches.<sup>[12, 13]</sup> Zum Teil wurden auch schon Untersuchungen zur Cancerogenität dieser Verbindungen durchgeführt. *o*-Toluidin **9** zum Beispiel ist schon seit langem als Nager-Carcinogen bekannt.<sup>[14]</sup> 2,6-Xylidin **10** ist ein Hauptmetabolit des Anästhetikums und Antiarrhythmikums Lidocain **11** und seine carcinogenen Eigenschaften in Ratten wurden nachgewiesen.<sup>[15]</sup> Ein weiteres Beispiel ist das Antipyretikum und Analgetikum Phenacetin **12**, dass auf Grund der carcinogenen Eigenschaften seines Metaboliten Phenetidin **13** 1984 vom Markt genommen werden musste (s. Abb. 4).

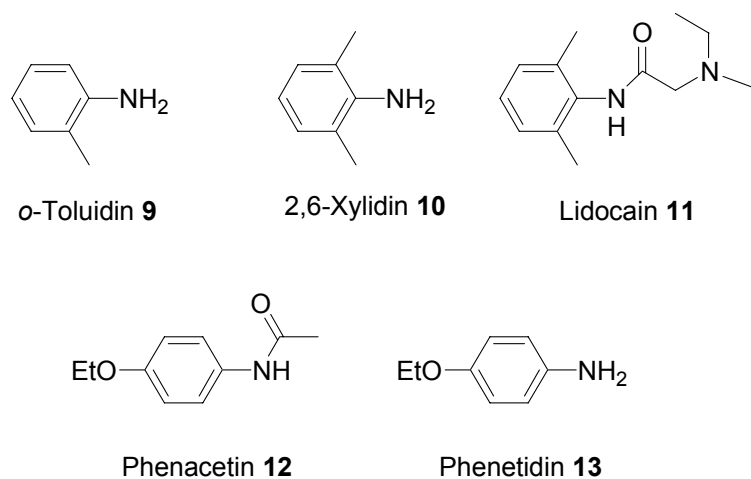


Abb. 4 Pharmakologisch relevante, monocyclische aromatische Amine und Amide

Obwohl der exakte Ablauf der Carcinogenese bei den genannten Verbindungen sehr unterschiedlich sein kann, bleibt deren Wirkungsweise immer gleich. Durch enzymatische Oxidation entsteht aus dem Amin das entsprechende Hydroxylamin. Dieses wird durch weitere Aktivierung (Protonierung, *O*-Acetylierung, *O*-Sulfatierung) und Abspaltung einer



auf diese Weise entstandenen Abgangsgruppe in ein extrem reaktives Nitreniumion überführt. Das Nitreniumion kann nun seinerseits mit den Basen der DNA reagieren und Addukte bilden die möglicherweise Mutationen auslösen und so zu Krebs führen können.

## 2.2 Metabolismus aromatischer Amine

Gelangen aromatische Amine in den Körper, setzt ein Detoxifizierungsmechanismus ein, der zum Ziel hat, die körperfremden Stoffe wasserlöslich zu machen, um sie dann ausscheiden zu können. Der erste Schritt dieser Reaktion geschieht durch enzymatische Oxidation (Phase I) am aromatischen Ring zu Phenol-Derivaten (C-Oxidation). Der zweite Schritt ist meistens eine Veresterung (Phase II) der Hydroxylgruppe zu einer wasserlöslichen Verbindung, die dann über Nieren und Harntrakt ausgeschieden werden kann.

Aus Arbeiten von *J.W. Cramer*, *J.A. Miller* und *E.C. Miller* wurde bekannt, dass gerade dem ersten Schritt, der Oxidation aromatischer Amine eine Schlüsselrolle für deren Carcinogenität zukommt.<sup>[16]</sup> Da die Enzymsysteme, die die Oxidation katalysieren, relativ unspezifisch sind, kann eine Oxidation nicht nur am aromatischen Ring, sondern auch am Stickstoff stattfinden (*N*-Oxidation). Dadurch werden aromatische Amine **14** bzw. Amide **15** zu *N*-Hydroxylaminen **16** bzw. Hydroxamsäuren **17**, sogenannten proximativen Carcinogenen, die dann durch Veresterung zu den sogenannten ultimativen Carcinogenen, den Hydroxylaminestern **16a** bzw. Hydroxamsäureestern **17a** aktiviert werden (s. Abb. 5, S. 6).

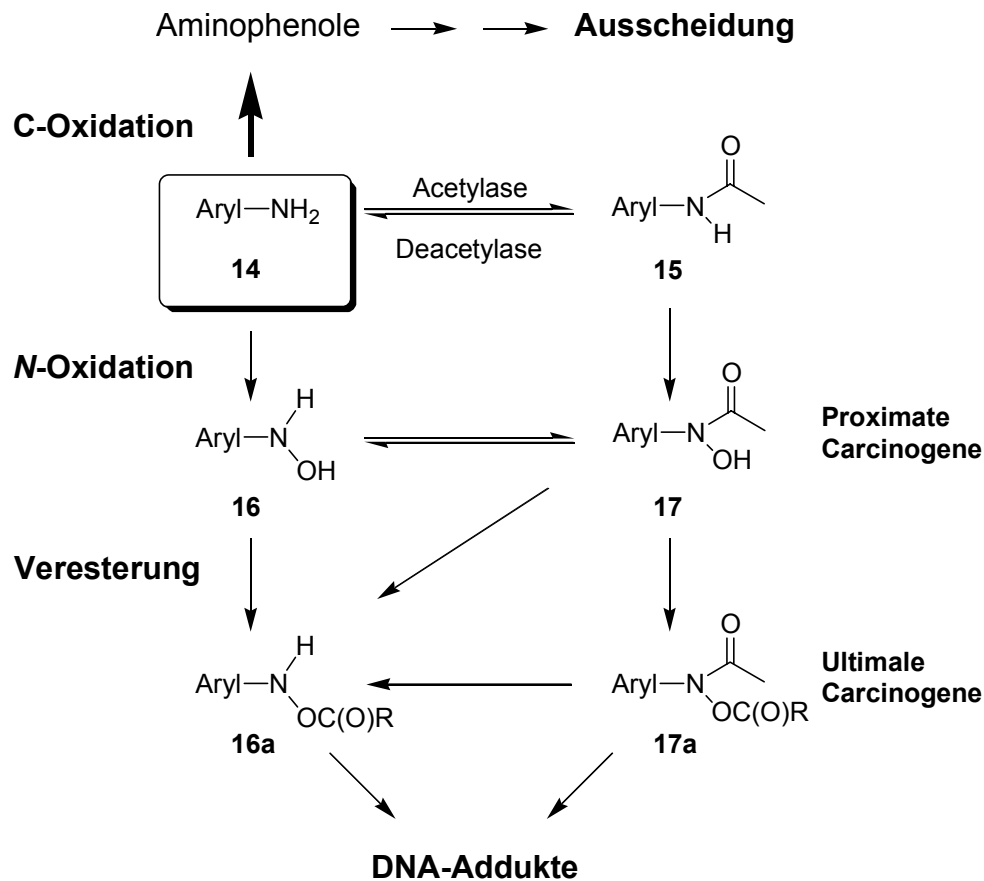


Abb. 5 *Metabolismus aromatischer Amine*

### 2.2.1 Oxidation (Phase I)

Aromatische Amine werden relativ unspezifisch durch verschiedene Enzymsysteme am Ring oder am Stickstoff oxidiert. Zum Beispiel durch Cytochrom P450-abhängige und Flavin-haltige Monooxygenasen<sup>[17,18]</sup>, peroxydative Enzyme wie die Prostaglandin-H-Synthethasen (PHS)<sup>[19,20,21,22]</sup> oder Prostaglandin-Endoperoxid-Synthetasen (PES) bzw. Meerrettichperoxidasen.<sup>[23,24]</sup> Desweiteren ist auch eine nicht-enzymatische Oxidation aromatischer Amine und Amide zu den entsprechenden *N*-Oxiden bekannt. Sie findet im endoplasmatischen Retikulum hepatischer Zellen mit molekularem Sauerstoff und NADPH<sub>2</sub> statt.

### 2.2.2. Aktivierung zu ultimativen Carcinogenen (Phase II)

An den ersten Aktivierungsschritt (Phase I) zu den proximativen Carcinogenen, den *N*-hydroxylierten Verbindungen **16** und **17**, schließt sich ein weiterer Schritt zu den ultimativen Carcinogenen an. Hierbei handelt es sich meist um eine enzymatische Veresterung der

*N*-Hydroxylgruppe. Die vorher nucleophilen aromatischen Amine werden somit durch eine Umpolungsreaktion in elektrophile Aminierungsreagenzien umgewandelt. Diese Veresterung wird, wie die *N*-Oxidation, durch eine Vielzahl von Enzymsystemen katalysiert.<sup>[25,26]</sup>

Je nach Spezies und Organ treten eine Reihe von Aktivierungswegen auf, die im weiteren kurz zusammengefasst werden sollen.

#### O-Sulfonylierung

Die Bildung des Sulfatesters wird durch das Enzym Sulfotransferase katalysiert, das Cosubstrat 2'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) dient als Sulfatcarrier. Als Hauptmetabolit resultiert allerdings selbst bei Verabreichung von Hydroxamsäuren **17** nicht der Hydroxamsäureester **17a**, sondern der Hydroxylamin-Sulfatester.<sup>[27]</sup> Dies lässt auf eine vorgelagerte Deacetylierung der Hydroxamsäure **17** zum Hydroxylamin **16** schließen.<sup>[28]</sup> Die Sulfonylierung der Hydroxylfunktion erfolgt erst anschließend.

#### O-Glucuronylierung

Die Glucuronsäureester **19** spielen ebenso wie bei der Detoxifikation auch bei der Aktivierung eine Rolle und entstehen durch Veresterung mit UDP-Glucuronat (aktivierte Glucuronsäure). Die Ester **19** sind bei physiologischem pH-Wert relativ stabil und gelten als Transportform. Durch bakterielle  $\beta$ -Glucuronidasen im Darm<sup>[29]</sup> oder durch saure Bedingungen im Harntrakt (pH=5)<sup>[30]</sup> können diese Ester jedoch wieder gespalten werden (siehe auch *O*-Protonierung).

An diesem Beispiel wird noch einmal der schmale Grat zwischen Entgiftung und Aktivierung zum ultimatsten Carcinogen deutlich (s. Abb. 6, S. 8).

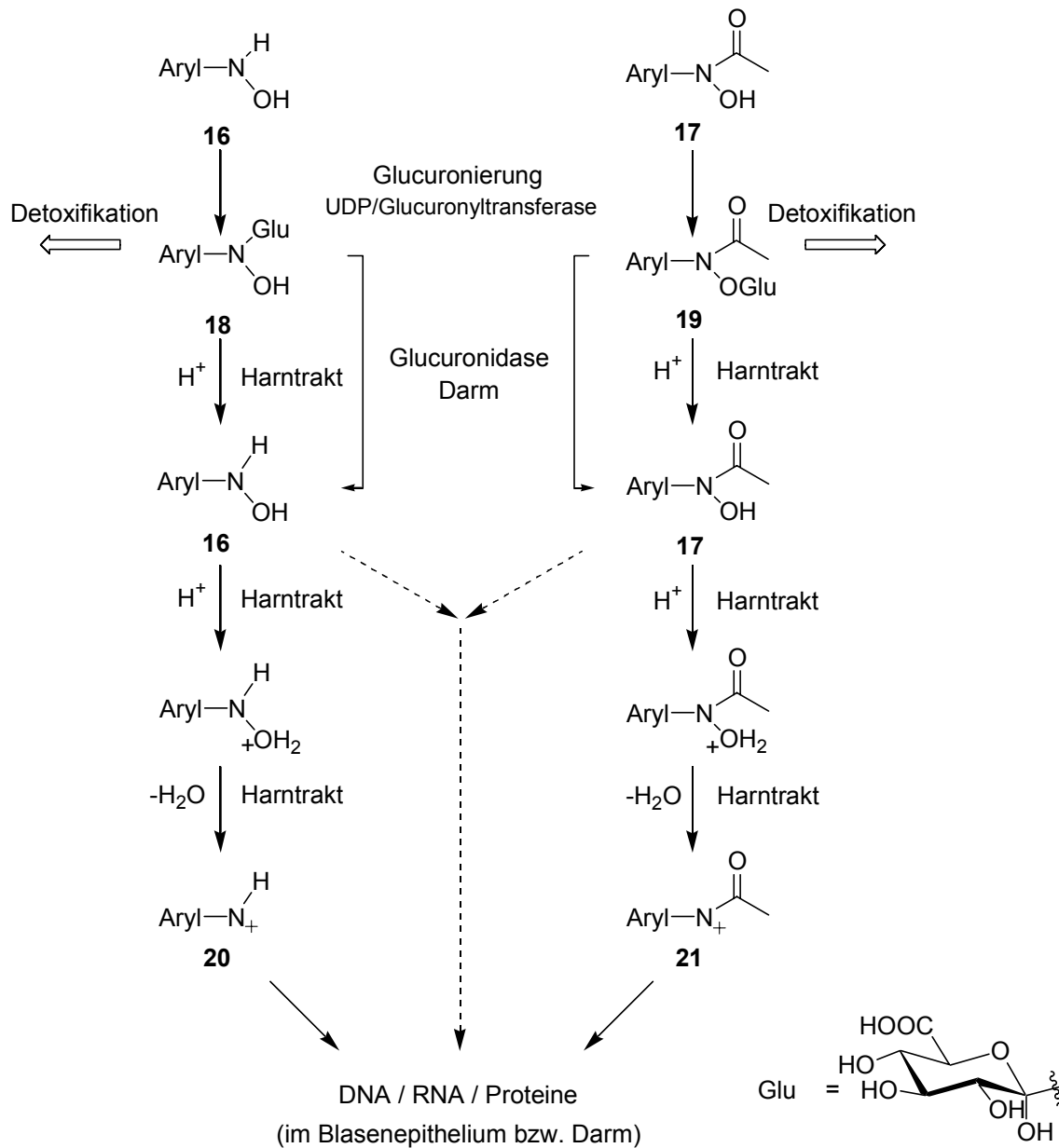


Abb. 6 Aktivierung durch *O*-Glucuronylierung und *O*-Protonierung

### *O*-Protonierung

Die *O*-Protonierung stellt bei pH-Werten kleiner als 7 die einfachste Form der Aktivierung dar und erfolgt meist nach der *N*- oder *O*-Glucuronylierung (s. Abb. 6). Die Kombination der beiden Aktivierungsschritte wird im Falle des 2-Aminofluorens **7** für die Entstehung von Darm- oder Blasenkarzinomen verantwortlich gemacht.<sup>[31]</sup> Die durch Enzyme oder saure Bedingungen wieder frei werdenden Hydroxylamine **16** bzw. Hydroxamsäuren **17** können am Sauerstoffatom protoniert werden. Durch anschließende Wasserabspaltung entstehen hochreaktive Nitreniumionen **20** und **21**, die dann kovalent an die DNA oder andere Biomoleküle binden können.

### O-Acetylierung

Eine weitere wichtige Aktivierungsmöglichkeit zu ultimativen Carcinogenen ist die O-Acetylierung. Bei der O-Acetylierung von Hydroxylaminen **16** entstehen N-Acetoxyarylamine, deren Bildungsmechanismen wurden von T.J. Flammang und F.F. Kadlubar diskutiert.<sup>[32]</sup> Durch eine S-Acetyl-Coenzym-A abhängige O-Acetyltransferase werden Hydroxylamine **16** direkt am Sauerstoff acetyliert.<sup>[33]</sup> Die Acetylgruppe kann aber auch von N-Arylhydroxamsäure-abhängigen N,O-Acyltransferasen intermolekular von Hydroxamsäuren **17** auf Hydroxylamine **16** übertragen werden.<sup>[34,35]</sup> Beide Enzyme gehören zur Klasse der O-Acyltransferasen. Der N,O-Acyltransfer kann aber auch, durch N,O-Acyltransferasen katalysiert, intramolekular stattfinden.<sup>[36,37]</sup>

Als Spezialform der O-Acetylierung soll noch die Aktivierung durch  $\alpha$ -Aminosäuren erwähnt werden. Sie wurde 1974 von M. Tada entdeckt<sup>[38]</sup> und von C. Meier intensiv untersucht.<sup>[39]</sup>

#### 2.2.3 Reaktionen ultimaler Carcinogene mit der DNA

Viele Untersuchungen der letzten Jahre beschäftigen sich mit der Identifizierung der „Addukte“, die durch die Reaktion elektrophiler ultimaler Carcinogene mit Nucleobasen entstehen. Dabei zeigte sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, dass die Anzahl, die Struktur und die Menge der mit DNA-Basen gebildeten Produkte je nach Carcinogen verschieden ist.

Neben zwei Addukten der DNA-Base Desoxyadenosin **22** wurden nur Addukte der DNA-Base Desoxyguanosin **23** gefunden (s. Abb. 7).

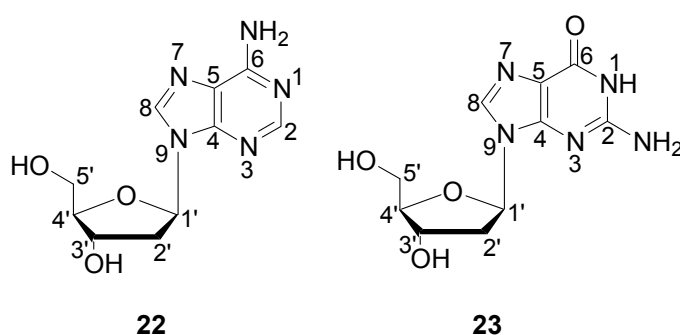


Abb. 7 Desoxyadenosin (dA) **22** und Desoxyguanosin (dG) **23**

Bei *in vivo* Untersuchungen mit 4-Aminobiphenyl **4** an Hunden wurden drei verschiedene Addukte gefunden.<sup>[40]</sup> Zwei davon wurden als Desoxyguanosinaddukte, das dritte als Desoxyadenosinaddukt identifiziert. Neben den C8-Addukten an dG und dA (**24** und **25**, s. Abb. 8, S. 10) wurde ein Produkt isoliert, dem die Struktur des dG-N2-Adduktes **26** zugeschrieben wurde (s. Abb. 9, S. 10).

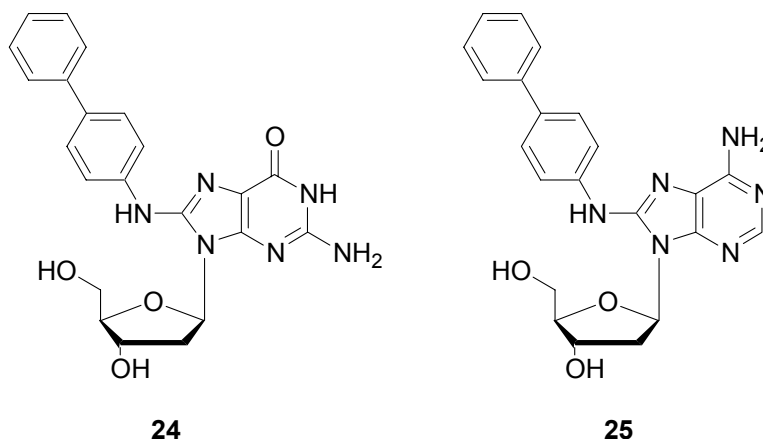


Abb. 8 *dG-C8-Addukt 24 und dA-C8-Addukt 25 von 4-Aminobiphenyl 4*

Analoge Untersuchungen mit 2-Aminofluoren **7** ergaben nur ein Addukt, nämlich das C8-Addukt am Desoxyguanosin **27** (s. Abb. 9). Diese Beobachtung ist insofern interessant, als die Bedeutung der C8-Addukte später von einigen Autoren in Zweifel gezogen wurde, und die N2-Addukte als entscheidende DNA-Modifikationen angenommen wurden.<sup>[41]</sup>

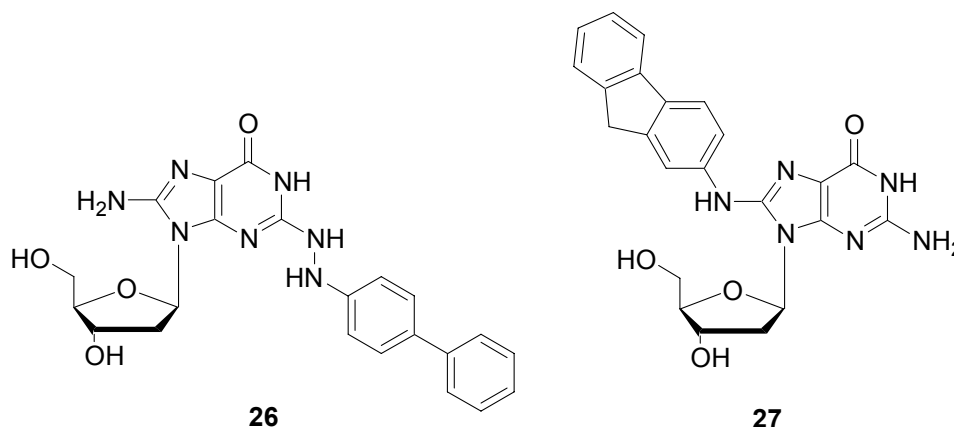


Abb. 9 *dG-N2-Addukt 26 von 4-Aminobiphenyl 4 und dG-C8-Addukt 27 von 2-Aminofluoren 7*

Aus *in vivo*-Untersuchungen anderer aromatischer Amine ist eine Reihe weiterer Addukttypen bekannt, die hier nicht weiter erläutert werden sollen. Als Beispiele seien genannt, das dG-O6-Addukt beim 1-Naphthylamin und das dA-N6-Addukt beim 2-Naphthylamin.

Bei der Replikation modifizierter DNA kann es zu Fehlern (Mutationen) kommen, so dass die im Zellteilungsprozess entstehenden neuen Zellen ein mutiertes Genom besitzen. Dies kann dazu führen, dass eine Zelle abstirbt oder im ungünstigeren Fall zu einer Tumorzelle wird.<sup>[42]</sup>

Nicht jede DNA-Modifikation führt jedoch zu Replikationsfehlern. Die Zellen verfügen über Reparaturmechanismen, die mutierte DNA-Abschnitte erkennen und in ihren ursprünglichen Zustand (Wildtyp) zurückversetzen können. In Tierversuchen konnte im Zusammenhang mit <sup>32</sup>P-Postlabeling-Experimenten gezeigt werden, dass unterschiedliche DNA-Addukte mit

aromatischen Aminen unterschiedlich schnell repariert werden.<sup>[43]</sup> Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass unterschiedliche DNA-Addukte die Konformation, und damit die Struktur, der DNA unterschiedlich beeinflussen. Wichtig hierfür ist die Natur des aromatischen Systems. Einige Aromaten fügen sich z.B. gut in die Helixstruktur der DNA ein und führen so zu keinen konformativen Änderungen, während andere die Umwandlung der normalerweise vorliegenden B-Konformation zur Z-Konformation begünstigen, was eine Denaturierung der DNA zur Folge hat. Entsprechende Untersuchungen an modifizierter DNA wurden mit Hilfe von Schmelzpunktexperimenten, Circular dichroismusmessungen und NMR-Messungen durchgeführt.<sup>[44,45,46]</sup> Die Änderung der Konformation wird dabei mit der Persistenz der Addukte *in vivo* in Zusammenhang gebracht. Addukte mit denaturierter Konformation werden demnach leichter repariert als Addukte, deren aromatische Systeme sich gut in die DNA einpassen und keine konformativen Veränderungen hervorrufen. Ob diese Zusammenhänge aber tatsächlich für den Ablauf der Carcinogenese von Bedeutung sind, lässt sich daraus jedoch nicht eindeutig ableiten und kann von Fall zu Fall variieren.

#### 2.2.4 Mechanismus der Adduktbildung *in vivo*

Der Mechanismus des am häufigsten auftretenden DNA-Adduktes, des dG-C8-Adduktes ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Das Auftreten eines intermediär gebildeten Arylnitreniumions **20** ist inzwischen anerkannt. Der Angriff des Nitreniumions an der C8-Position ist jedoch einigermaßen überraschend. Diese Stelle des Desoxyguanosins **23** ist nämlich nicht die nucleophilste Stelle der Base. Die mit einem  $pK_s$ -Wert von circa 2 am stärksten basische Stelle des Desoxyguanosins **23** ist die N7-Position. Alkylierungsreagenzien, wie z.B. Methyljodid, reagieren mit dG **23** in hohen Ausbeuten an der N7-Position unter Bildung des N7-methylierten Produktes.<sup>[47]</sup> Auf diesem Befund aufbauend postulierten *F.P. Guengerich* et al. einen Mechanismus, der zunächst den Angriff des Elektrophils **20** an der N7-Position vorsieht.<sup>[48]</sup> Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch *M. Novak* und *S.A. Kennedy*.<sup>[49]</sup> Die resultierende positive Ladung ist über N7, C8 und N9 delokalisiert. Nach Deprotonierung des C8-Atoms liegt ein Ylid vor. Nun erfolgt eine der Stevens-Umlagerung ähnliche Wanderung des Arylfragmentes an die C8-Position. Es resultiert das *in vivo* beobachtete C8-Addukt unter Regeneration der Aromatizität (s. Abb. 10, S. 12).

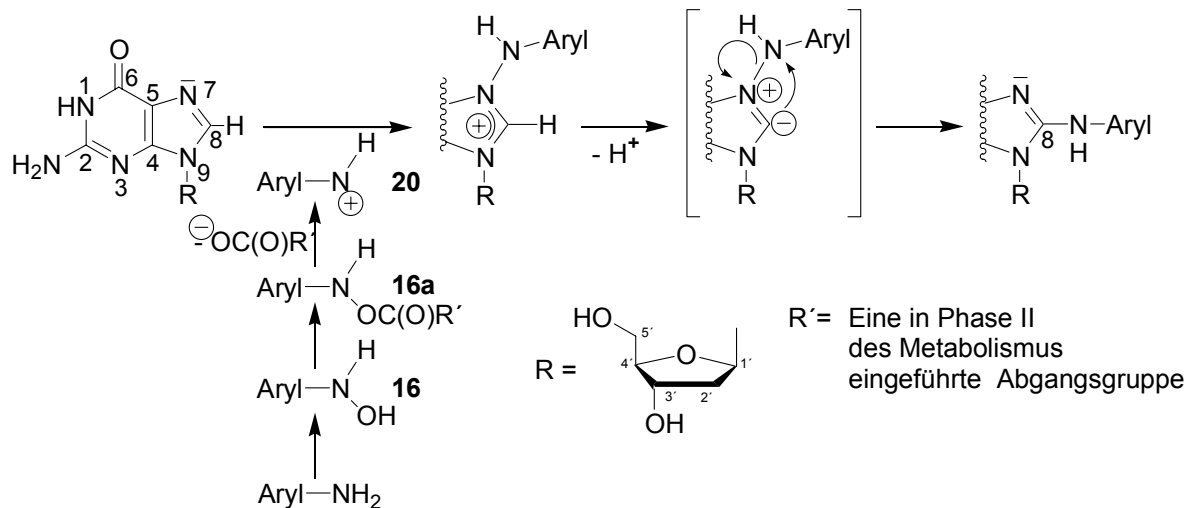


Abb. 10 Postulierter Mechanismus der elektrophilen Arylaminierung in C8-Position

### 2.2.5 Nachweis der Mutagenität und Cancerogenität

Die Frage, ob eine chemische Substanz mutagen oder cancerogen für den Menschen ist, lässt sich zunächst am zuverlässigsten im Tierversuch an Säugetieren klären. Tierversuche haben jedoch außer den relativ hohen Kosten den Nachteil, dass sie keine sofortigen Ergebnisse liefern. Die Auswertung der Versuche kann erst nach einem angemessenen Beobachtungszeitraum erfolgen. Darüber hinaus existieren im Zusammenhang mit Tierversuchen auch ethisch-moralische Bedenken. Deshalb sind mittlerweile alternative Methoden entwickelt worden, das genverändernde Potential von potentiell mutagenen oder cancerogenen Substanzen zu untersuchen.

#### Ames-Test

Der gegenwärtig wichtigste Test zur Untersuchung der Mutagenität einer Verbindung ist der nach seinem Entwickler *B.N. Ames* benannte Ames-Test.<sup>[50,51]</sup> Als Testobjekte werden beim Ames-Test mutierte Bakterienstämme von *Salmonella typhimurium* verwendet. Alle diese Stämme besitzen das gemeinsame Merkmal der Histidinauxotrophie. Eine Mutation in einem der Gene, welche die Enzyme der Histidinbiosynthese codieren, sorgt dafür, dass sie im Gegensatz zum Wildtyp nicht zur Synthese von Histidin fähig sind und deshalb auf einem histidinfreien Medium nicht wachsen können. Diese Mutation kann durch eine weitere (z.B. chemisch induzierte) Mutation rückgängig gemacht werden. Durch diesen als Reversion bezeichneten Vorgang entsteht eine Zelle, welche nun wieder die ursprüngliche Wildtyp- oder eine funktionell verwandte Basensequenz besitzt. Solche Revertanten sind in der Lage, Histidin zu synthetisieren und können sich daher auch in histidinfreiem Medium vermehren.



Dies erlaubt eine Selektion der Revertanten, deren Häufigkeit sich quantitativ bestimmen und mit der Mutagenität der eingesetzten Verbindung korrelieren lässt. Routinemäßig werden heute fünf verschiedene Bakterienstämme von *Salmonella typhimurium* verwendet: TA1535, TA1537, TA1538, TA98 und TA100. Da diese Stämme zum Teil verschiedene Arten von Mutationen (z.B. Leserastermutationen oder Basenpaarmutationen) besitzen, kann mit ihrer Hilfe nicht nur das mutagene Potential einer Substanz, sondern auch eine Klassifizierung des Wirkmechanismus erfolgen. Da die meisten genotoxischen Stoffe allerdings nicht direkt, sondern erst nach Aktivierung zu reaktiven Metaboliten mit der DNA reagieren (z.B. aromatische Amine, s. Kap. 2.2, S.5), muss diese im Säugetierorganismus stattfindende Metabolisierung im Ames-Test simuliert werden. Hierzu kann z.B. ein aus Säugetierleber gewonnenes Aktivierungssystem (S9-Mix) verwendet werden.<sup>[52]</sup>

#### <sup>32</sup>P-Postlabeling-Methode

Eine hochempfindliche Methode zum Nachweis von DNA-Addukten ist das <sup>32</sup>P-Postlabeling. Bei dem 1981 von *K. Randerath et al.*<sup>[53]</sup> eingeführten und von *H.H. Schmeiser* und *C.A. Bieler*<sup>[54]</sup> modifizierten Verfahren wird zunächst DNA mit der zu testenden Substanz inkubiert. Bei Bedarf kann ein Aktivierungssystem zugegeben werden. Nach Aufarbeitung wird die DNA enzymatisch, z.B. durch Nuclease-P1-Verdau<sup>[55]</sup> zu den 3'-Nucleosidmonophosphaten abgebaut. Diese werden dann durch Reaktion mit  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-Adenosintriphosphat, katalysiert durch das Enzym T4 Polynucleotid-Kinase, am C5' phosphoryliert. Durch mehrdimensionale Dünnschichtchromatographie können nun die Addukte von den unveränderten 3',5'-Nucleosiddiphosphaten abgetrennt und audioradiographisch untersucht werden. Mit dieser Methode ist man auch in der Lage, selbst kleinste Mengen eines Adduktes (ein Addukt pro 10<sup>10</sup> Basen), z.B. in Gewebe- und Blutproben verstorbener Krebspatienten nachzuweisen.<sup>[42]</sup>

#### 2.2.6. Auswirkungen der C8-Addukte auf DNA-Ebene

Die DNA unterliegt aufgrund ihrer eigenen Instabilität und durch exogene Einflüsse einem ständigen Zerfallsprozeß.<sup>[56]</sup> So verlieren beispielsweise Cytosin-Basen mit der Zeit sehr langsam ihre Aminogruppen durch Hydrolyse. Das entstehende Uracil kann keine festen Wasserstoffbrückenbindungen zu Guanin mehr bilden und verursacht so eine sogenannte Punktmutation, indem es bevorzugt mit Adenin paart. Gleiche Auswirkungen kann ein DNA-Addukt haben, wenn es in den DNA-Strang hineinragt. Die resultierende falsche Paarung führt bei der Transkription zur Veränderung eines Codons (ein Codon ist eine Gruppe von

drei Basen, die für eine bestimmte Aminosäure codiert). Dies kann dazu führen, dass bei der Proteinsynthese (Translation) eine falsche Aminosäure eingebaut wird. Das ist allerdings nicht zwangsläufig der Fall, da verschiedene Codons für die gleiche Aminosäure codieren und der Austausch einer Aminosäure in einem Protein nicht notwendiger Weise schwerwiegende Folgen haben muss. Punktmutationen haben also in den meisten Fällen nur geringe Auswirkungen. Anders die Leserastermutationen („frameshift“-Mutationen), die durch Insertion oder Deletion einzelner Basen hervorgerufen werden. Hier wird die Kollinearität zwischen DNA-Codons und Aminosäuresequenz unterbrochen. Eine Insertion oder Deletion führt dazu, dass ab der Mutationstelle eine falsche Aminosäuresequenz gebildet wird. Die große Mehrzahl der „frameshift“-Mutationen führt zur Bildung biologisch völlig inaktiver Proteine. Erfolgt nach einer Deletions-Mutation zufällig ein paar Basen weiter eine Insertionsmutation, ist das korrekte Leseraster anschließend wiederhergestellt. Diese zweite Mutation, nach der wieder ein korrektes Leseraster vorliegt, wird Suppressor-Mutation genannt. Solche Leserastermutationen können bevorzugt durch DNA-Addukte oder durch große, flache, basische Moleküle, die sich zwischen aufeinanderfolgende Basenpaare schieben, generiert werden. Nun enthält dieser Strang das Molekül wie eine Extrabase. Bei der Replikation kann es dadurch zu einer fehlerhaften Paarung zu diesem Extra-Molekülteil kommen, was somit zum Einbau einer zusätzlichen Base führt (+1 Frameshift). Für 2-AF **7** und 2-AAF **8** wurden aber auch, durch Punktmutationen hervorgerufene, Ein-Basen- und Zwei-Basen-Deletionen nachgewiesen.<sup>[57,58]</sup>

Die Zellen verfügen jedoch über Reparaturmechanismen<sup>[59]</sup>, die fehlerhafte Stellen in vielen Fällen erkennen und gegebenenfalls reparieren. In *Escherichia coli* sind dafür Enzyme wie MutH, MutL, MutS und MutU verantwortlich. Auch UVRABC-Nuclease erkennt und repariert UV-Schäden und teilweise Arylamin-Addukte wie beispielweise 2-AF- und 2-AAF-Addukte.<sup>[60]</sup> Größere Addukte werden durch eine Exinuclease herausgeschnitten und die entstandenen Lücken durch die DNA Polymerase I mit Nucleosiden wieder aufgefüllt. Andere Formen der Reparatur sind die Basenaustauschreparatur oder die Direkte Umkehr-Reparatur. Letztere trennt zum Beispiel auch die durch UV-Strahlung gebildeten Thymidin-Dimere.<sup>[61]</sup> Inwieweit nun das Arylamin im C8-Arylamin-dG-Addukt in die Helix interkaliert oder in die große Furche der DNA ragt, wurde durch Energie-Minimierungs-Rechnungen oder NMR-Untersuchungen aufgeklärt.<sup>[62,63,64]</sup>

Hierzu wurden oligomere Sequenzen mit sogenannten Hotspots berechnet. Dies sind DNA-Abschnitte, die besonders leicht durch Mutation oder Neukombination der Erbsubstanz verändert werden. So zum Beispiel der G<sup>1</sup>-G<sup>2</sup>-C-G<sup>3</sup>-C-C *NarI*- Hotspot aus *Escherichia coli*,

der nach Modifikation (z.B. Addukt-Bildung) an G<sup>3</sup> durch eine –2 Leserastermutation zu G<sup>1</sup>-G<sup>2</sup>-C-C verkürzt wird.<sup>[65]</sup>

Das Auftreten dieser Leserastermutation ist mit der räumlichen Ausrichtung des adduktierten 2'-Desoxyguanosin-Bausteins verknüpft. Diese ist beinahe erwartungsgemäß von der Größe und der Polarität der einzelnen adduktierten Verbindungen abhängig. Berechnungen zufolge drehen sich das Anilin-C8-dG-Addukt<sup>[66]</sup> und das 2-AF-C8-dG-Addukt<sup>[62]</sup> in der B-DNA in die große Furche. Von Interesse ist schließlich, diese Strukturkenntnisse mit dem im Tierexperiment oder Ames-Test gewonnenen Wissen über die Mutagenität bzw. Carcinogenität der zur Adduktbildung verwendeten Arylamine zu korrelieren. Es existieren aber auch massive Unterschiede zwischen der Struktur der *N*-acetylierten und der nichtacetylierten DNA-Addukte. So liegt im Vergleich der dG-C8-Addukte von 2-Aminofluoren (2-AF) **7** und seinem Amid 2-Acetylaminofluoren (2-AAF) **8** beim 2-AF-Addukt die *anti*-Konformation und beim 2-AAF-Addukt die *syn*-Konformation der glycosidischen Bindung vor.<sup>[67,68]</sup> Das hat in der DNA-Doppelhelix zur Folge, daß die 2-AAF-adduktierte Base in die Helix ragt, mit den Nachbarbasen interkaliert, und den Guanin-Heterocyclus in die große Furche der B-DNA drückt. Beim 2-AF-Addukt, das die *anti*-Konformation beibehält, liegt der 2-AF-Teil in der großen Furche und stört die Basenpaarung nicht. Dies erklärt auch die höhere Persistenz der 2-AF-Addukte in der DNA, da sie von den Reparaturenzymen schlechter erkannt werden. 2-AAF-C8-dG-Addukte führen auch stärker zu „frameshift“-Mutationen als 2-AF-C8-dG-Addukte.<sup>[69]</sup> Je nach den für die Rechnung angelegten Parametern und den gerechneten DNA-Oligomeren können aber auch für ein 2-AF-C8-dG-Addukt die *syn*- und *anti*-Konformationen berechnet werden.<sup>[70]</sup>

Die Krebsentstehung nach erfolgter Mutation ist ein komplexer Prozeß<sup>[71]</sup>, zu Schlagworten wie Onkogenen (z.B. denen der *ras*-Familie) oder Tumor-Supressor-Genen (z.B. *p53*)<sup>[72]</sup> soll hier nur auf die Fachliteratur verwiesen werden.

## 2.3 Chemische Synthese von Arylamin-Addukten

### 2.3.1 Elektrophile Arylaminierung

Der überwiegende Teil der bereits bekannten Synthesen ahmt den *in vivo*-Mechanismus der Adduktbildung nach: Hydroxylamine **16** werden zur Aktivierung mit einer guten Abgangsgruppe am Stickstoff versehen, diese wird zur Abspaltung gebracht und das resultierende Nitreniumion **20** bildet dann über die elektrophile Arylaminierung Addukte mit Guanosin oder 2'-Desoxyguanosin **23**.

Im Folgenden sollen die prinzipiell unterschiedlichen *O*-veresterten Hydroxylamine **16** und die Hydroxamsäureester **16a**, die für die elektrophile Aminierung zum Einsatz kommen, vorgestellt werden:

*M.D. Jacobson* et al.<sup>[73]</sup> versuchten mit Phenylhydroxylamin **28**, *N*-Acetoxyacetanilid **29**, *N*-Tosyloxyacetanilid **30** und *N*-Acetoxy-*N*-trifluoroacetanilid **31** (s. Abb. 11) als „aktivierte Anilinderivate“ *N*-(Desoxyguanosin-8-yl)-anilin **32** darzustellen, hatten aber keinen Erfolg.

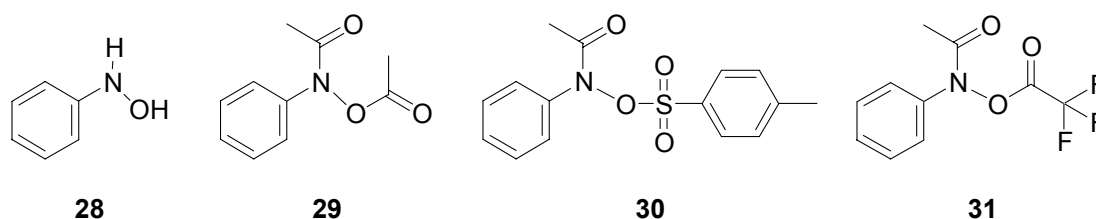


Abb. 11 „Aktivierte“ Anilinderivate

Die Umsetzung von Arylhydroxylaminestern **16a** mit dG **23** wurde später von *M. Famulok*<sup>[74,75]</sup>, jedoch nur in geringen Ausbeuten, erfolgreich durchgeführt. Mit *N*-Acetoxyanilin **33** und *N*-Pivaloyloxyanilin **34** gelang die Synthese von **32** in 2.5 % Ausbeute (s. Abb. 12).

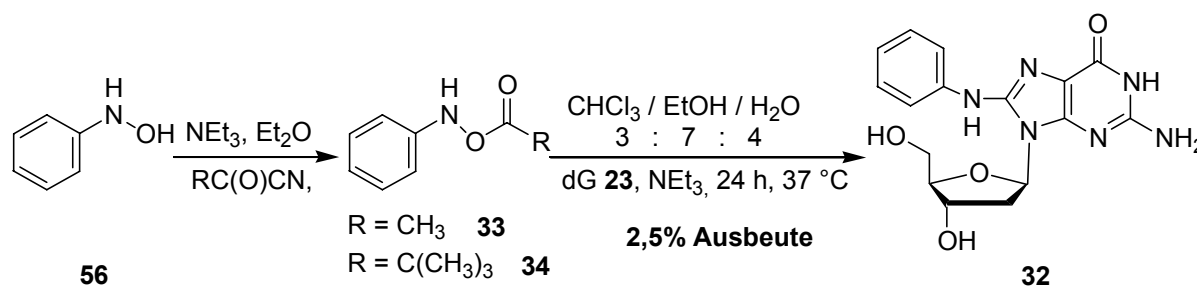


Abb. 12 Reaktion von *N*-Acetoxyanilin **33** und *N*-Pivaloyloxyanilin **34** mit dG **23**

Die Ausbeute lag bei beiden Abgangsgruppen in derselben Größenordnung, allerdings ist **33** ein *in vivo* auftretender Metabolit, während **34** ein nicht natürlich vorkommendes Anilin-

Derivat darstellt. Dieses hat jedoch für die Synthese den Vorteil, dass es stabiler ist und somit länger gelagert und besser gehandhabt werden kann. Die Verwendung von 2'-Desoxyguanosin **23** erforderte bei dieser biomimetischen Strategie aufgrund der hohen Polarität ungeschützter Nucleoside einen gewissen Anteil Wasser im Lösungsmittelgemisch. Dies wiederum hat zur Folge, dass das aus dem Aminierungsmittel freigesetzte Nitreniumion **20** teilweise von Wasser (Nucleophil) abgefangen wird. Zudem entstehen bei dieser Reaktionsklasse durch das intermediäre Auftreten von Nitreniumionen zahlreiche farbige Nebenprodukte, die oft schwer abtrennbar sind.

Diese Synthesestrategie wird mittlerweile trotz der niedrigen Ausbeuten (um 1-2 %) angewendet, wenn kleine Mengen dG-C8-Addukte der verschiedensten Arylamine für biochemische Tests benötigt werden. Meist wird hierzu das *N*-Acetyl-**33** oder *N*-Pivaloyloxyarylammin **34** aufgrund seiner Labilität *in situ* generiert und sofort weiter umgesetzt. *M.M Marques* et al. synthetisierten und charakterisierten mit dieser Strategie mehr als ein Dutzend dG-C8-Addukte von im Tabakrauch gefundenen Anilin-Derivaten.<sup>[15,76]</sup> Zur Kalibrierung ihrer <sup>32</sup>P-postlabeling-Experimente synthetisierten *A. Beyerbach* et al. ebenfalls eine Reihe von dG-C8-Addukten verschiedener Anilin-Derivate.<sup>[77]</sup> Ebenfalls mit dieser Methode, synthetisierte *M. Famulok* als erster modifizierte DNA-Fragmente, indem er unmodifizierte Oligonucleotide mit den Acyloxyarylamminen umsetzte.<sup>[74]</sup>

Während ihrer Dissertation gelang es *A. Heimbel* über einen DBU-katalysierten intermediären Acetyltransfer aus *N*-(4-Ethoxyphenyl)-*N*-Pivaloylhydroxamsäure **35** bzw. deren intramolekularem Umlagerungsprodukt *N*-Pivaloyloxyphenetidin **36** mit dG **23** in 27,7 % Ausbeute *N*-(Desoxyguanosin-8-yl)-phenetidin **37** (s. Abb. 13) darzustellen.<sup>[78]</sup> Dies ist die höchste bisher gefundene Ausbeute für eine elektrophile Arylaminierung an C8-Position des 2'-Desoxyguanosins **23**.

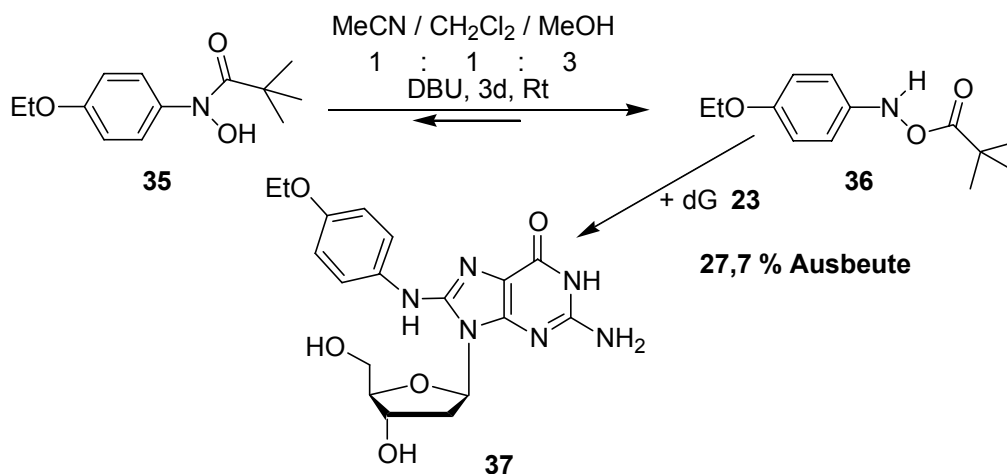


Abb. 13 Adduktbildung mit DBU-katalysiertem *N,O*-Acyltransfer

C. Meier verwendete zur elektrophilen Arylaminierung *N*-( $\alpha$ -Aminoacyl)-hydroxamsäuren.<sup>[39,79,80,81,82]</sup> Er konnte Addukte von Anisidin **1**, *p*-Chloranilin und *p*-Toluidin an Guanosin und 2'-Desoxyguanosin **23** in Ausbeuten von 1.3-6.5 % darstellen. Eine vergleichsweise gute Ausbeute von 6,5 % erzielte er durch die Umsetzung von *N*-(Benzylalanin)-*N*-(4-methoxyphenyl)-hydroxamsäure **38** mit **23** zu *N*-(Desoxyguanosin-8-yl)-anisidin **39** (s. Abb. 14).

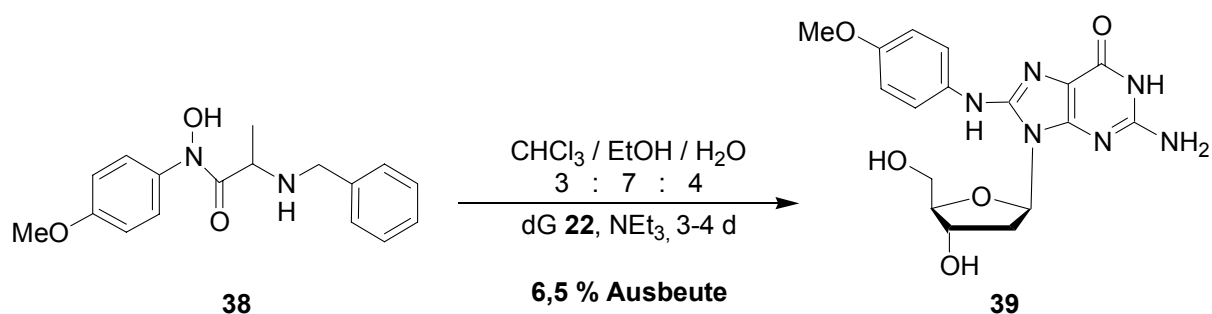


Abb. 14 Aktivierung von Hydroxylaminen durch *N*- $\alpha$ -Aminosäureester

Neben den bereits genannten intermolekularen Arylaminierungen stellten E. Defrancq et al. eine Variante vor, die eine intramolekulare Umlagerung einer über eine Succinyl-Brücke an C5' einer geschützten Ribose geknüpften *N*-(Acetyl)-2-aminofluorenhydroxamsäure beinhaltet.<sup>[83,84]</sup> Die Ausbeute über alle Stufen beträgt jedoch auch hier nur etwa 10 % (s. Abb. 15).

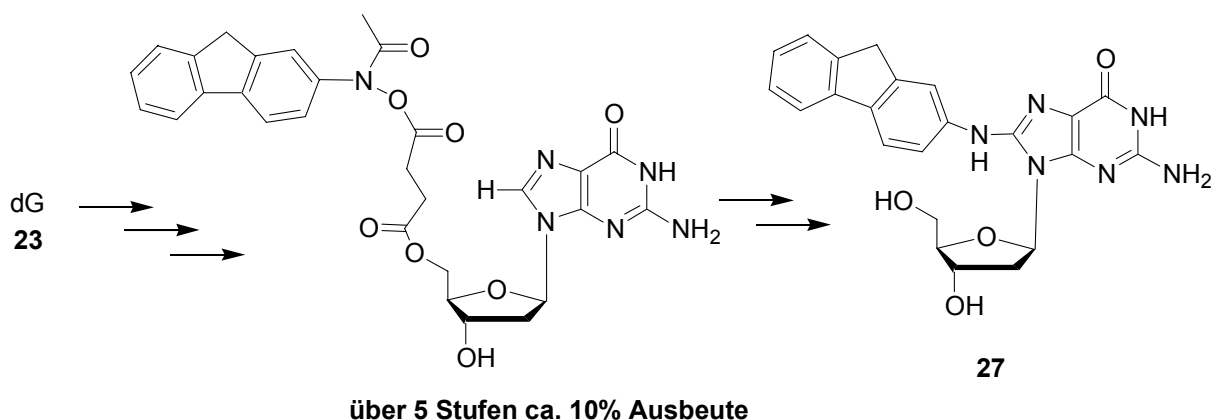


Abb. 15 Intramolekulare elektrophile Arylaminierung nach Defrancq

### 2.3.2 Nucleophile Arylaminierung

E. Kriek und E. Miller veröffentlichten bereits 1967 die erste Synthese eines C8-Guanosin-Adduktes via nucleophiler Arylaminierung.<sup>[85]</sup> Sie setzten 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-8-

bromguanosen **40** mit 2-Aminofluoren **7** in *iso*-Propanol bei 150 °C in einem Glasautoklaven zu *N*-(2',3',5'-Tri-*O*-acetylguanosen-8-yl)-2-aminofluoren **41** um (s. Abb. 16).

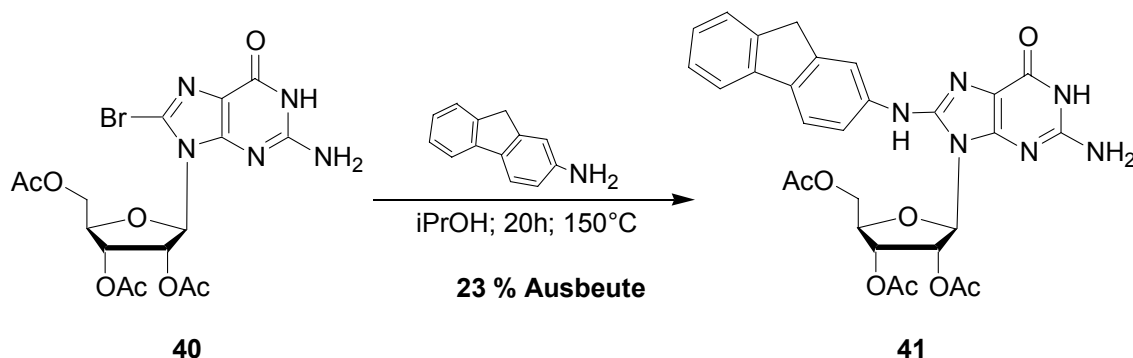


Abb. 16 Nucleophile Arylaminierung nach Kriek und Miller

Durch diese Erfolge inspiriert, versuchten *M.D. Jacobson* und *R. Shapiro* 1988, 3',5'-Di-*O*-acetyl-8-brom-2'-desoxyguanosen mit Anilin **1** zu *N*-(3',5'-Di-*O*-acetyl-2'-desoxyguanosen-8-yl)-anilin umzusetzen.<sup>[73]</sup> Dies misslang jedoch, weil das 2'-Desoxynucleosid unter den harschen Reaktionsbedingungen depurinierter. Es gelang ihnen jedoch, 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-8-bromguanosen **40** mit Anilinhydrobromid bei diesen Bedingungen in 50 % Ausbeute zum *N*-(2',3',5'-Tri-*O*-acetylguanosen-8-yl)-anilin **42** umzusetzen. *F. Johnson* et al. griffen diesen Syntheseweg auf und setzten ihn in Kombination mit der Barton-Desoxygenierung zur Synthese von *N*-(3',5'-Di-*O*-acetyl-2'-desoxyguanosen-8-yl)-anilin und *N*-(Desoxyguanosen-8-yl)-anilin **32** ein (s. Abb. 17).<sup>[86,87]</sup> Die Ausbeute über 6 Stufen lag allerdings auch hier nur bei ca. 5-8 %. *H. Riehl* versuchte in seiner Diplomarbeit, diese Reaktion zu optimieren, bzw. die Reaktionsbedingungen und die Schutzgruppen so zu verändern, dass sie doch für 2'-Desoxyguanosen-derivate verwendet werden kann. Es ist ihm aber leider nicht gelungen.<sup>[88]</sup>

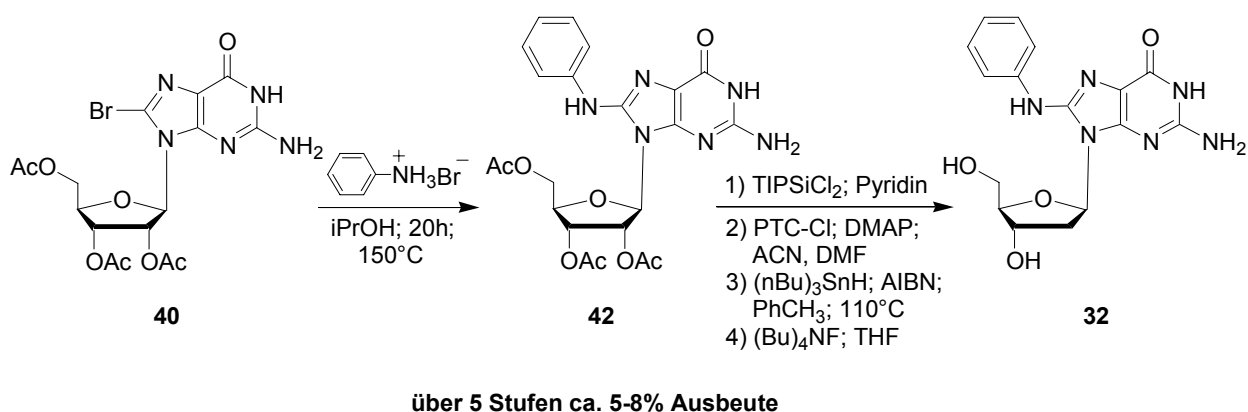


Abb. 17 Arylaminierung nach Jacobson und Johnson

### 2.3.3 Palladium-katalysierte C-N-Bindungsknüpfung

Die erste literaturbekannte Palladium-katalysierte C-N-Kupplung wurde 1983 von *T. Migita* et al. veröffentlicht. Sie beobachteten eine durch  $\text{PdCl}_2(o\text{-tolyl}_3\text{P})_2$  katalysierte Kupplung des Aminostannans (*N,N*-Diethylamino)tributylzinn mit verschiedenen Bromaromaten zum entsprechenden Arylamin.<sup>[89]</sup> Diese Reaktion wurde von *S.L. Buchwald* et al. und *J.F. Hartwig* et al. untersucht und weiterentwickelt. Sie waren es auch, die 1995 schließlich die später nach ihnen benannte Buchwald-Hartwig-Reaktion veröffentlichten. Die Palladium-katalysierte Knüpfung einer C-N-Bindung zwischen einem Amin und einem Halogenaromaten (Abb. 18).<sup>[90,91]</sup>

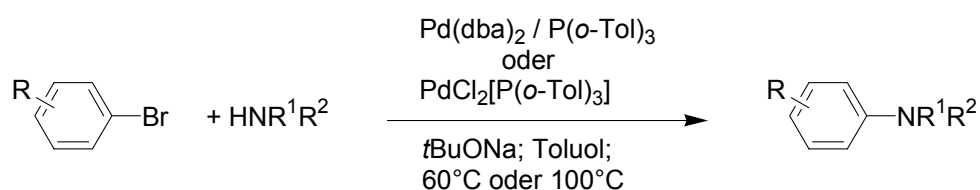


Abb. 18 Buchwald-Hartwig-Reaktion

Die ersten Reaktionen dieser Art mit Nucleosiden wurden von *M.K. Lakshman* et al.<sup>[92]</sup> und später auch *F. Johnson* et al.<sup>[41]</sup> durchgeführt. Sie synthetisierten *N*6- und *N*2-Arylamin-Addukte von 2'-Desoxyadenosin **22** und *N*2-Arylamin-Addukte von 2'-Desoxyguanosin **23**. *P.B. Hopkins* und *S.T. Sigurdsson*<sup>[93]</sup> sowie *F. Johnson*<sup>[94,95,96]</sup> nutzten diese Methode auch um DNA-Cross-Links darzustellen. Hierbei kuppelte *Johnson* die exocyclische Aminogruppe geschützter dA- und dG-Derivate mit Bromaromaten, während *Lakshman* und *Hopkins* und *Sigurdsson* die entsprechenden Brompurine mit Arylaminen umsetzten.

Im Jahr 2001 veröffentlichten *E. Schoffers* et al. die erste Darstellung von Adenosin-C8-Addukten durch Buchwald-Hartwig-Reaktion.<sup>[97]</sup> Für die Synthese der modifizierten Nucleoside die als Referenz für die Identifizierung und Quantifizierung solcher Addukte in der DNA dienen sollten, wurde die *tert*-Butyldimethylsilyl-Schutzgruppe (TDBMS) für alle drei Hydroxylgruppen des Adenosins verwendet.

Die erste Synthese von dG-C8-Addukten durch Buchwald-Hartwig-Reaktion wurde während der Entstehung dieser Arbeit von *C.J. Rizzo* und *Z. Wang* veröffentlicht.<sup>[11]</sup> Ihnen gelang es, das dG-C8-Addukt **44** von IQ **5** darzustellen. Einem Carcinogen das, wie bereits in Kap. 2.1 beschrieben, in gekochtem Fleisch und Fisch vorkommt (s. Abb. 19, S. 21). Als Schutzgruppen verwendeten sie die 1,1,3,3-Tetrakis(isopropyl)-1,3-disiloxandiyl-Schutzgruppe für die beiden Hydroxylgruppen und die Tetramethylsilylazacyclopentan-Gruppe (STABASE) für die exocyclische Aminofunktion. Die *O*<sup>6</sup>-Position wurde mit



Benzylalkohol in einen Azaenolether umgewandelt. Des Weiteren stellten sie C8-Addukte von verschiedenen, mutagenen Arylaminen dar. Da die STABASE-Gruppe für diese Synthesen nicht geeignet war, verwendeten sie Bis-BOC als Schutzgruppe für die exocyclische Aminofunktion. Die Abspaltung der Bis-BOC-Schutzgruppe wurde allerdings nicht beschrieben ebenso wenig wie die weitere Schützung zum angestrebten Oligonucleotidbaustein..

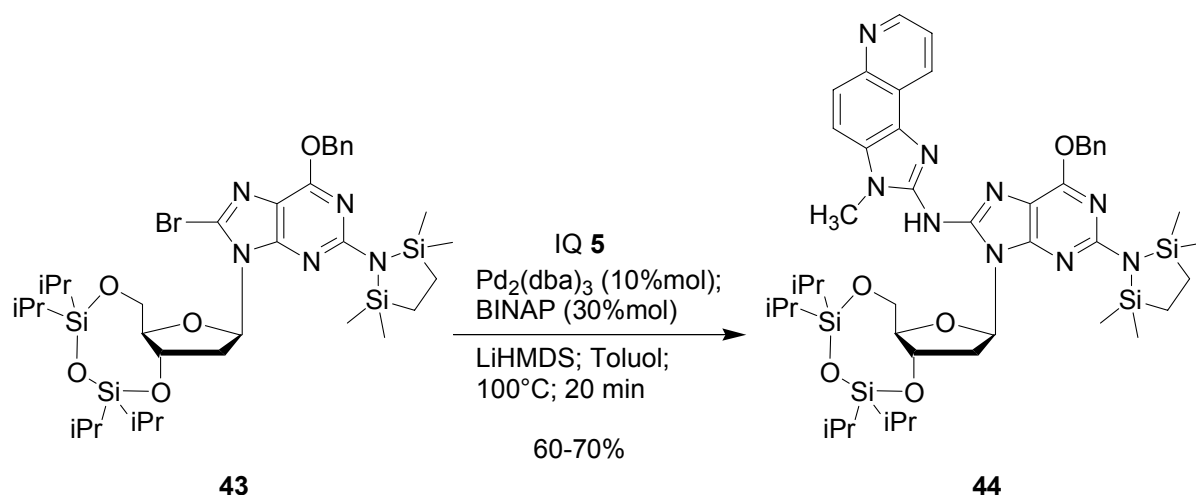


Abb. 19 Synthese des dG-C8-Adduktes von IQ 5

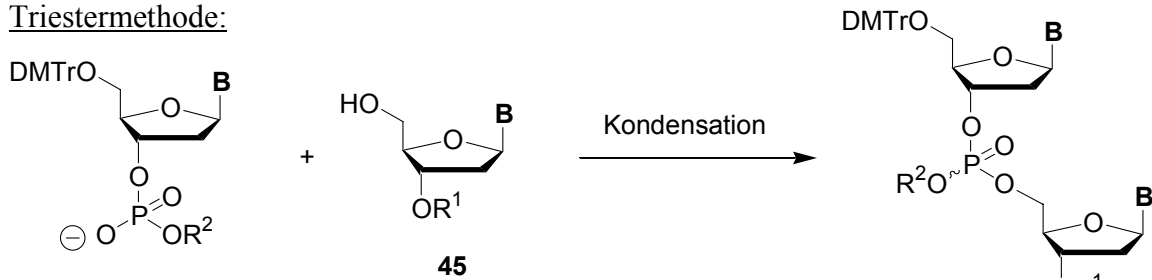
In der vorliegenden Arbeit sollen nun zwei der genannten Synthesemethoden, die elektrophile Aminierung und die Buchwald-Hartwig-Reaktion, optimiert werden um mit ihrer Hilfe größere Mengen an dG-C8-Addukten herzustellen. Diese sollen dann in Oligonucleotidbausteine umgewandelt und in Oligonucleotide eingebaut werden.

## 2.4. Synthese von Oligonucleotiden

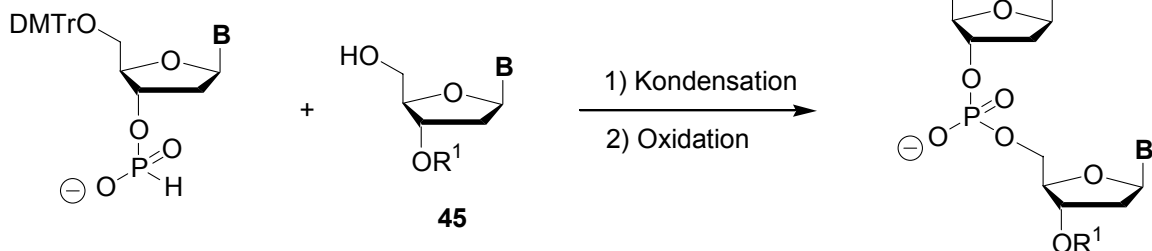
Oligonucleotide sind Polymere, die durch Polykondensation von Nucleotidphosphaten entstehen. Im Gegensatz zur natürlichen DNA-Synthese, die basierend auf den 5'-Triphosphaten, in 5'→3'-Richtung erfolgt, verläuft die Oligonucleotidsynthese am Synthesizer aufgrund der höheren Reaktivität der 5'-Hydroxygruppe in 3'→5'-Richtung. Die Methoden zur chemischen Synthese von Oligonucleotiden unterscheiden sich im Wesentlichen durch die Art, wie die Phosphorsäureesterbindung erhalten wird. Je nach Art der Phosphorkomponente spricht man von Triester-, Phosphit-, Phosphoramidit-, bzw. H-Phosphonatmethode (s. Abb. 20, S. 22 ). Als Ausgangsverbindung der Synthese fungiert das entsprechend geschützte Nucleosidderivat **45**. Obgleich viele Schutzgruppen bekannt sind, haben sich aufgrund der Automatisierung der DNA-Synthese einige wenige Schutzgruppen durchgesetzt. Dies sind im wesentlichen die von *Khorana*<sup>[98]</sup> eingeführten

Acylgruppen für die exocyclischen Aminofunktionen an Adenin, Cytosin und Guanin, sowie die 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylgruppe (DMTr) an der 5'-Hydroxylgruppe der Desoxyribose. Alle Methoden werden am festen Träger durchgeführt. Das Startmolekül wird bei der automatisierten Festphasensynthese über die 3'-Hydroxylgruppe an einen sogenannten „controlled pore glass“-Träger (CPG-Träger) gebunden. Die Verbindung zwischen dem festen Trägermaterial und dem Startnucleosid wird als Linker bezeichnet und ist im allgemeinen eine Dicarbonsäure (meist Bernsteinsäure).

Triestermethode:



H-Phosphonatmethode:



Phosphit- (X=Cl) bzw. Phosphoramiditmethode (X=N(*i*-Pr)<sub>2</sub>):

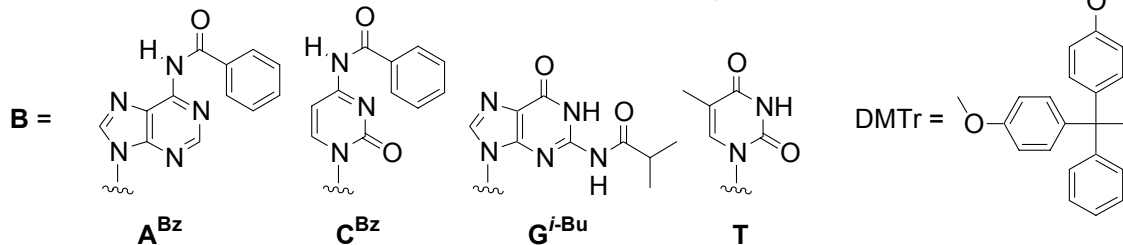
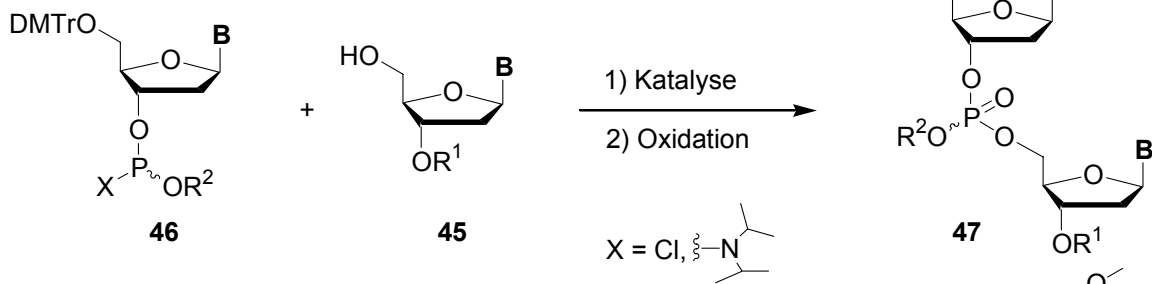


Abb. 20 Drei unterschiedliche Methoden zur Oligonucleotidsynthese

Die wegen ihrer sehr guten Ausbeuten standardmäßig angewandte Methode, ist die Phosphoramiditmethode. Hier wird ein geeignet geschütztes Nucleosidphosphoramidit **46** in Gegenwart des Aktivators 1H-Tetrazol mit einem 5'-OH-freien Nucleosid **45** zu einem

Phosphittriestern umgesetzt. Eine nachfolgende Oxidation führt zum analogen Phosphattriestern **47**.

Die höhere Reaktivität der P(III)-Verbindungen lassen diese als attraktive Edukte erscheinen, wobei zunächst ihre schlechte Zugänglichkeit und Lagerfähigkeit der monomeren Bausteine im Wege stand. Mit der Einführung der durch Säure aktivierbaren Phosphoramidite durch *H. Köster* et al.<sup>[99]</sup> und deren Optimierung durch *M.H. Caruthers* et al.<sup>[100]</sup> gelang der Durchbruch, wobei heute die Diisopropylaminoverbindungen als Amiditkomponente in Verbindung mit der 2-Cyanoethylschutzgruppe den besten Kompromiss darstellt. Wichtigster Vorteil dieser Methode ist die nahezu nebenreaktionsfreie Aktivierung durch milde Reagenzien wie beispielsweise 1H-Tetrazol, Dichlorimidazol (DCI) oder Pyridiniumchlorid.

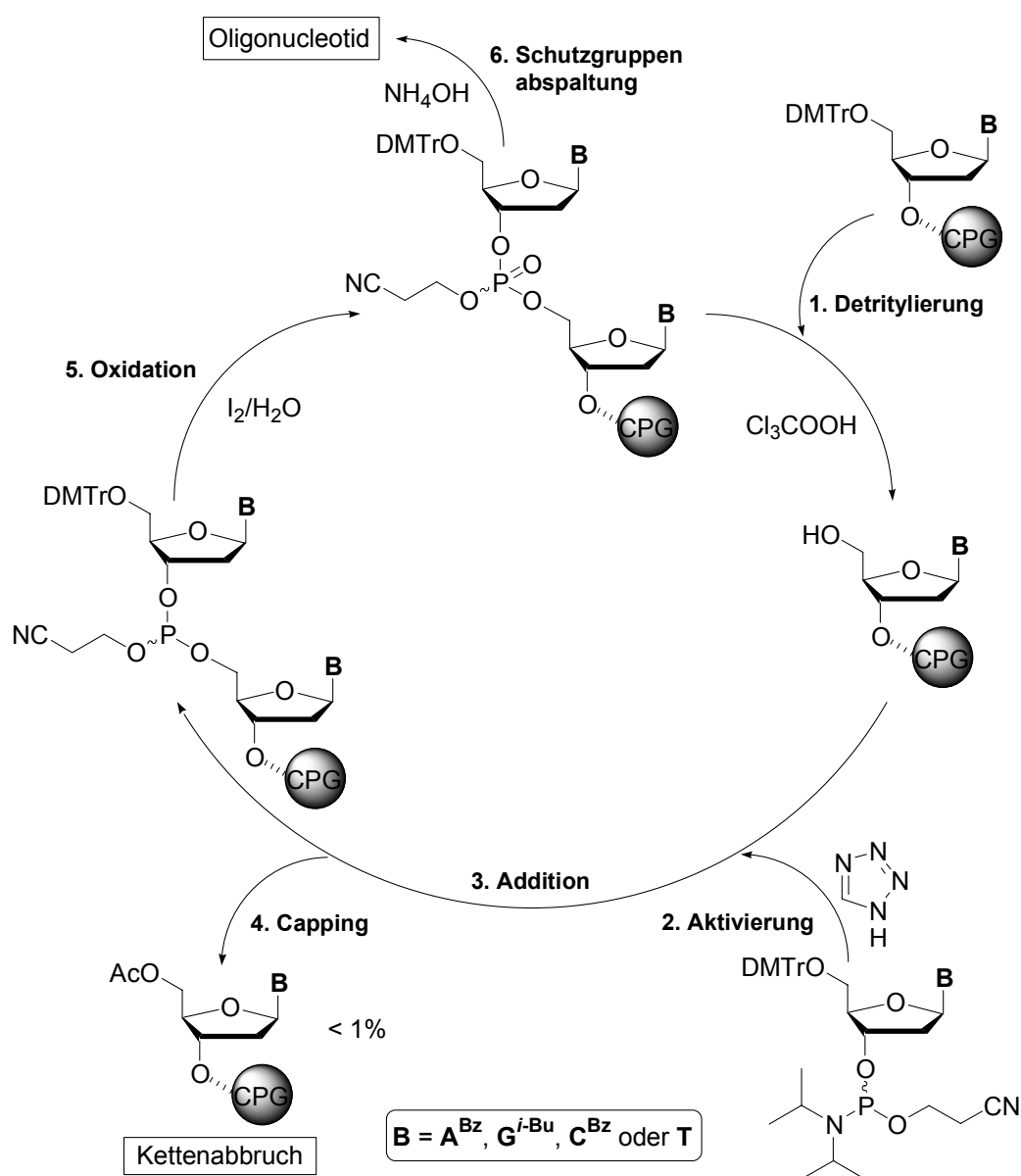


Abb. 21 Synthesecyclus der Phosphoramiditmethode

Der genaue Syntheseverlauf (s. Abb. 21, S. 23) beginnt durch Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe durch Trichloressigsäure (TCA, 1 % in Acetonitril) (Schritt 1). Darauf folgt die Addition des Nucleosidphosphoramidits, das zuvor durch DCI aktiviert wurde (Schritt 2). Man erhält zunächst ein 3'→5'-verknüpftes Dinucleosidphosphit mit einer Ausbeute von über 99 % (Schritt 3). Zur Vermeidung von Fehlsequenzen werden daraufhin nicht abreagierte 5'-Hydroxygruppen mit Essigsäureanhydrid und *N*-Methylimidazol, als 5'-Acetate blockiert (Schritt 4). Der anschließenden Oxidation des dreiwertigen Phosphits zum fünfwertigen Phosphat mit einer wässrigen Iodlösung (Schritt 5) folgt erneut die saure Abspaltung der nächsten DMTr-Gruppe und der Eintritt in den sich wiederholenden Synthesecyclus. Nach Abschluss der Synthese wird unter Standardbedingungen das Oligonucleotid mit konzentrierter wässriger Ammoniaklösung von der festen Phase abgespalten und die Schutzgruppen der Nucleobasen sowie der Phosphatgruppen im gleichen Medium, bei erhöhter Temperatur entfernt.

Die in dieser Arbeit synthetisierten Oligonucleotide wurden ausschließlich auf einem DNA-Synthesizer dargestellt, der nach diesem Phosphoramidit-Protokoll arbeitet.

Die Darstellung Arylamin-modifizierter Oligonucleotide wurde bislang fast immer durch Umsetzung von unmodifizierten Oligonucleotiden mit aktivierten Arylamin-Derivaten realisiert. Die Probleme dieses postsynthetischen Verfahrens liegen allerdings in den sehr schlechten Ausbeuten und in der Tatsache, daß diese Methode nur zur Modifikation einer Base in der Sequenz angewandt werden. Die Synthese von zweifach-modifizierten Sequenzen ist nicht möglich.

*Y. Zhou* und *L. Romano* gelang es als ersten, die für die Festphasensynthese benötigten Phosphoramidite der dG-C8-Addukte von 2-Aminofluoren **7** und *N*-Acetyl-2-aminofluoren **8** darzustellen und sie am DNA-Synthesizer in Oligonucleotide einzubauen.<sup>[101,102]</sup> Dies waren bislang die einzigen synthetisierten Oligonucleotidbausteine, denn die dazu benötigten DNA-Addukte wurden durch elektrophile Arylaminierung dargestellt (s. Kap. 2.3.1, S. 16). Diese Methode ist aber sehr aufwendig (HPLC-Trennung) und, bedingt durch die schlechten Ausbeuten, sehr teuer. Desweiteren ist auch die Abspaltung vom Träger, durch die Basenlabilität der Addukte, nicht unproblematisch. Durch Zugabe von 2-Mercaptoethanol bei der Abspaltung kann die Basenstabilität der Addukte aber erhöht werden.

Ein Bestreben dieser Arbeit soll es sein, eine möglichst effiziente Methode zur Synthese der C8-Addukte und der daraus resultierenden Oligonucleotidbausteine zu entwickeln, um sie in der DNA-Festphasensynthese einzusetzen.

### 3. Aufgabenstellung

„Synthese C8-Arylamin-modifizierter 2'-Desoxyguanosinderivate und deren Einbau in Oligonucleotide“

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten modifizierte Oligonucleotide hergestellt und mit diesen die Unterschiede in der Mutagenität/Cancerogenität aromatischer Amine untersucht werden.

Dazu mussten zunächst die Oligonucleotidbausteine der C8-Arylamin-modifizierten Desoxyguanosinderivate dargestellt werden (s. Abb. 22).

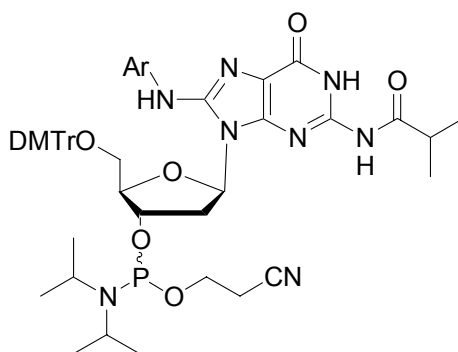


Abb. 22 Modifizierter Oligonucleotidbaustein für die Festphasen-DNA-Synthese

Schlüsselintermediate der Synthese der Oligonucleotidbausteine waren die C8-Arylamin-Addukte des 2'-Desoxyguanosins. Das Hauptaugenmerk sollte dabei, zur Aufklärung der Cancerogenitätsunterschiede, auf den C8-Addukten monocyclischer aromatischer Amine liegen.

Zur Darstellung der C8-Arylamin-Addukte des 2'-Desoxyguanosins sollte zunächst folgender, biomimetischer, elektrophiler Weg beschritten werden (s. Abb. 23).

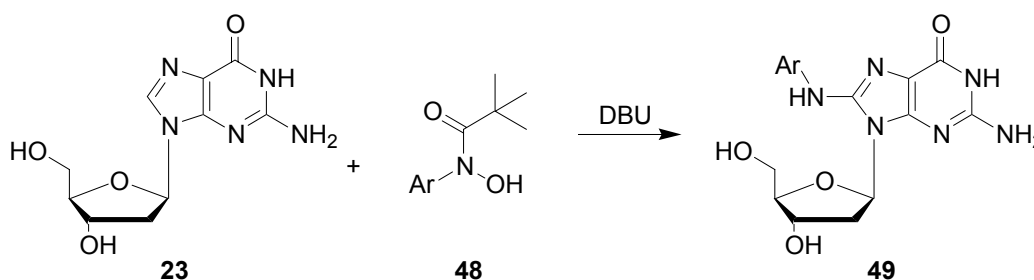


Abb. 23 Adduktbildung durch N,O-Acytransfer

Ziel war es, zu untersuchen, ob sich die Ausbeuten dieser Reaktion soweit verbessern lassen, dass genügend Material für die weiteren Umsetzungen zum Oligonucleotidbaustein erhalten werden kann.

Parallel dazu, sollte nach einer neuen Methode zur C-N-Bindungsknüpfung gesucht werden. Nach den bereits erfolgreichen Synthesen der dA-N6- und dG-N2-Addukte durch *M.K. Lakshman*<sup>[92]</sup> und *F. Johnson*<sup>[94]</sup> sollte untersucht werden, ob die Buchwald-Hartwig-Reaktion auch für die Synthese der C8-Addukte eingesetzt werden kann (s. Abb. 24).

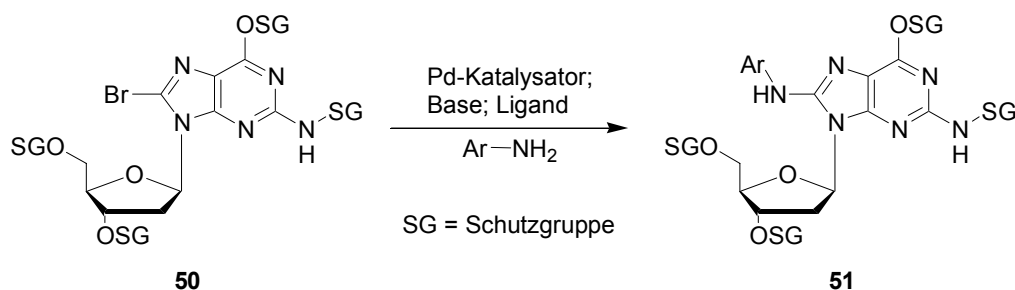


Abb. 24 Adduktbildung durch Buchwald-Hartwig-Reaktion

Ein Hauptaugenmerk dieser Untersuchungen lag neben der Etablierung der katalytischen Methode auf der Entwicklung einer geeigneten Schutzgruppenstrategie. Die Schutzgruppen mussten von den Reaktionsbedingungen der katalytischen Reaktion toleriert werden, sich aber anschließend einfach wieder abspalten lassen bzw. im Molekül verbleiben können und damit für die Festphasensynthese geeignet sein.

Im Anschluss sollten die Oligonucleotidbausteine dargestellt und mittels Festphasensynthese in Oligonucleotide eingebaut werden. Diese sollten dann sowohl physikalischen als auch biologischen Tests unterzogen werden.

So sollten beispielsweise Untersuchungen der Schmelzkurven ( $T_m$ -Werte) und CD-spektroskopische Methoden Auskunft über strukturelle Veränderungen der modifizierten DNA-Fragmente geben können.

Fokus der molekularbiologischen Untersuchungen war die Klärung der Frage, ob es Unterschiede in der Erkennung der Addukte stark cancerogener und weniger stark cancerogener Amine durch verschiedene DNA-Polymerasen gibt. Ferner sollte untersucht werden, ob der Einbau einer modifizierten Base in den Templatstrang zu einer Veränderung der Sequenz (Mutation) des neusynthetisierten Strangs führen kann.

## 4. Resultate und Diskussion

### 4.1 Synthese der C8-Arylamin-modifizierten Oligonucleotidbausteine

Die Darstellung der modifizierten Oligonucleotidbausteine sollte ausgehend von 2'-Desoxyguanosin **23** erfolgen. Der entscheidende Schritt dieser mehrstufigen Synthese liegt in der Einführung der Arylamingruppe in die C8-Position der Nucleobase (vgl. Abb. 25).

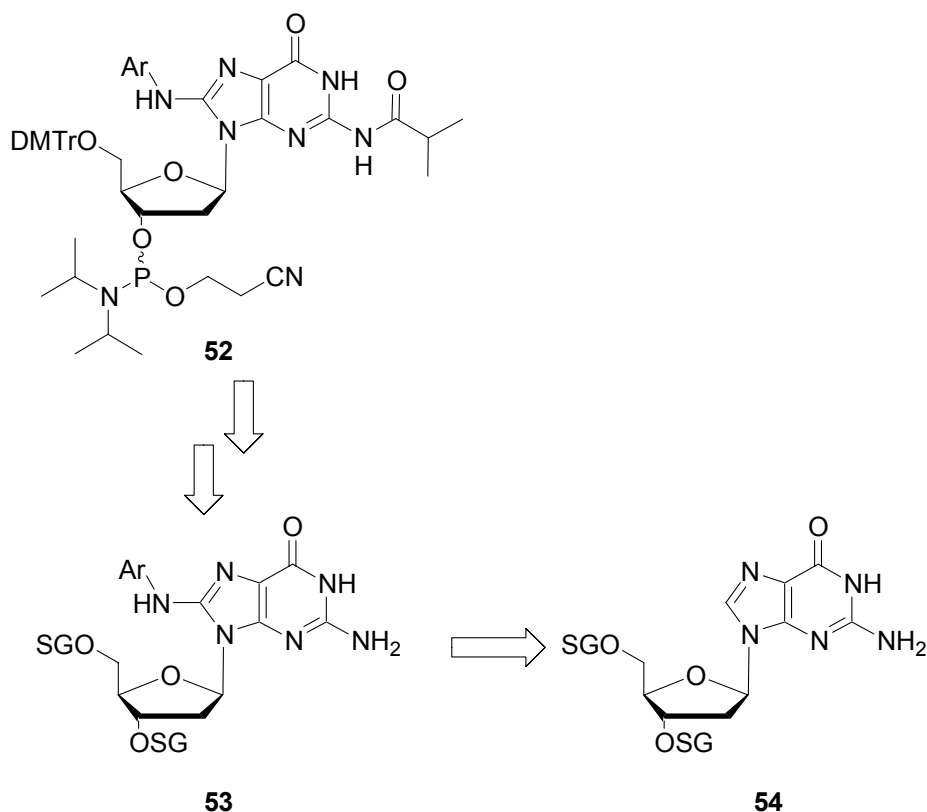


Abb. 25 Retrosynthese der Oligonucleotidbausteine **52**

Für diese C-N-Bindungsknüpfung sind unterschiedliche Methoden bekannt, von denen zwei, die elektrophile Arylaminierung sowie eine Palladium-katalysierte Bindungsknüpfung, in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kommen sollten. Beiden möglichen Syntheserouten ist gemeinsam, dass die Modifikation in der C8-Position der Nucleobase in einem frühen Stadium der Synthesesequenz eingeführt werden soll. In der Folge sollten dann die notwendigen Schutzgruppen (*N*<sup>2</sup>-*iso*-Butyryl und 5'-*O*-DMTr) für die Festphasensynthese eingeführt und abschließend die Phosphoramditfunktion generiert werden.

Im folgenden soll zunächst auf die Versuche zur Einführung der Modifikation durch eine elektrophile Arylaminierung eingegangen werden.

## 4.1.1 Einführung der Arylamingruppe durch Elektrophile Aminierung

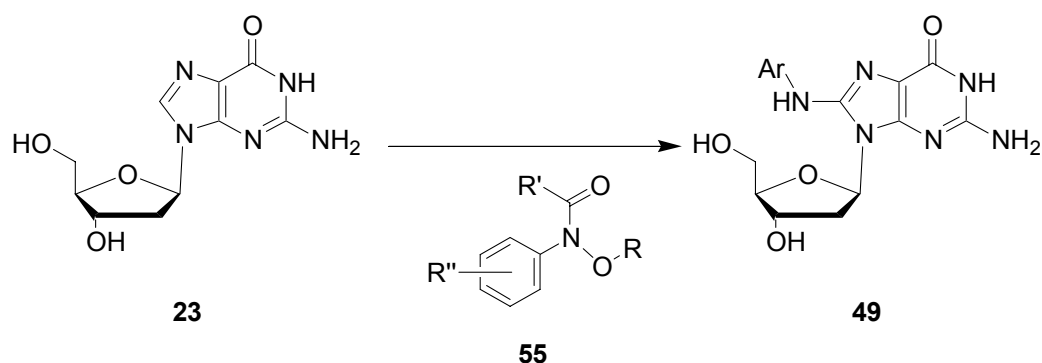


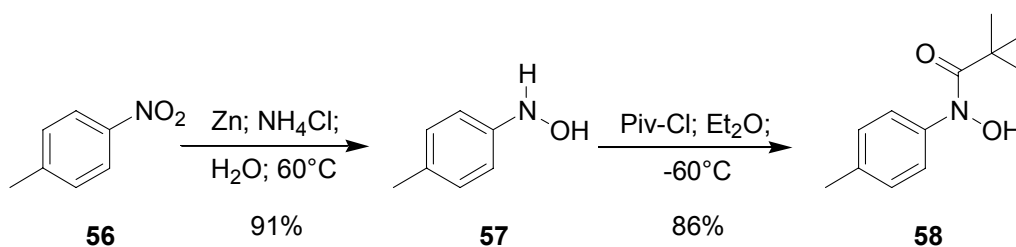
Abb. 26 Allgemeine Darstellung der elektrophilen Arylaminierung

Die literaturbekannten Synthesen gehen direkt vom ungeschützten 2'-Desoxyguanosin **23** aus. Dieses wird mit Reagenzien umgesetzt, welche bei der Reaktion die eigentlich reaktive Spezies, die entsprechenden Nitreniumionen freisetzen (Abb. 26).

Aufgrund der schlechten Löslichkeit von 2'-Desoxyguanosin **23** in organischem Lösungsmittel musste aber zu jeder Reaktion ein protisches Lösungsmittel, wie zum Beispiel Wasser oder Methanol, zugegeben werden. Dies schlug sich natürlich nachteilig auf die Ausbeuten nieder, da sowohl Wasser als auch Methanol die entstehenden Nitreniumionen abfangen können. Ziel sollte es also sein, die Aminierung in einem wasserfreien Medium, bzw. ohne Zugabe von Methanol durchzuführen.

Das bislang vielversprechendste Beispiel einer elektrophilen Arylaminierung in der C8-Position mit einer Ausbeute von 28 % gelang *A. Heimbel*<sup>[78]</sup> durch einen DBU-katalysierten intermediären Acyltransfer aus *N*-(4-Ethoxyphenyl)-*N*-Pivaloylhydroxamsäure **35** bzw. deren intramolekularem Umlagerungsprodukt *N*-Pivaloyloxyphenetidin **36** mit dG **23** (s. Abb. 13, S. 17). Allerdings wurde auch hier mit Methanol als Co-Solvens gearbeitet.

Hierauf aufbauend wurde versucht, das C8-Addukt von *p*-Toluidin darzustellen. Die für die Umsetzung benötigte *N*-(4-Methylphenyl)-*N*-pivaloylhydroxamsäure **57** wurde in zwei Schritten aus *p*-Nitrotoluidin **56** hergestellt (Abb. 27).

Abb. 27 Synthese von *N*-(4-Methylphenyl)-*N*-pivaloylhydroxamsäure **58**



Dazu wurde p-Nitrotoluidin **56** in Wasser aufgenommen und bei 60 °C mit Zinkstaub zur Reaktion gebracht. Nach Aufarbeitung konnte *N*-(4-Methylphenyl)-hydroxylamin **57** in einer Ausbeute von 91 % als farbloser Feststoff isoliert werden. Aufgrund der Labilität dieser Verbindung **57** musste diese sofort zur Hydroxamsäure **58** weiter umgesetzt werden. Für die Umsetzung wurde das Hydroxylamin **57** in wasserfreiem Diethylether gelöst, mit Natriumhydrogencarbonat versetzt und bei -60 °C mit Pivaloylchlorid zur Reaktion gebracht. Das gewünschte Produkt **58** konnte nach Aufarbeitung in einer Ausbeute von 86 % als hellgelber Feststoff isoliert werden.

Die Hydroxamsäure **58** sollte nun als Aminierungsreagenz mit dem ungeschützten Nucleosid umgesetzt werden. Dazu wurde 2'-Desoxyguanosin **23** in absolutem Pyridin suspensiert und das Reaktionsgemisch nach Zugabe des Katalysators DBU und *N*-(4-Methylphenyl)-*N*-pivaloylhydroxamsäure **58** für 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Da auch nach dieser Zeit dünnschichtchromatographisch keine Produktentwicklung nachgewiesen werden konnte, wurde die erhaltene Reaktionsmischung mittels Größenausschlusschromatographie über eine Sephadex LH-20-Säule getrennt. Aus der Mischung konnte jedoch nur das Edukt 2'-Desoxyguanosin **23** isoliert werden.

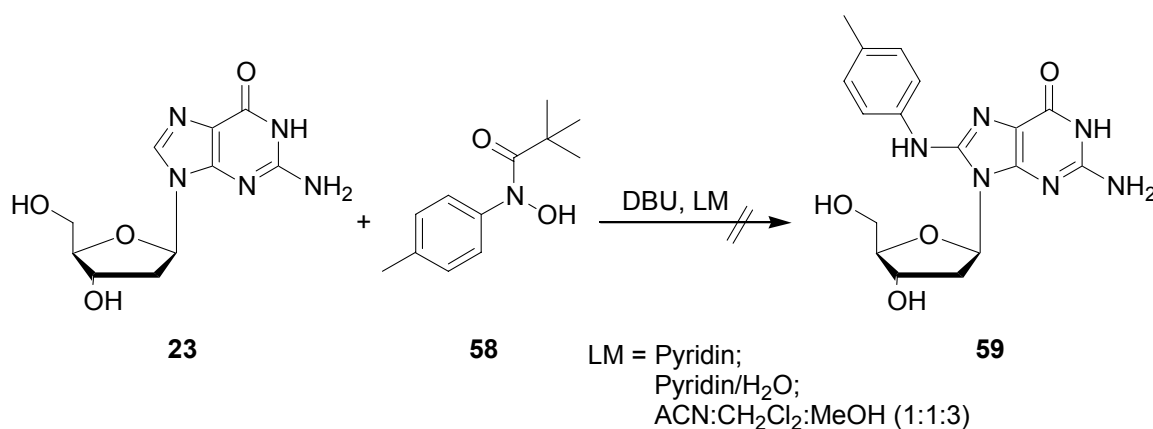


Abb. 28 Versuch der Synthese von 8-*N*-(4-methylphenylamino)-2'-desoxyguanosin **59**

Da sich das Nucleosid **23** in Pyridin allein nur suspensieren ließ, wurde der Versuch daher mit soviel Wasser in Pyridin wiederholt, dass sich das Edukt gerade löste. Nach 24 Stunden konnte dünnschichtchromatographisch die Bildung eines Produktes nachgewiesen werden, dass sich jedoch durch herkömmliche chromatographische Trennmethode nicht in reiner Form isolieren ließ. Jedoch konnte aus dem NMR-Spektrum des Rohgemisches aufgrund des Fehlens des Signals des Protons in der 8-Position der Nucleobase geschlossen werden, dass sich das gewünschte Produkt **59** zumindest teilweise gebildet hatte. Eine HPLC-

chromatographische Aufreinigung wie bei *A. Heimbel* beschrieben, war wegen der Größe der für die weiteren Umsetzungen benötigten Mengen nicht möglich.

Auch eine Wiederholung des Versuchs mit dem von *A. Heimbel* verwendeten Lösungsmittelgemisch (Acetonitril/Dichlormethan/Methanol 1:1:3), sowie eine portionsweise Zugabe von 4 Äquivalenten Hydroxamsäure **58** lieferte aufgrund der immer wieder auftretenden Trennprobleme das Produkt nicht in reiner Form.

Da das gewünschte Produkt immer noch mit dem Ausgangsmaterial 2'-Desoxyguanosin **23** verunreinigt war, wurde nun versucht, das Produktgemisch weiter umzusetzen, in der Hoffnung, bei der Aufreinigung des Folgeproduktes eine vollständige Trennung zu erhalten. Der Folgeschritt sollte die Schützung der exocyclischen Aminogruppe als *iso*-Butyramid sein.

Die Reaktion wurde analog zu *R.A. Jones et al.*<sup>[103]</sup> durchgeführt. Es handelt sich hierbei um eine sogenannte „*Transient Protection*“. Dabei werden zunächst die beiden freien Hydroxylgruppen mit Trimethylsilylchlorid (TMS-Cl) in die Silylether überführt, die abschließend, nach der Umsetzung mit dem eigentlichen Reagenz Isobutyrylchlorid, wieder unter wässrigen Bedingungen gespalten werden. Aufgrund der geringen Menge an modifizierter Ausgangssubstanz wurde die Reaktion zunächst an 2'-Desoxyguanosin **23** als Referenzverbindung durchgeführt. Das unmodifizierte Produkt konnte nach Aufarbeitung und Umkristallisation in einer Ausbeute von 59 % erhalten werden.

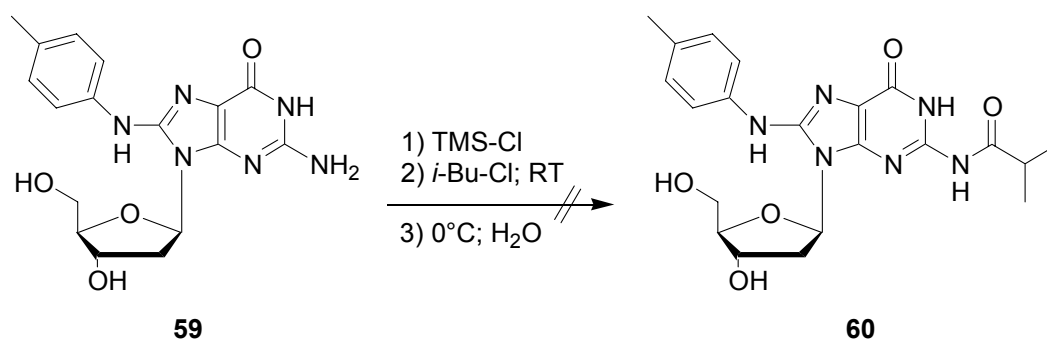


Abb. 29 Versuch der Synthese von 8-*N*-(4-methylphenylamino)-2'-Desoxyguanosin **60**

Die Durchführung der Reaktion mit dem aus der elektrophilen Aminierung erhaltenen Gemisch lieferte nur ein Produkt in geringen Mengen, das wohl aus dem noch in geringen Mengen enthaltenen Edukt entstandene, *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-2'-desoxyguanosin (Abb. 29).

Da die bei der Trennung der Produkte der elektrophilen Arylaminierung auftretenden Probleme nicht gelöst werden konnten, wurde diese Syntheseroute nicht weiter verfolgt.

Es wurde nun versucht, die C-N-Bindungsknüpfung durch eine Palladium-katalysierte Reaktion zu erreichen. Auf diese Synthesestrategie soll im folgenden detaillierter eingegangen werden.

#### 4.1.2 C-N-Bindungsknüpfung durch Buchwald-Hartwig-Reaktion

Da die Knüpfung der C-N-Bindung an der Nucleobase mit Hilfe der elektrophilen Arylaminiierung nicht erfolgreich war, sollte versucht werden, diese Bindung mit Hilfe einer Palladium-katalysierten Reaktion zu knüpfen.

Zur Anwendung der sogenannten Buchwald-Hartwig-Reaktion war ein Synthesebaustein mit folgender allgemeiner Struktur notwendig (Abb. 30):

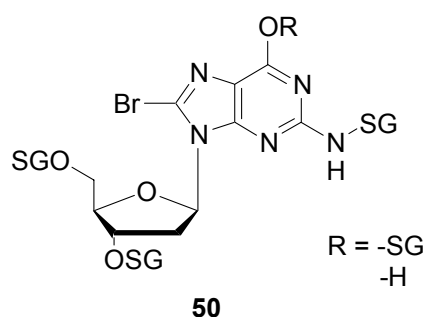


Abb. 30 Allgemeine Struktur des Ausgangsmaterials für die Buchwald-Hartwig-Kupplung

Potentielle nucleophile Zentren des 2'-Desoxyguanosins **23** mussten vor der Durchführung der katalytischen Reaktion geschützt werden, da diese Gruppen aufgrund ihrer Nucleophilie den Katalysezyklus stören könnten. Eine weitere Notwendigkeit für die Einführung einer Schutzgruppe an der exocyclischen Aminogruppe liegt darin, dass es bei der Buchwald-Hartwig-Reaktion zu einer Arylaminiierung mit dieser Aminofunktion und damit zu einer Dimerisierung der nucleosidischen Bausteine kommen könnte.

Aufgrund der Bromierung in der 8-Position der Nucleobase sowie der Einführung der Schutzgruppe an der exocyclischen Aminogruppe ändern sich die elektronischen Verhältnisse im aromatischen Heterocyclus und dieser wird elektronenärmer. Daher könnte es notwendig sein, die Elektronendichte im Heterocyclus durch Überführung des Amids in einen Azaenolether zu erhöhen. Dies könnte zu einer Beschleunigung der katalytischen Reaktion führen.

Grundvoraussetzung für alle drei möglichen Schutzgruppen war, dass diese die Bedingungen der Palladium-katalysierten Reaktion, Erhitzen auf 80 °C sowie schwach basische

Bedingungen, tolerieren. Außerdem sollten die Schutzgruppen nicht unter stark basischen, wässrigen Bedingungen abspaltbar sein, da diese Bedingungen von der modifizierten Nucleobase nicht toleriert werden.

Aufgrund dieser Voraussetzungen kommen als Schutzgruppen für die beiden Hydroxylgruppen (vgl. Abb. 30, S. 31) acylische Schutzgruppen (z.B. Acetyl) oder Silylether infrage. Diese lassen sich beispielsweise unter nicht-wässrigen, basischen Bedingungen bzw. mit Fluoriden abspalten, sind jedoch gegenüber erhöhten Temperaturen sowie schwachen, nicht nucleophilen Basen stabil.

Als Schutzgruppen für die exocyclische Aminofunktion (vgl. Abb. 30, S. 31) kommen Schutzgruppen wie die *tert*-Butyloxycarbonylgruppe (BOC) oder die *iso*-Butyrylgruppe (*i*-Bu) infrage, die unter den Katalysebedingungen stabil sein sollten, sich jedoch unter nicht-wässrigen, basischen Bedingungen bzw. mit Säuren abspalten lassen. Die *iso*-Butyrylschutzgruppe böte zusätzlich den großen Vorteil, dass sie als Standardschutzgruppe für die exocyclische Aminogruppe des Guanosins bei der Festphasensynthese von Oligonucleotiden gilt, und somit bis nach der Synthese der DNA-Fragmente im Molekül verbleiben könnte.

Zur Überführung des Amids des Heterocyclus in einen Azaenoether (vgl. Abb. 30, S. 31) kommt zunächst die Benzylgruppe (Bn), die sich mittels Hydrogenolyse abspalten lässt, infrage. Es ist jedoch auch möglich, einen Alkylazaenoether mit der 4-Cyanophenylethylgruppe (CPE) zu generieren, der sich mit nicht nucleophilen Basen in aprotischen Lösungsmitteln im Sinne einer  $\beta$ -Eliminierung spalten lässt. Auch diese Gruppe könnte wie die *iso*-Butyrylgruppe bis nach der Oligonucleotidsynthese im Molekül verbleiben und würde dann beispielsweise mit ammoniakalischer Methanollösung zusammen mit den Schutzgruppen an den exocyclischen Aminogruppen sowie der 2-Cyanaoethyl-Schutzgruppe am Phosphatrest abgespalten.

#### 4.1.2.1 Versuch der katalytischen Arylaminierung mit Acetyl-Schutzgruppen

Um den Acetyl-geschützten Synthesebaustein **62** für die Buchwald-Hartwig-Kupplung zu erhalten, sollten zunächst die beiden Hydroxylgruppen mit Acetyl-Schutzgruppen versehen werden. Danach sollte es möglich sein, an der 8-Position des Heterocyclus zu bromieren und abschließend eine *iso*-Butyrylschutzgruppe an der exocyclischen Aminogruppe einzuführen (vgl. Abb. 31, S. 33).

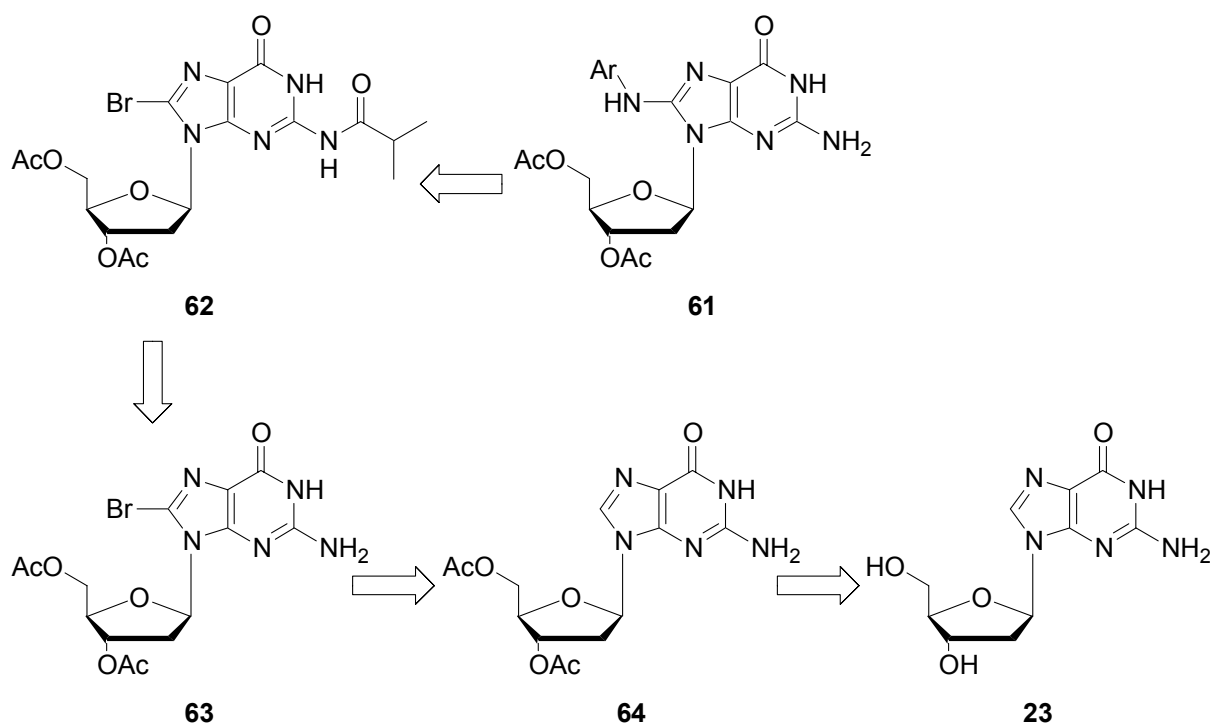


Abb. 31 Synthesestrategie mit Acetyl-Schutzgruppen

Um den Acetyl-geschützten Synthesebaustein zu erhalten, sollten zunächst die beiden Hydroxylgruppen mit Acetanhydrid geschützt werden (s. Abb. 32).

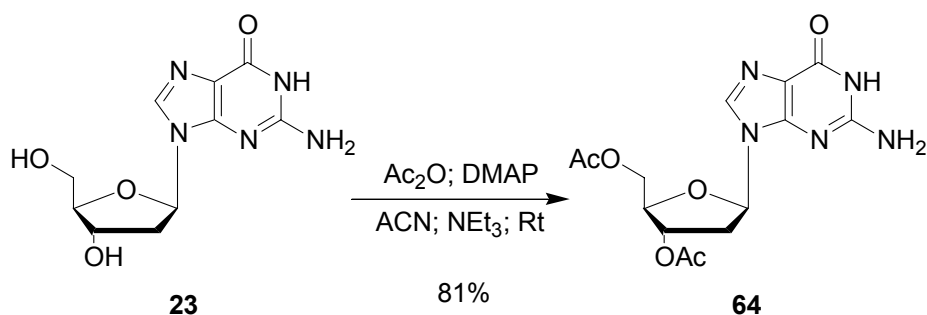


Abb. 32 Synthese von 3',5'-Bisacetyl-2'-desoxyguanosin 64

Dazu wurde 2'-Desoxyguanosin **23** in absolutem Acetonitril gelöst, mit 4-Dimethylaminopyridin, Triethylamin und Acetanhydrid versetzt und bei Raumtemperatur für 18 Stunden gerührt. Nach Aufarbeitung konnte 3',5'-Bisacetyl-2'-desoxyguanosin **64** in einer Ausbeute von 81 % als farbloser Feststoff isoliert werden.

Dieser wurde im Anschluss, mit *N*-Bromsuccinimid an der 8-Position der Nucleobase bromiert (s. Abb. 33, S. 34).

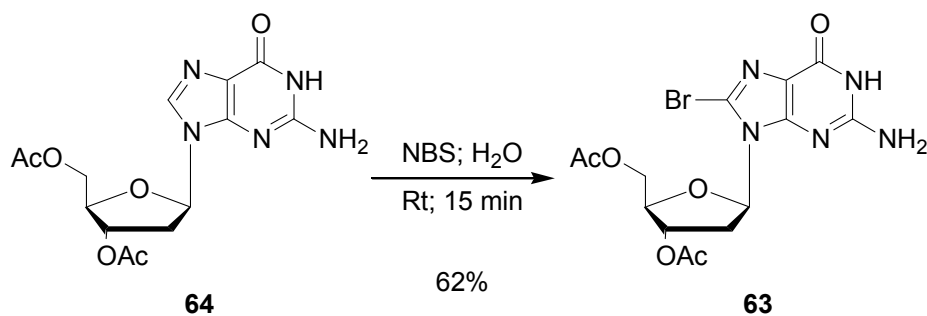


Abb. 33 Bromierung von 3',5'-Bisacetyl-2'-desoxyguanosin **64**

Hierzu wurde fein gepulvertes 3',5'-Bisacetyl-2'-desoxyguanosin **64** in Wasser suspendiert und mit N-Bromsuccinimid zur Reaktion gebracht. Abfiltrieren vom Lösungsmittel nach 15 Minuten lieferte das Produkt 8-Brom-3',5'-bisacetyl-2'-desoxyguanosin **63** in einer Ausbeute von 62 %.

Zur Schützung der exocyclischen Aminogruppe wurde Verbindung **63** in wasserfreiem Pyridin aufgenommen und mit *iso*-Butyrylchlorid (*i*-Bu-Cl) versetzt. Nach zweistündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde wässrig aufgearbeitet. Das gewünschte Produkt, *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-brom-3',5'-bisacetyl-2'-desoxyguanosin **62** konnte nach chromatographischer Aufreinigung in einer Ausbeute von 75 % als hellgelber Feststoff isoliert werden (Abb. 34).

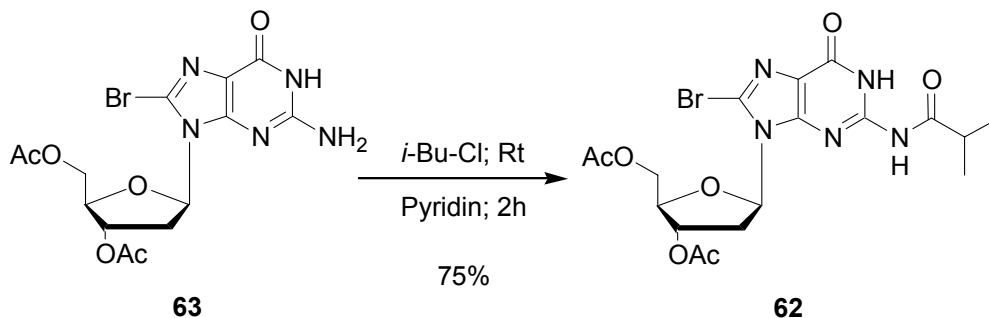


Abb. 34 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-brom-3',5'-bisacetyl-2'-desoxyguanosin **62**

*N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-brom-3',5'-bisacetyl-2'-desoxyguanosin **63** wurde nun einer Buchwald-Hartwig-Reaktion unterzogen. Als Referenzverbindung wurde *p*-Toluidin als Aminkomponente eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen wurden wie bei *M.K. Lakshman et al.*<sup>[92]</sup> gewählt. Unter diesen Bedingungen gelang den Autoren, wie in Kapitel 2.3.3, S. 20 beschrieben, die Arylaminierung in der 6-Position von 2'-Desoxyguanosin **23**. Allerdings wurde nicht der dort beschriebene, damals nicht kommerziell erhältliche, Katalysator 2-(Dicyclohexylphosphino)-2'-(*N,N*-dimethylamino)-1,1'-biphenyl eingesetzt, sondern der von *E. Schoffers et al.*<sup>[97]</sup> für die Synthese von C8-Arylamin modifizierten Adenosin-Derivaten verwandte Ligand, 2,2'-Bis-(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl (BINAP).

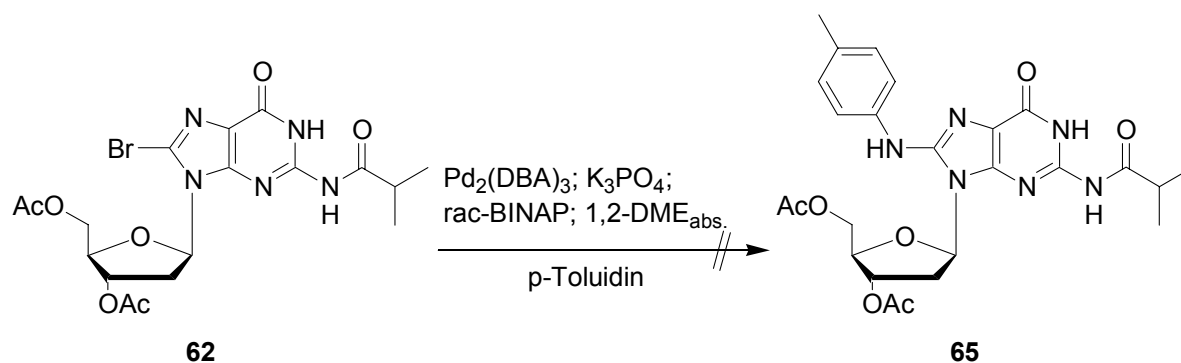


Abb. 35 Versuchte Synthese von  $N^2$ -*i*-Butyryl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-3',5'-bisacetyl-2'-desoxyguanosin **65**

Der Katalysator ( $\text{Pd}_2(\text{DBA})_3$ ; 10 mol%), der Ligand (rac-BINAP; 30 mol%) und die Base ( $\text{K}_3\text{PO}_4$ ) wurden unter Schutzgas eingewogen. Dann wurden das Edukt  $N^2$ -Bis(*t*-butyloxycarbonyl)- $O^6$ -benzyl-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **62**, wasserfreies 1,2-Dimethoxyethan (1,2-DME) und *p*-Toluidin zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 48 Stunden bei 80 °C gerührt. Die dünnschichtchromatographische Verfolgung der Reaktion zeigte jedoch keinerlei Produktbildung.

Vermutlich führt das veränderte Substitutionsmuster am aromatischen Heterocyclus zu einer Erniedrigung der Elektronendichte. Diese Verringerung der Elektronendichte ist vermutlich dafür verantwortlich, dass die Buchwald-Hartwig-Reaktion mit Verbindung **65** als Ausgangsmaterial scheiterte. Eine Möglichkeit, die Elektronendichte in der Nucleobase zu erhöhen, ist die Überführung des Amids in einen Azaenolether. Diese Synthesestrategie wurde jedoch nicht mehr für die Bisacetylverbindungen durchgeführt, sondern es wurden andere Schutzgruppen für die Hydroxylgruppen der 2'-Desoxyriboseeinheit verwendet. Auf diese Untersuchungen soll im folgenden Kapitel näher eingegangen werden.

#### 4.1.2.2 Palladium-katalysierte C-N-Bindungsknüpfung unter Verwendung eines $O^6$ -benzylierten 2'-Desoxyguanosinderivates

Da die Buchwald-Hartwig-Reaktion mit  $N^2$ -*i*-Butyryl-8-brom-3',5'-bisacetyl-2'-desoxyguanosin **65** nicht erfolgreich war, sollte nun versucht werden, die Elektronendichte im Heterocyclus durch Überführung des Amids in einen Azaenolether zu erhöhen. Dazu wurde die Schutzgruppenstrategie, wie in Abb. 36, S. 36 dargestellt, verändert.

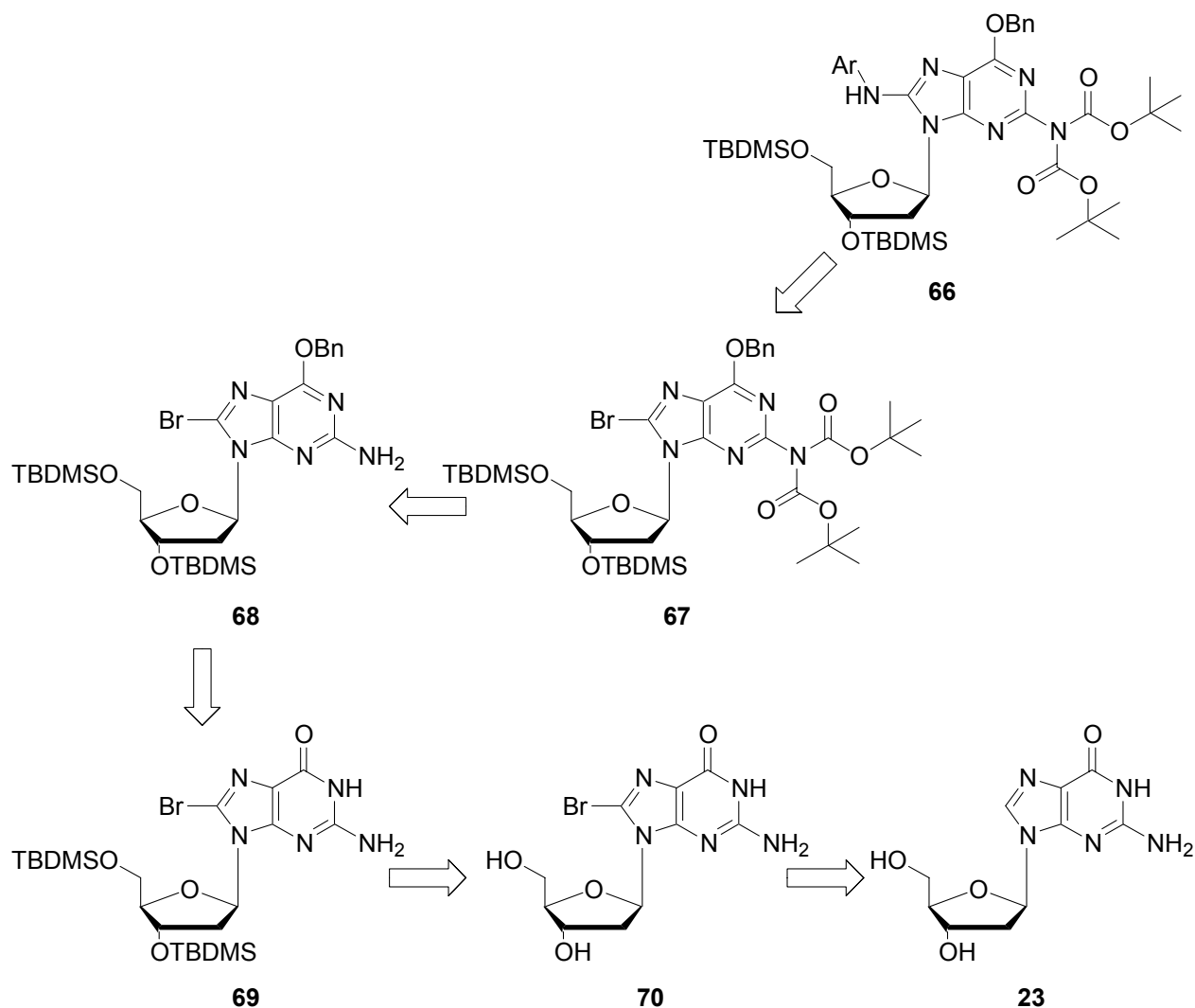


Abb. 36 Synthesestrategie mit einer  $O^6$ -Benzyl-Schutzgruppe

Da sich Silylether unter milden, nicht basischen Bedingungen abspalten lassen, sind sie noch besser für die Schützung der beiden Hydroxylgruppen von 2'-Desoxyguanosin **23** geeignet.

Daher sollte ausgehend von 2'-Desoxyguanosin **23** zunächst in der 8-Position der Nucleobase bromiert werden, bevor die beiden Silylschutzgruppen eingefügt werden sollten. Anschließend sollte der Benzylazaenoether gebildet werden. Die Benzylgruppe lässt sich mittels Hydrogenolyse unter milden Bedingungen wieder abspalten. Zur Darstellung des Ausgangsmaterials für die Buchwald-Hartwig-Reaktion sollten in einem abschließenden Reaktionsschritt zwei BOC-Schutzgruppen an der exocyclischen Aminogruppe eingeführt werden. Die BOC-Schutzgruppe ist in der Peptidsynthese weit verbreitet und lässt sich beispielsweise mit Trifluoressigsäure wieder abspalten.

Zunächst musste 2'-Desoxyguanosin **23** bromiert werden. Die Reaktion wurde nach *P.M. Gannett* und *T.P. Sura* durchgeführt (Abb. 37, S. 37).<sup>[104]</sup>



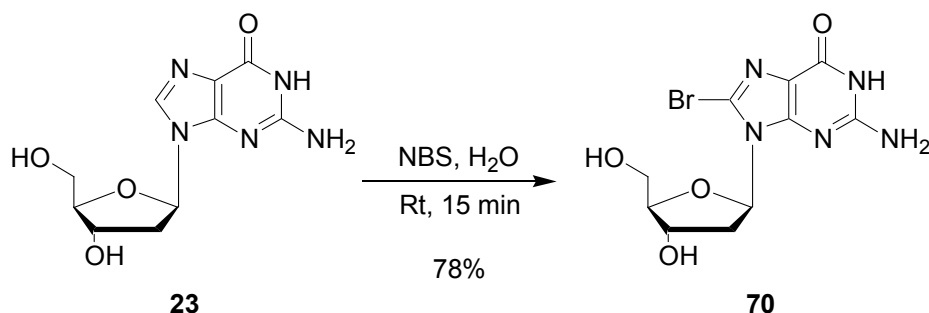


Abb. 37 Synthese von 8-Brom-2'-desoxyguanosin (Br-dG) **70**

Dazu wurde feingepulvertes 2'-Desoxyguanosin **23** in Wasser aufgenommen, mit *N*-Bromsuccinimid (NBS) versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt, 8-Brom-2'-desoxyguanosin (Br-dG) **70** konnte in einer Ausbeute von 78 % isoliert werden.

Die Übertragung dieser Reaktionsdurchführung auf Eduktmengen von über 500 mg ist bei dieser Reaktion allerdings nicht möglich, da vermehrt eine Spaltung der glycosidischen Bindung beobachtet werden konnte. Die Synthese größerer Mengen Produkt konnte deshalb nur durch mehrere Parallelansätze realisiert werden.

Nun wurden die, für Nucleoside üblichen, und auch für die Palladium-Katalyse bereits verwendeten<sup>[92]</sup> *tert*-Butyldimethylsilyl-Gruppen eingeführt (Abb. 38). Diese Schutzgruppen lassen sich ohne den Einsatz von wässrigen Basen abspalten, sollten aber den leicht basischen Bedingungen und den Temperaturen der Palladium-Katalyse standhalten können.

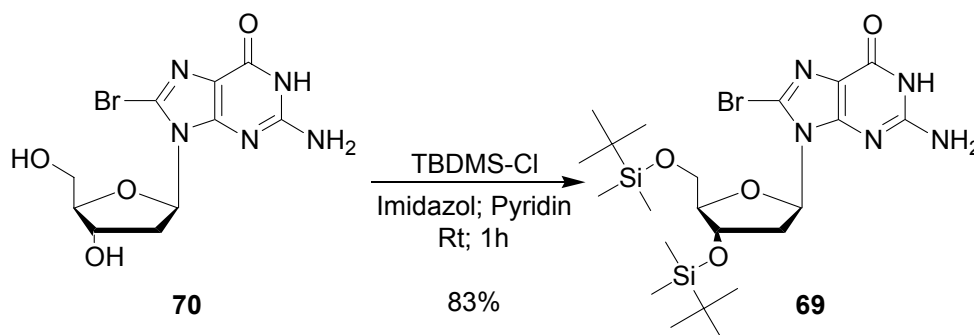


Abb. 38 Synthese von 8-Brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **69**

Die Synthese wurde analog zu *P.B. Hopkins* et al. durchgeführt.<sup>[105]</sup> Zunächst wurde die Reaktion wie in der Vorschrift beschrieben mit *N,N*-Dimethylformamid (DMF) als Lösungsmittel durchgeführt, es zeigte sich jedoch, dass durch den Austausch von DMF durch Pyridin die Reaktionszeit drastisch gesenkt und die Aufarbeitung vereinfacht werden konnte.

Im Anschluss an die Schützung der Hydroxylgruppen musste die Amidfunktion der Nucleobase in einen Azaenolether überführt werden, da Katalyseversuche ohne die Schützung dieser Funktion erfolglos geblieben waren. Als Schutzgruppe wurde analog zu *P.B. Hopkins*

et al.<sup>[93]</sup> die Benzylgruppe verwendet, die mittels einer Mitsunobu-artigen Reaktion mit Benzylalkohol eingeführt werden konnte (Abb. 39).

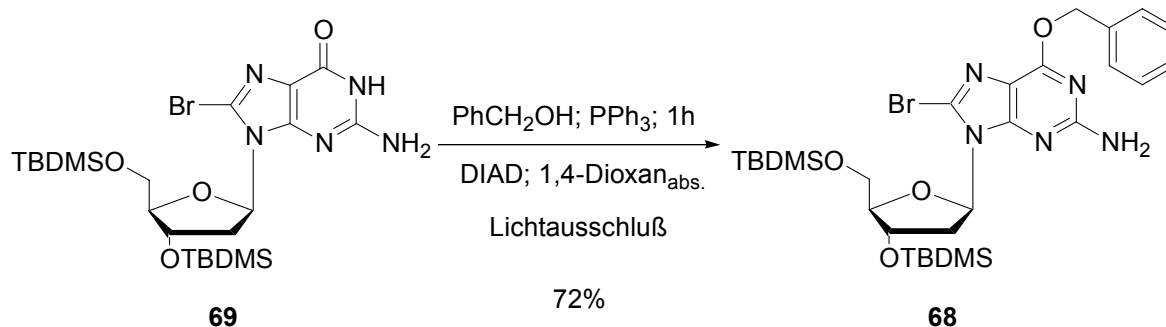


Abb. 39 Synthese von *O*<sup>6</sup>-Benzyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **68**

8-Brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **69** wurde in wasserfreiem 1,4-Dioxan suspendiert, mit Triphenylphosphin und Benzylalkohol versetzt und Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) tropfenweise zugegeben. Das gewünschte Produkt *O*<sup>6</sup>-Benzyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **68** konnte in einer Ausbeute von 72 % isoliert werden.

Die Reaktion wurde zunächst, wie von *P.B. Hopkins* et al. beschrieben, ohne Lichtausschluss durchgeführt, aber es zeigte sich, dass das Abkleben des Reaktionskolbens während der Reaktion zu höheren Ausbeuten führte. Ein Grund hierfür könnte in der Lichtempfindlichkeit des Diisopropylazodicarboxylates liegen.

Zuletzt musste nun noch die exocyclische Aminogruppe geschützt werden, um Nebenreaktionen bei der Buchwald-Hartwig-Reaktionen zu vermeiden. Diese Schützung wurde mit Di-*tert*-Butyldicarbonat und Lithiumhexamethyldisilazid (LiHMDS) durchgeführt und lieferte das zweifach BOC-geschützte Produkt **67** in einer Ausbeute von 84 % (Abb. 40, S. 39). Eine Anwendung dieser Schutzgruppe für die Synthese von C8-Addukten via Buchwald-Hartwig-Reaktion war kurz zuvor von *C.J. Rizzo* und *Z. Wang* beschrieben worden.<sup>[11]</sup>

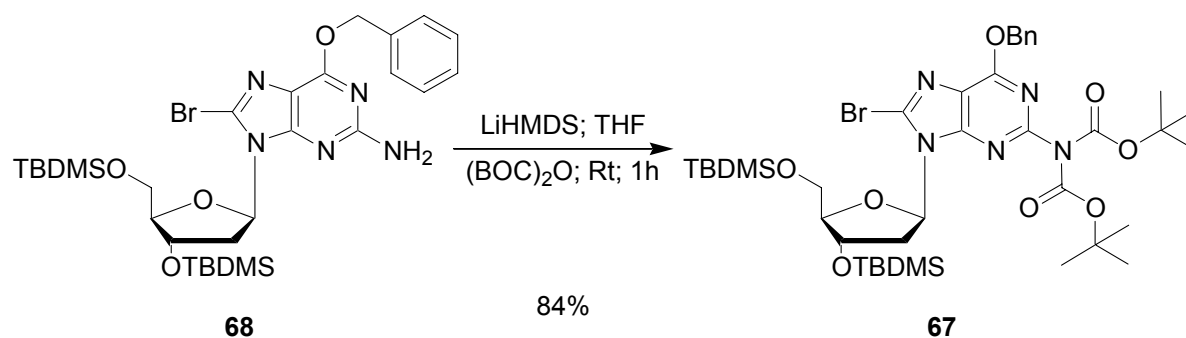


Abb. 40 Synthese von *N*<sup>2</sup>-Bis(*t*-butyloxycarbonyl)-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **67**

Die Verwendung der schwächeren Base Natriumhexamethyldisilazid (NaHMDS) lieferte selektiv das nur einfach geschützte Derivat bei gleicher Reaktionsführung in einer Ausbeute von 76 % (Abb. 41).

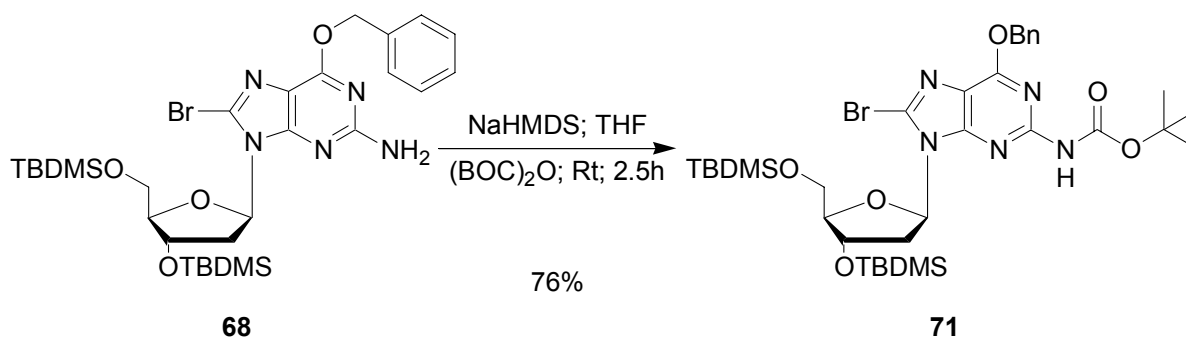


Abb. 41 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*t*-Butyloxycarbonyl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **71**

Das vollgeschützte *N*<sup>2</sup>-Bis(*t*-butyloxycarbonyl)-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **67** wurde nun einer Buchwald-Hartwig-Reaktion unterzogen. Als Referenzverbindung wurde wie bereits zuvor *p*-Toluidin als Aminkomponente eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen wurden wiederum wie bei *M.K. Lakshman et al.*<sup>[92]</sup> dargestellt gewählt. Es wurde erneut der von *E. Schoffers et al.*<sup>[97]</sup> für die Synthese von C8-Arylamin modifizierten Adenosin-Derivaten benutzte Ligand, 2,2'-Bis-(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl (BINAP) verwandt (Abb. 42, S. 40).

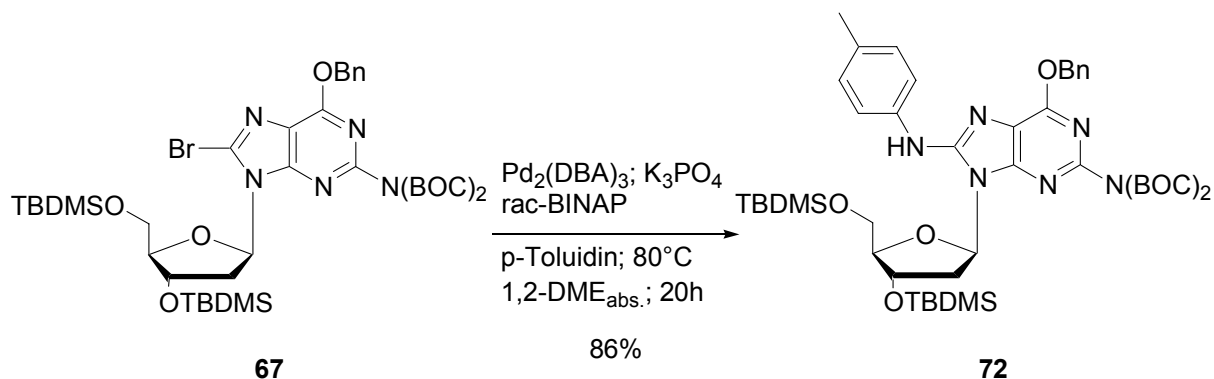


Abb. 42 *Synthese von N<sup>2</sup>-Bis(t-butyloxycarbonyl)-O<sup>6</sup>-benzyl-8-N-(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(t-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin 72*

Der Katalysator ( $\text{Pd}_2(\text{DBA})_3$ ; 10 mol%), der Ligand ( $\text{rac-BINAP}$ ; 30 mol%) und die Base ( $\text{K}_3\text{PO}_4$ ) wurden unter Argon eingewogen. Dann wurden das Edukt *N<sup>2</sup>-Bis(t-butyloxycarbonyl)-O<sup>6</sup>-benzyl-3',5'-bis(t-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin 67*, absolutes 1,2-Dimethoxyethan (1,2-DME) und das Amin zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 20 Stunden bei 80 °C gerührt, anschließend aufgearbeitet und chromatographisch aufgereinigt. Das Produkt *N<sup>2</sup>-Bis(t-butyloxycarbonyl)-O<sup>6</sup>-benzyl-8-N-(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(t-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin 72* konnte in 86 % Ausbeute erhalten werden.

Eine Instabilität einer der beiden BOC-Schutzgruppen, wie bei *C.J. Rizzo* und *Z. Wang* beschrieben, wurde unter den oben angegebenen Bedingungen nicht beobachtet.

Im Anschluss musste nun überprüft werden, ob sich beide BOC-Schutzgruppen aus dem Addukt wieder abspalten lassen. Die Abspaltung sollte wegen der Basenlabilität des Adduktes mit Trifluoressigsäure geschehen (Abb. 43).

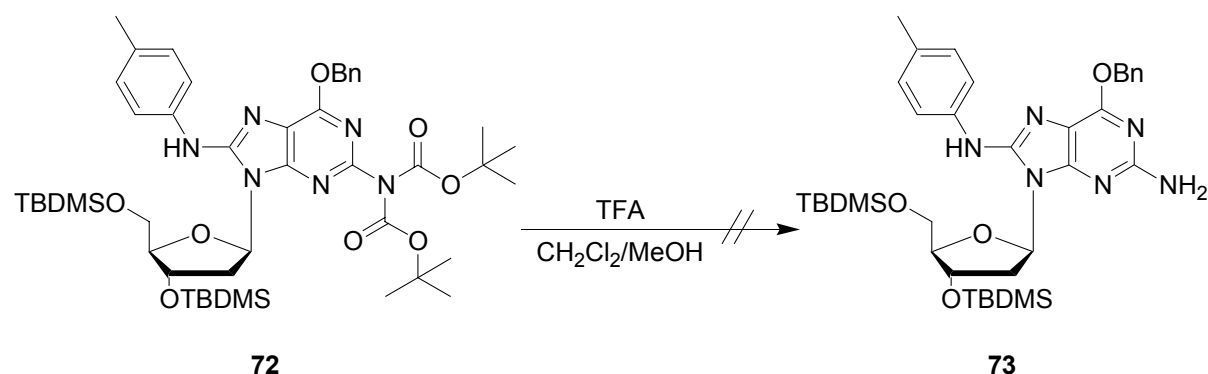


Abb. 43 *Versuch der Synthese von O<sup>6</sup>-benzyl-8-N-(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(t-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin 73*

Das Toluidin-Addukt **72** wurde in wenig Dichlormethan gelöst, mit 2 %-iger Trifluoressigsäure-Lösung in Dichlormethan/Methanol versetzt und mehrere Stunden gerührt. Da auch nach 4 Stunden dünnschichtchromatographisch keine Reaktion erkennbar war, wurde noch mehrmals 5 %-ige Trifluoressigsäure-Lösung zugegeben und über Nacht gerührt. Da sich aber auch jetzt keine Reaktion zeigte, wurde die Reaktion abgebrochen.

Die beiden BOC-Schutzgruppen ließen sich demnach nicht mit TFA abspalten. Es musste also eine andere Schutzgruppe für die exocyclische Aminogruppe gefunden werden.

Erste Überlegungen ließen die Schützung mit zwei *iso*-Butyryl-Gruppen als sinnvoll erscheinen. Sie könnten analog der BOC-Gruppen eingeführt werden und könnten bis nach der Oligonucleotidsynthese im Molekül verbleiben, da die *iso*-Butyryl-Schutzgruppe eine Standardschutzgruppe für die exocyclische Aminogruppe in dG-Phosphoramiditen ist und nach der Oligonucleotidsynthese zusammen mit den anderen Schutzgruppen mit konzentriertem Ammoniak abgespalten werden kann.

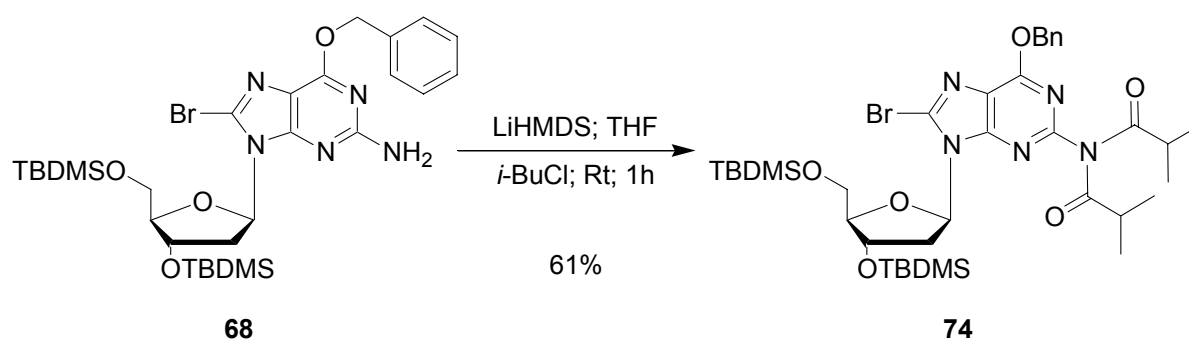


Abb. 44 *Synthese von N<sup>2</sup>-Bis(i-Butyryl)-O<sup>6</sup>-benzyl-3',5'-bis(t-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin 74*

Die Reaktion wurde analog der Synthese der Bis-BOC-Verbindung **67** durchgeführt und lieferte *N*<sup>2</sup>-Bis(*i*-Butyryl)-*O*<sup>6</sup>-benzyl-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **74** in einer Ausbeute von 61 %.

Mit dieser Verbindung wurde nun ebenfalls eine Buchwald-Hartwig-Reaktion durchgeführt (s. Abb. 45, S. 42).

Die Reaktion wurde analog der Synthese der zweifach BOC geschützten Verbindung **72** durchgeführt. Es zeigte sich allerdings, dass nicht beide *iso*-Butyryl-Schutzgruppen unter den Reaktionsbedingungen stabil sind, sondern eine der Schutzgruppen teilweise abgespalten wird. Deshalb wurde die Reaktion nach 20 Stunden abgebrochen. Eine Ausbeutebestimmung war demnach nicht möglich. Proben von 4 verschiedenen Fraktionen konnten getrennt isoliert und NMR-spektroskopisch untersucht werden. Sie enthielten zweifach **75** und einfach **76** geschütztes Produkt, sowie doppelt **74** und einfach **77** geschütztes Edukt.

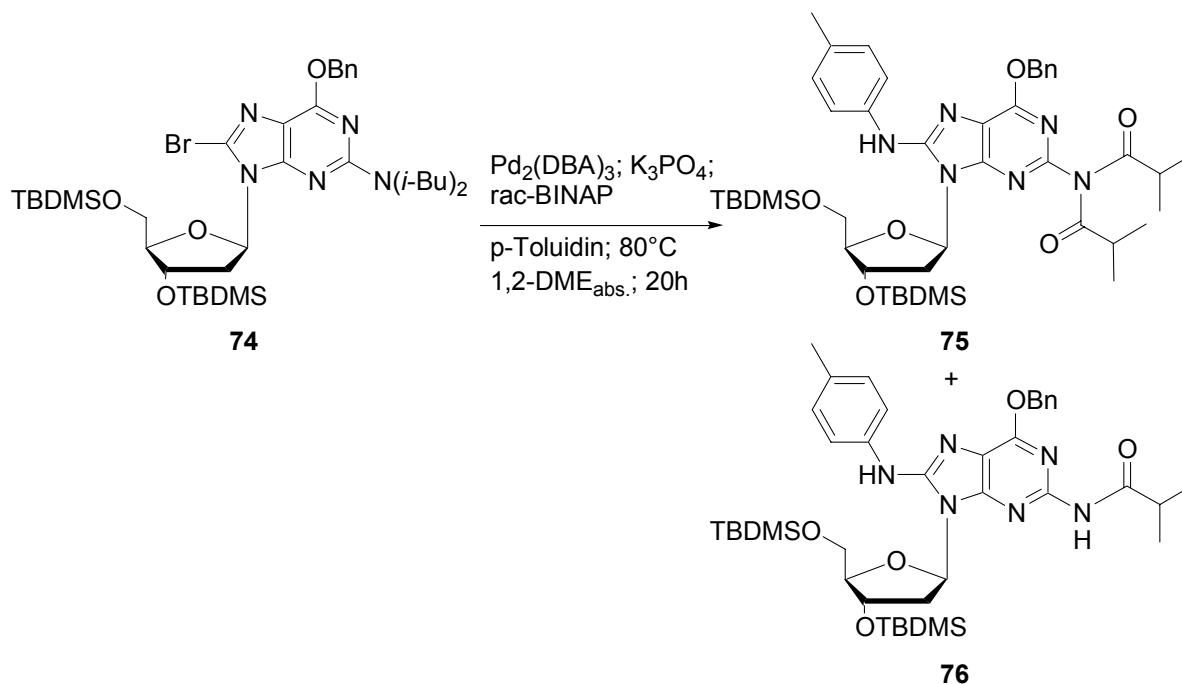


Abb. 45 Synthese von  $N^2$ -Bis(*i*-Butyryl)- $O^6$ -benzyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **75**

Basierend auf diesem Ergebnis stellte sich die Frage, ob nicht auch eine einfache Schützung der exocyclischen Aminogruppe ausreichend wäre. Daher wurde nun das einfach *iso*-Butyrylgeschützte Derivat,  $N^2$ -*i*-Butyryl- $O^6$ -benzyl-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **77** dargestellt (Abb. 46).

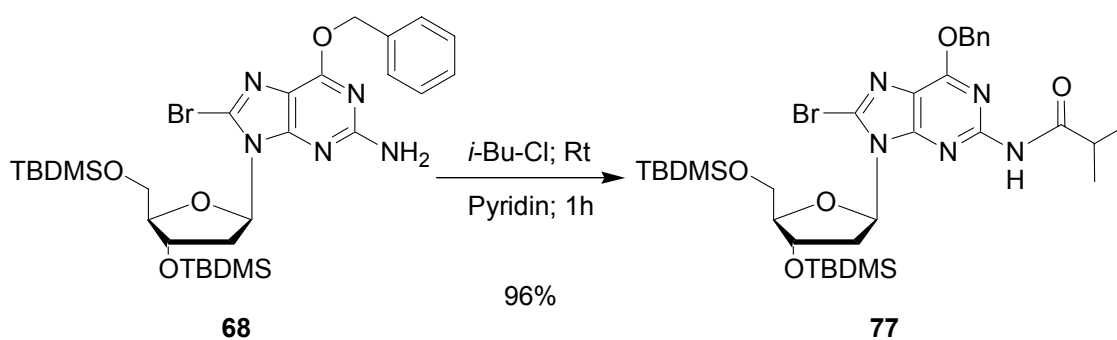


Abb. 46 Synthese von  $N^2$ -*i*-Butyryl- $O^6$ -benzyl-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **77**

$O^6$ -Benzyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **68** wurde in absolutem Pyridin mit Isobutyrylchlorid für eine Stunde bei Raumtemperatur umgesetzt. Durch Zugabe von Methanol wurde die Reaktion abgebrochen und nach anschließender Aufarbeitung das Rohprodukt chromatographisch getrennt. Das gewünschte Produkt,  $N^2$ -*i*-Butyryl- $O^6$ -benzyl-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **77** konnte in einer Ausbeute von 96 % isoliert werden.

Nach der Synthese der Ausgangsverbindung **77** für die Palladium-katalysierte Arylaminierung sollte diese nun unter Buchwald-Hartwig Bedingungen durchgeführt werden. Wiederum wurde die Reaktion zunächst mit p-Toluidin als Referenzverbindung durchgeführt.

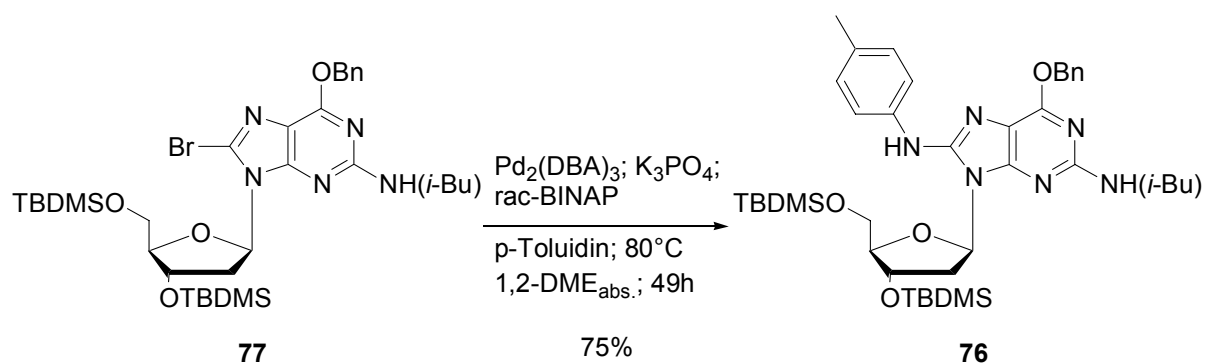


Abb. 47 *Synthese von N<sup>2</sup>-i-Butyryl-O<sup>6</sup>-benzyl-8-N-(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(t-butyl dimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **76***

Die Reaktion wurde analog der Synthese der Verbindungen **72** und **75** durchgeführt und lieferte das gewünschte Produkt **76**, nach einer Reaktionszeit von 50 Stunden, in einer Ausbeute von 75 % (Abb. 47).

Der Mechanismus dieser Reaktion ist noch nicht entgültig geklärt, wurde aber von *S.L. Buchwald* et al. postuliert<sup>[106]</sup> und wurde hier auf die Arylaminierung an C8-Position des 2'-Desoxyguanosins übertragen (s. Abb. 48, S. 44).

Die Pd-katalysierte Arylaminierung verläuft sehr wahrscheinlich über die oxidative Addition des Arylbromids **I** an die Pd<sup>0</sup>-Spezies (BINAP)Pd<sup>0</sup>, welche sich zunächst aus Pd<sub>2</sub>(DBA)<sub>3</sub> und BINAP bildet, und die Bildung des Pd<sup>II</sup>-Intermediats **II**. Durch Koordination des Amins an **II** bildet sich die pentakoordinierte Verbindung **III**. Die Deprotonierung des koordinierten Amins durch die zugegebene Base K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> liefert die Verbindung **IV**, die unter reduktiver Eliminierung das gewünschte Arylaminaddukt **V** bildet und dabei den Pd<sup>0</sup>-Katalysator zurückbildet.

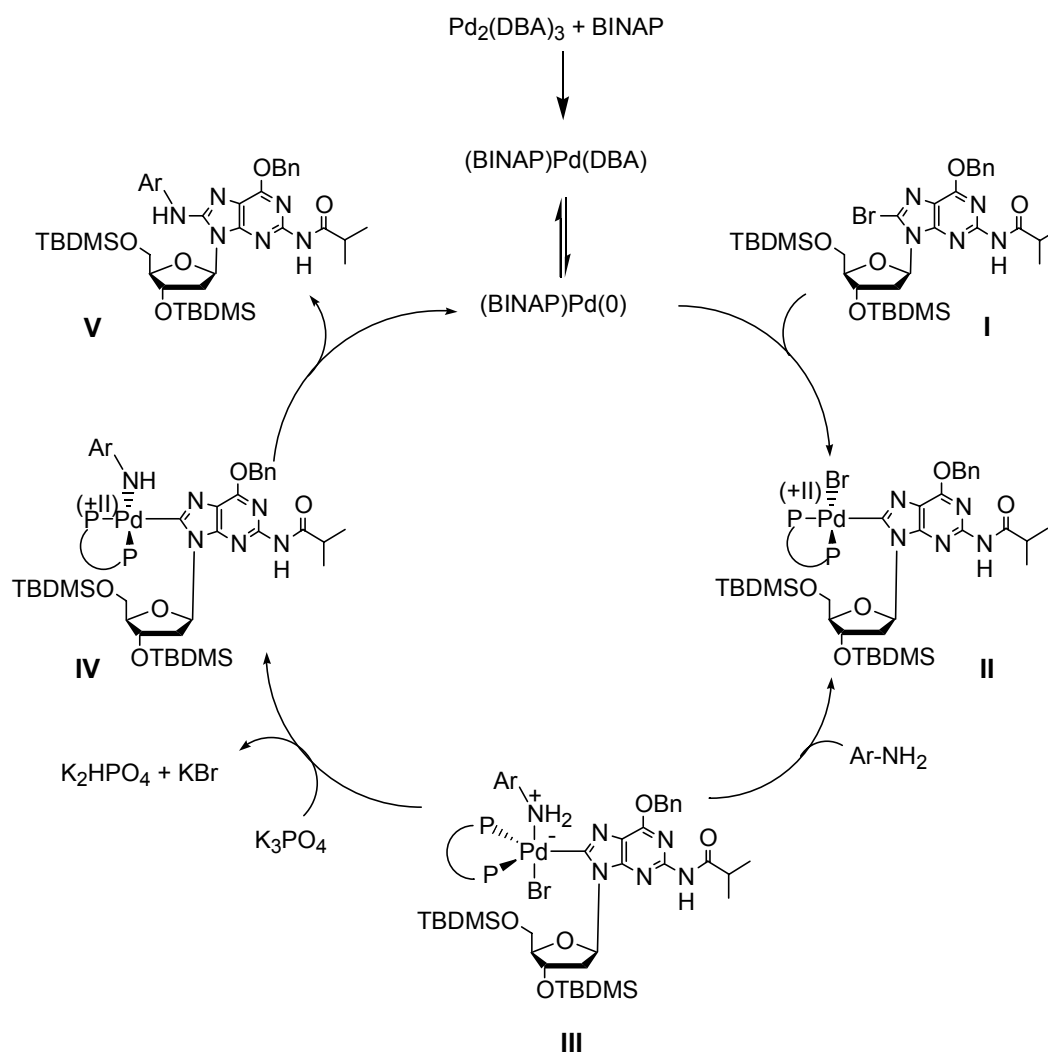


Abb. 48 Mechanismus der Buchwald-Hartwig-Reaktion für C8-Addukte

Im Anschluss wurden nun weitere Arylamine mit dem vollgeschützten dG-Derivat **77** umgesetzt. Es wurden sowohl stark cancerogene Amine wie 4-Aminobiphenyl, als auch schwache Carcinogene wie Anilin eingesetzt, um die allgemeine Anwendbarkeit der Synthese mit aromatischen Aminen zu belegen. Die Synthesen wurden analog der Umsetzung mit p-Toluidin durchgeführt und sind in Abb. 49 sowie Tabelle 1, S. 45 zusammengefasst.

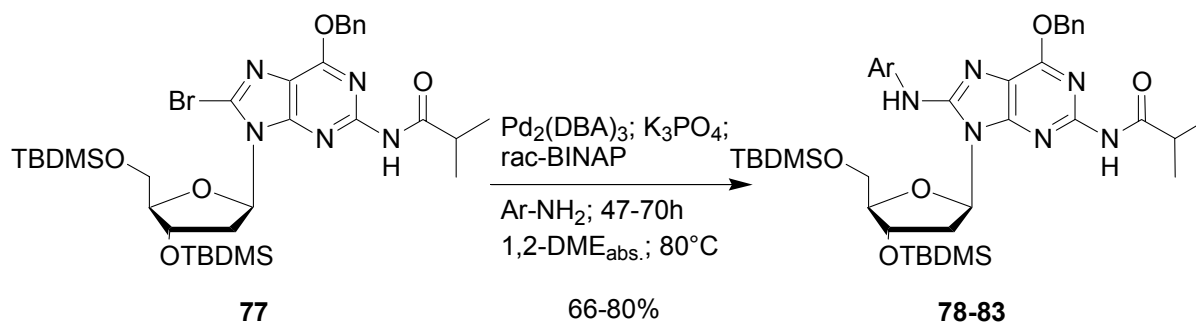


Abb. 49 Synthese der C8-Arylamin-Addukte **78-83**



Addukt	Ar	Reaktionszeit	Ausbeute
<b>78</b>	Ph	49 h	77 %
<b>76</b>	4-Me-Ph	50 h	75 %
<b>79</b>	4-MeO-Ph	51 h	76 %
<b>80</b>	4-CN-Ph	48 h	66 %
<b>81</b>	2-Fluorenyl	47 h	73 %
<b>82</b>	4-Biphenyl	51 h	80 %
<b>83</b>	3-Pyridinyl	70 h	66 %

Tabelle 1 Zusammenfassung aller synthetisierten C8-Arylamin-Addukte

Die gewünschten Produkte **78-83** konnten in guten bis sehr guten Ausbeuten erhalten werden. Verglichen mit den Ausbeuten der elektrophilen Arylaminierung konnten die Ausbeuten für die C-N-Bindungsknüpfung teilweise um nahezu das dreifache gesteigert werden. Lediglich die Reaktionen mit elektronenarmen Aminen wie 4-Cyanophenylamin **80** und 3-Aminopyridin **83** zeigten mit einer Ausbeute von jeweils 66 % eine geringfügig niedrigere Ausbeute, was vermutlich auf die Reaktionsträgheit bei der Addition des Amins zurückzuführen ist.

Durch Verwendung der auch in der Originalliteratur verwendeten Base Natrium-*tert*-butanolat konnte zwar die Reaktion beschleunigt, jedoch zugleich geringere Ausbeuten beobachtet werden, da sich das Edukt **77** unter diesen Bedingungen zersetzt.

Es wurde versucht, die Reaktionsbedingungen im Hinblick auf unterschiedliche Konzentrationen an Katalysator und Ligand zu optimieren. Die Ergebnisse dieser Optimierungsversuche sind in Tabelle 2, S. 46 zusammengefasst.

Es zeigte sich, dass die Verwendung der doppelten Menge an Katalysator und Ligand zu etwas höheren Ausbeuten führte. Zudem waren auch die Reaktionszeiten geringfügig kürzer. Aufgrund von Kosten/Nutzenüberlegungen überwogen die hohen Kosten für Katalysator und Ligand jedoch den Vorteil der geringfügig höheren Ausbeuten.

Die geringfügig höhere Ausbeute bei Verwendung einer niedrigeren Konzentration an Katalysator und Ligand ging einher mit einer um Stunden verlängerten Reaktionszeit (nicht vollständige Reaktion nach über 70 Stunden) und wurde deshalb ebenfalls nicht weiter verfolgt. Als Fazit konnte also gezeigt werden, dass die zu Beginn verwendeten Konzentrationen, für diese Reaktion, die optimalen Bedingungen darstellten.

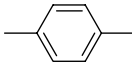
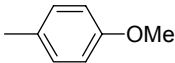
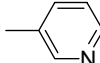
Ar =			
	10 mol % Pd <sub>2</sub> (DBA) <sub>3</sub> / 30 mol % <i>rac</i> -BINAP		
Ausbeute	75 %	77 %	60 %
	5 mol % Pd <sub>2</sub> (DBA) <sub>3</sub> / 15 mol % <i>rac</i> -BINAP		
Ausbeute	n.d.	79 %	n.d.
	20 mol % Pd <sub>2</sub> (DBA) <sub>3</sub> / 60 mol % <i>rac</i> -BINAP		
Ausbeute	n.d.	83 %	66 %

Tabelle 2 Optimierung der Katalysator- und Ligandmengen

Zur Klärung der elektronischen Verhältnisse im Adduktmolekül wurden von den Addukten **78-80** und **82** UV-Spektren gemessen und mit dem UV-Spektrum von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **77** verglichen. Es zeigte sich im Vergleich mit der Brom-Verbindung **77** ein deutlicher, bathochromer Effekt aufgrund des nun vergrößerten  $\pi$ -Systems. Eine Verschiebung zu höheren Wellenlängen, die mit der Fähigkeit des Substituenten in 4-Position des Arylamins zur Delokalisation der  $\pi$ -Elektronen noch verstärkt wird (s. Abb. 50).

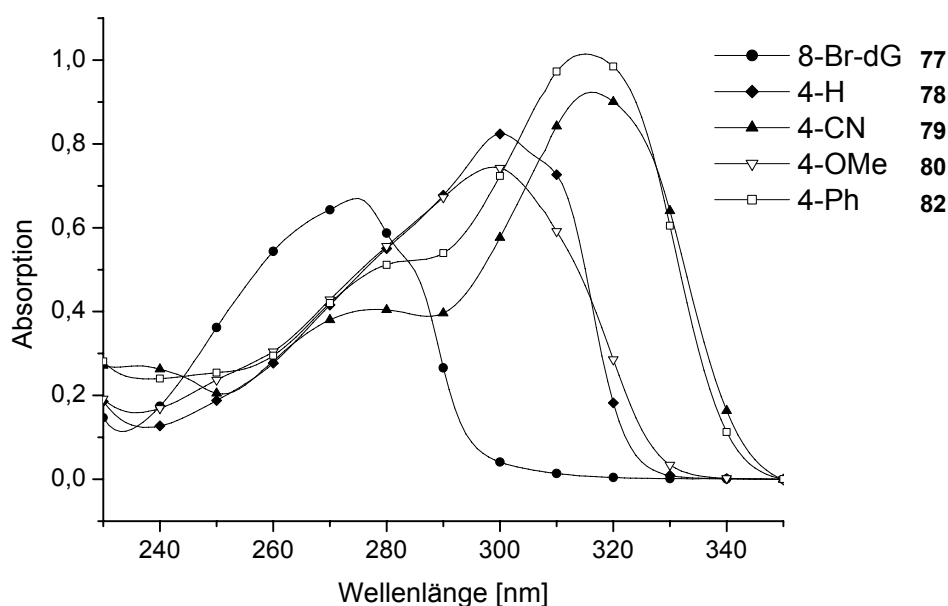


Abb. 50 UV-Spektren der C8-Arylamin-Addukte

Um nun, ausgehend von den vollgeschützten Addukten **76** und **78-83**, die Synthese des eigentlichen Oligonucleotidbausteins vornehmen zu können, mussten zuerst die Hydroxylschutzgruppen und die Benzylgruppe wieder abgespalten werden (Abb. 51).

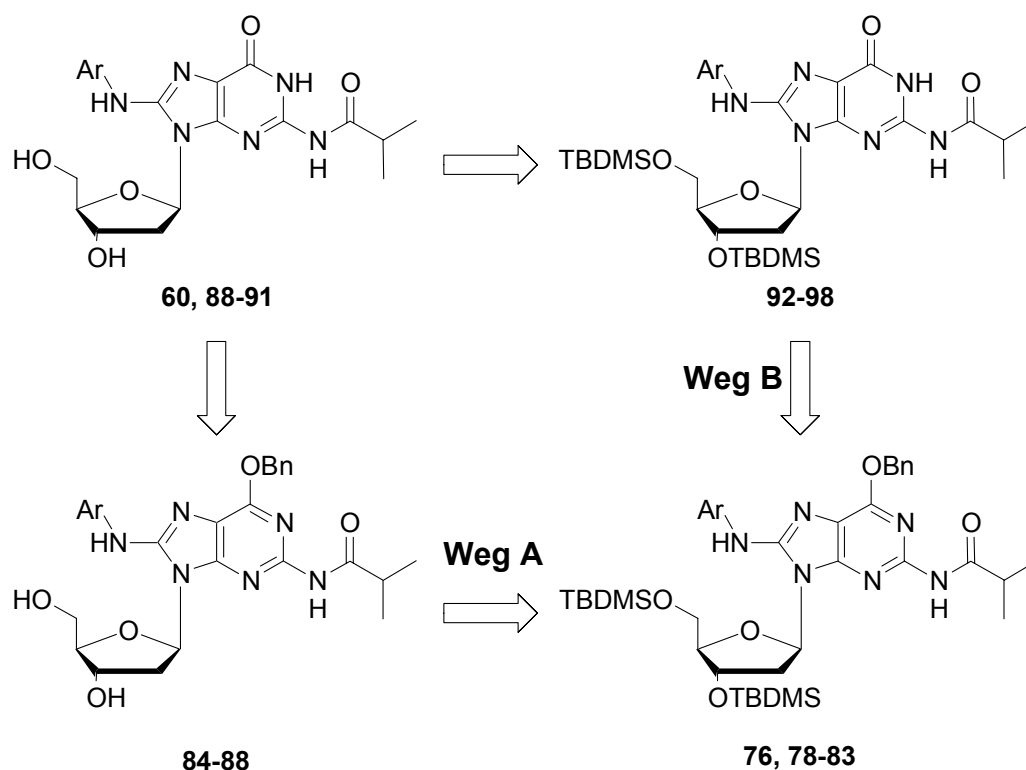


Abb. 51 Strategien zur Entschützung der Arylamin-Addukte **76** und **78-83**

Zur Entschützung der Arylamin-Addukte **76** und **78-83** sind prinzipiell zwei Wege denkbar: es könnten zunächst die Silylether mit Fluorid gespalten werden, gefolgt von der hydrogenolytischen Abspaltung der Benzylschutzgruppe (Weg A). Ferner ist es möglich, zunächst die Benzylschutzgruppe abzuspalten, um dann die Silylether zu spalten (Weg B).

Die Reihenfolge der Abspaltungen sollte dabei keine Rolle spielen. Deshalb wurde Weg A eingeschlagen, es wurden zunächst die TBDMS-Gruppen abgespalten. Wie schon in den vorangegangenen Reaktionen wurde die Anwendbarkeit dieser Entschützung auf die synthetisierten Addukte am p-Toluidin-Addukt **76** getestet (Abb. 52, S. 48).

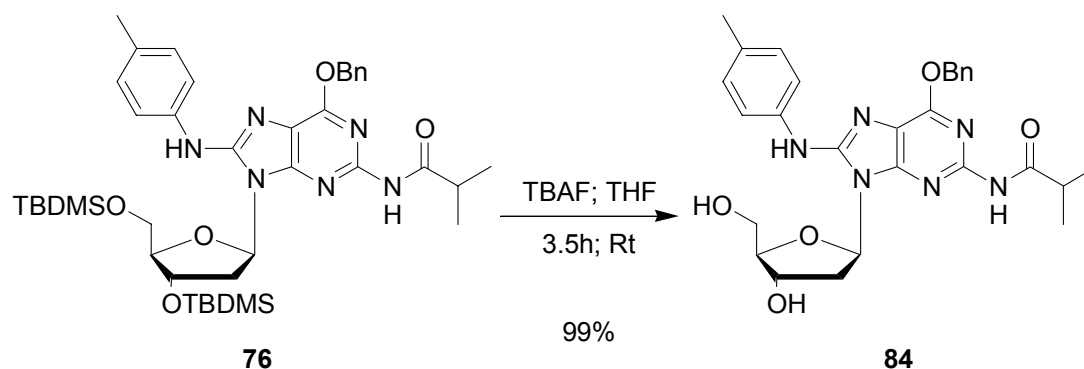


Abb. 52 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-2'-desoxy-guanosin **84**

Die Desilylierung wurde, wie bei *S.T. Sigurdsson et al.*<sup>[107]</sup> beschrieben, mit einer 1M TBAF-Lösung in THF durchgeführt. Nach chromatographischer Aufreinigung konnte das gewünschte Produkt, *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-2'-desoxy-guanosin **84**, als hellgelber Feststoff in 99 % Ausbeute isoliert werden.

Dieser Desilylierung wurden nun auch die anderen Addukte **78-83** unterzogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

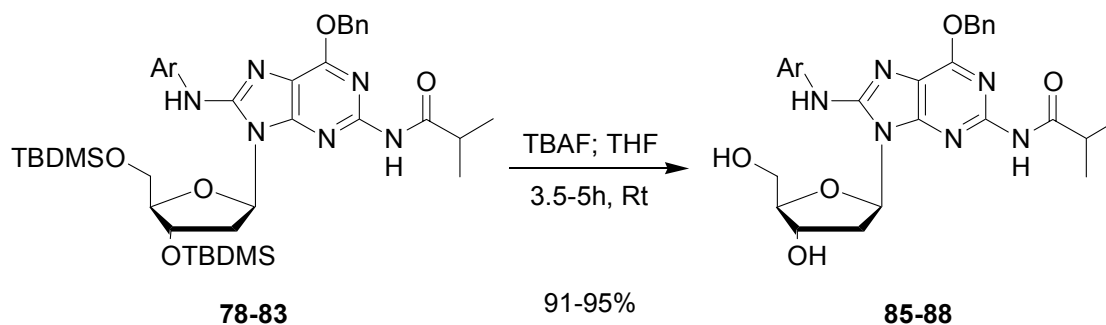


Abb. 53 Desilylierung der C8-Arylamin-Addukte **78-83**

Die Umsetzung des 2-Fluorenyl-Adduktes führte leider nicht zum gewünschten Produkt, sondern zu zwei, aufgrund ihrer sehr ähnlichen  $R_f$ -Werte nicht durch einfache Chromatographie trennbaren, Substanzen.

Produkt	Ar	Reaktionszeit	Ausbeute
<b>85</b>	<b>Ph</b>	<b>3.5 h</b>	<b>92 %</b>
<b>84</b>	<b>4-Me-Ph</b>	<b>3.5 h</b>	<b>99 %</b>
<b>86</b>	<b>4-MeO-Ph</b>	<b>3.5 h</b>	<b>91 %</b>
<b>87</b>	<b>4-CN-Ph</b>	<b>5.0 h</b>	<b>94 %</b>
<b>88</b>	<b>4-Biphenyl</b>	<b>4.5 h</b>	<b>92 %</b>

Tabelle 3 *OH*-entschützte C8-Arylamin-Addukte

Die Ausbeuten dieser Reaktionen waren durchweg sehr gut. Es konnten keinerlei Unterschiede im Hinblick auf die verschiedenen Arylaminreste beobachtet werden.

Die Verbindungen  $N^2$ -*i*-Butyryl- $O^6$ -benzyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-2'-desoxyguanosin **84** und  $N^2$ -*i*-Butyryl-8-*N*-(4-methoxyphenylamino)-2'-desoxyguanosin **86** konnten zur Kristallisation gebracht werden und wurden röntgenographisch untersucht (s. Abb. 54 und Abb. 55, S. 50). Die Kristalle von Verbindung **84** wurden nach Kristallisation aus einem Essigsäureethylester/Petrolether-Gemisch als hellgelbe Nadeln isoliert, und die Kristalle der Verbindung **86** wurden durch Kristallisation aus einem Acetonitril/Wasser-Gemisch als feine, hellrosa Nadeln erhalten.

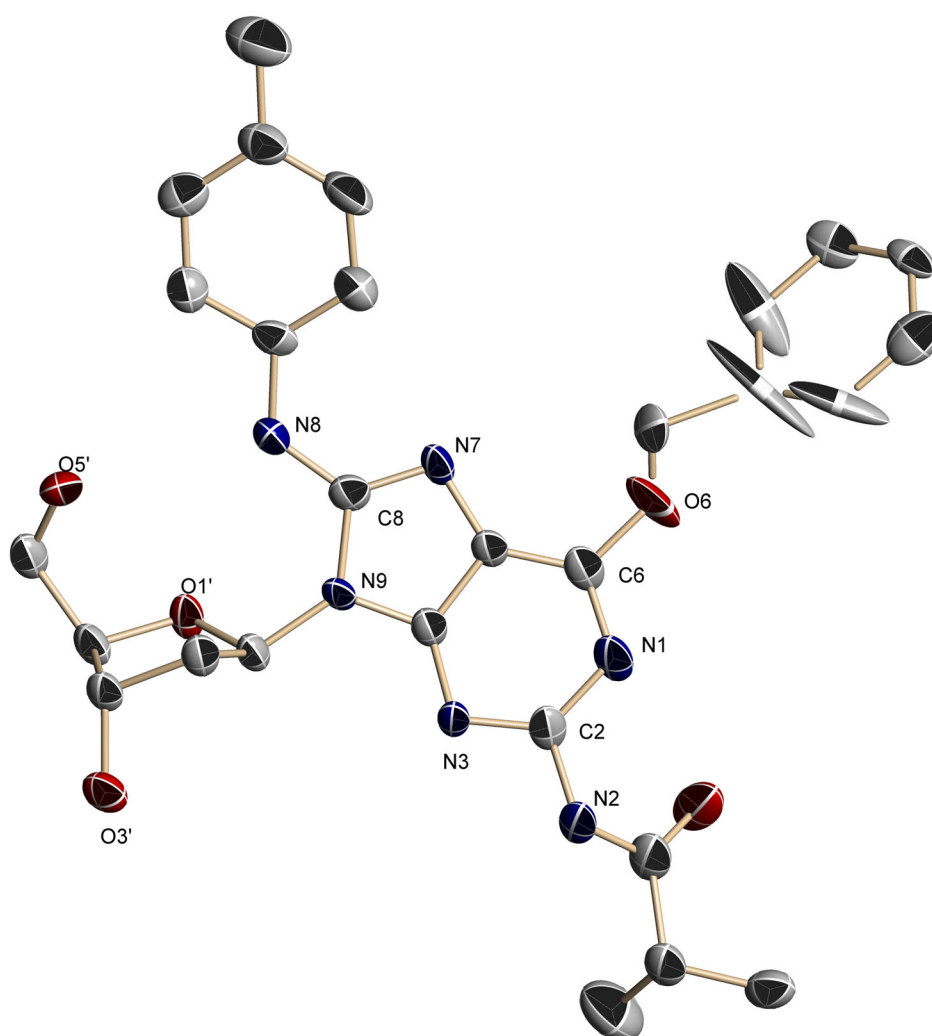


Abb. 54 ORTEP-Plot von  $N^2$ -*i*-Butyryl- $O^6$ -benzyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-2'-desoxyguanosin **84**

Der Desoxyribose ring von Verbindung **84** zeigt eine  $C2'$ -endo,  $C3'$ -exo-Konformation bezüglich der Nucleobase. Der Pseudorotationswinkel  $P$  von  $153.05^\circ$ , welcher sich aus allen vier Torsionswinkeln im Ribose ring berechnen lässt<sup>[108]</sup>, weist darauf hin, dass zum Großteil

eine „Southern“-Konformation vorliegt. Die maximale Abweichung des Riboserings von der Planarität  $v_{\max}$  beträgt  $39.89^\circ$ . Der Wert für  $v_{\max}$  lässt sich aus dem Pseudorotationswinkel  $P$  und dem Torsionswinkel entlang der  $C2'-C3'$ -Bindung berechnen.<sup>[108]</sup> Der Torsionswinkel  $\chi$  entlang der glycosidischen Bindung ( $O4'-C1'-N1-C2$ ) zeigt mit einem Wert von  $-124.74^\circ$  eine *anti*-Konformation, während der Torsionswinkel  $\gamma$  um die  $C4'-C5'$ -Bindung ( $C3'-C4'-C5'-O5'$ ) einen Wert von  $54.20^\circ$  und somit eine *gg*-Konformation annimmt. Ein Grund für diese Konformation ist möglicherweise die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Proton an N8 und O5'. Der Abstand zwischen diesen beiden Atomen beträgt  $2.207 \text{ \AA}$  und liegt damit im Bereich einer Wasserstoffbrückenbindung. Der Winkel entlang der Addukt-Bindung ( $C8-N8-C1(\text{Ar})$ ) beträgt  $126.25^\circ$  und die Torsion der Ebenen  $x$  (Guanin-Ring) und  $y$  (Aryl-Ring) liegt bei  $20.63^\circ$ . Die beiden, aromatischen Systeme sind also nicht planar zueinander, sondern leicht verdreht, was Stabilitätseinbußen aufgrund von verminderter Konjugation zu Folge haben könnte.

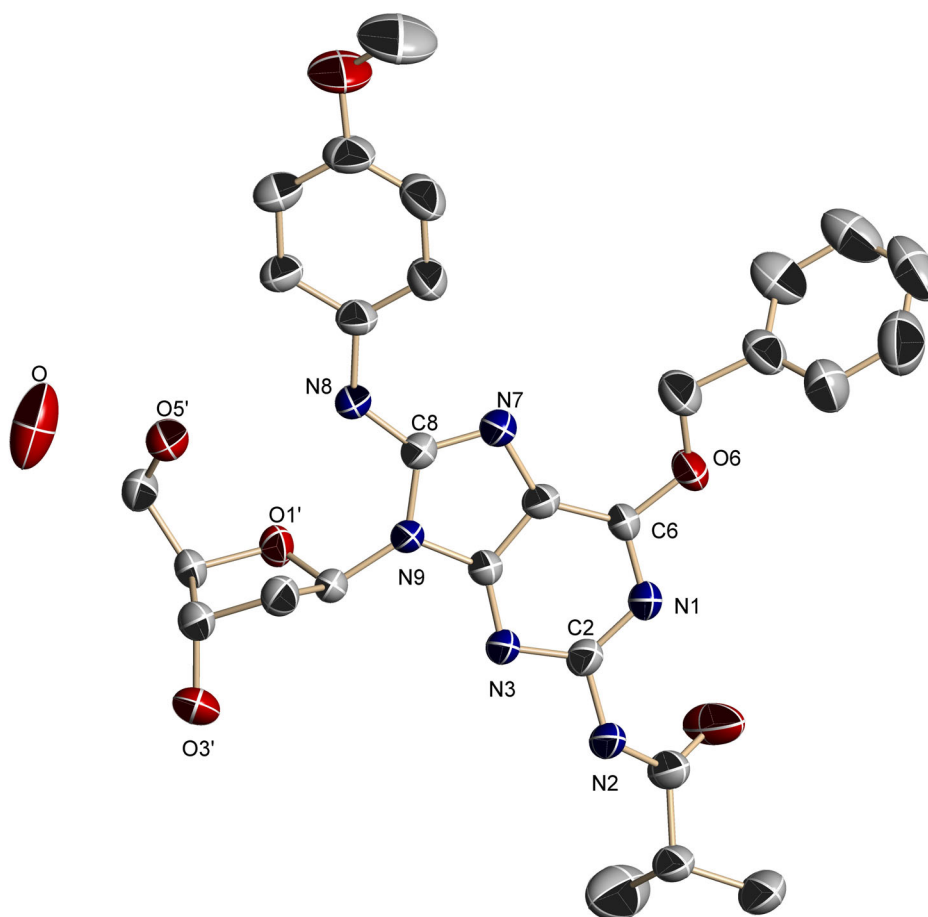


Abb. 55 ORTEP-Plot von  $N^2$ -*i*-Butyryl- $O^6$ -benzyl-8-*N*-(4-methoxyphenylamino)-2'-desoxyguanosin **86**

Der Desoxyribosering von Verbindung **86** zeigt ebenfalls eine  $C2'$ -endo,  $C3'$ -exo-Konformation bezüglich der Nucleobase. Der Pseudorotationswinkel  $P$  ist mit  $157.21^\circ$  ähnlich dem von Verbindung **84** und lässt auch hier auf das Vorliegen einer „Southern“-Konformation schließen. Die maximale Abweichung des Riboserings von der Planarität  $\nu_{\max}$  beträgt  $40.42^\circ$ . Der Torsionswinkel  $\chi$  entlang der glycosidischen Bindung ( $O4'-C1'-N1-C2$ ) zeigt mit einem Wert von  $-121.36^\circ$  auch hier eine *anti*-Konformation, während der Torsionswinkel  $\gamma$  um die  $C4'-C5'$ -Bindung ( $C3'-C4'-C5'-O5'$ ) einen Wert von  $53.05^\circ$  und somit ebenfalls eine *gg*-Konformation annimmt. Ein Grund für diese Konformation könnte auch hier, wie schon bei Verbindung **84** die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Proton an  $N8$  und  $O5'$  sein. Der Abstand zwischen diesen beiden Atomen beträgt hier  $2.152 \text{ \AA}$  und liegt damit ebenfalls im Bereich einer Wasserstoffbrückenbindung. Der Winkel entlang der Addukt-Bindung ( $C8-N8-C1(\text{Ar})$ ) beträgt  $126.28^\circ$ .

Die beiden Röntgenstrukturen von  $N^2$ -*i*-Butyryl-8-*N*-(4-methoxyphenylamino)-2'-desoxyguanosin **86** und  $N^2$ -*i*-Butyryl- $O^6$ -benzyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-2'-desoxyguanosin **84** sind sich, wie gezeigt, in allen wichtigen Werten sehr ähnlich. Der Substituent am Phenylring der Arylamineinheit dürfte demnach keinen Einfluss auf die Struktur des Gesamtmoleküls haben.

Als zweiter Entschützungs-schritt folgte nun die Debenzylierung durch Hydrogenolyse (s. Abb. 56).

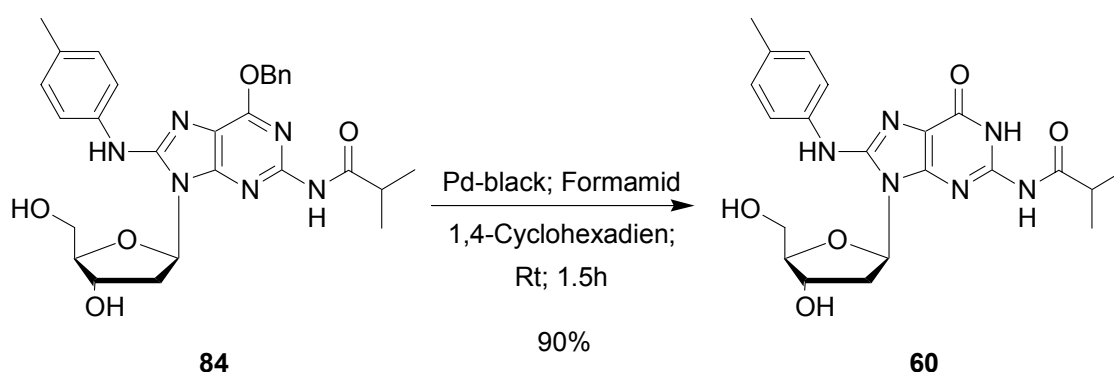


Abb. 56 Synthese von  $N^2$ -*i*-Butyryl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-2'-desoxyguanosin **60**

Die Debenzylierung wurde ebenfalls analog zu den von *S.T. Sigurdsson* et al.<sup>[107]</sup> angegebenen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Wiederum diente die *p*-Toluidylverbindung **60** als Referenz. Verbindung **60** wurde in einer Mischung aus Formamid, Ethanol, 1,4-Cyclohexadien, Methanol und Essigsäureethylester gelöst, mit Palladium-black versetzt und gerührt. Das Produkt konnte als farbloser Feststoff in 90 % Ausbeute erhalten werden.

Nach gelungener Umsetzung des p-Toluidin-Adduktes **76**, wurde diese Reaktion nun auch auf die Addukte **78**, **79** und **82** angewandt (Abb. 57).

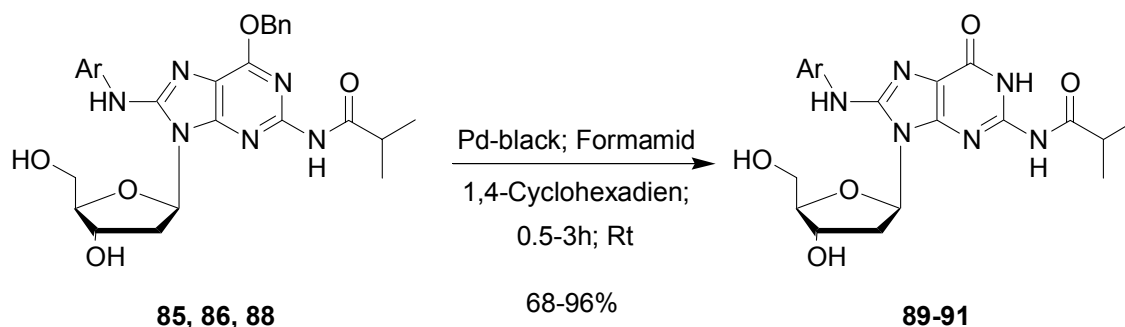


Abb. 57 Debenzylierung der C8-Arylamin-Addukte **78**, **79** und **82**

Tabelle 4 fasst die Resultate dieser Umsetzungen zusammen:

Produkt	Ar	Reaktionszeit	Ausbeute
<b>89</b>	<b>Ph</b>	<b>1.0 h</b>	<b>96 %</b>
<b>60</b>	<b>4-Me-Ph</b>	<b>1.5 h</b>	<b>90 %</b>
<b>90</b>	<b>4-MeO-Ph</b>	<b>3.0 h</b>	<b>68 %</b>
<b>91</b>	<b>4-Biphenyl</b>	<b>0.5 h</b>	<b>90 %</b>

Tabelle 4 Entschützte C8-Arylamin-Addukte (1)

Die Debenzylierung des 4-Cyanophenyl-Adduktes **87** war überraschenderweise nicht möglich. Das gewünschte Produkt konnte nicht isoliert werden, weil es sich schon während der Reaktion wieder zersetzte.

Mit Ausnahme der 4-Methoxyphenylverbindung **90** konnten die gewünschten Produkte in sehr guten Ausbeuten erhalten werden. Die Gründe für die notwendige, lange Reaktionszeit sowie die geringe Ausbeute für Verbindung **90** konnten nicht geklärt werden.

Diese Art der Debenzylierung ist zwar sehr mild, ist aber für die Umsetzung größerer Mengen Edukt nicht geeignet aufgrund der hohen Kosten für den Katalysator sowie der Toxizität von Formamid und 1,4-Cyclohexadien. Daher wurde für die Debenzylierung eine weitere Methode getestet, die Abspaltung mittels Palladium auf Aktivkohle und Wasserstoffgas. Mit Rücksichtnahme auf eine mögliche Instabilität der TBDMS-entschützten Zwischenprodukte während der Hydrogenolyse, wurde die Reihenfolge der Entschützungs-schritte verändert und nun zuerst die Debenzylierung durchgeführt (Weg B, vgl. Abb. 51, S. 47).



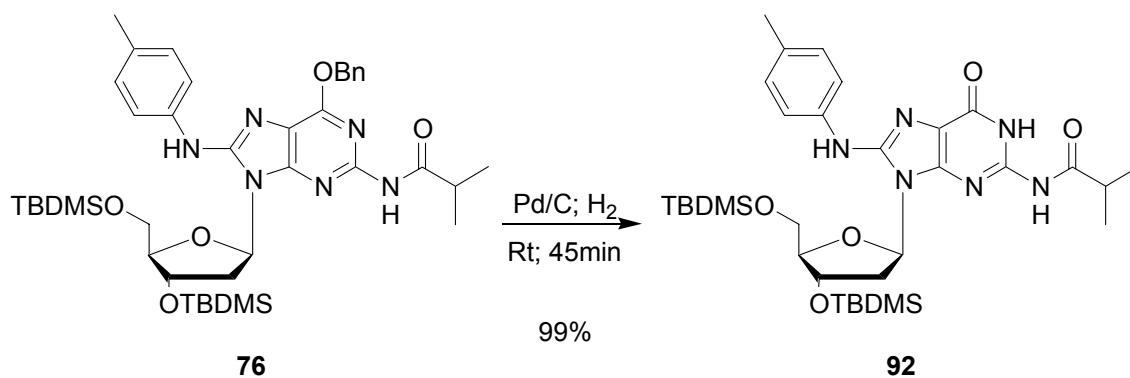


Abb. 58 *Debenzylierung von N<sup>2</sup>-i-Butyryl-O<sup>6</sup>-benzyl-8-N-(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(t-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin 76*

Zunächst wurde *N<sup>2</sup>-i-Butyryl-O<sup>6</sup>-benzyl-8-N-(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(t-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin 76* mit Palladium auf Aktivkohle versetzt, in absolutem Methanol gelöst, und unter Wasserstoffatmosphäre für 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Gemisch über Celite filtriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene, farblose Feststoff war das gewünschte Produkt, *N<sup>2</sup>-i-Butyryl-8-N-(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(t-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin 92*. Das Produkt wurde in nahezu quantitativer Ausbeute erhalten.

Wie zuvor wurde diese Umsetzung auch mit den anderen Addukten **78-83** durchgeführt (s. Abb. 59).

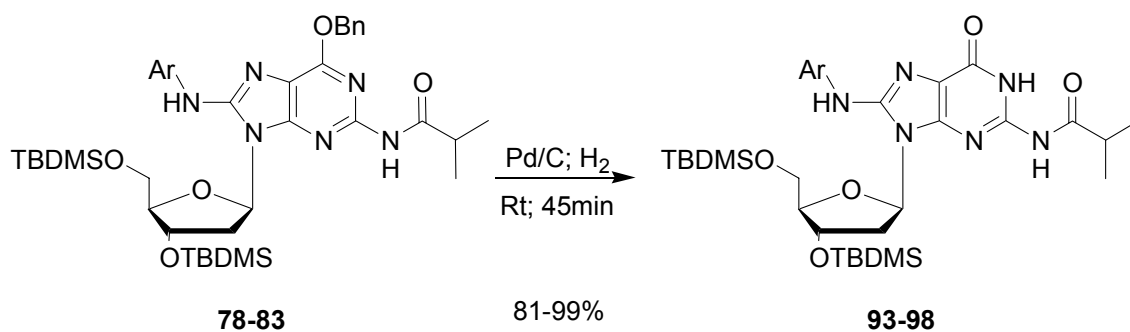


Abb. 59 *Debenzylierung der C8-Arylamin-Addukte 78-83*

Die Resultate dieser Reaktionen sind in Tabelle 5 wiedergegeben.

Addukt	Ar	Reaktionszeit	Ausbeute
93	Ph	45min	99 %
92	4-Me-Ph	45min	99 %
94	4-MeO-Ph	45min	99 %
95	4-CN-Ph	45min	99 %
96	2-Fluorenyl	45min	81 %
97	4-Biphenyl	45min	99 %
98	3-Pyridinyl	45min	99 %

Tabelle 5 Amid-entschützte C8-Arylamin-Addukte

Alle Produkte konnten in nahezu quantitativer Ausbeute erhalten werden. Lediglich das 2-Fluorenyl-Addukt **96** musste chromatographisch aufgereinigt werden, da es, wahrscheinlich aus dem Edukt, noch Verunreinigungen enthielt.

Der Debenzylierung folgte nun die Entschützung der Hydroxylgruppen. Diese Reaktion wurde, wie zuvor beschrieben, mit Tetrabutylammoniumfluoridlösung in Tetrahydrofuran durchgeführt (Abb. 60).

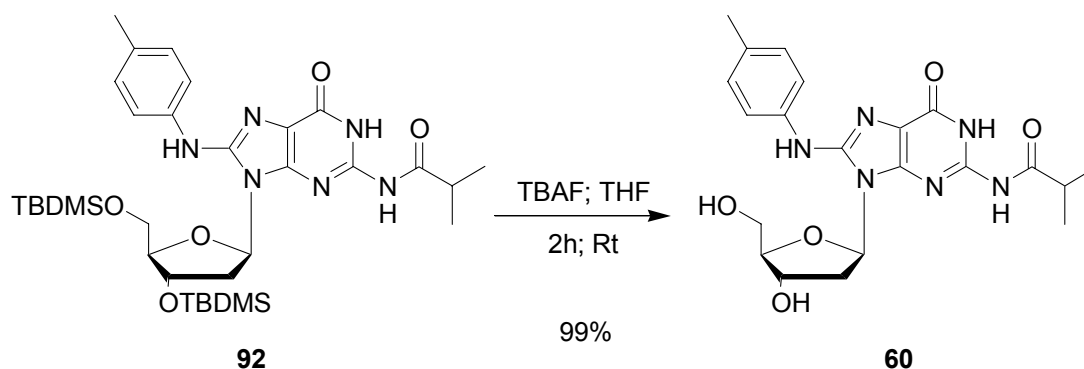


Abb. 60 Desilylierung von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **92**

Die Desilylierung wurde, wie bereits zuvor beschrieben, nach *S.T. Sigurdsson et al.*<sup>[107]</sup>, durchgeführt. Allerdings wurden nur 2.5 Äquivalente TBAF-Lösung verwendet, und das Produkt wurde, nach chromatographischer Reinigung am Chromatotron, zur Entsalzung, noch mittels Größenausschlusschromatographie über eine Sephadex LH-20-Säule gereinigt. Das Produkt **60** wurde trotz wiederholter Chromatographie als farbloser Feststoff in 99 % Ausbeute erhalten.

*N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-2'-desoxyguanosin **60** konnte aus Methanol kristallisiert und röntgenographisch untersucht werden (s. Abb. 61). Es wurden zwei verschiedene Kristallformen erhalten. Zum einen orthorhombische Kristalle und zum anderen oktaedrische Kristalle. Letztere ließen sich leider nicht röntgenographisch vermessen, so dass die hier angegebene Struktur nur der Struktur der orthorhombischen Kristalle entspricht.

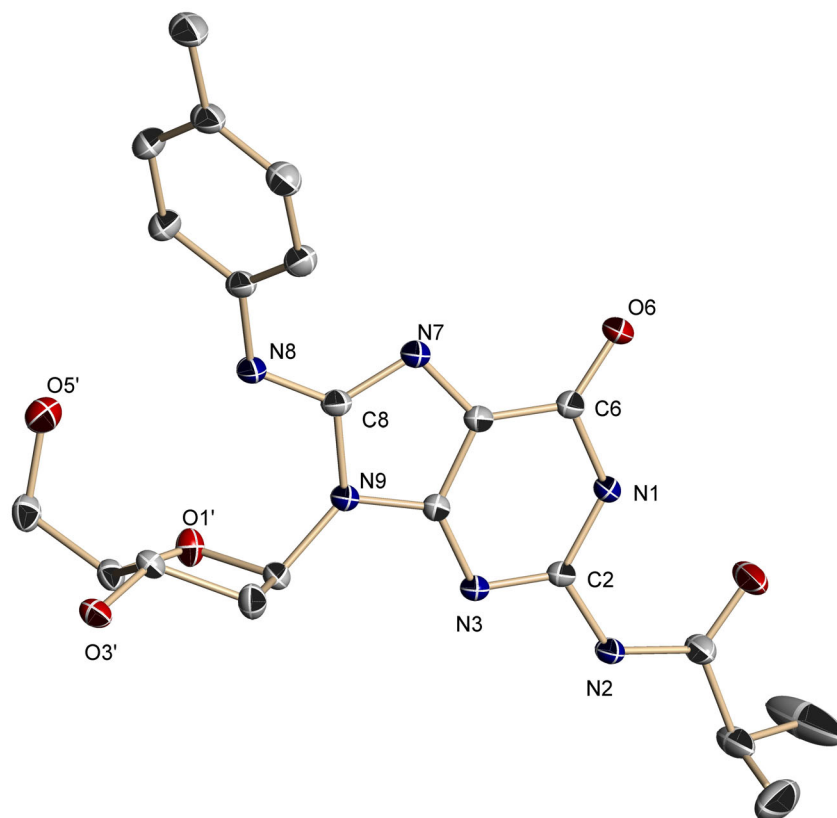


Abb. 61 ORTEP-Plot von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-2'-desoxyguanosin **60**

Der Desoxyribose ring von Verbindung **60** zeigt, im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Strukturen, eine C2'-*exo*, C3'-*endo*-Konformation. Der Pseudorotationswinkel  $P$  von  $38.37^\circ$ , weist darauf hin, dass zum Großteil eine „Northern“-Konformation vorliegt. Die maximale Abweichung des Riboserings von der Planarität  $\nu_{\max}$  beträgt  $38.82^\circ$ . Der Torsionswinkel  $\chi$  der glycosidischen Bindung (O4'-C1'-N1-C2) zeigt mit einem Wert von  $-129.39^\circ$  eine *anti*-Konformation, während der Torsionswinkel  $\gamma$  um die C4'-C5'-Bindung (C3'-C4'-C5'-O5') einen Wert von  $52.68^\circ$  und somit eine *gg*-Konformation annimmt. Ein Grund für diese Konformation ist möglicherweise auch hier die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Proton an N8 und O5'. Der Abstand zwischen diesen beiden Atomen beträgt  $2.251 \text{ \AA}$  und liegt damit im Bereich einer Wasserstoffbrückenbindung. Diese Wasserstoffbrückenbindung könnte auch ein Grund für die schlechten Ausbeuten bei der

folgenden Dimethoxytritylierung (vgl. Tabelle 7, S. 60) sein, da diese vor, bzw. bei der Reaktion erst gespalten werden muss. Der Winkel entlang der Addukt-Bindung (C8-N8-C1(Ar)) beträgt  $123.85^\circ$  und die Torsion der Ebenen x (Guanin-Ring) und y (Aryl-Ring) liegt bei  $57.55^\circ$ . Die beiden, aromatischen Systeme sind also nicht coplanar, sondern leicht verdrillt, was Stabilitätseinbußen aufgrund von verminderter Konjugation zu Folge haben könnte.

Die Möglichkeit, dass eventuell die Moleküle in den Kristallen mit oktaedrischer Form auch die, bei den anderen Strukturen gefundene, „Southern“-Konformation aufweisen, konnte leider nicht untersucht werden.

Die oben beschriebene Desilylierung wurde nun auch mit den anderen, debenzylierten Addukten **93**, **94**, **97**, und **98** durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 62 und Tabelle 6 zusammengefasst.

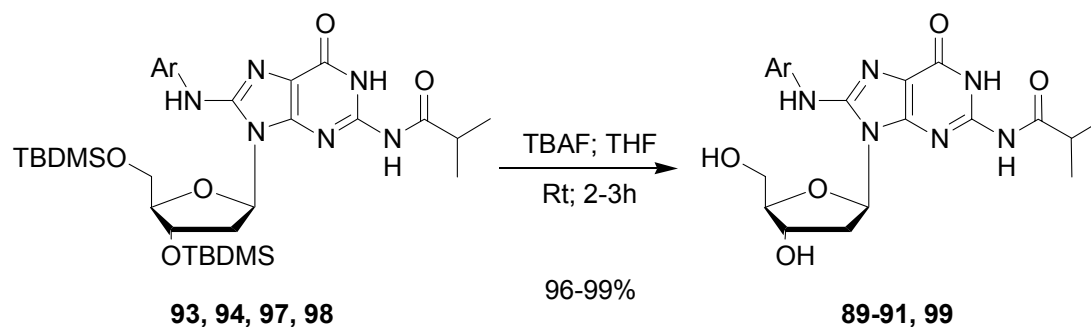


Abb. 62 Desilylierung der C8-Arylamin-Addukte **93**, **94**, **97** und **98**

Produkt	Ar	Reaktionszeit	Ausbeute
<b>89</b>	<b>Ph</b>	<b>2.0 h</b>	<b>99 %</b>
<b>60</b>	<b>4-Me-Ph</b>	<b>2.0 h</b>	<b>99 %</b>
<b>90</b>	<b>4-MeO-Ph</b>	<b>3.0 h</b>	<b>96 %</b>
<b>91</b>	<b>4-Biphenyl</b>	<b>2.0 h</b>	<b>99 %</b>
<b>99</b>	<b>3-Pyridinyl</b>	<b>2.5 h</b>	<b>96 %</b>

Tabelle 6 Entschützte C8-Arylamin-Addukte (2)

Die Produkte **60**, **89-91** und **99** konnten in nahezu quantitativer Ausbeute erhalten werden. Die Entschützung des 2-Fluorenyl- und des 4-Cyanophenyl-Adduktes gelang jedoch auch auf diesem Wege nicht. Die Desilylierung des 2-Fluorenyl-Adduktes lieferte zwei nicht getrennt isolierbare Verbindungen, und das 4-Cyanophenyl-Addukt zersetzte sich bereits während der Reaktion. Die Gründe hierfür konnten nicht geklärt werden.

Fazit dieser Untersuchungen ist, dass der Entschützungswege B dem Entschützungswege A eindeutig überlegen ist (s. Abb. 63).

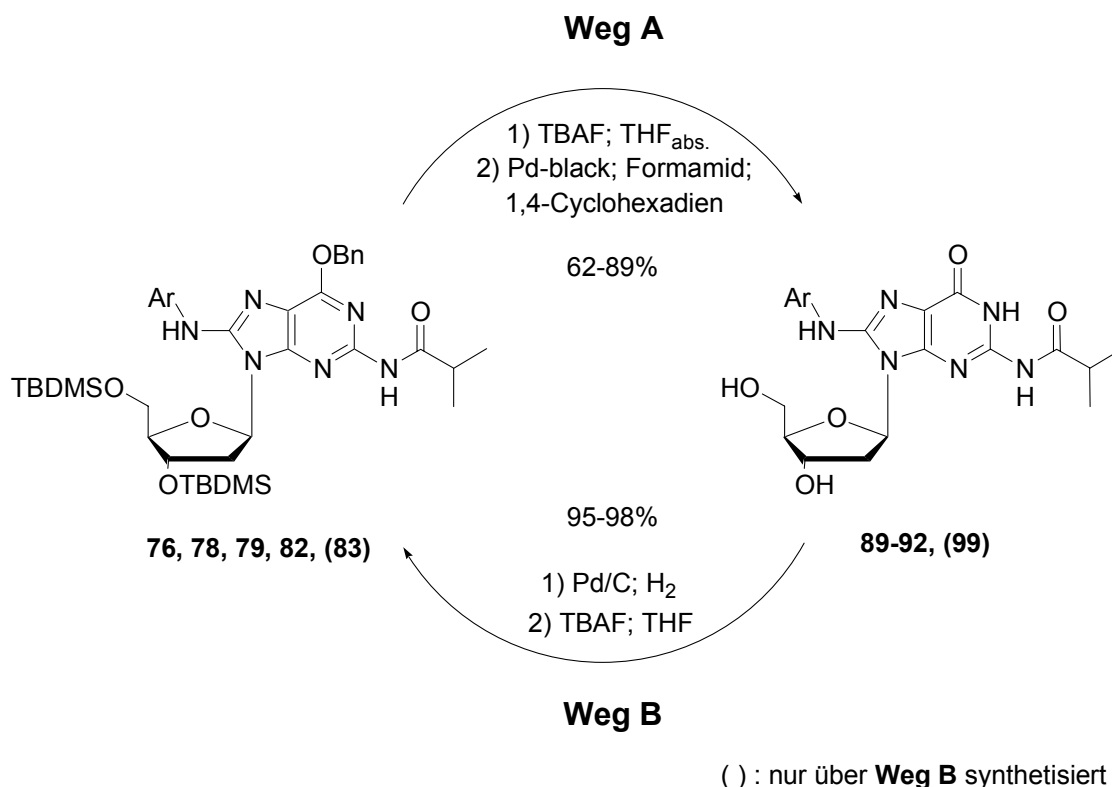


Abb. 63 Darstellung der beiden Entschützungswege A und B

Die Verbindungen **60**, **89-91** und **99** konnten über den Syntheseweg B in Ausbeuten über zwei Stufen von 95-98 % in nahezu quantitativer Ausbeute isoliert werden. Demgegenüber konnten für die Synthese der Verbindungen **89-92** über den Syntheseweg A lediglich Gesamtausbeuten von 62-89 % realisiert werden. Die höheren Ausbeuten, die einfachere Aufreinigung, die geringere Toxizität sowie die geringeren Kosten der verwendeten Chemikalien sprechen eindeutig für Weg B.

Da die Debenzylierung des 4-Cyanophenyl-Adduktes **80** mit Palladium auf Aktivkohle erfolgreich war, wurden noch weitere Untersuchungen zur Abspaltung der Silylschutzgruppen durchgeführt. Es wurde versucht, die Desilylierung unter mildereren Bedingungen durchzuführen (Abb. 64, S. 58).

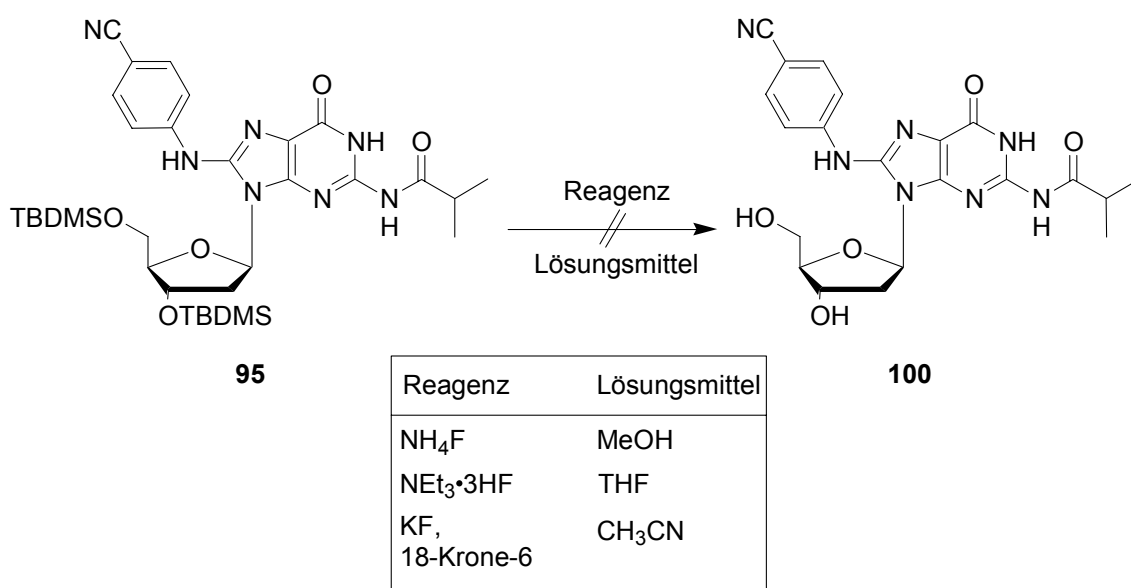


Abb. 64 Versuchte Darstellung von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-cyanophenylamino)-2'-desoxyguanosin **100**

Allerdings ließ sich auch mit Reagenzien wie Ammoniumfluorid in Methanol oder Triethylamintrihydrofluorid nur Zersetzung feststellen. Die Umsetzung mit Kaliumfluorid und 18-Krone-6 dagegen führte selektiv zum in 5'-Position einfach-entschützten Produkt, das nicht weiterreagierte und in einer Ausbeute von 58 % isoliert werden konnte.

Zum Nachweis, dass mit der verwendeten Synthese-Sequenz auch die an der exocyclischen Aminogruppe des Guanins entschützten Verbindungen erhalten werden können, wurde das Addukt **89** als Beispielverbindung entschützt (s. Abb. 65).

Die Entschützung wurde mit einer ammoniakalischen Methanollösung durchgeführt und lieferte das gewünschte Produkt **101** in einer Ausbeute von 79 %. Durch die Zugabe von 2-Mercaptoethanol sollte, wie bei *Y. Zhou* und *L. Romano* beschrieben<sup>[101]</sup>, das basenlabile Addukt geschützt werden.

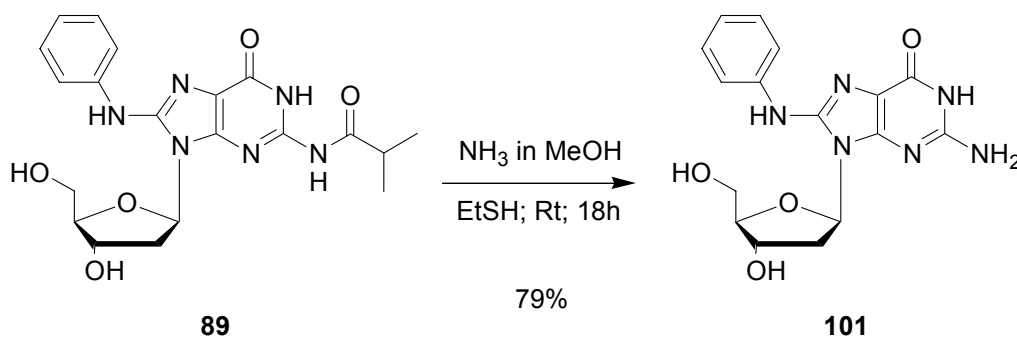


Abb. 65 Darstellung von 8-*N*-phenylamino-2'-desoxyguanosin **101**

Die analoge Reaktion mit wässriger Ammoniumhydroxidlösung war nach 47 Stunden immer noch nicht vollständig und wurde abgebrochen.

Damit konnte der Nachweis erbracht werden, dass sich *iso*-Butyrylschutzgruppen an der exocyclischen Aminogruppe abspalten lassen, ohne dass es zu einer Zersetzung des Adduktes kommt. Dieser Befund ist entscheidend für die später durchzuführende Synthese der modifizierten Oligonucleotide. Diese Methode sollte demnach auch für die Entschützung von modifizierten Oligonucleotiden geeignet sein.

Ausgehend von den aus beiden Entschützungswegen erhaltenen Addukten wurden nun die Addukte **60**, **89**, und **90** als Vertreter für Addukte schwach cancerogener Amine, und das Addukt **91** als ein Beispiel für Addukte stark cancerogener Amine, weiter zu den Bausteinen für die Oligonucleotidsynthese umgesetzt (Abb. 66)

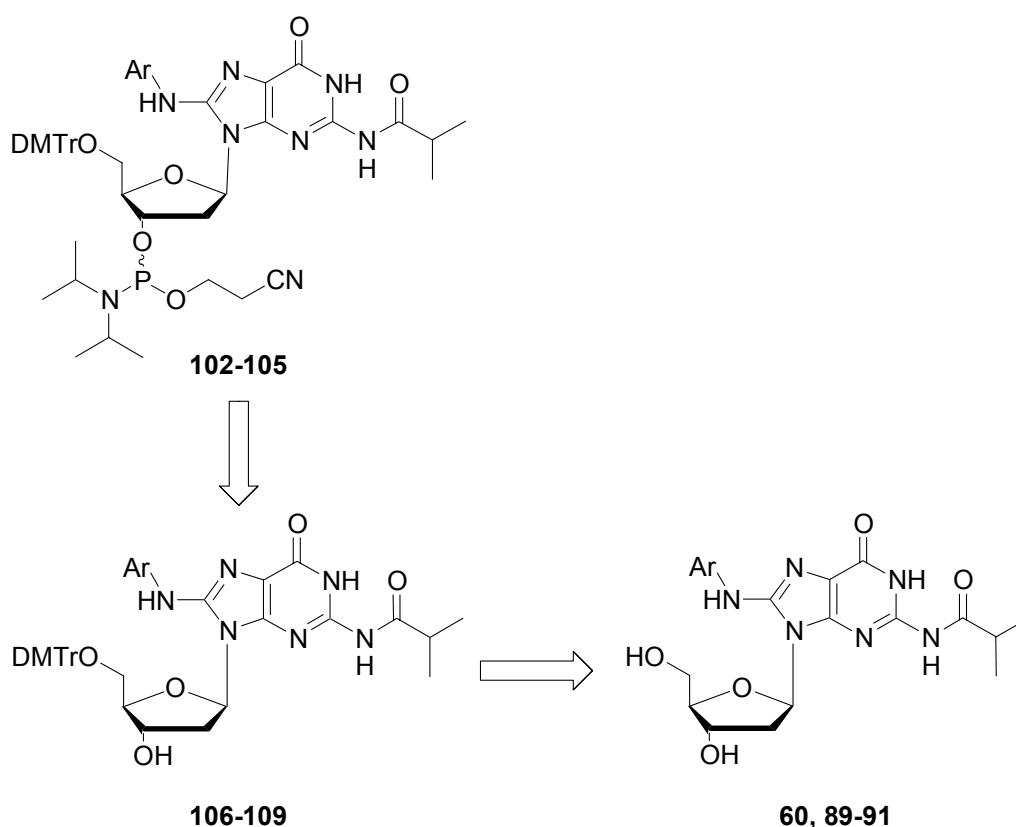


Abb. 66 Synthesestrategie zur Darstellung der Oligonucleotidbausteine **102-105**

Zuerst muss die 4,4'-Dimethoxytrityl-Schutzgruppe (DMTr) an der primären Hydroxylgruppe eingeführt werden. Anschließend können dann die hydrolyse- und oxidations-empfindlichen Phosphoramidite synthetisiert werden. Die Anwendbarkeit der Methode wurde, wie bei den anderen Synthesen auch, zunächst wieder am *p*-Toluidin-Addukt **60** als Referenzverbindung getestet (Abb. 67, S. 60).

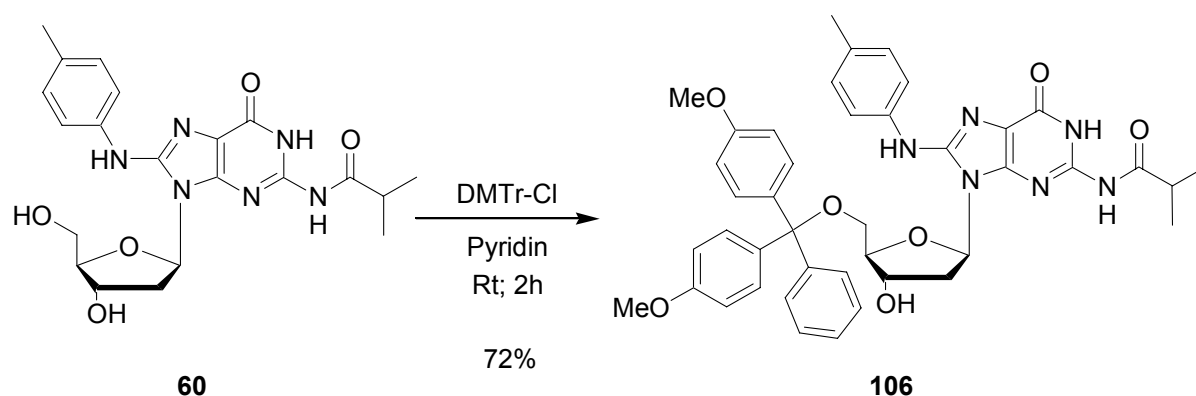


Abb. 67 *Synthese von N<sup>2</sup>-i-Butyryl-8-N-phenylamino-O5'-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin 106*

Das Edukt, N<sup>2</sup>-i-Butyryl-8-N-(4-methylphenylamino)-2'-desoxyguanosin **60**, wurde in absolutem Pyridin gelöst, mit 2 Äquivalenten 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (DMTr-Cl) versetzt und für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Nach Aufarbeitung sowie chromatographischer Aufreinigung konnte das Produkt in einer Ausbeute von 72 % als hellgelber Feststoff erhalten werden.

Diese Dimethoxytritylierung wurde nun auch mit den drei anderen Addukten durchgeführt (Abb. 68).

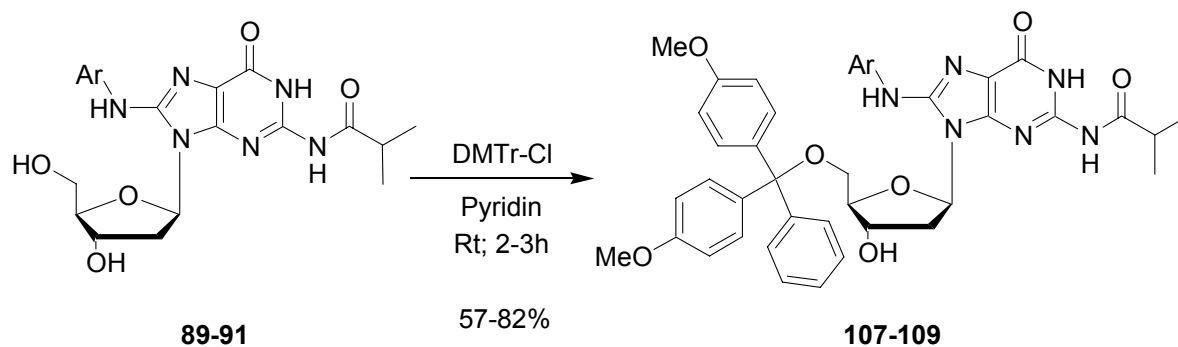


Abb. 68 *Dimethoxytritylierung der entschützten C8-Arylamin-Addukte 89-91*

Die 5'-O-DMTr-geschützten Verbindungen **107-109** konnten in Ausbeuten von 57-82 % isoliert werden. Tabelle 7 fasst die Ergebnisse der DMTr-Schützungen zusammen.

Produkt	Ar	Reaktionszeit	Ausbeute
<b>107</b>	<b>Ph</b>	<b>3 h</b>	<b>82 %</b>
<b>106</b>	<b>4-Me-Ph</b>	<b>3 h</b>	<b>72 %</b>
<b>108</b>	<b>4-MeO-Ph</b>	<b>2 h</b>	<b>57 %</b>
<b>109</b>	<b>4-Biphenyl</b>	<b>3 h</b>	<b>72 %</b>

Tabelle 7 *4,4'-Dimethoxytrityl-geschützte C8-Arylamin-Addukte*



Aufgrund der Sperrigkeit der Substituenten in der 8-Position der Nucleobase sind die erhaltenen Ausbeuten als zufriedenstellend zu bezeichnen. Im Falle des Anisidinadduktes **108** konnte nur eine Ausbeute von 57 % erreicht werden. Die geringere Ausbeute könnte eventuell auf die kürzere Reaktionszeit von 2 Stunden zurückzuführen sein.

Der gelungenen Dimethoxytritylierung in der 5'-Position schloss sich nun die Phosphitylierung an der 3'-Position an.

Zur Synthese der Phosphoramidite musste zunächst das Phosphitylierungsreagenz, Bis-*N,N'*-Diisopropylamino-(2-cyanoethyl)-phosphit **112** in zwei Schritten aus Phosphortrichlorid, 3-Hydroxypropionsäurenitril und *N,N'*-Diisopropylamin dargestellt werden (Abb. 69).

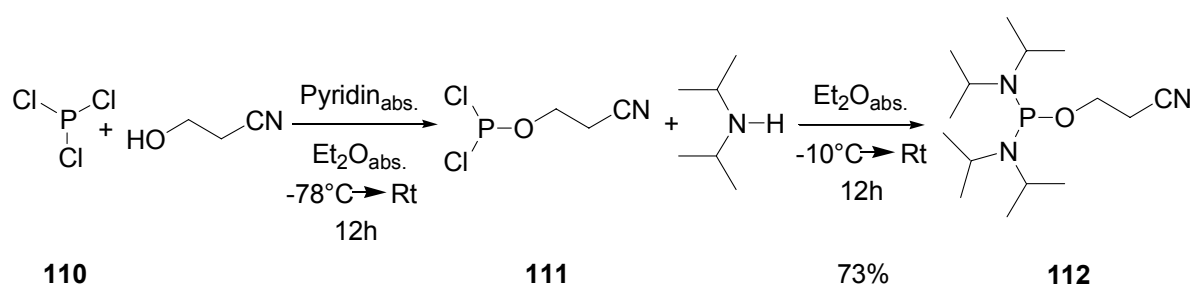


Abb. 69 Synthese von Bis-*N,N'*-Diisopropylamino-(2-cyanoethyl)-phosphit **112**

Phosphortrichlorid **110** wurde in einem Lösungsmittelgemisch aus absolutem Pyridin und absolutem Diethylether gelöst, bei -78 °C tropfenweise mit 3-Hydroxypropionsäurenitril versetzt und 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das nach Aufarbeitung erhaltene Rohprodukt wurde direkt weiter umgesetzt. Dazu wurde Verbindung **111** in wasserfreiem Diethylether aufgenommen und bei -10 °C mit *N,N'*-Diisopropylamin versetzt. Nach Aufarbeitung und Destillation, konnte das Produkt, Bis-*N,N'*-Diisopropylamino-(2-cyanoethyl)-phosphit **112** in einer Ausbeute von 73 % über zwei Stufen als farbloses Öl erhalten werden.

Das so erhaltene Phosphitylierungsreagenz **112** wurde nun zur Umsetzung der DMTr-geschützten p-Toluidin-Verbindung **106** eingesetzt (vgl. Abb. 70, S. 62).

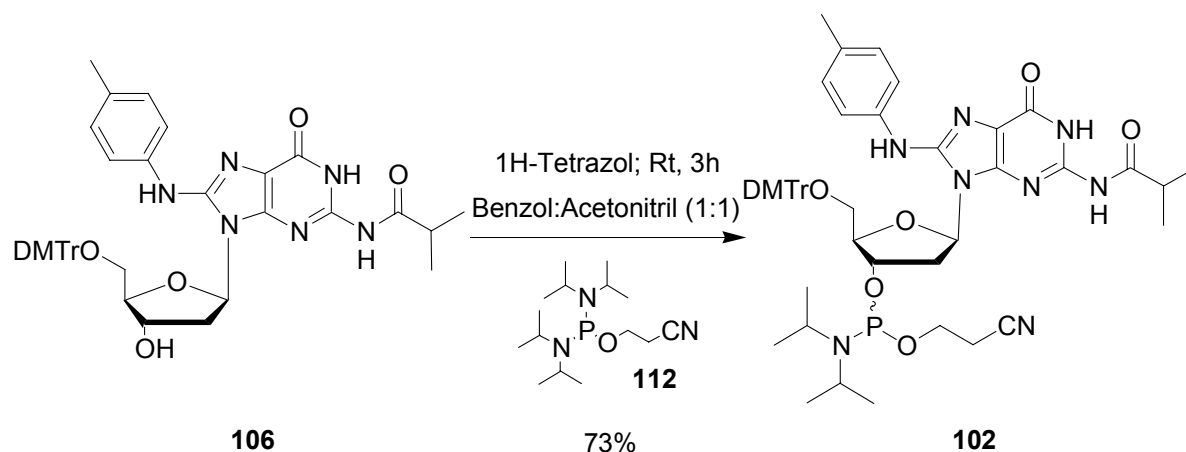


Abb. 70 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-*O*3'-[(2-cyanoethoxy)-(*N,N*-diisopropylamino)phosphinyl]-*O*5'-dimethoxytrityl-2'-desoxy-guanosin **102**

Das DMTr-geschützte Addukt **106** wurde mit Benzol coevaporiert, in einem Benzol/Acetonitril-Gemisch (1:1) suspendiert und zunächst mit 1H-Tetrazol und anschließend tropfenweise mit Bis-*N,N'*-Diisopropylamino-(2-cyanoethyl)-phosphit **112** versetzt. Nach Rühren bei Raumtemperatur, Aufarbeitung und chromatographischer Aufreinigung an Aluminiumoxid wurde das Produkt **102** (2 Diastereomere) als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 73 % erhalten.

Vorangegangene Versuche, die Phosphitylierung mit *N,N'*-Diisopropylamino-(2-cyanoethyl)-phosphorchloridit als Phosphitylierungsreagenz durchzuführen, lieferten schlechtere Ausbeuten und führten zu mehr Nebenprodukten. Ebenfalls fehl schlug die Messung von NMR-Spektren in über Aluminiumoxid neutralisiertem Deuteriochloroform, da sich das Phosphoramidit hierin langsam zersetzte. Erst die Verwendung von deuteriertem Benzol als NMR-Lösungsmittel führte zu sauberen Spektren.

Anschließend wurden nun auch die drei anderen DMTr-geschützten Addukte **107-109** mit Bis-*N,N'*-Diisopropylamino-(2-cyanoethyl)-phosphit **112** in die Phosphoramidite **103-105** überführt (s. Abb. 71, S. 63).

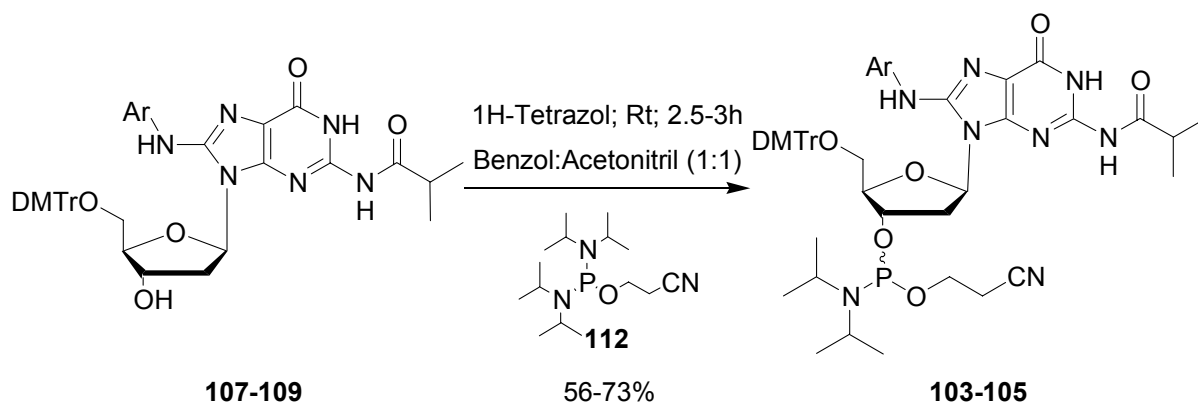


Abb. 71 Phosphitylierung der DMTr-geschützten C8-Arylamino-Addukte **107-109**

Tabelle 8 fasst die Ergebnisse dieser Umsetzungen zusammen.

Produkt	Ar	Reaktionszeit	Ausbeute
<b>103</b>	<b>Ph</b>	<b>3.0 h</b>	<b>67 %</b>
<b>102</b>	<b>4-Me-Ph</b>	<b>3.0 h</b>	<b>73 %</b>
<b>104</b>	<b>4-MeO-Ph</b>	<b>4.0 h</b>	<b>56 %</b>
<b>105</b>	<b>4-Biphenyl</b>	<b>2.5 h</b>	<b>58 %</b>

Tabelle 8 Bausteine für die Oligonucleotidsynthese

Die modifizierten Bausteine für die Oligonucleotidsynthese **102-105** konnten in Ausbeuten von 56-73 % erhalten werden. Damit lagen die für die Festphasensynthese notwendigen Phosphoramidite von 2'-Desoxyguanosin mit Arylamino-modifikationen in der 8-Position der Nucleobase vor. In Abb. 72 und Abb. 73, S. 64 sind exemplarisch die <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>31</sup>P-NMR-Spektren der Anilin-Verbindung **103** dargestellt.

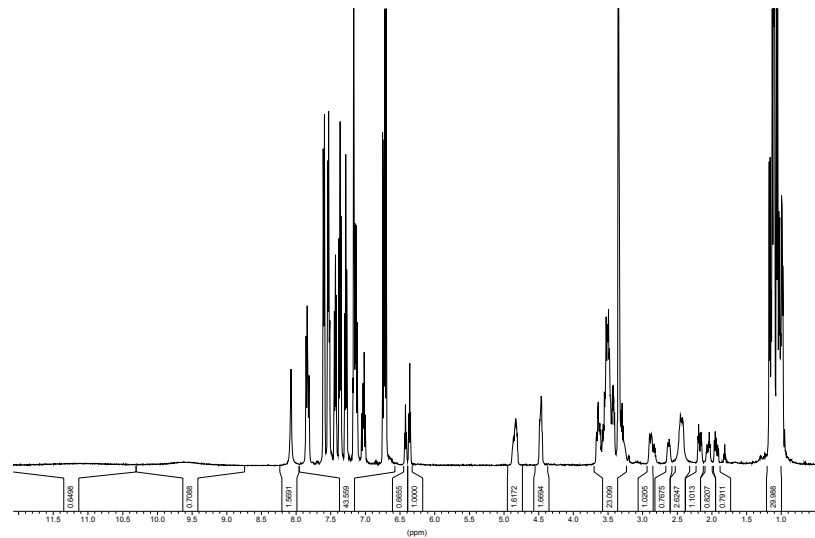


Abb. 72  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von  $N^2$ -*i*-Butyryl-8-*N*-phenylamino- $O3'$ -[(2-cyanoethoxy)-(*N,N*-diisopropylamino)phosphinyl]- $O5'$ -dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **103** (2 Diastereomere)

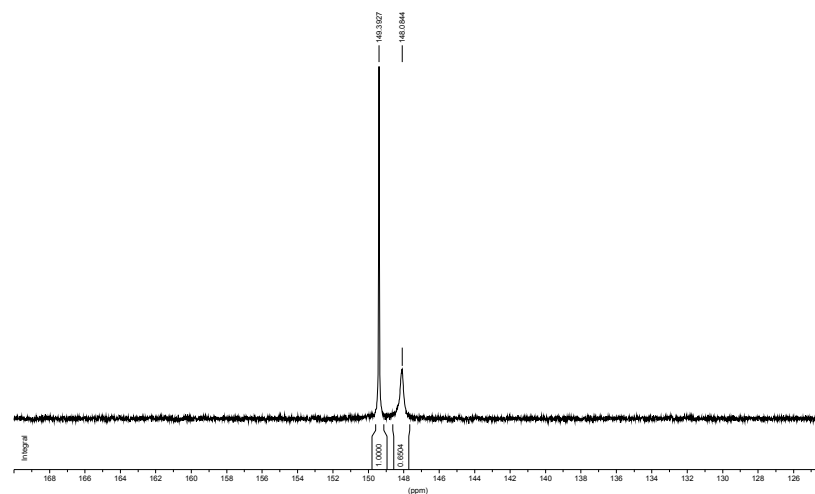


Abb. 73  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum von  $N^2$ -*i*-Butyryl-8-*N*-phenylamino- $O3'$ -[(2-cyanoethoxy)-(*N,N*-diisopropylamino)phosphinyl]- $O5'$ -dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **103** (2 Diastereomere)

Vor der Synthese der DNA-Fragmente, sollte nun untersucht werden, ob es auch möglich ist, modifizierte Phosphoramidite mit einer Schutzgruppe an  $O^6$ -Position des Heterocyclus zu erhalten, die erst nach der Oligonucleotidsynthese gemeinsam mit den anderen Schutzgruppen wie der *iso*-Butyrylschutzgruppe abgespalten werden kann.

#### 4.1.2.3 Palladium-katalysierte C-N-Bindungsknüpfung unter Verwendung eines $O^6$ -(4-Cyanophenyl)ethyl-geschützten 2'-Desoxyguanosinderivates

Im Anschluss an die erfolgreiche Synthese der Oligonucleotidbausteine aus den entschützten Addukten sollte untersucht werden, ob es möglich ist, den für die erfolgreiche Durchführung der Buchwald-Hartwig-Reaktion notwendigen Azaenolether in der Nucleobase so zu gestalten, dass die an  $O^6$  notwendige Schutzgruppe bis nach der Oligonucleotidsynthese im Molekül verbleiben und gemeinsam mit den anderen Schutzgruppen abgespalten werden kann. Daher kamen für diese Schutzgruppe vor allem solche infrage, die sich unter basischen Bedingungen abspalten lassen.

Eine solche Schutzgruppe stellt die von *E. Uhlmann* und *W. Pfeleiderer* entwickelte<sup>[109]</sup> p-Cyanophenylethyl-Gruppe (CPE) dar. Diese sollte sich erst nach der Oligonucleotidsynthese durch den im Abspaltungsschritt verwendeten Ammoniak, oder durch anschließende Entschützung mit DBU im Sinne einer  $\beta$ -Eliminierung abspalten lassen.

Die Synthesestrategie zur Darstellung des Oligonucleotidbausteins **113** verläuft analog zur zuvor für die Benzylschutzgruppe beschriebenen Synthesesequenz, jedoch kann auf die Hydrogenolyse verzichtet werden (Abb. 74).

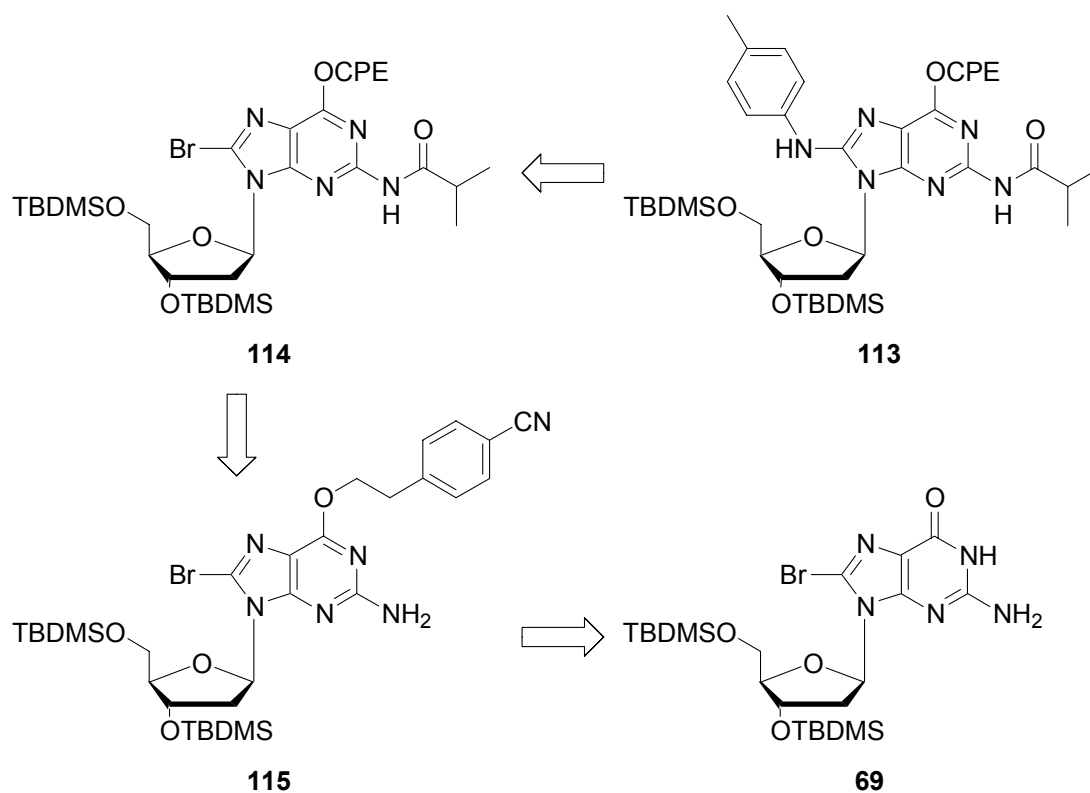


Abb. 74 Synthesestrategie zur Darstellung des Phosphoramidits **113**

Die Synthese sollte von der bereits zuvor dargestellten Verbindung **69** ausgehen. Zuvor musste jedoch 4-Cyanophenylethanol **117** dargestellt werden, welches nicht kommerziell erhältlich ist. Hierzu wurde eine von *E. Uhlmann* und *W. Pfeleiderer* entwickelte Syntheseroute verwandt (Abb. 75).<sup>[109]</sup>

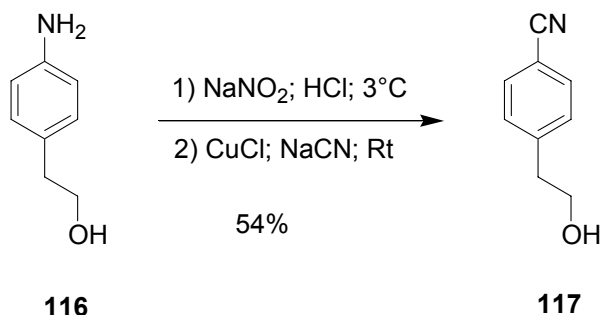


Abb. 75 Darstellung von 4-Cyanophenylethanol **117**

Die Sandmeyer-Reaktion wurde der Literatur entsprechend durchgeführt. Das Produkt **117** konnte als gelber Feststoff in einer Ausbeute von 54 % isoliert werden.

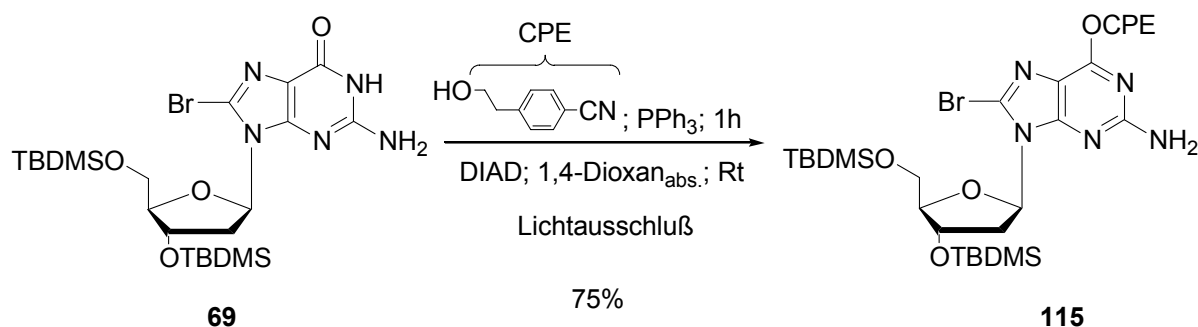


Abb. 76 Synthese von *O*<sup>6</sup>-(4-Cyanophenyl)ethyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **115**

Die Synthese von *O*<sup>6</sup>-(4-Cyanophenyl)ethyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **115** wurde analog zur Darstellung von *O*<sup>6</sup>-Benzyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **68** mit einer Mitsunobu-artigen Reaktion durchgeführt. Das gewünschte Produkt **115** konnte dabei nach chromatographischer Aufreinigung in einer Ausbeute von 75 % als blassgelber Feststoff isoliert werden (Abb. 76).

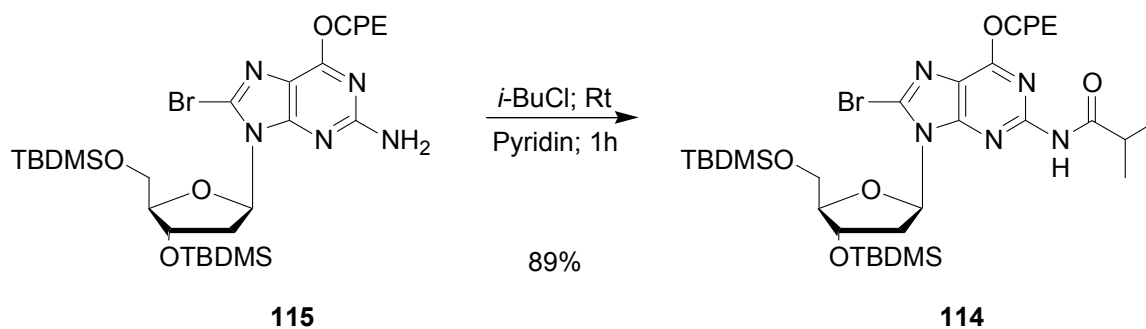


Abb. 77 Synthese von  $N^2$ -*i*-Butyryl- $O^6$ -(4-cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **114**

Die analog der Synthese der benzylierten Verbindung  $N^2$ -*i*-Butyryl- $O^6$ -benzyl-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **77** durchgeführte Schützung der exocyclischen Aminogruppe mit *iso*-Butyrylchlorid lieferte  $N^2$ -*i*-Butyryl- $O^6$ -(4-cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **114** in einer Ausbeute von 89 % (Abb. 77).

Von dieser Verbindung konnten durch Kristallisation aus einem Essigsäureethylester/Petrolether-Gemisch Kristalle in Form von farblosen Nadeln erhalten und röntgenographisch untersucht werden (Abb. 78).

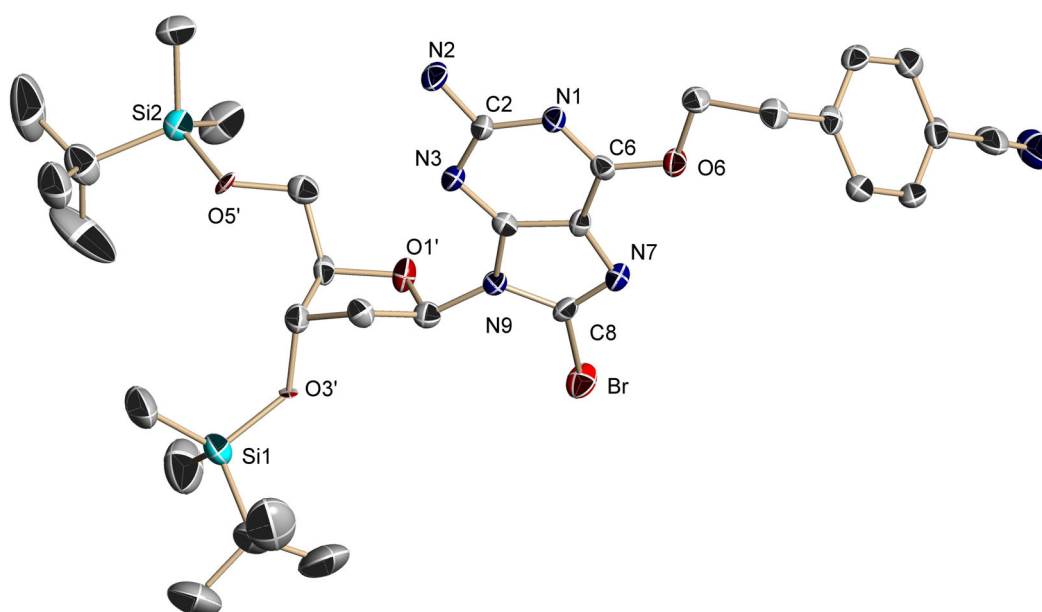


Abb. 78 ORTEP-Plot von  $N^2$ -*i*-Butyryl- $O^6$ -(4-cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **114**

Der Desoxyribose ring von Verbindung **114** zeigt eine  $C2'$ -endo,  $C3'$ -exo-Konformation bezüglich der Nucleobase. Der Pseudorotationswinkel  $P$  von  $171.70^\circ$ , weist darauf hin, dass zum Großteil eine „Southern“-Konformation vorliegt. Die maximale Abweichung des Riboserings von der Planarität  $\nu_{\max}$  beträgt  $39.54^\circ$ . Der Torsionswinkel  $\chi$  entlang der

glycosidischen Bindung (O4'-C1'-N1-C2) zeigt mit einem Wert von  $87.60^\circ$  eine *syn*-Konformation, das am C8-gebundene Bromatom zeigt also vom Zucker weg. Der Torsionswinkel  $\gamma$  um die C4'-C5'-Bindung (C3'-C4'-C5'-O5') nimmt einen Wert von  $-61.86^\circ$  und somit ein *tg*-Konformation an. Die vorliegende *syn*-Konformation entlang der glycosidischen Bindung entspricht erwartungsgemäß der im ungeschützten Br-dG vorliegenden Konformation und ist wahrscheinlich auf sterische Gründe zurückzuführen. Aus dieser Abbildung wird deutlich, dass einer Kreuzkupplungsreaktion am C8-Atom aus sterischen Gründen nichts im Wege stehen dürfte.

Anschließend wurde nun auch die CPE geschützte Verbindung **114** einer Buchwald-Hartwig-Reaktion unterworfen (Abb. 79).

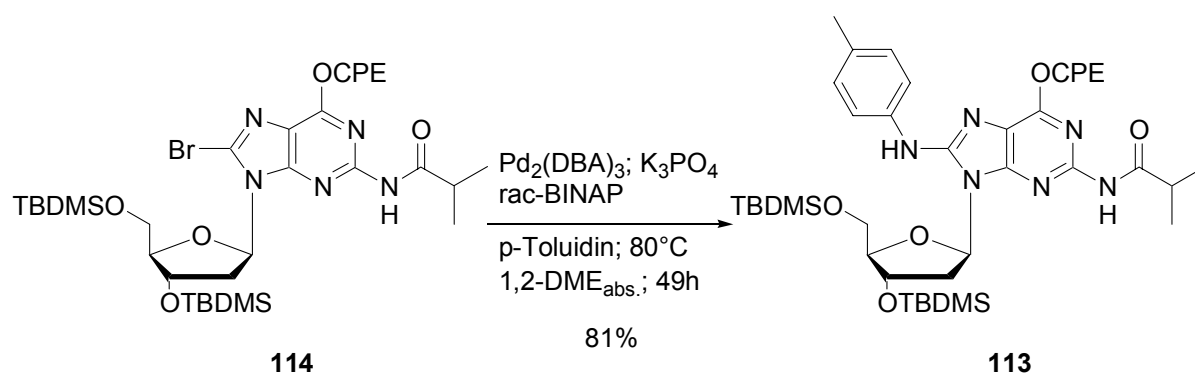


Abb. 79 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-(4-cyanophenyl)ethyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **113**

Die Umsetzung der CPE-geschützten Verbindung **114** erfolgte unter den bereits beschriebenen Bedingungen für die Palladium-katalysierte Reaktion. Sie dauerte mit einer Reaktionsdauer von 49 Stunden etwa genau so lang wie die Reaktion zum benzylierten Toluidin-Addukt **76** (50 h) und lieferte das Produkt, *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-(4-cyanophenyl)ethyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **113**, in einer Ausbeute von 81 %.

Es wurden auch andere von *Pfleiderer* et al. entwickelte Schutzgruppen<sup>[109]</sup> auf ihre Tauglichkeit untersucht, wie beispielsweise die *p*-Methoxyphenylethyl-Gruppe oder die *p*-Nitrophenylethyl-Gruppe. So wurde zum Beispiel die in *O*<sup>6</sup>-Position *p*-Nitrophenylethyl-modifizierte Verbindung synthetisiert. Diese war jedoch unter Katalysebedingungen nicht stabil, die *p*-Nitrophenylethyl-Gruppe wurde wieder abgespalten. Des weiteren wurde die *p*-Methoxyphenylethyl-Gruppe in *O*<sup>6</sup>-Position eingeführt. Die Synthese des Toluidin-Adduktes war mit 76% in 45 Stunden zwar ebenfalls erfolgreich, jedoch ließ sich die *p*-Methoxyphenylethyl-Gruppe nicht mehr mit DBU vom Addukt abspalten.



Die aus der Palladium-katalysierten Reaktion erhaltene Verbindung **113** wurde anschließend an den Hydroxylgruppen mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) entschützt (Abb. 80).

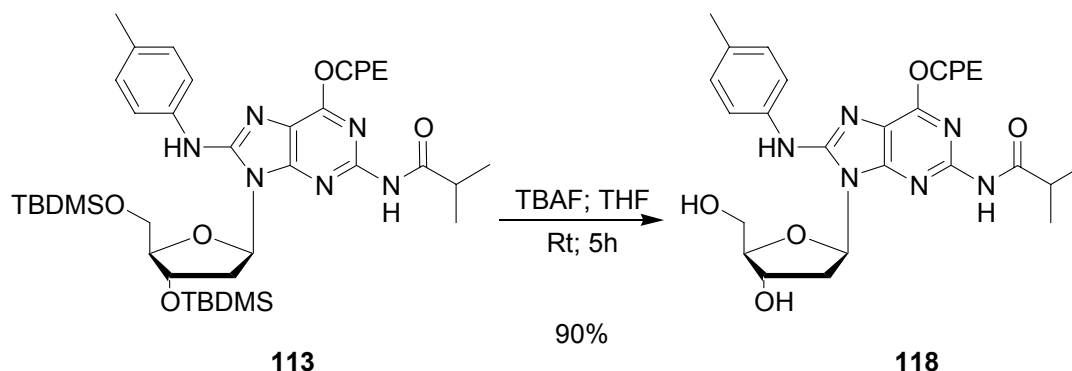


Abb. 80 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-(4-cyanophenyl)ethyl-8-*N*-(4-methylphenyl-amino)-2'-desoxyguanosin **118**

Die Desilylierung wurde analog der Entschützung der benzylierten Addukte **76**, und **78-83**, mit 1M Tetrabutylammoniumfluoridlösung (TBAF) in THF durchgeführt und lieferte das Produkt **118** nach Reinigung als hellgelben Feststoff in 90 % Ausbeute.

Vor der geplanten Synthese des CPE-modifizierten Phosphoramidits **120** sollte zunächst überprüft werden, ob sich die 4-Cyanophenylethyl-Gruppe abspalten lässt, ohne das die Arylamineinheit zerstört wird (Abb. 81).

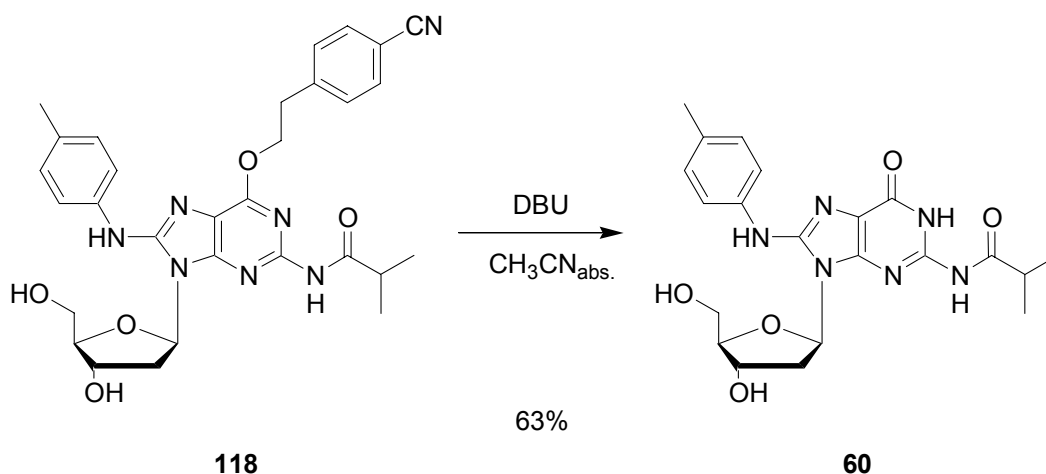


Abb. 81 Darstellung von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **60** durch Abspaltung der CPE-Schutzgruppe

Verbindung **118** wurde in wasserfreiem Acetonitril aufgenommen, mit DBU versetzt und bei 50 °C für 24 Stunden gerührt. Nach wässriger Aufarbeitung und chromatographischer Aufreinigung konnte das Produkt **60** in einer Ausbeute von 63 % isoliert werden.

Damit konnte gezeigt werden, dass sich die CPE-Schutzgruppe abspalten lässt, ohne dass die Arylamineinheit zerstört wird. Zudem ist es möglich, die CPE-Gruppe selektiv neben einer *iso*-Butyrylgruppe an der exocyclischen Aminogruppe abzuspalten. Daher konnte nun mit der Synthese des Oligonucleotidbausteins fortgefahren werden.

Zur Synthese des Phosphoramidits **120** musste zunächst die primäre Hydroxylgruppe mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid geschützt werden (Abb. 82).

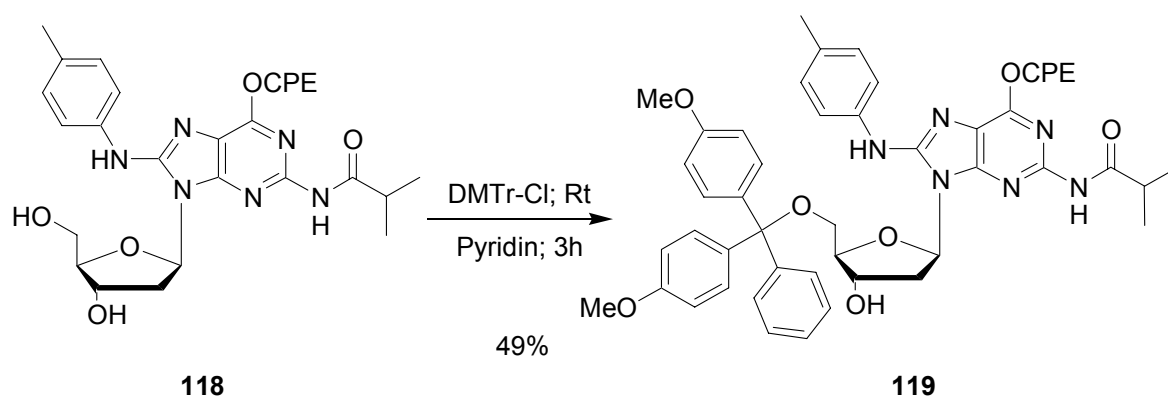


Abb. 82 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-(4-cyanophenyl)ethyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-*O*<sup>5</sup>'-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **119**

Die analog der Synthese von Verbindung **106** durchgeführte Reaktion lieferte nach dreistündigem Rühren das gewünschte Produkt, *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-(4-cyanophenyl)ethyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-*O*<sup>5</sup>'-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **119**, in einer Ausbeute von 49 %, sowie 48 % reisoliertes Ausgangsmaterial **118**.

Im abschließenden Schritt dieser Synthesesequenz musste nun noch die Phosphoramiditeinheit eingeführt werden (Abb. 83).

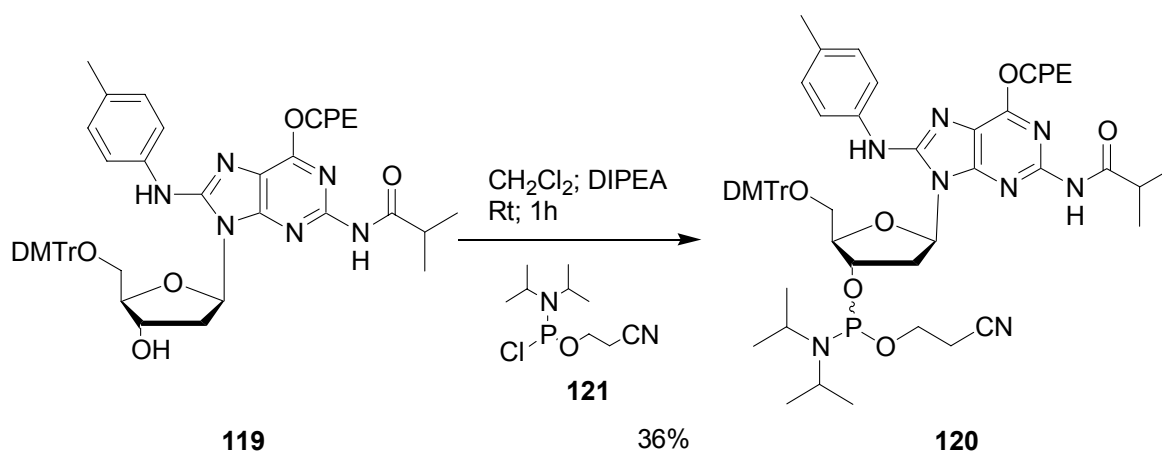


Abb. 83 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-(4-cyanophenyl)ethyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-*O*<sup>3</sup>'-[2-cyanoethoxy)-(N, N-diisopropylamino)phosphinyl]-*O*<sup>5</sup>'-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **120**

Diese Synthese wurde mit *N,N'*-Diisopropylamino-(2-cyanoethyl)-phosphorchloridit **121** in Dichlormethan und Diisopropylethylamin (DIPEA; „Hünigs Base“) durchgeführt und lieferte in einer relativ schlechten Ausbeute von 36 % das gewünschte Produkt **120**.

Möglicherweise hätte an dieser Stelle das zuvor verwendete Phosphitylierungsreagenz Bis-*N,N'*-Diisopropylamino-(2-cyanoethyl)-phosphit **112** eine Erhöhung der Ausbeute ermöglicht. Die Optimierung dieser Synthese wurde jedoch nicht weitergeführt, da sich die Darstellung der Phosphoramidite über die benzylierte Verbindung **77** bereits als erfolgreich erwiesen hatte.

Die Gesamtausbeuten der Synthesen der beiden vergleichbaren, entschützten Addukte **60** und **118** liegen für das Addukt **60**, über 7 Stufen ausgehend von dG **23**, bei 33 % und für das CPE-modifizierte Addukt **118** über 6 Stufen bei 32 %. Die Reduzierung der Syntheseroute um eine Stufe hatte also keine bessere Ausbeute zur Folge. Auch der Arbeitsaufwand ist nicht wirklich geringer, da das benötigte Reagenz 4-Cyanophenylethanol **117** nicht kommerziell erhältlich ist und somit erst synthetisiert werden muss.

## 4.2 Oligonucleotide

Zur einfacheren Zuordnung wurden die eingebauten Modifikationen allgemein mit (dG\*) und im speziellen wie folgt bezeichnet:

- dG(AN) = Anilin-Addukt
- dG(TOL) = Toluidin-Addukt
- dG(ANIS) = Anisidin-Addukt
- dG(ABP) = Aminobiphenyl-Addukt

### 4.2.1 Synthese von Standard-Oligonucleotiden

Die Synthesen der Oligonucleotide wurden mittels Festphasensynthese nach der Phosphoramiditmethode auf einem DNA-Synthesizer der Firma Eppendorf (Modell D 300+) durchgeführt. Zur Synthese unmodifizierter Oligonucleotide wurden sowohl die Standard-Chemikalien als auch die Syntheseprotokolle des Herstellers verwendet. Als Trägermaterial wurden kommerziell erhältliche Succinyl-CPG-Träger eingesetzt. Alle Synthesen wurden im 1  $\mu$ M-Maßstab durchgeführt. Die Entschützung und Isolierung von der festen Phase erfolgte, aufgrund der besseren Vergleichsmöglichkeit mit den modifizierten Oligonucleotiden, unter identischen Bedingungen.

#### 4.2.2 Synthese von modifizierten Oligonucleotiden

Zur Synthese der modifizierten Oligonucleotide wurden die zuvor synthetisierten Oligonucleotidbausteine **102-105** in ein spezielles (spitz zulaufendes) Syntheserfläschen überführt und in absolutem Acetonitril gelöst. Die Konzentration der eingesetzten Phosphoramidite betrug stets 0.1 M. Es wurden die Standard-Chemikalien der Hersteller eingesetzt. Bei einer zunächst unter Standardbedingungen durchgeführten Synthese wurde ein Abfall der Einbaurrate beim Einbau des modifizierten Amidites festgestellt. Deshalb wurde das Kupplungsprotokoll verändert. Es wurde ein dritter Kupplungsschritt eingefügt und die Kupplungszeit bei jedem der drei Schritte von 15 auf 60 sec. verlängert.

Auf diese Art wurden verschiedene Oligonucleotide mit jeweils einer Modifikation synthetisiert, um möglichst einfach interpretierbare Ergebnisse zu erhalten. Der Einbau von mehreren Modifikationen sollte aber ebenfalls möglich sein. Zum einen wurden Oligonucleotide mit der Modellsequenz d(5'-TTTTTT(G\*)TTTTTT) synthetisiert, um die Auswirkungen der Modifizierung auf das Basen-Paarungsverhalten zu untersuchen. Es sollte geklärt werden, ob Cytosin auch mit den modifizierten Guanin-Basen immer noch die besten Hybridisierungseigenschaften besitzt.

Zum anderen wurden die bereits von *M.M. Marques* und *F.A. Beland* untersuchten, modifizierten 15mere d(5'-TACTCTTCTT(G\*)ACCT), mit einem Teil des Maus *c-Ha-ras* Protoonkogens der sich um das Codon 61 befindet synthetisiert.<sup>[110]</sup> Diese Sequenz ist ein Mutationshotspot für aromatische Amine und Amide. Die erste Base des Codons 61 ist eine Guanosinbase und bildet, mit aromatischen Aminen und Amiden, fast ausschließlich C8-Addukte. Mit Hilfe dieser Oligonucleotide sollte der Einfluss der Größe der Modifikationen auf die Hybridisierungseigenschaften der Oligonucleotide untersucht werden. Des Weiteren wurden noch modifizierte 37mere mit der Sequenz d(5'-GTGCGTCTGTC-G(G\*)TGTCTGTCAGAAATTCGCACCAC) für Primer-Verlängerung-Untersuchungen synthetisiert. Die erhaltenen modifizierten und unmodifizierten Oligonucleotide sind in Tabelle 9, S. 73 zusammengefasst.

<b>123</b>	d(5'-TACTCTTCTTG(AN)ACCT)
<b>124</b>	d(5'-TACTCTTCTTG(TOL)ACCT)
<b>125</b>	d(5'-TACTCTTCTTG(ANIS)ACCT)
<b>126</b>	d(5'-TACTCTTCTTG(ABP)ACCT)
<b>127</b>	d(5'-TTTTTTG(TOL)TTTTTT)
<b>128</b>	d(5'-TTTTTTG(ABP)TTTTTT)
<b>129</b>	d(5'-GTGCGTCTGTCGG(AN)TGTCTGTCAGAAATTTTCGCACCAC)
<b>130</b>	d(5'-GTGCGTCTGTCGG(TOL)TGTCTGTCAGAAATTTTCGCACCAC)
<b>131</b>	d(5'-GTGCGTCTGTCGG(ANIS)TGTCTGTCAGAAATTTTCGCACCAC)
<b>132</b>	d(5'-GTGCGTCTGTCGG(ABP)TGTCTGTCAGAAATTTTCGCACCAC)
<b>133</b>	d(5'-TACTCTTCTTGACCT)
<b>134</b>	d(5'-AGGTCAAGAAGAGTA)
<b>135</b>	d(5'-TTTTTTTGTTTTTTT)
<b>136</b>	d(5'-AAAAAAACAAAAAA)
<b>137</b>	d(5'-AAAAAAAAAAAAAAAA)
<b>138</b>	d(5'-AAAAAAGAAAAAA)
<b>139</b>	d(5'-AAAAAATAAAAAA)
<b>140</b>	d(5'-GTGCGTCTGTCGGTGTCTGTCAGAAATTTTCGCAC)

*Tabelle 9 Synthetisierte Oligonucleotide*

Nach der Synthese wurden alle Oligonucleotide durch die nachfolgend aufgeführten Methoden isoliert, gereinigt und charakterisiert. Anschließend wurden die Eigenschaften der modifizierten DNA-Fragmente untersucht und mit denen der unmodifizierten Referenzstränge verglichen. Hierzu zählen die Bestimmung der Schmelzpunkte, die Messung von CD-Spektren und, für die 37mere, molekularbiologische Untersuchungen.

#### 4.2.3 Entschützung und Isolierung der Oligonucleotide

Nach der Synthese wurde noch am Synthesizer die letzte DMTr-Schutzgruppe entfernt. Die Abspaltung der Oligonucleotide vom CPG-Träger wurde manuell mit konzentriertem Ammoniak und 2-Mercaptoethanol durchgeführt.

#### 4.2.4 Reinigung der Oligonucleotide

##### 4.2.4.1 Analytische HPLC

Von den nach der Reinigung über die Pharmacia-Festphasenextraktionssäule erhaltenen Proben wurde je eine Probe auf eine Waters XTerra (2.5  $\mu\text{m}$ , 4.6x50 mm) Umkehrphasen Ionen-Paarungssäule gegeben und mit 0.1 M Triethylammoniumacetat-Puffer (TEAA-Puffer) mit einem Acetonitrilgradienten eluiert. Der geeignete Acetonitrilgradient wurde für jedes Oligonucleotid so bestimmt, dass der (n-1)-Peak, der des um eine Base kürzeren Oligonucleotids eindeutig vom Produktpeak zu unterscheiden war. Die Säulentemperatur betrug 60 °C. Die Detektion erfolgte über einen Dioden Array Detektor bei 200 bis 500 nm.

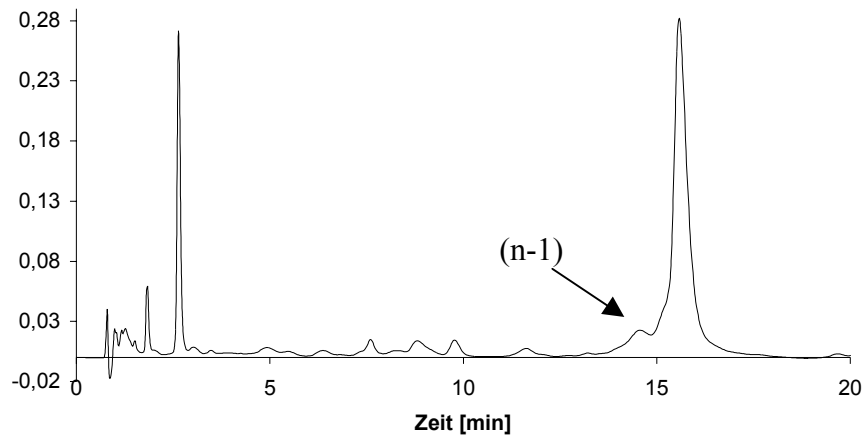
Proben mit dem gewünschten Oligonucleotid wurden anschließend in einem Speed-Vac-Probenkonzentrator getrocknet.

##### 4.2.4.2 Reinigung der Oligonucleotide mittels semipräparativer HPLC

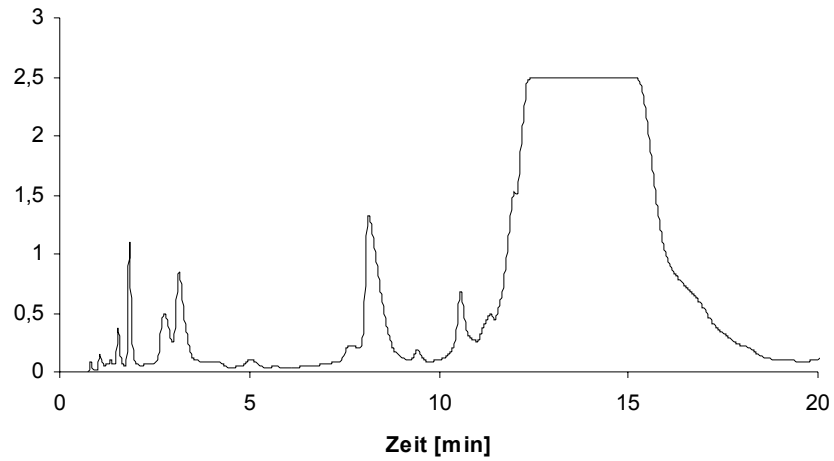
Die bei der Isolierung erhaltenen Proben wurden in Reinstwasser gelöst und auf eine Waters XTerra-Säule (Säulentemperatur 60 °C) gegeben. Die Absorption wurde bei 290 nm gemessen. Der gewünschte Peak wurde in einzelnen Fraktionen gesammelt und anschließend von jeder Fraktion eine Probe HPLC-chromatographisch analysiert. Gleiche Fraktionen wurden vereinigt, in einem Speed-Vac-Probenkonzentrator bis zur Trockne eingengt, und bei Bedarf noch einmal getrennt. Nach anschließender Entsalzung des Oligonucleotids über eine Pharmacia-Festphasenextraktionssäule, wurde das gereinigte und getrocknete Oligonucleotid erneut in 200  $\mu\text{l}$  Reinstwasser aufgenommen. Von 20  $\mu\text{l}$  dieser Oligonucleotidlösung wurde nun die Absorption bei 260 nm ( $A_{260}$ ) gemessen. Aus dem  $A_{260}$ -Wert ließ sich, durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor, die optische Dichte der Gesamtlösung ( $OD_{260}$ ) und daraus mit Hilfe der in Kapitel 8.3.5.1, S. 112 angegebenen Formeln, die Menge des erhaltenen Oligonucleotids, berechnen. Zur Reinheitskontrolle wurden 0.1 OD des gereinigten Oligonucleotids erneut HPLC-chromatographisch untersucht.

In Abb. 84, S. 75 sind als Beispiel die HPLC-Chromatogramme des Oligonucleotids d(5'-GTGCGTCTGTCGG(TOL)TGTCTGTCAGAAATTCGCACCAC) **130** abgebildet.

- a) Analytischer Lauf des dG(TOL)-Oligonucleotids **130** (Rohprodukt nach Abspaltung vom CPG-Träger)



- b) Semipräparative Trennung des dG(TOL)-Oligonucleotids **130**



- c) Analytischer Lauf des gereinigten Oligonucleotids **130**

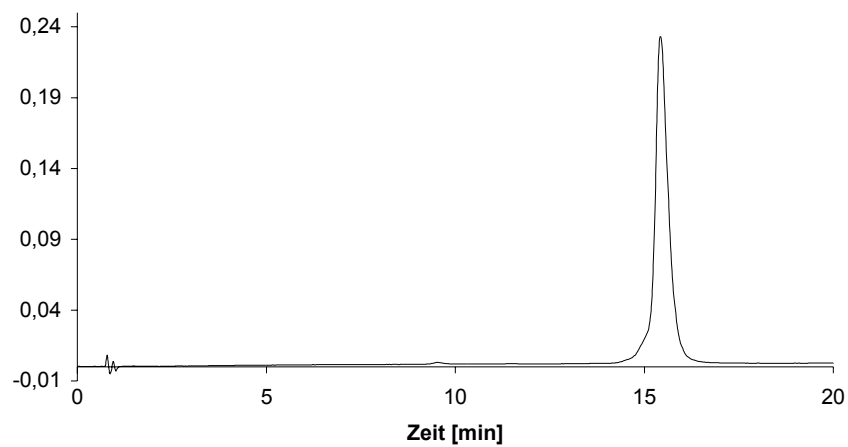


Abb. 84 HPLC-Chromatogramme des Oligonucleotids  
*d(5'-GTGCGTCTGTCGG(TOL)TGTCTGTCAGAAATTCGCACCAC) 130*

#### 4.2.5 Identifizierung durch Massenspektrometrie

Die Identifikation der synthetisierten Oligonucleotide erfolgte massenspektrometrisch. Die 15 Basen langen Oligonucleotide **123-128** und **133-139** konnten mittels Maldi-TOF-MS identifiziert werden. Diese Methode war jedoch für die längeren Oligonucleotide **129-132** und **140** nicht geeignet, da es vermutlich durch die Anregung durch den Laser zu einer verstärkten Fragmentierung kam und fast nur kürzere Bruchstücke beobachtet werden konnten. Diese Oligonucleotide wurden dann mittels LC-ESI-MS identifiziert.

#### 4.2.6 Messung der Schmelztemperaturen ( $T_m$ -Werte)

Die Bestimmung des  $T_m$ -Wertes eines sich ausbildenden Duplexes zwischen einem Sense-Strang und einem Antisense-Strang wird in einem wässrigen Puffer mit Hilfe eines UV-Spektralphotometers durchgeführt. Bei Oligonucleotiden kann durch Messung der UV-Absorption als Funktion der Temperatur der thermisch induzierte Übergang von einer geordneten, helikalen Struktur in einen ungeordneten Zustand mit statistischer Verteilung der Konformation verfolgt werden. Die elektronische Wechselwirkung der  $\pi$ -Systeme der Basen, die in der helikalen Form in Stapeln senkrecht zur Helixachse angeordnet sind, führt zu einer deutlichen Reduktion der UV-Absorption, dem hypochromen Effekt (Hypochromizität).<sup>[111]</sup> Beim Erwärmen der Probe steigt daraufhin der Absorptionswert zunächst langsam, dann sprunghaft und später wieder langsam. Dieser sigmoide Verlauf resultiert aus dem Phänomen, dass von einem Startpunkt aus, meistens den Strangenden, die Denaturierung sehr schnell den Duplex entlang verläuft, da der Zustand eines Nucleotids die Konformation der benachbarten Nucleotide beeinflusst. Diese Reißverschluss-ähnliche Öffnen der Doppelhelixstruktur bedeutet, dass in einer Probe nur native Duplexe und denaturierte Einzelstränge, nicht jedoch Zwischenstufen, anzutreffen sind. Dies gilt allerdings nur für kurze Nucleinsäureduplices. Für lange Duplices wie zum Beispiel genomische DNA gilt dies nicht.

Der Grad der Hypochromizität ist ein Maß für die Basenpaarung und –stapelung der Sekundärstruktur. Der Wendepunkt der sigmoiden Kurve, bzw. das Maximum der 1. Ableitung, das man durch Auftragung der UV-Absorption gegen die Temperatur erhält, entspricht dem Schmelzpunkt ( $T_m$ -Wert) des Duplexes. Aus der Analyse der Schmelzkurve lassen sich qualitative und quantitative Aussagen über das Molekül treffen. Allgemein gilt, je höher der  $T_m$ -Wert, desto stabiler ist die zugrundeliegende Struktur. Eine Faustregel für die Abschätzung eines  $T_m$ -Wertes gibt für ein A-T-Basenpaar 2 °C und für ein G-C-Basenpaar 4 °C an.



Um nun den  $T_m$ -Wert eines Duplexes zu bestimmen, werden in einer Quarzglas-Küvette gleiche Mengen des Sense- und des Antisense-Strangs zusammen in einen wässrigen Puffer gegeben und in einem temperierbaren UV-Spektralphotometer vermessen. Hierbei ist zu beachten, dass nicht die Optische Dichte ( $OD_{260}$ ) der Menge des zugegebenen Oligonucleotids entspricht, sondern dessen Molarität. Da die Extinktion für jede Nucleobase einen anderen Wert besitzt, muss zunächst die Molarität berechnet werden.

Die in dieser Arbeit synthetisierten und untersuchten Oligonucleotide wurden in einem 1  $\mu$ M-Maßstab (1 nmol je Strang gelöst in 1 ml Puffer), in einem 10 mM Phosphat-Puffer mit 140 mM NaCl und 1 mM EDTA, pH 6.8 vermessen. Die Messungen wurden für die gemischten Sequenzen **123-126** und **133** mit **134** als Gegenstrang in einem Temperaturbereich von 10 °C bis 70 °C durchgeführt, wobei jeweils dreimal von 10 °C auf 70 °C erhitzt und dreimal von 70 °C auf 10 °C abgekühlt wurde. Die Heiz- bzw. Kühlrate betrug hierbei 0.5 °C/min, wobei alle 0.5 °C ein Datenpunkt aufgenommen wurde. Vor der eigentlichen Messung wurde die Probelösung zweimal schnell von 10 °C auf 70 °C erhitzt und wieder auf 10 °C abgekühlt. Die Heiz- bzw. Kühlrate hierbei lag bei 5 °C/min. Mit dieser „Rampe“ wurde die DNA-Struktur zunächst in Einzelstränge auseinander geschmolzen, damit sie bei der folgenden Abkühlung einen wohldefinierten Doppelstrang ausbilden konnte. 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. Der so erhaltene Mittelwert wird als  $T_m$ -Wert des Duplexes angegeben. Der Fehler bei dieser Methode betrug  $\pm 1^\circ$  C. Eine weitere Möglichkeit, den  $T_m$ -Wert zu bestimmen, ist die van't Hoff Kurvenanalyse. Sie lieferte mit einem Fehler von  $\pm 0.5^\circ$  C die genaueren Ergebnisse und wurde für die hier angegebenen Werte verwendet.

Allgemein ließ sich eine thermische Instabilität der modifizierten Oligonucleotide feststellen. Zu lange bei 70 °C denaturierte Proben lieferten keine auswertbaren Kurven mehr. Weiterführende Untersuchungen bei 90 °C zeigten, dass bereits nach 5 min eine signifikante Menge der untersuchten Oligonucleotide, in der Nähe der Modifikation auseinandergebrochen ist.

Die vermessenen Oligonucleotide und ihre  $T_m$ -Werte sind in Abb. 85, S.78 zusammengefasst.

Oligonucleotid	$T_m$ -Wert	$\Delta H$	$\Delta S$
<b>133</b> (unmod.)	51.6	82.0	280.8
<b>123</b> (AN)	46.3	163.9	541.4
<b>124</b> (TOL)	46.4	144.4	480.8
<b>125</b> (ANIS)	46.0	161.5	534.5
<b>126</b> (ABP)	45.0	175.7	580.2

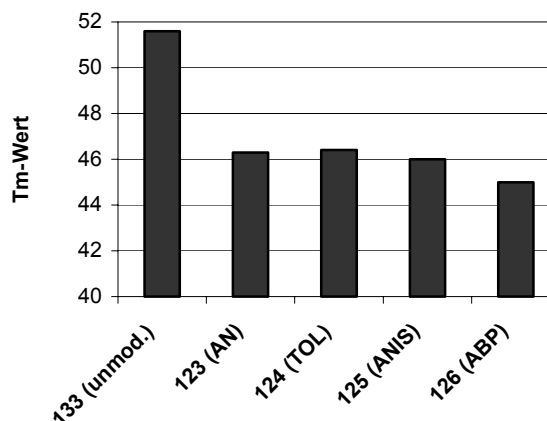


Abb. 85 Darstellung der  $T_m$ -Werte und der thermodynamischen Daten von **133** und **123-126** mit **134** als Gegenstrang

Die hier dargestellten  $T_m$ -Werte wurden für den unmodifizierten Sense-Strang **133** d(5'-TACTCTTCTTGACCT) und die modifizierten Sense-Stränge **123-126** d(5'-TACTCTTCTT(G\*)ACCT) mit dem komplementären Antisense-Strang **134** d(5'-AGGTCAAGAAGAGTA) gemessen.

Generell sind die  $T_m$ -Werte für die modifizierten Oligonucleotide ca. 5-6 °C niedriger als für den unmodifizierten Referenzstrang. Der niedrigste Wert wurde mit 45.0 °C für das 4-Aminobiphenyl-modifizierte Oligonucleotid gemessen, was auf einen Einfluss der Größe der Modifikation auf die Hybridisierungseigenschaften hinweisen könnte. Die Schmelztemperaturen der anderen Duplices der modifizierten Stränge **123-125** unterscheiden sich aber, unter Berücksichtigung der Fehlergrenzen, nicht signifikant. Eine weitere Einordnung der anderen Modifikation nach dem sterischen Anspruch der Modifikation ist daher leider nicht möglich.

Für die poly-T-Sequenzen **127**, **128** und **135** wurden die Messungen mit einem dem Programm der gemischten Sequenzen analogen Programm in einem Temperaturbereich von 5 °C bis 60 °C durchgeführt, denn die  $T_m$ -Werte lagen, wie erwartet, deutlich unter denen der gemischten Sequenzen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abb. 86 und Tabelle 10, S. 79 dargestellt.

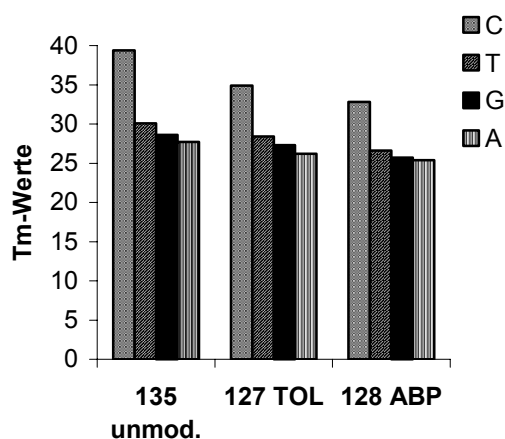


Abb. 86 Darstellung der  $T_m$ -Werte von **135**, **127** und **128** mit den Antisense-Strängen **136-139**

	<b>135</b> (unmod.)	$\Delta H$	$\Delta S$	<b>127</b> (TOL)	$\Delta H$	$\Delta S$	<b>128</b> (ABP)	$\Delta H$	$\Delta S$
C	39.4	116.6	401.9	34.9	157.4	539.6	32.8	193.7	306.0
T	30.1	211.4	722.3	28.4	114.7	351.6	26.6	180.1	628.3
G	28.6	171.1	594.6	27.3	159.6	558.9	25.7	100.6	365.5
A	27.7	187.5	649.6	26.2	117.9	422.6	25.4	102.5	372.2

Tabelle 10  $T_m$ -Werte und thermodynamische Daten von **135**, **127** und **128** mit den Antisense-Strängen **136-139**

Die hier dargestellten  $T_m$ -Werte wurden für den unmodifizierte Sense-Strang **135** d(5'-TTTTTTTIGTTTTTTT) und die modifizierten Sense-Stränge **127** und **128** d(5'-TTTTTTT(G\*)TTTTTTT) mit den Antisense-Strängen **136-139** d(5'-AAAAAAXAAAAAAA) gemessen.

Auch hier sind die  $T_m$ -Werte der modifizierten Oligonucleotide mit den verschiedenen Antisense-Strängen generell niedriger als die des unmodifizierten Duplexes. Wobei die Messungen für die 4-Aminobiphenyl-modifizierten Oligonucleotide, wie schon bei den gemischten Sequenzen beobachtet, wieder die niedrigsten Werte liefern. Prinzipiell lässt sich aber sagen, dass innerhalb einer Reihe der  $T_m$ -Wert für die C-G\*-Basenpaarung immer der höchste ist und die weitere Abfolge der  $T_m$ -Werte für die Basen T, G und A bei allen gemessenen Oligonucleotiden gleich ist. Die am besten paarende Base für die modifizierte Guanin-Base ist also wie auch für das unmodifizierte Guanin, die Base Cytosin, wengleich die Stärke der Wechselwirkungen durch die Modifikation beeinflusst wird.

#### 4.2.7 Messung der CD-Spektren

Messungen des Circularen Dichroismus (CD) dienen in erster Linie der Konfigurations- und Konformationsanalyse chiraler Moleküle. Darüber hinaus können damit intermolekulare Wechselwirkungen untersucht werden. In dieser Arbeit sollten damit eventuelle, durch die eingebauten Modifikationen entstehende, Unterschiede in der Helixstruktur der gebildeten DNA-Duplices untersucht werden.

In Oligonucleotiden sind die Nucleobasen als Chromophore konformationell fixiert. Dadurch entsteht eine chirale Helix. Im Einzelstrang findet man eine statistische Verteilung der Basenorientierung, d.h. es wird kein Circularer Dichroismus beobachtet. Im Doppelstrang bewirkt die Vorzugsrichtung der Nucleobasen gegenüber dem Rückgrat einen Cotton-Effekt.<sup>[112]</sup> Abb. 87 zeigt die CD-Spektren verschiedener DNA-Konformationen. Die B-DNA ist hierbei die natürlich vorkommende DNA-Konformation.

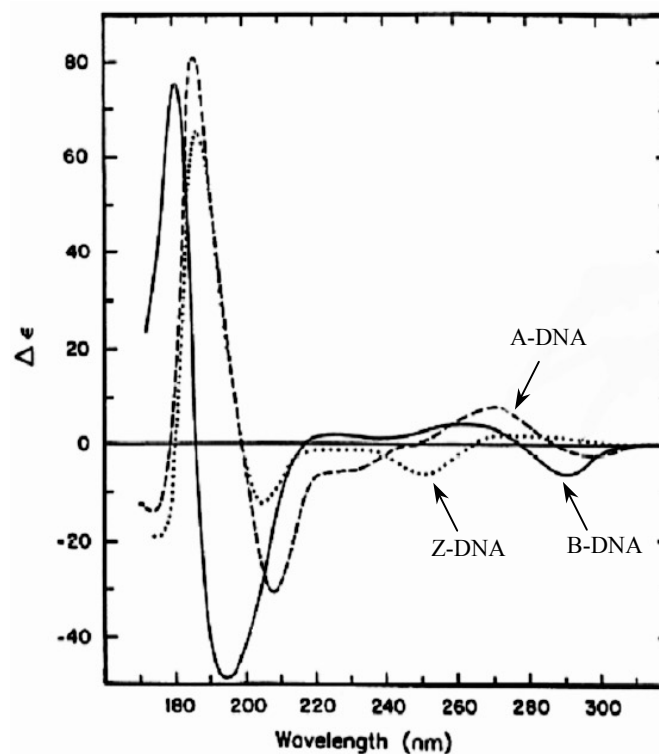


Abb. 87 Darstellung verschiedener DNA-Konformationen

Die Messungen wurden an einem CD-Spektrometer der Firma AVIS-Instruments Inc., Modell 215 vorgenommen. Es wurden der gleiche Phosphat-Puffer und die gleiche Konzentration an Oligonucleotid wie für die  $T_m$ -Wert-Bestimmung verwendet. Die Absorption wurde in einem Bereich von 220-350 nm bei einer Temperatur von 10 °C gemessen.

Die gemessenen CD-Spektren der Oligonucleotide mit gemischter Sequenz d(5'-TACTCTTCTT(G\*)ACCT) **133** und **123-126** mit **134** als Antisense-Strang sind in Abb. 88 dargestellt.

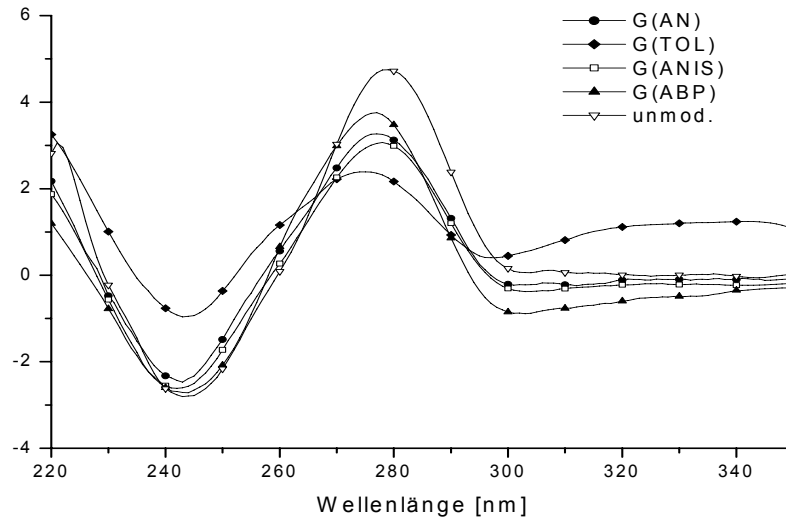


Abb. 88 *CD-Spektren der gemischten Sequenzen 133 und 123-126 mit 134 als Gegenstrang*

Die CD-Spektren der modifizierten Sequenzen **123-126** zeigen, wie auch die unmodifizierte Sequenz **133**, im Duplex mit dem entsprechenden Gegenstrang **134** das typische CD-Spektrum einer B-DNA. Unterschiede zwischen den verschiedenen Modifikationen sind nicht erkennbar. Die Untersuchungen der modifizierten und unmodifizierten poly-T-Sequenzen sind im Folgenden dargestellt.

1) CD-Spektrum von TTTTTTTGTTTTTTT **135** mit AAAAAAXAAAAAAA **136-139**:

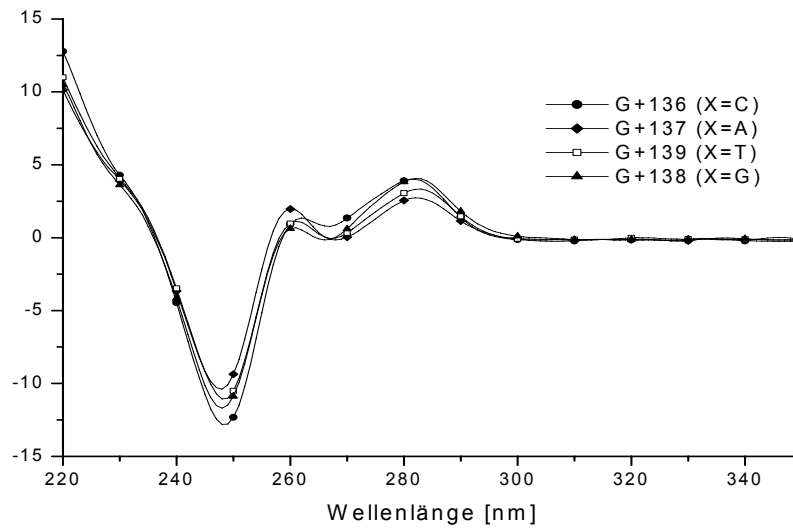


Abb. 89 CD-Spektren des Referenzstranges **135** mit den verschiedenen Antisense-Strängen **136-139**

2) CD-Spektrum von TTTTTTTG(TOL)TTTTTTT **127** mit AAAAAAXAAAAAAA **136-139**:

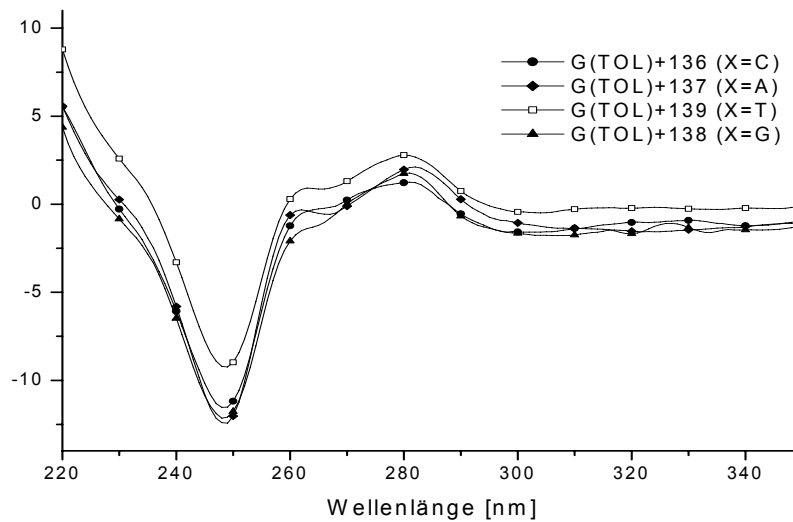


Abb. 90 CD-Spektren des modifizierten Oligonucleotids **127** mit den verschiedenen Antisense-Strängen **136-139**

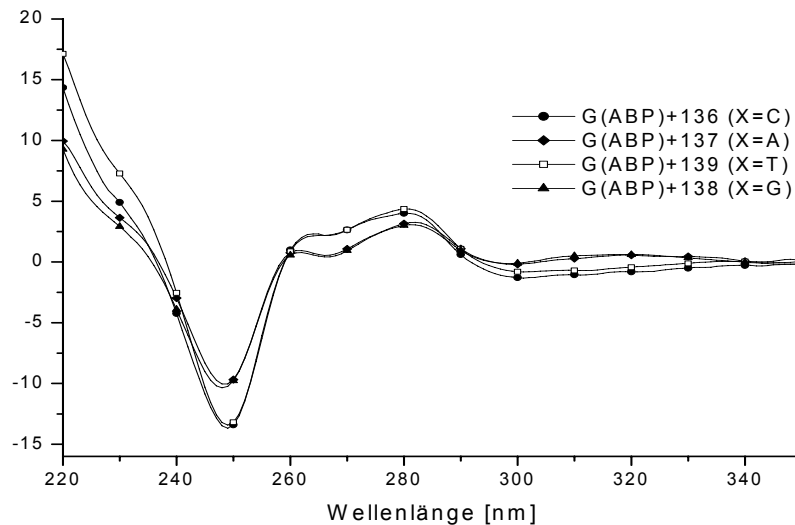
3) CD-Spektrum von TTTTTTTG(ABP)TTTTTTT **128** mit AAAAAAXAAAAAAA **136-139**:

Abb. 91 CD-Spektren des modifizierten Oligonucleotids **128** mit den verschiedenen Antisense-Strängen **136-139**

Alle CD-Spektren der modifizierten und unmodifizierten T<sub>7</sub>-(dG/dG\*)-T<sub>7</sub>·A<sub>7</sub>-(dC)-A<sub>7</sub>-Duplices zeigen wie bereits bei den gemischten Sequenzen eindeutig das Vorhandensein einer B-DNA. Aber auch hier ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Spektren der modifizierten und der unmodifizierten Duplices erkennbar.

Die CD-Spektroskopie, so wie sie hier angewandt wurde, lieferte also nicht den erhofften Hinweis auf strukturelle Veränderungen der DNA durch die Modifikation eines 2'-Desoxyguanosinbausteins in DNA-Fragmenten. Offensichtlich haben die unterschiedlichen Modifikationen also keinen erkennbaren Einfluss auf die Struktur eines Doppelstranges. Die Unterschiede in der Cancerogenität sind demnach nicht auf strukturelle Veränderungen der DNA, hervorgerufen durch die Addukte in der 8-Position von 2'-Desoxyguanosin, zurückzuführen. Die Gründe für die unterschiedliche Cancerogenität sind also vermutlich auf Interaktionen mit Enzymen zurückzuführen.

#### 4.2.8 Molekularbiologische Untersuchung der 37mere

Diese Arbeiten wurden im Fachbereich Chemie der Universität Konstanz, im Arbeitskreis von Prof. Dr. A. Marx durchgeführt.

Mit Primer-Verlängerungs-Untersuchungen sollte der Einfluss von C8-Arylamin-Modifikationen am 2'-Desoxyguanosin in Oligonucleotiden auf die Selektivität verschiedener DNA-Polymerasen untersucht werden.

DNA-Polymerasen lassen sich nach Strukturhomologien in mindestens sechs Familien einteilen, darunter Familie A (*Pol I*), Familie B (*Pol α*, *Pfu*), Familie X (*Pol β*) und die Reversen Transkriptasen. Unabhängig von dieser Einteilung gibt es zwei verschiedene Arten von DNA-Polymerasen, die einen sind für die genaue Replikation des Genoms verantwortlich, während die anderen spezielle Funktionen haben.

Die DNA-Polymerase I aus *E. coli* (*Pol I*) besteht aus der DNA-Polymerase-Untereinheit einer 3'-5'- und einer 5'-3'-Exonuklease. *Pol I* synthetisiert sehr genau mit einem Fehler nach  $10^5$  bis  $10^6$  Basenpaaren (bp). Wird die 5'-3'-Exonuklease entfernt, spricht man vom *Klenow-Fragment (KF)*, wobei dies nicht zum Überleben eines Bakteriums genügt, da die entfernte Exonukleaseaktivität zum Entfernen der RNA-Primerstränge unbedingt nötig ist.

Die DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*) arbeitet mit einer extrem hohen Genauigkeit. Da sie zusätzlich noch thermostabil ist, wird sie häufig für die PCR verwendet.<sup>[113]</sup>

*Pol β* hat zwei wichtige Aufgaben; zum einen eine dRPLyase- Aktivität, zum anderen ist sie auch eine Polymerase, die durch Basen-Excisions-Reparatur entstandene „Löcher“ in der DNA wieder auffüllt. *In vitro* macht *Pol β* jedoch sehr viele Deletionen und Einbaufehler (ein Fehler nach  $10^3$  bp).<sup>[114]</sup> Es wird weiter angenommen, dass *Pol β* in der Neurogenese eine entscheidende Rolle spielt und auch bei der Meiose beteiligt ist.<sup>[115]</sup>

Um ihre virale RNA in das Genom ihres Wirtes zu integrieren, benutzen Retroviren eine *Reverse Transcriptase*, die die RNA in DNA umschreibt. Diese Funktion wird bei der Herstellung von cDNA-Bibliotheken ausgenutzt, wenn man bereits gespleißte eukaryotische mRNA wieder in DNA überführen will, um sie z.B. in ein Bakteriengenom zu klonieren. Die *Reverse Transcriptase* ist sowohl eine RNA-abhängige, wie auch DNA-abhängige DNA-Polymerase.



Die in dieser Arbeit synthetisierten, modifizierten Oligonucleotide (**140**, und **129-132**) sollten nun mit DNA-Polymerasen aus drei verschiedenen Familien (*KF<sup>exo</sup>*, *Pfu<sup>exo</sup>*, *Pol β*) untersucht werden.

Es wurde untersucht, welche Auswirkungen der Einbau einer C8-Arylamin-Modifikation in den Templatstrang, auf die Genauigkeit beim komplementären Nucleotideinbau bzw. beim Einbau des darauffolgenden Nucleotids hat.

Für die Versuche zur Einbaugenauigkeit gegenüber des modifizierten Desoxyguanosins wurden „standing-start“-Reaktionen durchgeführt, das heißt die DNA-Polymerase ist noch nicht in Bewegung, wenn sie an die zu untersuchende Stelle kommt, sondern muss dort zuerst an die DNA binden und dann mit der Synthese beginnen. Dafür wurde ein Primer verwendet, der eine Base vor dem Desoxyguanosinanalogen endete.

Ein Desoxynucleotid (dC) länger und damit fähig eine korrekte Basenpaarung nach Watson und Crick mit dem modifizierten dG einzugehen, ist der Primer für die Einbauversuche mit dem darauffolgenden Nucleotid. Diese Experimente werden im weiteren Verlauf der Arbeit als „standing-start +1“-Versuche bezeichnet.

Die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese-Bilder (PAGE) wurden folgendermaßen beschriftet:

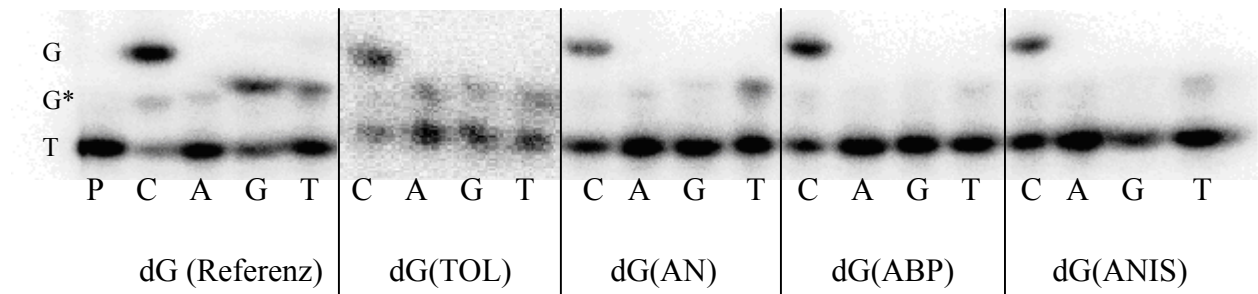
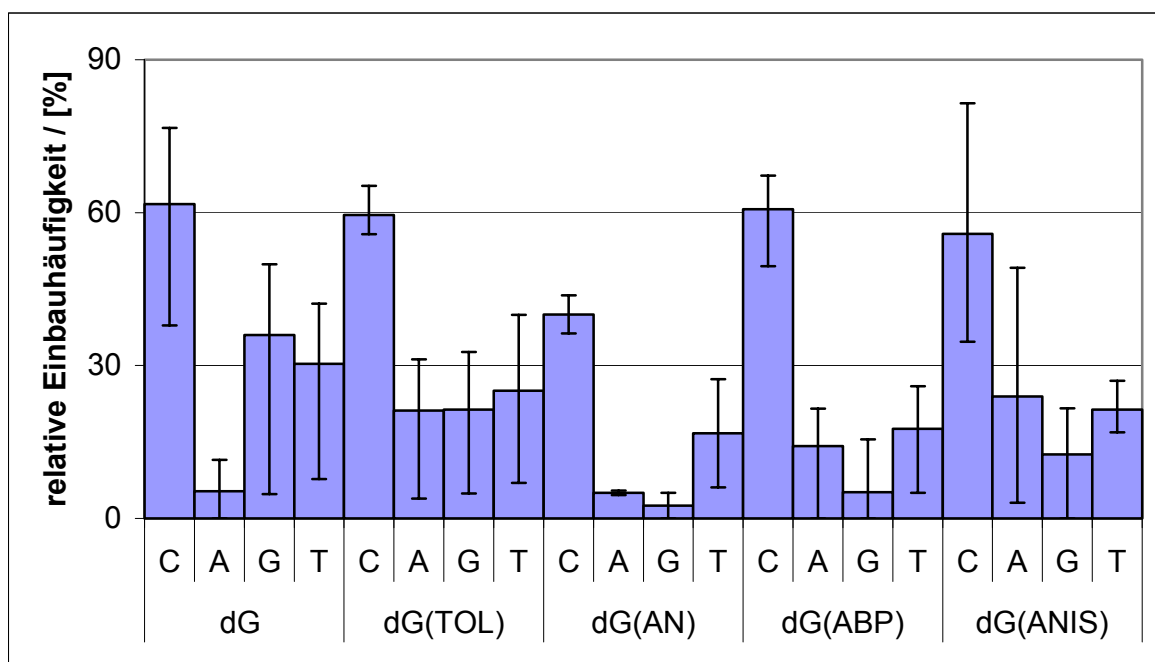
Die Buchstaben unter jeder Bande zeigen, mit welchem dNTP das Reaktionsgemisch versetzt wurde:

**C:** dCTP, **A:** dATP, **G:** dGTP, **T:** dTTP, **P:** ohne dNTP, Referenz

Da jeder Versuchsaufbau mehrmals durchgeführt wurde, ist unter jedem Gel ein Diagramm mit der relativen Einbauhäufigkeit des jeweiligen Desoxynucleotids abgebildet.

## 4.2.8.1 „standing-start“-Primer-Verlängerung

Zu einer Lösung mit Reaktionspuffer, Primer und Templat wurden die DNA-Polymerase und anschließend das entsprechende dNTP zugegeben.

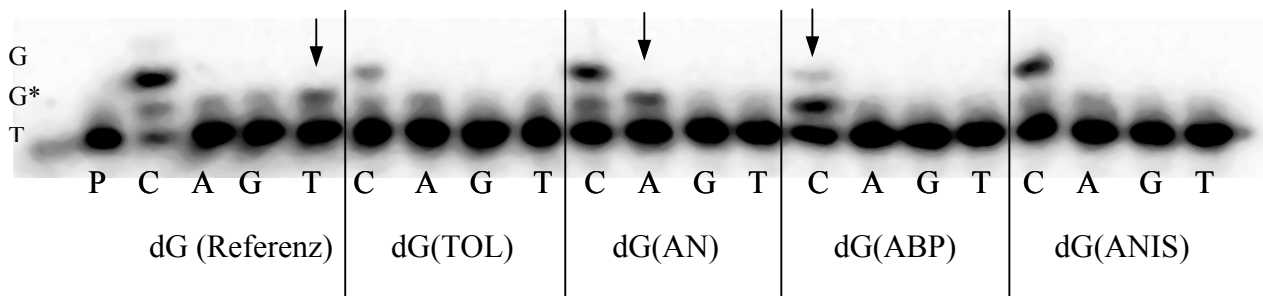
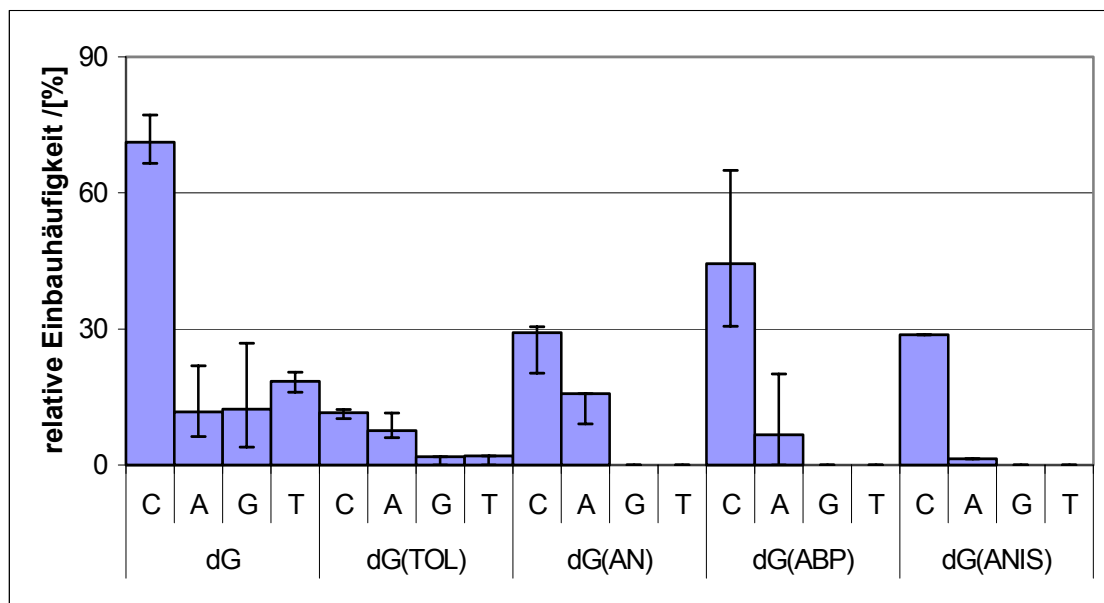
4.2.8.1.1 DNA-Polymerase I aus *E.coli* (*KF*  $exo^-$ )Abb. 92 „standing-start“-Reaktionen von *KF*  $exo^-$ Abb. 93 Relative Einbauhäufigkeit von dNTPs durch *KF*  $exo^-$  gegenüber eines C8-Arylamin-modifizierten 2'-Desoxyguanosins

Auffällig ist, dass bei den Versuchen mit der unmodifizierten Referenzverbindung außer dem kanonischen Einbau von dCTP oft auch dGTP und dTTP eingebaut wird. Beim Toluidin- oder auch beim Anisidin-Addukt wurde zusätzlich mit ungefähr der selben Häufigkeit wie bei dGTP oder dTTP ein dATP eingebaut

Die Genauigkeit der DNA-Polymerase wird durch ein Anilin- oder 4-Aminobiphenyl-Addukt im Vergleich zur Referenz erhöht. Dies lässt sich an der abnehmenden Häufigkeit eines nichtkanonischen Einbaus bei diesen beiden Addukten zeigen. Beim Anilin-Addukt geht die verbesserte Genauigkeit aber mit einer Verringerung der Effizienz einher, während beim 4-Aminobiphenyl Addukt die Effizienz im Vergleich zur Referenz unverändert bleibt.

Beim Diagramm zur relativen Einbauhäufigkeit sind die Fehler relativ groß. Dies beruht darauf, dass bei den einzelnen Versuchsdurchläufen Schwankungen in der Effektivität der DNA-Polymerasen auftraten. Dies hat zur Folge, dass in der konstant gehaltenen Reaktionszeit unterschiedlich viele dNTPs eingebaut und so die Abweichungen z.T. sehr groß wurde. Das Verhältnis des Einbaus der verschiedenen dNTPs bei gleicher Modifikation blieb dabei aber ungefähr gleich es wurde hauptsächlich dieses Verhältnis ausgewertet.

Dies gilt auch für die folgenden Gele.

4.2.8.1.2 *Pfu*-DNA-Polymerase (*exo*<sup>-</sup>)Abb. 94 „standing-start“-Reaktionen von *Pfu exo*<sup>-</sup>Abb. 95 Relative Einbauhäufigkeit von dNTPs durch *Pfu exo*<sup>-</sup> gegenüber eines C8-Arylamin-modifizierten 2'-Desoxyguanosins

Die *Pfu*-DNA-Polymerase *exo*<sup>-</sup> zeigte bei den durchgeführten Versuchen mehrere Auffälligkeiten: Zum einen fand auch hier - relativ zum kanonischen Einbau gesehen - ein vermehrter Einbau von dATP beim Vorhandensein eines Anilin-Adduktes gegenüber der Referenz statt. Viel augenscheinlicher ist aber auf dem Gel zu erkennen, dass beim 4-Aminobiphenyl-Addukt nicht wie bei allen anderen Modifikationen und der Referenz zwei Desoxycytosine eingebaut wurden, sondern hauptsächlich nur eins.

Noch viel stärker ist der Effekt beim Toluidin-Addukt. Hier findet selbst der erste kanonische Einbau kaum noch statt.

Die Häufigkeit eines nicht-kanonischen Einbaus bei einem 4-Aminobiphenyl- oder Anisidin-Addukt ist sehr viel geringer als beim Referenzversuch. Damit wird auch hier eine erhöhte Genauigkeit, ausgelöst durch diese beiden Addukte, vorgefunden, die jedoch so sehr zu

Lasten der Effektivität geht, dass beim 4-Aminobiphenyl-Addukt hauptsächlich nur noch ein dCTP in der vorgegebenen Zeit eingebaut wird (s. Abb. 94, S. 88).

4.2.8.1.3 DNA-Polymerase *Pol β*

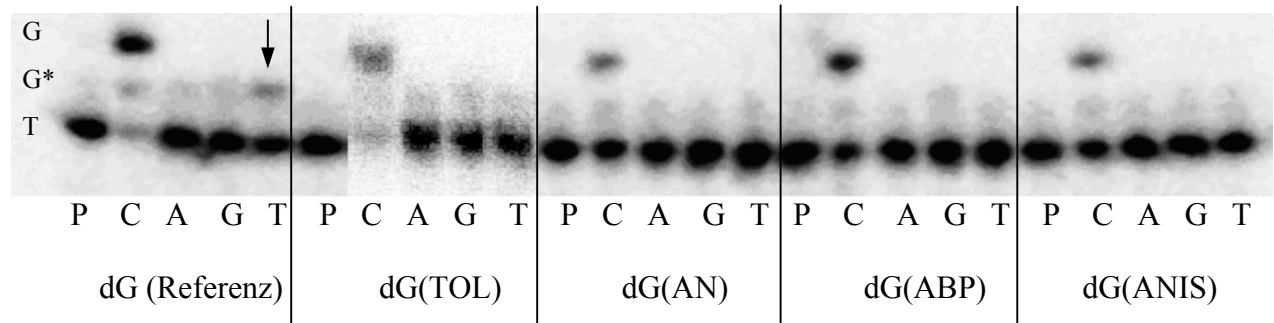


Abb. 96 „standing-start“-Reaktionen von *Pol β*

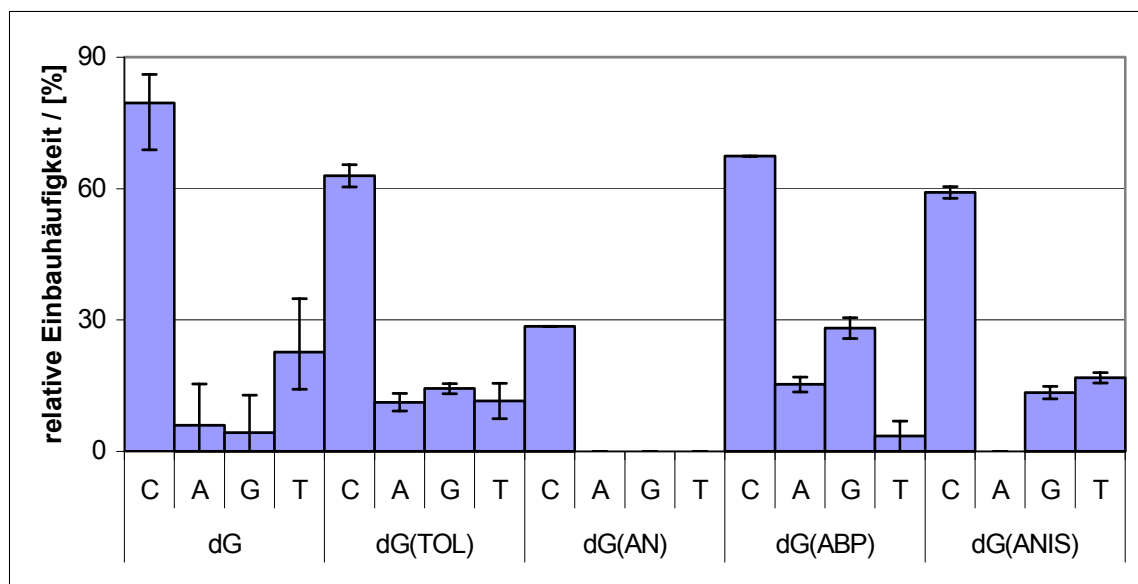


Abb. 97 Relative Einbauhäufigkeit von dNTPs durch *Pol β* gegenüber eines C8-Arylamin-modifizierten 2'-Desoxyguanosins

Beim Referenzversuch zeigte *Pol β* eine leichte Tendenz zum nicht-kanonischen Einbau eines dTTPs, während gegenüber dem 4-Aminobiphenyl-Addukt bei einem Fehleinbau eher ein dGTP eingebaut wurde. Beim Anilin-Addukt war die Wahrscheinlichkeit eines nicht-kanonischen Einbaus so gering, dass sie bei jedem Gel unter der Nachweisgrenze lag. Das heißt, auch hier wurde wieder die Genauigkeit der DNA-Polymerase erhöht und ebenfalls nahm dadurch die Effizienz der Polymerase ab.

## 4.2.8.2 „standing-start +1“-Primer-Verlängerung

Zu einer Lösung mit Reaktionspuffer, Primer und Templat wurde die DNA-Polymerase und anschließend das entsprechende dNTP zugegeben.

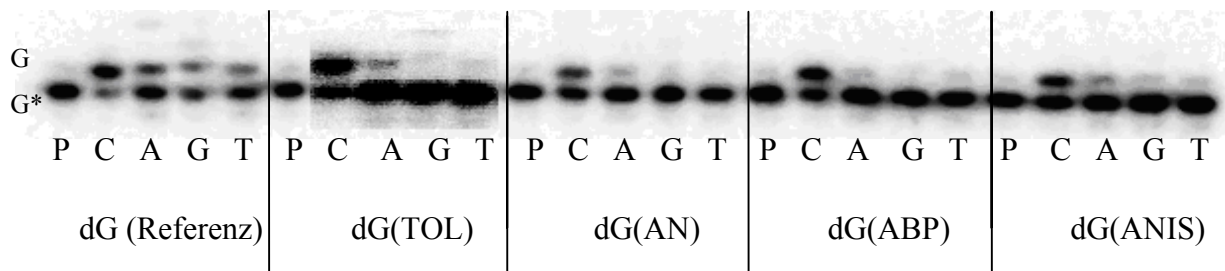
4.9.7.2.1 DNA-Polymerase I aus *E.coli* (*KF* *exo*<sup>-</sup>)

Abb. 98 „standing-start +1“-Reaktionen von *KF* *exo*<sup>-</sup>

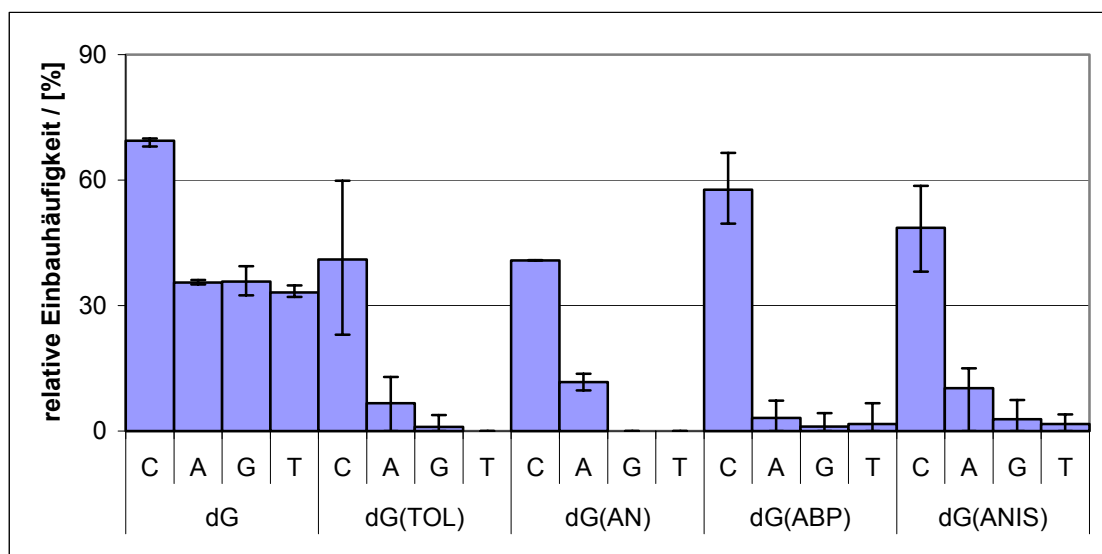


Abb. 99 Relative Einbauhäufigkeit von dNTPs durch *KF* *exo*<sup>-</sup> bei C8-Arylamino-Modifikation am vorhergehenden 2'-Desoxyguanosin

Man kann hier gut erkennen, dass durch alle Modifikationen beim Einbau des darauffolgenden Desoxynucleotids viel weniger Falscheinbauten gemacht werden als im Referenzversuch. Dabei sinkt aber auch, wie schon bei anderen Versuchen mehrfach erwähnt, die Effektivität der DNA-Polymerase

4.2.8.2.2 *Pfu*-DNA-Polymerase (*exo*<sup>-</sup>)

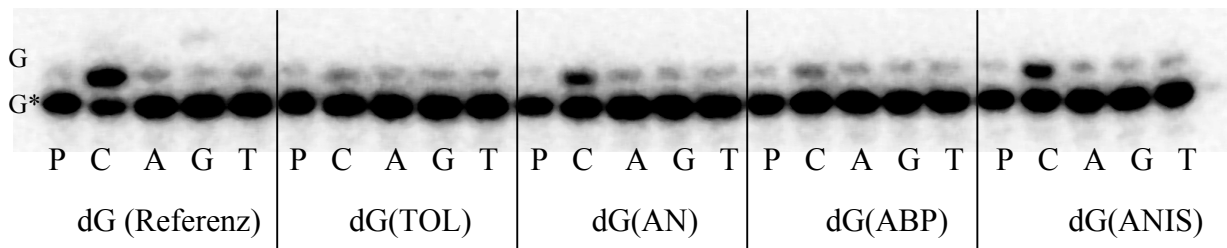


Abb. 100 „standing-start +1“-Reaktionen von *Pfu* *exo*<sup>-</sup>

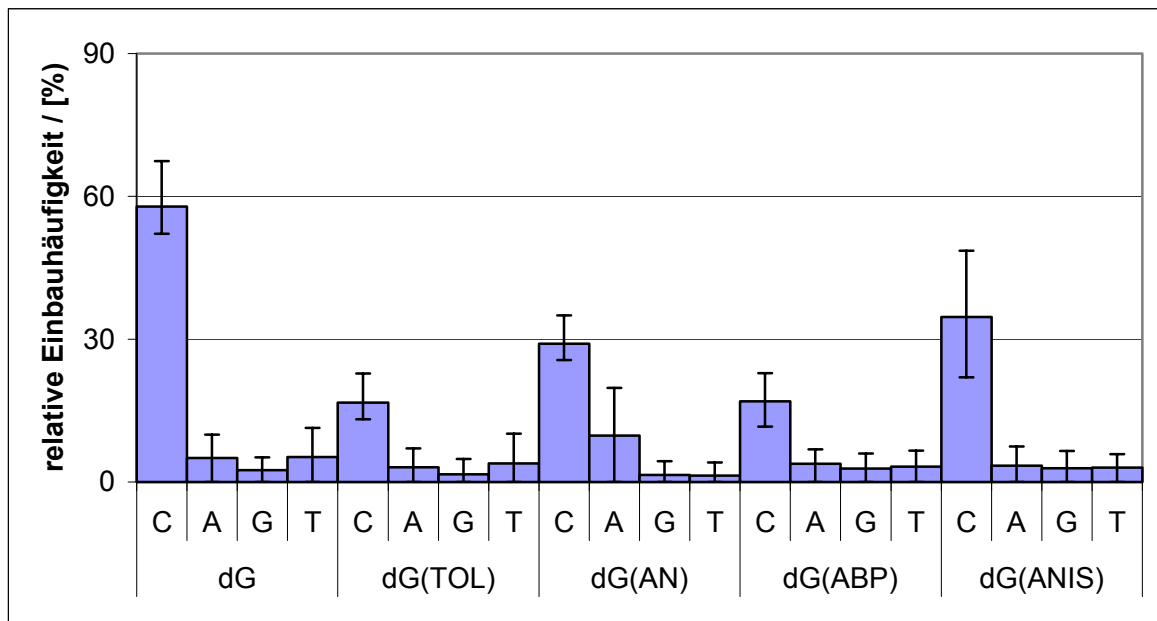
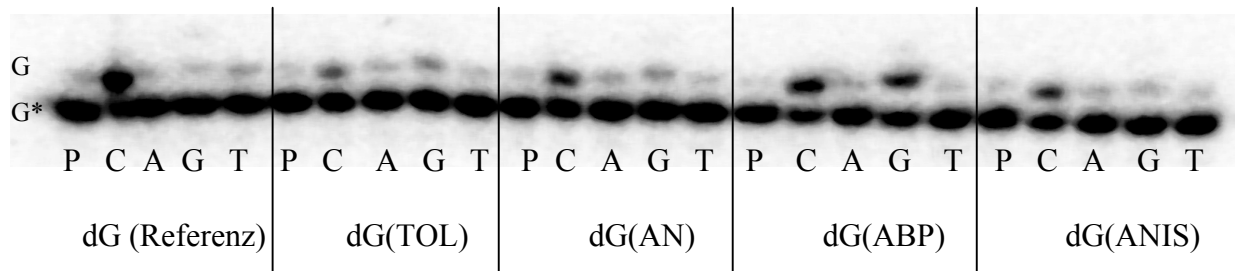
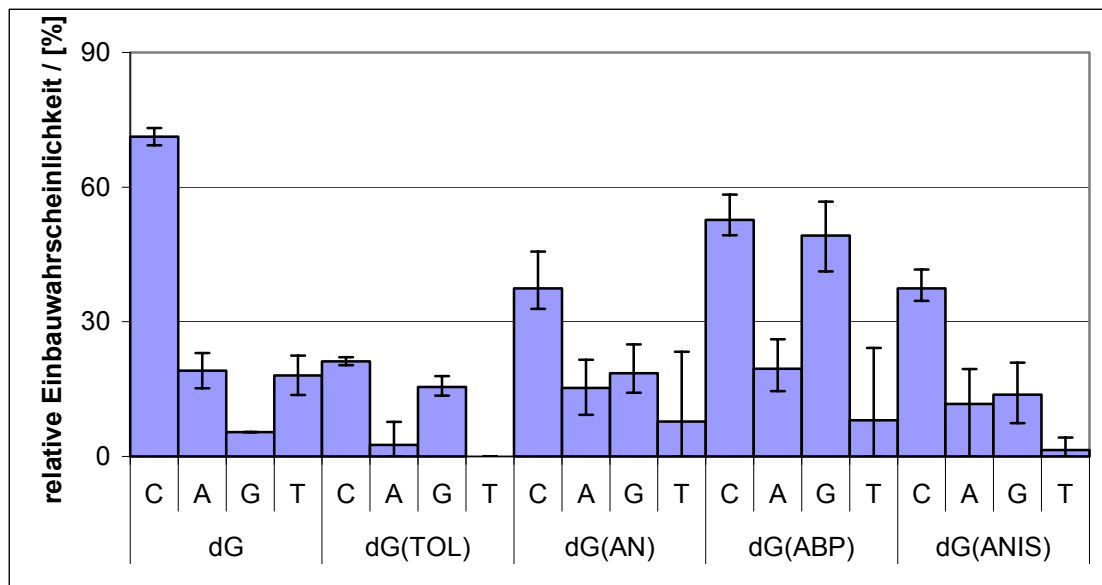


Abb. 101 Relative Einbauhäufigkeit von dNTPs durch *Pfu*-DNA-Polymerase (*exo*<sup>-</sup>) bei C8-Arylamin-Modifikation am vorhergehenden 2'-Desoxyguanosin

Die Modifikationen am vorhergehenden Desoxyguanosin haben kaum Auswirkungen auf die Einbaugenauigkeit der *Pfu* *exo*<sup>-</sup>, aber die relative Einbauhäufigkeit und damit die Effizienz nimmt sehr stark ab. Besonders deutlich wird dies beim 4-Aminobiphenyl- und Toluidin-Addukt. Hier verringerte sich die Einbauhäufigkeit für ein dCTP um mehr als die Hälfte.

4.2.8.2.3 DNA-Polymerase  $Pol \beta$ Abb. 102 „standing-start +1“-Reaktionen von  $Pol \beta$ Abb. 103 Relative Einbauhäufigkeit von dNTPs durch  $Pol \beta$  bei C8-Arylamino-Modifikation am vorhergehenden 2'-Desoxyguanosin

Besonders auffallend bei dieser Reaktion ist der Einfluss des 4-Aminobiphenylrestes auf die Einbaugenauigkeit der DNA-Polymerase  $\beta$ : Trägt das vorhergehende Desoxyguanosin einen 4-Aminobiphenylrest, so findet neben dem kanonischen Einbau eines dCTPs auch ein nicht-kanonischer Einbau eines dGTPs statt. Die Effizienz des Fehleinbaus ist dabei vergleichbar hoch zum kanonischen Einbau des dCTPs. Beim Referenzversuch dagegen fand dieser Fehleinbau des dGTPs mit einer viel geringeren Häufigkeit statt. Deshalb wurde dieser Effekt durch Kinetikmessungen noch genauer untersucht (s. Kapitel 4.2.8.3, S 93). Dieses Ergebnis ist besonders interessant, da es sich zum einen bei der DNA Polymerase  $\beta$  um eine humane DNA-Polymerase handelt und zum anderen 4-Aminobiphenyladdukte an der humanen DNA *in vivo* stark cancerogen wirken. Es wurde aber bis jetzt immer davon ausgegangen, dass nur der Nucleotideinbau direkt gegenüber durch ein 4-Aminobiphenyladdukt beeinflusst wird, nicht aber auch der Einbau des folgenden Nucleotids. Weiter kann eine Abnahme der



Einbauwahrscheinlichkeit eines dCTPs beim Toluidin- bzw. Anilin-Addukt beobachtet werden.

4.2.8.3 Kinetikmessung von „standing-start +1“-Primer-Verlängerungen durch *Pol β*

Der in Kap. 4.2.8.2.3 (S. 92) beschriebenen Fehleinbau eines dGTPs anstatt eines dCTPs bei vorhergehendem mit einem 4-Aminobiphenylrest modifizierten Desoxyguanosin wurde genauer untersucht. Dazu wurde die Abhängigkeit der relativen Einbauhäufigkeit von dCTP bzw. dGTP von der Modifikation und Konzentration beobachtet.

Zu einer Lösung mit Reaktionspuffer, Primer und Templat wurden die DNA-Polymerase und anschließend das dCTP oder dGTP in verschiedenen Konzentrationen zugegeben.

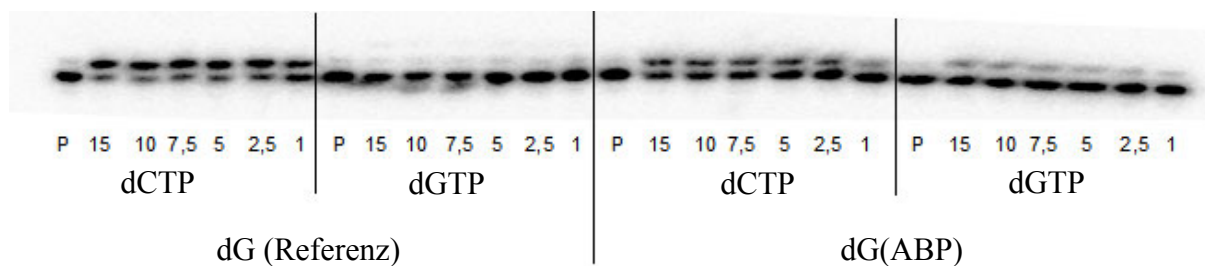


Abb. 104 Kinetikmessung von „standing-start+1“-Reaktionen mit *Pol β*. Die angegebenen Zahlen sind die Konzentrationen der eingesetzten dNTPs in  $\mu\text{M}$

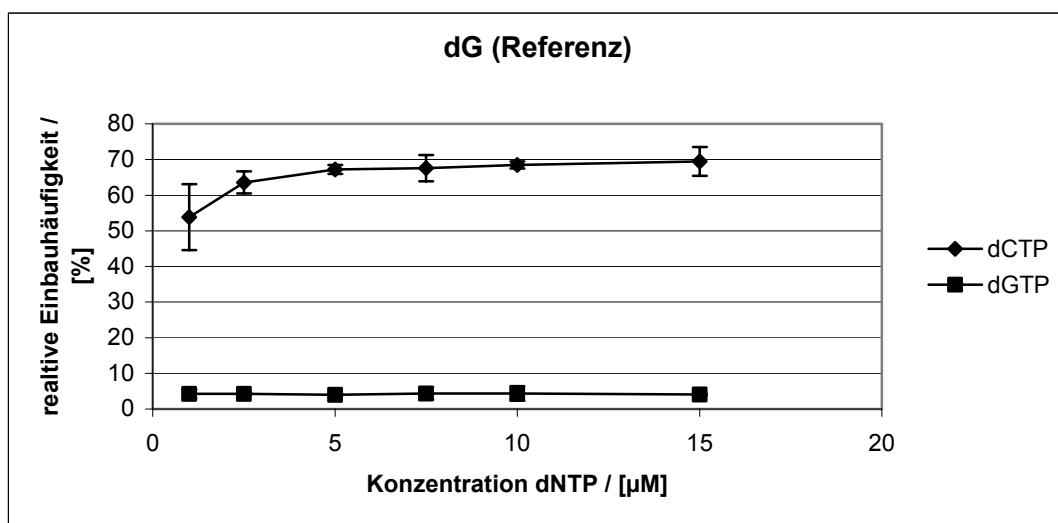


Abb. 105 Abhängigkeit der relativen Einbauhäufigkeit zur dNTP-Konzentration bei unmodifiziertem dG (Referenz)

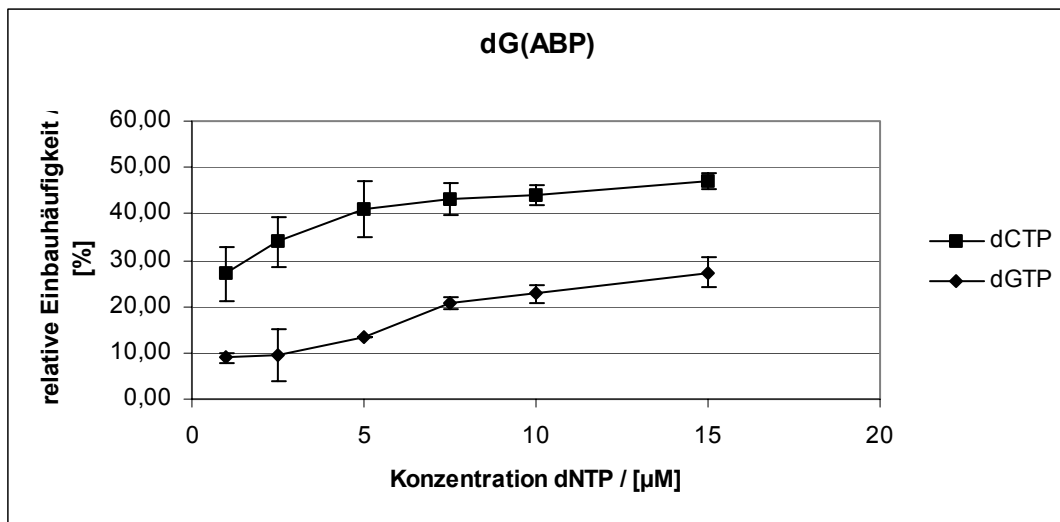


Abb. 106 Abhängigkeit der relativen Einbauhäufigkeit zur dNTP-Konzentration bei C8-4-Aminobiphenyl-modifiziertem dG

Im Referenzversuch konnte beim nicht-kanonischen Einbau eines dGTPs keine Abhängigkeit der Einbauhäufigkeit zu der dGTP-Konzentration nachgewiesen werden. Nach einem mit einem 4-Aminobiphenyl modifizierten dG steigt die Einbauwahrscheinlichkeit des nicht-kanonischen Einbaus eines dGTPs jedoch mit steigender Nucleotidkonzentration stark an. Sie erreicht zwar nicht die Werte des kanonischen Einbaus, liegt jedoch bei weitem über den Referenzwerten.

Für die Untersuchung der Cancerogenitätsunterschiede lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Auswirkungen durch das 4-Aminobiphenyl-Addukt, vor allem bei Untersuchungen mit der humanen *Pol β*, am gravierendsten sind. Die Tatsache, dass nicht die gegenüberliegende Base fehleingebaut wird, sondern erst die darauffolgende, ist ein bislang für Arylamin-Addukte unbekanntes Phänomen. Ob sich diese Beobachtung allerdings mit der Cancerogenität korrelieren lässt, lässt sich mit letzter Sicherheit erst nach der Untersuchung weiterer Addukte stark cancerogener Amine sagen. Die Effekte mit den Addukten der weniger starken Cancerogene sind jedenfalls erheblich geringer.

## 5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese Arylamin-modifizierter Oligonucleotidbausteine und deren Einbau in Oligonucleotide zur Untersuchung der physikalischen und biologischen Eigenschaften von DNA-Addukten verschiedener aromatischer Amine. In Abb. 107 sind die dargestellten Oligonucleotidbausteine und die synthetisierten Oligonucleotide zusammengefasst.

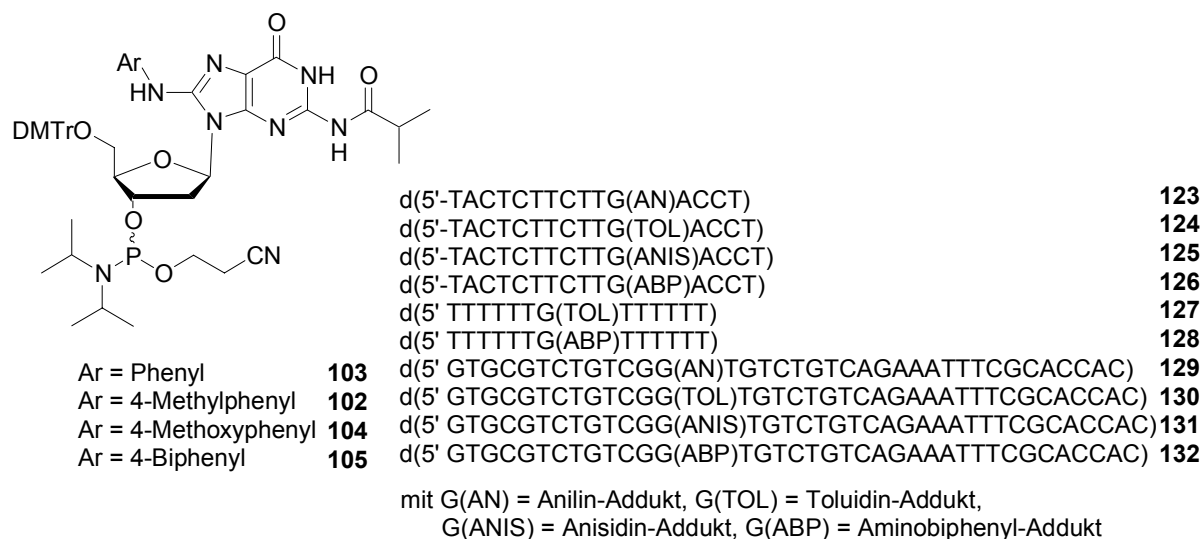


Abb. 107 Dargestellte Oligonucleotidbausteine und Oligonucleotide

Zur Darstellung der Oligonucleotidbausteine **102-105** mussten vorab die entsprechenden Arylamin-DNA-Addukte **60** und **89-91** dargestellt werden (s. Kap. 4.1.2.2, S. 35).

Zunächst wurde versucht, die *N,O*-Acyltransfer-katalysierte elektrophile Arylaminierung durch Veränderungen des Lösungsmittels zu optimieren. Dies misslang jedoch aufgrund von Aufreinigungsproblemen (s. Kap. 4.1.1, S. 28).

Der parallel dazu eingeschlagene Weg, die C-N-Bindungsknüpfung durch eine Buchwald-Hartwig-Reaktion verlief dagegen erfolgreich. Anfängliche Schwierigkeiten hinsichtlich der Wahl der Schutzgruppen und der zu schützenden Positionen konnten überwunden werden.

So wurden zunächst die Hydroxylgruppen mit Acetylgruppen geschützt, die für die Palladiumkatalyse notwendige Bromierung in 8-Position durchgeführt, und die exocyclische Aminogruppe mit einer Isobutyrylgruppe geschützt. Die Umsetzung dieser Verbindung **62** mit *p*-Toluidin unter Buchwald-Hartwig-Bedingungen verlief allerdings erfolglos. Ein Grund hierfür könnten die elektronischen Verhältnisse im Molekül sein. Daher wurde in weiteren Versuchen das Amid der Nucleobase in einen Azaenoether umgewandelt, um die Elektronendichte in der Nucleobase zu erhöhen. Dies wurde zunächst durch Einsatz einer Benzylgruppe realisiert. Zuvor wurden Silylschutzgruppen zur Schützung der

Hydroxylgruppen eingesetzt und die exocyclische Aminogruppe anschließend zweifach BOC-geschützt (s. Kap.4.1.2.2, S. 35). Das so erhaltene 2'-Desoxyguanosinderivat **67** wurde einer Buchwald-Hartwig-Reaktion mit p-Toluidin als Amin-Komponente unterzogen und lieferte das gewünschte Produkt **72**. Die beiden BOC-Schutzgruppen ließen sich jedoch nicht, wie geplant mit Trifluoressigsäure abspalten. Aus diesem Grunde wurde die zweifach Isobutyryl-geschützte Verbindung **74** dargestellt. Diese zeigte allerdings unter Buchwald-Hartwig-Bedingungen Zersetzung. Eine der Isobutyrylgruppen wurde während der Katalyse teilweise abgespalten. Deshalb wurde schließlich die einfach Isobutyryl-geschützte Verbindung **77** synthetisiert (Abb. 108). Diese stellte sich als ideales Ausgangsprodukt für die Umsetzung mit verschiedenen Arylaminen heraus (s. Abb. 109).

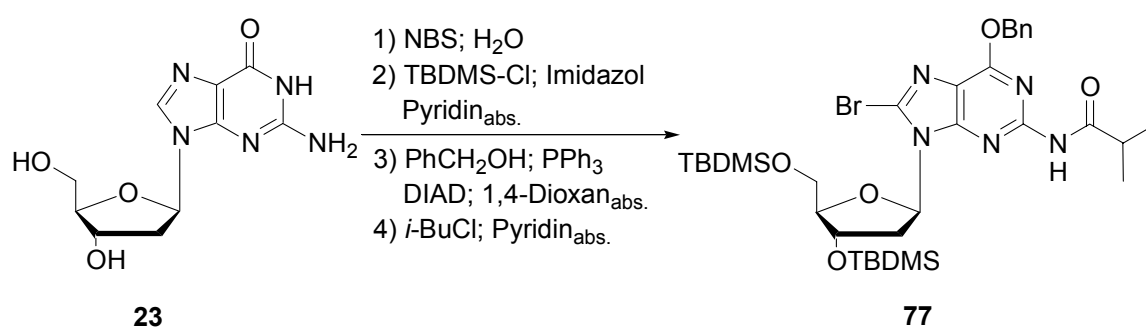


Abb. 108 Synthese des geschützten 2'-Desoxyguanosin-Derivates

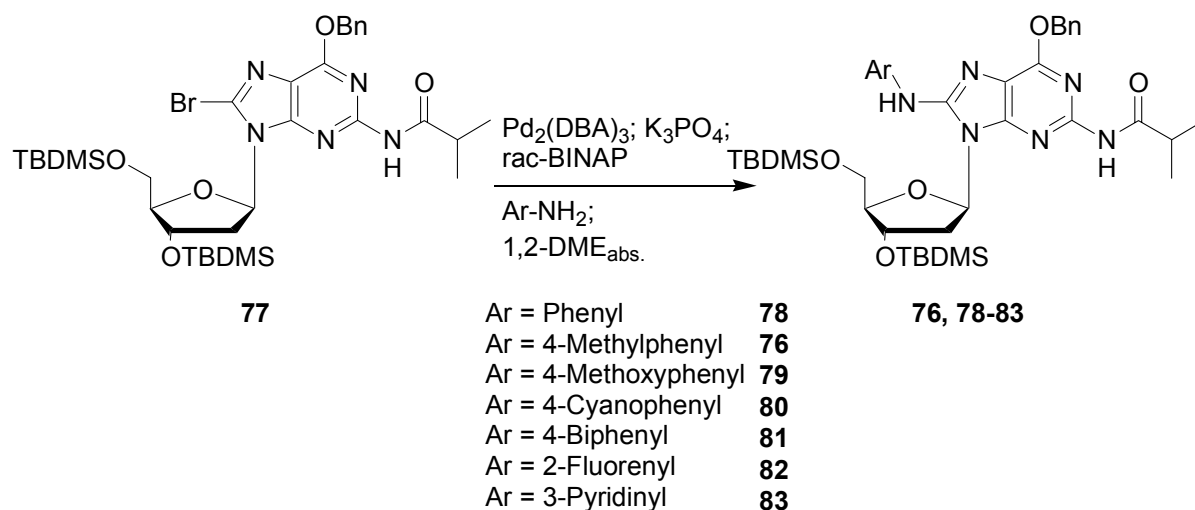


Abb. 109 Durch Buchwald-Hartwig-Reaktion dargestellte DNA-Addukte

Die DNA-Addukte konnten in guten Ausbeuten von 66-80 % erhalten werden und wurden anschließend auf zwei verschiedenen Wegen debenzilyliert und desilyliert (s. Abb. 110, S. 97).

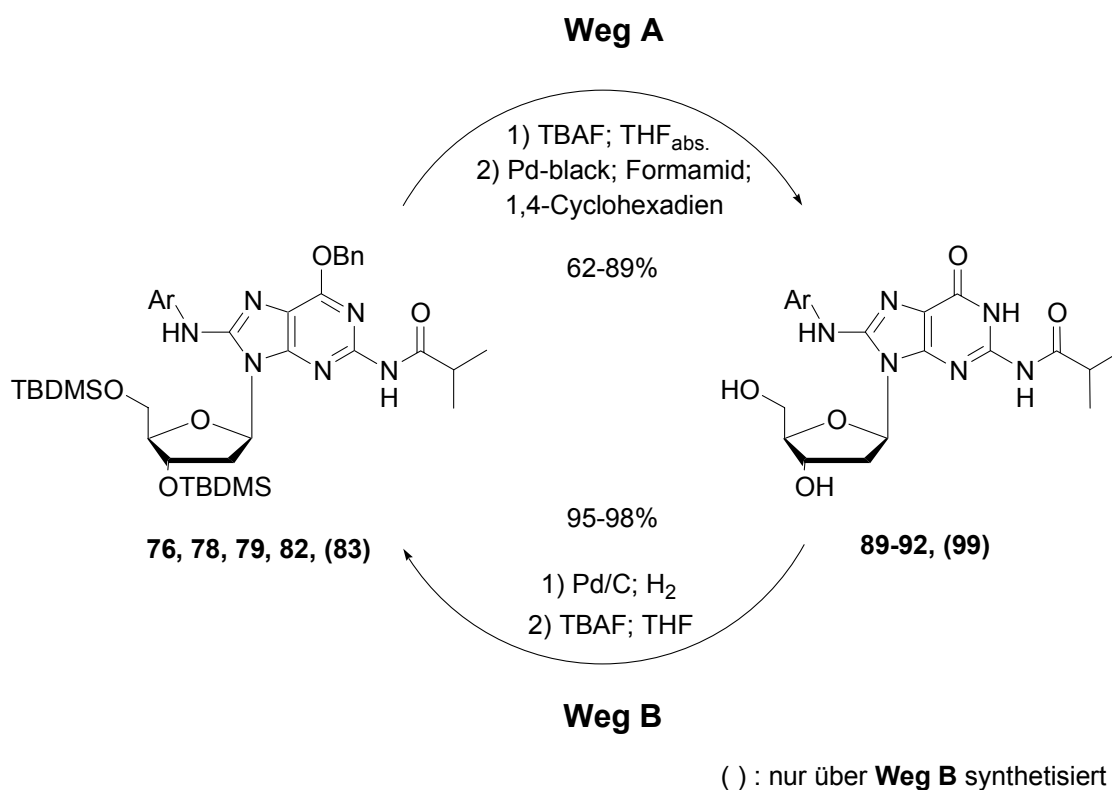


Abb. 110 Debenzylierung und Desilylierung der Addukte

Die Debenzylierung mit Palladium auf Aktivkohle und Wasserstoff und anschließende Desilylierung mit Tetrabutylammoniumfluorid (Weg B) war dabei dem Entschützungsweg A, zunächst Desilylierung mit Tetrabutylammoniumfluorid und anschließende Debenzylierung mit Palladium-black, Formamid und 1,4-Cyclohexadien weit überlegen. Die Gesamtausbeuten über beide Schritte lagen für Weg A bei 62-89 % und für Weg B bei 95-98 %. Weiterhin zeigte sich, dass für die Entschützung des 4-Cyanophenyl-Addukts **80** und des 2-Fluorenyl-Addukts **82** keiner der beiden Wege geeignet ist. Die entschützten Addukte dieser Verbindungen konnten demnach nicht isoliert werden.

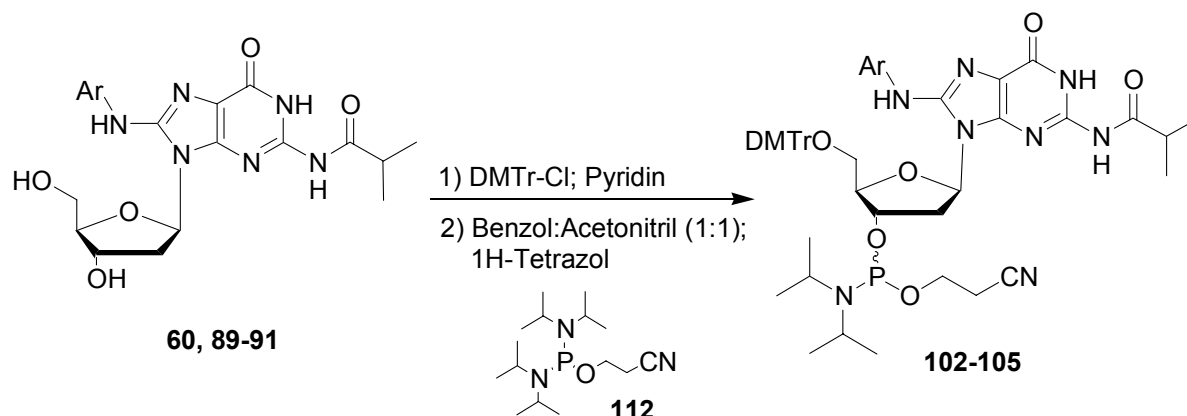


Abb. 111 Dimethoxytritylierung und Phosphitylierung der entschützten Addukte

Die OH-entschützten und debenzilylierten Verbindungen **60** und **89-91** konnten in sehr guten Ausbeuten von 95-98 % dargestellt werden und wurden durch Dimethoxytritylierung und Phosphitylierung in die entsprechenden Oligonucleotidbausteine überführt (s. Abb. 111, S. 97).

Die erhaltenen Phosphoramidite **102-105** der DNA-Addukte **60** und **89-91** standen nun für die Synthese verschiedener, modifizierter DNA-Fragmente mittels DNA-Festphasensynthese zur Verfügung.

Neben der Benzylgruppe wurde auch die 4-Cyanophenylethylgruppe (CPE) zur Erhöhung der Elektronendichte im Molekül eingesetzt. Die 4-Cyanophenylethyl-modifizierte Verbindung **114** wurde analog der benzylierten Verbindung **77** synthetisiert, mit *p*-Toluidin umgesetzt und an den Hydroxylgruppen entschützt (Abb. 112).

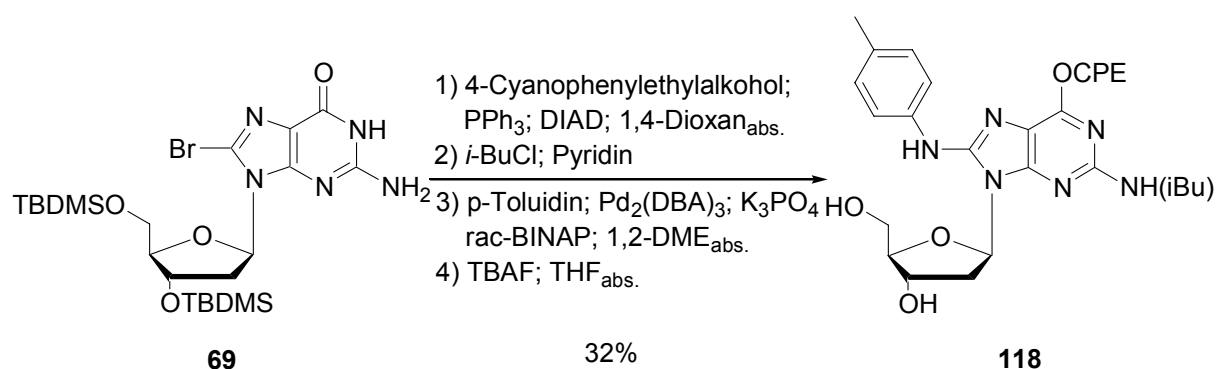


Abb. 112 Synthese der CPE-modifizierten Verbindung **118**

Das Produkt **118** konnte in einer Ausbeute von 32 % (über 6 Stufen) erhalten werden und wurde anschließend dimethoxytrityliert und phosphityliert (Abb. 113).

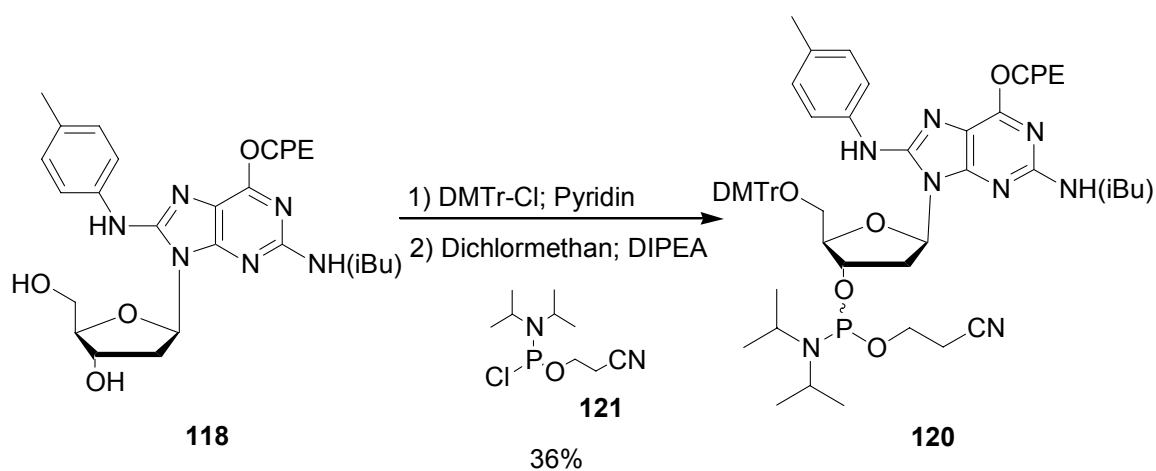


Abb. 113 Dimethoxytritylierung und Phosphitylierung des Adduktes **118**

Die Ausbeute dieser Reaktion war mit 36 % nicht zufrieden stellend. Es konnte nicht genügend Substanz für einen Einbau am DNA-Synthesizer erhalten werden.

Mit den Phosphoramiditen **102-105** wurden unter Verwendung eines leicht abgewandelten Standard-Syntheseprotokolls (s. Anhang) verschiedene, modifizierte Oligonucleotide synthetisiert (s. Kap. 4.2.2, S. 72). Hierbei handelte es sich zum einen um eine 15 Basen lange Poly-T-Sequenz mit einer Modifikation in der Position 8 (d(5'-TTTTTT(G\*)TTTTTT)) und zum anderen um eine gemischte 15mer-Sequenz aus einem Maus *c-H-ras* Protoonkogen (d(5'-TACTCTTCTT(G\*)ACCT)). Anhand von Schmelzpunktexperimenten und CD-spektroskopischen Untersuchungen dieser modifizierten Oligonucleotide mit den entsprechenden Antisense-Strängen konnte kein Einfluss der Modifikation auf das Hybridisierungsverhalten oder die Struktur der entstehenden DNA-Helix festgestellt werden. Es ließen sich also aufgrund dieser Untersuchungen keine Unterschiede für die Addukte verschieden starker Cancerogene feststellen. Zur Klärung der Auswirkungen von C8-Arylamin-Addukten auf die Wirkungsweise verschiedener DNA-Polymerasen wurden modifizierte 37mere mit der Sequenz d(5'-GTGCGTC TGTCG(G\*)TGTCTGTCAGAAA TTTCGCACCAC) synthetisiert und als Templat in Primer-Verlängerungs-Untersuchungen mit drei verschiedenen DNA-Polymerasen (*KF exo<sup>-</sup>*, *Pfu exo<sup>-</sup>*, *Pol β*) eingesetzt (s. Kap. 4.2.8, S. 84). Als Ergebnis dieser Untersuchungen lässt sich festhalten, dass das DNA-Addukt des starken Cancerogens 4-Aminobiphenyl bei Versuchen mit der humanen Polymerase *Pol β* gravierende Auswirkungen auf einen Fehleinbau nicht gegenüber des Adduktes, sondern gegenüber der darauffolgenden Nucleobase zeigt. So findet neben dem kanonischen Einbau eines dCTPs mit der selben Häufigkeit auch der nicht-kanonischer Einbau eines dGTPs statt. Diese Effekte sind für die Addukte der weniger starken Cancerogene sehr viel schwächer. Eine Erhöhung der Selektivität der Polymerasen konnte bei allen Polymerasen und Addukten festgestellt werden. Es wurde also bei allen modifizierten Oligonucleotiden, im Vergleich mit der Referenz, weniger Produkt gebildet.

## 6. Summary

Poly- and monocyclic aromatic amines belong to the class of chemical carcinogens that form covalently bonded adducts with DNA after metabolic activation. If these damages are not repaired, they can compromise the fidelity of DNA replication and cause mutations and possibly cancer. The predominant site of reaction is the C8-position of 2'-deoxyguanosine **23** (dG). To properly study the mutagenic effects, structure and repair of these adducts, it was the aim of this thesis, to develop a strategy for the site-specific incorporation of these dG-carcinogen-adducts into oligonucleotides.

Primary goal was the synthesis of the phosphoramidites **102-105** and before the synthesis of the arylamine-dG adducts **76** and **78-83**. The key step for this synthesis was the Pd-catalyzed Buchwald-Hartwig reaction, which made a former protection of the 2'-deoxyguanosine **23** necessary.

After protection of the 2'-deoxyguanosine **23** with *t*-butyldimethylsilylethers in 3'- and 5'-position, an *i*-butyramide at the exocyclic amino group and conversion of the amide function of the guanine into an azaenoether, the synthesis of the adducts via a Pd-catalyzed reaction delivered the desired products in good yields from 66 to 80 % (see chapter 4.1.2.2, p. 35; and figure 1).

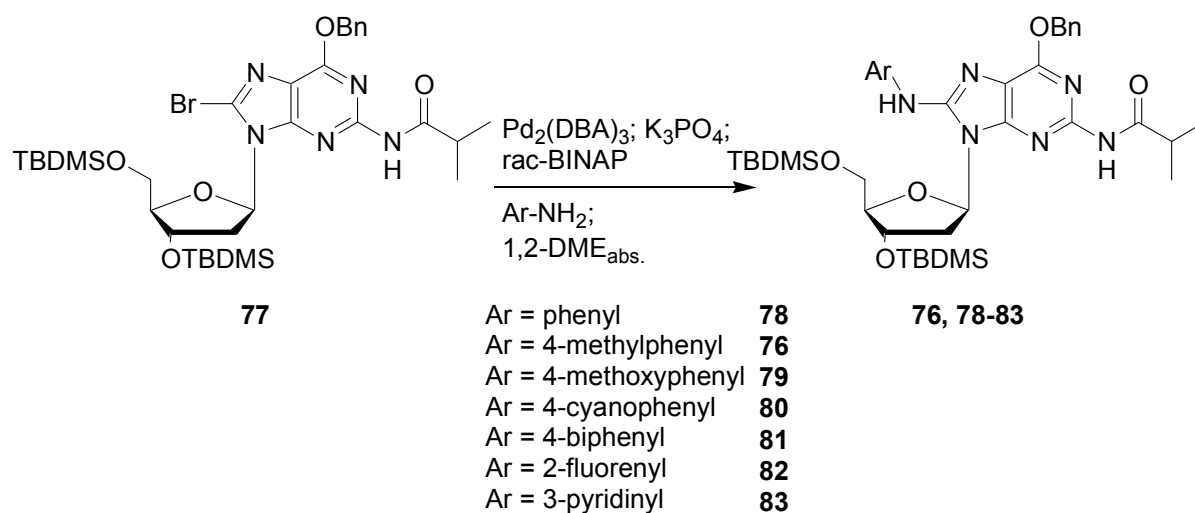


figure 1 Adducts synthesized via Buchwald-Hartwig reaction

The adducts were then desilylated and debenzylated in two different ways, with yields up to 98 % over two steps. Only the exocyclic amino group was left protected, because the *i*-butyryl group is a standard protecting group for this position during the solid phase oligonucleotide synthesis. The obtained compounds **60** and **89-91** were converted into the corresponding



oligonucleotide building blocks **102-105** by dimethoxytritylation and phosphitylation (chapter 4.1.2.2, p. 35 and figure 2).

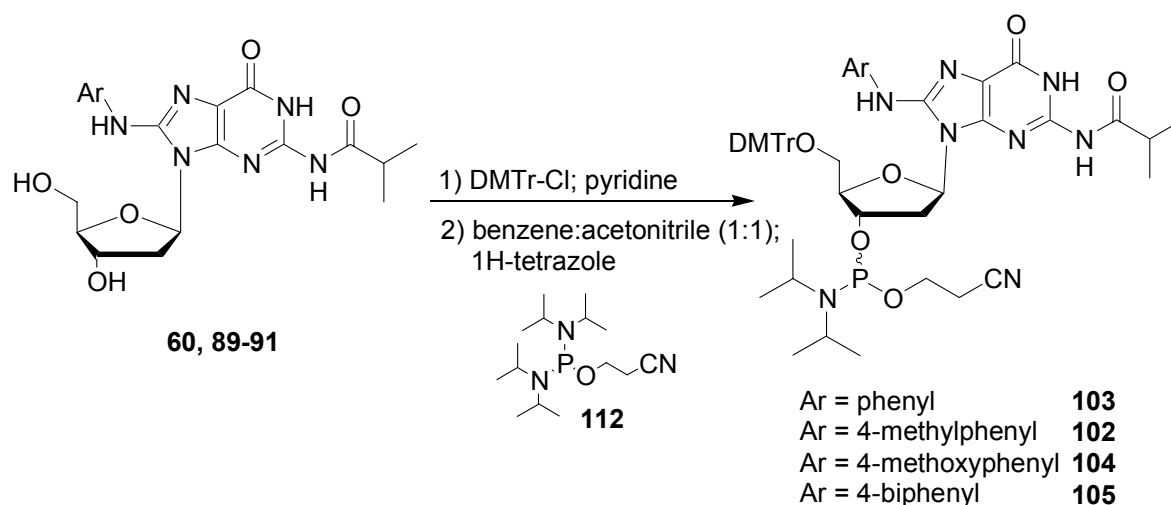


figure 2 Dimethoxytritylation and phosphitylation of the adducts **60** and **89-91**

These phosphoramidites **102-105** were incorporated into three different oligonucleotide sequences. A sequence of fourteen dT with a modification in the middle (d(5'-TTTTTTT(G\*)TTTTTTT)), and a sequence of the mouse *c-H-ras* protooncogene (d(5'-TACTCTTCTT(G\*)ACCT)) to investigate the effects of the modification on hybridisation and structure of the resulting DNA-helices. The result of these CD- and  $T_m$ -value studies was that no difference in hybridisation or structure, neither for the adducts of the borderline carcinogens aniline, p-toluidine or p-anisidine, nor for the adduct of the strong carcinogen 4-aminobiphenyl could be observed.

To study the effects of C8-arylamine adducts on the effectiveness of DNA-polymerases, oligonucleotides of the sequence d(5'-GTGCGTCTGTCG(G\*)TGTCTGTCAGAAATTCGCACCAC) were synthesized and used as templates in primer-extension experiments. Three different polymerases were used, *KF*  $exo^-$ , *Pfu*  $exo^-$  and *Pol*  $\beta$  (see chapter 4.2.8, p. 84).

The primer-extension experiments with the modified oligonucleotides revealed differences between the three polymerases and between the four modifications. The most obvious effects were observed for the 4-aminobiphenyl adducted oligonucleotide and the DNA-polymerase *Pol*  $\beta$ . A significant introduction of a wrong base (dGTP instead of dCTP) opposite the base following the modification was observed. This effect was also observed for the borderline-carcinogen adducts, but was only very small. An impact on the selectivity of the used polymerases was also found, the selectivity rises with the incorporation of a modification.

## 7. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reihe modifizierter Oligonucleotide mit Addukten unterschiedlich starker Carcinogene synthetisiert und sowohl strukturell als auch molekularbiologisch untersucht. Die dabei erhaltenen Ergebnisse geben erste Hinweise auf einen neuen Mutationsmechanismus für aromatische Amine der einen Fehleinbau nicht gegenüber des Adduktes, sondern eine Base weiter betrifft. Zur Bestätigung der molekularbiologischen Ergebnisse für das starke Carcinogen 4-Aminobiphenyl müssten aber noch weitere Oligonucleotide der Sequenz d(5'-GTGCGTCTGTCTG(G\*)TGTCTGTCAGAAATTCGCACCAC) mit C8-dG-Addukten starker Carcinogene (z.B. 2-Aminofluoren, 2-Naphthylamin oder Benzidin) synthetisiert und untersucht werden.

Hierzu könnte der Syntheseweg über das bereits verwendete *O*<sup>6</sup>-(4-Cyanophenyl)ethyl-2'-desoxyguanosinderivat **114** von Vorteil sein (s. Abb. 114).

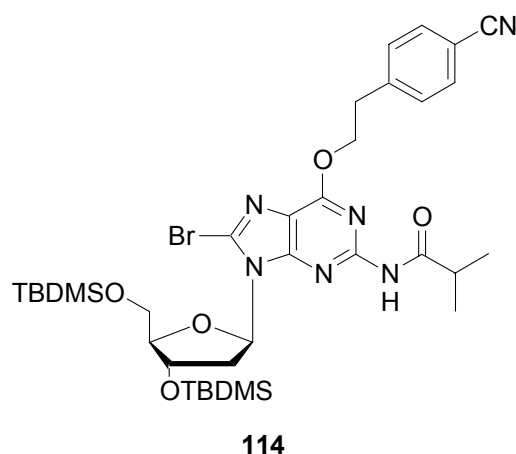


Abb. 114 *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-(4-cyanophenyl)ethyl-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **114**

Mit Hilfe von Verbindung **114** ist es eventuell möglich, auch die Phosphoramidite des 4-Cyanophenylamin-Adduktes und des 2-Aminofluoren-Adduktes darzustellen, da diese durch das Vorhandensein des Azaenolethers stabiler sein sollten als die an *O*<sup>6</sup>-Position unmodifizierten Verbindungen.

Ferner könnten weitere Untersuchungen mit Oligonucleotiden, die anderen Nucleobasen als Guanin (G) nach der Modifikation (G\*) tragen, zur Klärung des Einflusses dieser Nucleobase auf den ihr gegenüber stattfindenden Fehleinbau beitragen (

Abb. 115, S. 103).

d(3'-CACCACGCTTTAAAGACTGTCTGT(G\*)XCTGTCTGCGTC)

X = C, A, T

*Abb. 115 Oligonucleotidsequenz zur weiteren Untersuchung des Fehleinbaus*

Damit sollte es möglich sein zu klären, ob nicht nur die Modifikation, sondern auch die darauffolgende Base Auswirkungen auf den Fehleinbau, bzw. die eingebaute Nucleobase hat.

Eine weitere Möglichkeit, Informationen bezüglich des Verhaltens von C8-dG-Addukten in biologischen Systemen zu erhalten, könnte beispielsweise die Einführung von C8-dG-Addukten an der Schnittstelle der Topoisomerase 1 (top1) sein (Abb. 116).



5'-AAAAAGACTT-GGAAAAATTTTT

TTTTTCTGAA-CCTTTTAAAAA-3'

*Abb. 116 Topoisomerase 1 Schnittstelle*

Topoisomerasen sind zusammen mit Helikasen dafür verantwortlich, dass die DNS nach der Verdoppelung wieder funktionsfähig gemacht wird. Wird beispielsweise die Topoisomerase 1 blockiert, so ist eine geordnete Weitergabe genetischer Information für die betroffenen Zellen nicht mehr möglich. Topoisomerase-Hemmer wie z.B. Camptothecin werden in der Krebstherapie verwendet und können DNA-Brüche, und damit verbunden, den programmierten Zelltod (Apoptose) auslösen. Im Arbeitskreis von Prof. Dr. Yves Pommier am National Institute of Health durchgeführte Untersuchungen ergaben, dass top1-vermittelte DNA-Schäden aber auch durch endogene DNA Modifikationen (Fehlpaarungen, 8-Oxoguanin, DNA-Brüche), oder durch Addukte polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (*O*<sup>6</sup>-Methylguanin, Benz[a]pyren-Addukte) hervorgerufen werden können<sup>[116]</sup>. Der Einbau C8-Arylamin-modifizierter Addukte in die top1-Schnittstelle und die Untersuchung dieser Oligonucleotide könnte dazu beitragen, nun auch den Einfluss von aromatischen Aminen auf die Topoisomerase 1 zu klären.

## 8. Experimentalteil

### 8.1 Allgemeines

#### 8.1.1 Lösungsmittel

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

- puriss. absolut, über Molsieb,  $H_2O \leq 0.001 \%$ ; Fluka Nr. 0069.
- zur Synthese; Merck Nr. 800015.
- technische Qualität; über Natriumhydrid getrocknet und bei Normaldruck abdestilliert

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

- technische Qualität; über Calciumchlorid getrocknet und bei Normaldruck abdestilliert.
- puriss. absolut, über Molsieb,  $H_2O \leq 50$  ppm; Fluka Nr. 66749.

1,2-Dimethoxyethan (1,2-DME);  $C_4H_{10}O_2$  [90.12]; technische Qualität; Sdp.: 84-86 °C;  $d = 0.867$ ; über Natrium getrocknet und bei Normaldruck abdestilliert.

1,4-Dioxan;  $C_4H_8O_2$  [88.11]; technische Qualität; Sdp.: 101 °C;  $d = 1.030$ ; über Natrium getrocknet und bei Normaldruck abdestilliert.

Essigsäureethylester;  $C_4H_8O_2$  [88.11]; technische Qualität; Sdp.: 77 °C;  $d = 0.902$ ; über Calciumchlorid getrocknet und bei Normaldruck abdestilliert.

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

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

Petrolether (45-60); technische Qualität; Sdp.: 45-60 °C; bei Normaldruck destilliert.

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

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

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

- puriss. absolut über Molsieb,  $H_2O \leq 50$  ppm; Fluka Nr. 82704.
- technische Qualität; über Natriumhydriddispersion getrocknet und bei Normaldruck destilliert.

Benzol;  $C_6H_6$  [78.00]; technische Qualität; Sdp.: 80 °C; über Natrium getrocknet und bei Normaldruck abdestilliert.

### 8.1.2 Verwendete Puffer und Reagenzien

#### Ammoniak-gesättigte Methanollösung

In einem 1000 mL Rundkolben wurde Ammoniakgas in ca. 800 mL wasserfreies Methanol bei -15 °C für etwa 27 Minuten eingeleitet. Das Ammoniakgas wurde dabei durch zwei mit Kaliumhydroxid-Plätzchen gefüllte Gaswaschflaschen vorgetrocknet, die Kühlung der Methanollösung erfolgte durch eine Eis-Kochsalz-Kältemischung. Die fertige Ammoniak-gesättigte Methanollösung wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

#### 0.1 M Triethylammoniumacetat-Puffer (TEAA-Puffer, pH 7.0) für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Es wurden 5.88 g (5.60 ml) Eisessig und 10.12 g (13.86 ml) Triethylamin in ca. 900 ml Reinstwasser gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde mit Eisessig auf pH 7.0 eingestellt und anschließend wurde mit Reinstwasser auf 1000 ml aufgefüllt. Zuletzt wurde die Lösung durch einen Celluloseacetat-Filter (Schleicher & Schuell, 0.45 µm, Ø = 50 mm, wässrig und organisch) mit leichtem Unterdruck filtriert.

Um einen Liter einer 5 %igen ACN-Puffer-Lösung zu erhalten wurden 39.3g ACN und 946.1g 0.1 M TEAA-Puffer gemischt.

Um einen Liter einer 15 %igen ACN-Puffer-Lösung zu erhalten wurden 117.9g ACN und 850.6g 0.1 M TEAA-Puffer gemischt.

#### Phosphatpuffer (pH 6.8)

Für den Phosphat-Puffer mit 140 mM NaCl, 10.0 mM Phosphat und 1.00 mM Na<sub>2</sub>EDTA wurden 818 mg Natriumchlorid, 85.0 mg Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O), 69.0 mg Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O) und 37.0 mg Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat (Na<sub>2</sub>EDTA) in 100 ml Reinstwasser gelöst, auf pH 6.8 eingestellt und vor Verwendung autoklaviert.

Dieser Puffer wurde für die Messung der T<sub>m</sub>-Werte und der CD-Spektren eingesetzt.

#### 1x Reaktionspuffer für die molekularbiologischen Untersuchungen

<i>KF exo</i> <sup>-</sup>	50 mM Tris HCl (pH 7.3)
	10 mM MgCl <sub>2</sub>
	1 mM DTT
	0.05 % Triton X-100

<i>Pol β</i>	50 mM Tris HCl (pH 8.8) 10 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM KCl 1 mM DTT
<i>Pfu exo-</i>	20 mM Tris HCl (pH 8,8) 10 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10 mM KCl 0.1 % Triton X-100 0.1 mg/ml BSA 2 mM MgSO <sub>4</sub>
1x TBE-Laufpuffer	89 mM Tris 89 mM Borsäure 2 mM EDTA

### 8.1.3 Chromatographie

#### 8.1.3.1 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 2-4x10 cm zugeschnitten; die Laufstrecke betrug 8-9 cm. Alle R<sub>F</sub>-Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt. Die Detektion der UV-aktiven Substanzen erfolgte mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm.

#### 8.1.3.2 Zirkulare, zentrifugale Dünnschichtchromatographie (CCTLC)

Mittels eines Chromatotrons der Firma Harrison Research, Modell 7924 T, wurden Substanzgemische mit Rohausbeuten von maximal 4 g getrennt. Als Trennmaterial diente gipshaltiges Kieselgel 60 PF<sub>254</sub> (Merck Nr. 7749) in Schichtdicken von 1, 2 und 4 mm auf Glasplatten (Durchmesser: 20 cm). Die Detektion der UV-aktiven Substanzen erfolgte mit einer UV-Lampe der Firma Konrad Benda bei einer Wellenlänge von 254 nm.

### 8.1.3.3 Präparative Säulenchromatographie (Flash-Chromatographie)

Substanzgemische mit mehr als 2 g Rohausbeute wurden über eine Säule mit leichtem Überdruck aufgereinigt. Als Trennmateriale wurde Kieselgel mit einer Korngröße von 63-200  $\mu\text{m}$  (Baker Nr. 0253) verwendet.

### 8.1.3.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde an einer Merck-Hitachi-Anlage durchgeführt.

Software:	Chromatography Data Station Software HPLC System Manager Version 3.1.1.
Interface:	Model L-7000
Pumpe:	Model L-7100
Automatischer Probenwechsler:	Model L-7200
Dioden Array Detektor	Model L-7455
Säule:	XTerra (2.5 $\mu\text{m}$ , 4.6x50 mm) Umkehrphasen Ionen- Paarungssäule

#### HPLC-Methoden:

##### Analytische und semipräparative HPLC

##### Gradient A:

Acetonitril-Gradient in TEAA-Puffer von 8-15 % in 15 Minuten, dann 100 % Acetonitril für 10 Minuten, abschließend 10 Minuten isokratisch 8 % Acetonitril in TEAA-Puffer mit einer Flussrate von 1 ml/min.

##### Gradient B:

Acetonitril-Gradient in TEAA-Puffer von 8-15 % in 15 Minuten, dann 15 % für 5 Minuten, 100 % Acetonitril für 10 Minuten und abschließend 10 Minuten isokratisch 8 % Acetonitril in TEAA-Puffer mit einer Flussrate von 1 ml/min.

##### Gradient C:

Acetonitril-Gradient in TEAA-Puffer von 9-11 % in 15 Minuten, dann 100 % Acetonitril für 10 Minuten, abschließend 10 Minuten isokratisch 9 % Acetonitril in TEAA-Puffer mit einer Flussrate von 1 ml/min.

**Gradient D:**

Acetonitril-Gradient in TEAA-Puffer von 9-13 % in 15 Minuten, dann 13 % für 5 Minuten, 100 % Acetonitril für 10 Minuten und abschließend 10 Minuten isokratisch 9 % Acetonitril in TEAA-Puffer mit einer Flussrate von 1 ml/min.

**Gradient E:**

Acetonitril-Gradient in TEAA-Puffer von 9-15 % in 15 Minuten, dann 15 % für 5 Minuten, 100 % Acetonitril für 10 Minuten und abschließend 10 Minuten isokratisch 9 % Acetonitril in TEAA-Puffer mit einer Flussrate von 1 ml/min.

**Gradient F:**

Acetonitril-Gradient in TEAA-Puffer von 7.5–12.5 % in 20 Minuten, dann 100 % Acetonitril für 10 Minuten, abschließend 10 Minuten isokratisch 7.5 % Acetonitril in TEAA-Puffer mit einer Flussrate von 1 ml/min.

**Gradient G:**

Acetonitril-Gradient in TEAA-Puffer von 8–14 % in 15 Minuten, dann 100 % Acetonitril für 10 Minuten, abschließend 10 Minuten isokratisch 8 % Acetonitril in TEAA-Puffer mit einer Flussrate von 1 ml/min.

**Gradient H:**

Acetonitril-Gradient in TEAA-Puffer von 8–14 % in 20 Minuten, dann 100 % Acetonitril für 10 Minuten, abschließend 10 Minuten isokratisch 8 % Acetonitril in TEAA-Puffer mit einer Flussrate von 1 ml/min.

**Gradient I:**

Acetonitril-Gradient in TEAA-Puffer von 6–10 % in 15 Minuten, dann 100 % Acetonitril für 10 Minuten, abschließend 10 Minuten isokratisch 6 % Acetonitril in TEAA-Puffer mit einer Flussrate von 1 ml/min.

**Gradient J:**

Acetonitril-Gradient in TEAA-Puffer von 7-10 % in 15 Minuten, dann 10 % für 5 Minuten, 100 % Acetonitril für 10 Minuten und abschließend 10 Minuten isokratisch 7 % Acetonitril in TEAA-Puffer mit einer Flussrate von 1 ml/min.

**Gradient K:**

Acetonitril-Gradient in TEAA-Puffer von 8–12 % in 15 Minuten, dann 100 % Acetonitril für 10 Minuten, abschließend 10 Minuten isokratisch 8 % Acetonitril in TEAA-Puffer mit einer Flussrate von 1 ml/min.



#### 8.1.4 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden in der spektroskopischen Abteilung der Universität Hamburg aufgenommen. Es standen folgende Geräte zur Verfügung:

$^1\text{H}$ -NMR:

Bruker AC 250 (250 MHz), Bruker AMX 400 (400 MHz), Bruker DMX 500 (500 MHz),

Die Standardisierung erfolgte gegen DMSO- $d_6$  ( $\delta = 2.49$  ppm) und  $\text{C}_6\text{D}_6$  ( $\delta = 7.26$  ppm).

$^{13}\text{C}$ -NMR:

Bruker AMX 400 (101 MHz), Bruker DMX 500 (123 MHz).

Die Standardisierung erfolgte gegen DMSO- $d_6$  ( $\delta = 39.7$  ppm) und  $\text{C}_6\text{D}_6$  ( $\delta = 128.0$  ppm).

$^{31}\text{P}$ -NMR:

Bruker DMX 500 (202 MHz).

Die Standardisierung erfolgte gegen einen externen Standard (85 % Phosphorsäure).

Zur Wiedergabe der Multiplizitäten in den  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -,  $^{19}\text{F}$ - und  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren finden folgende Abkürzungen Verwendung:

s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quadruplett, quin = Quintett, sept = Septett, m = Multipllett.

#### 8.1.5 Massenspektrometrie (MS)

Die FAB-Massenspektren wurden an der Universität Hamburg mit einem doppel-fokussierenden Spektrometer VG/70-250 F der Firma VG Analytical gemessen. Als Matrix wurde *m*-Nitrobenzylalkohol verwendet.

Die MALDI-TOF-Massenspektren wurden an einem Bruker Bilflex-III-Gerät im Positiv-Modus unter Verwendung eines Stickstoff-Lasers ( $\lambda = 337$  nm) gemessen (Matrix *nor*-Haman).

Die LC-ESI-Massenspektren wurden am Rega Institute for Medical Research in Leuven, Belgien mit einem Esquire-LC-Gerät der Firma Bruker Daltonik mit vorgeschalteter HP 1100 HPLC mit einer Dionex (LC)-Säule gemessen.

## 8.2 Geräte

### 8.2.1 Gefriertrocknung

Wässrige Lösungen wurden an einer Christ/Alpha 2-4 Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert.

### 8.2.2 Thermomixer

Die Abspaltung vom Träger wurde in einem Eppendorf Thermomixer, Modell 5436, bei 55 °C durchgeführt.

### 8.2.3 Speed-Vac-Probenkonzentrator

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

### 8.2.4 Zentrifuge

Die Oligonucleotide wurden mit Hilfe einer Biofuge der Firma Heraeus, Modell Pico, zentrifugiert.

### 8.2.5 DNA-Synthesizer

Oligonucleotide wurden an einem DNA-Synthesizer der Firma Eppendorf, Modell D300+ synthetisiert. Die Synthesen wurden dabei nach der Phosphoramidit-Methode<sup>[100]</sup> durchgeführt.

### 8.2.6 UV-Spektrometer

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

### 8.2.7 CD-Spektrometer

Die CD-Spektren wurden an einem CD-Spektrometer (Modell 215) der Firma AVIS-Instruments Inc. aufgenommen.

## 8.3 Oligonucleotide

### 8.3.1 Synthese von Oligonucleotiden

Die Synthese der DNA-Oligonucleotide wurde an einem Eppendorf D300+ DNA-Synthesizer im Maßstab 1.00  $\mu\text{M}$  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.

Das Standardprotokoll der DNA-Synthese, sowie das abgeänderte Verfahren sind in Tabelle 11 aufgelistet.

	Standardprotokoll	Modifiziertes Protokoll
Detritylierung	detr02	detr02
Waschen	wash02	wash02
Kuppeln	coupop02 (A,C,G,T = cobrstla)	coupop02 (A,C,G,T = cobrstla ; Z = cofpmp)
Capping	cap02	cap02
Oxidation	oxi02	oxi02
Waschen	wash02	wash02

Tabelle 11 DNA-Syntheseprotokolle für Standard- und modifizierte Oligonucleotide

Die exakten Prozesszeiten sind im Anhang aufgeführt. Die Abkürzungen der Einzelschritte sind dem DNA-Synthesizer entnommen.

### 8.3.2 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.

Hierzu wurden die noch festphasengebundenen Oligonucleotide in der Säule mit zwei aufgesetzten Spritzen zweimal, je für 30 Minuten mit konzentriertem Ammoniak und

2-Mercaptoethanol versetzt und die erhaltenen Lösungen in Schraubcaps überführt. Diese wurden nun für mindestens 8 Stunden, oder über Nacht, im Thermoschüttler bei 55 °C geschüttelt. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben in einem Speed-Vac-Probenkonzentrator getrocknet. Das getrocknete Oligonucleotid wurde in Reinstwasser aufgenommen, über eine Pharmacia-Festphasenextraktionssäule gereinigt und erneut im Speed-Vac-Probenkonzentrator getrocknet.

### 8.3.3 Festphasenextraktion

Das Roh-Oligonucleotid wurde in 1 ml Reinstwasser aufgenommen und auf die zuvor mit Reinstwasser vorkonditionierte Pharmacia-Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Extraktion mit Reinstwasser fortgeführt und in 1 ml Portionen in Eppendorf-Caps fraktioniert. Diese Proben wurden an der analytischen HPLC untersucht. In fast allen Fällen war das Oligonucleotid in den Fraktionen 1-3. Die Säule konnte nach mehrfachem Spülen mit Reinstwasser wiederverwendet werden.

### 8.3.4 Aufreinigung der Oligonucleotide

Das getrocknete Roh-Oligonucleotid wurde in 100 µl Reinstwasser aufgenommen und in zwei Portionen über die XTerra-Säule gereinigt. Hierbei wurden manuell jeweils 0.5-1.0 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 eingengt, und bei Bedarf noch einmal getrennt. Anschließend wurde das Oligonucleotid nochmals in Reinstwasser aufgenommen und über eine Pharmacia-Festphasenextraktionssäule entsalzt (Ablauf s. 8.3.3).

### 8.3.5 Analytik der Oligonucleotide

#### 8.3.5.1 Bestimmung der Optischen Dichte (OD<sub>260</sub>)

Eine OD<sub>260</sub>-Einheit ist die Menge, die in 1.0 ml Wasser gelöst, im Spektralphotometer (1 cm Küvettenlänge) bei 260 nm einen Absorptionswert von 1.0 erzeugt. Um die OD<sub>260</sub>-Menge zu bestimmen, wurde das gereinigte Oligonucleotid in 200 µl Reinstwasser gelöst und 20 µl davon mit 980 µl Reinstwasser auf 1000 µl Gesamtlösung verdünnt. Diese Lösung wurde in einer Quanzküvette 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 den  $OD_{260}$ -Wert, der mit Hilfe der nachfolgenden Umrechnungsfaktoren in andere Maßeinheiten umgerechnet werden kann.

Die Extinktionskoeffizienten von Oligonucleotiden wurden mit folgenden Inkrementen berechnet:  $G = 11.7$ ,  $A = 15.4$ ,  $T = 8.8$  und  $C = 7.3 \text{ cm}^3/\mu\text{mol}$ . Der Extinktionskoeffizient eines Oligonucleotids ergibt sich zu:  $\epsilon_{ODN} = (a \cdot 15.4 + g \cdot 11.7 + t \cdot 8.8 + c \cdot 7.3) \text{ cm}^3/\mu\text{mol}$  mit  $a, g, t, c =$  Anzahl der entsprechenden Basen. Bei modifizierten Basen wurde der berechnete Extinktionskoeffizient der unmodifizierten Base als Näherungswert verwendet.

Die Menge an Oligonucleotid ergibt sich nach:

$$n[\text{nmol}] = \frac{A_{260} \cdot 1000}{\epsilon_{ODN} \cdot 1} \cdot 1 \text{ cm}^3 \cdot 10$$

Die molare Masse des Oligonucleotids ergibt sich näherungsweise nach:

$$M_{ODN} = a \cdot A + g \cdot G + c \cdot C + t \cdot T - 61$$

Die Masse des Oligonucleotids ergibt sich zu:  $ng = n[\text{nmol}] \cdot M_{ODN}$

Der Wert 61 muß abgezogen werden, da synthetisierte Oligonucleotide weder am 5'- noch am 3'-Ende phosphoryliert sind.

### 8.3.5.2 Bestimmung der Reinheit per analytischer HPLC

Es wurden 0.1 OD der Oligonucleotidlösung über eine Waters XTerra Umkehrphasen Ionen-Paarungssäule mit einem Triethylammoniumacetat-Puffer (TEAA) und einem Acetonitrilgradienten (je nach Oligonucleotid) mit einem Fluß von 1 ml/Min getrennt. Die Trennung erfolgt bei einer Säulentemperatur von 60 °C. Die Detektion erfolgte bei 260 nm, ein DAD-Spektrum (200-500 nm) wurde aufgenommen.

### 8.3.5.3 Bestimmung der Schmelztemperaturen ( $T_m$ -Werte)

Die  $T_m$ -Werte wurden im 1  $\mu\text{M}$ -Maßstab (1 nmol je Strang gelöst in 1 ml Puffer), in einem 10 mM Phosphat-Puffer mit 140 mM NaCl und 1 mM EDTA, pH 6.8 vermessen. Die Messungen wurden je nach Sequenz in einem Temperaturbereich von 10 °C bis 70 °C, bzw. 5 °C bis 60 °C durchgeführt. Für den ersten Fall wurde die Probe jeweils dreimal von 10 °C auf 70 °C erhitzt und dreimal von 70 °C auf 10 °C abgekühlt. Die Heiz- bzw. Kühlrate betrug hierbei 0.5 °C/min, wobei alle 0.5 °C ein Datenpunkt aufgenommen wurde. Vor der eigentlichen Messung wurde die Probelösung zweimal schnell von 10 °C auf 70 °C erhitzt

und wieder auf 10 °C abgekühlt. Die Heiz- bzw. Kühlrate hierbei lag bei 5 °C/min. 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. Der so erhaltene Mittelwert wird als  $T_m$ -Wert des Duplexes angegeben. Für die poly-T-Oligonucleotide, die wie erwartet erheblich niedrigere  $T_m$ -Werte aufweisen, wurden nur die Höchst- und Tiefsttemperatur auf 5 °C bzw. 60 °C abgeändert.

#### 8.3.5.4 Messung der CD-Spektren

Die Messungen der CD-Spektren wurden an einem CD-Spektrometer der Firma AVIS-Instruments Inc., Modell 215 vorgenommen. Sie wurden wie die Bestimmung der  $T_m$ -Werte, im 1  $\mu$ M-Maßstab (1 nmol je Strang gelöst in 1 ml Puffer), in einem 10 mM Phosphat-Puffer mit 140 mM NaCl und 1 mM EDTA, pH 6.8 durchgeführt. Allerdings wurde hier, wegen des Fehlens kleinerer Küvetten, ein Volumen von 2 ml benötigt. Die Absorption wurde in einem Bereich von 220-350 nm bei einer Temperatur von 10 °C gemessen.

#### 8.3.6 Molekularbiologische Untersuchungen

Die molekularbiologischen Untersuchungen der synthetisierten 37mer-Oligonucleotide **115-118** und **126** wurden im Fachbereich Chemie der Universität Konstanz, im Arbeitskreis von Prof. Dr. A. Marx, durch Herrn M. Wieland durchgeführt. Es wurden die DNA-Polymerasen *KF exo<sup>-</sup>*, *Pfu exo<sup>-</sup>* und *Pol  $\beta$*  verwendet.

##### 8.3.6.1 Methoden

###### 8.3.6.1.1 Phosphorylierung der Primer mit <sup>32</sup>P

Zur radioaktiven Markierung der DNA-Primer stellte man bei 0 °C folgende Lösung her

###### **Kinasierungsansatz (50 $\mu$ l):**

	<i>Volumen</i>
Wasser	39 $\mu$ l
10x Ligasepuffer	5 $\mu$ l
Primer (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ l
$\gamma$ - <sup>32</sup> P-ATP	2 $\mu$ l
T4 Polynukleotidkinase	2 $\mu$ l

Diese Lösung wurde für 90 min bei 37 °C inkubiert und dann die Reaktion durch zweiminütiges Erhitzen auf 95 °C gestoppt. Noch vorhandene Salze und das restliche <sup>32</sup>P-ATP wurden durch Gelfiltration (Sephadex G25 – Säule) entfernt. Um eine 3 µM-Lösung zu erhalten, wurden letztlich noch 20 µl Primer (10 µM) zugegeben.

### 8.3.6.1.2 „Standig-start“-Primer-Verlängerung

Um den Einbau gegenüber der dG-Addukte zu untersuchen wurde folgende Reaktion durchgeführt:

Das Templat und der 5'-<sup>32</sup>P-markierte Primer wurden im Verhältnis 2.5 : 1 im entsprechenden 1x Reaktionspuffer 2 min bei 95 °C denaturiert und anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Zugabe der DNA-Polymerase wurde das Reaktionsgemisch weitere 10 min auf Eis inkubiert, bevor man das jeweilige dNTP hinzufügte. Die Reaktion wurde dann 15 min bei 37 °C inkubiert und danach mit 40 µl STOP-Lösung abgestoppt.

#### Standing start Reaktion:

	<i>Endkonzentration</i>	<i>Reaktionsvolumen</i>
1x Reaktionspuffer		46.25 µl
Primer (3µM)	100 nM	1.67 µl
Templat (10µM)	250 nM	1.25 µl
Enzym		0.833 µl
dNTP	10 µM	10 µl

	<i>Aktivität des Enzyms im Reaktionsansatz</i>
<i>KF (exo<sup>-</sup>)</i>	1.16 U/ µl
<i>Pol β</i>	4.17 U /µl
<i>Pfu (exo<sup>-</sup>)</i>	2.08 U /µl

### 8.3.6.1.3 „Standig-start +1“-Primer-Verlängerung

Die „standig-start +1“-Primer-Verlängerungen wurden mit demselben Ansatz wie die „standig-start“-Reaktionen durchgeführt, nur verwendete man den um ein Desoxynucleotid verlängerten Primer.

#### 8.3.6.1.4 Kinetikmessung von „standing start +1“ Primer-Verlängerungen durch *Pol β*

Auch die Kinetikmessungen wurden mit dem in Kapitel 8.3.6.1.2 beschriebenen Ansatz durchgeführt, es wurden jedoch verschiedenen Konzentrationen an dNTPs benutzt. Die genauen Angaben sind in der Abbildungslegende des entsprechenden PAGE-Gels aufgeführt.

#### 8.3.6.2 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Zur Untersuchung enzymatischer Reaktionen mit Oligonucleotiden kann man diese durch Polyacrylamidgelelektrophorese auftrennen. Dabei laufen längere DNA-Stränge weniger weit als kürzere, die Auftrennung erfolgt also auf Grund der Länge der Oligonucleotide.

Es wurden immer 12 %ige Polyacrylamid-Gele mit 0.4 mm Dicke für analytische Arbeiten hergestellt, indem man 1 Volumen der Lösung B mit 4.8 Volumen der Lösung C und 4.2 Volumen der Lösung C vermischt (Zusammensetzung der Lösungen siehe unten). Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0.08 Volumen 10 % (w/w) APS und  $4 \cdot 10^{-3}$  Volumen TEMED gestartet. Diese Lösung wurde dann zwischen zwei gereinigte und silanisierte Glasplatten gegossen, die durch entsprechende Abstandshalter den gewünschten Abstand voneinander hatten. Die Geltaschen erhielt man durch Einsetzen eines Kammes.

Nach einer Polymerisationszeit von mindestens 60 min wurde das Gel in eine vertikale Gelapparatur eingesetzt, mit 1x TBE als Laufpuffer aufgefüllt und ein Vorlauf (120 W, bis eine Geltemperatur von 45 – 50 °C erreicht war) durchgeführt. Vor Auftragen der Proben wurden die Geltaschen mit Laufpuffer ausgespült, die Proben für 5 min bei 95 °C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Als Längenmarker wurden die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol verwendet.

Die Trennung erfolgte mit 120 W bei einer Geltemperatur von ca. 50 °C .

Nach der Elektrophorese wurden die Gele auf Whatmanpapier übertragen, mit Frischhaltefolie abgedeckt, in einem Gelrockner bei 80 °C getrocknet und auf einen Phosphorimagerscreen gelegt.

Gellösungen:

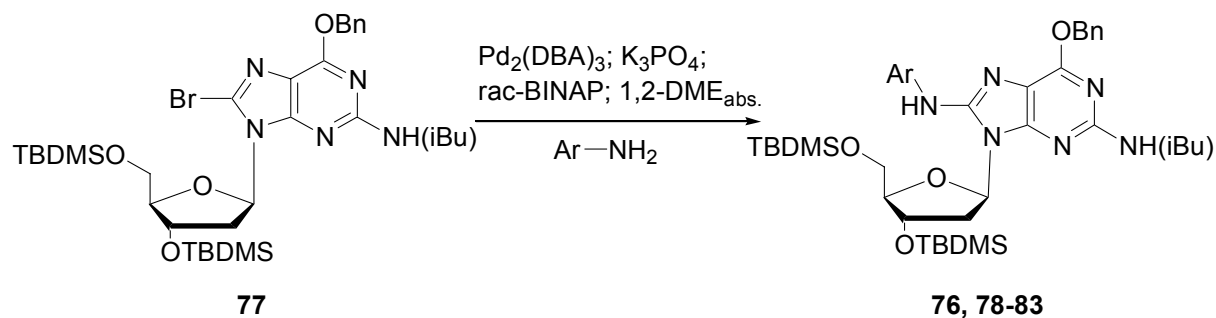
<i>Lösung B</i>	10x TBE mit 8.3 M Harnstoff
<i>Lösung C</i>	25 % Acrylamidlösung mit 8.3 M Harnstoff
	2 % <i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid
<i>Lösung D</i>	8.3 M Harnstoff



## 8.4 Darstellungen

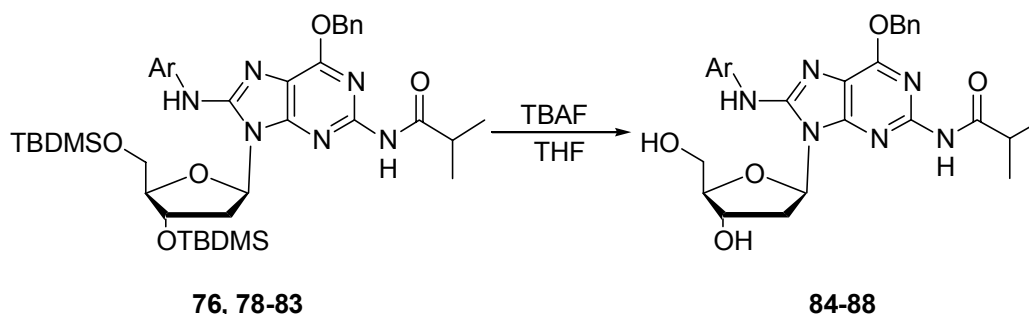
### 8.4.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

#### 8.4.1.1 Darstellung der Arylamin-Addukte durch Buchwald-Hartwig-Reaktion (AAV 1)



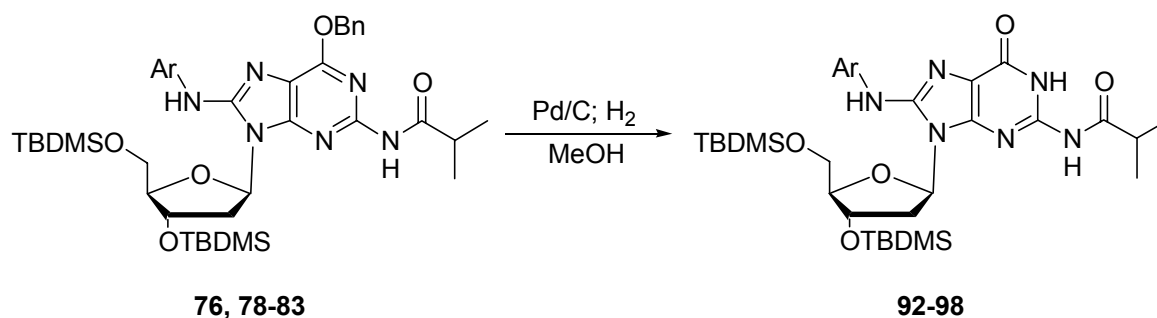
In einem ausgeheizten Kolben wurden, unter Argonatmosphäre, das Bromid: *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **77**, 1.5 Äquivalente  $\text{K}_3\text{PO}_4$ , 10 mol% Tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0) ( $\text{Pd}_2\text{dba}_3$ ), 30 mol% racemisches 2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl (BINAP) und 2 Äquivalente Amin eingewogen und in 15 ml absolutem 1,2-Dimethoxyethan (1,2-DME) gelöst. Anschließend wurde die Reaktionsmischung bei 80 °C solange gerührt, bis dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr detektiert werden konnte. Nach Abkühlen der Reaktion auf Raumtemperatur, wurde 1 ml gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung zugegeben und die Mischung kurz gerührt. Nach Zugabe von 10 ml gesättigter Natriumchloridlösung, wurden die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 10 ml Essigsäureethylester extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen anschließend zweimal mit je 10 ml gesättigter Natriumchloridlösung und einmal mit einer Mischung aus 10 ml gesättigter Natriumchloridlösung und 2 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert. Durch chromatographische Reinigung am Chromatotron mit 20 % Essigsäureethylester in Petrolether konnten die Arylamin-Addukte als Schäume erhalten werden. Diese gingen durch Gefriertrocknung in Watten über.

#### 8.4.1.2 Desilylierung der $N^2$ -*i*-Butyryl- $O^6$ -benzyl-8-*N*-arylamino-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosinderivate (AAV 2)



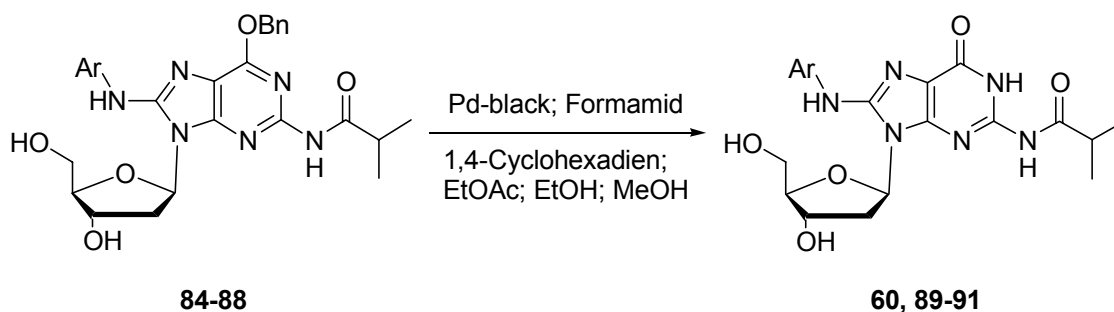
In einem ausgeheizten Kolben wurde, unter Argonatmosphäre, das  $N^2$ -*i*-Butyryl- $O^6$ -benzyl-8-*N*-arylamino-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin-Derivat in absolutem THF gelöst, mit 3 Äquivalenten einer 1.0 M Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung (TBAF) in THF versetzt und bis zur vollständigen Umsetzung des Eduktes bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ende der Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit Methanolgradient.

#### 8.4.1.3 Debenzylierung der $N^2$ -*i*-Butyryl- $O^6$ -benzyl-8-*N*-arylamino-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosinderivate (AAV 3)



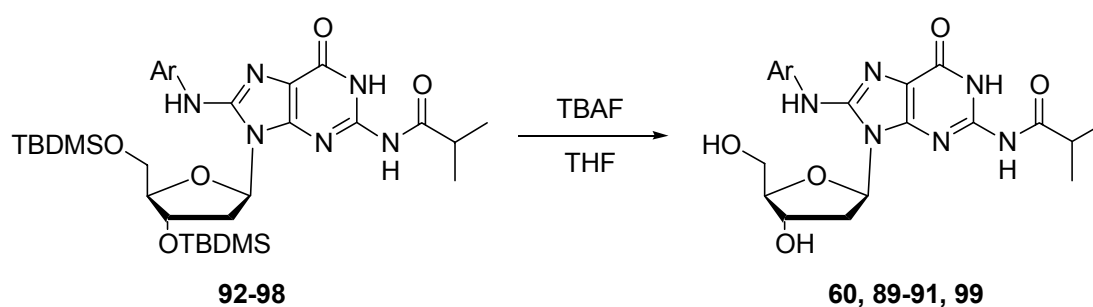
In einem ausgeheizten Kolben wurden, unter Argonatmosphäre, das  $N^2$ -*i*-Butyryl- $O^6$ -benzyl-8-*N*-arylamino-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin-Derivat und Pd/C mit absolutem Methanol versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Wasserstoffatmosphäre, bei Raumtemperatur für 45 min gerührt und anschließend über Celite filtriert. Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck lieferte in der Regel das saubere Produkt. Unsaubere Produkte wurden am Chromatotron gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit Methanolgradient.

8.4.1.4 Debenzylierung der  $N^2$ -*i*-Butyryl- $O^6$ -benzyl-8-*N*-arylamino-2'-desoxy-  
guanosinderivate (AAV 4)



Das  $N^2$ -*i*-Butyryl- $O^6$ -benzyl-8-*N*-arylamino-2'-desoxyguanosin-Derivat wurde in einer Mischung aus 1.6 ml of Formamid, 1.6 ml Ethanol, 1.0 ml Methanol, 0.4 ml Essigsäureethylester und 1.2 ml 1,4-Cyclohexadien gelöst und 25 mg Palladium-black wurden zugegeben. Nach 2 min im Ultraschallbad wurde die Reaktionsmischung, bis zur vollständigen Umsetzung, bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Katalysator durch Filtration über Celite abgetrennt und die Lösung unter vermindertem Druck bis auf ca. 1 ml eingengt. Nach Zugabe von Wasser wurde die Lösung lyophilisiert. Der entstandene Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit 20 % Methanol. Zur Entsalzung wurde das Produkt anschließend über eine Sephadex LH-20-Säule gereinigt.

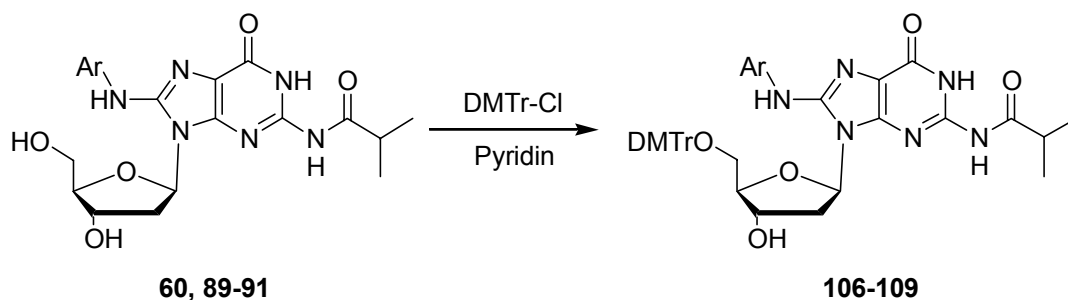
8.4.1.5 Desilylierung der  $N^2$ -*i*-Butyryl-8-*N*-arylamino-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-  
desoxyguanosinderivate (AAV 5)



In einem ausgeheizten Kolben wurde, unter Argonatmosphäre, das  $N^2$ -*i*-Butyryl- $O^6$ -benzyl-8-*N*-arylamino-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin-Derivat in absolutem Tetrahydrofuran (THF) gelöst, mit 2.5 Äquivalenten einer 1.0 M Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung (TBAF) in THF versetzt und bis zur vollständigen Umsetzung des Eduktes bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ende der Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand

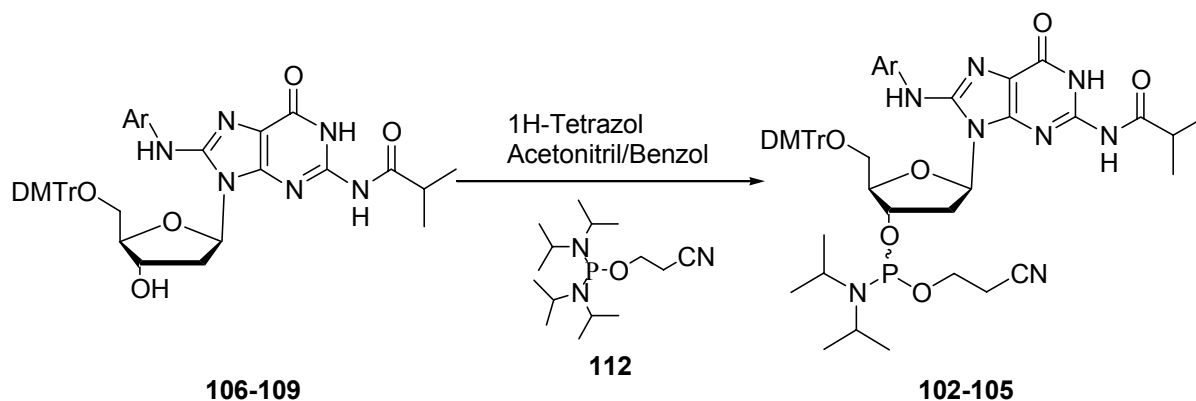
säulenchromatographisch gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit Methanolgradient. Zur Entsalzung wurde das Produkt anschließend über eine Sephadex LH-20-Säule gereinigt.

#### 8.4.1.6 Dimethoxytritylierung der $N^2$ -*i*-Butyryl-8-*N*-arylamino-2'-desoxyguanosinderivate (AAV 6)



Das  $N^2$ -*i*-Butyryl-8-*N*-arylamino-2'-desoxyguanosine-Derivat wurde zweimal mit Pyridin coevaporiert, in absolutem Pyridin gelöst, mit 2 Äquivalenten Dimethoxytritylchlorid versetzt und bis zur vollständigen Umsetzung des Eduktes bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung wurden die Phasen getrennt, und die wässrige Phase noch dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit Methanolgradient. Anschließend wurde das Produkt über eine Sephadex LH-20 Säule von Salzen getrennt.

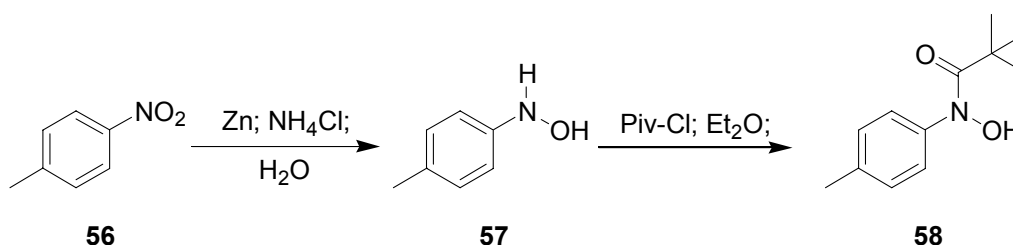
#### 8.4.1.7 Phosphitylierung der $N^2$ -*i*-Butyryl-8-*N*-arylamino-*O*5'-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosinderivate (AAV 7)



Das  $N^2$ -*i*-Butyryl-8-*N*-arylamino-2'-desoxyguanosin-Derivat wurde zweimal mit absolutem Acetonitril coevaporiert, in einer 1/1-Mischung aus absolutem Acetonitril und absolutem Benzol suspendiert und mit 0.75 Äquivalenten 1H-Tetrazol versetzt. Unter Rühren wurden

dann 1.5 Äquivalente Bis-*N,N'*-Diisopropylamino-(2-cyanoethyl)-phosphit zugetropft und die Reaktionsmischung bis zur vollständigen Umsetzung des Eduktes bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase noch dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über Aluminiumoxid gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit 0-2 % Methanol. Anschließende Gefriertrocknung mit Benzol lieferte das gewünschte Produkt als Feststoff.

#### 8.4.2 Synthese von *N*-(4-Methylphenyl)-pivaloylhydroxamsäure **58**



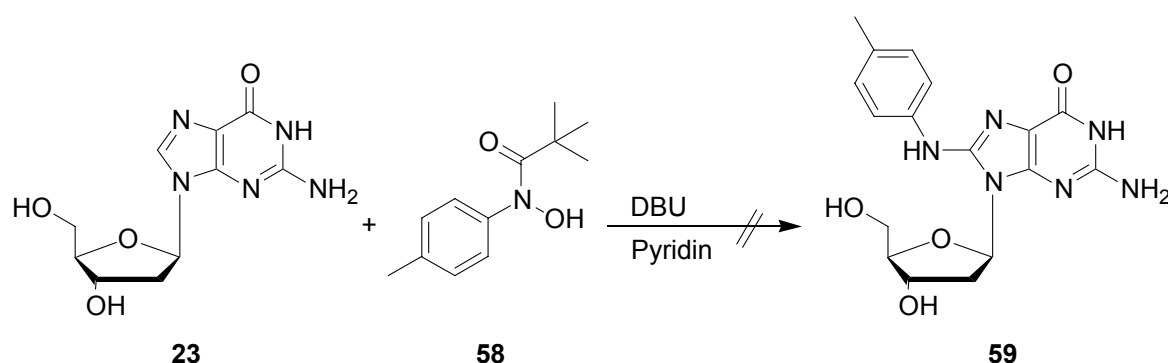
Die Verbindung **58** wurde in einer zweistufigen Synthese dargestellt. Zunächst wurden 5.35 g (0.10 mol) Ammoniumchlorid in 200 ml Reinstwasser gelöst, 13.71 g (0.10 mol) 4-Nitrotoluol **56** zugegeben und die Mischung unter Rühren auf 60 °C erwärmt. Bei 60 °C wurden, innerhalb von 20 Minuten, portionsweise 13.07 g (0.20 mol) Zinkstaub so zugegeben, dass die Reaktionstemperatur 80 °C nicht überschritt. Nach erfolgter Zugabe wurde das Gemisch noch für 15 Minuten weitergerührt. Anschließend wurde die noch heiße Lösung mit Unterdruck abfiltriert und der Rückstand (ZnO/Zn) noch mit 200 ml heißem Wasser (90 °C) gewaschen. Das Filtrat wurde mit ca. 150 g Natriumchlorid gesättigt und in einem Eis/Viehlsalzbad zur Kristallisation gebracht. Der erhaltene Feststoff wurde in Diethylether gelöst und das ungelöste Natriumchlorid wurde abfiltriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde das Produkt über Nacht über Phosphorpentoxid getrocknet. Es wurden 11.2 g (91 %) des Hydroxylamins **57** erhalten und sofort weiterverarbeitet. Dazu wurden 3.69 g (30.0 mmol) Hydroxylamin **57** und 3.78 g (45.0 mmol) Natriumhydrogencarbonat in 150 ml absolutem Diethylether gelöst und die Mischung auf -60 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur wurden nun innerhalb von 20 Minuten 3.78 ml (30.8 mmol) Pivaloylchlorid, gelöst in 20 ml Diethylether, zugetropft. Anschließend ließ man das Reaktionsgemisch durch Rühren über Nacht, auf Raumtemperatur auftauen. Die so erhaltene Lösung wurde nun viermal mit je 100 ml verdünnter Natronlauge (pH=13) ausgeschüttelt. Die vereinigten wässrigen Phasen wurde mit verdünnter Salzsäure

auf einen pH-Wert von 5.5 gebracht. Das Produkt fiel dabei als Öl aus. Dieses wurde im Anschluss mit Diethylether extrahiert und kristallisierte, nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck und erneutem Lösen in einem Petrolether / Dichlormethan-Gemisch, aus.

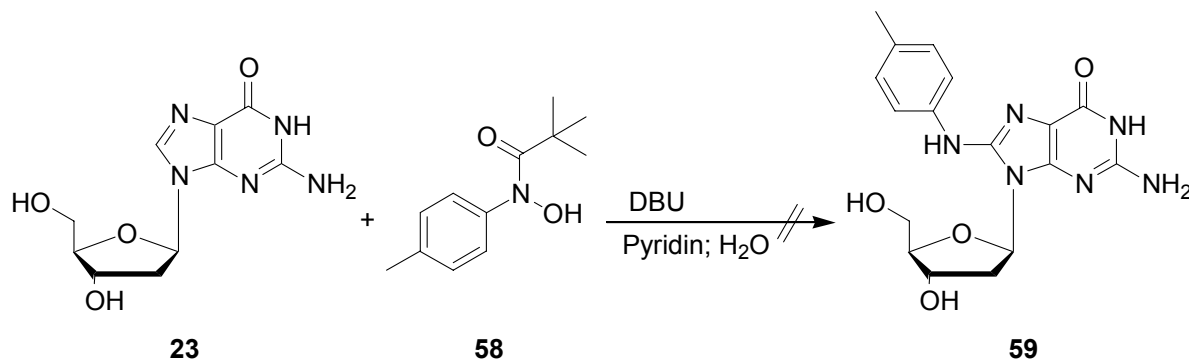
Ausbeute: 3.57 g (17.2 mmol, 86 %) eines hellgelben Feststoffs.

<sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 7.28-7.21 (m, 4H, TOL-H), 2.39 (s, 3H, TOL-CH<sub>3</sub>), 1.11 (s, 9H, Piv-CH<sub>3</sub>).

#### 8.4.3 Versuch der Synthese von 8-*N*-(4-methylphenylamino)-2'-desoxyguanosin **59**

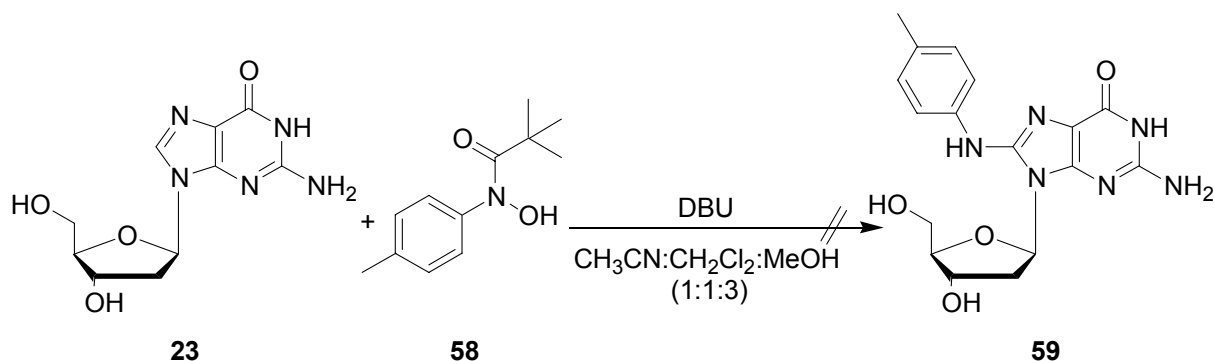


535 mg (2.00 mmol) 2'-Desoxyguanosin **23** wurden in 30 ml absolutem Pyridin suspendiert und das Reaktionsgemisch nach Zugabe von 1.26 mg (8.30 mmol) DBU und 830 mg (4.00 mmol) *N*-(4-Methylphenyl)-*N*-pivaloylhydroxamsäure **58** für 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Da auch nach dieser Zeit dünnschichtchromatographisch keine Produktentwicklung nachgewiesen werden konnte, wurde die erhaltene Reaktionsmischung mittels Größenausschlusschromatographie über eine Sephadex LH-20-Säule getrennt. Aus der Mischung konnte jedoch nur das Edukt 2'-Desoxyguanosin **23** isoliert werden.



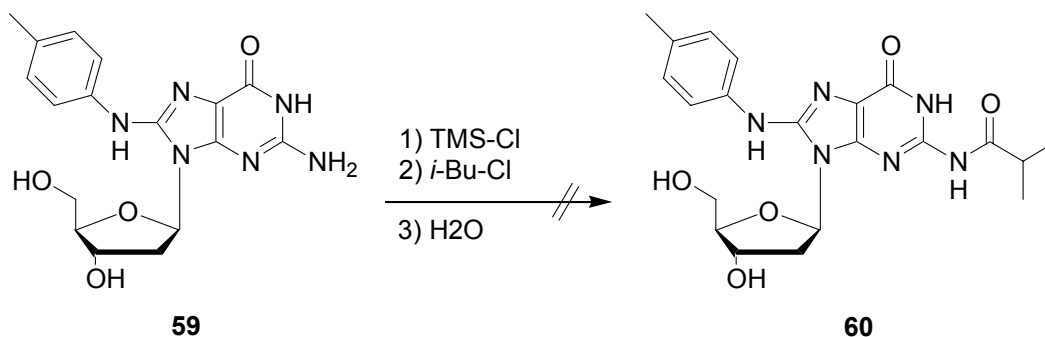
535 mg (2.00 mmol) 2'-Desoxyguanosin **23** wurden in 30 ml absolutem Pyridin suspendiert und mit genau soviel Wasser versetzt (ca. 2.5 ml), bis sich eine klare Lösung bildete. Anschließend wurden 1.26 mg (8.30 mmol) DBU und 830 mg (4.00 mmol)

*N*-(4-Methylphenyl)-*N*-pivaloylhydroxamsäure **58** zugegeben und das Reaktionsgemisch für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Trocknung und Abkondensieren des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand säulenchromatographisch zunächst über Kieselgel und, nachdem dies erfolglos blieb, über Sephadex LH-20 gereinigt. Es konnte aber kein sauberes Produkt erhalten werden.



535 mg (2.00 mmol) 2'-Desoxyguanosin **23** wurden in 30 ml eines Lösungsmittelgemisches aus Acetonitril, Dichlormethan und Methanol (1:1:3) suspendiert, mit 1.26 mg (8.30 mmol) DBU und 830 mg (4.00 mmol) *N*-(4-Methylphenyl)-*N*-pivaloylhydroxamsäure **58** versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 24 Stunden wurde ein weiteres Äquivalent *N*-(4-Methylphenyl)-*N*-pivaloylhydroxamsäure **58** zugegeben und für weitere 48 Stunden gerührt. Nach Trocknung und Abkondensieren des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand säulenchromatographisch zunächst über Kieselgel und, nachdem dies erfolglos blieb, über Sephadex LH-20 gereinigt. Es konnte aber kein sauberes Produkt erhalten werden.

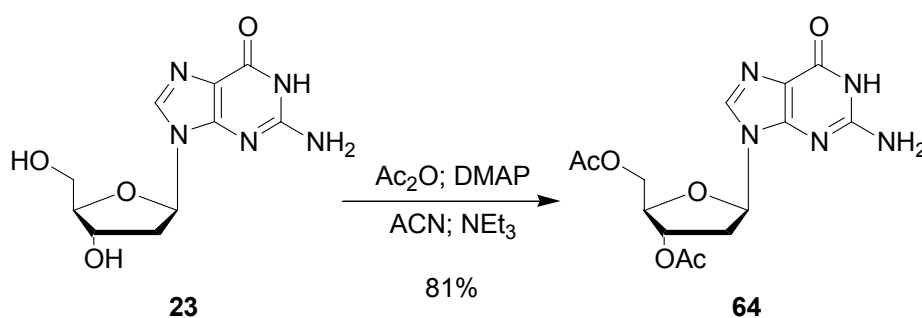
#### 8.4.4 Versuch der Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-2'-Desoxyguanosin **60**



420 mg des verunreinigten Produktes aus 8.4.3 wurden zweimal mit je 10 ml Pyridin coevaporiert, in 20 ml absolutem Pyridin gelöst und mit 755 mg (6.95 mmol; 0.9 ml) Trimethylsilylchlorid versetzt. Nach 30 minütigem Rühren bei Raumtemperatur wurden 741 mg (6.95 mmol; 0.8 ml) Isobutyrylchlorid zugegeben und die Reaktionsmischung für

3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden unter Eiskühlung 5.0 ml Reinstwasser zugegeben, das Gemisch für 5 Minuten gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 20 ml Wasser aufgenommen und dreimal mit je 20 ml Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden noch einmal mit 10 ml Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde am Chromatotron mit Dichlormethan und Methanolgradient getrennt. Das gewünschte Produkt konnte jedoch nicht isoliert werden. Aus der wässrigen Phase fiel ein farbloser Niederschlag aus, der nach Abfiltrieren und Trocknung als *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-2'-Desoxyguanosin identifiziert werden konnte.

#### 8.4.5. Synthese von 3',5'-Bisacetyl-2'-desoxyguanosin **64**



2.67 g (10.0 mmol) 2'-Desoxyguanosin **23** wurden zweimal mit je 15 ml Pyridin coevaporiert, unter Argon in 100 ml absolutem Acetonitril gelöst und mit 92.0 mg (750 μmol) 4-Dimethylaminopyridin (DMAP), 3.7 ml (2.67 mg; 26.4 mmol) Triethylamin und 2.3 ml (2.45 g; 24.0 mmol) Essigsäureanhydrid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, unter Eiskühlung mit 3 ml Methanol versetzt und nach kurzem Rühren im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand wurde in 50 ml Wasser suspendiert und nach kurzer Ultraschallbehandlung abfiltriert. Der Niederschlag wurde noch zweimal mit je 10 ml Wasser, und je einmal mit 10 ml Ethanol und 10 ml Diethylether gewaschen. Anschließend wurde das Produkt **64** im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 2.84 mg (8.07 mmol, 81 %) eines farblosen Feststoffs.

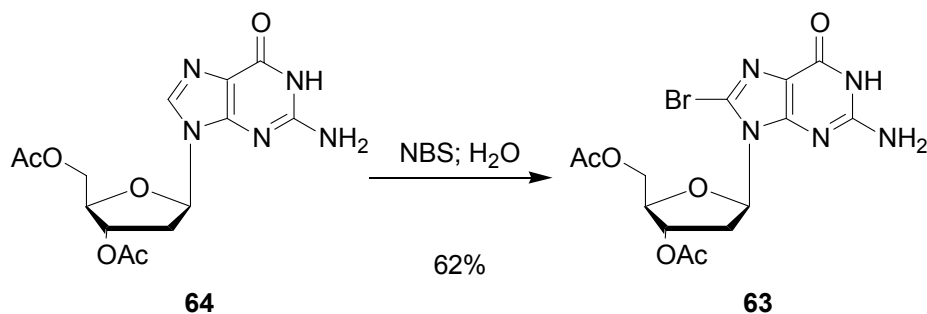
DC: R<sub>F</sub>-Wert (Dichlormethan / Methanol 7:3): 0.65

<sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 10.68 (s, 1H, NH), 7.90 (s, 1H, H8), 6.50 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.12 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.4, 5.8 Hz, 1H, H1'), 5.30-5.25 (m, 1H, H3'), 4.29-4.13 (m, 3H, H4'+H5a'+H5b'), 2.90 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 14.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.4, 6.3 Hz, 1H, H2a'), 2.44 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 14.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.9, 1.8 Hz, 1H, H2b'), 2.07 (s, 3H, Ac-CH<sub>3</sub>), 2.02 (s, 3H, Ac-CH<sub>3</sub>).



$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO- $d_6$ ): 170.5 (Ac-C(O)), 170.3 (Ac-C(O)), 157.1, 154.1, 151.4, 135.5, 117.2, 82.9 (C4'), 81.8 (C1'), 74.8 (C3'), 64.0 (C5'), 35.8 (C2'), 21.2 (Ac-CH<sub>3</sub>), 20.9 (Ac-CH<sub>3</sub>).

#### 8.4.6 Bromierung von 3',5'-Bisacetyl-2'-desoxyguanosin **64**



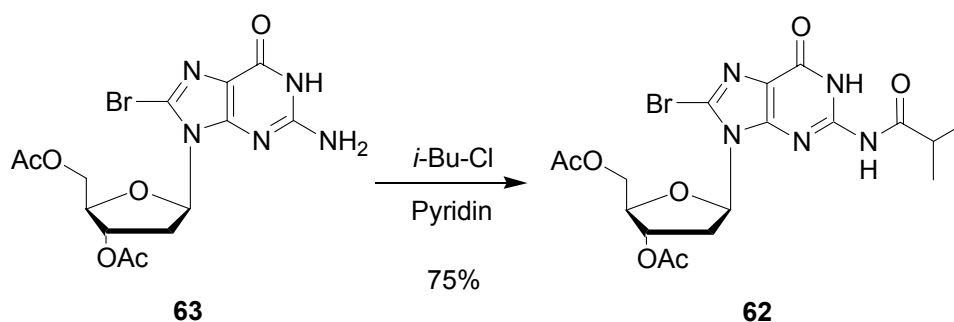
176 mg (0.50 mmol) feingepulvertes 3',5'-Bisacetyl-2'-desoxyguanosin **64** wurden in 15 ml Reinstwasser suspendiert, mit 133 mg (0.75 mmol) *N*-Bromsuccinimid versetzt und für genau 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließendes Abfiltrieren vom Lösungsmittel liefert das Produkt 8-Brom-3',5'-bisacetyl-2'-desoxyguanosin **63** in einer Ausbeute von 62 %.

Ausbeute: 134 mg (0.31 mmol, 62 %) eines orangeroten Feststoffs.

DC:  $R_f$ -Wert (Dichlormethan / Methanol 7:3): 0.82

$^1\text{H}$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 10.83 (s, 1H, NH), 6.50 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.17 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 7.0, 7.0$  Hz, 1H, H1'), 5.41 (ddd,  $^3J_{\text{HH}} = 7.0, 3.2, 3.4$  Hz, 1H, H3'), 4.41-4.15 (m, 1H, H4'), 4.21-4.14 (m, 2H, H5a'+H5b'), 3.49 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 14.2$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 7.0, 7.0$  Hz, 1H, H2a'), 2.41 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 14.2$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 7.0, 3.4$  Hz, 1H, H2b'), 2.07 (s, 3H, Ac-CH<sub>3</sub>), 1.98 (s, 3H, Ac-CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO- $d_6$ ): 170.5 (Ac-C(O)), 170.4 (Ac-C(O)), 155.8, 153.8, 152.3, 120.9, 85.5 (C4'), 82.0 (C1'), 74.8 (C3'), 63.9 (C5'), 33.9 (C2'), 21.2 (Ac-CH<sub>3</sub>), 20.9 (Ac-CH<sub>3</sub>).

8.4.7 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-brom-3',5'-bisacetyl-2'-desoxyguanosin **62**

344 mg 8-Brom-3',5'-bisacetyl-2'-desoxyguanosin **63** wurden zweimal mit je 5 ml Pyridin coevaporiert, in 10 ml absolutem Pyridin gelöst und mit 0.45 ml (4.00 mmol; 426 mg) Isobutyrylchlorid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, unter Eiskühlung mit 2 ml Reinstwasser versetzt und nach kurzem Rühren im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand wurde in 20 ml Wasser und 20 ml Dichlormethan gelöst und ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde anschließend dreimal mit je 20 ml Dichlormethan extrahiert und die organische Phase zweimal mit je 20 ml Wasser gewaschen. Im Anschluss wurde die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das so erhaltene Rohprodukt wurde am Chromatotron mit Methanolgradient in Dichlormethan gereinigt.

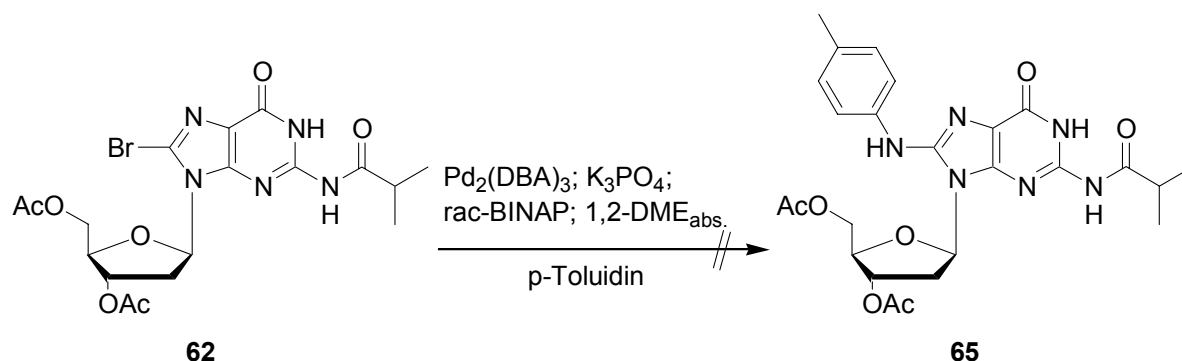
Ausbeute: 300 mg (0.60 mmol, 75 %) eines hellgelben Schaums.

DC:  $R_f$ -Wert (Dichlormethan / Methanol 9:1): 0.68

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 12.15 (s, 1H, NH), 11.38 (s, 1H, NH), 6.26 (dd, <sup>3</sup> $J_{\text{HH}} = 7.2, 7.1$  Hz, 1H, H1'), 5.41 (ddd, <sup>3</sup> $J_{\text{HH}} = 7.0, 3.1, 3.1$  Hz, 1H, H3'), 4.39-4.32 (m, 1H, H4'), 4.24-4.17 (m, 2H, H5a'+H5b'), 3.55 (ddd, <sup>2</sup> $J_{\text{HH}} = 14.5$  Hz, <sup>3</sup> $J_{\text{HH}} = 7.0, 7.2$  Hz, 1H, H2a'), 2.77 (sept, <sup>3</sup> $J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, 1H, *i*Bu-H), 2.48 (ddd, <sup>2</sup> $J_{\text{HH}} = 14.5$  Hz, <sup>3</sup> $J_{\text{HH}} = 7.1, 3.1$  Hz, 1H, H2b'), 2.09 (s, 3H, Ac-CH<sub>3</sub>), 1.98 (s, 3H, Ac-CH<sub>3</sub>), 1.13 (d, <sup>3</sup> $J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, 1H, *i*Bu-CH<sub>3</sub>), 1.13 (d, <sup>3</sup> $J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, 1H, *i*Bu-CH<sub>3</sub>).

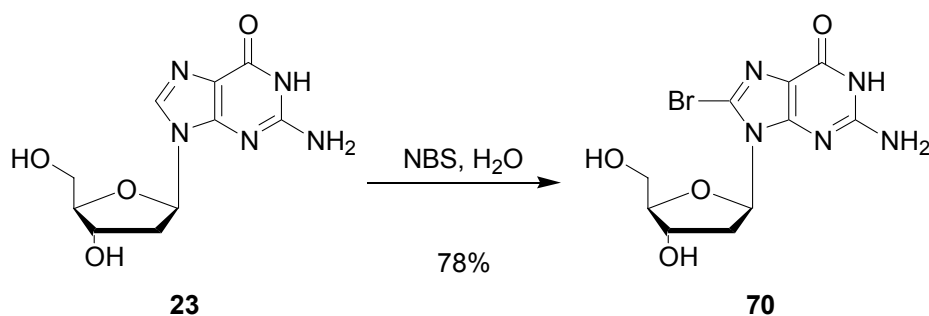
<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 180.2 (Ac-C(O)), 170.3 (Ac-C(O)), 153.7, 149.7, 148.0, 124.0, 121.2, 85.6 (C4'), 81.8 (C1'), 74.4 (C3'), 63.6 (C5'), 35.0 (*i*Bu-CH), 33.8 (C2'), 21.0 (Ac-CH<sub>3</sub>), 20.7 (Ac-CH<sub>3</sub>), 19.0 (*i*Bu-CH<sub>3</sub>), 18.9 (*i*Bu-CH<sub>3</sub>).

#### 8.4.8 Versuchte Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-3',5'-bisacetyl-2'-desoxyguanosin **65**



Die Reaktion wurde analog AAV 1 durchgeführt. Als Bromid wurden 125 mg (0.25 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-3',5'-bisacetyl-2'-desoxyguanosin **62** verwendet und es wurden 47.0 mg (76.0  $\mu\text{mol}$ ) BINAP, 23.0 mg (25.0  $\mu\text{mol}$ )  $\text{Pd}_2(\text{DBA})_3$  und 83.0 mg (0.39 mmol)  $\text{K}_3\text{PO}_4$ , sowie 53.6 mg (0.50 mmol) *p*-Toluidin verwendet. Da auch nach 48 Stunden Rühren bei 80 °C dünnschichtchromatographisch keine Produktentwicklung nachgewiesen werden konnte, wurde der Versuch abgebrochen. Auch eine Trennung des nach Aufarbeitung erhaltenen Rückstandes am Chromatotron lieferte nicht das gewünschte Produkt.

#### 8.4.9 Synthese von 8-Brom-2'-desoxyguanosin (Br-dG) **70**



571 mg (2.00 mmol) feingepulvertes 2'-Desoxyguanosin **23** wurden in 20 ml Reinstwasser suspendiert, mit 534 mg (3.00 mmol) *N*-Bromsuccinimid versetzt, kurz im Ultraschallbad suspendiert und für genau 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließendes Abfiltrieren vom Lösungsmittel mit Unterdruck liefert das Produkt 8-Brom-2'-desoxyguanosin **70** in einer Ausbeute von 78 %.

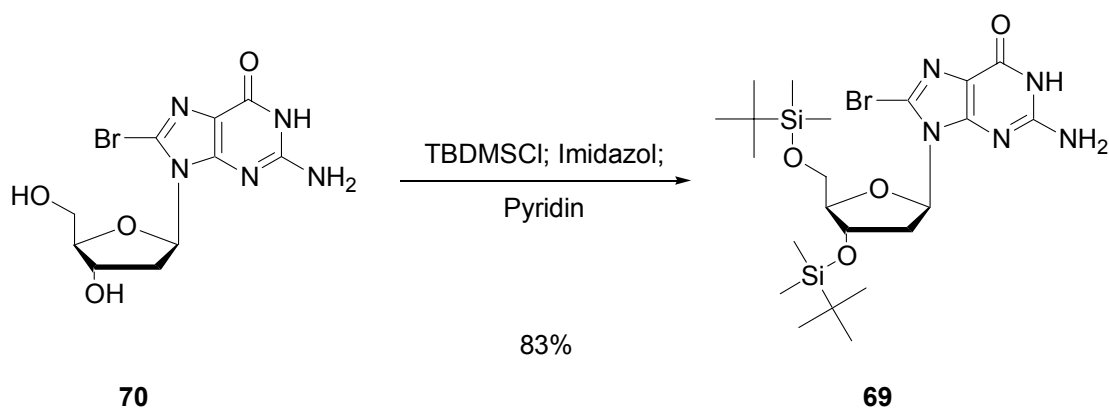
Ausbeute: 541 mg (1.56 mmol, 78 %) eines hellorangen Feststoffs.

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 10.79 (s, 1H, NH), 6.48 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.14 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7.0, 7.0 Hz, 1H), 4.38 (ddd, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 3.3, 6.7, 2.7 Hz, 1H, H3'), 3.78 (ddd, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 5.3, 6.0, 3.3 Hz, 1H, H4'), 3.61 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 11.5 Hz,

$^3J_{\text{HH}} = 5.3$  Hz, 1H, H5a'), 3.48 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 11.5$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 6.0$  Hz, 1H, H5b'), 3.15 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.4$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 7.0, 6.7$  Hz, 1H, H2a'), 2.09 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.4$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 7.0, 2.7$  Hz, 1H, H2b').

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO- $d_6$ ): 155.7, 153.5, 152.2, 120.8, 117.7, 88.1 (C4'), 85.3 (C1'), 71.2 (C3'), 62.3 (C5'), 36.7 (C2').

#### 8.4.10 Synthese von 8-Brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **69**



Unter Argonatmosphäre wurden 2.00 g (5.78 mmol) 8-Brom-2'-desoxyguanosin **70**, 3.74 g (24.8 mmol) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid und 2.60 g (38.1 mmol) Imidazol in 15 ml absolutem Pyridin suspendiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde dabei klar. Nach langsamer Zugabe von 1 ml Methanol und anschließendem fünfminütigem Rühren, wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum in eine Kühlfalle abkondensiert. Der Rückstand wurde 2 mal mit je 20 ml Toluol coevaporiert und säulenchromatographisch gereinigt. Als Eluent diente Dichlormethan mit 5 % Methanol.

Ausbeute: 2.74 g (4.77 mmol, 83 %) eines hellbeigen Feststoffs.

DC:  $R_f$ -Wert (Dichlormethan / Methanol 9:1): 0.57

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 10.81 (s, 1H, NH), 6.41 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.13 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 6.4, 6.9$  Hz, 1H, H1'), 4.57 (ddd,  $^3J_{\text{HH}} = 3.4, 6.4, 3.4$  Hz, 1H, H3'), 3.78-3.72 (m, 2H, H4'+H5a'), 3.66-3.61 (m, 1H, H5b'), 3.37 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.4$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9, 6.4$  Hz, 1H, H2a'), 2.14 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.4$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9, 3.4$  Hz, 1H, H2b'), 0.88 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.82 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.10 (s, 6H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.02 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.03 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

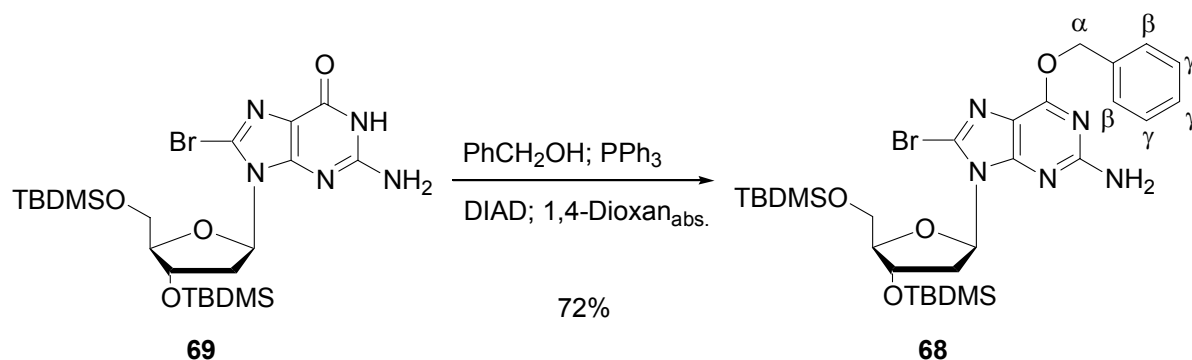
$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO- $d_6$ ): 155.6, 153.5, 152.2, 120.7, 117.6, 87.3 (C4'), 84.9 (C1'), 72.5 (C3'), 63.0 (C5'), 36.2 (C2'), 25.9 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.8

(SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.1 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.8 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.5 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -4.7 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.3 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.3 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 574.1880

gef.: 574.1852 (M+H<sup>+</sup>)

#### 8.4.11 Synthese von *O*<sup>6</sup>-Benzyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **68**



Ein Kolben mit 1.50 g (2.61 mmol) 8-Br-3',5'-TBDMS-dG **69** und 1.37 g (5.22 mmol) Triphenylphosphin (PPh<sub>3</sub>) wurde 10 min im Ölpumpenvakuum evakuiert. Dann wurden, unter Argonatmosphäre, 30 ml absolutes 1,4-Dioxan und 0.54 ml Benzylalkohol über eine Spritze zugegeben. Nach zehnminütigem Rühren, wurde die Reaktionsmischung auf 0 °C abgekühlt und 1.02 ml Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) zugetropft. Die Reaktion wurde eine Stunde unter Lichtausschluss gerührt und aufgetaut. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand am Chromatotron gereinigt. Als Eluent diente Petrolether mit 10 % Essigsäureethylester.

Ausbeute: 1.25 g (1.88 mmol, 72 %) eines farblosen Schaums.

DC: R<sub>f</sub>-Wert (Petrolether / Essigsäureethylester 4:1): 0.44

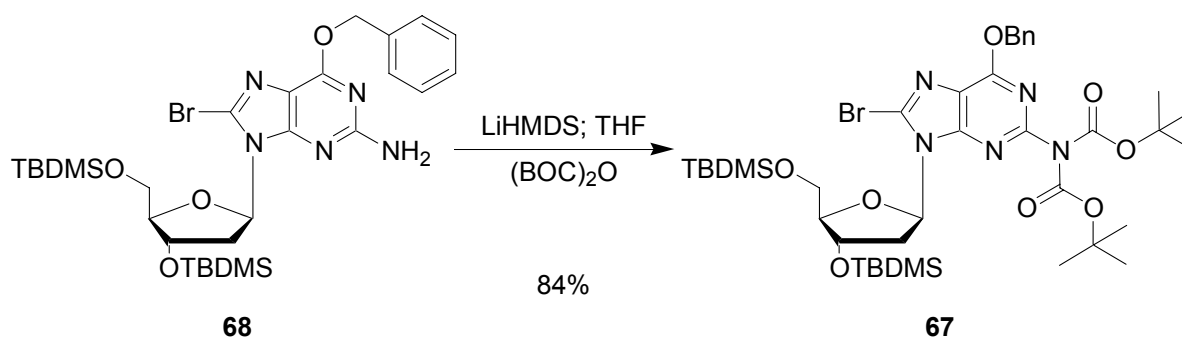
<sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 7.48-7.31 (m, 5H, β-H+γ-H), 6.43 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.17 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.9, 6.9 Hz, 1H, H1'), 5.49 (d, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 12.2 Hz, 1H, α-Ha), 5.45 (d, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 12.2 Hz, 1H, α-Hb), 4.66 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.8, 6.4, 3.8 Hz, 1H, H3'), 3.79-3.73 (m, 2H, H4'+H5a'), 3.64-3.59 (m, 1H, H5b'), 3.51 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.9, 6.4 Hz, 1H, H2a'), 2.18 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.9, 3.8 Hz, 1H, H2b'), 0.89 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.78 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.12 (s, 6H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.05 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.07 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO- $d_6$ ): 159.4, 159.1, 154.8, 136.5, 128.5, 128.5, 128.2, 124.9, 114.6, 87.2 (C4'), 85.1 (C1'), 72.4 (C3'), 67.1 ( $\alpha$ -C), 62.8 (C5'), 35.9 (C2'), 25.8 (SiC(CH $_3$ ) $_3$ ), 25.8 (SiC(CH $_3$ ) $_3$ ), 18.0 (SiC(CH $_3$ ) $_3$ ), 17.8 (SiC(CH $_3$ ) $_3$ ), -4.6 (Si(CH $_3$ ) $_2$ ), -4.7 (Si(CH $_3$ ) $_2$ ), -5.3 (Si(CH $_3$ ) $_2$ ), -5.4 (Si(CH $_3$ ) $_2$ ).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 664.2350

gef.: 664.2355 (M+H $^+$ )

#### 8.4.12 Synthese von $N^2$ -Bis(*t*-butyloxycarbonyl)- $O^6$ -benzyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **67**



345 mg (0.52 mmol)  $O^6$ -Benzyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **68** wurden in 1 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst und mit 2.08 ml (2.08 mmol) 1M Lithiumhexamethyldisilazid-Lösung (LiHMDS) in Tetrahydrofuran versetzt. Nach 15 minütigem Rühren wurden 453 mg (2.08 mmol) Di-*tert*-Butyldicarbonat zugegeben und das Gemisch für 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in 25 ml 0.1N Salzsäure und 10 ml Essigsäureethylester gelöst. Nach Trennung der Phasen wurde die wässrige Phase mit 2.5 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert und anschließend zweimal mit je 10 ml Essigsäureethylester extrahiert. Nach Trocknung der organischen Phase über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand am Chromatotron gereinigt. Als Eluent diente Petrolether mit 10 % Essigsäureethylester.

Ausbeute: 379 mg (0.44 mmol, 84 %) eines farblosen Schaums.

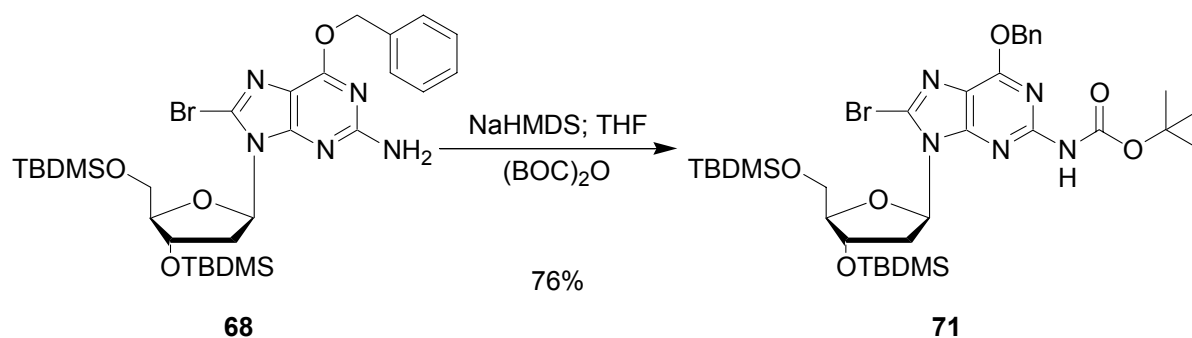
DC:  $R_f$ -Wert (Petrolether / Essigsäureethylester 4:1): 0.46

$^1\text{H}$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 7.48-7.32 (m, 5H,  $\beta$ -H+ $\gamma$ -H), 6.30 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 7.4, 4.9$  Hz, 1H, H1'), 5.59 (d,  $^2J_{\text{HH}} = 12.7$  Hz, 1H,  $\alpha$ -Ha), 5.56 (d,

$^2J_{\text{HH}} = 12.7$  Hz, 1H,  $\alpha$ -Hb), 4.74 (ddd,  $^3J_{\text{HH}} = 5.6, 5.5, 5.5$  Hz, 1H, H3'), 3.85-3.79 (m, 2H, H4'), 3.74 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 11.1$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 5.1$  Hz, 1H, H5a'), 3.52 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 11.1$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 6.1$  Hz, 1H, H5b'), 3.36-3.29 (m, 1H, H2a'), 2.37 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.2$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 7.4, 5.6$  Hz, 1H, H2b'), 1.36 (s, 9H, BOC-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.88 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.76 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.09 (s, 6H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.09 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.14 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 159.4, 153.0, 150.8, 150.4, 136.1, 132.5, 128.8, 128.7, 128.6, 87.5 (C4'), 86.3 (C1'), 83.1 (BOC-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 72.4 (C3'), 68.6 ( $\alpha$ -C), 63.5 (C5'), 36.9 (C2'), 27.8 (BOC-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 26.0 (BOC-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.3 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.0 (Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.4 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -4.6 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.2 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.3 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

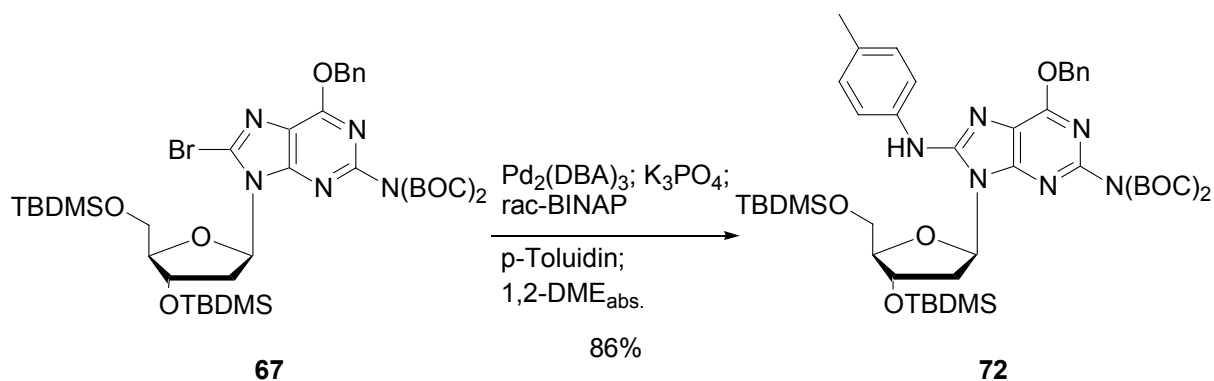
#### 8.4.13 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*t*-Butyloxycarbonyl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **71**



544 mg (0.82 mmol) *O*<sup>6</sup>-Benzyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **68** wurden in 1 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst und mit 2.46 ml (2.46 mmol) 1M Lithiumhexamethyldisilazid-Lösung (LiHMDS) in Tetrahydrofuran versetzt. Nach 15 minütigem Rühren wurden 537 mg (2.46 mmol) Di-*tert*-Butyldicarbonat zugegeben und das Gemisch bei Raumtemperatur für 2.5 Stunden gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in 25 ml 0.1N Salzsäure und 10 ml Essigsäureethylester gelöst. Nach Trennung der Phasen wurde die wässrige Phase mit 2.5 ml Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert und anschließend zweimal mit je 10 ml Essigsäureethylester extrahiert. Nach Trocknung der organischen Phase über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand am Chromatotron gereinigt. Als Eluent diente Petrolether mit 10 % Essigsäureethylester.

Ausbeute: 474 mg (0.88 mmol, 76 %) eines farblosen Schaums.  
 DC: R<sub>f</sub>-Wert (Dichlormethan / Methanol 19:1): 0.51  
<sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 11.07 (s, 1H, NH), 7.48-7.31 (m, 5H, β-H+γ-H), 6.16 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.2, 6.2 Hz, 1H, H1'), 5.49 (d, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 12.2 Hz, 1H, α-Ha), 5.45 (d, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 12.2 Hz, 1H, α-Hb), 4.66 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.8, 6.4, 3.8 Hz, 1H, H3'), 3.79-3.73 (m, 2H, H4'+H5a'), 3.64-3.59 (m, 1H, H5b'), 3.51 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.2, 6.4 Hz, 1H, H2a'), 2.18 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.2, 3.8 Hz, 1H, H2b'), 1.48 (s, 9H, BOC-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.88 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.85 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.10 (s, 6H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.02 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.02 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

8.4.14 Synthese von *N*<sup>2</sup>-Bis(*t*-butyloxycarbonyl)-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **72**



Die Synthese wurde analog AVV 1 mit 350 mg (0.40 mmol) *N*<sup>2</sup>-Bis(*t*-butyloxycarbonyl)-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **67** als Ausgangssubstanz durchgeführt. Reaktionszeit: 20 h. Die Aufreinigung erfolgte am Chromatotron mit 0-12 % Essigsäureethylester in Petrolether.

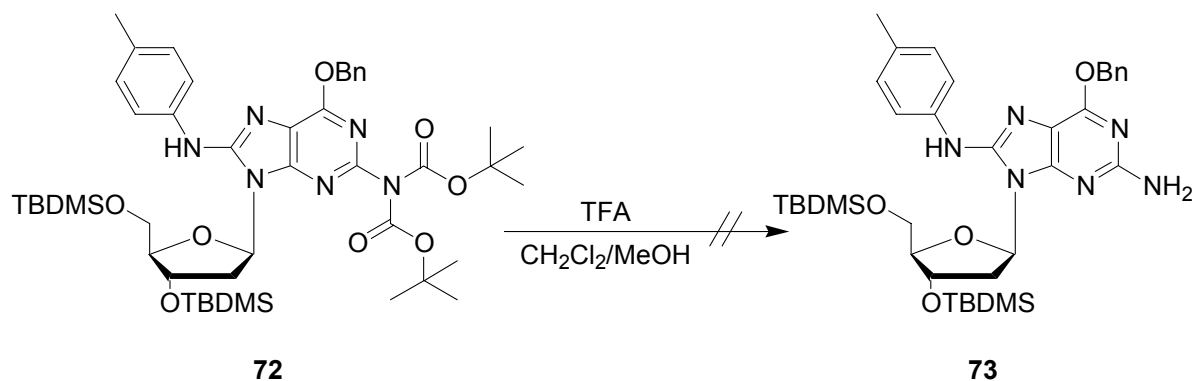
Ausbeute: 304 mg (0.34 mmol, 86 %) eines farblosen Schaums.  
 DC: R<sub>f</sub>-Wert (Petrolether / Essigsäureethylester 4:1): 0.37  
<sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 9.26 (s, 1H, NH), 7.64-7.59 (m, 2H, TOL-H), 7.47-7.29 (m, 5H, β-H+γ-H), 7.15-7.11 (m, 2H, TOL-H), 6.45 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2, 5.6 Hz, 1H, H1'), 5.56 (d, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 12.3 Hz, 1H, α-Ha), 5.52 (d, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 12.3 Hz, 1H, α-Hb), 4.75-4.69 (m, 1H, H3'), 3.85-3.79 (m, 2H, H4'+H5a'), 3.59-3.52 (m, 1H, H5b'), 3.37-3.28 (m, 1H, H2a'), 2.29-2.21 (m, 1H, H2b'+TOL-CH<sub>3</sub>), 1.36 (s, 9H, BOC-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.89 (s, 9H, Si-



$C(CH_3)_3$ , 0.79 (s, 9H, Si- $C(CH_3)_3$ ), 0.09 (s, 6H, Si- $(CH_3)_2$ ), -0.06 (s, 3H, Si- $(CH_3)_2$ ), -0.08 (s, 3H, Si- $(CH_3)_2$ ).

$^{13}C$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO- $d_6$ ): 150.3, 137.2, 136.6, 131.3, 129.2, 128.6, 128.3, 128.2, 119.5, 87.3 ( $C4'$ ), 83.0 ( $C1'$ ), 82.3, 72.6 ( $C3'$ ), 67.5 ( $\alpha$ -C), 63.7 ( $C5'$ ), 36.9 ( $C2'$ ), 27.6 (Si $\underline{C}(CH_3)_3$ ), 25.8 (Si $\underline{C}(CH_3)_3$ ), 20.5 (TOL- $CH_3$ ), 18.1 (Si $\underline{C}(CH_3)_3$ ), 17.9 (Si $\underline{C}(CH_3)_3$ ), -4.6 (Si( $\underline{C}H_3$ ) $_2$ ), -4.8 (Si( $\underline{C}H_3$ ) $_2$ ), -5.4 (Si( $\underline{C}H_3$ ) $_2$ ), -5.4 (Si( $\underline{C}H_3$ ) $_2$ ).

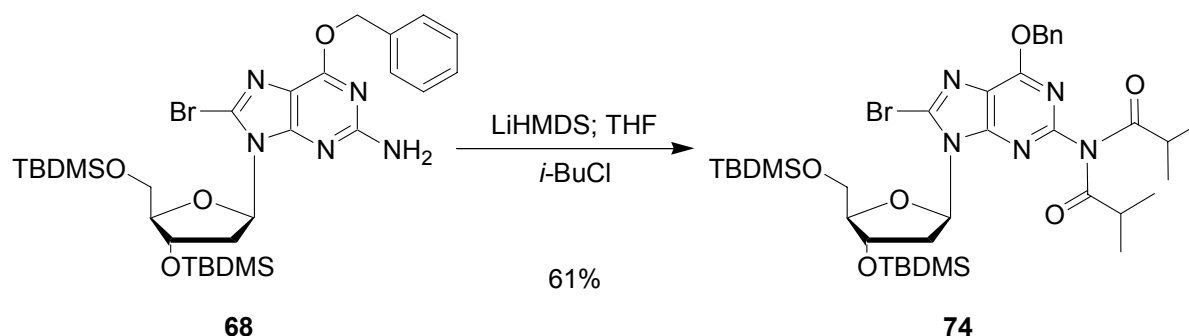
#### 8.4.15 Versuch der Synthese von *O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **73**



100 mg (0.11 mmol) des Toluidin-Addukts **72** wurde in 2 ml Dichlormethan gelöst, mit 2 ml 2 %-iger Trifluoressigsäure-Lösung in Dichlormethan/Methanol (9:1) versetzt und mehrere Stunden gerührt. Da auch nach 4 Stunden dünnschichtchromatographisch keine Reaktion erkennbar war, wurde 1 ml 5 %-ige Trifluoressigsäure-Lösung zugegeben. Aber auch danach zeigte sich dünnschichtchromatographisch keine Veränderung. Also wurde nach 5 Stunden noch einmal 1 ml und nach 6 Stunden weitere 2 ml 5 %-ige Trifluoressigsäure-Lösung zugegeben und die Reaktionsmischung über Nacht gerührt. Da sich aber auch nach 22 Stunden keine Reaktion zeigte, wurde der Versuch abgebrochen.

Die beiden BOC-Schutzgruppen ließen sich demnach nicht mit TFA abspalten.

8.4.16 Synthese von *N*<sup>2</sup>-Bis(*i*-Butyryl)-*O*<sup>6</sup>-benzyl-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **74**



Diese Reaktion wurde analog der Zweifachschützung der exocyclischen Aminogruppe mit Di-*tert*-Butyldicarbonat durchgeführt (s. Kap. 8.4.12, S. 130).

349 mg (0.52 mmol) *O*<sup>6</sup>-Benzyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **68** wurden in 1 ml absolutem Tetrahydrofuran gelöst und mit 2.10 ml (2.10 mmol) 1M Lithiumhexamethyldisilazid-Lösung (LiHMDS) in Tetrahydrofuran versetzt. Nach 15 minütigem Rühren wurden 224 mg (2.10 mmol) Isobutyrylchlorid zugetropft und das Gemisch für 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 1 ml Methanol unter Eiskühlung und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in 25 ml Reinstwasser und 10 ml Dichlormethan gelöst. Nach Trennung der Phasen wurde die wässrige Phase zweimal mit je 10 ml Dichlormethan extrahiert. Nach Trocknung der organischen Phase über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand am Chromatotron gereinigt. Als Eluent diente Petrolether mit 0-6 % Essigsäureethylester.

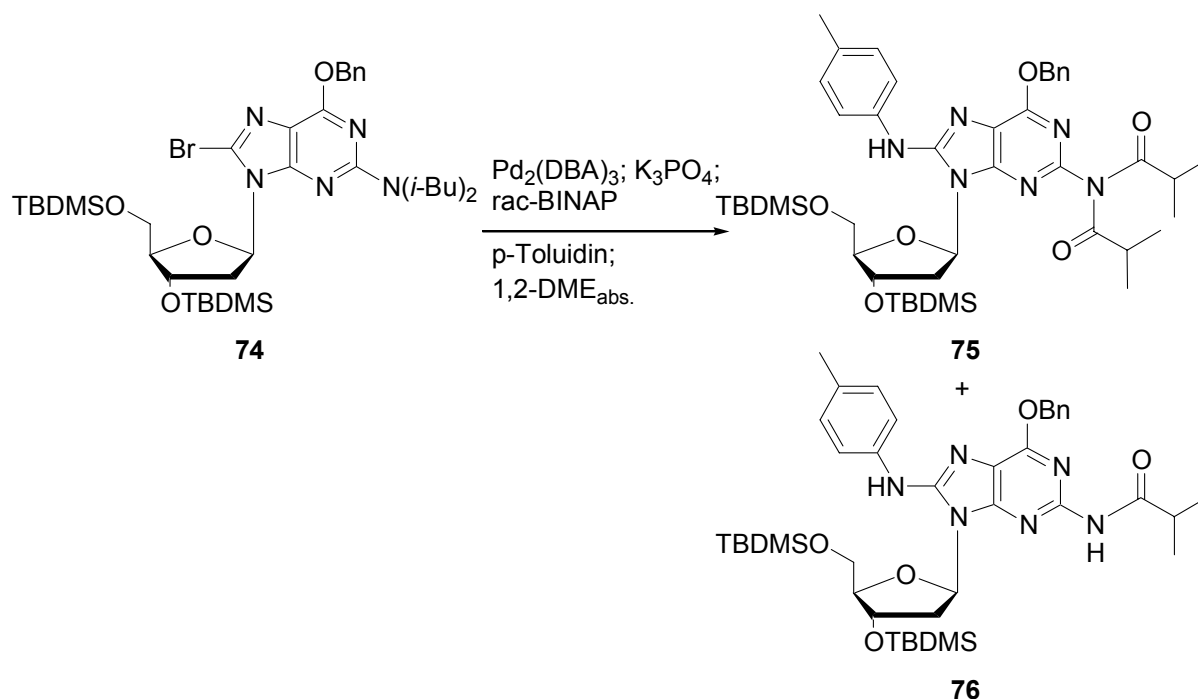
Ausbeute: 254 mg (0.31 mmol, 61 %) eines farblosen Schaums.

DC:  $R_f$ -Wert (Petrolether / Essigsäureethylester 4:1): 0.44

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 7.46-7.33 (m, 5H,  $\beta$ -H+ $\gamma$ -H), 6.32 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7.5, 4.6 Hz, 1H, H1'), 5.56 (s, 2H,  $\alpha$ -H), 4.65 (ddd, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6.6, 6.0, 5.6 Hz, 1H, H3'), 3.80 (ddd, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 5.6, 5.1, 5.8 Hz, 1H, H4'), 3.68 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 11.0 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 5.1 Hz, 1H, H5a'), 3.50 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 11.0 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 5.8 Hz, 1H, H5b'), 3.20 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 13.4 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 4.6, 6.0 Hz, 1H, H2a'), 2.64 (sept, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6.7 Hz, 2H, *i*Bu-CH), 2.36 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 13.4 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7.5, 6.0 Hz, 1H, H2b'), 1.07 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6.7 Hz, 6H, *i*Bu-CH<sub>3</sub>), 1.07 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6.7 Hz, 6H, *i*Bu-CH<sub>3</sub>), 0.86 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.75 (s, 9H, Si-

$C(CH_3)_3$ , 0.05 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.05 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.09 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.14 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

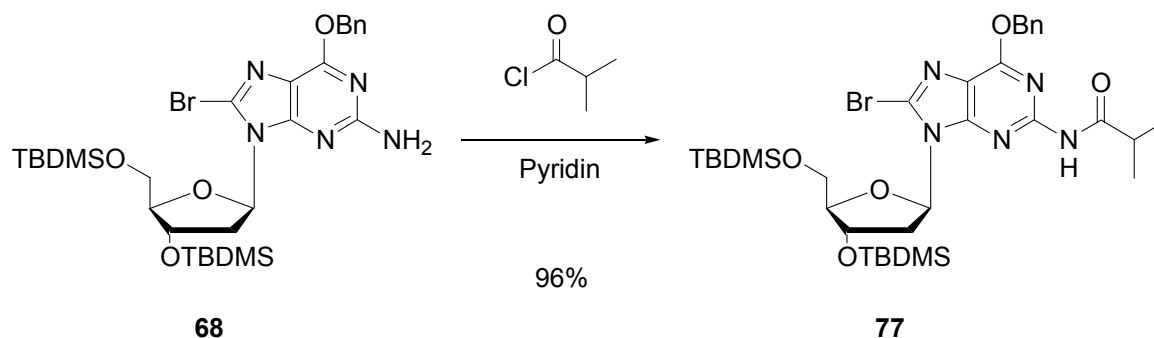
8.4.17 Synthese von *N*<sup>2</sup>-Bis(*i*-Butyryl)-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **75**



Die Reaktion wurde analog der Synthese der zweifach BOC geschützten Verbindung **72** nach AAV 1 durchgeführt. Es wurden 250 mg (0.31 mmol) *N*<sup>2</sup>-Bis(*i*-Butyryl)-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **74** als Ausgangssubstanz eingesetzt. Reaktionszeit: 20 h.

Es zeigte sich allerdings, dass nicht beide *iso*-Butyryl-Schutzgruppen unter den Reaktionsbedingungen stabil sind, sondern eine der Schutzgruppen teilweise abgespalten wird. Es konnte also nur ein Gemisch aus zweifach **75** und einfach **76** geschütztem Produkt, sowie zweifach **74** und einfach geschütztem Edukt isoliert werden.

8.4.18 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **77**



1.15 g (1.73 mmol) *O*<sup>6</sup>-Bn-8-Br-3',5'-TBDMS-dG **68** wurden zunächst zweimal mit je 4 ml Pyridin coevaporiert und danach in 10 ml absolutem Pyridin gelöst. Anschließend wurden langsam 0.37 ml Isobutyrylchlorid zugegeben und die Lösung wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 1 ml Methanol and anschließendem Rühren für 5 min wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum in eine Kühlfalle abkondensiert. Der Rückstand wurde 2 mal mit je 20 ml Toluol coevaporiert, und in 20 ml Dichlormethan und 20 ml Wasser gelöst. Nach Trennung der Phasen, wurde die wässrige Phase zweimal mit je 20 ml Dichlormethan extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen mit 20 ml Wasser gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über Natriumsulfat, wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand am Chromatotron gereinigt. Als Eluent diente Petrolether mit 10 % Essigsäureethylester.

Ausbeute: 1.22 g (1.66 mmol, 96 %) eines farblosen Schaums.

DC:  $R_f$ -Wert (Petrolether / Essigsäureethylester 4:1): 0.43

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  [ppm] (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 10.41 (s, 1H, NH), 7.53-7.33 (m, 5H,  $\beta$ -H+ $\gamma$ -H), 6.26 (dd, <sup>3</sup> $J_{HH}$  = 7.4, 6.1 Hz, 1H, H1'), 5.60 (d, <sup>2</sup> $J_{HH}$  = 12.1 Hz, 1H,  $\alpha$ -Ha), 5.57 (d, <sup>2</sup> $J_{HH}$  = 12.1 Hz, 1H,  $\alpha$ -Hb), 4.99-4.95 (m, 1H, H3'), 3.84-3.77 (m, 2H, H4'+H5a'), 3.69-3.62 (m, 1H, H5b'), 3.51 (ddd, <sup>2</sup> $J_{HH}$  = 13.1 Hz, <sup>3</sup> $J_{HH}$  = 6.1, 6.1 Hz, 1H), 2.80 (sept, <sup>3</sup> $J_{HH}$  = 6.8 Hz, 1H, *i*Bu-H), 2.26 (ddd, <sup>2</sup> $J_{HH}$  = 13.1 Hz, <sup>3</sup> $J_{HH}$  = 7.4, 4.8 Hz, 1H, H2b'), 1.10 (d, <sup>3</sup> $J_{HH}$  = 6.8 Hz, 3H, *i*Bu-CH<sub>3</sub>), 1.09 (d, <sup>3</sup> $J_{HH}$  = 6.8 Hz, 3H, *i*Bu-CH<sub>3</sub>), 0.88 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.75 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.13 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.11 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.10 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.12 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

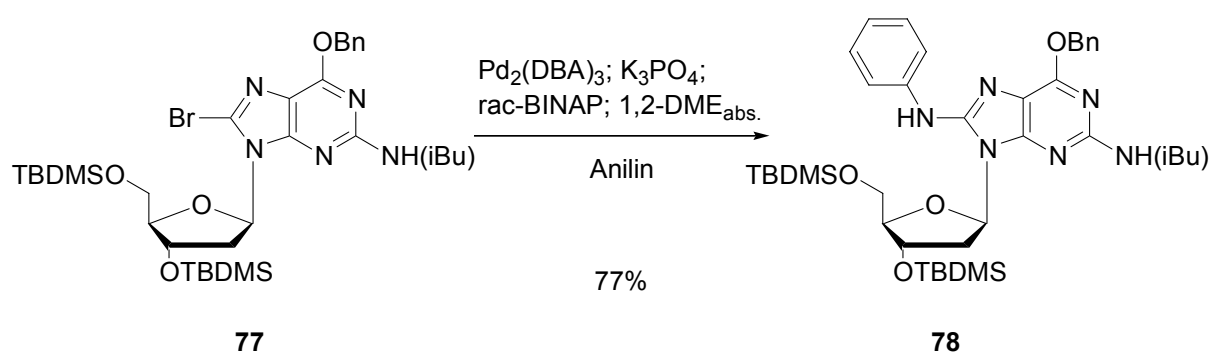
<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 174.3 (*i*Bu-C(O)), 156.9, 152.5, 149.5, 148.2, 142.6, 140.4, 137.0, 136.6, 128.6, 128.5, 128.1, 125.1, 123.5, 115.4,

87.9 (C4'), 83.0 (C1'), 72.4 (C3'), 67.2 ( $\alpha$ -C), 63.5 (C5'), 37.0 (C2'), 34.4 (iBu-CH), 25.8 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.7 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 19.4 (iBu-CH<sub>3</sub>), 19.3 (iBu-CH<sub>3</sub>), 18.0 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.7 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.7 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -4.8 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.5 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.5 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 748.4038

gef.: 748.4076 (M+H<sup>+</sup>)

8.4.19 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-phenylamino-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **78**



Die Reaktion wurde nach AAV 1 durchgeführt. Es wurden 350 mg (0.48 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **77** eingesetzt.

Reaktionszeit: 49 h

Ausbeute: 273 mg (0.37 mmol, 77 %) einer hellrosa Watte.

DC: R<sub>F</sub>-Wert (Petrolether / Essigsäureethylester 4:1): 0.36

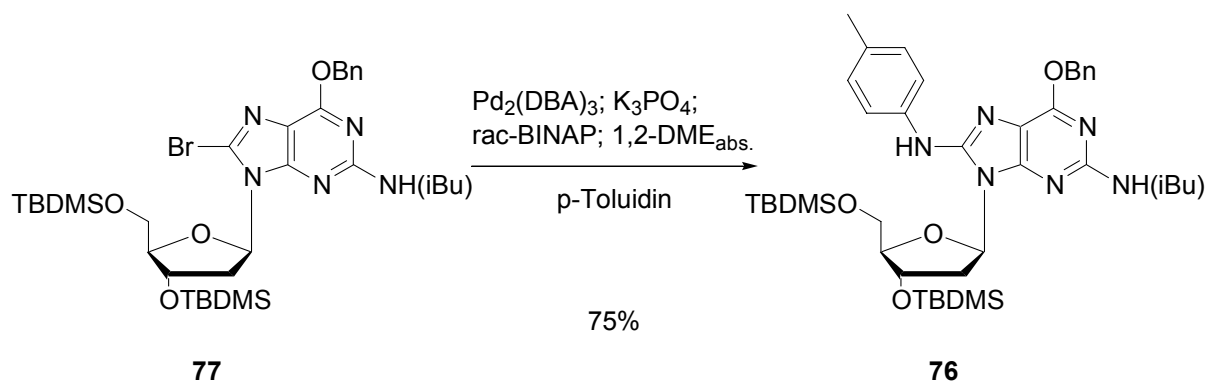
<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  [ppm] (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 10.13 (s, 1H, NH), 9.14 (s, 1H, NH), 7.69-6.93 (m, 10 h,  $\beta$ -H+ $\gamma$ -H+AN-H), 6.41 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3, 6.5 Hz, 1H, H1'), 5.60 (d, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 12.2 Hz, 1H,  $\alpha$ -Ha), 5.56 (d, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 12.2 Hz, 1H,  $\alpha$ -Hb), 4.94 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.2, 6.5, 4.3 Hz, 1H, H3'), 3.86 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.6, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.8 Hz, 1H, H5a'), 3.80 (ddd, J = 4.2, 4.8, 6.0 Hz, 1H, H4'), 3.71 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.6, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.0 Hz, 1H, H5b'), 3.50 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.1, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5, 6.5 Hz, 1H, H2a'), 2.81 (sept, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, 1H, iBu-H), 2.17 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.1, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3, 4.3 Hz, 1H, H2b'), 1.10 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>), 1.09 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>), 0.89 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.77 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.14 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.12 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.08 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.09 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO- $d_6$ ): 174.4 (iBu-C(O)), 156.8, 152.7, 149.4, 148.7, 140.4, 136.8, 128.8, 128.7, 128.6, 128.3, 121.8, 118.6, 115.7, 88.0 (C4'), 83.0 (C1'), 72.5 (C3'), 67.3 ( $\alpha$ -C), 63.7 (C5'), 37.3 (C2'), 34.5 (iBu-CH), 25.9 (SiC(CH $_3$ ) $_3$ ), 19.6 (iBu-CH $_3$ ), 19.4 (iBu-CH $_3$ ), 18.1 (SiC(CH $_3$ ) $_3$ ), 17.8 (SiC(CH $_3$ ) $_3$ ), -4.6 (Si(CH $_3$ ) $_2$ ), -4.7 (Si(CH $_3$ ) $_2$ ), -5.3 (Si(CH $_3$ ) $_2$ ), -5.4 (Si(CH $_3$ ) $_2$ ).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 747.4086

gef.: 747.4066 (M+H $^+$ )

#### 8.4.20 Synthese von $N^2$ -*i*-Butyryl- $O^6$ -benzyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **76**



Die Reaktion wurde nach AAV 1 durchgeführt. Es wurden 450 mg (0.61 mmol)  $N^2$ -*i*-Butyryl- $O^6$ -benzyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **77** eingesetzt.

Reaktionszeit: 50 h

Ausbeute: 350 mg (0.46 mmol, 75 %) einer hellgelben Watte.

DC:  $R_f$ -Wert (Petrolether / Essigsäureethylester 4:1): 0.30

$^1\text{H}$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 10.13 (s, 1H, NH), 9.05 (s, 1H, NH), 7.58-7.49 (m, 4H,  $\beta$ -H+TOL-H), 7.40-7.31 (m, 3H,  $\gamma$ -H), 7.12-7.08 (m, 2H, TOL-H), 6.39 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 7.3, 6.2$  Hz, 1H, H1'), 5.59 (d,  $^2J_{\text{HH}} = 12.1$  Hz, 1H,  $\alpha$ -Ha), 5.55 (d,  $^2J_{\text{HH}} = 12.1$  Hz, 1H,  $\alpha$ -Hb), 4.93 (ddd,  $^3J_{\text{HH}} = 4.3, 6.6, 4.0$  Hz, 1H, H3'), 3.86 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 10.6, ^3J_{\text{HH}} = 5.1$  Hz, 1H, H5a'), 3.79 (ddd,  $^3J_{\text{HH}} = 5.1, 4.0, 5.8$  Hz, 1H, H4'), 3.70 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 10.6, ^3J_{\text{HH}} = 5.8$  Hz, 1H, H5b'), 3.50 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.1, ^3J_{\text{HH}} = 6.2, 6.6$  Hz, 1H, H2a'), 2.80 (sept,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, 1H, iBu-H), 2.23 (s, 3H, TOL-CH $_3$ ), 2.15 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.1, ^3J_{\text{HH}} = 7.3, 4.3$  Hz, 1H, H2b'), 1.09 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, 3H, iBu-CH $_3$ ), 1.09

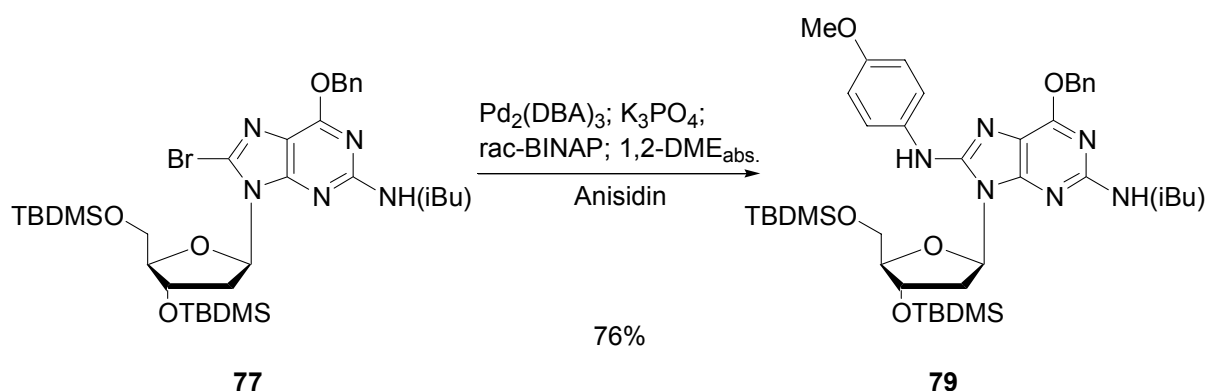
(d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>), 0.89 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.77 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.14 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.12 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.09 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.09 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 174.3 (iBu-C(O)), 156.5, 152.6, 149.1, 148.8, 137.6, 136.7, 130.5, 129.0, 128.5, 128.4, 128.1, 118.7, 115.6, 87.7 (C4'), 82.8 (C1'), 72.3 (C3'), 67.1 ( $\alpha$ -C), 63.5 (C5'), 37.0 (C2'), 34.4 (iBu-CH), 25.7 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 20.4 (TOL-CH<sub>3</sub>), 19.4 (iBu-CH<sub>3</sub>), 19.3 (iBu-CH<sub>3</sub>), 18.0 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.7 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.8 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -4.9 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.5 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.5 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 761.4242

gef.: 761.4216 (M+H<sup>+</sup>)

#### 8.4.21 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-(4-methoxyphenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **79**



Die Reaktion wurde nach AAV 1 durchgeführt. Es wurden 250 mg (0.34 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **77** eingesetzt.

Reaktionszeit: 51 h

Ausbeute: 201 mg (0.26 mmol, 76 %) einer hellvioletten Watte.

DC:  $R_f$ -Wert (Petrolether / Essigsäureethylester 4:1): 0.20

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  [ppm] (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 10.20 (s, 1H, NH), 9.06 (s, 1H, NH), 7.69-6.97 (m, 9H,  $\beta$ -H+ $\gamma$ -H+ANIS-H), 6.48 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 6.6, 7.3$  Hz, 1H, H1'), 5.67 (d,  $^2J_{\text{HH}} = 12.1$  Hz, 1H,  $\alpha$ -Ha), 5.63 (d,  $^2J_{\text{HH}} = 12.1$  Hz, 1H,  $\alpha$ -Hb), 5.02 (ddd,  $^3J_{\text{HH}} = 6.6, 4.2, 4.2$  Hz, 1H, H3'), 3.96 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 11.0, ^3J_{\text{HH}} = 5.2$  Hz, 1H, H5a'), 3.89 (ddd,  $^3J_{\text{HH}} = 5.2, 4.2, 5.9$  Hz, 1H, H4'), 3.80 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 11.0, ^3J_{\text{HH}} = 5.9$  Hz, 1H, H5b'), 3.61 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.0,$

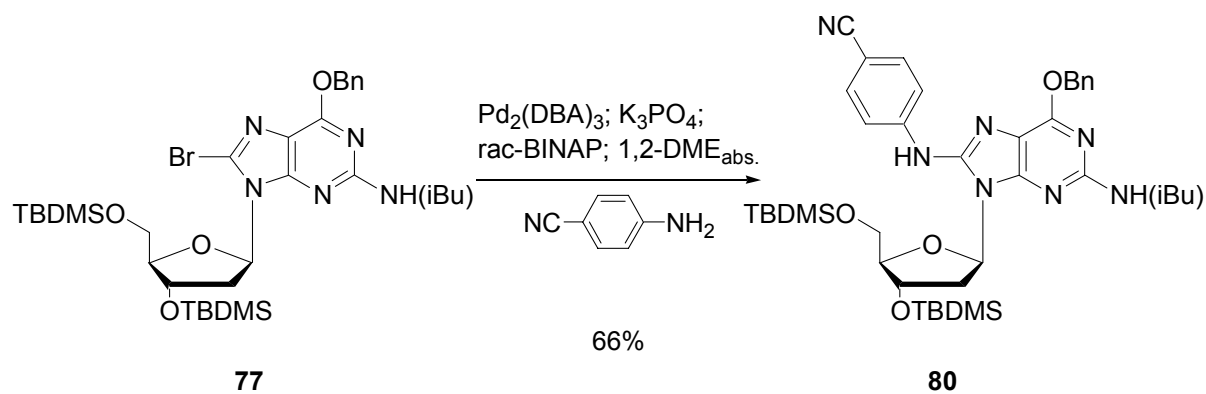
$^3J_{\text{HH}} = 6.6, 6.6 \text{ Hz}$ , 1H, H2a'), 2.90 (sept,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7 \text{ Hz}$ , 1H, iBu-H), 2.25 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.0, ^3J_{\text{HH}} = 4.2, 7.3 \text{ Hz}$ , 1H, H2b'), 1.20 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7 \text{ Hz}$ , 3H, iBu-CH<sub>3</sub>), 1.19 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7 \text{ Hz}$ , 3H, iBu-CH<sub>3</sub>), 1.00 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.87 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.24 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.22 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.02 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.01 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 174.4 (iBu-C(O)), 156.5, 154.7, 152.9, 149.5, 149.1, 136.9, 133.4, 128.7, 128.6, 128.2, 120.8, 115.8, 114.1, 87.9 (C4'), 82.9 (C1'), 72.6 (C3'), 67.3 ( $\alpha$ -C), 63.7 (C5'), 55.3 (ANIS-CH<sub>3</sub>), 37.2 (C2'), 34.5 (iBu-CH), 25.9 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 19.6 (iBu-CH<sub>3</sub>), 19.4 (iBu-CH<sub>3</sub>), 18.1 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.9 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.6(Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -4.7(Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.3(Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.4(Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 777.4191

gef.: 777.4204 (M+H<sup>+</sup>)

#### 8.4.22 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-(4-cyanophenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **80**



Die Reaktion wurde nach AAV 1 durchgeführt. Es wurden 400 mg (0.54 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **77** eingesetzt.

Reaktionszeit: 48 h

Ausbeute: 278 mg (0.36 mmol, 66 %) einer hellgelben Watte.

DC:  $R_f$ -Wert (Petrolether / Essigsäureethylester 4:1): 0.32

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 10.21 (s, 1H, NH), 9.78 (s, 1H, NH), 7.87-7.32 (m, 9H,  $\beta$ -H+ $\gamma$ -H+pCPA-H), 6.40 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 6.2, 7.4 \text{ Hz}$ , 1H, H1'), 5.61 (d,  $^2J_{\text{HH}} = 12.1 \text{ Hz}$ , 1H,  $\alpha$ -Ha), 5.58 (d,  $^2J_{\text{HH}} = 12.1 \text{ Hz}$ , 1H,  $\alpha$ -Hb), 4.96 (ddd,  $^3J_{\text{HH}} = 6.5, 4.3, 4.3 \text{ Hz}$ , 1H, H3'), 3.85 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 10.5,$



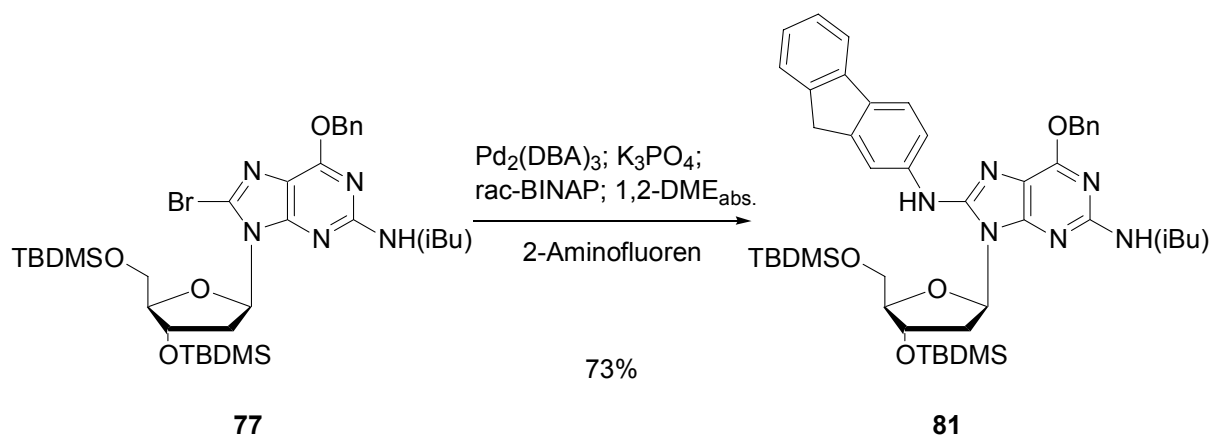
$^3J_{\text{HH}} = 5.0$  Hz, 1H, H5a'), 3.79 (ddd,  $^3J_{\text{HH}} = 5.0, 4.3, 6.0$  Hz, 1H, H4'), 3.71 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 10.5, ^3J_{\text{HH}} = 6.0$  Hz, 1H, H5b'), 3.53 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.0, ^3J_{\text{HH}} = 6.2, 6.5$  Hz, 1H, H2a'), 2.81 (sept,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, 1H, iBu-H), 2.18 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.0, ^3J_{\text{HH}} = 4.3, 7.4$  Hz, 1H, H2b'), 1.10 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>), 1.09 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>), 0.89 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.76 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.14 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.12 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.10 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.11 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 174.3 (iBu-C(O)), 157.3, 152.3, 149.9, 147.1, 144.7, 136.5, 133.2, 128.6, 128.5, 128.2, 119.5, 117.8, 115.3, 102.6, 87.9 (C4'), 83.0 (C1'), 72.3 (C3'), 67.3 ( $\alpha$ -C), 63.5 (C5'), 37.0 (C2'), 34.4 (iBu-CH), 25.7 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 19.4 (iBu-CH<sub>3</sub>), 19.3 (iBu-CH<sub>3</sub>), 18.0 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.7 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.8 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -4.9 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.5 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.5 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 772.4038

gef.: 772.4047 (M+H<sup>+</sup>)

#### 8.4.23 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-(2-fluorenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **81**



Die Reaktion wurde nach AAV 1 durchgeführt. Es wurden 400 mg (0.54 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **77** eingesetzt.

Reaktionszeit: 47 h

Ausbeute: 332 mg (0.40 mmol, 73 %) einer hellgelbe Watte.

DC:  $R_f$ -Wert (Petrolether / Essigsäureethylester 4:1): 0.29

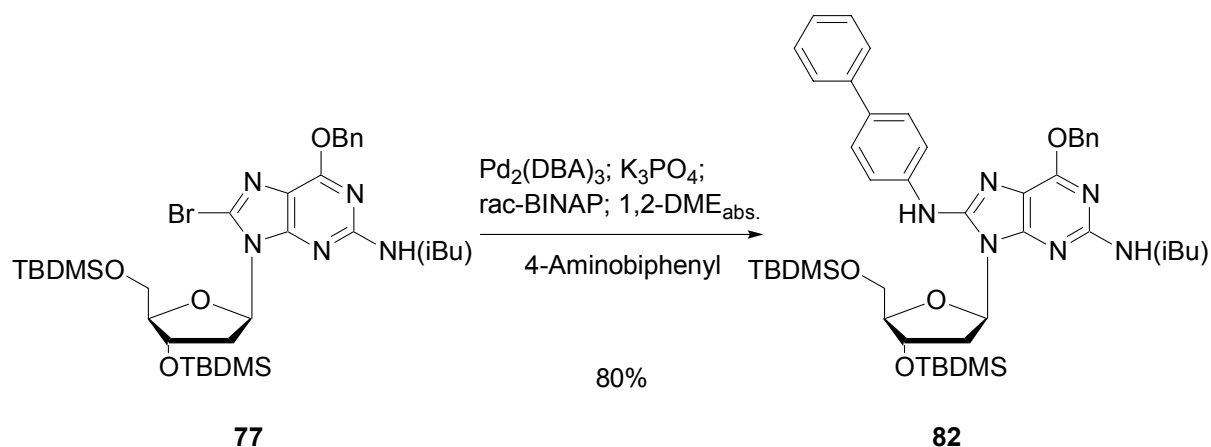
$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (500 MHz, DMSO- $d_6$ ): 10.15 (s, 1H, NH), 9.24 (s, 1H, NH), 7.98-7.20 (m, 12H,  $\beta$ -H+ $\gamma$ -H+AF-H), 6.44 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 6.6, 7.5$  Hz, 1H, H1'), 5.62 (d,  $^2J_{\text{HH}} = 12.1$  Hz, 1H,  $\alpha$ -Ha), 5.59 (d,  $^2J_{\text{HH}} = 12.1$  Hz, 1H,  $\alpha$ -Hb), 4.94 (ddd,  $^3J_{\text{HH}} = 6.6, 4.1, 4.1$  Hz, 1H, H3'), 3.89 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-AF), 3.87 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 11.0, ^3J_{\text{HH}} = 5.1$  Hz, 1H, H5a'), 3.81 (ddd,  $^3J_{\text{HH}} = 5.1, 4.1, 5.9$  Hz, 1H, H4'), 3.73 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 11.0, ^3J_{\text{HH}} = 5.9$  Hz, 1H, H5b'), 3.52 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.1, ^3J_{\text{HH}} = 6.6, 6.6$  Hz, 1H, H2a'), 2.82 (sept,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz, 1H, iBu-H), 2.18 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.1, ^3J_{\text{HH}} = 4.1, 7.5$  Hz, 1H, H2b'), 1.11 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>), 1.10 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>), 0.89 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.78 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.15 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.12 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.08 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.08 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO- $d_6$ ): 174.5 (iBu-C(O)), 156.8, 152.8, 149.5, 148.7, 144.0, 142.7, 141.4, 139.6, 136.8, 135.2, 128.7, 128.6, 128.3, 126.8, 125.9, 125.1, 120.3, 119.3, 117.6, 115.8, 115.2, 88.0 (C4'), 83.1 (C1'), 72.5 (C3'), 67.3 ( $\alpha$ -C), 63.7 (C5'), 37.3 (C2'), 36.7 (CH<sub>2</sub>-AF), 34.6 (iBu-CH), 25.9 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 19.6 (iBu-CH<sub>3</sub>), 19.4 (iBu-CH<sub>3</sub>), 18.1 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.8 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.6 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -4.7 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.3 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.4 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 835.4399

gef.: 835.4398 (M+H<sup>+</sup>)

8.4.24 Synthese von  $N^2$ -*i*-Butyryl- $O^6$ -benzyl-8- $N$ -(4-biphenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **82**



Die Reaktion wurde nach AAV 1 durchgeführt. Es wurden 300 mg (0.41 mmol)  $N^2$ -*i*-Butyryl- $O^6$ -benzyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **77** eingesetzt.

Reaktionszeit: 51 h

Ausbeute: 270 mg (0.33 mmol, 80 %) einer hellgelbe Watte.

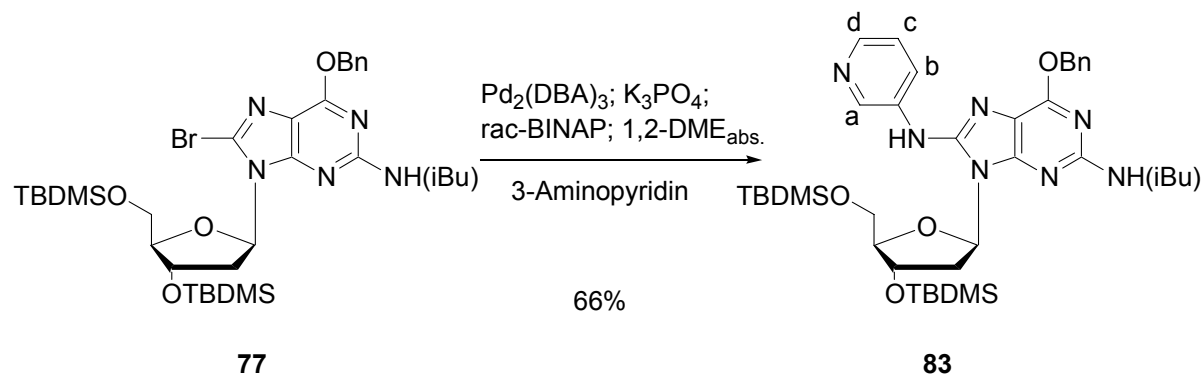
DC:  $R_f$ -Wert (Petrolether / Essigsäureethylester 4:1): 0.26

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 10.15 (s, 1H, NH), 9.30 (s, 1H, NH), 7.81-7.27 (m, 14H,  $\beta$ -H+ $\gamma$ -H+ABP-H), 6.44 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 6.2, 7.4$  Hz, 1H, H1'), 5.61 (d,  $^2J_{\text{HH}} = 12.1$  Hz, 1H,  $\alpha$ -Ha), 5.57 (d,  $^2J_{\text{HH}} = 12.1$  Hz, 1H,  $\alpha$ -Hb), 4.96 (ddd,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7, 4.3, 4.3$  Hz, 1H, H3'), 3.87 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 10.6, ^3J_{\text{HH}} = 5.0$  Hz, 1H, H5a'), 3.81 (ddd,  $^3J_{\text{HH}} = 5.0, 4.3, 6.0$  Hz, 1H, H4'), 3.72 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 10.6, ^3J_{\text{HH}} = 6.0$  Hz, 1H, H5b'), 3.53 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.0, ^3J_{\text{HH}} = 6.2, 6.7$  Hz, 1H, H2a'), 2.81 (sept,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz, 1H, *i*Bu-H), 2.19 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.0, ^3J_{\text{HH}} = 4.3, 7.4$  Hz, 1H, H2b'), 1.11 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz, 3H, *i*Bu- $\text{CH}_3$ ), 1.10 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz, 3H, *i*Bu- $\text{CH}_3$ ), 0.90 (s, 9H,  $\text{Si-C}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.77 (s, 9H,  $\text{Si-C}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.15 (s, 3H,  $\text{Si-(CH}_3)_2$ ), 0.13 (s, 3H,  $\text{Si-(CH}_3)_2$ ), -0.08 (s, 3H,  $\text{Si-(CH}_3)_2$ ), -0.09 (s, 3H,  $\text{Si-(CH}_3)_2$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (101 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 156.9, 152.7, 149.5, 148.6, 140.0, 139.9, 136.8, 133.4, 129.0, 128.7, 128.6, 128.3, 127.0, 126.9, 126.2, 118.9, 115.7, 88.0 (C4'), 83.0 (C1'), 72.5 (C3'), 67.3 ( $\alpha$ -C), 63.7 (C5'), 37.2 (C2'), 34.6 (*i*Bu-CH), 25.9 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 19.6 (*i*Bu- $\text{CH}_3$ ), 19.4 (*i*Bu- $\text{CH}_3$ ), 18.1 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 17.9 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), -4.6 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ), -4.7 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ), -5.3 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ), -5.4 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 823.4399  
gef.: 823.4482 (M+H<sup>+</sup>)

8.4.25 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-(3-pyridinylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **83**



Die Reaktion wurde nach AAV 1 durchgeführt. Es wurden 400 mg (0.54 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **77** eingesetzt.  
Reaktionszeit: 70 h

Ausbeute: 268 mg (0.36 mmol, 66 %) einer hellorangenen Watte.

DC:  $R_f$ -Wert (Dichlormethan / Methanol 29:1): 0.26

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  [ppm] (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 10.17 (s, 1H, NH), 9.43 (s, 1H, NH), 8.85-8.84 (m, 1H, Ha), 8.20-8.16 (m, 2H, Hb+Hd), 7.52 -7.51 (m, 2H,  $\beta$ -H), 7.40-7.31 (m, 4H,  $\gamma$ -H+Hc), 6.41 (dd, <sup>3</sup> $J_{\text{HH}}$  = 6.4, 7.3 Hz, 1H, H1'), 5.60 (d, <sup>2</sup> $J_{\text{HH}}$  = 12.1 Hz, 1H,  $\alpha$ -Ha), 5.56 (d, <sup>2</sup> $J_{\text{HH}}$  = 12.1 Hz, 1H,  $\alpha$ -Hb), 4.95 (ddd, <sup>3</sup> $J_{\text{HH}}$  = 6.6, 4.3, 4.1 Hz, 1H, H3'), 3.86 (dd, <sup>2</sup> $J_{\text{HH}}$  = 10.7, <sup>3</sup> $J_{\text{HH}}$  = 5.2 Hz, 1H, H5a'), 3.81 (ddd, <sup>3</sup> $J_{\text{HH}}$  = 5.2, 4.1, 6.0 Hz, 1H, H4'), 3.71 (dd, <sup>2</sup> $J_{\text{HH}}$  = 10.7, <sup>3</sup> $J_{\text{HH}}$  = 6.0 Hz, 1H, H5b'), 3.55 (ddd, <sup>2</sup> $J_{\text{HH}}$  = 13.0, <sup>3</sup> $J_{\text{HH}}$  = 6.4, 6.6 Hz, 1H, H2a'), 2.81 (sept, <sup>3</sup> $J_{\text{HH}}$  = 6.8 Hz, 1H, *i*Bu-H), 2.18 (ddd, <sup>2</sup> $J_{\text{HH}}$  = 13.0, <sup>3</sup> $J_{\text{HH}}$  = 4.3, 7.3 Hz, 1H, H2b'), 1.10 (d, <sup>3</sup> $J_{\text{HH}}$  = 6.8 Hz, 3H, *i*Bu-CH<sub>3</sub>), 1.09 (d, <sup>3</sup> $J_{\text{HH}}$  = 6.8 Hz, 3H, *i*Bu-CH<sub>3</sub>), 0.90 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.77 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.14 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.12 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.09 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.10 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

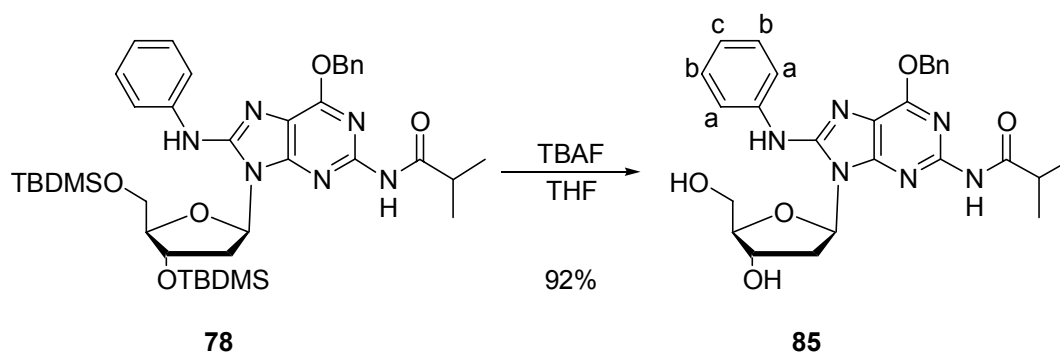
<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 174.3 (*i*Bu-C(O)), 156.9, 152.5, 149.5, 148.2, 142.6, 140.4, 137.0, 136.6, 128.6, 128.5, 128.1, 125.1, 123.5, 115.4, 87.9 (C4'), 83.0 (C1'), 72.4 (C3'), 67.2 ( $\alpha$ -C), 63.5 (C5'), 37.0 (C2'), 34.4

(iBu-CH), 25.8 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.7 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 19.4 (iBu-CH<sub>3</sub>), 19.3 (iBu-CH<sub>3</sub>), 18.0 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.7 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.7 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -4.8 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.5 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.5 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 748.4038

gef.: 748.4076 (M+H<sup>+</sup>)

#### 8.4.26 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-phenylamino-2'-desoxyguanosin **85**



Die Reaktion wurde nach AAV 2 durchgeführt. Es wurden 250 mg (0.33 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-phenylamino-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **78** und 4 ml Tetrahydrofuran eingesetzt. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch über Kieselgel mit 10 % Methanol in Dichlormethan.

Reaktionszeit: 3.5 h

Ausbeute: 159 mg (0.31 mmol, 92 %) eines farblosen Feststoffs.

DC: R<sub>f</sub>-Wert (Dichlormethan / Methanol 9:1): 0.14

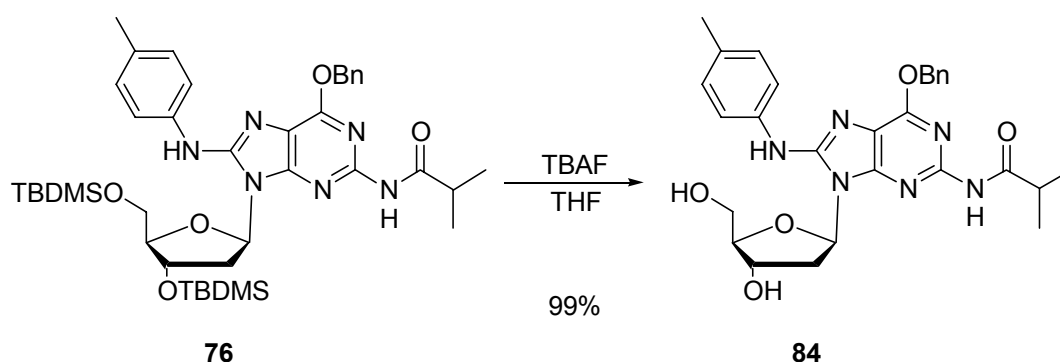
<sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 10.25 (s, 1H, NH), 9.09 (s, 1H, NH), 7.79-7.76 (m, 2H, Ha), 7.56-7.54 (m, 2H, β-H), 7.40-7.28 (m, 5H, γ-H+Hb), 6.99-6.96 (m, 1H, Hc), 6.55 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.6, 5.7 Hz, 1H, H1'), 5.89 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.9, 3.9 Hz, 1H, 5'OH), 5.60 (d, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 12.3 Hz, 1H, α-Ha), 5.58 (d, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 12.3 Hz, 1H, α-Hb), 5.38 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.7 Hz, 1H, 3'OH), 4.46 (dddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 1.7, 3.7, 2.0, 5.8 Hz, 1H, H3'), 3.97 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 2.0, 2.2, 2.2 Hz, 1H, H4'), 3.76 (s, 2H, H5a+b'), 2.84 (sept, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7 Hz, 1H, *i*Bu-H), 2.65 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.1, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.6, 5.8 Hz, 1H, H2a'), 2.08 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.1, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.7, 1.7 Hz, 1H, H2b'), 1.09 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7 Hz, 3H, *i*Bu-CH<sub>3</sub>), 1.09 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7 Hz, 3H, *i*Bu-CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO- $d_6$ ): 175.0 (iBu-C(O)), 156.6, 152.8, 149.8, 148.0, 139.9, 136.8, 129.0, 128.8, 128.6, 128.3, 122.0, 118.8, 114.7, 87.7 (C4'), 83.4 (C1'), 71.5 (C3'), 67.5 ( $\alpha$ -C), 61.5 (C5'), 38.4 (C2'), 34.5 (iBu-CH), 19.6 (iBu-CH $_3$ ), 19.5 (iBu-CH $_3$ ).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 519.2356

gef.: 519.2396 (M+H $^+$ )

#### 8.4.27 Synthese von $N^2$ -*i*-Butyryl- $O^6$ -benzyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-2'-desoxyguanosin **84**



Die Reaktion wurde nach AAV 2 durchgeführt. Es wurden 650 mg (0.85 mmol)  $N^2$ -*i*-Butyryl- $O^6$ -benzyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxy-guanosin **76** und 10 ml Tetrahydrofuran eingesetzt. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch über Kieselgel mit 5 % Methanol in Dichlormethan.

Reaktionszeit: 3.5 h

Ausbeute: 450 mg (0.85 mmol, 99 %) eines hellgelben Feststoffs.

DC:  $R_f$ -Wert (Dichlormethan / Methanol 9:1): 0.43

$^1\text{H}$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (500 MHz, DMSO- $d_6$ ): 10.30 (s, 1H, NH), 9.07 (s, 1H, NH), 7.71-7.68 (m, 2H, TOL-H), 7.61-7.59 (m, 2H,  $\beta$ -H), 7.45-7.37 (m, 3H,  $\gamma$ -H), 7.17-7.14 (m, 2H, TOL-H), 6.54 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 9.6, 5.8$  Hz, 1H, H1'), 5.93 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 4.6, 4.6$  Hz, 1H, 5'OH), 5.59 (d,  $^2J_{\text{HH}} = 11.9$  Hz, 1H,  $\alpha$ -Ha), 5.57 (d,  $^2J_{\text{HH}} = 11.9$  Hz, 1H,  $\alpha$ -Hb), 5.38 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 3.6$  Hz, 1H, 3'OH), 4.51 (dddd,  $^3J_{\text{HH}} = 1.5, 3.6, 5.8, 2.0$  Hz, 1H, H3'), 4.02 (ddd,  $^3J_{\text{HH}} = 2.0, 2.2, 2.2$  Hz, 1H, H4'), 3.75 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 2.2, 4.6$  Hz, 2H, H5a+b'), 2.83 (sept,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz, 1H, iBu-H), 2.63 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.1, ^3J_{\text{HH}} = 9.6, 5.8$  Hz, 1H, H2a'), 2.29 (s,

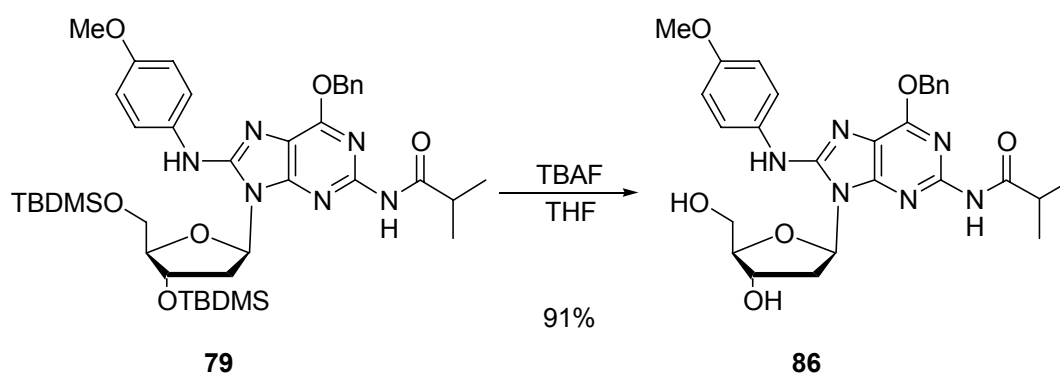
3H, TOL-CH<sub>3</sub>), 2.11 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.1, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.8, 1.5 Hz, 1H, H2b'), 1.09 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7 Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>), 1.08 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7 Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 174.9 (iBu-C(O)), 156.4, 152.8, 149.6, 148.2, 137.3, 136.8, 130.9, 129.2, 128.9, 128.6, 128.3, 118.9, 114.8, 87.6 (C4'), 83.3 (C1'), 71.5 (C3'), 67.4 (α-C), 61.5 (C5'), 38.2 (C2'), 34.5 (iBu-CH), 20.5 (TOL-CH<sub>3</sub>), 19.5 (iBu-CH<sub>3</sub>), 19.5 (iBu-CH<sub>3</sub>). 175.0, 156.6, 152.8, 149.8, 148.0, 139.9, 136.8, 129.0, 128.8, 128.6, 128.3, 122.0, 118.8, 114.7, 87.7, 83.4, 71.5, 67.5, 61.5, 38.4, 34.5, 19.6 (iBu-CH<sub>3</sub>), 19.5 (iBu-CH<sub>3</sub>).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 533.2512

gef.: 533.2515 (M+H<sup>+</sup>)

8.4.28 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-(4-methoxyphenylamino)-2'-desoxyguanosin **86**



Die Reaktion wurde nach AAV 2 durchgeführt. Es wurden 200 mg (0.26 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-(4-methoxyphenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **79** und 10 ml Tetrahydrofuran eingesetzt. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch über Kieselgel mit 5 % Methanol in Dichlormethan.

Reaktionszeit: 3.5 h

Ausbeute: 129 mg (0.24 mmol, 91 %) eines hellrosa Feststoffs.

DC: R<sub>F</sub>-Wert (Dichlormethan / Methanol 9:1): 0.49

<sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 10.20 (s, 1H, NH), 8.97 (s, 1H, NH), 7.67-7.63 (m, 2H, ANIS-H), 7.55-7.52 (m, 2H, β-H), 7.40-7.31 (m, 3H, γ-H), 6.91-6.87 (m, 2H, ANIS-H), 6.53 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.6, 5.8 Hz, 1H, H1'), 5.84 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.9, 4.9 Hz, 1H, 5'OH), 5.58 (d, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 12.5 Hz, 1H, α-Ha), 5.55

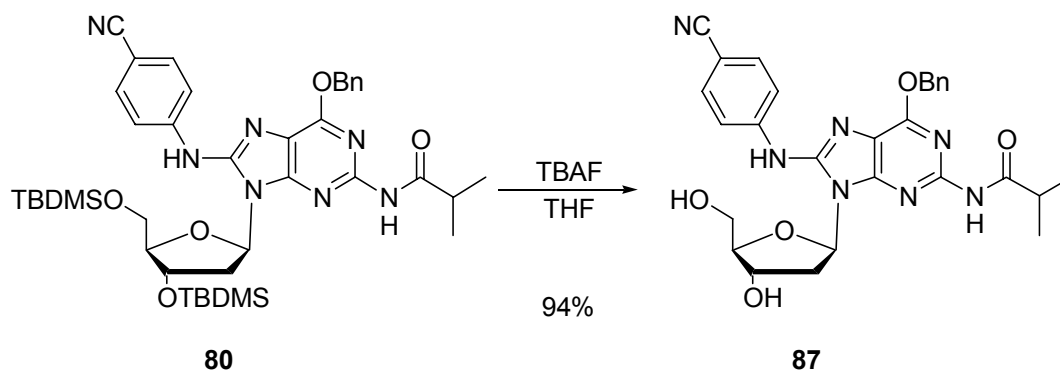
(d,  $^2J_{\text{HH}} = 12.5$  Hz, 1H,  $\alpha$ -Hb), 5.36 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 2.5$  Hz, 1H, 3'OH), 4.46 (dddd,  $^3J_{\text{HH}} = 1.6, 2.0, 2.5, 6.0$  Hz, 1H, H3'), 3.97 (ddd,  $^3J_{\text{HH}} = 2.4, 2.0, 2.4$  Hz, 1H, H4'), 3.75 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 2.4, 4.9$  Hz, 2H, H5a+b'), 3.71 (s, 3H, ANIS-CH<sub>3</sub>), 2.83 (sept,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz, 1H, iBu-H), 2.64 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.1, ^3J_{\text{HH}} = 9.6, 6.0$  Hz, 1H, H2a'), 2.06 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.1, ^3J_{\text{HH}} = 5.8, 1.6$  Hz, 1H, H2b'), 1.09 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>), 1.09 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 174.9 (iBu-C(O)), 156.3, 154.7, 152.9, 149.5, 148.6, 136.9, 133.0, 129.0, 128.6, 128.3, 120.6, 114.9, 114.0, 87.6 (C4'), 83.3 (C1'), 71.5 (C3'), 67.5 ( $\alpha$ -C), 61.5 (C5'), 55.4 (ANIS-CH<sub>3</sub>), 38.2 (C2'), 34.5 (iBu-CH), 19.6 (iBu-CH<sub>3</sub>), 19.5 (iBu-CH<sub>3</sub>).

MS (HRFAB; *m/z*): ber.: 549.2462

gef.: 549.2436 (M+H<sup>+</sup>)

#### 8.4.29 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-(4-cyanophenylamino)-2'-desoxyguanosin **87**



Die Reaktion wurde nach AAV 2 durchgeführt. Es wurden 244 mg (0.32 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-(4-cyanophenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxy-guanosin **80** und 4 ml Tetrahydrofuran eingesetzt. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch über Kieselgel mit 10 % Methanol in Dichlormethan.

Reaktionszeit: 5 h

Ausbeute: 162 mg (0.30 mmol, 94 %) eines farblosen Feststoffs.

DC: *R*<sub>f</sub>-Wert (Dichlormethan / Methanol 9:1): 0.39

$^1\text{H}$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 10.31 (s, 1H, NH), 9.55 (s, 1H, NH), 7.99-7.96 (m, 2H, pCPA-H), 7.78-7.75 (m, 2H, pCPA-H), 7.57-7.55 (m, 2H,



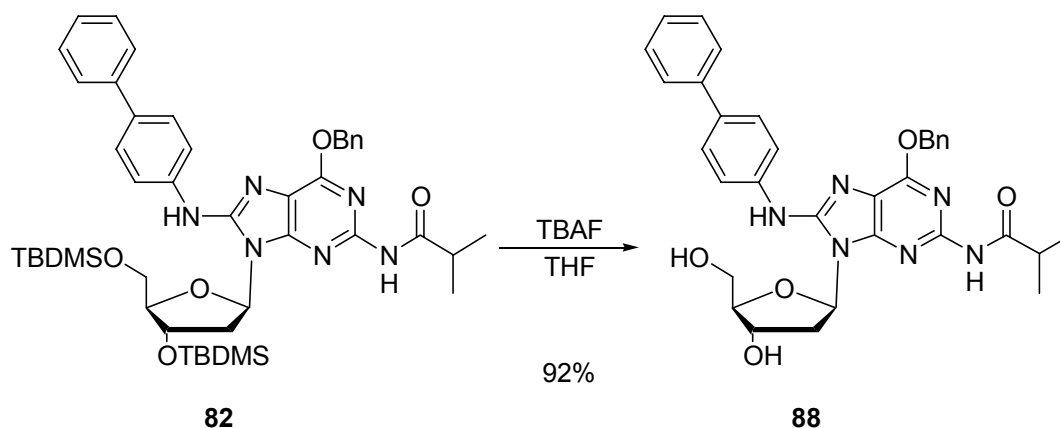
$\beta$ -H), 7.41-7.33 (m, 3H,  $\gamma$ -H), 6.55 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 9.5, 5.8$  Hz, 1H, H1'), 5.97 (s, 1H, 5'OH), 5.62 (d,  $^2J_{\text{HH}} = 12.1$  Hz, 1H,  $\alpha$ -Ha), 5.59 (d,  $^2J_{\text{HH}} = 12.1$  Hz, 1H,  $\alpha$ -Hb), 5.39 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 3.6$  Hz, 1H, 3'OH), 4.47 (dddd,  $^3J_{\text{HH}} = 1.7, 2.0, 3.6, 5.7$  Hz, 1H, H3'), 3.98 (ddd,  $^3J_{\text{HH}} = 2.0, 2.3, 2.3$  Hz, 1H, H4'), 3.76 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 2.3$  Hz, 2H, H5a+b'), 2.84 (sept,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, 1H, iBu-H), 2.65 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.2, ^3J_{\text{HH}} = 9.5, 5.7$  Hz, 1H, H2a'), 2.10 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.2, ^3J_{\text{HH}} = 5.8, 1.7$  Hz, 1H, H2b'), 1.09 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>), 1.09 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 175.0 (iBu-C(O)), 157.2, 152.5, 150.4, 146.7, 144.1, 136.7, 133.3, 129.1, 128.6, 128.4, 119.5, 118.4, 114.5, 103.2, 87.7 (C4'), 83.5 (C1'), 71.5 (C3'), 67.6 ( $\alpha$ -C), 61.5 (C5'), 38.6 (C2'), 34.5 (iBu-CH), 19.5 (iBu-CH<sub>3</sub>), 19.5 (iBu-CH<sub>3</sub>).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 544.2308

gef.: 544.2293 (M+H<sup>+</sup>)

#### 8.4.30 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-(4-biphenylamino)-2'-desoxy-guanosin **88**



Die Reaktion wurde nach AAV 2 durchgeführt. Es wurden 251 mg (0.30 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-(4-biphenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxy-guanosin **82** und 4 ml Tetrahydrofuran eingesetzt. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch über Kieselgel mit 10 % Methanol in Dichlormethan.

Reaktionszeit: 4.5 h

Ausbeute: 166 mg (0.28 mmol, 92 %) eines farblosen Feststoffs.

DC:  $R_f$ -Wert (Dichlormethan / Methanol 9:1): 0.39

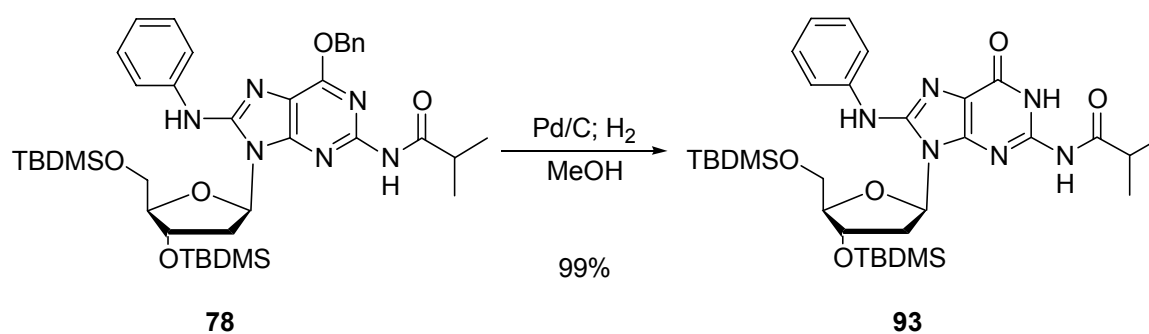
$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (500 MHz, DMSO- $d_6$ ): 10.26 (s, 1H, NH), 9.22 (s, 1H, NH), 7.89-7.28 (m, 14H,  $\beta$ -H+ $\gamma$ -H+ABP-H), 6.57 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 9.7, 5.7$  Hz, 1H, H1'), 5.94 (s, 1H, 5'OH), 5.61 (d,  $^2J_{\text{HH}} = 12.3$  Hz, 1H,  $\alpha$ -Ha), 5.59 (d,  $^2J_{\text{HH}} = 12.3$  Hz, 1H,  $\alpha$ -Hb), 5.39 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 3.6$  Hz, 1H, 3'OH), 4.48 (dddd,  $^3J_{\text{HH}} = 1.5, 2.0, 3.6, 5.8$  Hz, 1H, H3'), 3.99 (ddd,  $^3J_{\text{HH}} = 2.0, 2.2, 2.2$  Hz, 1H, H4'), 3.78 (s, 2H, H5a+b'), 2.84 (sept,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz, 1H, iBu-H), 2.67 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.1, ^3J_{\text{HH}} = 9.7, 5.8$  Hz, 1H, H2a'), 2.10 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.1, ^3J_{\text{HH}} = 5.7, 1.5$  Hz, 1H, H2b'), 1.10 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>), 1.09 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO- $d_6$ ): 175.0 (iBu-C(O)), 156.7, 152.8, 149.8, 147.9, 140.0, 139.4, 136.8, 133.7, 129.0, 128.6, 128.3, 127.0, 126.9, 126.3, 119.1, 114.8, 87.7 (C4'), 83.4 (C1'), 71.5 (C3'), 67.5 ( $\alpha$ -C), 61.5 (C5'), 38.4 (C2'), 34.5 (iBu-CH), 19.6 (iBu-CH<sub>3</sub>), 19.5 (iBu-CH<sub>3</sub>).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 595.2669

gef.: 595.2740 (M+H<sup>+</sup>)

#### 8.4.31 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-phenylamino-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **93**



Die Reaktion wurde nach AAV 3 durchgeführt. Es wurden 800 mg (1.07 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-phenylamino-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **78**, 50 mg Pd/C und 20 ml Methanol eingesetzt.

Ausbeute: 697 mg (1.06 mmol, 99 %) eines farblosen Feststoffs.

DC:  $R_f$ -Wert (Dichlormethan / Methanol 19:1): 0.31

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 11.99 (s, 1H, NH), 11.21 (s, 1H, NH), 8.66 (s, 1H, NH), 7.57-6.91 (m, 5H, AN-H), 6.32 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 8.7, 6.0$  Hz, 1H, H1'), 4.52-4.48 (m, 1H, H3'), 3.88-3.83 (m, 2H, H4'+ H5a'), 3.68 (dd,

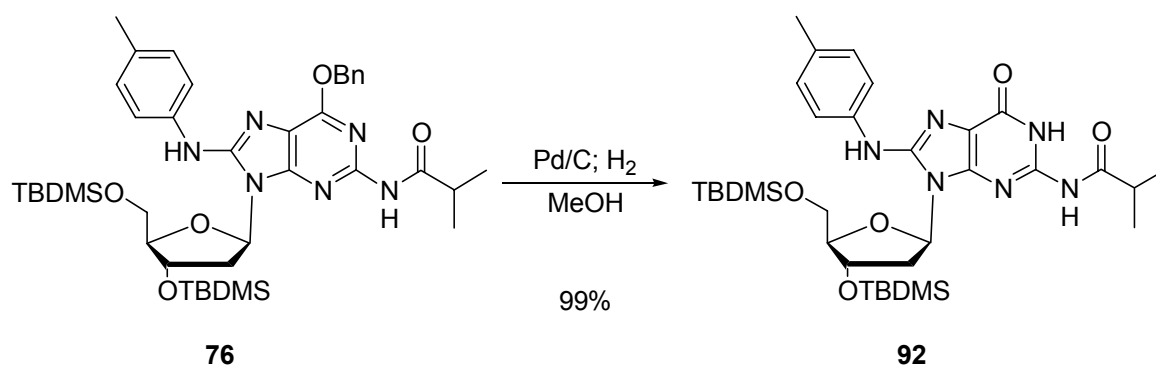
$^2J_{\text{HH}} = 13.5$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 7.9$  Hz, 1H, H5b'), 3.40 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.2$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 8.7$ , 5.9 Hz, 1H, H2a'), 2.75 (sept,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, 1H, iBu-H), 2.13 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.2$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ , 1.8 Hz, 1H, H2b'), 1.12 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>), 0.89 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.81 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.11 (s, 6H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.00 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.01 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 147.4, 146.3, 138.2, 129.9, 129.0, 118.0, 117.7, 87.6 (C4'), 83.7 (C1'), 73.2 (C3'), 63.1 (C5'), 36.5 (C2'), 34.8 (iBu-CH), 25.8 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.7 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 19.0 (iBu-CH<sub>3</sub>), 18.8 (iBu-CH<sub>3</sub>), 18.0 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.8 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.7 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -4.8 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.4 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.5 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

MS (HRFAB; *m/z*): ber.: 657.3616

gef.: 657.3577 (M+H<sup>+</sup>)

#### 8.4.32 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **92**



Die Reaktion wurde nach AAV 3 durchgeführt. Es wurden 500 mg (0.66 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **76**, 50 mg Pd/C und 15 ml Methanol eingesetzt.

Ausbeute: 437 mg (0.65 mmol, 99 %) eines farblosen Feststoffs.

DC: *R<sub>f</sub>*-Wert (Dichlormethan / Methanol 19:1): 0.36

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 12.02 (s, 1H, NH), 11.26 (s, 1H, NH), 8.53 (s, 1H, NH), 7.47-7.45 (m, 2H, TOL-H), 7.09-7.07 (m, 2H, TOL-H), 6.30 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 8.5$ , 6.1 Hz, 1H, H1'), 4.52 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 5.8$  Hz, 1H, H3'), 3.87-3.83 (m, 2H, H4'+ H5a'), 3.67 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.3$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 7.6$  Hz, 1H, H5b'), 3.38 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.3$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 8.5$ , 5.8 Hz, 1H, H2a'), 2.75 (sept,

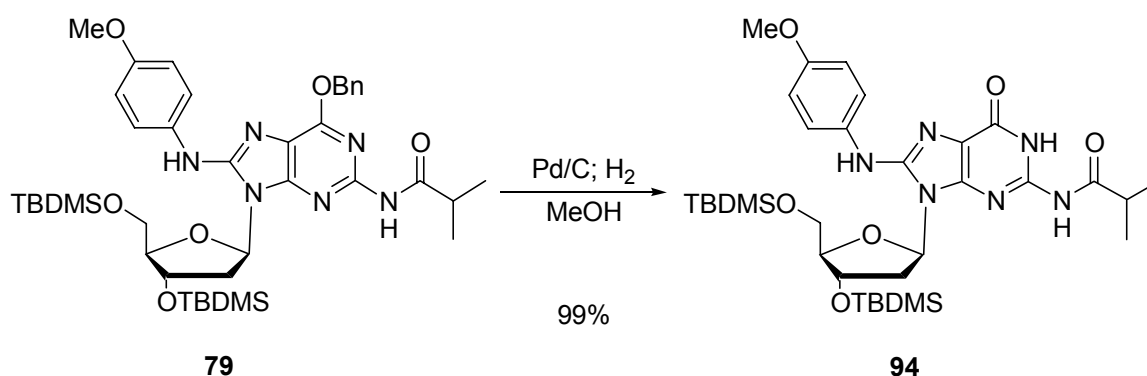
$^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz, 1H, iBu-H), 2.24 (s, 3H, TOL-CH<sub>3</sub>), 2.11 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.3$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 6.1$ , 1.8 Hz, 1H, H2b'), 1.12 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>), 1.12 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>), 0.89 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.82 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.11 (s, 6H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.00 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.01 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 147.4, 146.3, 138.2, 129.9, 129.0, 118.0, 117.7, 87.6 (C4'), 83.7 (C1'), 73.2 (C3'), 63.1 (C5'), 36.5 (C2'), 34.8 (iBu-CH), 25.8 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.7 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 20.3 (TOL-CH<sub>3</sub>), 19.0 (iBu-CH<sub>3</sub>), 18.8 (iBu-CH<sub>3</sub>), 18.0 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.8 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.7 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -4.8 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.4 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.5 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

MS (HRFAB; *m/z*): ber.: 671.3773

gef.: 671.3769 (M+H<sup>+</sup>)

#### 8.4.33 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-methoxyphenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **94**



Die Reaktion wurde nach AAV 3 durchgeführt. Es wurden 627 mg (0.81 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-(4-methoxyphenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **79**, 50 mg Pd/C und 15 ml Methanol eingesetzt.

Ausbeute: 549 mg (0.80 mmol, 99 %) eines farblosen Feststoffs.

DC: *R<sub>f</sub>*-Wert (Dichlormethan / Methanol 9:1): 0.58

$^1\text{H}$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 11.96 (s, 1H, NH), 11.18 (s, 1H, NH), 8.44 (s, 1H, NH), 7.50-7.48 (m, 2H, ANIS-H), 6.88-6.86 (m, 2H, ANIS-H), 6.30 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 8.7$ , 6.0 Hz, 1H, H1'), 4.50 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 5.8$  Hz, 1H, H3'), 3.88-3.84 (m, 2H, H4'+ H5a'), 3.71 (s, 3H, ANIS-CH<sub>3</sub>), 3.68 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.6$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 7.7$  Hz, 1H, H5b'), 3.40 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.2$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 8.7$ , 5.8 Hz, 1H,

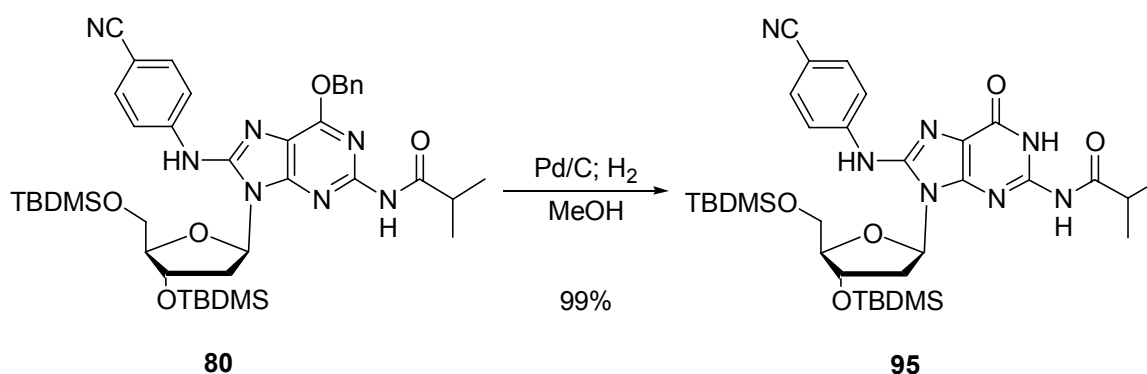
H2a'), 2.75 (sept,  $^3J_{\text{HH}}=6.9$  Hz, 1H, iBu-H), 2.11 (ddd,  $^2J_{\text{HH}}=13.2$ ,  $^3J_{\text{HH}}=6.0$ , 1.6 Hz, 1H, H2b'), 1.12 (d,  $^3J_{\text{HH}}=6.9$  Hz, 6H, iBu-CH<sub>3</sub>), 0.90 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.81 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.11 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.11 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.01 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.02 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 179.4 (iBu-C(O)), 154.3, 153.6, 147.3, 147.0, 145.5, 133.7, 120.2, 117.7, 113.8, 87.6 (C4'), 83.7 (C1'), 73.2 (C3'), 63.1 (C5'), 55.2 (ANIS-CH<sub>3</sub>), 36.5 (C2'), 34.7 (iBu-CH), 25.8 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 19.0 (iBu-CH<sub>3</sub>), 18.8 (iBu-CH<sub>3</sub>), 18.1 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.8 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.7 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -4.8 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.4 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.5 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 687.3722

gef.: 687.3723 (M+H<sup>+</sup>)

#### 8.4.34 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-cyanophenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **95**



Die Reaktion wurde nach AAV 3 durchgeführt. Es wurden 500 mg (0.65 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-(4-cyanophenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **80**, 50 mg Pd/C und 15 ml Methanol eingesetzt.

Ausbeute: 438 mg (0.64 mmol, 99 %) eines farblosen Feststoffs.

DC:  $R_f$ -Wert (Dichlormethan / Methanol 29:1): 0.43

<sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 12.03 (s, 1H, NH), 11.20 (s, 1H, NH), 9.40 (s, 1H, NH), 7.72-7.67 (m, 4H, pCPA-H), 6.31 (dd,  $^3J_{\text{HH}}=8.4$ , 6.1 Hz, 1H, H1'), 4.50 (ddd,  $^3J_{\text{HH}}=5.6$ , 1.8, 1.6 Hz, 1H, H3'), 3.86-3.77 (m, 2H, H4'+H5a'), 3.62 (dd,  $^2J_{\text{HH}}=10.2$ ,  $^3J_{\text{HH}}=5.0$  Hz, 1H, H5b'), 3.51 (ddd,  $^2J_{\text{HH}}=13.3$ ,  $^3J_{\text{HH}}=8.4$ , 5.6 Hz, 1H, H2a'), 2.76 (sept,  $^3J_{\text{HH}}=6.8$  Hz, 1H, iBu-H), 2.15 (ddd,  $^2J_{\text{HH}}=13.3$ ,  $^3J_{\text{HH}}=6.1$ , 1.8 Hz, 1H, H2b'), 1.13 (d,  $^3J_{\text{HH}}=$

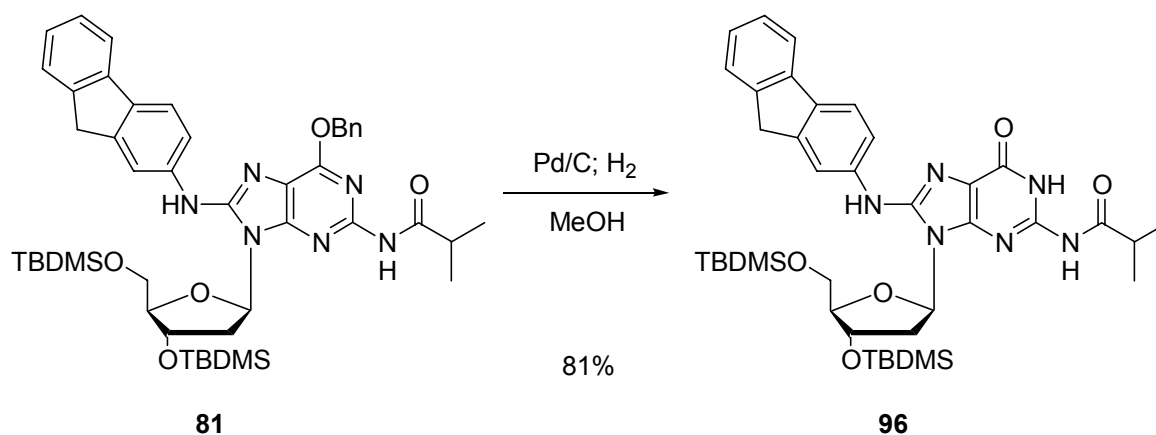
6.8 Hz, 6H, iBu-CH<sub>3</sub>), 0.89 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.81 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.10 (s, 6H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.02 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.03 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 179.5 (iBu-C(O)), 153.8, 147.5, 146.2, 145.5, 144.4, 133.2, 119.5, 117.9, 117.1, 102.0, 87.8 (C4'), 83.9 (C1'), 73.4 (C3'), 63.1 (C5'), 36.1 (C2'), 34.7 (iBu-CH), 25.7 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 19.0 (iBu-CH<sub>3</sub>), 18.7 (iBu-CH<sub>3</sub>), 18.0 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.8 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.7 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -4.8 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.4 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.5 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 682.3569

gef.: 682.3587 (M+H<sup>+</sup>)

#### 8.4.35 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(2-fluorenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **96**



Die Reaktion wurde nach AAV 3 durchgeführt. Es wurden 178 mg (0.21 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-(2-fluorenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxy-guanosin **81**, 20 mg Pd/C und 5 ml Methanol eingesetzt und der Rückstand anschließend am Chromatotron mit 0-2 % Methanol in Dichlormethan gereinigt.

Ausbeute: 129 mg (0.17 mmol, 81 %) eines farblosen Feststoffs.

DC: R<sub>F</sub>-Wert (Dichlormethan / Methanol 19:1): 0.46

<sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>): 12.16 (s, 1H, NH), 9.20 (s, 1H, NH), 8.11 (s, 1H, AF-H), 7.92 (s, 1H, NH), 7.91-7.21 (m, 6H, AF-H), 6.41 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3, 5.8 Hz, 1H, H1'), 4.53 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.2, 6.2, 3.4 Hz, 1H, H3'), 3.99 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.4, 3.9, 4.0 Hz 1H, H4'), 3.83 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.1, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.0 Hz, 1H, H5a'), 3.72 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.1, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.9 Hz, 1H, H5b'), 3.65 (s, 2H, AF-H), 2.91 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.3, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.2, 7.3 Hz, 1H, H2a'), 2.22 (ddd,

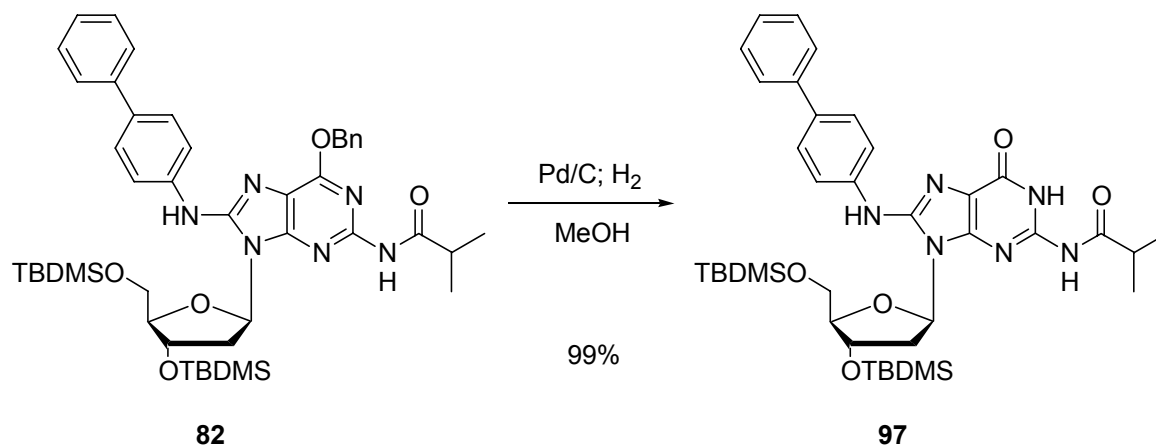
$^2J_{\text{HH}} = 13.3$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 5.8$ ,  $3.2$  Hz, 1H, H2b'), 2.15 (sept,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, 1H, iBu-H), 0.87 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>), 0.83 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.83 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>), 0.78 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.01 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.00 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.05 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.05 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (101 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>): 178.1 (iBu-C(O)), 155.3, 147.4, 146.9, 146.2, 144.9, 143.4, 142.4, 139.7, 136.1, 127.4, 127.0, 126.0, 125.3, 120.3, 119.5, 118.7, 117.6, 115.4, 88.3 (C4'), 85.7 (C1'), 72.6 (C3'), 63.3 (C5'), 39.8 (C2'), 37.4 (C-AF), 36.1 (iBu-CH), 26.2 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 26.1 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 19.0, 18.7 (iBu-CH<sub>3</sub>), 18.3 (iBu-CH<sub>3</sub>), -4.4 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -4.6 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.1 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.2 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 745.3929

gef.: 745.3924 (M+H<sup>+</sup>)

#### 8.4.36 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-biphenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **97**



Die Reaktion wurde nach AAV 3 durchgeführt. Es wurden 695 mg (0.84 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-(4-biphenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxy-guanosin **82**, 50 mg Pd/C und 20 ml Methanol eingesetzt.

Ausbeute: 614 mg (0.84 mmol, 99 %) eines farblosen Feststoffs.

DC:  $R_f$ -Wert (Dichlormethan / Methanol 19:1): 0.70

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 12.01 (s, 1H, NH), 11.21 (s, 1H, NH), 8.85 (s, 1H, NH), 7.69-7.58 (m, 6H, ABP-H), 7.44-7.40 (m, 2H, ABP-H), 7.31-7.27 (m, 1H, ABP-H), 6.35 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 8.6$ ,  $6.0$  Hz, 1H, H1'), 4.53-4.50 (m,

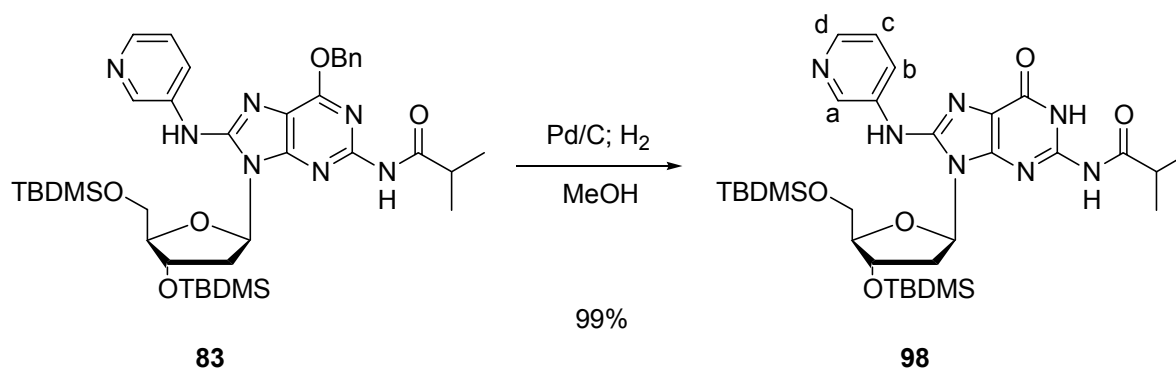
1H, H3'), 3.89-3.83 (m, 2H, H4'+H5a'), 3.68 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 14.0$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 8.4$  Hz, 1H, H5b') 3.46 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.3$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 8.6$ , 5.9 Hz, 1H, H2a'), 2.76 (sept,  $J = 6.7$  Hz, 1H, iBu-H), 2.15 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.3$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ , 1.6 Hz, 1H, H2b'), 1.13 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz, 6H, iBu-CH<sub>3</sub>), 0.89 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.82 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.11 (s, 6H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.00 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.01 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 179.5 (iBu-C(O)), 153.8, 147.4, 146.0, 145.8, 140.4, 139.9, 132.8, 128.8, 126.8, 126.7, 126.0, 118.1, 117.9, 87.7 (C4'), 83.8 (C1'), 73.3 (C3'), 63.1 (C5'), 36.4 (C2'), 34.7 (iBu-CH), 25.8 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 19.0 (iBu-CH<sub>3</sub>), 18.8 (iBu-CH<sub>3</sub>), 18.1, 17.9, -4.7 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -4.8 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.4 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.4 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 733.3929

gef.: 733.3916 (M+H<sup>+</sup>)

#### 8.4.37 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(3-pyridinylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **98**



Die Reaktion wurde nach AAV 3 durchgeführt. Es wurden 518 mg (0.69 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-(3-pyridinylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxy-guanosin **83**, 50 mg Pd/C und 15 ml Methanol eingesetzt.

Ausbeute: 451 mg (0.69 mmol, 99 %) eines hellrosa Feststoffs.

DC: R<sub>f</sub>-Wert (Dichlormethan / Methanol 19:1): 0.53

<sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 12.02 (s, 1H, NH), 11.20 (s, 1H, NH), 8.95 (s, 1H, NH), 8.74-8.73 (m, 1H, Ha), 8.15-8.08 (m, 2H, Hd+Hb), 7.33-7.29 (m, 1H, Hc), 6.33 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ , 6.2 Hz, 1H, H1'), 4.53-4.51 (m, 1H, H3'), 3.89-3.83 (m, 2H, H4'+H5a'), 3.70-3.64 (m, 1H, H5b'), 3.49 (ddd,



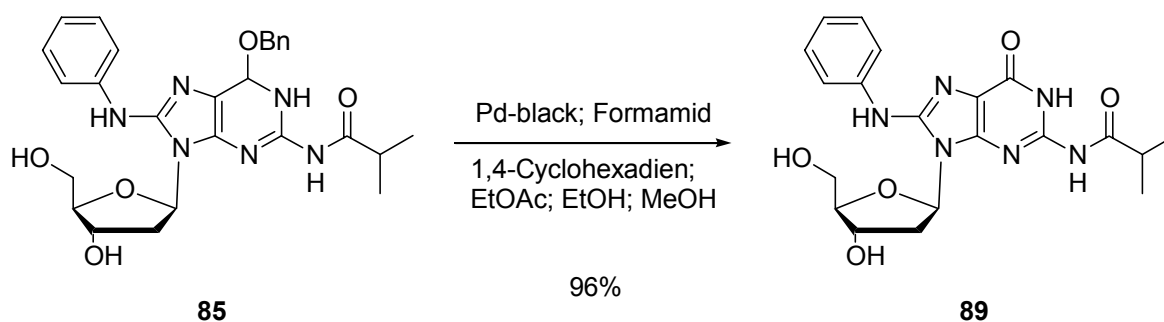
$^2J_{\text{HH}} = 13.4$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ , 5.7 Hz, 1H, H2a'), 2.76 (sept,  $J = 6.8$  Hz, 1H, iBu-H), 2.15 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.4$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 6.2$ , 1.6 Hz, 1H, H2b'), 1.12 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, 6H, iBu-CH<sub>3</sub>), 0.90 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.81 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.12 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.11 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.01 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.02 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 179.4 (iBu-C(O)), 147.4, 146.0, 145.7, 142.1, 139.9, 137.4, 124.4, 123.4, 117.7, 87.8 (C4'), 83.8 (C1'), 73.3 (C3'), 63.1 (C5'), 36.4 (C2'), 34.7 (iBu-CH), 25.7 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 19.0 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.7 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.0 (iBu-CH<sub>3</sub>), 17.8 (iBu-CH<sub>3</sub>), -4.7 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -4.8 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.4 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.5 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 658.3569

gef.: 658.3584 (M+H<sup>+</sup>)

#### 8.4.38 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-phenylamino-2'-desoxyguanosin **89** durch Debenzylierung



Die Reaktion wurde nach AAV 4 durchgeführt. Es wurden 150 mg (0.28 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-phenylamino-2'-desoxyguanosin **85** eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 1 Stunde.

Ausbeute: 117 mg (0.27 mmol, 96 %) eines farblosen Feststoffs.

DC:  $R_f$ -Wert (Dichlormethan / Methanol 9:1): 0.44

$^1\text{H}$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 11.98 (s, 1H, NH), 11.56 (s, 1H, NH), 8.87 (s, 1H, NH), 7.78-7.76 (m, 2H, AN-H), 7.30-7.26 (m, 2H, AN-H), 6.96-6.92 (m, 1H, AN-H), 6.42 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 9.9$ , 5.6 Hz, 1H, H1'), 5.99 (s, 1H, 5'-OH), 5.35 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 3.2$  Hz, 1H, 3'-OH), 4.44-4.43 (m, 1H, H3'), 3.97 (ddd,  $^3J_{\text{HH}} = 2.0$ , 2.0, 2.0 Hz, 1H, H4'), 3.77 (s, 2H, H5a'+H5b'), 2.73 (sept,  $J = 6.9$  Hz, 1H, iBu-H), 2.54 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 12.9$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 9.9$ , 5.9 Hz, 1H,

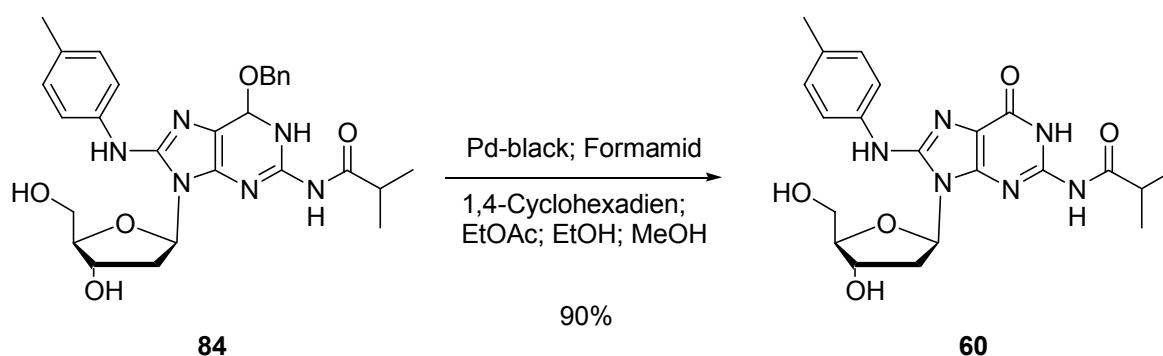
H2a'), 2.04 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 12.9$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 5.6$ , 1.3 Hz, 1H, H2b'), 1.11 (d,  $J = 6.9$  Hz, 6H, iBu-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 179.8 (iBu-C(O)), 153.7, 146.9, 146.6, 145.2, 140.2, 128.6, 121.2, 117.9, 116.3, 87.4 (C4'), 83.2 (C1'), 71.3 (C3'), 61.3 (C5'), 38.4 (C2'), 34.8 (iBu-CH), 18.9 (iBu-CH<sub>3</sub>).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 429.1886

gef.: 429.1934 (M+H<sup>+</sup>)

#### 8.4.39 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-2'-desoxyguanosin **60** durch Debenzylierung



Die Reaktion wurde nach AAV 4 durchgeführt. Es wurden 530 mg (1.00 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-2'-desoxyguanosin **84**, 4.8 ml Formamid, 4.8 ml Ethanol, 3.0 ml Methanol, 1.2 ml Essigsäureethylester, 3.6 ml 1,4-Cyclohexadien und 75.0 mg Palladium black eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 1.5 Stunden.

Ausbeute: 396 mg (0.90 mmol, 90 %) eines farblosen Feststoffs.

DC: R<sub>f</sub>-Wert (Dichlormethan / Methanol 9:1): 0.41

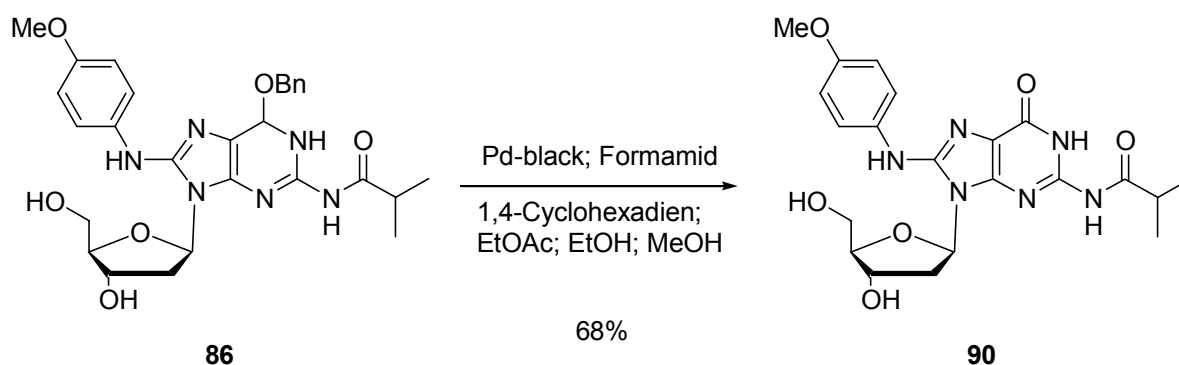
<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  [ppm] (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 11.97 (s, 1H, NH), 11.55 (s, 1H, NH), 8.78 (s, 1H, NH), 7.67-7.65 (m, 2H, TOL-H), 7.10-7.07 (m, 2H, TOL-H), 6.41 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 9.9$ , 5.5 Hz, 1H, H1'), 5.96 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 4.6$ , 4.6 Hz, 1H, 5'-OH), 5.34 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 3.4$  Hz, 1H, 3'-OH), 4.43 (ddd,  $^3J_{\text{HH}} = 3.4$ , 2.8, 1.4, 1H, H3') 3.96 (ddd,  $^3J_{\text{HH}} = 2.8$ , 1.9, 2.0 Hz, 1H, H4'), 3.78 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 11.8$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 4.6$ , 1.9 Hz, 1H, H5a'), 3.74 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 11.8$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 4.6$ , 2.0 Hz, 1H, H5b'), 2.73 (sept,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, 1H, iBu-H), 2.53 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.0$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 9.9$ , 5.8 Hz, 1H, H2a'), 2.25 (s, 3H, TOL-CH<sub>3</sub>), 2.03 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.0$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 5.5$ , 1.2 Hz, 1H, H2b'), 1.11 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, 6H, iBu-CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO- $d_6$ ): 179.9 (iBu-C(O)), 153.8, 147.0, 146.6, 145.6, 137.9, 130.2, 129.1, 118.1, 116.6, 87.5 (C4'), 83.4 (C1'), 71.5 (C3'), 61.4 (C5'), 38.5 (C2'), 34.9 (iBu-CH), 20.5 (TOL-CH<sub>3</sub>), 19.0 (iBu-CH<sub>3</sub>).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 443.2043

gef.: 443.2070 (M+H<sup>+</sup>)

#### 8.4.40 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-methoxyphenylamino)-2'-desoxyguanosin **90** durch Debenzylierung



Die Reaktion wurde nach AAV 4 durchgeführt. Es wurden 180 mg (0.33 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-(4-methoxyphenylamino)-2'-desoxyguanosin **86** eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 3 Stunden.

Ausbeute: 102 mg (0.22 mmol, 68 %) eines farblosen Feststoffs.

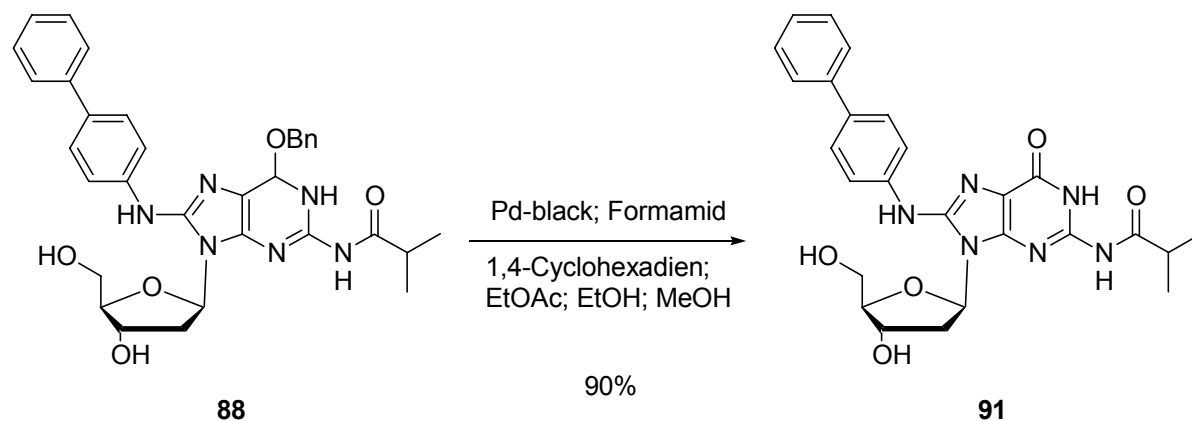
DC:  $R_f$ -Wert (Dichlormethan / Methanol 9:1): 0.28

$^1\text{H}$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 11.96 (s, 1H, NH), 11.55 (s, 1H, NH), 8.74 (s, 1H, NH), 7.68-7.65 (m, 2H, ANIS-H), 6.89-6.85 (m, 2H, ANIS-H), 6.40 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 9.9, 5.5$  Hz, 1H, H1'), 5.95 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 4.7, 4.7$  Hz, 1H, 5'-OH), 5.34 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 3.3$  Hz, 1H, 3'-OH), 4.43 (ddd,  $^3J_{\text{HH}} = 3.3, 4.5, 1.4$  Hz, 1H, H3'), 3.96 (ddd,  $^3J_{\text{HH}} = 2.0, 2.0, 2.0$  Hz, 1H, H4'), 3.77-3.75 (m, 2H, H5a'+H5b'), 3.72 (s, 3H, ANIS-CH<sub>3</sub>), 2.73 (sept,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz, 1H, iBu-H), 2.55 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.0, ^3J_{\text{HH}} = 9.9, 4.5$  Hz, 1H, H2a'), 2.03 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.0, ^3J_{\text{HH}} = 5.5, 1.4$  Hz, 1H, H2b'), 1.11 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz, 6H, iBu-CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO- $d_6$ ): 179.7 (iBu-C(O)), 154.1, 153.6, 146.9, 146.3, 145.8, 133.5, 119.6, 116.4, 113.8, 87.3 (C4'), 83.2 (C1'), 71.4 (C3'), 61.3 (C5'), 55.2 (ANIS-CH<sub>3</sub>), 38.3 (C2'), 34.7 (iBu-CH), 18.9 (iBu-CH<sub>3</sub>).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 459.1992  
gef.: 459.2007 (M+H<sup>+</sup>)

8.4.41 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-biphenylamino)-2'-desoxyguanosin **91** durch Debenzylierung



Die Reaktion wurde nach AAV 4 durchgeführt. Es wurden 152 mg (0.26 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-(4-biphenylamino)-2'-desoxyguanosin **88** eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 30 Minuten.

Ausbeute: 116 mg (0.23 mmol, 90 %) eines hellgelben Feststoffs.

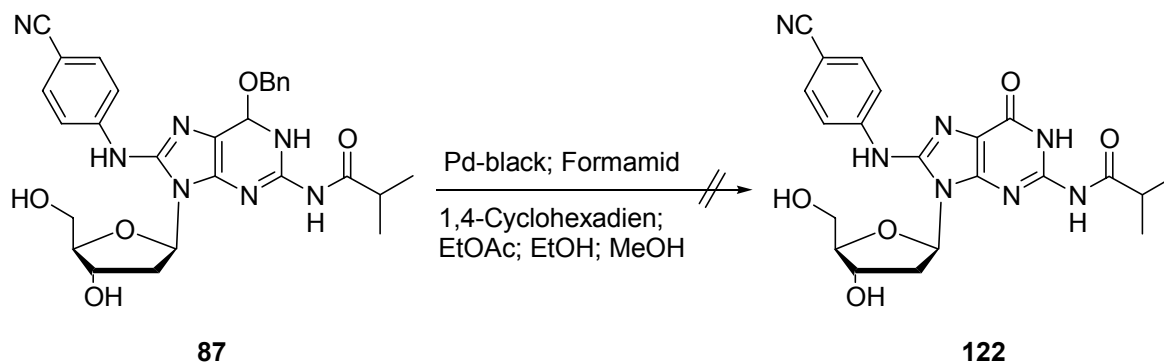
DC: R<sub>F</sub>-Wert (Dichlormethan / Methanol 9:1): 0.47

<sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 12.00 (s, 1H, NH), 11.59 (s, 1H, NH), 9.00 (s, 1H, NH), 7.89-7.87 (m, 2H, ABP-H), 7.64-7.60 (m, 4H, ABP-H), 7.45-7.41 (m, 2H, ABP-H), 7.32-7.29 (m, 1H, ABP-H), 6.44 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.9, 5.6 Hz, 1H, H1'), 6.05 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.6, 4.6 Hz, 1H, 5'-OH), 5.36 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.2 Hz, 1H, 3'OH), 4.48-4.43 (m, 1H, H3'), 4.00-3.97 (m, 1H, H4'), 3.83-3.75 (m, 2H, H5a'+H5b'), 2.74 (sept, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, 1H, *i*Bu-H), 2.56 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.0, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.9, 5.8 Hz, 1H, H2a'), 2.07 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.0, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.6 Hz, 1H, H2b'), 1.12 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, 6H, *i*Bu-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 179.7 (*i*Bu-C(O)), 153.6, 146.9, 146.6, 145.0, 139.9, 139.7, 132.9, 128.8, 126.8, 126.7, 126.1, 118.2, 116.4, 87.4 (C4'), 83.3 (C1'), 71.3 (C3'), 61.3 (C5'), 38.5 (C2'), 34.7 (*i*Bu-CH), 18.9 (*i*Bu-CH<sub>3</sub>).

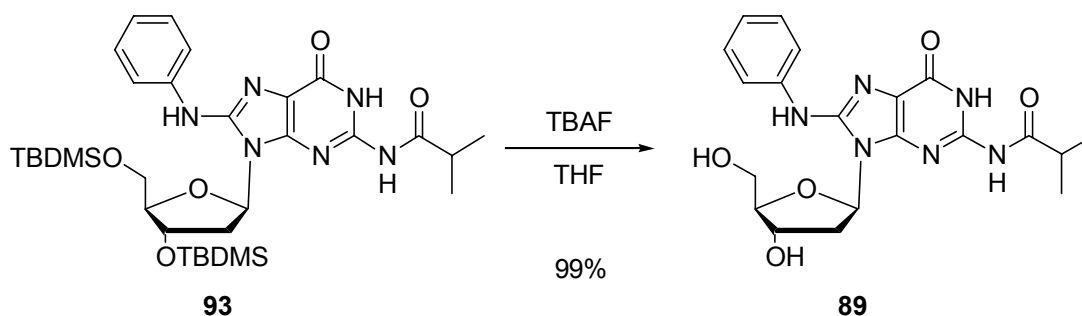
MS (HRFAB; m/z): ber.: 505.2199  
gef.: 505.2183 (M+H<sup>+</sup>)

8.4.42 Versuchte Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-cyanophenylamino)-2'-desoxyguanosin **122** durch Debenzylierung



Die Reaktion wurde nach AAV 4 durchgeführt. Es wurden 150 mg (0.28 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-(4-cyanophenylamino)-2'-desoxyguanosin **87** eingesetzt. Nach 3.5 Stunden Reaktionszeit konnten dünn-schichtchromatographisch Reste des Edukts, und sehr geringe Mengen Produkt nachgewiesen werden. Es hatte sich ein farbloser Niederschlag gebildet, der kein Produkt enthielt. Daraufhin wurde der Versuch abgebrochen.

8.4.43 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-phenylamino-2'-desoxyguanosin **89** durch Desilylierung



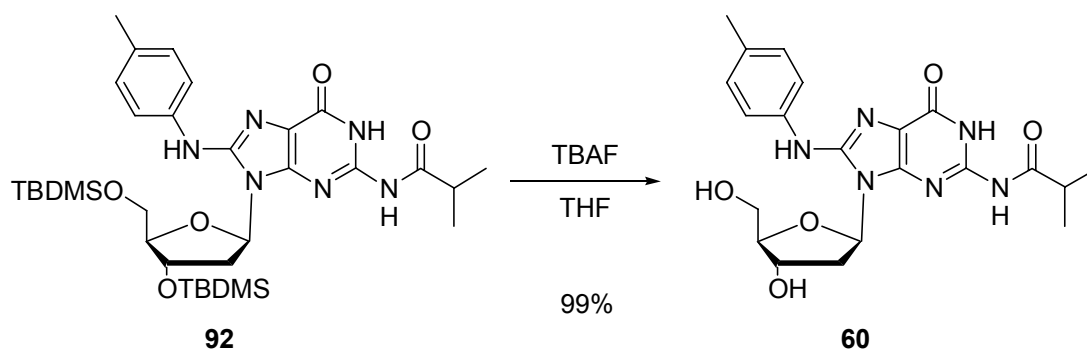
Die Reaktion wurde nach AAV 5 durchgeführt. Es wurden 330 mg (0.50 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-phenylamino-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyloxy)-2'-desoxyguanosin **93** in 6 ml absolutem Tetrahydrofuran eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 2 Stunden erfolgte die säulenchromatographische Reinigung mit 20 % Methanol in Dichlormethan und anschließende Entsalzung über eine Sephadex LH-20-Säule mit Methanol.

Ausbeute: 213 mg (0.50 mmol, 99 %) eines farblosen Feststoffs.

DC:  $R_f$ -Wert (Dichlormethan / Methanol 9:1): 0.44

Spektroskopische Daten: s. 8.4.38, S. 157

8.4.44 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-2'-desoxyguanosin **60** durch Desilylierung



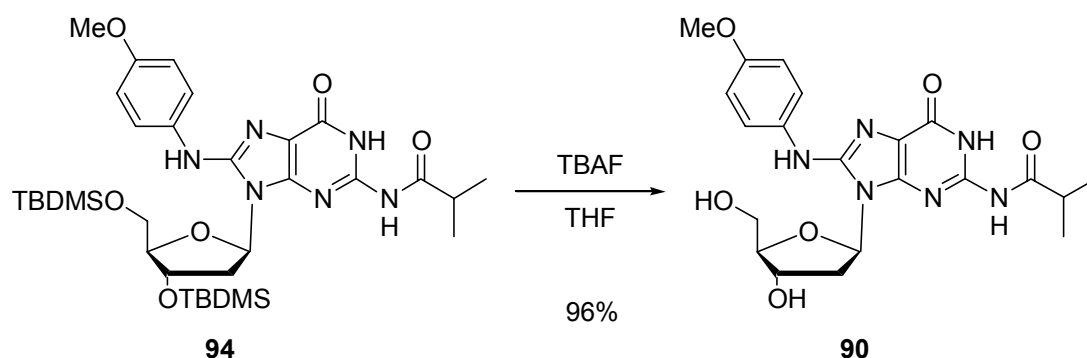
Die Reaktion wurde nach AAV 5 durchgeführt. Es wurden 876 mg (1.31 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxy-guanosin **92** in 10 ml absolutem Tetrahydrofuran eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 2 Stunden erfolgte die säulenchromatographische Reinigung mit 20 % Methanol in Dichlormethan und anschließende Entsalzung über eine Sephadex LH-20-Säule mit Methanol.

Ausbeute: 845 mg (1.91 mmol, 99 %) eines farblosen Feststoffs.

DC:  $R_f$ -Wert (Dichlormethan / Methanol 9:1): 0.41

Spektroskopische Daten: s. 8.4.39, S. 158

8.4.45 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-methoxyphenylamino)-2'-desoxyguanosin **90** durch Desilylierung



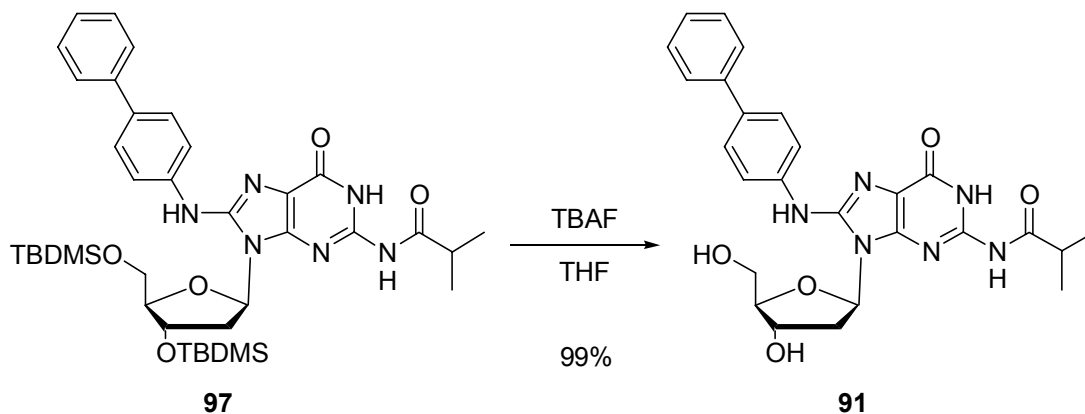
Die Reaktion wurde nach AAV 5 durchgeführt. Es wurden 550 mg (0.80 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-(4-methoxyphenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **94** in 8 ml absolutem Tetrahydrofuran eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 3 Stunden erfolgte die säulenchromatographische Reinigung mit 20 % Methanol in Dichlormethan und anschließende Entsalzung über eine Sephadex LH-20-Säule mit Methanol.

Ausbeute: 353 mg (0.77 mmol, 96 %) eines farblosen Feststoffs.

DC:  $R_f$ -Wert (Dichlormethan / Methanol 9:1): 0.28

Spektroskopische Daten: s. 8.4.40, S. 159

#### 8.4.46 Synthese von $N^2$ -*i*-Butyryl-8-*N*-(4-biphenylamino)-2'-desoxyguanosin **91** durch Desilylierung



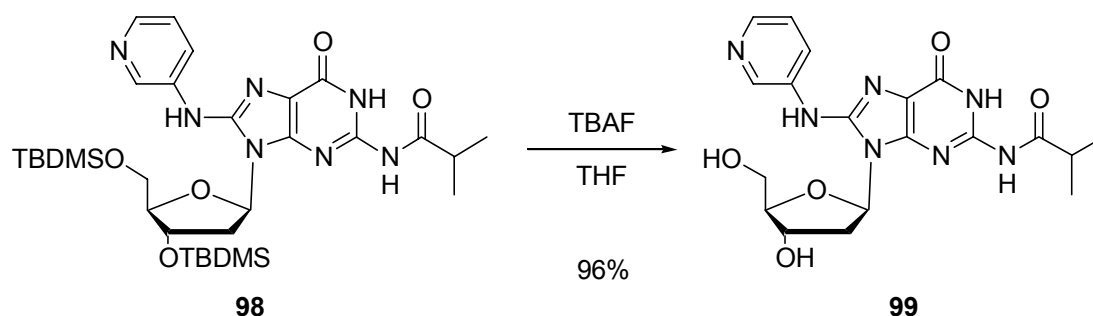
Die Reaktion wurde nach AAV 5 durchgeführt. Es wurden 421 mg (0.57 mmol)  $N^2$ -*i*-Butyryl- $O^6$ -benzyl-8-*N*-(4-biphenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxy-guanosin **97** in 8 ml absolutem Tetrahydrofuran eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 2 Stunden erfolgte die säulenchromatographische Reinigung mit 20 % Methanol in Dichlormethan und anschließende Entsalzung über eine Sephadex LH-20-Säule mit Methanol.

Ausbeute: 288 mg (0.57 mmol, 99 %) eines hellgelben Feststoffs.

DC:  $R_f$ -Wert (Dichlormethan / Methanol 9:1): 0.47

Spektroskopische Daten: s. 8.4.41, S. 160

8.4.47 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(3-pyridinylamino)-2'-desoxyguanosin **99** durch Desilylierung



Die Reaktion wurde nach AAV 5 durchgeführt. Es wurden 444 mg (0.67 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-benzyl-8-*N*-(3-pyridinylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxy-guanosin **98** in 8 ml absolutem Tetrahydrofuran eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 2.5 Stunden erfolgte die säulenchromatographische Reinigung mit 15 % Methanol in Dichlormethan und anschließende Entsalzung über eine Sephadex LH-20-Säule mit Methanol.

Ausbeute: 278 mg (0.65 mmol, 96 %) eines farblosen Feststoffs.

DC:  $R_f$ -Wert (Dichlormethan / Methanol 8:2): 0.54

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 12.01 (s, 1H, NH), 11.60 (s, 1H, NH), 9.12 (s, 1H, NH), 8.83-8.83 (m, 1H, APy-H), 8.35-8.32 (m, 1H, APy-H), 8.17-8.15 (m, 1H, APy-H), 7.35-7.32 (m, 1H, APy-H), 6.43 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 9.8, 5.5 Hz, 1H, H1'), 6.13, (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 4.5, 4.5 Hz, 1H, 5'-OH), 5.37 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 3.3 Hz, 1H, 3'-OH), 4.46-4.42 (m, 1H, H3'), 4.00-3.97 (m, 1H, H4'), 3.81-3.77 (m, 2H, H5a'+H5b'), 2.73 (sept, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, 1H, *i*Bu-H), 2.55 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 13.1, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 9.8, 5.7 Hz, 1H, H2a'), 2.07 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 13.1, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 5.5, 0.8 Hz, 1H, H2b'), 1.11 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, 6H, *i*Bu-CH<sub>3</sub>).

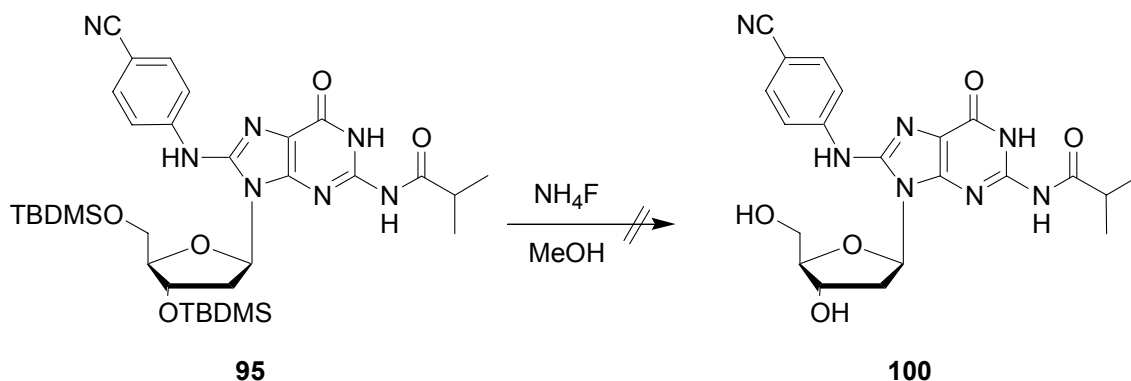
<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 179.8 (*i*Bu-C(O)), 153.7, 147.0, 146.8, 144.8, 142.2, 139.8, 136.9, 124.3, 123.4, 116.3, 87.4 (C4'), 83.4 (C1'), 71.4 (C3'), 61.3 (C5'), 38.6 (C2'), 34.7 (*i*Bu-CH), 18.9 (*i*Bu-CH<sub>3</sub>).

MS (HRFAB; *m/z*): ber.: 430.1839

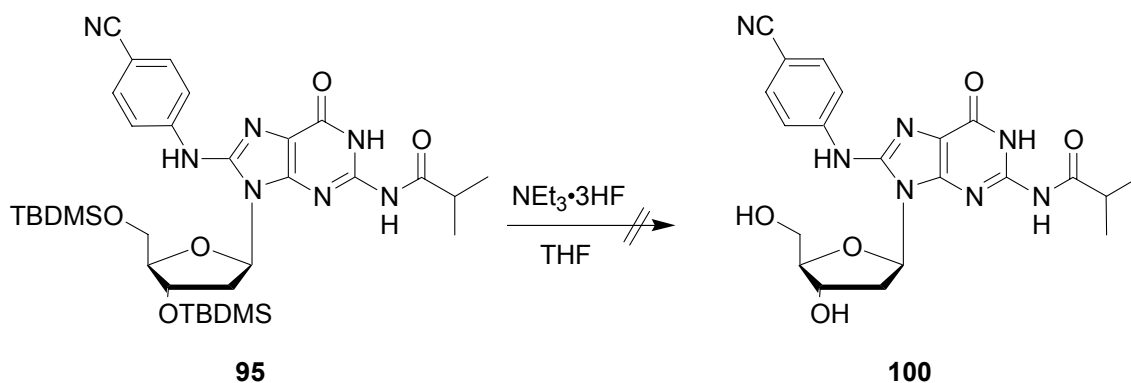
gef.: 430.1864 (M+H<sup>+</sup>)



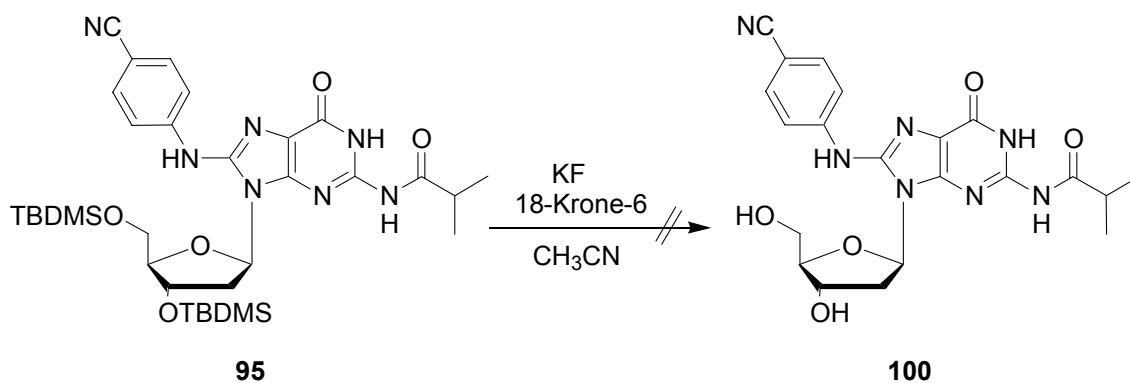
8.4.48 Versuchte Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-cyanophenylamino)-2'-desoxy-guanosin **100**



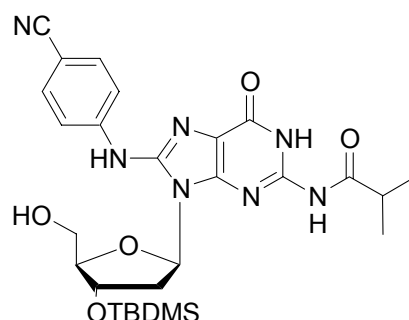
386 mg (0.57 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-cyanophenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **95** wurden in 15 ml Methanol gelöst, mit 210 mg Ammoniumfluorid versetzt und bei 60 °C gerührt. Da sich dünnschichtchromatographisch jedoch nur Zersetzung des Edukts feststellen ließ, wurde der Versuch abgebrochen.



80.0 mg (0.12 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-cyanophenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **95** wurden in 1 ml absolutem Dichlormethan gelöst, mit 1 ml absolutem Triethylamin und 191 µl Triethylamintrihydrofluorid versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Da sich dünnschichtchromatographisch jedoch nur Zersetzung des Edukts feststellen ließ, wurde der Versuch abgebrochen.



100 mg (0.15 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-cyanophenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **95** wurden in 1 ml absolutem Acetonitril gelöst, mit 2.84 mg (0.75 mmol) 18-Krone-6 und 25.8 mg (1.5 mmol) Kaliumfluorid versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand am Chromatotron mit 5-10% Methanol in Dichlormethan gereinigt und anschließend zur Entsalzung über eine Sephadex LH-20-Säule mit Methanol als Eluent getrennt. Es konnte allerdings nur die an 5'-Position entschützte Verbindung isoliert werden. Eine zweite Entschützung konnte auch dünnschichtchromatographisch nicht nachgewiesen werden.

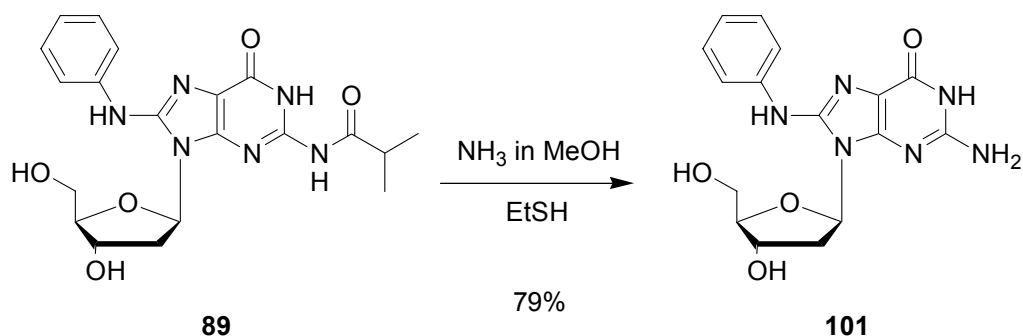


Ausbeute: 51.1 mg (0.09 mmol, 58 %) eines farblosen Feststoffs.

DC:  $R_f$ -Wert (Dichlormethan / Methanol 29:1): 0.35

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 11.79 (s, 1H, NH), 9.29 (s, 1H, NH), 7.92-7.73 (m, 4H, pCPA-H), 6.37 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 9.3, 5.7 Hz, 1H, H1'), 4.62-4.58 (m, 1H, H3'), 3.98-3.95 (m, 1H, H4'), 3.80-3.75 (m, 2H, H5a'+H5b'), 2.76 (sept, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, 1H, *i*Bu-H), 2.65 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 13.5, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 9.5, 6.2 Hz, 1H, H2a'), 2.10 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 13.5, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 5.9, 0.8 Hz, 1H, H2b'), 1.12 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, 6H, *i*Bu-CH<sub>3</sub>), -0.88 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -0.09 (s, 6H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

8.4.49 Synthese von 8-*N*-phenylamino-2'-desoxyguanosin **101** durch Entschützung der exocyclischen Aminogruppe



14.0 mg (32.7  $\mu\text{mol}$ ) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-phenylamino-2'-desoxyguanosin **89** wurden mit 1 ml einer ammoniakalischen Methanollösung und 17.5  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt und für 18.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand durch Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH-20 mit Methanol als Eluent aufgereinigt.

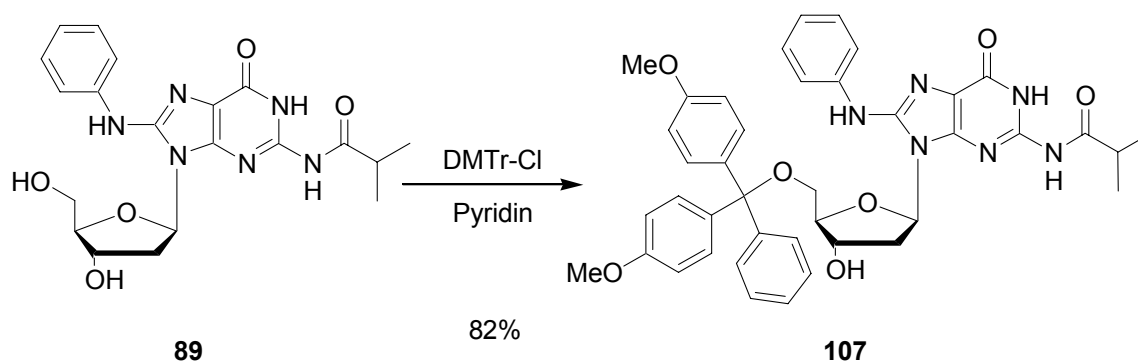
Ausbeute: 9.2 mg (25.8  $\mu\text{mol}$ , 79 %) eines farblosen Feststoffs.

DC:  $R_f$ -Wert (Dichlormethan / Methanol 8:2): 0.40

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  [ppm] (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 10.51 (s, 1H, NH), 8.60 (s, 1H, NH), 7.73-7.69 (m, 2H, AN-H), 7.26-7.21 (m, 2H, AN-H), 6.91-6.86 (m, 1H, AN-H), 6.33 (s, 1H, NH<sub>2</sub>), 6.31 (dd, <sup>3</sup> $J_{\text{HH}} = 9.8, 5.7$  Hz, 1H, H1'), 5.88 (s, 1H, 5'-OH), 5.30 (s, 1H, 3'-OH), 4.41-4.40 (m, 1H, H3'), 3.91 (ddd, <sup>3</sup> $J_{\text{HH}} = 1.8, 2.2, 2.2$  Hz, 1H, H4'), 3.74-3.74, (m, 2H, H5a'+H5b'), 2.54-2.47 (m, 1H, H2a'), 2.00 (ddd, <sup>2</sup> $J_{\text{HH}} = 12.9, ^3J_{\text{HH}} = 5.7, 1.8$  Hz, 1H, H2b').

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO- $d_6$ ): 155.6, 152.8, 149.4, 143.3, 140.8, 128.5, 120.6, 117.3, 112.1, 87.1 (C4'), 82.8 (C1'), 71.2 (C3'), 61.2 (C5'), 38.4 (C2').

8.4.50 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-phenylamino-*O*5'-dimethoxytrityl-2'-desoxy-guanosin **107**



Die Reaktion wurde nach AAV 6 durchgeführt. Es wurden 290 mg (0.68 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-phenylamino-2'-desoxyguanosin **89** in 15 ml absolutem Pyridin eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 3 Stunden erfolgte die säulenchromatographische Reinigung mit 0-5 % Methanol in Dichlormethan und anschließende Entsalzung über eine Sephadex LH-20-Säule mit Methanol.

Ausbeute: 407 mg (0.56 mmol, 82 %) eines hellgelben Feststoffs.

DC: R<sub>f</sub>-Wert (Dichlormethan / Methanol 9:1): 0.60

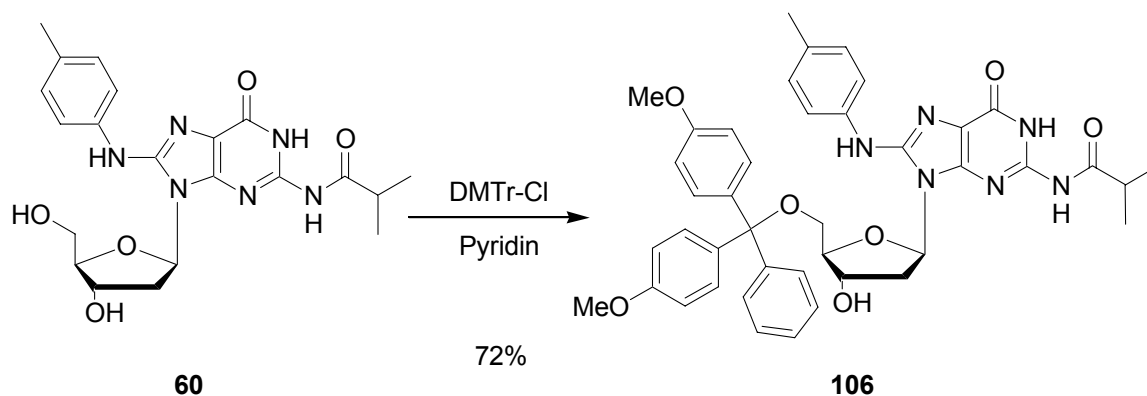
<sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 12.00 (s, 1H, NH), 11.06 (s, 1H, NH), 8.87 (s, 1H, NH), 7.68-7.65 (m, 2H, DMTr-H), 7.30-7.25 (m, 4H, DMTr-H), 7.17-7.10 (m, 7H, DMTr-H), 6.95-6.91 (m, 4H, AN-H), 6.73-6.64 (m, 1H, AN-H), 6.43 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.6, 5.8 Hz, 1H, H1'), 5.16 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.0 Hz, 1H, 3'OH), 4.53 (dddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.0, 7.2, 4.9, 4.8 Hz, 1H, H3'), 3.98 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.9, 4.8, 2.7 Hz, 1H, H4'), 3.67 (s, 3H, DMTr-CH<sub>3</sub>), 3.66 (s, 3H, DMTr-CH<sub>3</sub>), 3.47 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.2, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.9, Hz, 1H, H5a'), 3.18 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.2, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2, 5.8 Hz, 1H, H2a'), 3.08 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.2, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 2.7 Hz, 1H, H5b'), 2.70 (sept, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, 1H, *i*Bu-H), 2.23 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.2, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.6, 4.9 Hz, 1H, H2b'), 1.10 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, 3H, *i*Bu-CH<sub>3</sub>), 1.08 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, *i*Bu-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 179.6 (*i*Bu-C(O)), 157.9, 157.8, 153.7, 146.9, 145.9, 145.6, 144.9, 140.9, 135.7, 135.6, 129.7, 129.6, 128.6, 127.8, 127.4, 126.4, 121.0, 117.9, 117.5, 112.8, 112.7, 86.5 (C4'), 85.2, 83.1 (C1'), 70.8 (C3'), 64.8 (C5'), 54.9 (DMTr-CH<sub>3</sub>), 54.8 (DMTr-CH<sub>3</sub>), 37.4 (C2'), 34.6 (*i*Bu-CH), 19.0 (*i*Bu-CH<sub>3</sub>), 18.8 (*i*Bu-CH<sub>3</sub>).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 731.3193

gef.: 731.3215 (M+H<sup>+</sup>)

8.4.51 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-*O*5'-2'-desoxyguanosin **106**



Die Reaktion wurde nach AAV 6 durchgeführt. Es wurden 500 mg (1.13 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-*O*5'-2'-desoxyguanosin **60** in 25 ml absolutem Pyridin eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 3 Stunden erfolgte die säulenchromatographische Reinigung mit 0-5 % Methanol in Dichlormethan und anschließende Entsalzung über eine Sephadex LH-20-Säule mit Methanol.

Ausbeute: 605 mg (0.81 mmol, 72 %) eines hellgelben Feststoffs.

DC: R<sub>F</sub>-Wert (Dichlormethan / Methanol 9:1): 0.58

<sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 11.99 (s, 1H, NH), 11.04 (s, 1H, NH), 8.73 (s, 1H, NH), 7.57-6.65 (m, 17H, DMTr-H+TOL-H), 6.41 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4, 6.1 Hz, 1H, H1'), 5.15 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.2 Hz, 1H, 3'OH), 4.52 (dddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.2, 7.0, 4.9, 4.7 Hz, 1H, H3'), 3.98 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.0, 4.7, 2.7 Hz, 1H, H4'), 3.68 (s, 3H, DMTr-CH<sub>3</sub>), 3.67 (s, 3H, DMTr-CH<sub>3</sub>), 3.46 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.1, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.0, Hz, 1H, H5a'), 3.17 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.1, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.0, 6.1 Hz, 1H, H2a'), 3.08 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.1, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 2.7 Hz, 1H, H5b'), 2.70 (sept, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, 1H, 1H, *i*Bu-H), 2.25 (s, 3H, TOL-CH<sub>3</sub>), 2.22 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.1, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4, 4.9 Hz, 1H, H2b'), 1.10 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, 3H, *i*Bu-CH<sub>3</sub>), 1.08 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, 3H, *i*Bu-CH<sub>3</sub>).

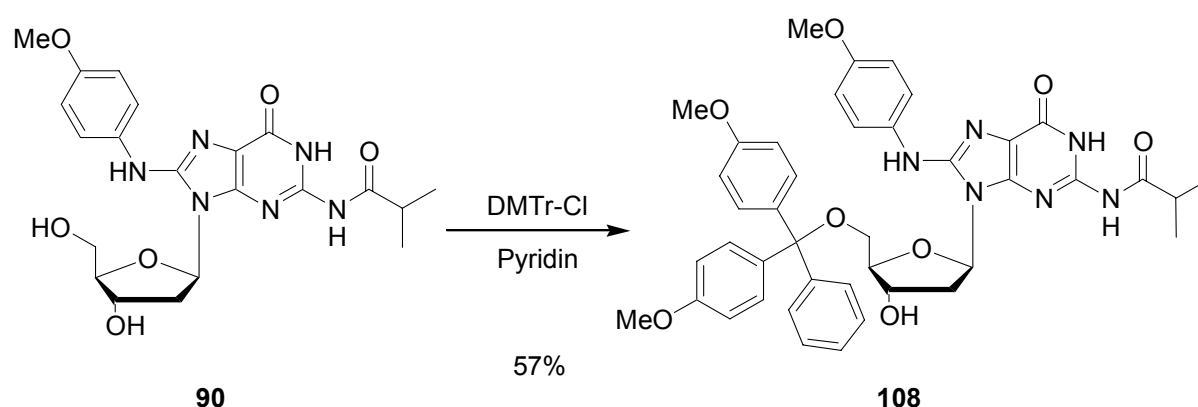
<sup>13</sup>C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 179.8 (*i*Bu-C(O)), 158.1, 158.0, 153.8, 147.1, 146.3, 145.7, 145.1, 138.4, 135.8, 135.7, 129.9, 129.9, 129.8, 129.2, 127.9, 127.6, 126.6, 118.0, 117.9, 112.9, 112.9, 86.6 (C4'), 85.3, 83.2 (C1'),

71.0 (C3'), 64.9 (C5'), 55.0 (DMTr-CH<sub>3</sub>), 55.0 (DMTr-CH<sub>3</sub>), 37.6 (C2'),  
34.7 (iBu-CH), 20.5 (TOL-CH<sub>3</sub>), 19.2 (iBu-CH<sub>3</sub>), 18.9 (iBu-CH<sub>3</sub>).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 745.3350

gef.: 745.3363 (M+H<sup>+</sup>)

#### 8.4.52 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-methoxyphenylamino)-*O*5'-*2*'-desoxyguanosin **108**



Die Reaktion wurde nach AAV 6 durchgeführt. Es wurden 340 mg (0.74 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-methoxyphenylamino)-*O*5'-*2*'-desoxyguanosin **90** in 20 ml absolutem Pyridin eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 2 Stunden erfolgte die säulenchromatographische Reinigung mit 0-5 % Methanol in Dichlormethan und anschließende Entsalzung über eine Sephadex LH-20-Säule mit Methanol.

Ausbeute: 321 mg (0.42 mmol, 57 %) eines farblosen Feststoffs.

DC: R<sub>F</sub>-Wert (Dichlormethan / Methanol 9:1): 0.57

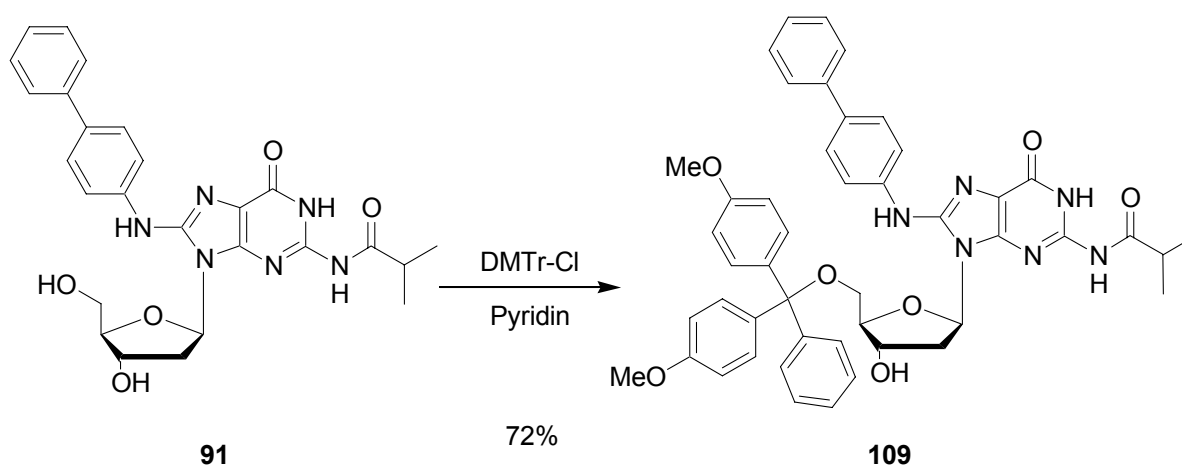
<sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 11.97 (s, 1H, NH), 11.04 (s, 1H, NH), 8.65 (s, 1H, NH), 7.61-6.65 (m, 17H, DMTr-H+ANIS-H), 6.40 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4, 6.3 Hz, 1H, H1'), 5.15 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.9 Hz, 1H, 3'OH), 4.52 (dddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.9, 7.0, 4.8, 4.6 Hz, 1H, H3'), 3.98 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.9, 4.6, 2.8 Hz, 1H, H4'), 3.72 (s, 3H, ANIS-CH<sub>3</sub>), 3.68 (s, 3H, DMTr-CH<sub>3</sub>), 3.67 (s, 3H, DMTr-CH<sub>3</sub>), 3.45 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.1, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.9 Hz, 1H, H5a'), 3.18 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.0, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.0, 6.3 Hz, 1H, H2a'), 3.08 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.1, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 2.8 Hz, 1H, H5b'), 2.70 (sept, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, 1H, iBu-H), 2.22 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.0, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4, 4.8 Hz, 1H, H2b'), 1.10 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>), 1.08 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO- $d_6$ ): 179.7 (iBu-C(O)), 158.1, 158.0, 154.2, 153.7, 147.1, 146.8, 145.6, 145.1, 135.8, 135.7, 134.1, 129.9, 129.8, 127.9, 127.6, 126.6, 119.7, 118.0, 114.0, 112.9, 112.9, 86.6 (C4'), 85.3, 83.2 (C1'), 71.0 (C3'), 64.9 (C5'), 55.4 (ANIS-CH<sub>3</sub>), 55.1 (DMTr-CH<sub>3</sub>), 55.0 (DMTr-CH<sub>3</sub>), 37.5 (C2'), 34.7 (iBu-CH), 19.2 (iBu-CH<sub>3</sub>), 18.9 (iBu-CH<sub>3</sub>).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 761.3299

gef.: 761.3324 (M+H<sup>+</sup>)

#### 8.4.53 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-biphenylamino)-*O*5'-2'-desoxyguanosin **109**



Die Reaktion wurde nach AAV 6 durchgeführt. Es wurden 695 mg (1.38 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-biphenylamino)-*O*5'-2'-desoxyguanosin **91** in 30 ml absolutem Pyridin eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 3 Stunden erfolgte die säulenchromatographische Reinigung mit 0-5 % Methanol in Dichlormethan und anschließende Entsalzung über eine Sephadex LH-20-Säule mit Methanol.

Ausbeute: 800 mg (0.99 mmol, 72 %) eines farblosen Feststoffs.

DC:  $R_f$ -Wert (Dichlormethan / Methanol 9:1): 0.63

$^1\text{H}$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 12.02 (s, 1H, NH), 11.07 (s, 1H, NH), 9.00 (s, 1H, NH), 7.78-6.65 (m, 22H, DMTr-H+ABP-H), 6.45 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 6.4$ , 6.0 Hz, 1H, H1'), 5.17 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 5.0$  Hz, 1H, 3'OH), 4.56-4.52 (m, 1H, H3'), 3.99 (ddd,  $^3J_{\text{HH}} = 8.0$ , 4.7, 2.7 Hz, 1H, H4'), 3.67 (s, 3H, DMTr-CH<sub>3</sub>), 3.66 (s, 3H, DMTr-CH<sub>3</sub>), 3.47 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 9.9$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 8.0$  Hz, 1H, H5a'), 3.20 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.1$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ , 6.4 Hz, 1H, H2a'), 3.09 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 9.9$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 2.7$  Hz, 1H, H5b'), 2.71 (sept,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz, 1H, iBu-H), 2.25 (ddd,

$^2J_{\text{HH}} = 13.1$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ , 6.0 Hz, 1H, H2b'), 1.11 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>), 1.09 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>).

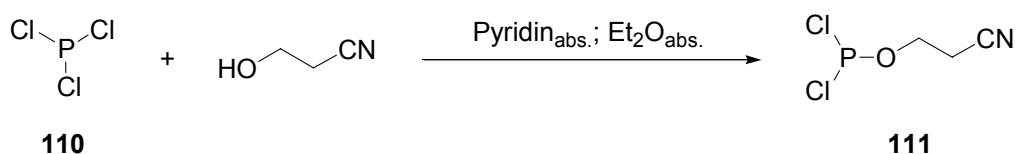
$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 179.6 (iBu-C(O)), 157.9, 157.8, 153.7, 146.9, 145.7, 144.9, 140.4, 139.9, 135.7, 135.6, 132.6, 129.7, 129.6, 128.9, 127.8, 127.4, 126.8, 126.6, 126.4, 126.0, 117.9, 117.9, 112.8, 112.7, 86.5 (C4'), 85.2, 83.2 (C1'), 70.8 (C3'), 64.8 (C5'), 54.9 (DMTr-CH<sub>3</sub>), 54.8 (DMTr-CH<sub>3</sub>), 37.4 (C2'), 34.6 (iBu-CH), 19.0 (iBu-CH<sub>3</sub>), 18.8 (iBu-CH<sub>3</sub>).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 807.3506

gef.: 807.3600 (M+H<sup>+</sup>)

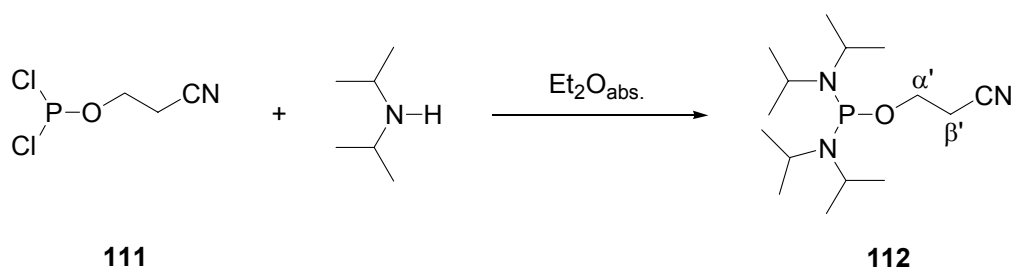
#### 8.4.54 Synthese des Phosphitylierungsreagenzes Bis-*N,N'*-Diisopropylamino-(2-cyanoethyl)-phosphit **112**

##### 8.4.54.1 Synthese von 2-Cyanoethylphosphordichlorid **111**



In einem ausgeheizten Kolben wurden unter Argonatmosphäre 13.7 g (0.10 mol; 8.6 ml) Phosphortrichlorid **110** in 8.1 ml (0.10 mol) absolutem Pyridin und 20 ml absolutem Diethylether gelöst, auf -78 °C abgekühlt und tropfenweise, über ca. 1.5 Stunden, mit 7.1 g (0.10 mol; 6.8 ml) 3-Hydroxypropionsäurenitril versetzt. Nach dem Auftauen auf Raumtemperatur und anschließendem 12 stündigem Nachrühren wurde der entstanden Niederschlag unter Schutzgas abfiltriert und 3 mal mit je 10 ml absolutem Diethylether gewaschen. Die Reaktionsmischung wurde im Ölpumpenvakuum vom Lösungsmittel befreit und der ölige Rückstand im Vakuum getrocknet. Die Rohausbeute betrug ca. 12.0 g. Die erhaltene Substanz wurde ohne weitere Reinigung zur weiteren Umsetzung eingesetzt.



8.4.54.2 Synthese von Bis-*N,N'*-Diisopropylamino-(2-cyanoethyl)-phosphit **112**

Unter Argonatmosphäre wurde das in 8.4.54.1. erhaltene Rohprodukt **111** in 100 ml absolutem Diethylether gelöst und bei -10 °C innerhalb einer Stunde mit 62.1 g (0.61 mol; 86.7 ml) *N,N'*-Diisopropylamin versetzt. Nach dem Auftauen auf Raumtemperatur und anschließendem zwölfstündigem Nachrühren wurde der entstandene Niederschlag unter Schutzgas abfiltriert und 3 mal mit je 20 ml absolutem Diethylether gewaschen. Die Reaktionsmischung wurde im Ölpumpenvakuum vom Lösungsmittel befreit. Der ölige Rückstand wurde mit 200 mg Calciumhydrid versetzt und bei 0.2 Torr über eine kleine Vigreuxkolonne destilliert. Die Übergangstemperatur lag bei 104–106 °C.

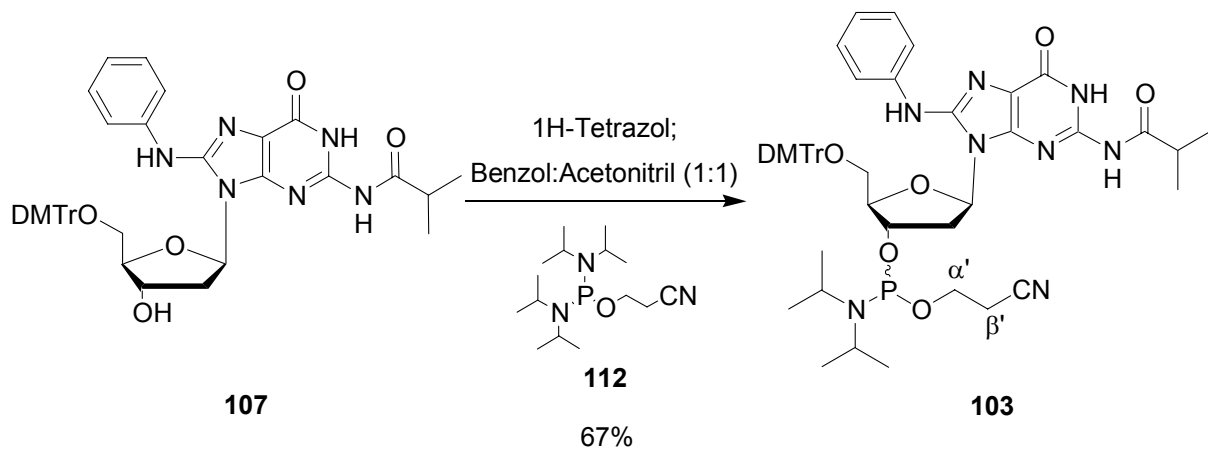
Ausbeute: 22.0 g (73.0 mmol, 73 % (über 2 Stufen)) eines farblosen Öls.

<sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>): 3.50-3.40 (m, 4H, iPr-H), 3.31-3.27 (m, 2H, α'H), 1.77-1.75 (m, 2H, β'H), 1.18-1.13 (m, 24H, iPr-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>): 127.6 (d, <sup>4</sup>J<sub>CP</sub> = 0.2 Hz, CN), 59.4 (d, <sup>2</sup>J<sub>CP</sub> = 0.2 Hz, α'-C), 44.6 (d, <sup>2</sup>J<sub>CP</sub> = 0.1 Hz, iPr-CH), 24.3 (d, <sup>3</sup>J<sub>CP</sub> = 0.1 Hz, iPr-CH<sub>3</sub>), 23.8 (d, <sup>3</sup>J<sub>CP</sub> = 0.1 Hz, iPr-CH<sub>3</sub>), 19.9 (d, <sup>3</sup>J<sub>CP</sub> = 0.1 Hz, β'-C).

<sup>31</sup>P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>): 123.34

8.4.55 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-phenylamino-*O*3'-[(2-cyanoethoxy)-(*N,N*-diisopropylamino)phosphinyl]-*O*5'-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **103**



Die Reaktion wurde nach AAV 7 durchgeführt. Es wurden 390 mg (0.53 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-phenylamino-*O*5'-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **107**, sowie 28.0 mg (0.40 mmol) 1H-Tetrazol und 241 mg (0.80 mmol) Bis-*N,N*-Diisopropylamino-(2-cyanoethyl)-phosphit **112** in 20 ml Acetonitril<sub>abs.</sub>/Benzol<sub>abs.</sub> (1:1) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 3 Stunden erfolgte die säulenchromatographische Reinigung über Aluminiumoxid mit 0-2 % Methanol in Dichlormethan und anschließende Gefriertrocknung mit Benzol.

Ausbeute: 332 mg (0.36 mmol, 67 %) eines farblosen Feststoffs.

DC: R<sub>f</sub>-Wert (Dichlormethan / Methanol 19:1): 0.36

<sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>) 2 Diastereomere: 11.11 (s, 2H, NH (A+B)), 9.61 (s, 2H, NH (A+B)), 8.07 (s, 2H, NH (A+B)), 7.85-6.70 (m, 36H, DMTr-H (A+B)+AN-H (A+B)), 6.42 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.6, 6.6 Hz, 1H, H1' (A)), 6.36 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.3, 6.3 Hz, 1H, H1' (B)), 4.88-4.80 (m, 2H, H3' (A+B)), 4.49-4.45 (m, 2H, H4' (A+B)), 3.67-3.26 (m, 26H, DMTr-CH<sub>3</sub> (A+B)+iPr-H (A+B)+H2a' (A+B)+H5'a+b (A+B)+α'Ha+b (A+B)), 2.92-2.86 (m, 1H, H2b' (B)), 2.65-2.59 (m, 1H, H2b' (A)), 2.50-2.39 (m, 3H, iBu-H (A+B)+β'Ha (A)), 2.17 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 17.2, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.8, 4.9 Hz, 1H, β'Hb (A)), 2.05 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 16.7, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.6, 5.6 Hz, 1H, β'Ha (B)), 1.93 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 16.7, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.9, 5.3 Hz, 1H, β'Hb (B)), 1.17-1.01 (m, 36H, iBu-CH<sub>3</sub> (A+B)+iPr-CH<sub>3</sub> (A+B)).

<sup>13</sup>C-NMR: δ [ppm] (126 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>) 2 Diastereomere: 178.7, 159.3, 159.2, 147.0, 146.8, 145.4, 145.3, 140.7, 140.6, 136.1, 136.1, 136.0, 136.0, 130.7, 130.6, 130.6, 130.5, 129.3, 128.8, 128.7, 128.6, 128.3, 128.2, 128.0, 127.2, 127.1,

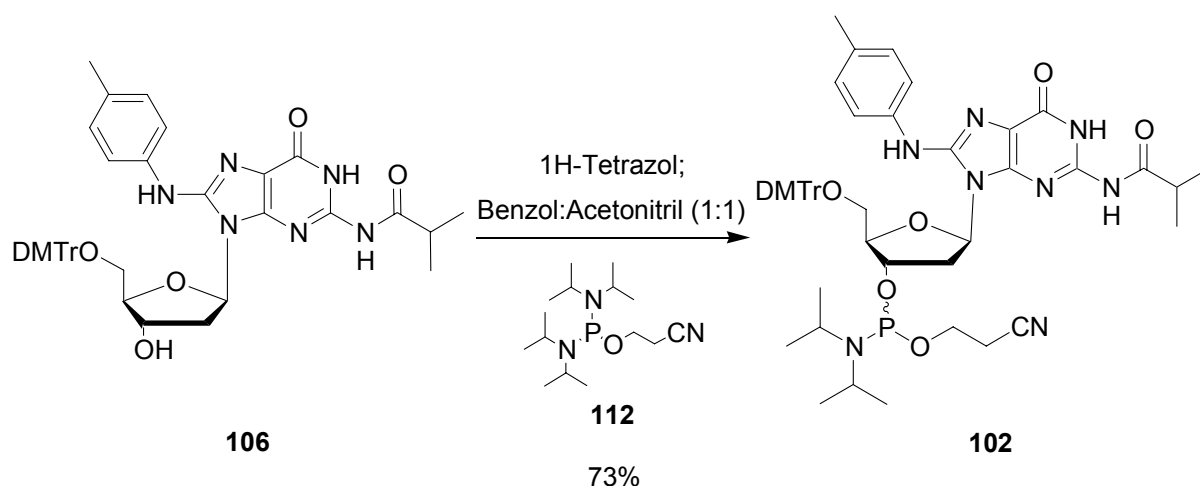
121.9, 121.9, 118.9, 118.7, 118.4, 118.2, 113.6, 87.1, 86.7, 86.6, 86.4, 86.4, 85.9, 75.1, 74.9, 74.1, 73.9, 64.1, 58.8, 58.6, 58.5, 58.4, 54.9, 54.9, 43.7, 43.6, 43.5, 43.5, 38.7, 38.5, 36.1, 24.8, 24.7, 24.6, 24.6, 20.6, 20.5, 20.3, 20.3, 19.3, 19.2, 19.1, 19.1, 1.4.

$^{31}\text{P}$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (202 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) 2 Diastereomere: 149.76, 147.90

MS (Maldi; m/z):ber.: 930.42

gef.: 932.12 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ), 954.12 ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ), 970.11 ( $\text{M}+\text{K}^+$ )

8.4.56 Synthese von  $N^2$ -*i*-Butyryl-8-*N*-(4-methylphenylamino)- $O3'$ -[(2-cyanoethoxy)-(*N,N*-diisopropylamino)phosphinyl]- $O5'$ -dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **102**



Die Reaktion wurde nach AAV 7 durchgeführt. Es wurden 500 mg (0.67 mmol)  $N^2$ -*i*-Butyryl-8-*N*-(4-methylphenylamino)- $O5'$ -dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **106**, sowie 46.9 mg (0.50 mmol) 1H-Tetrazol und 304 mg (1.01 mmol) Bis-*N,N'*-Diisopropylamino-(2-cyanoethyl)-phosphit **112** in 25 ml Acetonitril<sub>abs</sub>/Benzol<sub>abs</sub>. (1:1) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 3 Stunden erfolgte die säulenchromatographische Reinigung über Aluminiumoxid mit 0-2 % Methanol in Dichlormethan und anschließende Gefriertrocknung mit Benzol.

Ausbeute: 463 mg (0.49 mmol, 73 %) eines farblosen Feststoffs.

DC:  $R_f$ -Wert (Dichlormethan / Methanol 9:1): 0.58

$^1\text{H}$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) 2 Diastereomere: 12.01 (s, 2H, NH (A+B)), 9.19 (s, 2H, NH (A+B)), 8.92 (s, 2H, NH (A+B)), 7.74-6.69 (m, 34H, DMTr-H (A+B)+TOL-H (A+B)), 6.18 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 6.4, 6.0$  Hz, 1H, H1' (A)), 6.13 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 6.3, 6.0$  Hz, 1H, H1' (B)), 4.85-4.77 (m, 2H, H3' (A+B)),

4.50-4.45 (m, 2H, H4' (A+B)), 3.59-3.23 (m, 25H, DMTr-CH<sub>3</sub> (A+B)+iPr-H (A+B)+H2a' (B)+H5'a+b (A+B)+α'Ha+b (A+B)), 3.21-3.15 (m, 1H, H2a' (A)), 2.80 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 14.0, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.0, 3.0 Hz, 1H, H2b' (B)), 2.48 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.3, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.0, 2.9 Hz, 1H, H2b' (A)), 2.38 (sept, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.9 Hz, 1H, iBu-H (B)), 2.31-2.21 (m, 2H, iBu-H (A)+ βHa (B)), 2.15 (s, 6H, TOL-CH<sub>3</sub> (A+B)), 2.04-1.92 (m, 2H, β'Hb (B)+β'Ha (A)), 1.87 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 16.9, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.0, 5.6 Hz, 1H, β'Hb (A)), 1.14-0.95 (m, 36H, iBu-CH<sub>3</sub> (A+B) +iPr-CH<sub>3</sub> (A+B)).

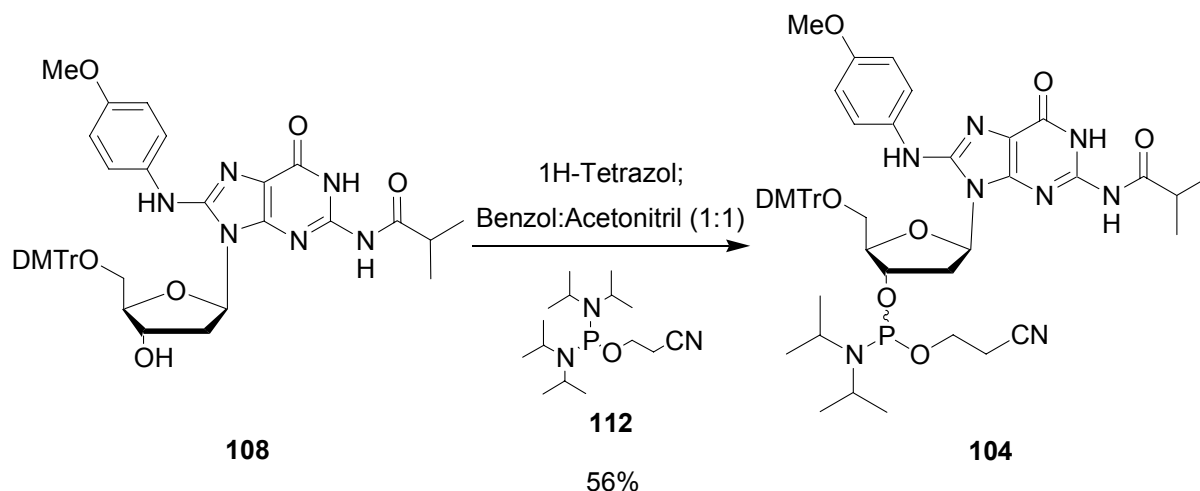
<sup>13</sup>C-NMR: δ [ppm] (126 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>) 2 Diastereomere: 178.8, 159.3, 159.2, 155.3, 155.2, 147.6, 147.3, 147.1, 146.4, 146.2, 145.4, 145.4, 138.3, 138.1, 136.1, 136.1, 136.0, 136.0, 131.1, 131.0, 130.7, 130.6, 130.6, 130.5, 129.8, 128.8, 128.7, 128.6, 128.3, 128.2, 128.0, 127.2, 127.1, 118.9, 118.9, 118.8, 118.6, 118.6, 118.3, 113.6, 113.6, 87.1, 86.7, 86.6, 86.4, 86.4, 85.8, 75.1, 74.9, 74.0, 73.9, 64.1, 58.8, 58.6, 58.5, 58.4, 54.9, 54.9, 43.6, 43.6, 43.5, 43.5, 38.7, 38.4, 36.2, 36.1, 24.8, 24.7, 24.6, 24.6, 20.9, 20.6, 20.6, 20.4, 20.3, 19.2, 19.2, 19.1, 1.4.

<sup>31</sup>P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>) 2 Diastereomere: 149.97, 147.79.

MS (Maldi; m/z):ber.: 944.43

gef.: 945.32 (M+H<sup>+</sup>), 967.34 (M+Na<sup>+</sup>), 983.31 (M+K<sup>+</sup>)

8.4.57 Synthese von  $N^2$ -*i*-Butyryl-8-*N*-(4-methoxyphenylamino)- $O3'$ -[(2-cyanoethoxy)-(*N,N*-diisopropylamino)phosphinyl]- $O5'$ -dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **104**



Die Reaktion wurde nach AAV 7 durchgeführt. Es wurden 395 mg (0.52 mmol)  $N^2$ -*i*-Butyryl-8-*N*-(4-Methoxyphenylamino)- $O5'$ -dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **108**, sowie 27.3 mg (0.39 mmol) 1H-Tetrazol und 235 mg (0.78 mmol) Bis-*N,N'*-Diisopropylamino-(2-cyanoethyl)-phosphit **112** in 20 ml Acetonitril<sub>abs.</sub>/Benzol<sub>abs.</sub> (1:1) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 4 Stunden erfolgte die säulenchromatographische Reinigung über Aluminiumoxid mit 0-2 % Methanol in Dichlormethan und anschließende Gefriertrocknung mit Benzol.

Ausbeute: 278 mg (0.29 mmol, 56 %) eines hellgelben Feststoffs.

DC:  $R_f$ -Wert (Dichlormethan / Methanol 19:1): 0.32

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) 2 Diastereomere: 10.99 (s, 2H, NH (A+B)), 9.63 (s, 2H, NH (A+B)), 7.70 (s, 2H, NH (A+B)), 7.67-6.70 (m, 34H, DMTr-H (A+B)+ANIS-H (A+B)), 6.34 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 6.6, 6.6$  Hz, 1H, H1' (A)), 6.27 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 6.5, 6.5$  Hz, 1H, H1' (B)), 4.86-4.78 (m, 2H, H3' (A+B)), 4.47-4.43 (m, 2H, H4' (A+B)), 3.64-3.16 (m, 32H, DMTr- $\text{CH}_3$  (A+B) +iPr-H (A+B)+H2a' (A+B)+H5'a+b (A+B)+ $\alpha'$ Ha+b (A+B), ANIS- $\text{CH}_3$  (A+B)), 2.79-2.72 (m, 1H, H2b' (B)), 2.54-2.35 (m, 4H, iBu-H (A+B)+H2b' (A)+ $\beta'$ Ha (A)), 2.18 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 17.0, ^3J_{\text{HH}} = 5.4, 5.4$  Hz, 1H,  $\beta'$ Hb (A)), 2.01 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 16.8, ^3J_{\text{HH}} = 5.8, 5.8$  Hz, 1H,  $\beta'$ Ha (B)), 1.94 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 16.8, ^3J_{\text{HH}} = 6.1, 6.1$  Hz, 1H,  $\beta'$ Hb (B)), 1.18-1.02 (m, 36H, iBu- $\text{CH}_3$  (A+B)+iPr- $\text{CH}_3$  (A+B)).

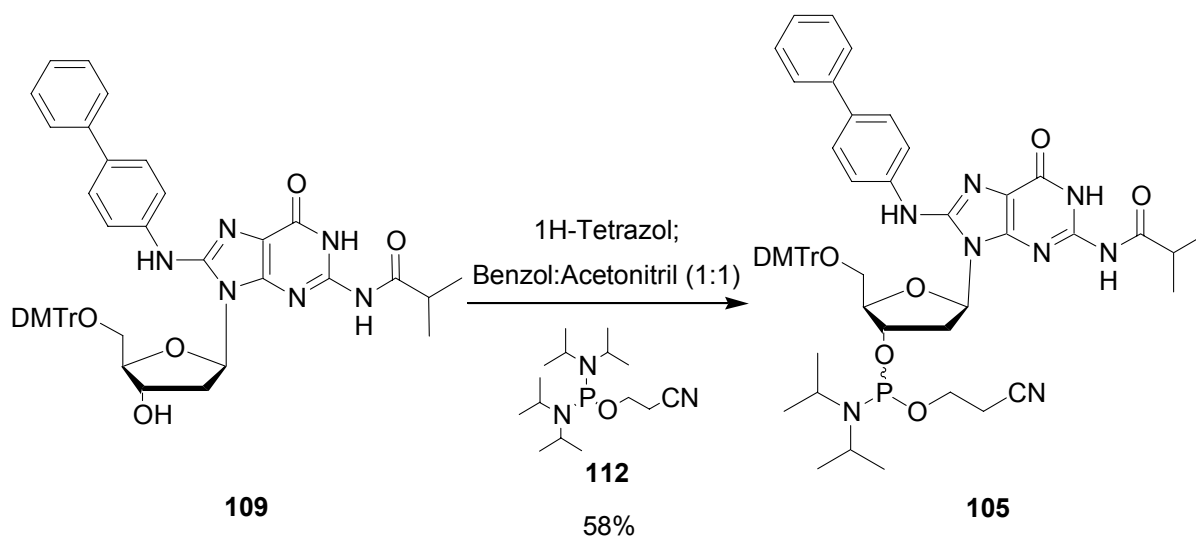
$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (126 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) 2 Diastereomere: 178.7, 159.3, 159.2, 155.5, 155.4, 147.6, 147.5, 145.3, 145.3, 136.1, 136.0, 136.0, 135.9, 133.9, 133.8, 130.7, 130.6, 130.6, 130.5, 128.8, 128.7, 128.6, 128.3, 128.2, 128.0, 127.2, 127.2, 120.4, 120.3, 118.9, 118.8, 118.2, 114.6, 113.6, 113.6, 87.1, 86.6, 86.5, 86.4, 86.3, 86.2, 85.6, 75.0, 74.8, 74.0, 73.8, 64.1, 64.0, 58.8, 58.6, 58.6, 58.5, 55.2, 54.9, 54.9, 43.6, 43.6, 43.5, 43.5, 38.6, 38.4, 36.1, 30.2, 24.8, 24.7, 24.6, 20.6, 20.5, 20.3, 20.3, 19.1, 1.4.

$^{31}\text{P}$ -NMR:  $\delta$  [ppm] (202 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) 2 Diastereomere: 149.36, 148.08.

MS (Maldi; m/z):ber.: 960.43

gef.: 961.86 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ), 983.97 ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ), 999.94 ( $\text{M}+\text{K}^+$ )

8.4.58 Synthese von  $N^2$ -*i*-Butyryl-8-*N*-(4-biphenylamino)- $O3'$ -[(2-cyanoethoxy)-(*N,N*-diisopropylamino)phosphinyl]- $O5'$ -dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **105**



Die Reaktion wurde nach AAV 7 durchgeführt. Es wurden 400 mg (0.50 mmol)  $N^2$ -*i*-Butyryl-8-*N*-(4-biphenylphenylamino)- $O5'$ -dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **109**, sowie 26.0 mg (0.37 mmol) 1H-Tetrazol und 224 mg (0.74 mmol) Bis-*N,N*-Diisopropylamino-(2-cyanoethyl)-phosphit **112** in 20 ml Acetonitril<sub>abs.</sub>/Benzol<sub>abs.</sub> (1:1) eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 2.5 Stunden erfolgte die säulenchromatographische Reinigung über Aluminiumoxid mit 0-2 % Methanol in Dichlormethan und anschließende Gefriertrocknung mit Benzol.

Ausbeute: 291 mg (0.29 mmol, 58 %) eines farblosen Feststoffs.

DC:  $R_f$ -Wert (Dichlormethan / Methanol 19:1): 0.51

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) 2 Diastereomere: 11.18 (s, 2H, NH (A+B)), 9.58 (s, 2H, NH (A+B)), 7.83 (s, 2H, NH (A+B)), 7.76-6.68 (m, 44H, DMTr-H (A+B)+ABP-H (A+B)), 6.27 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 6.4, 6.0$  Hz, 1H, H1' (A)), 6.21 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 6.3, 6.3$  Hz, 1H, H1' (B)), 4.85-4.75 (m, 2H, H3' (A+B)), 4.50-4.42 (m, 2H, H4' (A+B)), 3.60-3.28 (m, 25H, DMTr- $\text{CH}_3$  (A+B)+iPr-H (A+B)+H2a' (B)+H5'a+b (A+B)+ $\alpha'$ Ha+b (A+B)), 3.25-3.17 (m, 1H, H2a' (A)), 2.88-2.80 (m, 1H, H2b' (B)), 2.55 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.6, ^3J_{\text{HH}} = 6.0, 3.3$  Hz, 1H, H2b' (A)), 2.51-2.42 (m, 2H, iBu-H (A+B)), 2.37 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 16.8, ^3J_{\text{HH}} = 7.6, 4.7$  Hz, 1H,  $\beta'$ Ha (B)), 2.12 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 16.8, ^3J_{\text{HH}} = 6.2, 4.5$  Hz, 1H,  $\beta'$ Hb (B)), 2.00 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 16.8, ^3J_{\text{HH}} = 5.7, 5.7$  Hz, 1H,  $\beta'$ Ha (A)), 1.91 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 16.8, ^3J_{\text{HH}} = 6.9, 5.1$  Hz, 1H,  $\beta'$ Hb (A)), 1.19-1.02 (m, 36H, iBu- $\text{CH}_3$  (A+B)+iPr- $\text{CH}_3$  (A+B)).

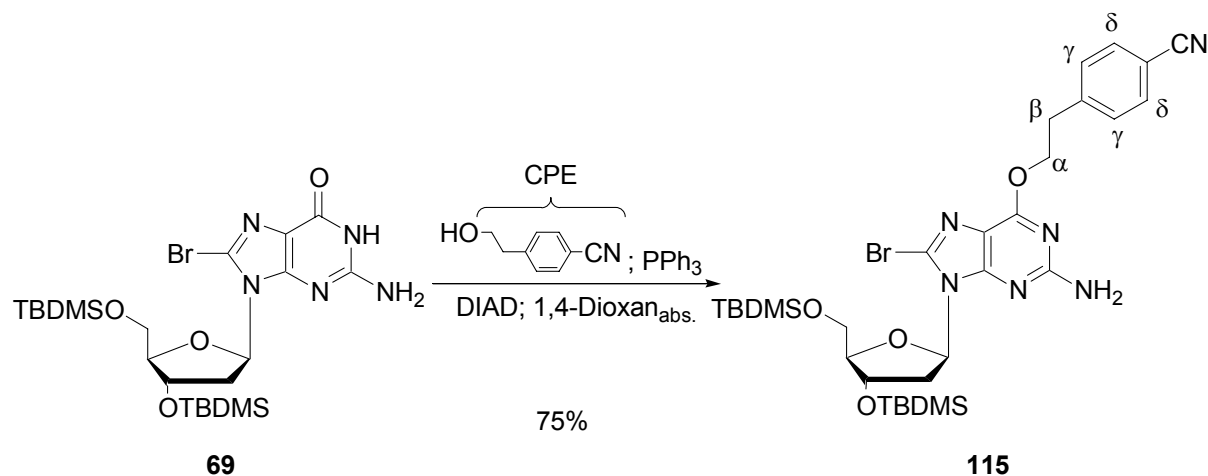
$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (126 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) 2 Diastereomere: 178.8, 159.3, 159.2, 146.8, 146.6, 145.4, 145.4, 141.4, 140.1, 140.0, 136.1, 136.1, 136.0, 136.0, 134.6, 134.6, 130.7, 130.7, 130.6, 130.6, 129.1, 128.8, 128.7, 128.6, 128.3, 128.2, 128.0, 127.5, 127.2, 127.2, 127.0, 126.9, 119.0, 118.8, 118.8, 118.3, 113.6, 113.6, 87.1, 86.7, 86.7, 86.4, 86.4, 85.9, 75.0, 74.8, 74.0, 73.9, 64.1, 58.8, 58.7, 58.6, 58.5, 54.9, 54.9, 45.7, 43.7, 43.6, 43.5, 38.8, 38.6, 36.1, 24.8, 24.7, 24.6, 20.6, 20.6, 20.4, 20.3, 19.1, 19.1, 1.4.

$^{31}\text{P-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (202 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) 2 Diastereomere: 149.71, 147.95.

MS (Maldi; m/z):ber.: 1006.46

gef.: 1008.19 ( $\text{M}+\text{H}^+$ ), 1030.16 ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ), 1046.17 ( $\text{M}+\text{K}^+$ )

8.4.59 Synthese von *O*<sup>6</sup>-(4-Cyanophenyl)ethyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **115**



Ein Kolben mit 1.00 g (1.74 mmol) 8-Br-3',5'-TBDMS-dG **69**, 1.37 g (5.22 mmol) Triphenylphosphin (PPh<sub>3</sub>) und 768 mg (5.22 mmol) 4-Cyanophenylethanol wurde 10 min im Ölpumpenvakuum evakuiert. Anschließend wurden, unter Argonatmosphäre, 20 ml absolutes 1,4-Dioxan über eine Spritze zugegeben. Nach zehnminütigem Rühren, wurde die Reaktionsmischung auf 0 °C abgekühlt und 1.02 ml Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) zugegeben. Die Reaktion wurde eine Stunde unter Lichtausschluss gerührt und aufgetaut. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand am Chromatotron gereinigt. Als Eluent diente Petrolether mit 10 % Essigsäureethylester.

Ausbeute: 914 mg (1.31 mmol, 75 %) eines farblosen Schaums.

DC: R<sub>f</sub>-Wert (Petrolether / Essigsäureethylester 2:1): 0.37

<sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 7.78-7.52 (m, 4H, δ-H+γ-H), 6.39 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.16 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.0, 6.7 Hz, 1H, H1'), 4.65 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.3, 6.3, 3.8 Hz, 1H, H3'), 4.63 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.7, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7, 6.7 Hz, 1H, α-Ha), 4.60 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.7, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7, 6.7 Hz, 1H, α-Hb), 3.79-3.73 (m, 2H, H4'+H5a'), 3.63-3.58 (m, 1H, H5b'), 3.50 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.3, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7, 6.3 Hz, 1H, H2a'), 3.16 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7, 6.7 Hz, 2H, β-H), 2.17 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.3, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.0, 3.8 Hz, 1H, H2b'), 0.89 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.78 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.11 (s, 6H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.05 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.08 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 159.4, 159.2, 154.8, 144.4, 132.4, 130.2, 124.9, 119.0, 114.5, 109.5, 87.2 (C4'), 85.1 (C1'), 72.4 (C3'), 65.8 (α-C),

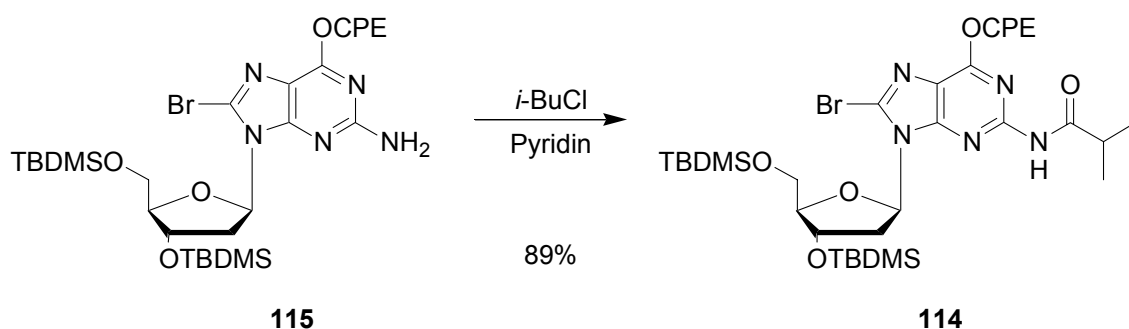


62.8 (C5'), 35.9 (C2'), 34.6 ( $\beta$ -C), 25.9 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.1 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.9 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.5 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -4.7 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.3 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.4 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 703.2459

gef.: 703.2458 (M+H<sup>+</sup>)

8.4.60 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-(4-Cyanophenyl)ethyl-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **114**



0.90 g (1.28 mmol) *O*<sup>6</sup>-CPE-8-Br-3',5'-TBDMS-dG **115** wurden zunächst zweimal mit je 4 ml Pyridin coevaporiert und danach in 10 ml absolutem Pyridin gelöst. Anschließend wurden langsam 0.27 ml Isobutyrylchlorid zugegeben und die Lösung wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 1 ml Methanol and anschließendem Rühren für 5 min wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum in eine Kühlfalle abkondensiert. Der Rückstand wurde 2 mal mit je 20 ml Toluol coevaporiert, und in 20 ml Dichlormethan und 20 ml Wasser gelöst. Nach Trennung der Phasen, wurde die wässrige Phase zweimal mit je 20 ml Dichlormethan extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen mit 20 ml Wasser gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über Natriumsulfat, wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und der Rückstand am Chromatotron gereinigt. Als Eluent diente Petrolether mit 10-25 % Essigsäureethylester.

Ausbeute: 884 mg (1.14 mmol, 89 %) eines farblosen Schaums.

DC: R<sub>F</sub>-Wert (Petrolether / Essigsäureethylester 2:1): 0.31

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  [ppm] (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 10.34 (s, 1H, NH), 7.78-7.54 (m, 4H,  $\delta$ -H+ $\gamma$ -H), 6.25 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4, 6.0 Hz, 1H, H1'), 4.95 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.1, 4.5, 6.5 Hz, 1H, H3'), 4.74 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.7, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8, 6.8 Hz, 1H,  $\alpha$ Ha), 4.72 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.7, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8, 6.8 Hz, 1H,  $\alpha$ Hb), 3.83-3.77 (m, 2H, H4'+H5a'), 3.67-3.62 (m, 1H, H5b'), 3.49 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.0, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.0,

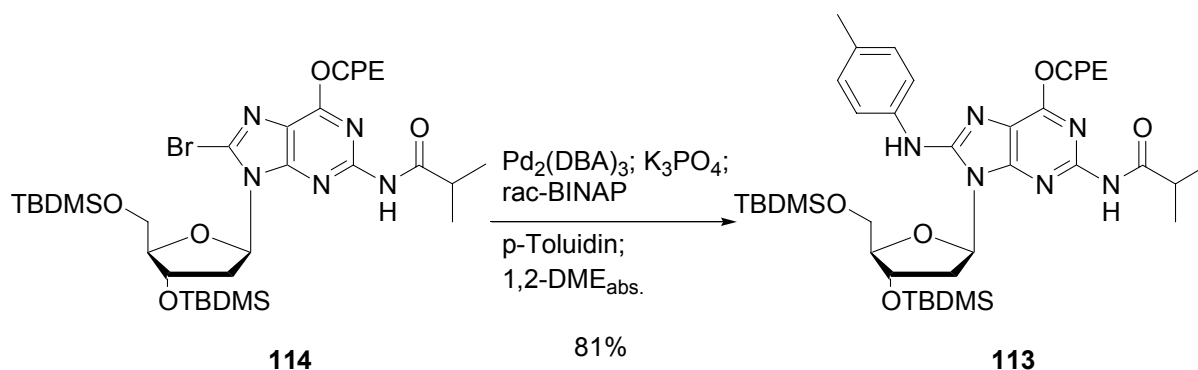
6.5 Hz, 1H, H2a'), 3.22 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ , 6.8 Hz, 2H,  $\beta\text{H}$ ), 2.76 (sept,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, 1H, iBu-H), 2.25 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.0$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 4.5$ , 7.4 Hz, 1H, H2b'), 1.08 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>), 1.07 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>), 0.88 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.75 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.13 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.11 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.10 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.13 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 174.5, 158.9, 153.1, 151.8, 144.2, 132.4, 130.2, 129.2, 119.0, 118.0, 109.5, 88.0 (C4'), 85.9 (C1'), 72.2 (C3'), 66.7 ( $\alpha$ -C), 63.4 (C5'), 36.7 (C2'), 34.7 (iBu-CH), 34.6 ( $\beta$ -C), 25.9 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.8 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 19.5 (iBu-CH<sub>3</sub>), 19.3 (iBu-CH<sub>3</sub>), 18.1 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.8 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.7 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -4.8 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.4 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.4 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 773.2878

gef.: 773.2843 (M+H<sup>+</sup>)

#### 8.4.61 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-(4-cyanophenyl)ethyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **113**



In einem ausgeheizten Kolben wurden, unter Argonatmosphäre, 300 mg (0.39 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-(4-cyanophenylethyl)-8-brom-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **114**, 123 mg (0.58 mmol) K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 35.5 mg (0.04 mmol) Tris(dibenzylidenaceton)dipalladium(0) (Pd<sub>2</sub>(DBA)<sub>3</sub>), 72.4 mg (0.12 mmol) racemisches 2,2'-Bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl (BINAP) und 83.1 mg (0.78 mmol) *p*-Toluidin eingewogen und in 15 ml absolutem 1,2-Dimethoxyethan (1,2-DME) gelöst. Anschließend wurde die Reaktionsmischung bei 80 °C 49 Stunden gerührt. Nach Abkühlen der Reaktion auf Raumtemperatur, wurde 1 ml gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung zugegeben und die Mischung kurz gerührt. Nach Zugabe von 10 ml gesättigter Natriumchloridlösung, wurden

die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 10 ml Essigsäureethylester extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen anschließend zweimal mit je 10 ml gesättigter Natriumchloridlösung und einmal mit einer Mischung aus 10 ml gesättigter Natriumchloridlösung und 2 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert. Durch chromatographische Aufreinigung am Chromatotron mit 20 % Essigsäureethylester in Petrolether konnte das Produkt als hellgelber Schaum erhalten werden.

Ausbeute: 252 mg (31.6 mmol, 81 %) einer hellgelben Schaums.

DC:  $R_f$ -Wert (Petrolether / Essigsäureethylester 2:1): 0.39

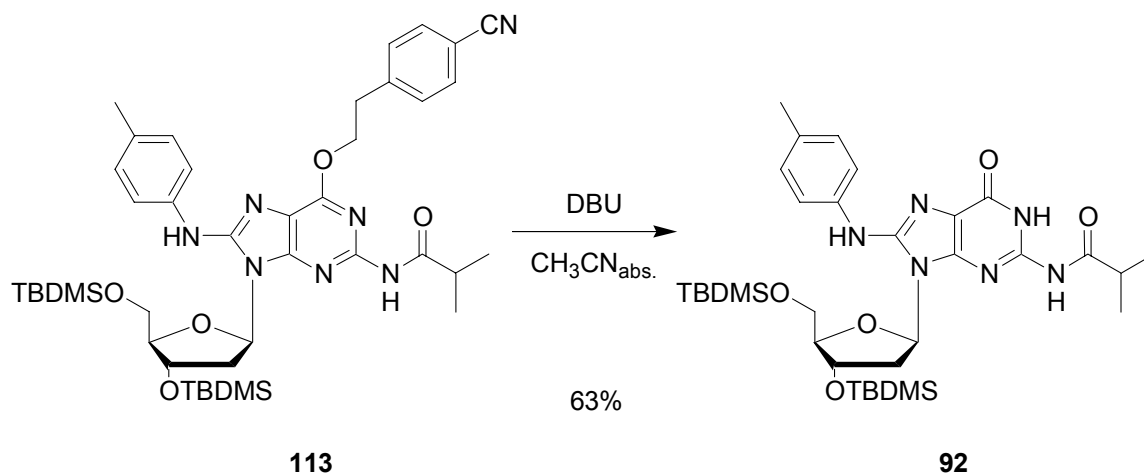
$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (500 MHz, DMSO- $d_6$ ): 10.07 (s, 1H, NH), 9.04 (s, 1H, NH), 7.77-7.10 (m, 8H,  $\delta$ -H+ $\gamma$ -H+TOL-H), 6.38 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 6.6, 7.0$  Hz, 1H, H1'), 4.91 (ddd,  $^3J_{\text{HH}} = 6.6, 4.1, 4.1$  Hz, 1H, H3'), 4.70 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 10.8, ^3J_{\text{HH}} = 7.0, 7.0$  Hz, 1H,  $\alpha$ -Ha), 4.67 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 10.8, ^3J_{\text{HH}} = 7.0, 7.0$  Hz, 1H,  $\alpha$ -Hb), 3.85 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 10.9, ^3J_{\text{HH}} = 5.0$  Hz, 1H, H5a'), 3.78 (ddd,  $^3J_{\text{HH}} = 5.0, 4.1, 6.1$  Hz, 1H, H4'), 3.69 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 6.1, ^2J_{\text{HH}} = 10.9$  Hz, 1H, H5b'), 3.49 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.1, ^3J_{\text{HH}} = 6.6, 6.6$  Hz, 1H, H2a'), 3.22 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 7.0, 7.0$  Hz, 2H,  $\beta$ -H), 2.77 (sept,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz, 1H, iBu-H), 2.26 (s, 3H, TOL-CH<sub>3</sub>), 2.15 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.1, ^3J_{\text{HH}} = 4.1, 7.0$  Hz, 1H, H2b'), 1.09 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>), 1.08 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>), 0.89 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.77 (s, 9H, Si-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.14 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.12 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.09 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -0.09 (s, 3H, Si-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO- $d_6$ ): 174.4, 156.7, 152.7, 149.4, 149.0, 144.4, 137.9, 132.4, 130.7, 130.3, 129.2, 119.1, 118.8, 115.7, 109.5, 87.9 (C4'), 83.0 (C1'), 72.5 (C3'), 66.2 ( $\alpha$ -C), 63.6 (C5'), 37.2 (C2'), 34.8 (iBu-CH), 34.6 ( $\beta$ -C), 25.9 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 20.5 (TOL-CH<sub>3</sub>), 19.6 (iBu-CH<sub>3</sub>), 19.4 (iBu-CH<sub>3</sub>), 18.1 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.8 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.6 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -4.7 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.3 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -5.4 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 800.4351

gef.: 800.4340 (M+H<sup>+</sup>)

8.4.62 Darstellung von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **92** durch Abspaltung der CPE-Schutzgruppe



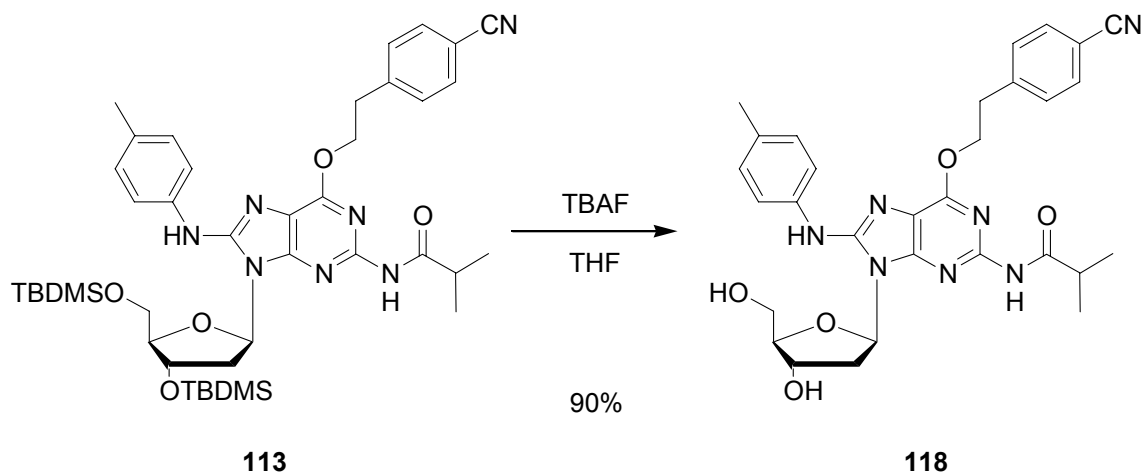
100 mg (0.13 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-(4-cyanophenyl)ethyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **113** wurden in 2.5 ml absolutem Acetonitril gelöst, mit 0.19 ml (190 mg, 1.25 mmol) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) versetzt und für 24 Stunden bei 50 °C gerührt. Nach Zugabe von 0.08 ml Essigsäure und 12.5 ml Reinstwasser wurde dreimal mit je 10 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit und am Chromatotron aufgereinigt. Als Eluent diente 0-3 % Methanol in Dichlormethan.

Ausbeute: 55.0 mg (81.9 μmol, 63 %) eines farblosen Feststoffs.

DC: R<sub>F</sub>-Wert (Dichlormethan / Methanol 19:1): 0.36

Spektroskopische Daten s. 8.4.32, S. 151.

8.4.63 Darstellung von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-(4-cyanophenyl)ethyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-2'-desoxyguanosin **118** durch Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppen



Die Reaktion wurde analog AAV 2 durchgeführt. Es wurden 125.0 mg (0.16 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-(4-cyanophenyl)ethyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-3',5'-bis(*t*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin **113** und 3 ml Tetrahydrofuran eingesetzt. Die Aufreinigung erfolgte am Chromatotron mit 5 % Methanol in Dichlormethan.

Reaktionszeit: 5 h

Ausbeute: 80.6 mg (0.14 mmol, 90 %) einer farblosen Schaums.

DC: R<sub>F</sub>-Wert (Dichlormethan / Methanol 19:1): 0.27

<sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 10.20 (s, 1H, NH), 9.02 (s, 1H, NH), 7.77-7.76-7.11 (m, 8H, δ-H+γ-H+TOL-H), 6.53 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.7, 5.8 Hz, 1H, H1'), 5.87 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.7, 4.7 Hz, 1H, 5'-OH), 5.37 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.6 Hz, 1H, 3'-OH), 4.71 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.8, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2, 7.2 Hz, 1H, αHa), 4.68 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.8, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.1, 7.1 Hz, 1H, αHb), 4.46 (dddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 1.5, 2.0, 3.6, 5.8 Hz, 1H, H3'), 3.97 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 2.0, 2.2, 2.2 Hz, 1H, H4'), 3.75 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 2.2, 4.7 Hz, 2H, H5a'+H5b'), 3.25 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2, 7.1 Hz, 2H, βH), 2.80 (sept, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.9 Hz, 1H, *i*Bu-H), 2.63 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.1, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.7, 5.8 Hz, 1H, H2a'), 2.06 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.1, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.8, 1.5 Hz, 1H, H2b'), 1.09 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.9 Hz, 3H, *i*Bu-CH<sub>3</sub>), 1.08 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.9 Hz, 3H, *i*Bu-CH<sub>3</sub>).

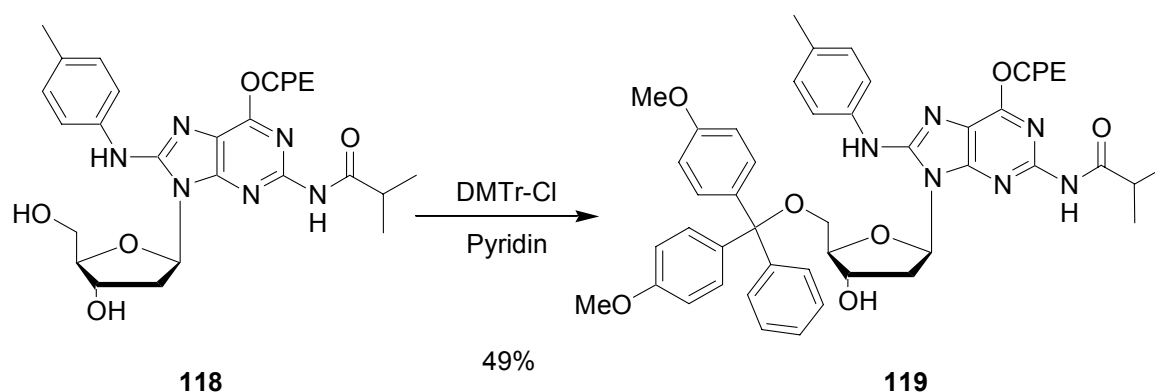
<sup>13</sup>C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 174.9, 156.5, 152.8, 149.7, 148.2, 144.4, 137.4, 132.4, 130.9, 130.4, 129.2, 119.1, 118.9, 114.8, 109.4, 87.6 (C4'),

83.3 (C1'), 71.5 (C3'), 66.3 ( $\alpha$ -C), 61.5 (C5'), 60.1, 38.3 (C2'), 34.8 (iBu- $\underline{\text{C}}\text{H}$ ), 34.5 ( $\beta$ -C), 20.5 (TOL- $\text{CH}_3$ ), 19.6 (iBu- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 19.5 (iBu- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 572.2621

gef.: 572.2595 (M+H<sup>+</sup>)

8.4.64 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-(4-cyanophenyl)ethyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-*O*5'-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **119**



Die Reaktion wurde analog AAV 6 durchgeführt. Es wurden 160 mg (0.28 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-(4-cyanophenyl)ethyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-2'-desoxyguanosin **118** in 5 ml absolutem Pyridin eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 3 Stunden erfolgte die säulenchromatographische Reinigung mit 2 % Methanol in Dichlormethan und anschließende Entsalzung über eine Sephadex LH-20-Säule mit Methanol.

Ausbeute: 121 mg (0.14 mmol, 49 %) einer farblosen Schaums.

Es konnten ebenfalls 48 % (0.13 mmol, 76.8 mg) des Eduktes **118** reisoliert werden.

DC: R<sub>f</sub>-Wert (Dichlormethan / Methanol 19:1): 0.47

<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  [ppm] (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 9.90 (s, 1H, NH), 9.03 (s, 1H, NH), 7.77-7.55 (m, 6H,  $\delta$ -H+ $\gamma$ -H+TOL-H), 7.22-6.61(m, 15H, DMTr-H+TOL-H), 6.46 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7.7, 5.3 Hz, 1H, H1'), 5.13 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 5.1 Hz, 1H, 3'-OH), 4.75 (ddd, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 5.1, 7.4, 5.2 Hz, 1H, H3'), 4.70 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 10.7, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7.3, 7.3 Hz, 1H,  $\alpha$ Ha), 4.66 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 10.7, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7.3, 7.3 Hz, 1H,  $\alpha$ Hb), 3.91 (ddd, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 4.7, 7.4, 2.8 Hz, 1H, H4'), 3.65 (s, 3H, DMTr-CH<sub>3</sub>), 3.64 (s, 3H, DMTr-CH<sub>3</sub>), 3.44 (ddd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 13.1, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 5.3, 7.4 Hz, 1H, H2a'), 3.37 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 10.3, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, 1H, H5a'), 3.24 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7.3, 7.3 Hz, 2H,  $\beta$ H), 3.10 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 10.3, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 2.8 Hz, 1H,

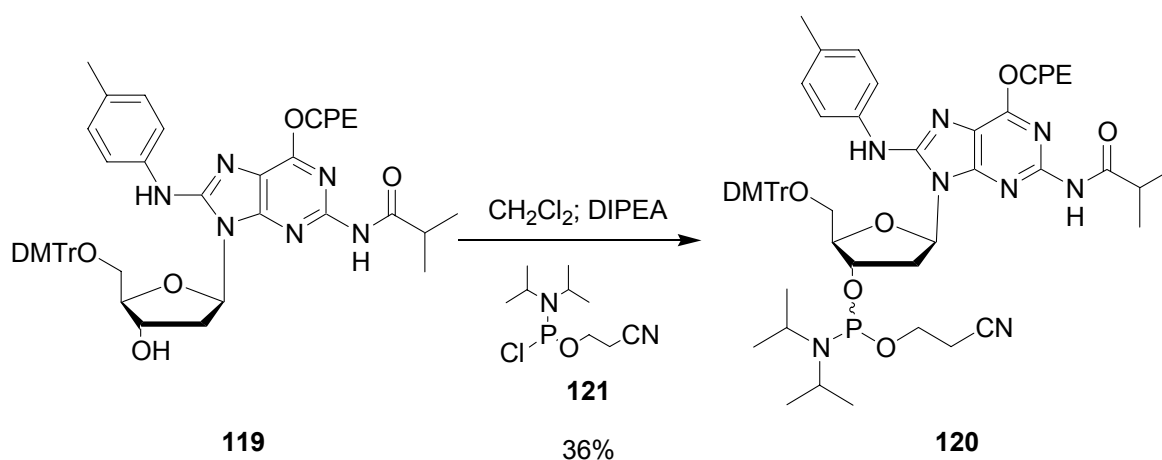
H5b'), 2.81 (sept,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, 1H, iBu-H), 2.26 (s, 3H, TOL-CH<sub>3</sub>), 2.22 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.1$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 7.7$ , 5.2 Hz, 1H, H2b'), 1.02 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>), 1.00 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, iBu-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$  [ppm] (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 158.0, 157.9, 156.5, 152.6, 149.4, 148.9, 145.2, 144.4, 137.9, 136.0, 135.9, 132.4, 130.6, 130.3, 129.8, 129.7, 129.2, 127.8, 127.5, 126.5, 119.1, 118.7, 115.5, 112.9, 112.9, 109.4, 86.6 (C4'), 85.3, 83.0 (C1'), 70.7 (C3'), 66.1 ( $\alpha$ -C), 64.5 (C5'), 55.0 (DMTr-CH<sub>3</sub>), 55.0 (DMTr-CH<sub>3</sub>), 54.8, 52.2, 37.3 (C2'), 34.8 (iBu-CH), 34.3 ( $\beta$ -C), 20.5 (TOL-CH<sub>3</sub>), 19.5 (iBu-CH<sub>3</sub>), 19.5 (iBu-CH<sub>3</sub>).

MS (HRFAB; m/z): ber.: 745.3350

gef.: 745.3363 (M+H<sup>+</sup>)

8.4.65 Synthese von *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-(4-cyanophenyl)ethyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-*O*3'-(2-cyanoethoxy)-(*N,N*-diisopropylamino)phosphinyl]-*O*5'-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **120**



100 mg (0.11 mmol) *N*<sup>2</sup>-*i*-Butyryl-*O*<sup>6</sup>-(4-cyanophenyl)ethyl-8-*N*-(4-methylphenylamino)-*O*5'-dimethoxytrityl-2'-desoxyguanosin **119** wurden in 5 ml absolutem Dichlormethan gelöst, mit 71.2 mg (0.55 mmol) Diisopropylethylamin (DIPEA) und 40.6 mg (0.17 mmol) *N,N*-Diisopropylamino-(2-cyanoethyl)-phosphorochloridit **121** versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.5 ml Methanol abgebrochen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Der erhaltene Rückstand wurde in 10 ml Dichlormethan gelöst und mit je 10 ml 5%iger Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, unter vermindertem Druck vom

Lösungsmittel befreit und anschließend am Chromatotron mit Ethylacetat in Dichlormethan getrennt.

Ausbeute: 42.5 mg (39.6  $\mu\text{mol}$ , 36 %) eines hellgelben Feststoffs.

DC:  $R_f$ -Wert (Dichlormethan / Methanol 19:1): 0.50

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) 2 Diastereomere: 8.03 (s, 1H, NH), 7.97 (s, 1H, NH), 7.90 (s, 1H, NH), 7.87-7.83 (m, 4H, TOL-H), 7.78 (s, 1H, NH), 7.65-6.75 (m, 38H, DMTr-H (A+B)+TOL-H (A+B), CPE-H (A+B)), 6.13 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 6.3, 6.3$  Hz, 1H, H1' (A+B)), 5.07-5.02 (m, 1H, H3' (A)), 5.02-4.96 (m, 1H, H3' (B)), 4.75-4.61 (m, 4H,  $\alpha\text{H}$  (A+B)), 4.57-4.53 (m, 1H, H4' (A)), 4.53-4.49 (m, 1H, H4' (B)), 3.71 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 10.6, ^3J_{\text{HH}} = 3.6$  Hz, 1H, H5a' (A)), 3.68-3.55 (m, 10H, iPr-H (A+B)+iBu-H (A+B)+H2a' (A+B)+H5b' (A)+H5a' (B)), 3.51 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 10.4, ^3J_{\text{HH}} = 5.4$  Hz, 1H, H5b' (B)), 3.43-3.38 (m, 12H, DMTr- $\text{CH}_3$  (A+B)), 2.96-2.88 (m, 4H,  $\beta\text{H}$  (A+B)), 2.84-2.66 (m, 3H, H2b' (B)+  $\alpha'$ H (A+B)), 2.55 (ddd,  $^2J_{\text{HH}} = 13.4, ^3J_{\text{HH}} = 5.7, 4.3$  Hz, 1H, H2b' (A)), 2.19 (s, 6H, DMTr- $\text{CH}_3$ ), 1.32-1.13 (m, 40H, iBu- $\text{CH}_3$  (A+B)+iPr- $\text{CH}_3$  (A+B)+  $\beta'$ H (A+B)).

$^{31}\text{P-NMR}$ :  $\delta$  [ppm] (202 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) 2 Diastereomere: 150.57, 150.00.

MS (Maldi; m/z):ber.: 1073.49

gef.: 1097.08 ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ), 1113.05 ( $\text{M}+\text{K}^+$ )



## 8.5 Oligonucleotide

### 8.5.1 Synthese der Standard-Oligonucleotide

Wie in Kapitel 8.3.1, S. 111 beschrieben, wurden alle Standard-Oligonucleotide am DNA-Synthesizer nach dem Standardprotokoll synthetisiert.

#### 8.5.1.1 Synthese des Standard-Oligonucleotids 133



$\text{C}_{145}\text{H}_{188}\text{N}_{44}\text{O}_{93}\text{P}_{14}$ ;  $M = 4469.0$

HPLC:  $t_R$  (XTerra-Säule; Analytisch: Gradient I): 14.40 min

Trennung: Gradient I

$\text{OD}_{260}$ : 32.24

MS: (Maldi,  $m/z$ ): 4469.6 ( $+\text{H}^+$ )

#### 8.5.1.2 Synthese des Standard-Oligonucleotids 134



$\text{C}_{149}\text{H}_{183}\text{N}_{67}\text{O}_{83}\text{P}_{14}$ ;  $M = 4674.1$

HPLC:  $t_R$  (XTerra-Säule; Analytisch: Gradient I): 10.56 min

Trennung: Gradient I

$\text{OD}_{260}$ : 35.88

MS: (Maldi,  $m/z$ ): 4675.9 ( $+2\text{H}^+$ )

#### 8.5.1.3 Synthese des Standard-Oligonucleotids 135



$\text{C}_{150}\text{H}_{195}\text{N}_{33}\text{O}_{102}\text{P}_{14}$ ;  $M = 4526.1$

HPLC:  $t_R$  (XTerra-Säule; Analytisch: Gradient K): 11.55 min

Trennung: Gradient K

$\text{OD}_{260}$ : 16.10

MS: (Maldi,  $m/z$ ): 4528.4 ( $+2\text{H}^+$ )

## 8.5.1.4 Synthese des Standard-Oligonucleotids 136



$\text{C}_{149}\text{H}_{181}\text{N}_{73}\text{O}_{74}\text{P}_{14}$ ;  $M = 4612.2$

HPLC:  $t_R$  (XTerra-Säule; Analytisch: Gradient I): 12.19 min

Trennung: Gradient I

$\text{OD}_{260}$ : 24.36

MS: (Maldi,  $m/z$ ): 4613.9 ( $+2\text{H}^+$ )

## 8.5.1.5 Synthese des Standard-Oligonucleotids 137



$\text{C}_{150}\text{H}_{181}\text{N}_{75}\text{O}_{73}\text{P}_{14}$ ;  $M = 4636.2$

HPLC:  $t_R$  (XTerra-Säule; Analytisch: Gradient I): 11.95 min

Trennung: Gradient I

$\text{OD}_{260}$ : 1.59

MS: (Maldi,  $m/z$ ): 4637.9 ( $+2\text{H}^+$ )

## 8.5.1.6 Synthese des Standard-Oligonucleotids 138



$\text{C}_{150}\text{H}_{181}\text{N}_{75}\text{O}_{74}\text{P}_{14}$ ;  $M = 4652.2$

HPLC:  $t_R$  (XTerra-Säule; Analytisch: Gradient I): 11.79 min

Trennung: Gradient I

$\text{OD}_{260}$ : 17.90

MS: (Maldi,  $m/z$ ): 4653.6 ( $+\text{H}^+$ )

8.5.1.7 Synthese des Standard-Oligonucleotids **139**

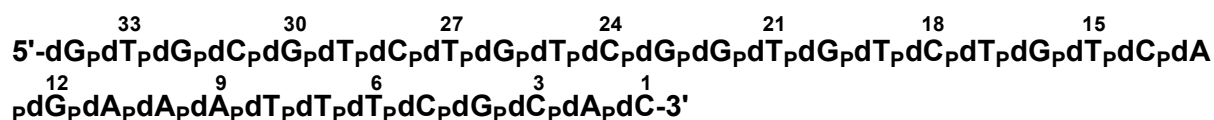
$\text{C}_{150}\text{H}_{182}\text{N}_{72}\text{O}_{75}\text{P}_{14}$ ;  $M = 4627.2$

HPLC:  $t_R$  (XTerra-Säule; Analytisch: Gradient I): 12.80 min

Trennung: Gradient I

$\text{OD}_{260}$ : 24.85

MS: (Maldi,  $m/z$ ): 4628.9 ( $+2\text{H}^+$ )

8.5.1.8 Synthese des Standard-Oligonucleotids **140**

$\text{C}_{332}\text{H}_{420}\text{N}_{121}\text{O}_{208}\text{P}_{33}$ ;  $M = 10450.7$

HPLC:  $t_R$  (XTerra-Säule; Analytisch: Gradient J): 14.00 min

Trennung: Gradient J

$\text{OD}_{260}$ : 22.72

MS: (ESI,  $m/z$ ): 10452.7 ( $+2\text{H}^+$ ); 10492.6 ( $+\text{K}^+, +\text{H}^+$ ); 10530.8 ( $+2\text{K}^+$ )

## 8.5.2 Synthese der modifizierten Oligonucleotide

Wie in Kapitel 8.3.1, S. 111 beschrieben, wurden alle modifizierten Oligonucleotide am DNA-Synthesizer nach dem abgewandelten Standardprotokoll synthetisiert.

8.5.2.1 Synthese des Anilin-modifizierten Oligonucleotids **123**

$\text{C}_{151}\text{H}_{193}\text{N}_{45}\text{O}_{93}\text{P}_{14}$ ;  $M = 4560.1$

HPLC:  $t_R$  (XTerra-Säule; Analytisch: Gradient C): 7.79 min

Trennung: Gradient C

$\text{OD}_{260}$ : 11.72

MS: (Maldi,  $m/z$ ): 4562.3 ( $+2\text{H}^+$ )

8.5.2.2 Synthese des p-Toluidin-modifizierten Oligonucleotids **124**

$\text{C}_{152}\text{H}_{195}\text{N}_{45}\text{O}_{93}\text{P}_{14}$ ;  $M = 4574.1$

HPLC:  $t_{\text{R}}$  (XTerra-Säule; Analytisch: Gradient C): 12.72 min

Trennung: Gradient C

$\text{OD}_{260}$ : 5.66

MS: (Maldi,  $m/z$ ): 4572.0 ( $+2\text{H}^+$ )

8.5.2.3 Synthese des p-Anisidin-modifizierten Oligonucleotids **125**

$\text{C}_{152}\text{H}_{195}\text{N}_{45}\text{O}_{94}\text{P}_{14}$ ;  $M = 4590.1$

HPLC:  $t_{\text{R}}$  (XTerra-Säule; Analytisch: Gradient C): 8.03 min

Trennung: Gradient C

$\text{OD}_{260}$ : 8.68

MS: (Maldi,  $m/z$ ): 4592.3 ( $+2\text{H}^+$ )

8.5.2.4 Synthese des 4-Aminobiphenyl-modifizierten Oligonucleotids **126**

$\text{C}_{157}\text{H}_{197}\text{N}_{45}\text{O}_{93}\text{P}_{14}$ ;  $M = 4636.2$

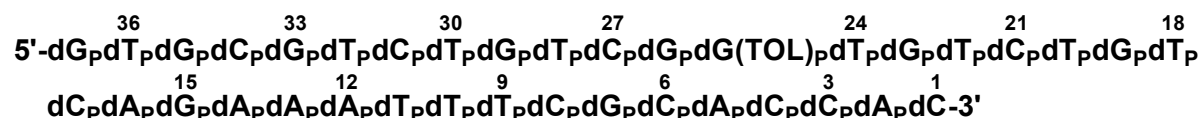
HPLC:  $t_{\text{R}}$  (XTerra-Säule; Analytisch: Gradient D): 15.73 min

Trennung: Gradient B

$\text{OD}_{260}$ : 19.75

MS: (Maldi,  $m/z$ ): 4639.0 ( $+3\text{H}^+$ )



8.5.2.8 Synthese des p-Toluidin-modifizierten Oligonucleotids **130**

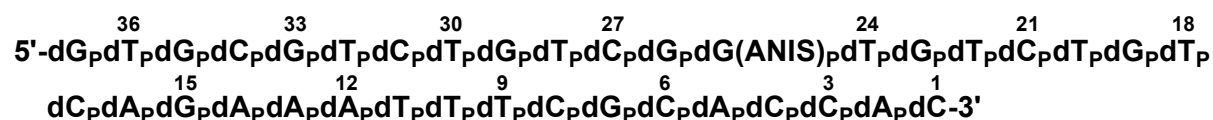
$\text{C}_{367}\text{H}_{463}\text{N}_{133}\text{O}_{225}\text{P}_{36}$ ;  $M = 11452.5$

HPLC:  $t_R$  (XTerra-Säule; Analytisch: Gradient F): 15.09 min

Trennung: Gradient F

$\text{OD}_{260}$ : 22.30

MS: (ESI, m/z): 11453.4 ( $+\text{H}^+$ ); 11491.3 ( $+\text{K}^+$ )

8.5.2.9 Synthese des p-Anisidin-modifizierten Oligonucleotids **131**

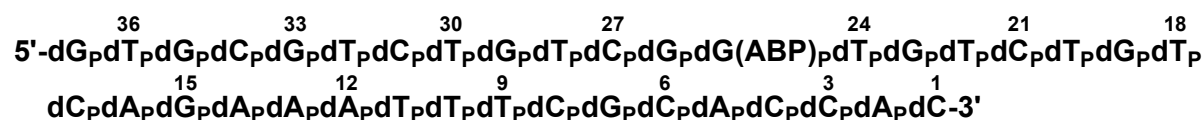
$\text{C}_{367}\text{H}_{463}\text{N}_{133}\text{O}_{226}\text{P}_{36}$ ;  $M = 11468.5$

HPLC:  $t_R$  (XTerra-Säule; Analytisch: Gradient F): 13.92 min

Trennung: Gradient F

$\text{OD}_{260}$ : 9.73

MS: (ESI, m/z): 11509.0 ( $+\text{H}^++\text{K}^+$ ); 11545.1 ( $+2\text{K}^+$ )

8.5.2.10 Synthese des 4-Aminobiphenyl-modifizierten Oligonucleotids **132**

$\text{C}_{372}\text{H}_{465}\text{N}_{133}\text{O}_{225}\text{P}_{36}$ ;  $M = 11514.6$

HPLC:  $t_R$  (XTerra-Säule; Analytisch: Gradient G): 13.79 min

Trennung: Gradient H

$\text{OD}_{260}$ : 22.83

MS: (ESI, m/z): 11553.2 ( $+\text{K}^+$ )

## 9. Gefahrstoffe

Verbindung	R-Sätze	S-Sätze
Acetonitril	11-23/24/25	16-27-45
4-Aminobenzonitril	22-36	26-36
4-Aminobiphenyl	22-45	45-53
2-Aminofluoren	40	36/37/39
Anilin	20/21/22-40-48/23/24/25-50	28-36/37-45-61
p-Anisidin	45-26/27/28-33-50	53-28-36/37-45-61
Benzylalkohol	20/22	26
DIAD	36/38	36
Dichlormethan	40	23.2-24/25-36/37
4,4'-Dimethoxytritylchlorid	---	22-24/25
4-Dimethylaminopyridin	25-36/38	37-45
1,4-Dioxan	11-19-36/37-40	16-36/37
Essigsäureethylester	11-36-66-67	16-26-33
Ethylenglycoldimethylether	11-19-60-61	16-24/25-37-45-53
Imidazol	22-34	22-26-36/37/39-45
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	22-36/37/38	22-26
Methanol	23/24/25-39/23/24/25-40-43	26-36/37/39-45-51
Natrium	14/15-34	5.1-8-43.12-45
Natriumhydrid	15-34	7/8-26-36/37/39-43.6-45
Petrolether 60-70	11-52/53-65	9-16-23.2-24-33-62
Pd <sub>2</sub> (DBA) <sub>3</sub>	22-38-40-48/20/22	36/37
di-Phosphorpentoxid	35	22-26-45
Pyridin	25-26-36/37/38-50/53	26-28.1-36/37-45-61
<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid	10-34	26-36/37/39-45
Tetrabutylammoniumfluorid	11-23/24/25-34	16-26-36/37/39-45
Tetrahydrofuran	11-19-36/37	16-29-33
p-Toluidin	23/24/25-33-50	28-36/37-45-61
Triethylamin	11-20/21/22-35	3-16-26-29-36/37/39-45
Triphenylphosphin	43-48/20/22-50-53	22-24-37

## 10. Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland: *Krebs in Deutschland: Häufigkeiten und Trends*, Saarbrücken **2002**, 3. Ausgabe.
- <sup>2</sup> J. Cairns in *Krebs-Tumoren, Zellen, Gene*, Hrsg.: Spektrum der Wissenschaft-Verlagsgesellschaft Heidelberg **1990**, 4. Auflage. S. 10-21.
- <sup>3</sup> *Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie*, Herder **1995**, 2, S. 267 ff.
- <sup>4</sup> G. Stöhrer; Krebserzeugende Chemikalien; *Chemie in unserer Zeit* **1970**, 4, 109-114.
- <sup>5</sup> B. Zajc, M.K. Lakshman, J.M. Sayer, D.M. Jerina, Epoxide and Diol Epoxide Adducts of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons at the Exocyclic Amino Group of Desoxyguanosine, *Tetrah. Lett.* **1992**, 33, 3409-3412.
- <sup>6</sup> H.A.J. Schut, E.G. Snyderwine, DNA-Adducts of Heterocyclic Amine Food Mutagens: Implication for Mutagenesis and Carcinogenesis, *Carcinogenesis* **1999**, 20, 3409-3419.
- <sup>7</sup> W. Lisinsky, E. Conrat, R. van de Bogart, Carcinogenic Formed Nitrosamines by Drug/Nitrite Interactions, *Nature* **1972**, 239, 165-167.
- <sup>8</sup> R. Saffhill, G. P. Margison, P. J. O'Connor, Mechanisms of Carcinogenesis Induced by Alkylating Agents, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 823, 111-145.
- <sup>9</sup> D. R. Hartter in D. E. Rickert (Ed.): *Toxicity of Nitroaromatic Compounds*, Hemisphere, New York **1985**, S. 1-13.
- <sup>10</sup> R. C. Garner, The Role of DNA Adducts in Chemical Carcinogenesis, *Mutat. Res.* **1998**, 402, 67-75.
- <sup>11</sup> Z. Wang, C. J. Rizzo, Synthesis of the C8-Desoxyguanosine Adduct of the Food Mutagen IQ, *Org. Lett.* **2001**, 3, 565-568.
- <sup>12</sup> C. Patrianakos, D. Hoffmann, Chemical studies on tobacco smoke LXIV. On the analysis of aromatic amines in cigarette smoke, *J. Anal. Toxicol.* **1979**, 3, 150-154.
- <sup>13</sup> F. Luceri, G. Pieraccini, G. Moneti, P. Dolara, Primary aromatic amines from side-stream cigarette smoke are common contaminants of indoor air, *Toxicol Ind. Health* **1993**, 9, 405-413.
- <sup>14</sup> E. K. Weisburger, A.B. Russfield, F. Homburger, J.H. Weisburger, E. Boger, C.G., Van Dongen, K.C. Chu, Testing of Twenty-One Environmental Aromatic Amines or



- Derivatives for Long-Term Toxicity of Carcinogenicity, *J. Environ. Pathol. Toxicol.* **1978**, *2*, 325-356.
- <sup>15</sup> M.M. Marques, L.L.G. Mourato, M.T. Amorim, M.A. Santos, W.B. Melchior Jr., F.A. Beland, Effect of Substitution Site upon the Oxidation Potentials of Alkylanilines, the Mutagenicities of *N*-Hydroxyalkylanilines, and the Conformations of Alkylaniline-DNA-Adducts, *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 1266-1274.
- <sup>16</sup> J.W. Cramer, J.A. Miller, E.C. Miller, *N*-Hydroxylation: A New Metabolic Reaction Observed in the Rat with the Carcinogen 2-Acetylaminofluorene, *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 885-888.
- <sup>17</sup> C.B. Frederick, J.B. Mays, D.M. Ziegler, F.P. Guengerich, F.F. Kadlubar; Cytochrome P-450- and Flavin-Containing Monooxygenase-Catalyzed Formation of the Carcinogen *N*-Hydroxy-2-aminofluorene and Its Covalent Binding to Nuclear DNA, *Cancer Res.* **1982**, *42*, 2671-2677.
- <sup>18</sup> G.J. Hammons, F.P. Guengerich, C.C. Weis, F.A. Beland, F.F. Kadlubar, Metabolic Oxidation of Carcinogenic Arylamines by Rat, Dog, and Human Hepatic Microsomes and by Purified Flavin-containing and Cytochrome P-450-Monooxygenases, *Cancer Res.* **1985**, *45*, 3578-3585.
- <sup>19</sup> T.J. Flammang, Y. Yamazoe, R.W. Benson, D.W. Roberts, D.W. Potter, D.Z.J. Chu, N.P. Lang, F.F. Kadlubar, Arachidonic Acid-Dependent Peroxidative Activation of Carcinogenic Arylamines by Extrahepatic Human Tissue Microsomes, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 1977-1982.
- <sup>20</sup> T. E. Eling, in: *Biochemical Oxidation of Nitrogen in Organic Molecules* (Hrsg. J. W. Gorrod, L. A. Damani), VCH Verlagsgesellschaft/ Ellis Horwood, Weinheim/Chichester **1985**, 313.
- <sup>21</sup> P. Hlavica, J. Golly, in: *Biochemical Oxidation of Nitrogen in Organic Molecules* (Hrsg. J. W. Gorrod, L. A. Damani), VCH Verlagsgesellschaft/ Ellis Horwood, Weinheim/Chichester **1985**, 320.
- <sup>22</sup> T. V. Zenser, R. W. Wiese, B. B. Davies, in: *Biochemical Oxidation of Nitrogen in Organic Molecules* (Hrsg. J. W. Gorrod, L. A. Damani), VCH Verlagsgesellschaft/ Ellis Horwood, Weinheim/Chichester **1985**, 327.

- 23 F.F. Kadlubar, C.B. Frederick, C.C. Weis, T.V. Zenser, Prostaglandin Endoperoxide Synthetase-Mediated Metabolism of Carcinogenic Aromatic Amines and the Binding to DNA and Proteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1982**, *108*, 253-258.
- 24 H. Bartsch, J.A. Miller, E.C. Miller, *N*-Acetoxy-*N*-Acetylaminoarenes and Nitrosoarenes. One-Electron Nonenzymic and Energetic Oxidation Products of Various Carcinogenic Aromatic Acetohydroxamic Acids, *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, *273*, 40-51.
- 25 S.S. Thorgeirsson, in: *Biochemical Basis of Chemical Carcinogenesis* (Hrsg. H. Greim, R. Jung, H. Marquardt, F. Oesch), Raven Press, New York **1984**, 47-56.
- 26 S.S. Thorgeirsson, P.J. Wirth, N. Staiano, C.L. Smith, in: *Advances in Experimental Medicine and Biology: Reactive Intermediates II, Vol 136B* (Hrsg. R. Snyder, D. V. Parke, J. M. Kocis, D. J. Jollow, C. G. Gibson, C. M. Whittmer); Plenum Press, New York **1982**, 897-919.
- 27 C.-C. Lai, J.A. Miller, E.C. Miller, A. Liem, *N*-Sulfoöxy-2-aminofluorene is the Major Ultimate Electrophilic Carcinogenic Metabolite of *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene in the Livers of Infant Male C57BL/6J x C3H/HeJF<sub>1</sub> (B6C3F<sub>1</sub>) Mice, *Carcinogenesis* **1985**, *6*(7), 1037-1045.
- 28 C.-C. Lai, J.A. Miller, E.C. Miller, A. Liem, The Essential Role of Microsomal Deacetylase Activity in the Metabolic Activation, DNA-(desoxyguanosin-8-yl)-2-aminofluorene Adduct Formation and Initiation of Liver Tumors by *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene in the Livers of Infant Male B6C3F<sub>1</sub> mice, *Carcinogenesis* **1988**, *9*, 1295-1302.
- 29 F.F. Kadlubar, L.E. Unruh, T.J. Flammang, D. Sparks, R.K. Mitchum, G.J. Mulder, Alteration of urinary levels of the carcinogen, *N*-hydroxy-2-naphthylamine, and its *N*-glucuronide in the rat by control of urinary pH, inhibition of metabolic sulfation, and changes in biliary excretion, *Chem. Biol. Interact.* **1981**, *33*, 129-140.
- 30 F.F. Kadlubar, J.A. Miller, E.C. Miller, Hepatic microsomal *N*-glucuronidation and nucleic acid binding of *N*-hydroxy arylamines in relation to urinary bladder carcinogenesis, *Cancer Res.* **1977**, *37*, 805-814.
- 31 F.A. Beland, T. Beranek, K.L. Dooley, R.H. Heflich, F.F. Kadlubar, Arylamine-DNA Adducts *In Vitro* and *In Vivo*: Their Role in Bacterial Mutagenesis and Urinary Bladder Carcinogenesis, *Environ. Health Persp.* **1983**, *49*, 125-134.

- 32 T.J. Flammang, F.F. Kadlubar, Acetyl Coenzyme A Dependent Metabolic Activation of N-hydroxy-3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl and Several Carcinogenic N-hydroxy Arylamines in Relation to Tissue and Species Differences, other Acyl Donors, and Arylhydroxamic Acid-dependent Acyltransferases, *Carcinogenesis* **1986**, 7, 919-926.
- 33 A. Shinohara, K. Saito, Y. Yamazoe, T. Kamataki, R. Kato, Acetyl-Coenzyme A Dependent Activation of N-Hydroxy Derivatives of Carcinogenic Arylamines: Mechanism of Activation, Species Difference, Tissue Distribution, and Acetyl Donor Specificity, *Cancer Res.* **1986**, 46, 4362-4367.
- 34 L.W. Boteju, P.E. Hanna, Bioactivation of N-hydroxy-2-acetylaminofluorenes by N,O-acyltransferase: substituent effects on covalent binding to DNA, *Carcinogenesis* **1993**, 14(8), 1651-1657.
- 35 H. Bartsch, M. Dworkin, J.A. Miller, E.C. Miller, Electrophilic N-acetoxyaminoarenes Derived from Carcinogenic N-hydroxy-N-acetyl aminoarenes by Enzymatic Deacetylation and Transacetylation in Liver, *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, 286, 272-298.
- 36 C. M. King; Mechanism of Reaction, Tissue Distribution, and Inhibition of Arylhydroxamic Acid Acyltransferase, *Cancer Res.* **1974**, 34, 1503-1515.
- 37 F. A. Beland, W. Allaben, F. E. Evans; Acyltransferase-Mediated Binding of N-Hydroxyarylamides to Nucleic Acids, *Cancer Res.* **1980**, 40, 834-840.
- 38 M. Tada, M. Tada, Seryl-tRNA Synthetase and Activation of the Carcinogen 4-Nitroquinoline 1-Oxide, *Nature* **1975**, 255, 510-512.
- 39 C. Meier,  $\alpha$ -Aminosäuren als aktivierende Reagentien bei der Carcinogenese durch aromatische Amine: Modellreaktionen von monocyclischen N-( $\alpha$ -Aminoacyloxy)arylaminen mit (Bio)Nucleophilen und Konformationsanalyse von Arylaminmodifizierten Nucleosiden und Nucleotiden, Dissertation, Philips-Universität Marburg/Lahn **1989**.
- 40 F.F. Kadlubar, F.A. Beland, D.T. Beranek, K.L. Dooley, R.H. Heflich, F.E. Evans, *Environmental Mutagens and Carcinogens* (T. Sugimura, S. Kondo, H. Takebe, Ed.), Alan R. Liss, New York **1982**, 385-396.
- 41 F. De Riccardis, R. R. Bonala, F. Johnson, A General Method for the Synthesis of the N2- and N6-Carcinogenic Amine Adducts of 2'-Desoxyguanosine and 2'-Desoxyadenosine, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 10453-10460.

- 42 W. Dekant, S. Vamvakas, *Toxikologie für Chemiker und Biologen*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg **1994**, S.102.
- 43 R.C. Gupta, N.R. Dighe, Formation and removal of DNA adducts in rat liver treated with N- hydroxy derivatives of 2-acetylaminofluorene, 4-acetylaminobiphenyl, and 2-acetylaminophenanthrene, *Carcinogenesis* **1984**, 5, 343-349.
- 44 E. Sage, M. Leng, Conformation of poly(dG-dC)•poly(dG-dC) modified by the carcinogens *N*-acetoxy-*N*-acetyl-2-aminofluorene and *N*-hydroxy-*N*-2-aminofluorene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 4597-4601.
- 45 R.M. Santella, D. Grunberger, I.B. Weinstein, A. Rich, Induction of the Z conformation in poly(dG-dC)•poly(dG-dC) by binding of *N*-2-acetylaminofluorene to guanine residues, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, 78, 1451-1455.
- 46 M. M. Marques, F. A. Beland, Synthesis, Characterization, and Solution Properties of ras Sequences Modified by Arylamine Carcinogens at the First Base of Codon 61, *Chem. Res. Toxicol.* **1990**, 3, 559-565.
- 47 J.W. Jones, R.K. Robins, Purine Nucleosides. III. Methylation Studies of Certain Naturally Occurring Purine Nucleosides, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 193-201.
- 48 W.G. Humphreys, F.F. Kadlubar, F.P. Guengerich, Mechanism of C8 alkylation of guanine residues by activated arylamines: Evidence for initial adduct formation at the N7 position, *Procl. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 8278-8282.
- 49 M. Novak, S.A. Kennedy, Selective Trapping of *N*-acetyl-*N*-(4-biphenyl)nitrenium and *N*-Acetyl-*N*-(2-fluorenyl)nitrenium Ions by 2'-Desoxyguanosine in Aqueous Solution, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 574-575.
- 50 B.N. Ames, F.D. Lee, W.E. Durston, Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens, *Proc. Nat. Acad. Sci* **1973**, 70, 782-786.
- 51 B. N. Ames, J. McCann, E. Yamasaki, Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.* **1975**, 31, 347-364.
- 52 B. N. Ames, W. E. Durston, E. Yamasaki, Carcinogens are Mutagens: A Simple Test System Combining Liver Homogenates for Activation and Bacteria for Detection, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1973**, 70, 2281-2285.

- 53 K. Randerath, M. V. Reddy, R. C. Gupta,  $^{32}\text{P}$ -labeling test for DNA damage, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1981**, 78, 6126-6129.
- 54 H. H. Schmeiser, C. A. Bieler,  $^{32}\text{P}$ -Postlabeling- eine ultrasensitive Nachweismethode für DNA-Addukte, *Bioforum* **1997**, 20, 144-148.
- 55 M.V. Reddy, K. Randerath, Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of  $^{32}\text{P}$ -postlabeling test for structurally diverse DNA adducts, *Carcinogenesis* **1986**, 7, 1543-1551.
- 56 A. Lehninger, *Prinzipien der Biochemie*, Walter de Gruyter, Berlin, New York, **1987**.
- 57 S. Shibutani, A.P. Grollman, On the Mechanism of Frameshift (Deletion) Mutagenesis *in Vitro*, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268(16), 11703-11710.
- 58 S. Shibutani, A.P. Grollman, Molecular Mechanisms of Mutagenesis by Aromatic Amines and Amides, *Mutat. Res.* **1997**, 376, 71-78.
- 59 J. Butenandt, L.T. Burgdorf, T. Carell, Synthesis of DNA Lesions and DNA-Lesion-Containing Oligonucleotides for DNA-Repair Studies, *Synthesis* **1999**, 7, 1085-1105.
- 60 J.R. Pierce, R. Case, M.-S. Tang, Recognition and Repair of 2-Aminofluorene- and 2-(Acetylamino)fluorene- DNA Adducts by UVRABC Nuclease, *Biochemistry* **1989**, 28, 5821-5826.
- 61 V.A. Bohr, DNA Repair Fine Structure and its Relations to Genomic Instability, *Carcinogenesis* **1995**, 16(12), 2885-2892.
- 62 B.E. Hingerty, S. Broyde, Energy Minimized Structures of Carcinogen-DNA Adducts: 2-Acetylaminofluorene and 2-Aminofluorene, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1986**, 4, 365-372.
- 63 R. Shapiro, G.R. Underwood, H. Zawadzka, S. Broyde, B.E. Hingerty, Conformation of d(CpG) Modified by the Carcinogen 4-Aminobiphenyl: A Combined Experimental and Theoretical Analysis, *Biochemistry* **1986**, 25, 2198-2205.
- 64 D. Roy, B.E. Hingerty, R. Shapiro, S. Broyde, A Slipped Replication Model Is Stabilized by the Syn Orientation of *N*-2-Aminofluorene- and *N*-2-(Acetyl)aminofluorene-Modified Guanine at a Mutational Hotspot, *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, 11, 1301-1311

- 65 D.J. Patel, B. Mao, Z. Gu, B.E. Hingerty, A. Gorin, A.K. Basu, S. Broyde, Nuclear Magnetic Resonance Solution Structures of Covalent Aromatic Amine-DNA Adducts and Their Mutagenic Relevance, *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 391-407
- 66 R. Shapiro, S. Ellis, B.E. Hingerty, S. Broyde, Effect of Ring Size on Conformations of Aromatic Amine-DNA Adducts: The Aniline-C8 Guanine Adduct Resides in the B-DNA Major Groove, *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 335-341
- 67 B.P. Cho, F.A. Beland, M.M. Marques, 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.
- 68 B.P. Cho, F.A. Beland, M.M. Marques, NMR Studies of a 15-mer DNA Duplex from a *ras* Protooncogene Modified with the Carcinogen 2-Aminofluorene: Conformational Heterogeneity, *Biochemistry* **1994**, *33*, 1373-1384.
- 69 G.R. Hoffmann, R.P.P. Fuchs, Mechanisms of Frameshift Mutations: Insight from Aromatic Amines, *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10(4)*, 347-359.
- 70 L.M. Eckel, T.R. Krugh, Structural Characterization of Two Interchangeable Conformations of a 2-Aminofluorene-Modified DNA Oligomer by NMR and Energy Minimization, *Biochemistry* **1994**, *33*, 13611-13624.
- 71 R.A. Weinberg, How Cancer Arises- An explosion of research is uncovering the long-hidden molecular underpinnings of cancer- and suggesting new therapies, *Scientific American* **1996**, *9*, 32-40.
- 72 G. Klein, The Approaching Era of the Tumor Suppressor Genes, *Science* **1987**, *238*, 1539-1544.
- 73 M.D. Jacobson, R. Shapiro, G.R. Underwood, S. Broyde, L. Verna, B.E. Hingerty, Syntheses and Conformation of a Dinucleoside Monophosphate Modified by Aniline, *Chem. Res. Toxicol.* **1988**, *1*, 152-159.
- 74 M. Famulok, G. Boche, *N*-(Desoxyguanosin-8-yl)anilin aus der in-vitro-Umsetzung von *N*-Acetoxyanilin mit Desoxyguanosin und DNA, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 470-471.  
Formation of *N*-(Desoxyguanosin-8-yl)aniline in the in vitro Reaction of *N*-Acetoxyaniline with Desoxyguanosine and DNA, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28(4)*, 468-469.

- 75 M. Famulok, Synthese von *N*-Acyloxyverbindungen carcinogener Arylamine und ihre *in-vitro*-Reaktion mit (Bio)Nukleophilen: Entscheidende Elektrophile Metaboliten Aromatischer Amine, Dissertation; Philips-Universität Marburg/Lahn, **1989**.
- 76 M.M. Marques, L.L.G. Mourato, M.A. Santos, F.A. Beland, Synthesis, Characterization, and Conformational Analysis of DNA Adducts from Methylated Anilines Present in Tobacco Smoke, *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, *9*, 99-108.
- 77 A. Beyerbach, P.B. Farmer, G. Sabbioni, Synthesis and Analysis of DNA Adducts of Arylamines, *Biomarkers* **1996**, *1*, 9-20.
- 78 A. Heimbel, Reaktionen ultimaler Carcinogene von 4-Ethoxyanilin mit Bionukleophilen und Konformationsanalyse von Arylamin-modifizierten Nukleosiden und Nukleotiden, Dissertation, Philips-Universität Marburg/Lahn **1992**.
- 79 C. Meier, G. Boche, *N*-( $\alpha$ -Aminoacyloxy)-*N*-Arylamines: Activation of Aromatic Amines to Ultimate Carcinogens by Amino Acids, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31(12)*, 1685-1688.
- 80 C. Meier, G. Boche, *N*-Aryl-*O*-( $\alpha$ -aminoacyl)hydroxylamine: Modellreaktionen zur Aktivierung von monocyclischen aromatischen Aminen zu ultimatsten Carcinogenen durch  $\alpha$ -Aminosäuren, *Chem. Ber.* **1990**, *123*, 1691-1698.
- 81 C. Meier, G. Boche, *N*-Aryl-*O*-( $\alpha$ -aminoacyl)hydroxylamine: Modellreaktionen mit Desoxyguanosin, Guanosin und 5'-Guanosinmonophosphat zur Aktivierung monocyclischer aromatischer Amine (z.B. Phenacetin) zu ultimatsten Carcinogenen, *Chem. Ber.* **1990**, *123*, 1699-1705.
- 82 C. Meier, G. Boche, The Modification of Guanine Nucleosides and Nucleotides by the Borderline Arylamine Carcinogens 4-Methyl- and 4-methoxyaniline: Chemistry and Structural Characterization, *Carcinogenesis* **1991**, *12(9)*, 1633-1640.
- 83 E. Defrancq, N. Polloux, A. Leterme, M.-F. Lhomme, J. Lhomme, Interaction and Reactivity of Carcinogenic *N*-Acetyl-*N*-(acyloxy)2-aminofluorene with Desoxyguanosine. An Intramolecular Approach, *J. Org. Chem.* **1991**, *56(16)*, 4817-4819.

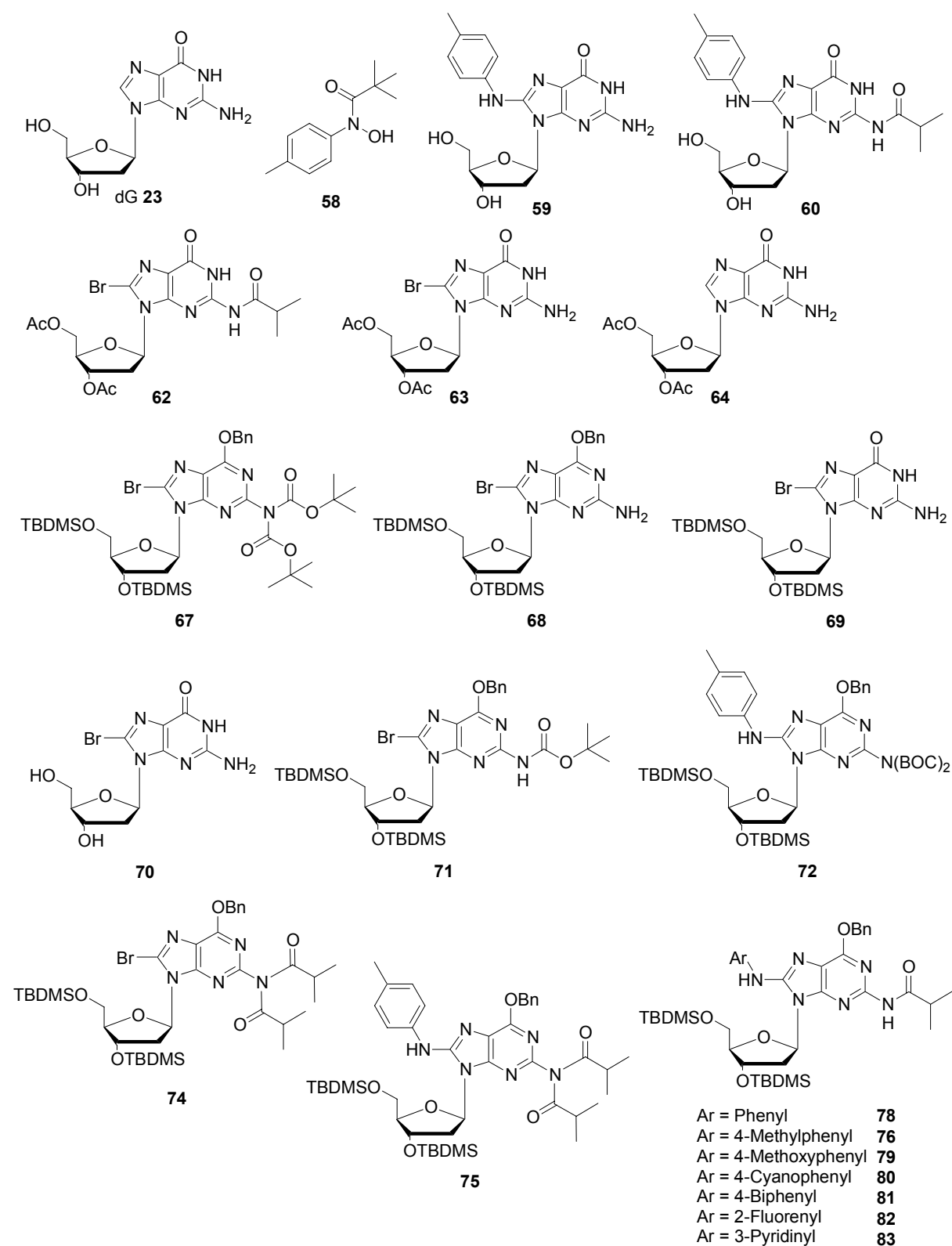
- 84 E. Defrancq, A. Leterme, N. Pelloux, M.-F. Lhomme, J. Lhomme, Arylamidation de la Guanosine par un Agent Cancérogène, le 2-Aminofluorène. Approche Intramoléculaire, *Tetrahedron* **1991**, 47(30), 5725-5736.
- 85 E. Kriek, J.A. Miller, U. Juhl, E. Miller, C8-(N-2-Fluorenylacetamido)guanosine, an Arylamidation Reaction Product of Guanosine and the Carcinogen N-Acetoxy-N-2-fluorenylacetamide in Neutral Solution, *Biochemistry* **1967**, 6(1), 177-182.
- 86 F. Johnson, C.-Y. Huang, P.-L. Yu, Synthetic and Oxidative Studies on 8-(Arylamino)-2'-Desoxyguanosine and -guanosine Derivatives, *Env. Health Persp. Suppl.* **1994**, 102, 143-149.
- 87 C.-Y. Huang, F. Johnson, The Synthesis of 2'-Desoxyguanosines Having an Arylamino Group at the C-8 Position, *Nat. Prod. Lett.* **1992**, 1(1), 3-7.
- 88 H. Riehl, C8-Addukte chemischer Grenzcancerogene an Purin-Nucleosiden zur DNA-Synthese, Diplomarbeit, Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Würzburg **1999**.
- 89 M. Kosugi, M. Kameyama, T. Migita, Palladium-catalyzed Aromatic Amination of Aryl Bromides with N,N-Diethylamino-tributyltin, *Chem. Lett* **1983**, 927-928.
- 90 A.S. Guran, R.A. Rennels, S.L. Buchwald, Eine einfache katalytische Methode zur Synthese von Arylaminen aus Arylbromiden, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 1456-1459. A Simple Catalytic Method for the Conversion of Aryl Bromides to Arylamines, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34(12), 1348-1350.
- 91 J. Louie, J.F. Hartwig, 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.
- 92 M.K. Lakshman, J.C. Keeler, J.H. Hilmer, J.Q. Martin, Palladium-Catalyzed C-N Bond Formation: Facile and General Synthesis of N6-Aryl 2'-Desoxyguanosine, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 6090-6091.
- 93 E.A. Harwood, S.T. Sigurdsson, N.B.F. Edfeldt, B.R. Reid, P.B. Hopkins, Chemical Synthesis and Preliminary Structural Characterization of a Nitrous Acid Interstrand Cross-Linked Duplex DNA, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 5081-5082.
- 94 R.R. Bonala, P.-L. Yu, F. Johnson, Synthesis of N2-(2-Aminofluoren-3-yl) Adducts of 2'-Desoxyguanosine, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 597-598.

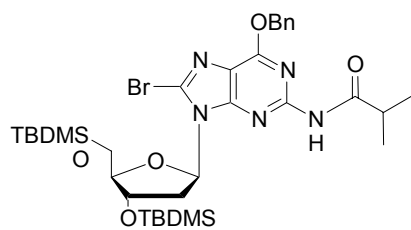


- 95 F. De Riccardis, F. Johnson, Chemical Synthesis of Cross-Linked Purine Nucleosides, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 293-295.
- 96 R.R. Bonala, I.G. Shishkina, F. Johnson, Synthesis of biologically active N<sup>2</sup>-amine adducts of 2'-desoxyguanosine, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7281-7284.
- 97 E. Schoffers, P.D. Olsen, J.C. Means, Synthesis of C8-Adenosine Adducts of Arylamines Using Palladium Catalysis, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 4221-4223.
- 98 H.G. Khorana, Studies on nucleic acids: Total synthesis of a biologically functional gene, *Bioorg. Chem.* **1978**, *7(3)*, 351-393.
- 99 W. Heidmann, H. Köster, Oligonucleotidsynthese an einem polymeren Träger unter Vermeidung von Fehlsequenzen, *Angew. Chem.* **1976**, *17*, 577-578.  
Oligonucleotide Synthesis on a Polymeric Support with Avoidance of Failure Sequences, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1976**, *15(9)*, 547-548.
- 100 S.L. Beaucage, M.H. Caruthers, Desoxynucleoside Phosphoramidites – A new class of key intermediates for Desoxypolynucleotide synthesis, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859-1862.
- 101 Y. Zhou, L.J. Romano, Solid-Phase Synthesis of Oligonucleotides Containing Site-Specific N-(2'-Desoxyguanosin-8-yl)-2-(acetylamino)fluorene Adducts Using 9-Fluorenylmethoxycarbonyl as the Base-Protecting Group, *Biochemistry* **1993**, *32*, 14043-14052.
- 102 Y. Zhou, S. Chládek, L.J. Romano, Synthesis of Oligonucleotides Containing Site-Specific Carcinogen Adducts. Preparation of the 2-Cyanoethyl N,N-Diisopropylphosphoramidite of N-(2'-Desoxyguanosin-8-yl)-2-(acetylamino)fluorene with Fmoc as the Base-Protecting Group, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 556-563.
- 103 G.S. Ti, B.L. Gaffney, R.A. Jones, Transient Protection: Efficient One-Flask Syntheses of Protected Desoxynucleosides, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1316-1319.
- 104 P.M. Gannett, T.P. Sura, An Improved Synthesis of 8-Bromo-2'-desoxyguanosine, *Synthetic Communications* **1993**, *23*, 1611-1615.
- 105 J. Woo, S.T. Sigurdsson, P.B. Hopkins, 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.

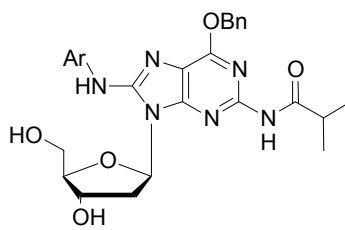
- 106 J.P. Wolfe, S. Wagaw, S.L. Buchwald, An Improved Catalyst System for Aromatic Carbon-Nitrogen Bond Formation: The Possible Involvement of Bis(Phosphine) Palladium Complexes as Key Intermediates, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7215-7216.
- 107 E.A. Harwood, P.B. Hopkins, S.T. Sigurdsson, Chemical Synthesis of Cross-Link Lesions Found in Nitous Acid Treated DNA: A General Method for the Preparation of N2-Substituted 2'-Desoxyguanosines, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2959-2964.
- 108 <http://cactus.nci.nih.gov/Pseurot/>
- 109 E. Uhlmann, W. Pfeleiderer, Substituierte  $\beta$ -Phenyläthyl-Gruppen. Neue Schutzgruppen für Oligonucleotid-Synthesen nach dem Phosphorsäuretriester-Verfahren, *Helv. Chim. Acta* **1981**, *64*, 1688-1703.
- 110 M.M. Marques, F.A. Beland, Synthesis, Characterization, and Solution Properties of ras Sequences Modified by Arylamine Carcinogens at the First Base of Codon 61, *Chem. Res. Toxicol.* **1990**, *3*, 559-565.
- 111 J.D. Puglisi, I. Tinoco, Absorbance melting curves of RNA, *Methods Enzymol.* **1989**, *180*, 304-325.
- 112 R. Winter, F. Noll, Methoden der Biophysikalischen Chemie, B.G. Teubner, Stuttgart **1998**, Kap. V.4.
- 113 Lundberg, K.S., et al., High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*, *Gene* **1991**, *108*, 1-6.
- 114 A.J. Rattray, J.N. Strathern, Error-prone DNA polymerases: when making a mistake is the only way to get ahead, *Annu. Rev. Genet.* **2003**, *37*, 31-66.
- 115 U. Hübscher, G. Maga, S. Spadari, Eukaryotic DNA polymerases, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 133-163.
- 116 P. Pourquier, Y. Pommier, Topoisomerase I-mediated DNA damage, *Adv. Cancer Res.* **2001**, *80*, 189-216.

## Ausklapptafel

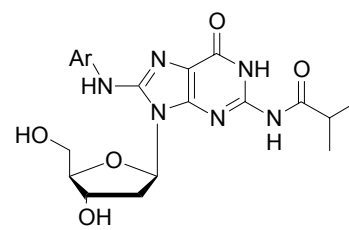




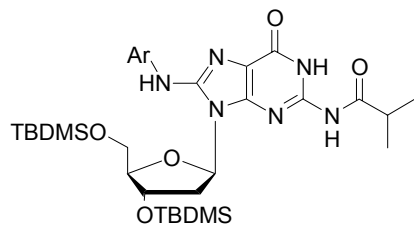
77



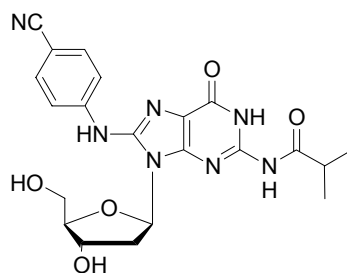
Ar = Phenyl **85**  
 Ar = 4-Methylphenyl **84**  
 Ar = 4-Methoxyphenyl **86**  
 Ar = 4-Cyanophenyl **87**  
 Ar = 4-Biphenyl **88**



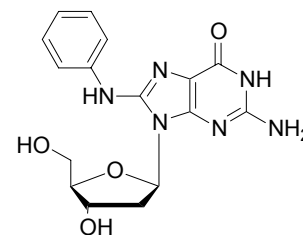
Ar = Phenyl **89**  
 Ar = 4-Methylphenyl **60**  
 Ar = 4-Methoxyphenyl **90**  
 Ar = 4-Biphenyl **91**  
 Ar = 3-Pyridinyl **99**



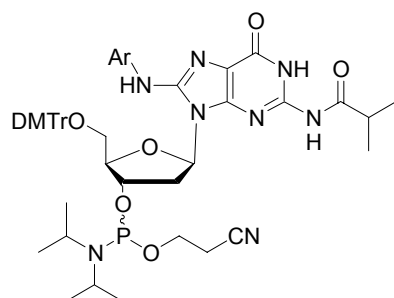
Ar = Phenyl **93**  
 Ar = 4-Methylphenyl **92**  
 Ar = 4-Methoxyphenyl **94**  
 Ar = 4-Cyanophenyl **95**  
 Ar = 4-Biphenyl **96**  
 Ar = 2-Fluorenyl **97**  
 Ar = 3-Pyridinyl **98**



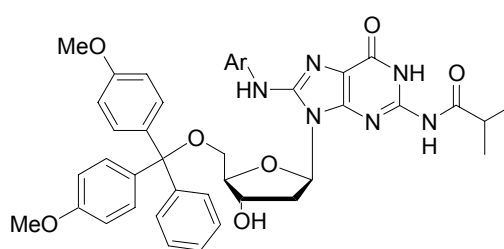
100



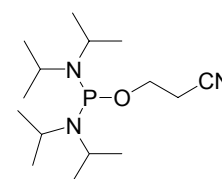
101



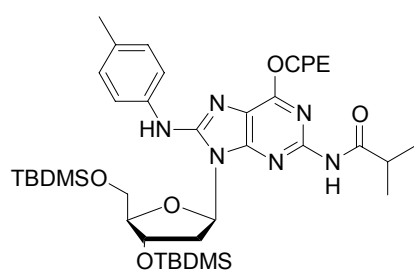
Ar = Phenyl **103**  
 Ar = 4-Methylphenyl **102**  
 Ar = 4-Methoxyphenyl **104**  
 Ar = 4-Biphenyl **105**



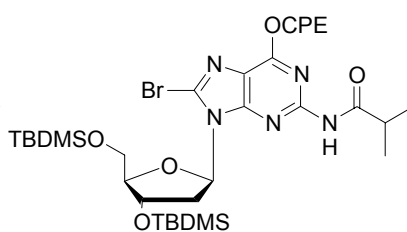
Ar = Phenyl **107**  
 Ar = 4-Methylphenyl **106**  
 Ar = 4-Methoxyphenyl **108**  
 Ar = 4-Biphenyl **109**



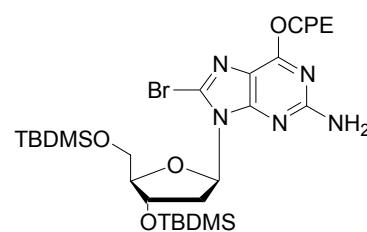
112



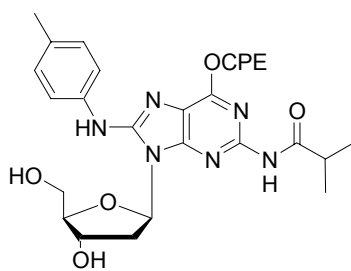
113



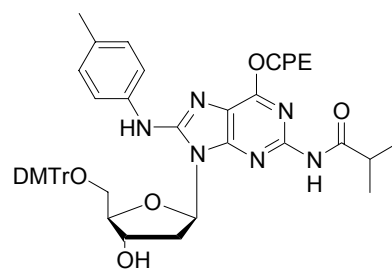
114



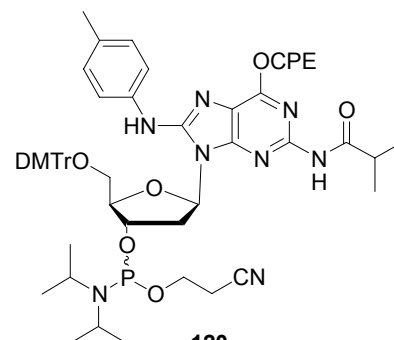
115



118



119



120

## Anhang

### DNA-Synthesizerprotokolle

#### Abkürzungen:

Acetonitril (ACN), manifested waste (mw), ct (column top), cb (column bottom), Amidit (AMD), TET (Aktivator Dicyanoimidazol), Adenosin- $\beta$ -cyanoethylphosphoramidit (A), Thymidin-PA (T), Cytosin-PA (C), Guanodin-PA (G), Modifiziertes-PA (Z), Trichloressigsäure (TCA), Cap A (CPA), Cap B (CPB), Oxidizer Lösung (OXI)

#### Programme:

Entschützen detr02  
 Waschen wash02  
 Kuppeln coupop02  
 Capping cap02  
 Oxidieren oxi02  
 Waschen wash02

#### detr02:

Step	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Vol	20		60	20		60	20		60	20		150	10
Source	TCA	TCA	GAS	TCA	TCA	GAS	TCA	TCA	GAS	TCA	TCA	GAS	GAS
Mix													
Dest	mw	mw	mw	mw	mw	mw	mw	mw	mw	mw	mw	mw	mw
Opto		v			v			v			v		
Delay/s		6			6			6			6		

#### wash02:

Step	1	2	3	4	5	6	7
Vol	20		80	20		80	10
Source	ACN	ACN	GAS	ACN	ACN	GAS	GAS
Mix							
Dest	cb	cb	cb	cb	cb	cb	mw
Opto		v			v		
Delay/s							

#### coupop02:

Step	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Vol	10	20	1	1	80		80	1	10
Source	ACN	GAS	GAS	GAS	GAS	ACN	GAS	GAS	GAS
Mix									
Dest	mw	mw	mw	mw	ct	cb	ct	mw	mw
Opto						y			
Delay/s				60					
Table			1					4	

Table:

Nr. / AMD	A	T	C	G	Z
1	cobrstla	cobrstla	cobrstla	cobrstla	cofmpm

cobrstla:

Step	1	2	3	4	5	6
Vol		10		20	10	20
Source	AMD	AMD	AMD	GAS	ACN	GAS
Mix	TET	TET	TET			
Dest	cb	cb	cb	mw	mw	mw
Opto	y		y			
Delay/s	15		15			

cofmpm:

Step	1	2	3	4	5	6	7	8
Vol		10		10		20	10	20
Source	AMD	AMD	AMD	AMD	AMD	GAS	ACN	GAS
Mix	TET	TET	TET	TET	TET			
Dest	cb	cb	cb	cb	cb	mw	mw	mw
Opto	y		y		y			
Delay/s	60		60		60			

cap02:

Step	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Vol	20		3		80	20		80	10
Source	CPA	CPA	CPA	CPA	GAS	ACN	ACN	GAS	GAS
Mix	CPB	CPB	CPB	CPB					
Dest	cb	cb	cb	cb	cb	cb	cb	cb	mw
Opto		y		y			y		
Delay/s		3	3	8					

oxi02:

Step	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Vol	15		3		80	20		80	10
Source	OXI	OXI	GAS	OXI	GAS	ACN	ACN	GAS	GAS
Mix	CPB	CPB	CPB	CPB					
Dest	cb	cb	cb	cb	cb	cb	cb	cb	mw
Opto		y		y			y		
Delay/s		2	2	6					

## Publikationsliste

### Beiträge in wissenschaftlichen Zeitschriften

1. D. Schindler, S. Lobitz, M. Thiel, S. Gräsl, S. Herterich, H. Hanenberg, Fanconi Anemia (FA) complementation group analysis using retroviral vectors, *Eur. J. Hum. Genet.* **2000**, *8 Suppl. 1*, 149-150.
2. I. Demuth, M. Wlodarski, A. J. Tipping, N. V. Morgan, J.P. de Winter, M. Thiel, S. Gräsl, D. Schindler, A. D. D'Andrea, C. Altay, H. Kayserili, A. Zatterale, J. Kunze, W. Ebell, C.G. Mathew, H. Joenje, K. Sperling, M. Digweed, Spectrum of mutations in the Fanconi anaemia group G gene, FANCG/XRCC9, *Eur. J. Hum. Genet.* **2000**, *8*, 861-868.
3. C. Meier, S. Gräsl, Highly Efficient Synthesis of a Phosporamidite Building Block of C8-Deoxyguanosine Adducts of Aromatic Amines, *Synlett* **2002**, *5*, 802-804.
4. C. Meier, S. Gräsl, Synthesis of Oligonucleotide Building Blocks of 2'-Deoxyguanosine Bearing a C8-Arylamine Modification, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2003**, *22*, 1119-1121.

### Posterbeiträge auf Tagungen

Mai 2000	32nd European Human Genetics Conference, Amsterdam/Niederlande
September 2001	Jahrestagung Chemie der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh), Würzburg
September 2002	5th International Roundtable of the International Society of Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Leuven/Belgien
April 2004	Frühjahrssymposium des Jungchemikerforums der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh), Heidelberg

## Lebenslauf

### Persönliche Angaben:

Sonja Gräsl

Geboren am 25.10.1972 in Neuendettelsau

### Schulbildung:

1979 – 1983

Volks- und Teilhauptschule Würzburg-Lengfeld

1983 – 1987

Mozart-Gymnasium, Würzburg

1987 – 1993

Röntgen-Gymnasium, Würzburg

09. Juli 1993

Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife mit der Gesamtnote „gut“

### Akademische Ausbildung:

1993 – 1996

Grundstudium im Diplomstudiengang Chemie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

26. Juni 1996

Diplomvorprüfung

März – April 1997

Forschungspraktikum am Institut für Anorganische Chemie der Universität Würzburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. W. Malisch zum Thema: „Untersuchungen zur Darstellung von Metallo-siloxy-gallanen und -indanen“

Aug. – Sept. 1997

Forschungspraktikum am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried, unter der Anleitung von PD Dr. W. Neubert auf dem Gebiet der rekombinanten Sendai-Viren

Aug. 1999 – März 2000

Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Universität Würzburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. H. J. Gross unter der Anleitung von PD Dr. med. D. Schindler zum Thema: „Mutationsanalysen an den Fanconi-Anämie-Genen der Komplementationsgruppen A, C und G“

30. März 2000

Diplom-Examen mit der Gesamtnote „gut“

seit 1. Mai 2000

Wechsel an die Universität Hamburg und Beginn der Arbeiten zur Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. C. Meier

### Studienbegleitende Tätigkeiten:

Mai 1998 – Juli 1998

Universität Würzburg: Tutorium für Lehramtsstudenten des anorganisch-chemischen Grundpraktikums



Mai 2000 – Sept. 2004    Universität Hamburg: Betreuung von Studenten des organisch-chemischen Fortgeschrittenenpraktikums

April 2003 – Sept. 2004    Universität Hamburg: Betreuung von Studenten des organisch-chemischen Grundpraktikums

Nebentätigkeiten:

Juli 1990 – Sept. 1999    Durchführung von Inventuren in Einzelhandelsmärkten der REWE Handelsgesellschaft

Aug. – Sept. 1996        Molkerei Walter, Kitzingen: Kommissionierung von Molkereiprodukten

Aug. – Sept. 1997        s.Oliver, Rottendorf: Kommissionierung von Textilien

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Synthese C8-Arylamin-modifizierter 2'-Desoxyguanosinderivate und deren Einbau in Oligonucleotide“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwandt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsversuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.