

Ralf Eisenhuth

Synthese von 3'-Aminonukleosiden



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

Synthese von 3'-Aminonukleosiden

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der

Universität Karlsruhe (TH)

vorgelegte

DISSERTATION

von

Dipl.-Chem. Ralf Eisenhuth

aus Bühl (Baden)

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2009

Zugl.: (TH) Karlsruhe, Univ., Diss., 2008

978-3-86727-875-1

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse

Referent: Prof. Dr. Dr. Clemens Richert

Korreferent: Prof. Dr. Joachim Podlech

Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2008

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2009

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2009

Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86727-875-1

Gewidmet Sonja und meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Aufgabenstellung	10
3. Theoretischer Teil.....	11
3.1. Synthese von 3'-Aminoprimern	11
3.1.1. Allgemeine Retrosynthetische Betrachtungen.....	11
3.1.2. Synthese von 3'-Aminoprimern mit 5'-Phosphitamiden.....	12
3.1.3. Synthese von 3'-Aminoprimern mit 3'-Phosphitamiden.....	17
Synthese des 3'-Aminothymidins	19
Synthese der 3'-Amino-2',3'-didesoxypurine.....	26
Entwicklung der festen Phase zur Synthese von 3'-Aminoprimern bei Kettenverlängerung mit 3'-Phosphitamiden	46
3.2. Synthese der 3'-Amino-2',3'-desoxyukleosid-5'-monophosphate.....	62
4. Zusammenfassung	70
5. Experimenteller Teil.....	71
5.1. Allgemeines	71
5.2. Synthese des 3'-Phthalimidothymidin-5'-phosphitamidess.....	74
5.3. Synthese der DMT-geschützten 3'-Aminonukleoside	76
5.4. Synthesen der festen Phasen.....	91
5.5. Synthese der 3'-Amino-2',3'-didesoxynukleotid-5'-monophosphate	92
5.6. Durchgeführte 3'-Aminoprimer und Oligonukleotidsynthesen	98
6. Anhang.....	100
6.1. NMR-Spektren.....	100
6.2. MALDI-TOF-MS Spektren.....	107
7. Literaturverzeichnis	109
Abkürzungsverzeichnis	113
Lebenslauf	115
Danksagung	116

1. Einleitung

Aminonucleoside wie 5'-Amino-5'-desoxythymidin (**1**) und 3'-Amino-3'-desoxythymidin (**2**) sind isoelektronische Analoga des natürlich vorkommenden Nucleosids Thymidin (Abbildung 1). Aminonucleoside werden seit Jahrzehnten für bioorganische Studien verwendet. Sowohl 5'-Amino-2'-desoxythymidin als auch 3'-Amino-3'-desoxythymidin wurden erstmals 1962 von Horwitz und Mitarbeitern beschrieben.^{1,2} Letsinger und Mitarbeiter konnten Anfang der 1970er Jahre zeigen, dass DNA-Analoga mit Phosphorsäureamidgruppierungen im Rückgrat, die aus Aminonucleosiden synthetisiert werden, von Polymerasen erkannt werden.^{3,4} Dies belegt wie strukturell ähnlich solche DNA-Analoga zu ihren natürlichen Vorbildern sind. Eine Literatursuche im *Web of Science*⁵ nach Phosphorsäureamiden (phosphoramidate, engl.) ergibt über 700 Einträge, viele davon sind über Oligonucleotidanaloga. Dies zeigt, wie aktiv diese Verbindungen erforscht werden.

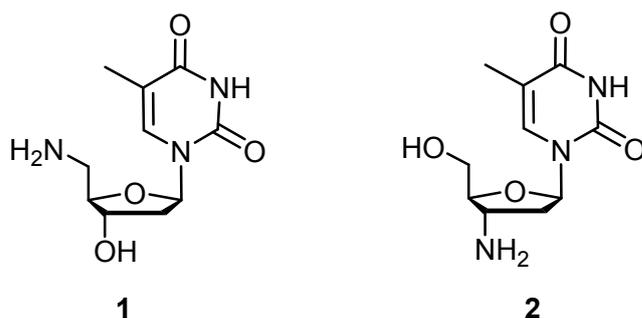


Abbildung 1: Die zu Thymidin isoelektronischen Aminonucleoside 5'-Amino-5'-desoxythymidin und 3'-Amino-3'-desoxythymidin.

Oligonucleotide mit Phosphorsäureamid-Rückgrat zeigen interessante Eigenschaften als Antisense-Inhibitoren der Genexpression. Gryaznov und Kollegen konnten in den letzten 15 Jahren eine ganze Reihe von Verbindungen mit *N3'-P5'*-Phosphorsäureamid-Rückgrat vorstellen, die in der biologischen Testung erfolgreich waren. Insbesondere Verbindungen mit 2'-Arabino-2'-fluor-*N3'-P5'*-Einheiten⁶ werden von der Firma *Geron* (Menlo Park, USA) weiter zu Pharmaka entwickelt. Das besondere Interesse an Oligonucleotiden mit *N3'-P5'*-Phosphorsäureamid-Rückgrat beruht auf der Beobachtung, dass diese stabilere Duplexe mit DNA- und RNA-Gegensträngen ausbilden als die entsprechenden *N5'-P3'*-Derivate.⁷ Einige pharmakologisch interessante Phosphorsäureamid-Rückgratstrukturen sind in Abbildung 2 dargestellt.

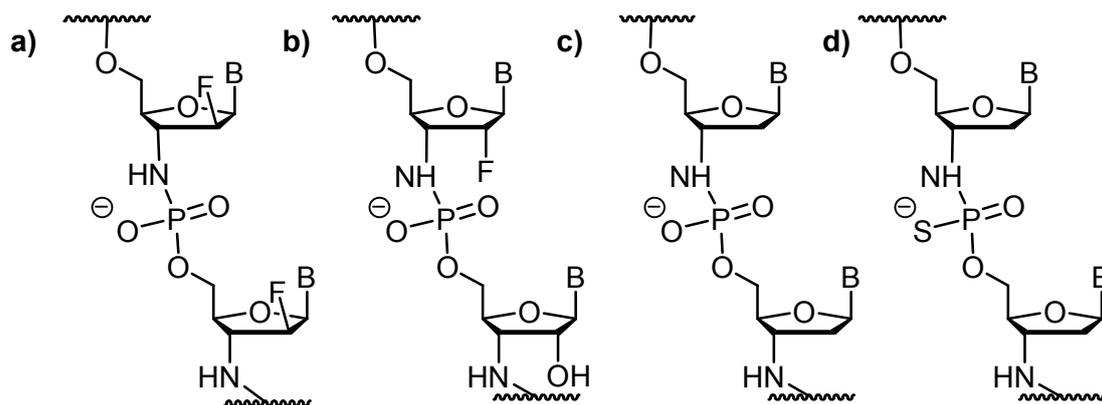


Abbildung 2: Ausschnitte aus den Strukturen von Oligonukleotid-Strängen, die von der Firma *Geron* für pharmakologische Anwendungen entwickelt wurden: a) 2'-Arabino-2'-fluor-*N3'*-*P5'*-Phosphorsäureamid b) 2'-Ribo-2'-fluor-*N3'*-*P5'*-Phosphorsäureamid c) *N3'*-*P5'*-Phosphorsäureamid (Stammverbindung) d) *N3'*-*P5'*-Phosphorsäureamidthioat.

Die Entwicklung der 2'-Arabino-2'-fluor-*N3'*-*P5'*-Oligonucleotide⁸ (Abbildung 2a) wurde durch die Beobachtung motiviert, dass es bei Synthesen der 2'-Ribofluor-*N3'*-*P5'*-Derivaten (Abbildung 2b) während der ammoniakalischen Abspaltung des Stranges von der festen Phase zur Bildung von Anhydroderivaten der Pyrimidine kam.^{9,10} Dieser Ringschluß geschieht nach S_N2 unter Abspaltung eines Fluoridions durch einen intramolekularen Angriff des Sauerstoffatoms an der 2-Position der Kernbase. Die Positionierung des Fluorsubstituenten in der Arabinoposition verhindert diese Nebenreaktion. Weiterhin zu sehen sind die *N3'*-*P5'*-Phosphorsäureamide^{11,12,13,14} (Abbildung 2c) und die von diesen abgeleiteten *N3'*-*P5'*-Phosphorsäureamidthioate¹⁵ (Abbildung 2d). Die Synthesen der ersten Generation auf *N3'*-*P5'*-Phosphorsäureamidtbindungen basierender Antisense-Oligonucleotide (den *N3'*-*P5'*-Phosphorsäureamide, Abbildung 2c), beinhalteten anfangs eine oxidative Kupplung von 5'-DMT-geschützten 3'-Aminonucleosiden (Abbildung 3a) an H-Phosphonate.¹⁶ Spätere Synthesen und solche der nachfolgenden Generationen wurden mit 5'-Phosphitamidin durchgeführt. In Abbildung 3b sind hierzu beispielhaft die von Hirschbein und Mitarbeitern beschriebenen 5'-Phosphitamide¹⁷ zur Synthese der *N3'*-*P5'*-Phosphorsäureamide dargestellt.

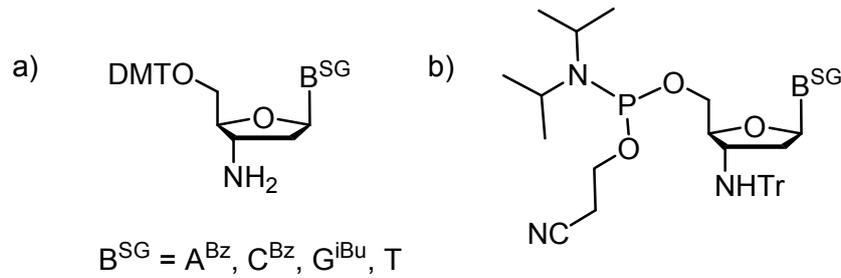


Abbildung 3: Nucleoside, die zur Synthese von N3'-P5'-Phosphorsäureamid-Antisense-Oligonucleotiden eingesetzt wurden. a) 5'-DMT-geschützte 3'-Aminonucleoside für den Kettenaufbau mittels oxidativer Kupplung, b) 3'-Aminotrylphosphoramidat zur Kettenverlängerung mittels Phosphoramidatmethode; SG = Schutzgruppe.

Phosphorsäureamide sind gegenüber enzymatischer Hydrolyse durch Exonucleasen stabiler als ihre Phosphordiester-Analoga. Dies ist für die Anwendung *in vivo* vorteilhaft. Dies gilt auch für andere Oligonucleotidanaloga, die als Antisense-Inhibitoren eingesetzt werden und ein verändertes Rückgrat enthalten.¹⁸ Es sind dies etwa die Phosphorthioate, die "Locked Nucleic Acids" (LNA)¹⁹ sowie "Peptide Nucleic Acids" (PNA)²⁰ (Abbildung 4).

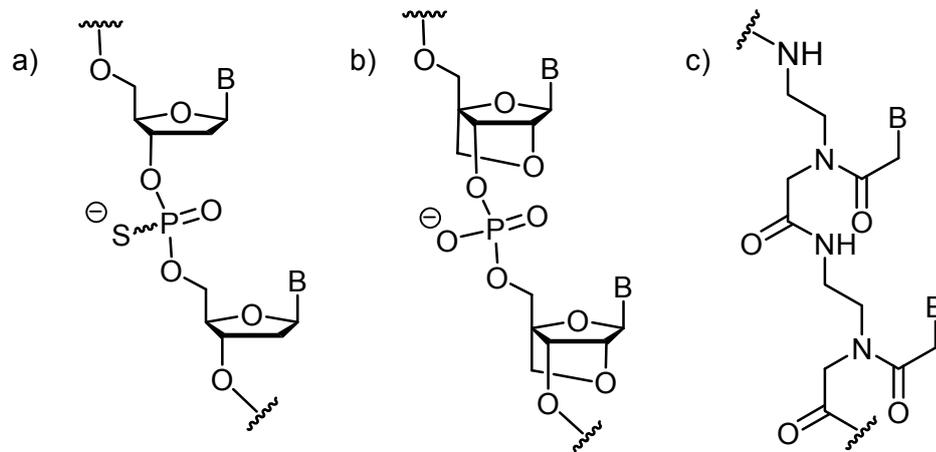


Abbildung 4: Rückgratmodifizierte Oligonucleotide die als Antisense Medikamente diskutiert werden. a) Ausschnitt aus einem Phosphorothioat-verbrückten DNA-Strang, b) Ausschnitt aus einem LNA-Strang c) Ausschnitt aus einem PNA-Strang. B = A, C, G, T.

DNA-Analoga mit Phosphorsäureamidgruppen im Rückgrat sind *chemisch* jedoch labiler als unmodifizierte DNA Stränge. Sie können unter mäßig sauren Bedingungen (z.B. 80%ige Essigsäure)^{21,22} unter Strangbruch zu freien Aminen und Phosphat-terminierten Fragmenten hydrolysiert werden. Dies hat Phosphorsäureamide für Anwendungen in der Diagnostik, zum Beispiel für die Genotypisierung²³ oder zur Sequenzierung²⁴ interessant gemacht. Mit dieser Motivation wurden Festphasensynthesen für Phosphorsäureamide bereits Ende der 1980er Jahre beschrieben (Abbildung 5).^{25,26}

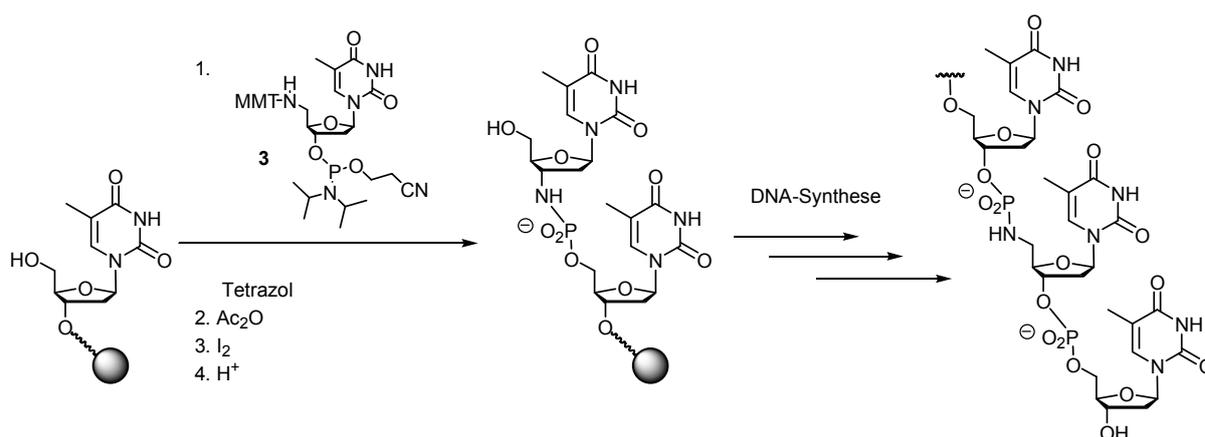


Abbildung 5: Synthese eines Oligonucleotids mit einer N5'-P3'-Phosphorsäureamidbindung unter Verwendung eines 5'-MMT-geschützten 5'-Aminophosphitamidates nach Bannwarth.^{25,26}

Bei diesen Festphasensynthesen wird das Amin der Phosphorsäureamid-Einheit durch 5'-MMT-geschützte Aminophosphitamide eingeführt. Die zu der Synthese solcher Phosphitamide benötigten 5'-Aminonucleoside sind synthetisch anspruchsvolle Zielmoleküle. Dies wird daran deutlich, dass die Synthese des letzten kanonischen Bausteins, dem freien 5'-Amino-2',5'-dideoxyguanosin, erst 42 Jahre nach der Publikation der Synthese des 5'-Amino-5'-deoxythymidins durch Horwitz und Mitarbeiter¹ publiziert wurde.²⁴ Eine effiziente Synthese eines 3'-Phosphitamidates des 5'-Amino-2',5'-dideoxyguanosin wurde von der hiesigen Gruppe im Jahre 2004 publiziert.²⁷ Diese Synthese ist in Abbildung 6 dargestellt.

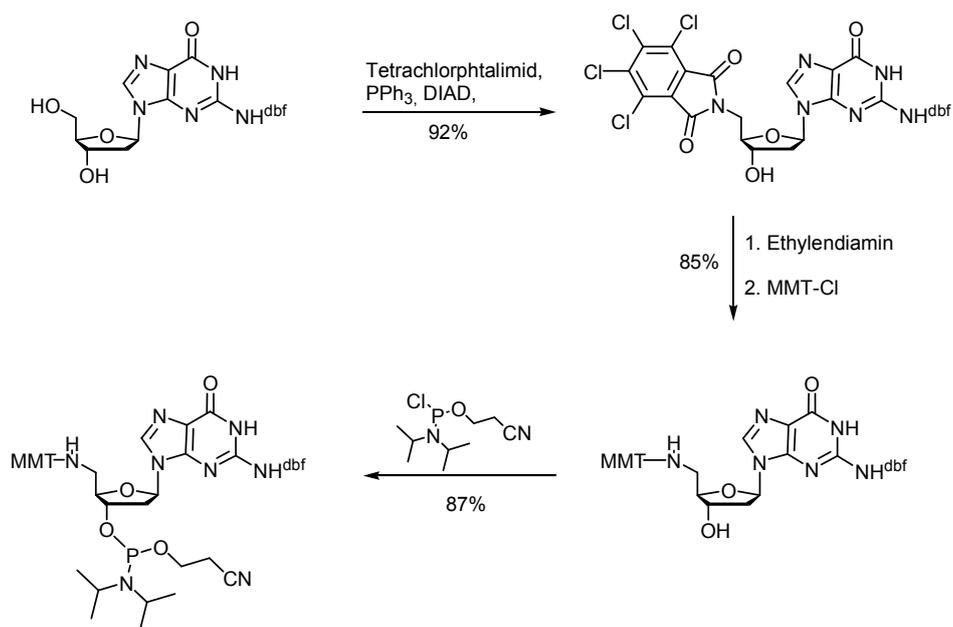


Abbildung 6: Synthese des 3'-Phosphitamidates von 5'-MMT-geschütztem 5'-Amino-2',5'-dideoxyguanosin.²⁷

Umsetzungen mit Aminonucleosiden, beziehungsweise Nucleotiden, sind auch im Zusammenhang mit chemischen Replikationsvorgängen untersucht worden. Orgel und Mitarbeiter konnten seit 1976 mehrfach zeigen, dass Aminonucleotide wie die 2'-Amino-2'-desoxyribonucleotide schneller auf einem Templatstrang oligomerisieren als Ribonucleotidderivate, denen diese aliphatische Aminogruppe fehlt.^{28,29,30,31} Eines der ersten Reaktionssystemen von Orgel und Mitarbeitern ist in Abbildung 7 dargestellt.

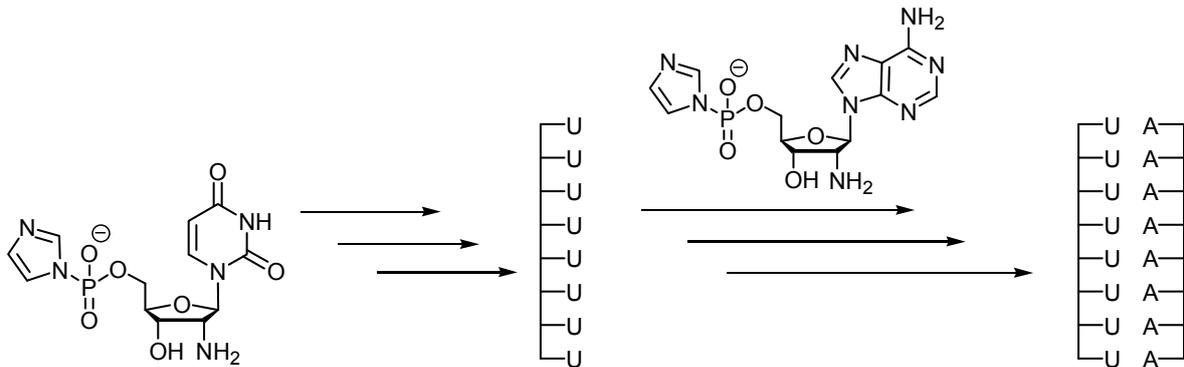


Abbildung 7: Stark vereinfachte Darstellung eines Reaktionssystems zur enzymfreien Replikation von Orgel und Mitarbeitern.²⁸ In dessen erstem Schritt wird ein als Imidazolid aktiviertes 2'-Amino-2'-desoxyuridinphosphat in Lösung polymerisiert. Die entstandenen Oligomere fungierten im nächsten Schritt als Templat für die Polymerisation eines ebenfalls als Imidazolid aktivierten 2'-Amino-2'-desoxyadenosinphosphats.

In diesem Experiment wurde in einem ersten Schritt, das als Imidazolid aktivierte, 2'-Amin-2'-desoxyuridinphosphat in Lösung polymerisiert. Die hieraus erhaltenen Stränge fungierten im nächsten Schritt als Template für die templatgesteuerte Polymerisation des aktivierten 2'-Amino-2'-desoxy-adenosinphosphats.

Auch in der hiesigen Arbeitsgruppe wird intensiv an templatgesteuerten, enzymfreien Primerverlängerungsreaktionen gearbeitet. Hierbei steht aber nicht die möglichst vollständige Replikation von Homosequenzen im Vordergrund, sondern das effiziente Auslesen von genetischer Information bei DNA in einem beliebigen Sequenzzusammenhang.

In ersten Experimenten wurden enzymfreie Verlängerungsreaktionen an 3'-Aminoprimeren mit Methylimidazoliden von 2'-Desoxynucleosid-5'-monophosphaten an der 5'-terminalen Position eines DNA-Templats untersucht.³² Es konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart verschiedener 5'-Substituenten am Templat, die als "molekulare Kappen" fungieren, die Selektivität und Effizienz der Primerverlängerung erhöht werden kann (Abbildung 8).

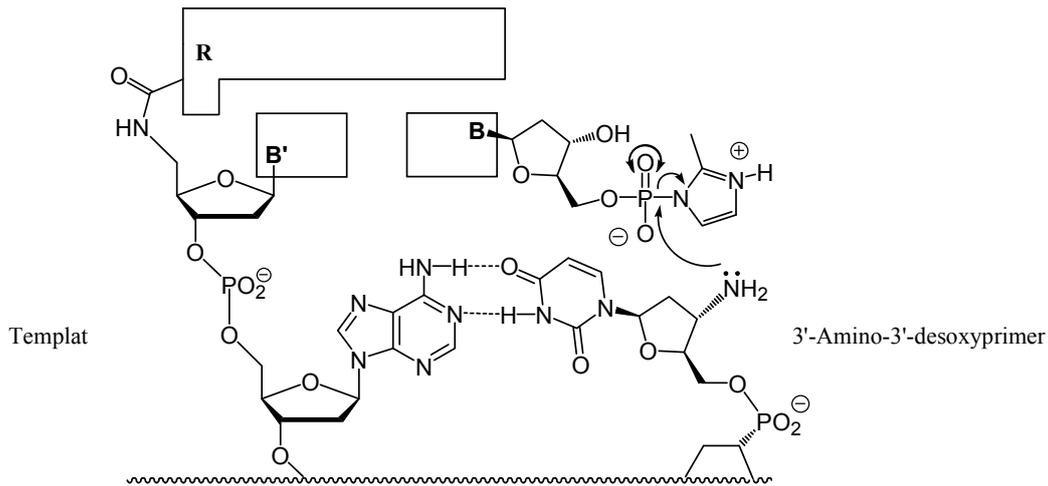


Abbildung 8: Schematische Darstellung einer templatgesteuerten chemischen Verlängerung eines 3'-Amino-3'-desoxy-terminierten Primers in Gegenwart eines an der 5'-terminalen Position mit einer Kappe versehenen DNA Templats.³² (R = "molekulare Kappe", B, B' = A, C, G oder T)

Solche "molekulare Kappen" imitieren, in einer sehr schlichten Form, das aktive Zentrum einer Polymerase. Mit den in einer umfangreichen Studie getesteten Acylsubstituenten konnte eine bis zu 20-fache Beschleunigung der Reaktion, im Vergleich zu der Kontrolle, erreicht werden.³³ Die bei diesen Reaktionen erreichten Halbwertszeiten lagen zwischen 1 und 19 Stunden.

Ein sich unmittelbar "downstream" auf dem Templat befindliches Oligonukleotid, das auch als "Helper-Oligonukleotid" bezeichnet wird (Abbildung 9a), kann einen ähnlichen Effekt wie die oben beschriebenen 5'-Acylsubstituenten haben. Der Helper-Strang bildet mit dem Templat und dem 3'-Aminoprimer eine einfache Bindungstasche für das einzubauende aktivierte Monomer. Dies kann zu einer 44-fachen Beschleunigung der Reaktion im Vergleich zu der Kontrollreaktion ohne "Helper" führen.³⁴

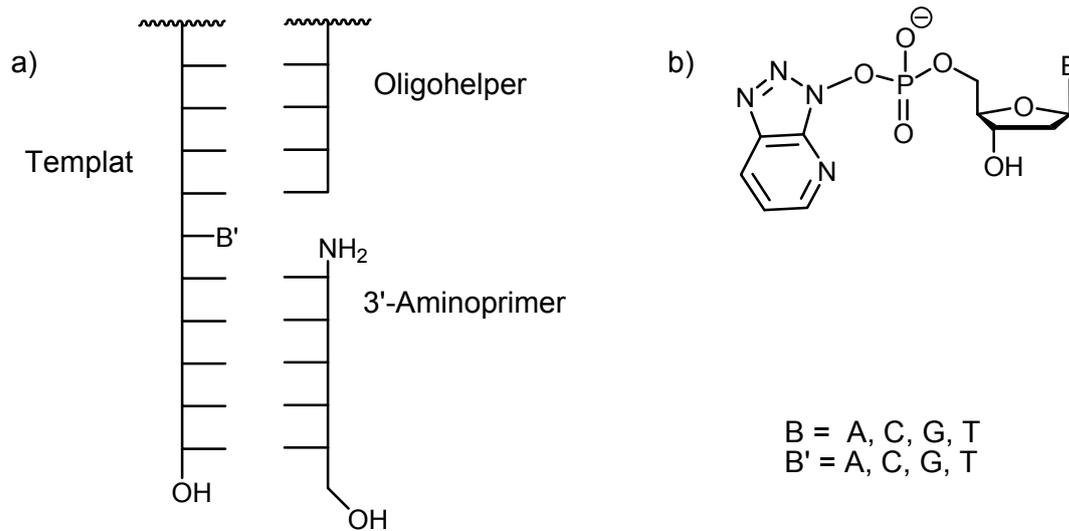


Abbildung 9: a) Dreistrang-DNA-System mit einem "Helper-Oligonukleotid." b) Als OAt-Ester aktivierte 5'-Monophosphate. B = A, C, G, T, B' = A, C, G, T.

Die zur Aktivierung des Phosphats eingesetzte Abgangsgruppe spielt im Hinblick auf Reaktionsgeschwindigkeiten ebenfalls eine wichtige Rolle.³⁵ Ein "Screening" von verschiedenen Abgangsgruppen mit nachfolgender pH-Optimierung für die nichtenzymatische Primerverlängerungsreaktion ergab die in Abbildung 9b dargestellten HOAt-Aktivester als verbesserte Monomere für die chemische Primerverlängerung.

Die Kombination aus Helper-Oligonukleotid und HOAt-Aktivester bei pH 8.9 ergab eine bis zu 79-fache Beschleunigung der Primerverlängerungsreaktion gegenüber der analogen Umsetzung mit Methylimidazoliden in Abwesenheit eines dritten Strangs bei pH 7.9. Dies führt zu Halbwertszeiten für solche Reaktionen von weit unter 30 Minuten. Da diese Reaktionen sequenzspezifisch erfolgen, wobei jeweils das komplementäre Nukleotid zur Templatbase mit dem Primerterminus reagiert, können sie zur Nukleotidbestimmung eingesetzt werden. Einzelnukleotid-Polymorphismen stellen die wichtigste Form der genetischen Variationen im menschlichen Genom dar und ihre Bestimmung ist deshalb eine wichtige diagnostische Aufgabe.

Das oben beschriebene Reaktionssystem zur Sequenzbestimmung erfordert eine Auslesung des Nukleotids im Templat per Massenspektrometrie. Da jedoch optische Chip-Scanner für das Auslesen von Microarrays, mit denen massiv parallele Bestimmungen durchgeführt werden können, preiswerter und verbreiteter sind als MALDI-TOF-Massenspektrometer, wurden im hiesigen Arbeitskreis auch fluorophormarkierte Aktivester von Nukleotiden synthetisiert.^{36,37} Mit einem Satz basenspezifisch fluorophormarkierter Mononukleotide ist ein

optisches Auslesen von Kernbasen in zu analysierenden DNA-Strängen möglich. Vier farbstoffmarkierte Nukleotide aus der hiesigen Arbeitsgruppe sind in Abbildung 10 dargestellt.

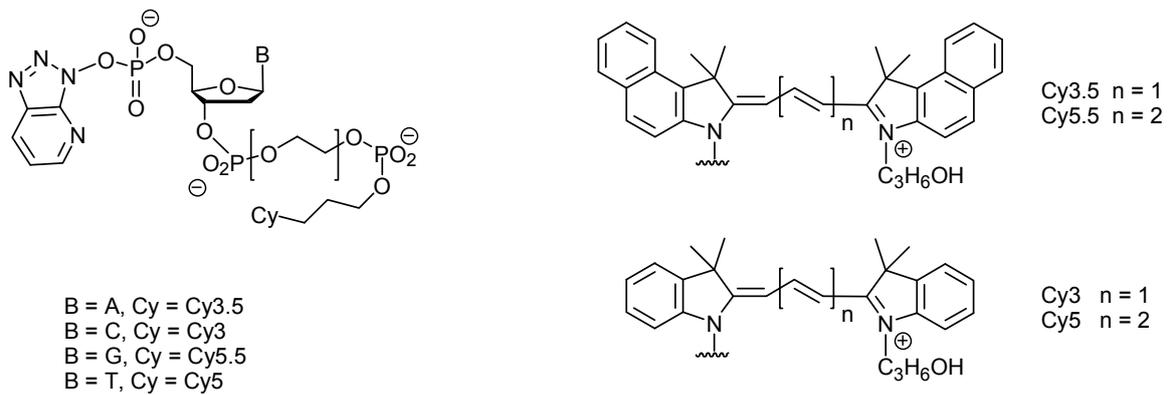


Abbildung 10: Mit vier verschiedenen Farbstoffen markierte HOAt-Aktivester der Nukleotide mit den kanonischen Basen A, C, G und T, die zur chemischen Primerverlängerung mit anschließendem Auslesen mittels Microarray und Chip-Scanner eingesetzt wurden.³⁶

Die Synthese der gezeigten fluorophormarkierten HOAt-Aktivester gelang in Festphasensynthesen mit Phosphitamid-Bausteinen.³⁶ Nach der enzymfreien Primerverlängerung in Lösung erfolgte eine Hybridisierung auf einem DNA-Microarray und die Spot-spezifische Analyse mittels des oben erwähnten Chip-Scanners, der ähnlich wie ein Laserscanningmikroskop arbeitet.

Um das Auslesen ganzer Sequenzabschnitte mittels nichtenzymatischer Primerverlängerung zu erreichen, sollen photolabil geschützte Aminonukleotid-Monomere eingesetzt werden. Ein hierzu entwickeltes Funktionsmolekül ist in Abbildung 11 dargestellt. Für dessen Einbau ist, ebenso wie bei den weiter oben beschriebenen Reaktionen, die Verfügbarkeit von Aminoprimern jedweder Sequenz wünschenswert. Diese stellt auch eine Voraussetzung für die Kommerzialisierung der chemischen Primerverlängerung zur Sequenzbestimmung dar.

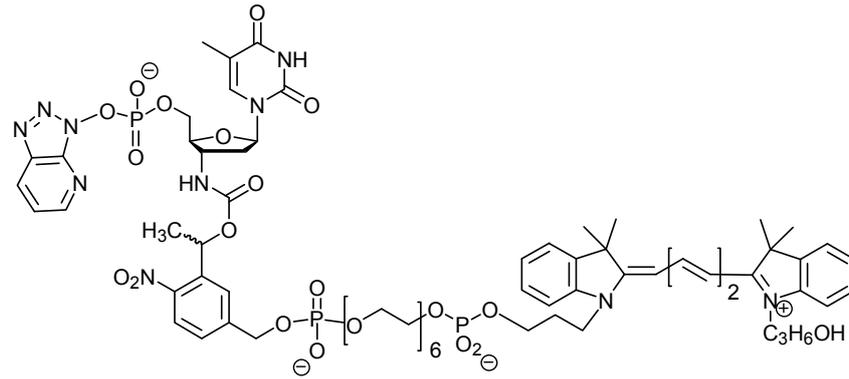


Abbildung 11: 3'-Aminonucleosid-5'-monophosphat mit einem photolabilen Linker zu einem fluoreszierenden Cyaninfarbstoff. Durch Bestrahlung mit UV-Licht kann der Linker gespalten werden und somit die Aminofunktion freigesetzt werden.

2. Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, 3'-Amino-2',3'-didesoxynukleoside zugänglich zu machen. Diese sollten als Ausgangsmaterialien für die Synthese von Oligonukleotiden mit einem 3'-terminalen 3'-Aminonukleosid dienen. Die zu entwickelnden Synthesen sollten auch in großem Maßstab zuverlässig zu den Aminonukleosiden führen. Dieses Kriterium war für die Nukleoside mit allen vier kanonischen Kernbasen (A, C, G und T) zu erfüllen (Abbildung 12). Desweiteren war eine Methodik zu etablieren, mit der die 3'-Aminonukleoside auf Controlled Pore Glass (CPG) als Träger für die Festphasensynthese immobilisiert werden können. Ausgehend von diesen festen Trägern sollten mittels konventioneller DNA-Synthese Oligonukleotide generiert werden, die als Primer für enzymfreie Replikationsschritte fungieren sollten. Schließlich war ein Zugang zu 3'-Amino-2',3'-didesoxynukleosid-5'-monophosphaten zu erarbeiten. Diese Aminophosphorsäurebausteine sind für die Herstellung von Monomeren für die mehrfache chemische Primerverlängerung von Bedeutung.



Abbildung 12: 3'-Aminonukleoside (links) und 3'-Amino-2',3'-dideoxynukleosid-5'-monophosphate (rechts) der vier kanonischen Kernbasen. B^{SG} = A^{Bz}, C^{Bz}, G^{iBu} und T.

3. Theoretischer Teil

3.1. Synthese von 3'-Aminoprimern

3.1.1. Allgemeine Retrosynthetische Betrachtungen

Ein Ziel dieser Arbeit war die Synthese von Oligodesoxynukleotiden mit einem 3'-terminalen 2',3'-didesoxynukleotid (**3**). Diese werden bei chemischen Primerverlängerungsreaktionen verwendet und auch als "3'-Aminoprimer" bezeichnet. Sie sollten über zwei verschiedene Syntheserouten zugänglich sein.

Abbildung 13 zeigt retrosynthetische Betrachtungen zur ersten möglichen Route zu dessen Synthese. Der Strangaufbau erfolgt hier im Gegensatz zu einer Standard-DNA-Synthese in 5'→3'-Richtung. Ein solches Vorgehen wird deshalb auch als "Reversed-DNA-Synthese" bezeichnet.

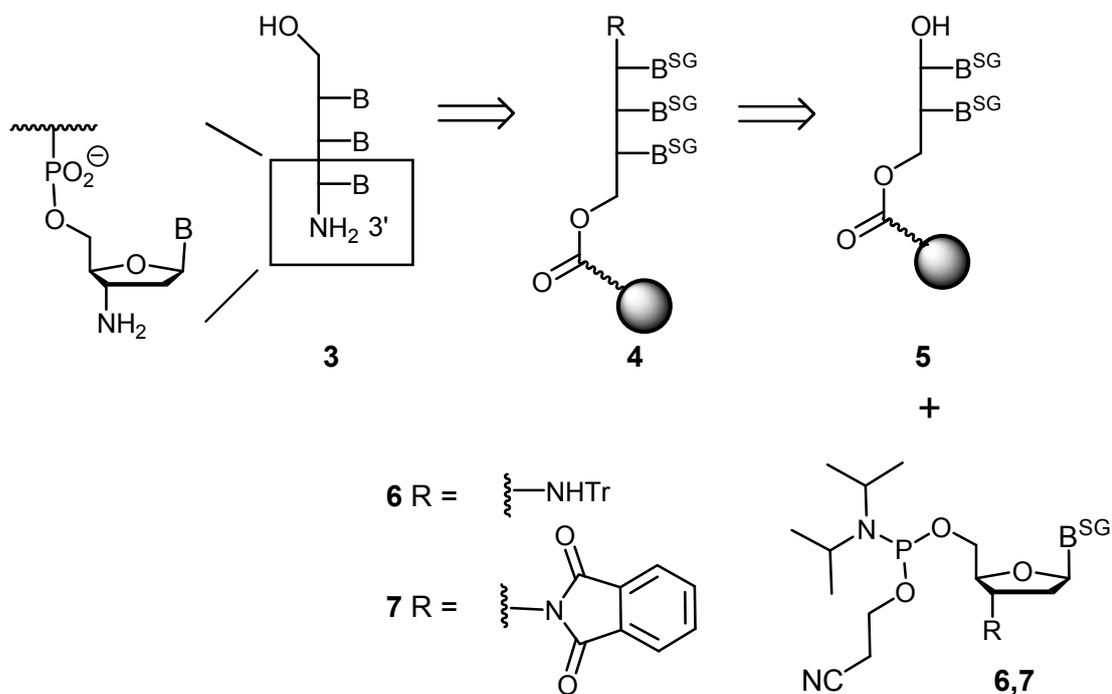


Abbildung 13: Retrosynthetische Betrachtungen zur Synthese des 3'-Aminoprimers **3** durch "Reversed-DNA-Synthese". SG =Schutzgruppe.

Der 3'-Aminoprimer sollte aus dem festphasengebundenen Oligonucleotid **4** durch Abspaltung von der festen Phase und Entschützung der als Phthalimid maskierten oder tritylgeschützten Aminofunktion erhältlich sein. Das immobilisierte Oligodesoxynucleotid **4** sollte durch Kupplung eines der Phosphitamide (**6** oder **7**) an das immobilisierte

Oligodesoxynukleotid **5** zugänglich sein. Oligodesoxynukleotid **5** wäre durch DNA-Synthese mit 3'-Phosphitamiden erhältlich.

Die retrosynthetischen Betrachtungen zur Synthese des 3'-Aminoprimer **3** in herkömmlicher 3'→5'-Richtung sind in Abbildung 14 dargestellt.

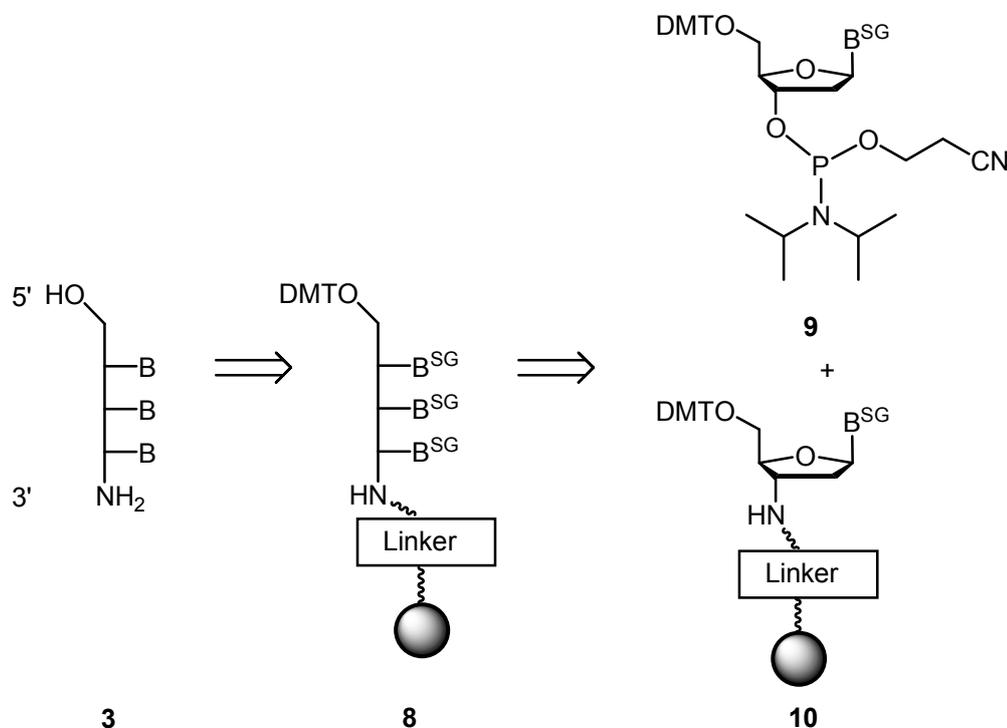


Abbildung 14: Retrosynthetische Betrachtung der Synthese eines 3'-Aminoprimer **3** durch Standard DNA – Synthese. SG = Schutzgruppe.

Der 3'-Aminoprimer **3** sollte aus dem festphasengebundenen Vorläufer **8** durch Abspaltung und Entschützung der 5'-Alkoholfunktion zugänglich sein. Das immobilisierte Oligonukleotid **8** sollte durch DNA-Synthese nach der Phosphitamidmethode mit 3'-Phosphitamiden (**9**) ausgehend vom immobilisierten Aminonucleosid **10** erhältlich sein.

Weitere retrosynthetische Betrachtungen sollen der besseren Übersicht halber in den einzelnen Kapiteln näher besprochen werden.

3.1.2. Synthese von 3'-Aminoprimern mit 5'-Phosphitamiden

Aus den retrosynthetischen Betrachtungen im vorherigen Abschnitt wurde ersichtlich, dass zur Synthese von 3'-Aminoprimern Phosphitamide mit einer geschützten Aminofunktion an der 3'-Position benötigt werden. In Abbildung 15 sind zwei dafür potentiell einsetzbare Phosphitamide dargestellt, die 3'-Tritylaminophosphitamide **11a-t**¹⁷ und die 3'-Phthalimidophosphitamide **12a-t**.

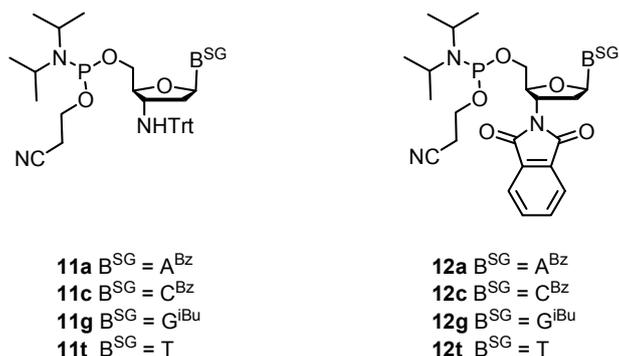


Abbildung 15: Aus den retrosynthetischen Überlegungen zur Synthese von 3'-Aminoprimeren mit 5'-Phosphitamididen resultierende Zielmoleküle.

Zum Beginn dieser Arbeit waren die Synthesen der 3'-Aminotriethylphosphitamide (**11a-t**) zwar literaturbekannt,¹⁷ doch waren sie nicht kommerziell erhältlich. Die Synthesen der 3'-Phthalimidophosphitamide (**12a-t**) waren nicht bekannt. Eine Aufgabe dieser Arbeit war es, die Phosphitamide **11a-t** oder **12a-t** der hiesigen Gruppe für weiterführende Studien zugänglich zu machen. Bei der Entscheidung welche der beiden Arten der Phosphitamide synthetisiert werden sollten, fiel die Wahl auf die 3'-Phthalimidophosphitamide (**12a-t**), da durch Verwendung von Phthalimid als maskiertes Amin die Synthesen um mindestens zwei Stufen kürzer wären, da die Hydrierung des Azids und die Tritylierung desamins bei diesen Synthesen entfallen würden. Der Einsatz von Phthalimid als maskiertes Amin zur Synthese aminomodifizierter Oligodesoxynukleotide war bis zu diesem Zeitpunkt auf an 2'-Seitenketten des Zuckers³⁸ oder an Kernbasen angebrachte Amine beschränkt.³⁹ Zur Etablierung der Phthalimidogruppe in der Synthese von 3'-Aminoprimeren sollte hierbei zuerst das Thymidinderivat **12t** synthetisiert und zur Synthese eines 3'-Aminoprimeres eingesetzt werden, da dieses Derivat mit dem kleinsten synthetischen Aufwand verbunden ist und in diesem Fall keine Schutzgruppe für die Kernbase notwendig ist.

In Abbildung 16 ist die geplante Synthese dieses 3'-Phthalimidophosphitamides **12t** schematisch dargestellt.

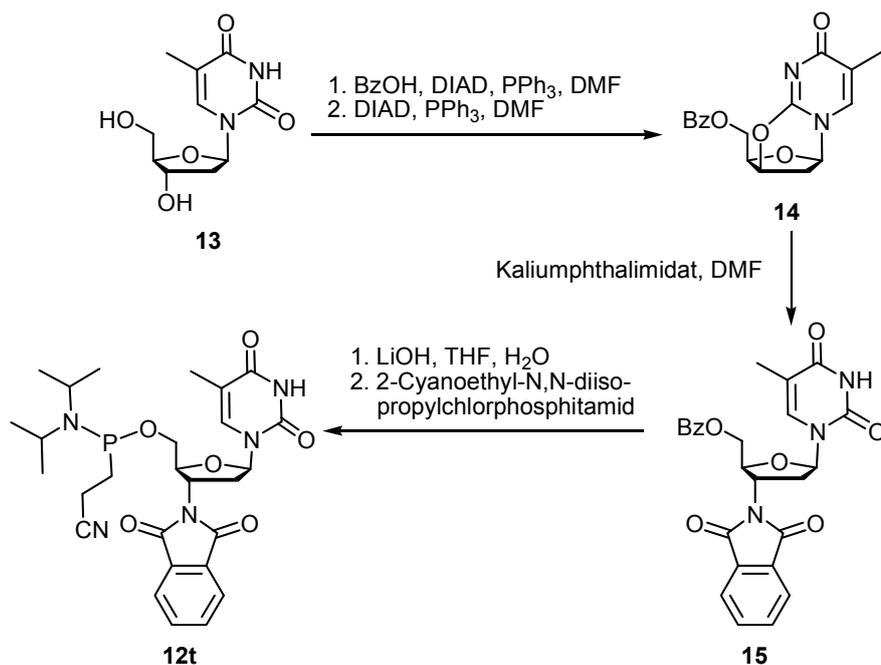


Abbildung 16: Syntheseplan zur Synthese von 3'-Phthalimido-3'-desoxythymidin-5'-O-cyanoethyldiisopropylphosphitamid **12t**.

Die Synthese sollte ausgehend von Thymidin **12** über das literaturbekannte Anhydroderivat⁴⁰ **14** stattfinden, welches durch eine doppelte Mitsunobu-Reaktion erhältlich sein sollte. Dieses sollte durch Öffnung mit dem Kaliumsalz des Phthalimides in das 5'-geschützte 3'-Phthalimidothymidin **15** überführt werden. Die letzten zwei Schritte der Synthese wären die alkalische Entschützung der 5'-Hydroxyl-funktion und die Phosphitylierung dieser zum 3'-Phthalimidophosphitamid **12t**.

Das Anhydroderivat **14** wurde nach Literaturprotokollen⁴¹ in 76 % Ausbeute erhalten. Es wurde versucht, die Phthalimidofunktion analog der Azideinführung unter Refluxbedingungen mit dem Kaliumsalz von Phthalimid durchzuführen. Jedoch konnte auch nach 10 Stunden Refluxieren keine Öffnung von Verbindung **14** zum 5'-geschützten 3'-Phthalimidothymidin (**15**) beobachtet werden. Durch den Wechsel des Lösungsmittels von DMF auf NMP konnte die maximal mögliche Reaktionstemperatur von 170 auf 210 °C erhöht werden. Dies führte jedoch auch zu keinen detektierbaren Mengen an Verbindung **15**. Die Erhöhung der Löslichkeit des Kaliumsalzes durch Zugabe von Kronenether führte ebenfalls zu keinem Erfolg. Der Einsatz von Lewisäuren, um die Ringöffnung von Anhydronukleosiden zu erleichtern, ist bekannt. In eigenen Experimenten konnte jedoch auch nach der Zugabe von LiCl oder BF₃-Etherat keine Verbesserung im Hinblick auf die Öffnung

von Verbindung **14** beobachtet werden. Es ist in diesem Fall davon auszugehen, dass die Lewisäuren durch Koordination an das Phthalimidat dessen Nucleophilie vermindern. Durchführung der Reaktion unter Mikrowellenbedingungen ergab lediglich Zersetzung des Eduktes schon innerhalb von Minuten. Die Verbindung **15** konnte hierbei nicht einmal massenspektrometrisch aus der Rohmischung nachgewiesen werden. Die beobachtete Zersetzung des Eduktes ist auf lokale Überhitzung der Lösung zurückzuführen. Dies ist vor allem bei hohen Salzkonzentrationen ein häufig auftretendes Phänomen.

Da die kürzest mögliche Route zum Zielmolekül **12t** somit nicht durchführbar war, wurden andere Syntheserouten untersucht. Eine Alternative ist die in Abbildung 17 dargestellte Synthese von 3'-Phthalimido-3'-desoxythymidine (**19**) nach Fox und Mitarbeitern.⁴² Die Einführung der Phthalimido-funkt. erfolgt auch hier über ein *in situ* gebildetes 2,3'-Anhydronukleosid **17**.

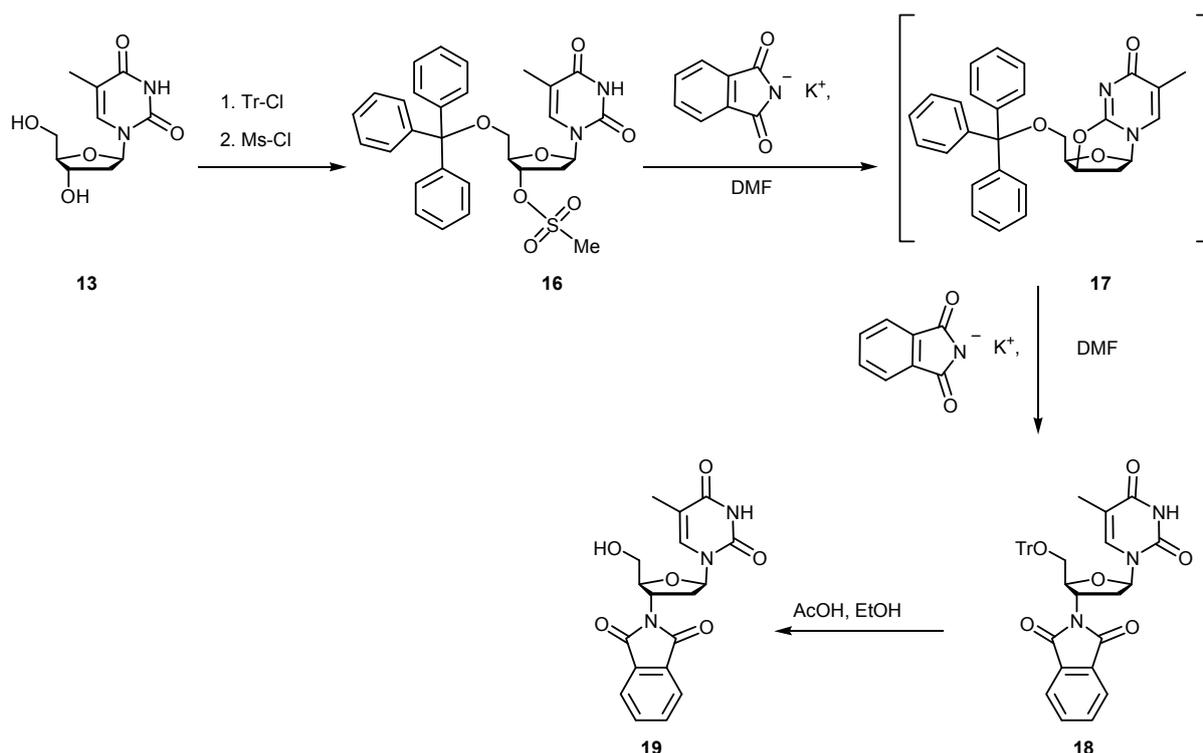


Abbildung 17: Synthese von 3'-Phthalimido-3'-desoxythymidin **19** nach Fox und Mitarbeitern.⁴²

Über die Hintergründe, warum sich Verbindung **17** im Gegensatz zu Verbindung **14** öffnen lassen sollte, kann nur spekuliert werden. Eine mögliche Erklärung könnte die Verbesserung der Abgangsgruppenqualität des Alkoholates durch Protonierung des Brückensauerstoffatoms oder der N3-Position sein, welche durch das beim Ringschluß

freiwerdende Proton ermöglicht wird. Jedoch ist hierbei zu bedenken, dass mit drei eingesetzten Äquivalenten Kaliumphthalimidat ein Überschuss an Base vorhanden ist.

Die Verbindung **16** wurde ausgehend von Thymidin (**13**) nach Literaturvorschrift⁴³ in 72% Ausbeute erhalten. Umsetzung mit Kaliumphthalimidat ergab das gewünschte 3'-Phthalimidonukleosid (**18**) welches nach wässriger Aufarbeitung direkt in der nachfolgenden Detritylierung mit Essigsäure in Ethanol eingesetzt wurde. Die Verbindung **19** konnte über zwei Stufen in 24 % erhalten werden. Phosphitylierung von **19** ergab das 3'-Phthalimidophosphitamid (**12t**) in einer Gesamtausbeute von 14 % über 4 Stufen (Abbildung 18).

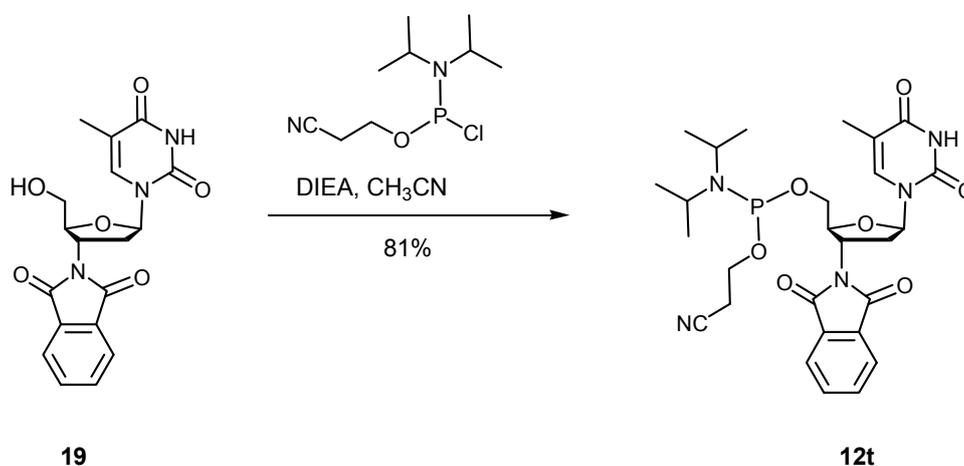


Abbildung 18: Synthese von 3'-Phthalimido-3'-desoxythymidin-5'-O-cyanoethyl-diisopropylphosphit-amid **12t**.

Unter Verwendung des nun erhaltenen Phosphitamides **12t** konnte ein 3'-Aminoprimer der Sequenz 5'-CTGT-3' durch Synthese mit 5'-Phosphitamiden synthetisiert werden. Bei der massen-spektrometrischen Routinekontrolle der ammoniakalischen Entschützungslösung musste jedoch festgestellt werden, dass das Amin nicht vollständig freigesetzt wurde. Es wurde eine Masse detektiert, die der des Produktes zuzüglich der des halb geöffneten Phthalimides entspricht. Eine Verlängerung der Entschützungsdauer auf vier Tage bei Raumtemperatur oder die Durchführung der Abspaltung bei höheren Temperaturen (55°C über Nacht) verbesserten das Ergebnis nur geringfügig. Der Grund für dieses Problem ist vermutlich die Deaktivierung der verbliebenen Amidbindung gegenüber Nucleophilen durch den elektronenschiebenden Effekt der Carboxylatfunktion. Weiterhin könnte es möglich sein, dass ein Angriff durch repulsive Wechselwirkungen zwischen der Carboxylatgruppe und dem Nucleophil zusätzlich erschwert wird.

Da dies ein bekanntes Problem ist, gibt es zur Freisetzung von Aminen aus Phthalimiden auf Oligonukleotidniveau optimierte Protokolle. Eine Möglichkeit hierfür ist der Einsatz einer Mischung aus konzentrierter Ammoniaklösung und 40% Methylamin in Wasser (1:1). Diese Mischung wird auch als AMA-Lösung⁴⁴ bezeichnet und dient normalerweise zur schnellen Entschützung von Oligonukleotiden die Isobutyrylgruppen als Schutzgruppe für die exocyclische Aminofunktion von Guanosin enthalten. Bei Anwendung dieser Mischung zur Entschützung des 3'-Aminoprimer wurden deutlich bessere Ergebnisse als bei der konventionellen Entschützung erhalten. Der 3'-Aminoprimer konnte nach Aufreinigung in 20% Ausbeute erhalten werden.

Zusammenfassung

Ausgehend von Thymidin (**13**) konnte das 3'-Phthalimidophosphitamid (**12t**) in 4 Stufen in 14% Gesamtausbeute synthetisiert werden. Durch die Synthese eines 3'-Aminoprimer der Sequenz 5'-CTGT-3' konnte gezeigt werden, dass das Phosphitamid **12t** zur Synthese eines 3'-Aminoprimer mit Thymidin als terminaler Base geeignet ist. Der synthetisierte 3'-Aminoprimer konnte in der hiesigen Gruppe erfolgreich in chemischen Primerverlängerungsreaktionen eingesetzt werden. Es war somit möglich die Phthalimidofunktion als maskiertes 3'-Amin für die Synthese von 3'-Aminoprimern zu etablieren.

Da jedoch im September 2005 erstmals die 3'-Tritylaminophosphitamide **11a-t**¹⁷ von der Firma *Transgenomics* (Glasgow, Schottland) auf den Markt gebracht wurden, musste von einer weiteren Verfolgung der Phthalimidrouten aus Gründen der Wirtschaftlichkeit abgesehen werden. Vorarbeiten welche zu den Purinen gemacht und bei den Synthese der im nächsten Abschnitt besprochenen 3'-Amino-5'-DMT-2',3'-didesoxynukleoside eingesetzt werden konnten, werden aus Gründen der Übersichtlichkeit im nächsten Abschnitt besprochen

3.1.3. Synthese von 3'-Aminoprimern mit 3'-Phosphitamiden

Wie im vorherigen Abschnitt erwähnt, waren die 3'-Aminotritylphosphitamide (**11a-t**)¹⁷ zu Beginn der Arbeiten an diesem Projekt kommerziell verfügbar. Bei genaueren Recherchen musste jedoch festgestellt werden, dass diese nur als Auftragssynthesen für die Firma *Geron* hergestellt wurden. Somit musste davon ausgegangen werden, dass eine dauerhafte Verfügbarkeit dieser teuren Substanzen nicht gewährleistet sein würde. Dies erwies sich bei

der Einstellung der Syntheseaktivitäten durch die Firma *Transgenomics* im Jahre 2006 als richtig. Es war deshalb wünschenswert diese Substrate zu umgehen. Dies wäre durch DNA-Synthese mit 3'-Phosphitamidern, die von einem auf einer festen Phase immobilisierten 3'-Aminonukleosid ausgeht möglich (Abbildung 19).

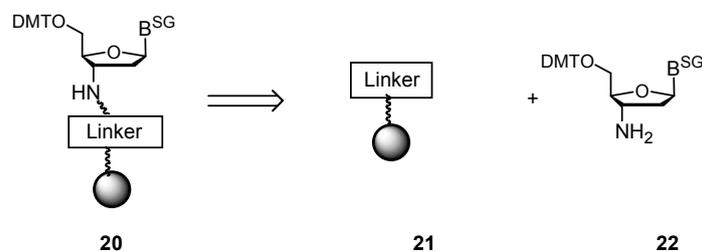


Abbildung 19: Retrosynthetische Betrachtung zur Synthese einer festen Phase für die Synthese von 3'-Aminoprimeren. SG = Schutzgruppe.

Der hierzu benötigte Support (**20**) könnte aus den 5'-DMT-geschützten Aminonukleosiden (**22**) und einem entsprechenden Träger **21** zugänglich sein. Die Kupplung zu **20** sollte hierbei über Standard-Acylierungsschemie möglich sein.

In diesem Abschnitt sollen nun zunächst die Synthesen der benötigten 5'-DMT-geschützten Aminonukleoside **23-26** besprochen werden (Abbildung 20). Das Kapitel wird aufgrund der unterschiedlichen Routen in einen Abschnitt über Pyrimidine und einen solchen über die Purine aufgeteilt. Anschließend soll über die Synthese eines Linkers und eines neuen Supports zur Immobilisierung von 3'-Aminonukleosiden berichtet werden.

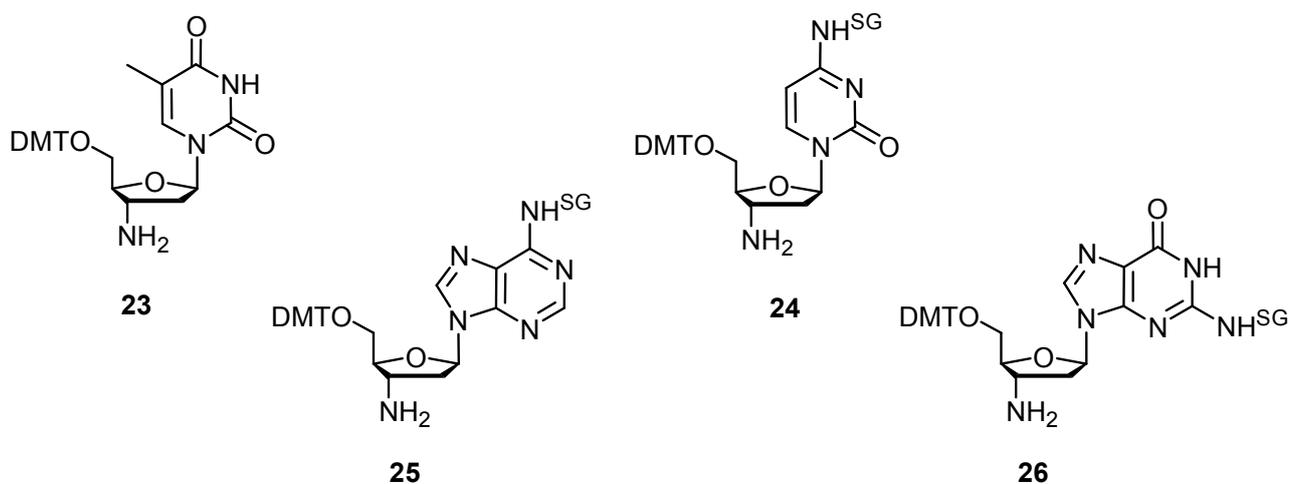


Abbildung 20: 3'-Aminonukleoside **23-26**. Die Zielmoleküle dieses Abschnitts. SG = Schutzgruppe.

Synthese des 3'-Aminothymidins

Die Synthese des Thymidinderivates **23** sollte in Anlehnung an die 1995 publizierte Synthese von Gryaznov und Mitarbeitern¹⁶ durchgeführt werden, die in Abbildung 21 dargestellt ist.

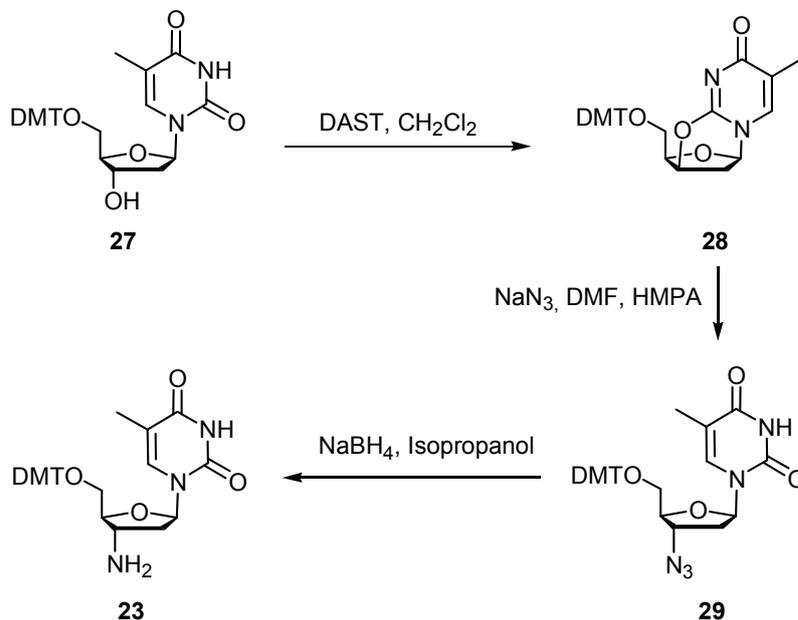


Abbildung 21: Synthese von 3'-Amino-5'-*O*-dimethoxytrityl-3'-desoxythymidin **23** nach Gryaznov und Mitarbeitern.

Diese Synthese geht von 5'-DMT-geschütztem Thymidin **27** aus und führt über das Anhydronucleosid **28**. Der Ringschluß zum Anhydronucleosid wird in diesem Fall mit Diethylamino-schwefeltrifluorid (DAST) durchgeführt.⁴⁵ Die Einführung der Azidofunktion erfolgt mit Natriumazid in einer Mischung aus DMF/HMPA. Die Reduktion von Azid **29** zu Amin **23** erfolgt in dieser Syntheseroute mit Natriumborhydrid in Isopropanol.

Das Anhydronucleosid **28** konnte ausgehend von Thymidin (**13**) nach einer abgewandelten Vorschrift von Pfeleiderer und Mitarbeitern⁴⁶ in 78 % Ausbeute erhalten werden (Abbildung 22). Bei dieser Synthese wurde nur das Endprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt.

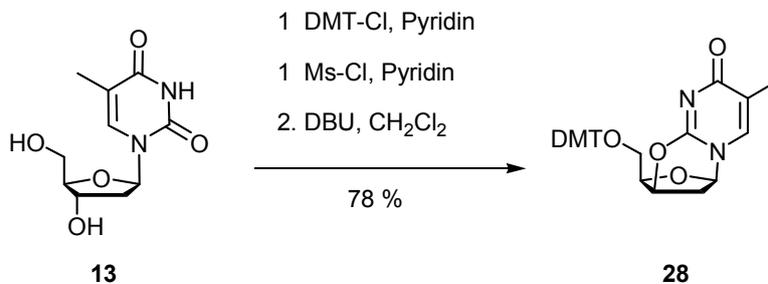


Abbildung 22: Synthese des 5'-geschützten Anhydronucleosides **28** nach einer abgewandelten Vorschrift von Pfeleiderer und Mitarbeitern.⁴⁶

Da zur Öffnung des Anhydronukleosides **28** zum 3'-Azidonukleosid **29** weder Hexamethylphosphorsäureamid (HMPA) noch Lithiumazid in Frage kamen^{*}, wurde diese mit Natriumazid in DMF durchgeführt. Hierbei waren Reaktionstemperaturen von 130°C, anstelle der beim Einsatz von HMPA oder Lithiumazid üblichen 100°C, notwendig. Weiterhin waren Reaktionsdauern von über zehn Stunden notwendig, wobei erhebliche Nebenreaktionen beobachtet wurden. Diese sind vermutlich auf die thermische Instabilität der Dimethoxytritylschutzgruppe (DMT) zurückzuführen. Verbindung **29** konnte nach aufwendiger säulenchromatographischer Aufreinigung in 75% erhalten werden. Der Grund für die Trennprobleme bei der Säulenchromatographie ist die verringerte Trennleistung der Säule durch die Passivierung des Kieselgels mit Triethylamin, das für den Erhalt der DMT-Schutzgruppe notwendig ist.

Da sich diese Synthese aufgrund der aufwendigen Säulenchromatographie als sehr arbeitsintensiv erwies, wurde nach einer Synthese des 5'-DMT geschützten Azidonukleosids **28** mit einfacherer Durchführung gesucht. Als eine interessante Alternative wurde die in Abbildung 23 dargestellte Syntheseroute identifiziert. Diese beinhaltet eine doppelte Mitsunobu-Reaktion mit Benzoesäure und dem Sauerstoffatom in der 2-Position von Thymidin als Nukleophile zum Anhydronukleosid **29**. Die Einführung der Azidofunktion und Freisetzung der 5'-Alkoholfunktion sollte das 3'-Azidonukleosid **30** ergeben. Dieses sollte an der 5'-Position DMT-geschützt und durch Reduktion mit Natriumborhydrid zur Zielverbindung umgesetzt werden.

^{*} Der Einsatz von HMPA ist aufgrund von Regulierungen nicht im großen Maßstab möglich. Lithiumazid ist wegen der Explosionsgefahr nur noch als wässrige Lösung kommerziell erhältlich.

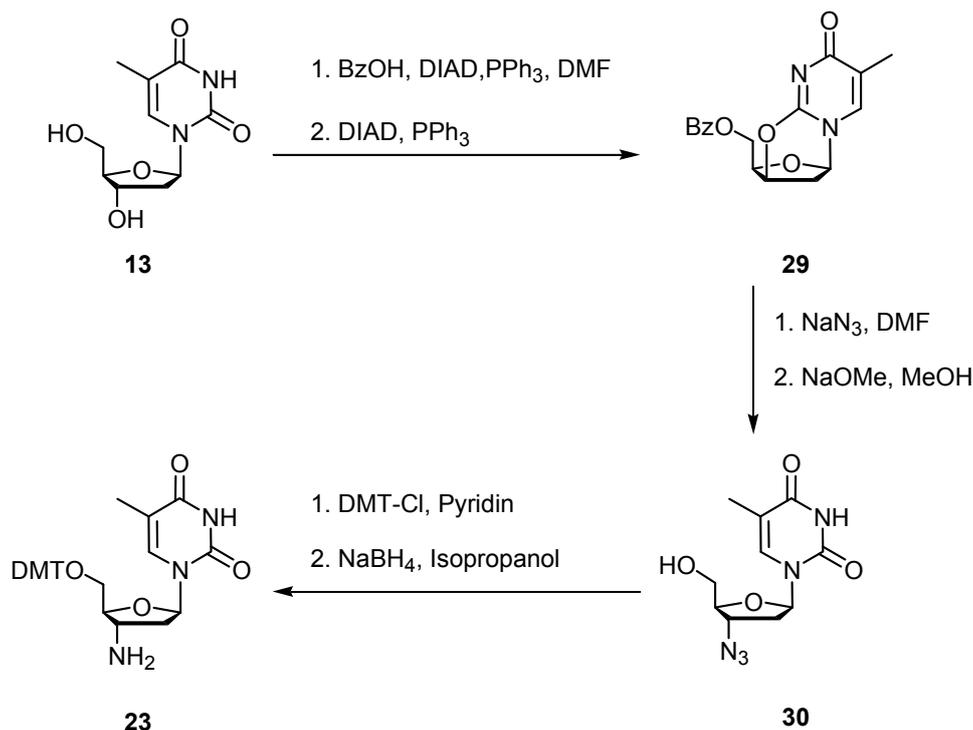


Abbildung 23: Synthesepfad zur Synthese von 3'-Amino-5'-O-DMT-3'-desoxythymidin **23**.

Diese Route hat den Vorteil, dass die DMT-Schutzgruppe erst in der vorletzten Stufe eingeführt wird, wodurch die Aufreinigung der Zwischenstufen erleichtert wird. Die Synthese von AZT (**30**) nach Valerie und Mitarbeitern⁴⁷ wurde weiterhin bereits routinemäßig im Fortgeschrittenen-Praktikum im hiesigen Institut durchgeführt, was ihre Robustheit belegt. Die Umsetzung von **30** mit DMT-Cl in Pyridin gefolgt von der Reduktion des Azids mit Natriumborhydrid in Isopropanol⁴⁸, ergab das Zielmolekül **23** in 88% Ausbeute über zwei Stufen. Die erhaltene Gesamtausbeute ist geringer als die zuvor publizierten,¹⁶ jedoch ist bei der gewählten Versuchsdurchführung nur eine säulenchromatographische Aufreinigung in der gesamten Synthesesequenz notwendig.

Die in Abbildung 24 dargestellte Synthese¹⁶ des 2'-Desoxycytidinderivates **24** nach Gryaznov und Mitarbeitern ist weitgehend analog zu der des Thymidinderivates **23**.

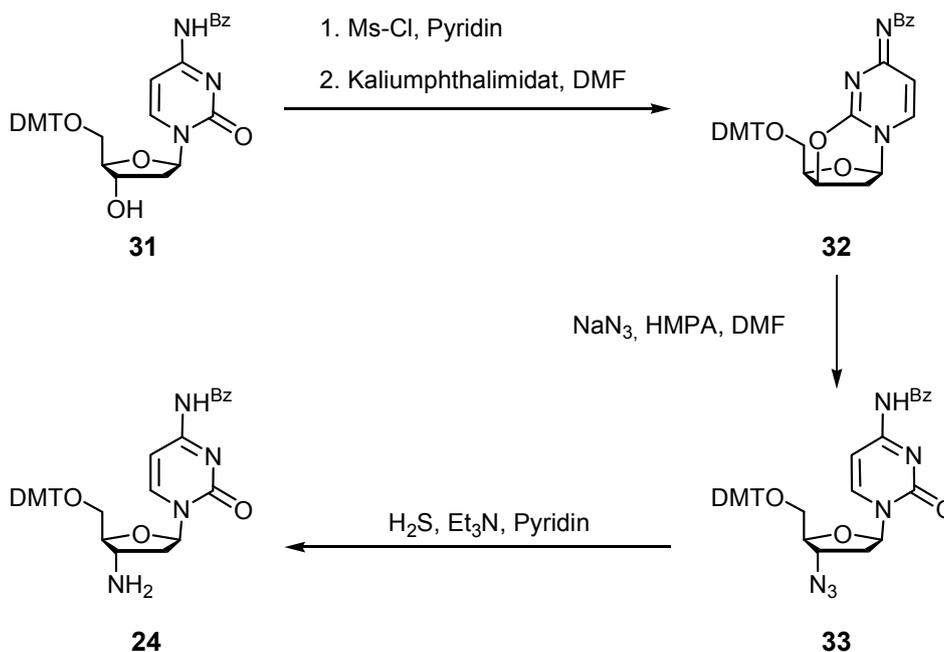


Abbildung 24: Synthese von 3'-Amino-*N*4-benzoyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2',3'-dideoxycytidin **24** nach Gryaznov und Mitarbeitern.¹⁶

Die Umwandlung zum Anhydronukleosid **32** geschieht hier jedoch nicht mit Diethylamino-schwefeltrifluorid (DAST) sondern über das 3'-Mesylat, gefolgt vom Ringschluß mit Kaliumphthalimidat als Base nach Fox und Mitarbeitern.⁴² Die Reduktion des Azids **33** zum Amin **24** erfolgt hier nicht mit Natriumborhydrid in Isopropanol sondern mit Schwefelwasserstoff in einer Mischung aus Pyridin und Triethylamin.

In den eigenen Experimenten konnte das 5'-DMT geschützte Nukleosid **31** ausgehend von *N*4-Benzoyl-2'-desoxycytidin nach Literaturprotokollen⁴⁹ in 93% erhalten werden. Das Anhydronukleosid **32** wurde jedoch nicht durch Mesylierung der 3'-Hydroxylgruppe und Umsetzung mit Kaliumphthalimidat, sondern durch eine intramolekulare Mitsunobu-Reaktion mit Triphenylphosphin und DIAD erhalten.⁵⁰ Die Ausbeute betrug hierbei 87% für den Ringschluß und somit 81 % über zwei Stufen. Versuche die Azideinführung mit Natriumazid in DMF durchzuführen, ergaben wie im Thymidinfall, erhebliche Nebenreaktionen. Beim 2'-Desoxycytidin tritt jedoch zusätzlich auch die Ringöffnung an der 1'-Position des Zuckers auf (Abbildung 25).⁵¹

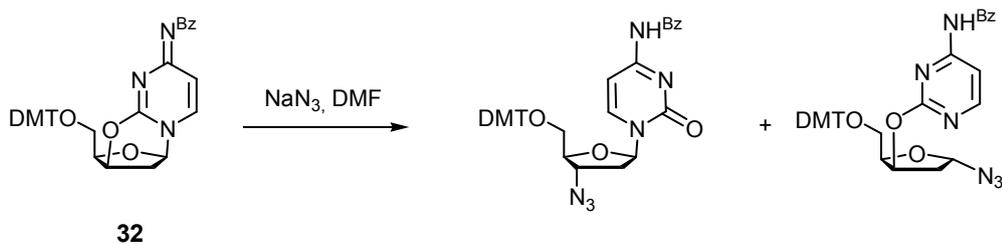


Abbildung 25: Die zwei möglichen Reaktionskanäle bei der Öffnung des Anhydronucleosides **32**.

Eine Abtrennung der Zersetzungsprodukte gelang in diesem Fall jedoch selbst bei chromatographischer Aufreinigung über einen Gradienten nicht. Als Grund hierfür muss wieder die schon im Falle des Thymidins besprochene verringerte Trennleistung der Säule bei Verwendung von Triethylamin angesehen werden. In der literaturbekannten Route wird das Aminonucleosid **24** durch Reduktion des Azides **33** mit H_2S in Pyridin/Triethylamin erhalten. Hierbei ist jedoch eine säulenchromatographische Aufreinigung notwendig. Da die Ausbeute dieser dünn-schichtchromatographisch sauberen Reaktion nur 60% betrug, kann davon ausgegangen werden, dass das Edukt für die Reduktion nicht als Reinstoff erhalten werden konnte. Eine säulenchromatographische Aufreinigung des Amins **24** an Kieselgel sollte aber wegen der hohen Polarität des Moleküls und den damit zu erwartenden Ausbeuteverlusten vermieden werden. Aus diesem Grund wurde eine der Thymidinroute analoge Route getestet (Abbildung 26).

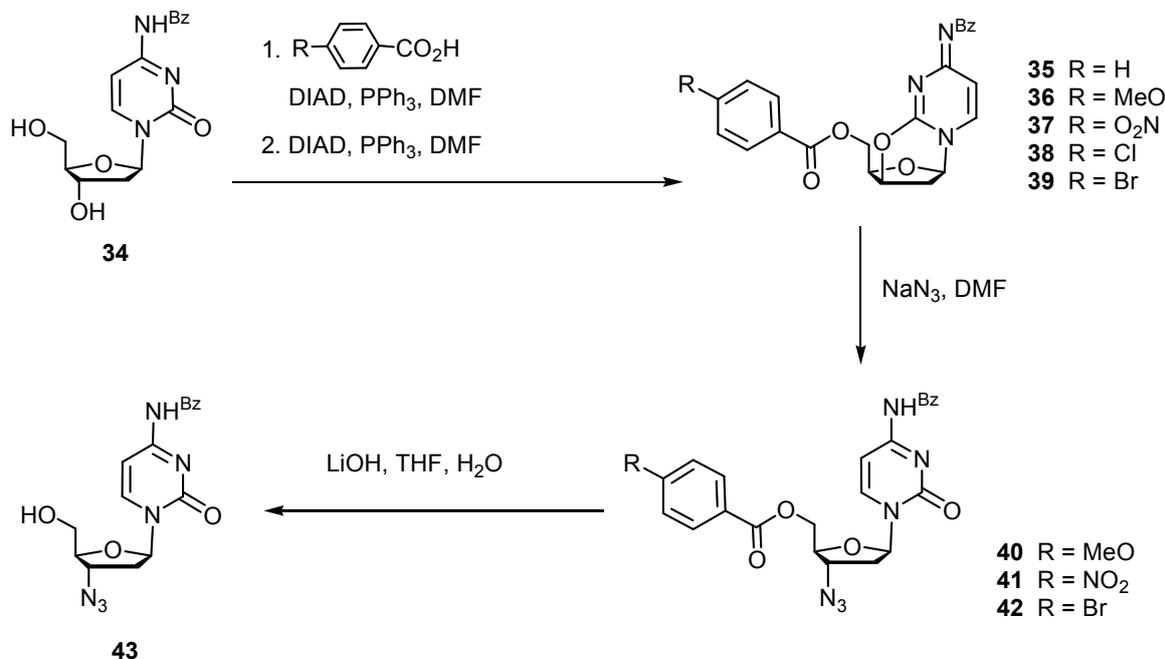


Abbildung 26: Eigene Synthese von 3'-Azido-4-benzoyl-2',3'-dideoxycytidin **43**.

Diese revidierte Route geht von käuflichem *N*4-Benzoyl-2'-desoxycytidin (**34**) aus. Dieses sollte in einer zweifachen Mitsunobu-Reaktion in das entsprechende 5'-geschützte Anhydronukleosid **35** um-gewandelt werden. Die Öffnung von **35** mit Natriumazid in DMF mit nachfolgender Verseifung des 5'-Esters sollte das 3'-Azidonukleosid **40** ergeben. Dieses sollte anschließend an der 5'-Position DMT-geschützt und zum Zielmolekül **43** hydriert werden. Aufgrund der Lipophilie der Kernbasenschutzgruppe war bei dieser Synthese eine schwierige Ausfällung der Anhydrozwischenstufe **35** zu erwarten. Weiterhin erschien die chemoselektive Verseifung des 5'-Esters in Gegenwart der basenlabilen Kernbasenschutzgruppe problematisch.

Da aus der Literatur bekannt war, dass sich 5'-Benzoyl-ester in Anwesenheit einer *N*6-Benzoylschutzgruppe am Adenosin mit LiOH in THF chemoselektiv verseifen lassen,¹⁷ wurde zunächst die Benzoylgruppe als 5'-Alkoholschutzgruppe getestet. Die Isolierung des Anhydroderivates **35** (R = H) scheiterte jedoch an der guten Löslichkeit des Produktes in Diethylether. Eine säulenchromatographische Aufreinigung erwies sich als schwierig, da das Produkt dazu neigt mit den abreagierten Mitsunobu-Reagenzien zu eluieren.

Gemäß Untersuchungen von Valerie und Mitarbeitern⁵² zur Synthese von AZT sollte eine *p*-Methoxybenzoylschutzgruppe gut für die Kristallisation der Anhydrozwischenstufe geeignet sein. Die Verwendung dieser Schutzgruppe ergab das Anhydroderivat **36** (R = OMe) in 50% Ausbeute. Öffnung von **36** mit Natriumazid in DMF ergab das 5'-geschützte Azidonukleosid **40** (R = OMe) in 51% Ausbeute. Die chemoselektive Abspaltung der 5'-Schutzgruppe mit Lithiumhydroxidlösung in THF scheiterte jedoch an der Stabilität des Esters, beziehungsweise der Labilität der Benzoylgruppe an Position vier der Kernbase.

Es musste somit eine Esterschutzgruppe gefunden werden, die leichter hydrolytisch zu entfernen ist als die *p*-Methoxybenzoylschutzgruppe und gleichzeitig die Kristallisation des entsprechenden Anhydronukleosides erleichtert. Elektronenziehende Substituenten in *para*-Position erleichtern die Hydrolyse des entsprechenden Esters. Sie erhöhen zumeist auch die Kristallisationsneigung der entsprechenden Aromaten. Deshalb wurde für die Anhydroverbindung eine leichtere Aufreinigung erwartet.

Die *p*-Nitrobenzoyl-Schutzgruppe sollte somit neben der wesentlich leichteren Hydrolysierbarkeit des Esters noch einen positiven Effekt auf die Ausbeute bei der Ausfällung des Anhydroderivates **37** (R = NO₂) aus Diethylether haben. Den Erwartungen entsprechend konnte **37** durch Ausfällung aus Diethylether in Ausbeuten von 75% erhalten werden. Bei den Reaktionskontrollen während der Azideinführung musste jedoch festgestellt werden, dass der *p*-Nitrobenzoyl-ester unter den Reaktionsbedingungen nicht stabil ist.⁵³ Eine

säulenchromatographische Aufreinigung von **41** (R = NO₂) scheiterte ebenfalls. Aus diesen Gründen wurde die *p*-Nitrobenzoylschutzgruppe als nicht geeignet für diese Syntheseroute eingestuft. Der nächste Schritt war die Verwendung der *p*-Chlor- und der *p*-Brombenzoesäureester als 5'-Schutzgruppen. Aufgrund der Halogenatome konnte eine gute Kristallisierbarkeit der Anhydroverbindungen **38** (R = Cl) und **39** (R = Br) erwartet werden. Aufgrund der *Hammitt*-Parameter wird für die Halogenbenzoate im Vergleich zum *p*-Nitrobenzoylester eine höhere Stabilität der Schutzgruppe während der Ringöffnung durch Natriumazid erwartet. Die alkalische Hydrolyse sollte aber immer noch schneller als bei der Benzoessäureschutzgruppe sein, von der bekannt ist das sie sich chemoselektiv abspalten lässt. Das Chlorderivat **38** (R = Cl) konnte auch unter optimierten Ausfällungsbedingungen nur in 40% Ausbeute erhalten werden. Aufgrund dieser niedrigen Ausbeute in der ersten Stufe wurde von weiteren Experimenten mit dieser Schutzgruppe abgesehen. Das Bromanhydroderivat **39** (R = Br) konnte reproduzierbar in 80% Ausbeute durch Ausfällung aus Diethylether erhalten werden. Die Azideinführung zum 5'-geschützten Azidonukleosid **39** (R = Br) verlief, trotz der schon beschriebenen Nebenreaktion, in akzeptablen Ausbeuten von 67%. Die Verseifung des Esters gelang chemoselektiv mit LiOH in THF/Wasser innerhalb von 45 Minuten. Hierbei wurden Ausbeuten an dem 3'-Azidonukleosid (**43**) zwischen 93 und 96% erhalten. Die Ausbeuten bei der Azideinführung sind bei der Route von Gryaznov und Mitarbeitern¹⁶ und der neu etablierten Route mit 60 und 67% relativ hoch. Seela und Mitarbeiter erzielten mit Lithiumazid eine Ausbeute von 47 % beim 5'-Trityl-geschützten Anhydronukleosid.⁵¹

Durch ein einfaches Experiment konnte wahrscheinlich gemacht werden, das im vorliegenden Fall der Einsatz von Lithiumazid einen negativen Effekt auf die Ausbeute hat. Umsetzungen von Anhydroderivat **37** mit drei Äquivalenten Natriumazid und in einem weiteren Fall mit zusätzlichen drei Äquivalenten Lithiumchlorid zeigt bei der DC-Kontrolle, dass durch Lithium⁺-Ionen die unerwünschte Öffnung der glykosidischen Bindung begünstigt wird (Abbildung 27).

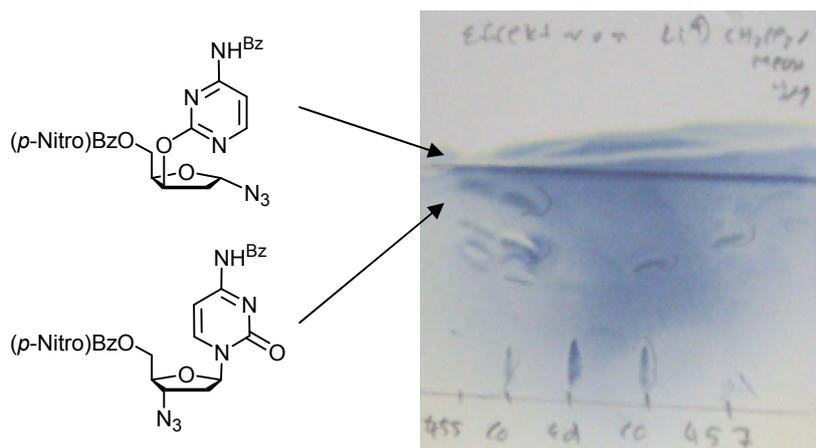


Abbildung 27: Einfluss von Lithiumionen auf die Öffnung von **37**. Links: Umsetzung mit drei zusätzlichen Äquivalenten Lithiumchlorid. Rechts: Umsetzung ohne zusätzliches Lithiumchlorid.

Die Umsetzung von **43** mit DMT-Cl in Pyridin ergab 3'-Azido-*N*4-benzoyl-5'-*O*-DMT-2',3'-didesoxycytidin in 83% Ausbeute. Die anschließende Reduktion zum 3'-Aminonukleosid **57** mit Palladium auf Aktivkohle ergab eine Ausbeute von 93% (Abbildung 28). Die säulenchromatographische Aufreinigung des Amins konnte wie geplant vermieden werden, da das Rohprodukt nach der Reduktion rein anfiel. Insgesamt konnte das Zielmolekül **24** in einer Gesamtausbeute von 40% über fünf Stufen erhalten werden.

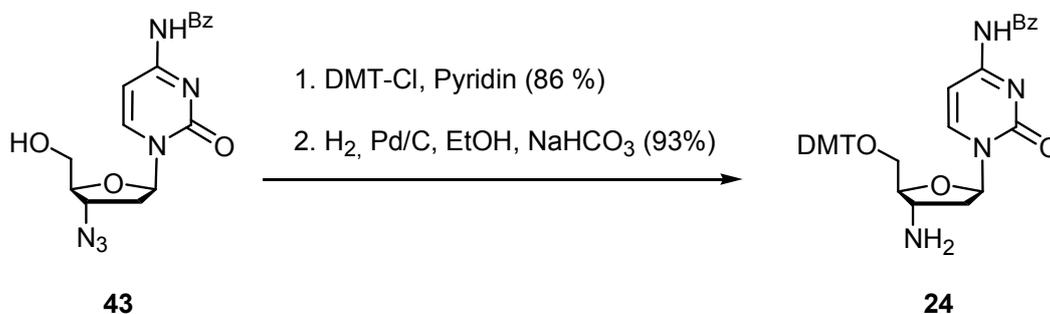


Abbildung 28: Die letzten Schritte der Synthese von 3'-Amino-*N*4-benzoyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2',3'-didesoxycytidin **24** ausgehend von **43**.

Synthese der 3'-Amino-2',3'-didesoxypurine

In Abbildung 29 sind retrosynthetische Überlegungen zur Synthese der 5'-DMT-geschützten 3'-Aminonukleoside der Purine (**25/26**) dargestellt. Diese sollten ausgehend von

den 3'-Azidonukleosiden **44a/g** durch DMT-Schätzung der 5'-Hydroxylgruppe gefolgt von der Reduktion des Azids zum Amin zugänglich sein.

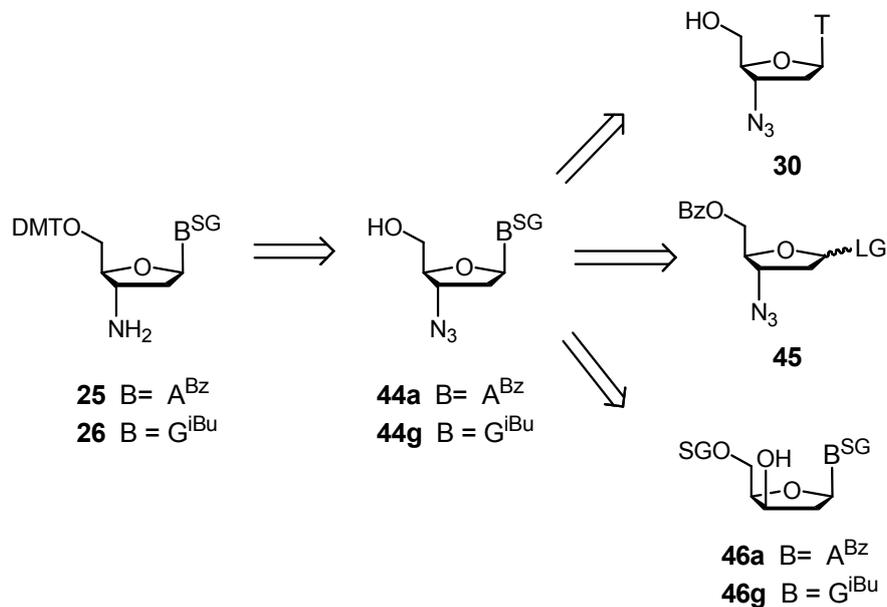


Abbildung 29: Retrosynthetische Betrachtungen zur Synthese der 5'-DMT geschützten 3'-Aminonucleoside der Purine (**25/26**). SG = Schutzgruppe, LG = Abgangsgruppe.

Die 3'-Azidonucleoside **44a/g** sind Schlüsselintermediate in diesen Synthesen. Ein Zugang zu diesen Verbindungen über die entsprechenden Anhydroverbindungen, in Analogie zu der Syntheseroute zu den Pyrimidinen, erschien nicht aussichtsreich. Zwar sind die entsprechenden Anhydroverbindungen sowohl für 2'-Desoxyadenosin⁴⁰ als auch für 2'-Desoxyguanosin⁵⁴ literaturbekannt (sie treten meist als unerwünschte Nebenprodukte in Mitsunobu-Reaktionen oder bei nukleophilen Substitutionen am 5'-C-Atom auf) jedoch ist eine entsprechende Öffnung mit Azid bisher nicht gelungen,⁵⁵ da der Sechsring vermutlich zu stabil ist.

Ein weiterer potentieller Zugang zu **44a/g** sollte durch Transglykosylierungsreaktionen möglich sein. Im Jahre 1978 berichteten Eckstein und Mitarbeiter über die Synthese von 3'-Azido-*N*6-palmitoyl-2',3'-didesoxyadenosin und 3'-Azido-*N*2-palmitoyl-2',3'-didesoxyuanosin durch Transglykosylierung, ausgehend von AZT (**30**).⁵⁶ AZT würde sich für solche Reaktionen anbieten, da es im großen Maßstab als Anti-HIV-Medikament hergestellt wird. Die Ausbeuten beliefen sich jedoch auf maximal 30%, was zum Großteil der fehlenden Stereoselektivität dieser Reaktion zuzurechnen ist. Eine säulenchromatographische Trennung der erhaltenen α - und β -Isomere gelang Eckstein und Mitarbeitern nur mit einem 1000fachen Überschuss an Kieselgel. Solche aufwendigen Aufarbeitungen mit niedrigen Ausbeuten sind

akzeptabel, um kleinere Mengen an Verbindungen für medizinische Tests zu erhalten. Eine Übertragung dieser Methodik auf einen größeren Maßstab ist jedoch nicht wirtschaftlich.

Der denkbare Zugang zu den 3'-Azidonukleosiden **44a/g** über eine Baseneinführung am 3'-Azidozucker **45** erschien ebenfalls aufgrund zu erwartender geringer Diastereoselektivität bei der Baseneinführung scheitern. In den meisten Fällen ist die Auftrennung der durch Baseneinführung an 2'-Desoxyzuckern erhaltenen α - und β -Isomere möglich. Sie ist jedoch sehr aufwendig und nur sehr schwer im größeren Maßstab durchführbar.

Ein weiterer Zugang zu den Schlüsselintermediaten **44a/g** wäre durch die Einführung der Azidofunktion unter Inversion der Konfiguration am 3'-C Atom, ausgehend von 2'-Desoxyxylonukleosiden* **46a/g** möglich (Abbildung 30). Die Einführung könnte mittels einer Mitsunobu-Reaktion oder durch Überführung der 3'-Alkoholfunktion in eine gute Abgangsgruppe und Einführung des Azides unter S_N2 -Bedingungen geschehen.

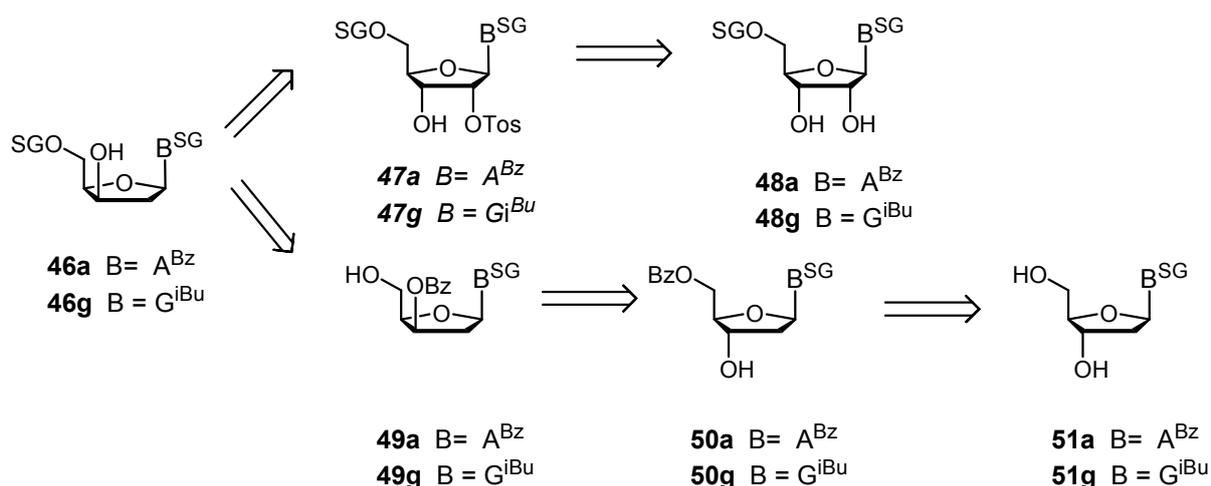


Abbildung 30: Retrosynthetische Betrachtungen zur Synthese der 2'-Desoxyxylonurine **46a/g**. SG = Schutzgruppe.

Die Xylonukleoside **46a/g** könnten ausgehend von den 2'-tosylierten Ribonukleosiden **47a/g** durch einen reduktiven Hydridshift nach Robins und Mitarbeitern^{57,58,59} erhältlich sein (Abbildung 30). Die 2'-tosylierten Ribonukleoside **47a/g** sollten durch die Umsetzung der entsprechenden 5'-geschützten Ribo-nukleoside **48a/g** mit Zinnoxid und Tosylchlorid zugänglich sein.⁶⁰ Das in der Synthese nach Robins und Mitarbeitern als Hydridübertragungsreagenz eingesetzte Lithiummethylborhydrid ist jedoch pyrophor und die Handhabung somit nicht ungefährlich.

* Aus Gründen der Übersichtlichkeit sollen die 2'-Desoxyxylonukleoside von nun an als "Xylonukleoside" bezeichnet werden.

Ein weiterer Zugang zu den Xylonukleosiden **46a/g** ergäbe sich über die 3'-benzoylierten Xylonukleoside (**49a/g**) durch Schützung der 5'-Position und anschließende Freisetzung des 3'-Alkohols (Abbildung 30). Die Verbindungen **49a/g** sollten über ein *in situ* gebildetes 3'-Triflat unter Acylwanderung ausgehend von den 5'-benzoylierten Nucleosiden **50a/g** nach Herdewijn und Mitarbeitern erhältlich sein. Die entsprechenden Umsetzungen sind sowohl für Adenosin⁶¹ als auch für Guanosin⁶² bekannt und basieren vermutlich auf der Migration einer 5'-Benzoylschutzgruppe, die in Abbildung 31 am Beispiel von Guanosin dargestellt ist.

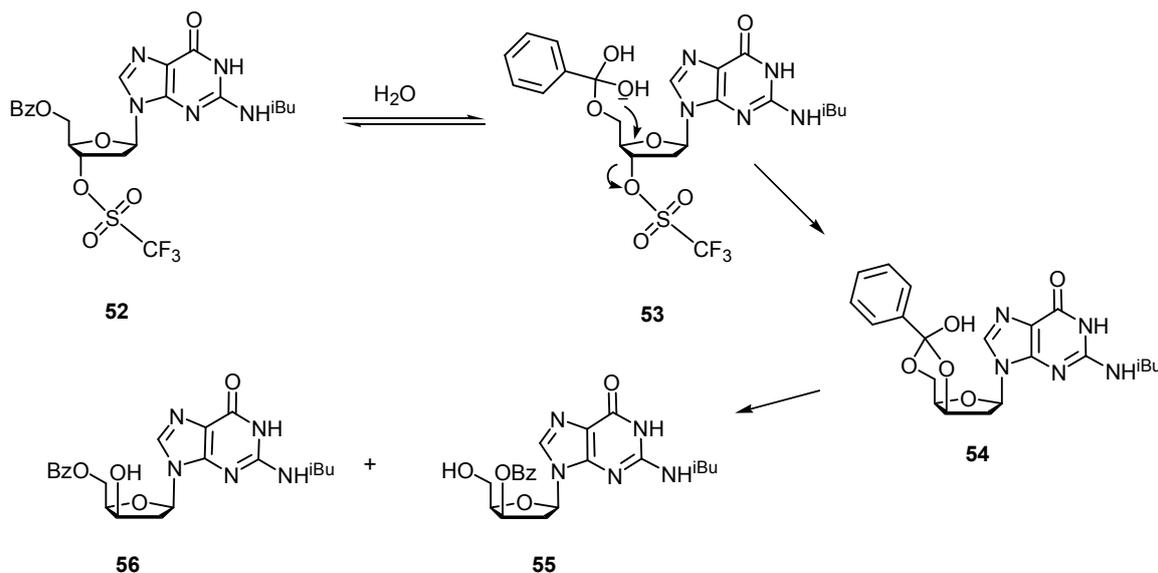


Abbildung 31: Von Herdewijn und Mitarbeitern vorgeschlagener Mechanismus⁶¹ zur Inversion der Konfiguration am 3'-Kohlenstoffatom unter Acylwanderung am Beispiel von Guanosin.

Die Umsetzung in Abbildung 31 verläuft über den Angriff der hydratisierten Carbonylfunktion des Esters **53** an die 3'-Position des Zuckers unter Abspaltung des Triflates. Die instabile Zwischenstufe **54** zerfällt in die beiden Regioisomere **55** und **56**. Der Mechanismus konnte von Seela und Mitarbeitern durch die Isolierung und Charakterisierung des entsprechenden Cytidinderivates erhärtet werden.⁶³ Als weiteres Indiz für die Richtigkeit des Mechanismus gilt, dass diese Art der Inversion nicht mit *N6*-Benzoyl-5'-*O*-trityl-3'-*O*-triflat-2'-desoxyadenosin stattfindet, bei dem eine Carbonylfunktion an der 5'-Position fehlt.⁶¹ Problematisch bei dieser Reaktion ist jedoch der nicht steuerbare Zerfall der Zwischenstufe **54**. Die maximale Ausbeute an dem benötigten Regioisomer **56** ist somit auf maximal 60% beschränkt. Die für diese Reaktionen benötigten 5'-Benzoessäureester **50a/g** sollten durch Umsetzung der kernbasengeschützten 2'-Desoxy-nucleoside mit Benzoylchlorid **51a/g** zugänglich sein.⁶⁴ In Abbildung 32 ist die von Gryaznov und Mitarbeitern etablierte Synthese¹⁶ der 5'-DMT geschützten 3'-Aminonucleoside der Purine (**25/26**) vollständig dargestellt.

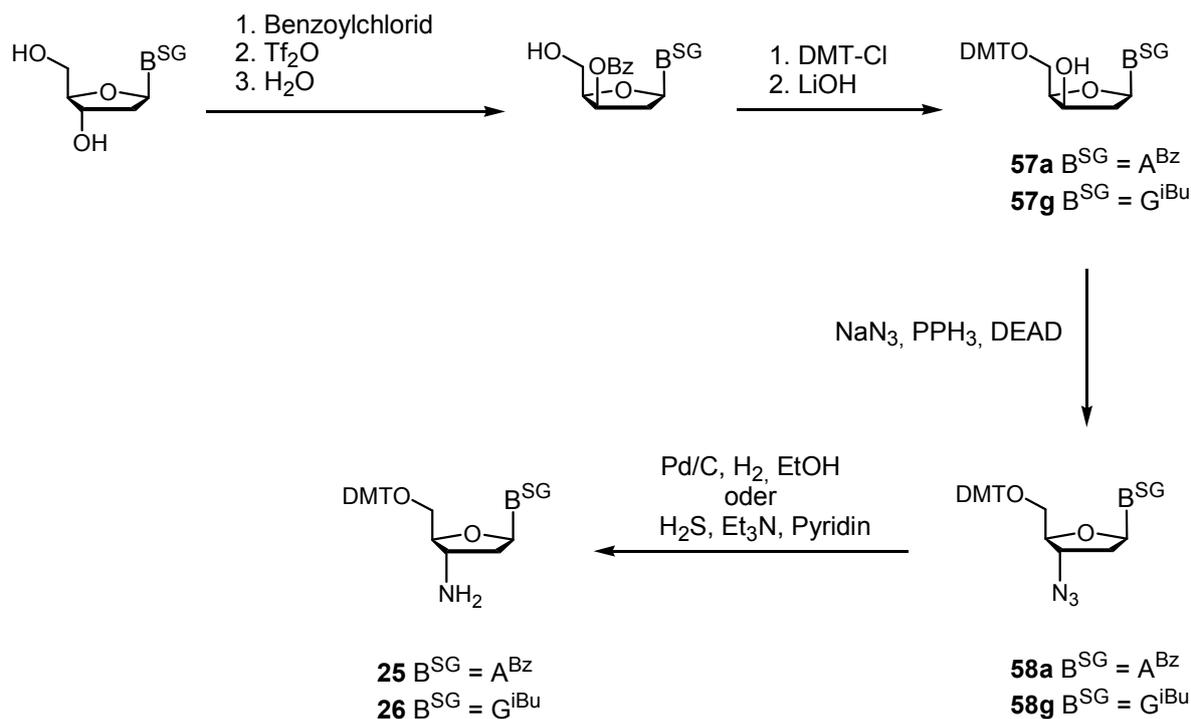


Abbildung 32: Synthese von 3'-Amino-*N*6-benzoyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2',3'-dideoxyadenosine (**25**) und 3'-Amino-*N*2-isobutyryl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2',3'-dideoxyadenosine (**26**) nach Gryaznov und Mitarbeitern.¹⁶ SG = Schutzgruppe.

Als Schlüsselschritte sind in der Gryaznov'schen Synthese die Inversion der Stereochemie durch intramolekulare Substitution nach Herdewijn und die Einführung der Azidofunktion durch eine Mitsunobu-Reaktion an den 5'-DMT-geschützten Xylonukleosiden **57a/g** anzusehen. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Mitsunobu-Reagenzien und ihre Reaktionsprodukte säulenchromatographisch nicht leicht von den 5'-DMT-geschützten 3'-Aziden **58a/g** abtrennbar sind. Die Abtrennung dieser gelingt erst auf der Stufe der Amine **25/26**. Die eigenen Synthesen sollten in Anlehnung an die Syntheseroute nach Gryaznov geschehen. Es sollte jedoch eine säulenchromatographische Aufreinigung der sehr polaren Amine **25** und **26** vermieden werden.

Die eigenen Synthesen sollten in Anlehnung an die Syntheseroute nach Gryaznov geschehen. Es sollte jedoch eine säulenchromatographische Aufreinigung der sehr polaren Amine **25** und **26** vermieden werden.

Die ersten beiden Stufen in der Gesamtsynthese der 5'-DMT geschützten 3'-Aminonukleoside der Purine (**25/26**) dienen der Inversion der Konfiguration am 3'-C-Atom. Diese sollten zuerst an Adenosin getestet und bei Erfolg auf Guanosin übertragen werden. Die geplanten Synthesen sind in Abbildung 33 dargestellt.

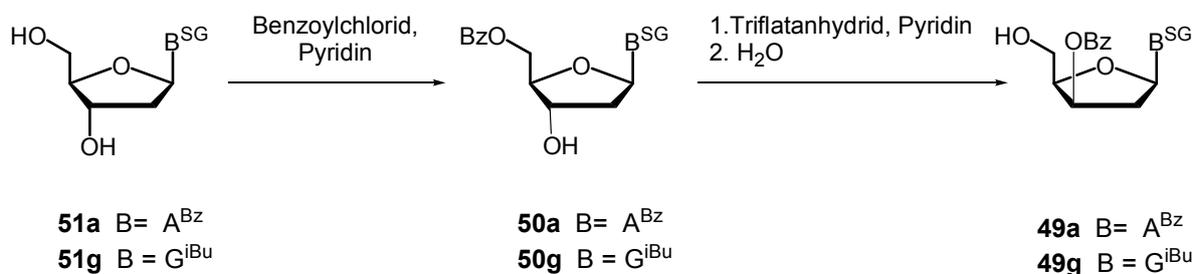


Abbildung 33: Synthesepfad zur Synthese der 3'-benzoylierten Xylonucleoside **49a/g** ausgehend von den käuflichen 2'-Desoxynucleosiden **51a/g**. SG = Schutzgruppe.

Die Umsetzung von *N*6-Benzoyl-2'-desoxyadenosin (**51a**) mit Benzoylchlorid unter den in der Literatur angegebenen Bedingungen ergab das 5'-benzoylierte Nucleosid **50a** in 76% Ausbeute. Die säulenchromatographische Aufreinigung war jedoch aufgrund der nahezu identischen R_f -Werte des Produktes und der Nebenprodukte sehr aufwendig. Die niedrige Ausbeute lässt sich vor allem auf die Bildung des 3',5'-dibenzoylierten Nucleosides zurückführen.

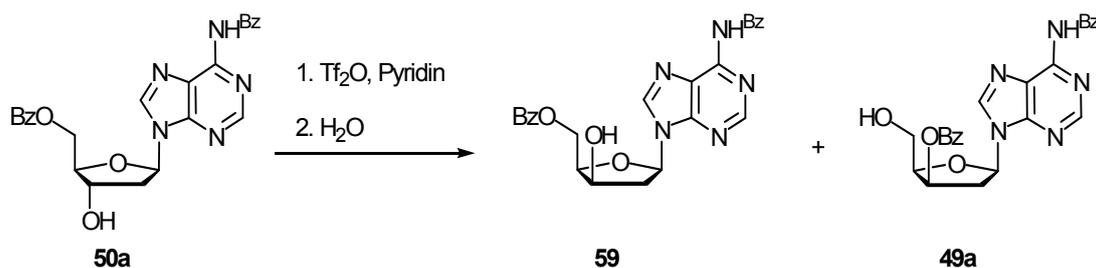


Abbildung 34: Synthese von *N*6-3'-*O*-Dibenzoyl-2'-desoxyxyloadenosin (**49a**) nach Herdewijn und Mitarbeitern.⁶¹

Die Umsetzung von **50a** mit Triflatanhydrid in Pyridin mit anschließender Zugabe von Wasser nach der Literaturvorschrift ergab ein Gemisch aus drei Verbindungen: dem nicht umgesetzte Edukt **50a** und den beiden Verbindungen **49a** und **59** (Abbildung 34). Eine Isolation des gewünschten Xylonucleosides **49a** durch säulenchromatographische

Aufreinigung an Kieselgel war jedoch mit dem in der Literatur angegebenen Laufmittel nicht erfolgreich.⁶¹

Aufgrund der aufwendigen Aufreinigung der ersten Stufe und der erfolglosen Aufreinigung der zweiten Stufe wurde nach alternativen Zugängen zu den Xylonukleosiden gesucht.

Eine in der Ribonukleosidchemie häufig eingesetzte Methode zur Inversion der Stereochemie an der 2'- oder 3'-Position des Zuckergerüsts ist die Oxidation zum Keton gefolgt von der anschließenden Reduktion zum invertierten Alkohol.^{65,66} Grundlegende Arbeiten hierzu wurden in den 60er Jahren von Moffat^{67,68} durchgeführt. Abbildung 35 zeigt hierzu beispielhaft die Synthese des medizinisch wirksamen Arabinoadenosin **61** ausgehend von Adenosin **60** nach Robins und Mitarbeitern.⁶⁹

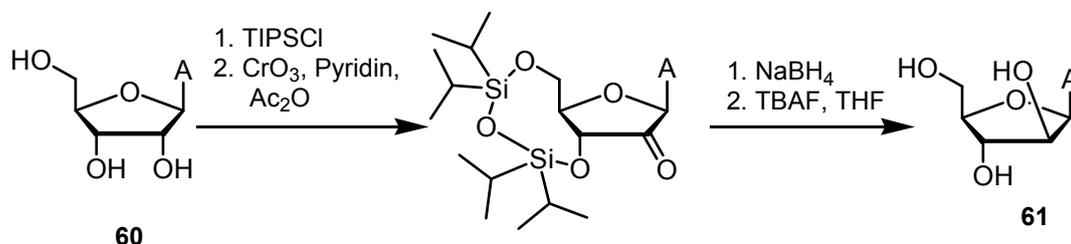


Abbildung 35: Synthese von Arabinoadenosin **61** nach Robins und Mitarbeitern.⁵⁹

Eine direkte Übertragung dieser Methodik auf entsprechend 5'-geschützte 2'-Desoxypurine scheiterte jedoch an der Instabilität der intermediären Ketone. Robins und Mitarbeiter beobachteten bei der Umsetzung von 5'-*O*-Trityl-2'-desoxyadenosin (**62**) unter den bei den Ribonukleosiden verwendeten Bedingungen vollständige Depurinierung (Abbildung 36).⁵⁹

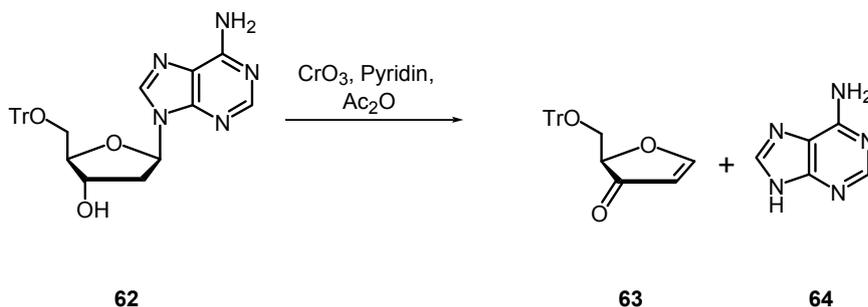


Abbildung 36: Ergebnis der von Robins und Mitarbeitern versuchten Oxidation von 5'-*O*-Trityl-2'-desoxyadenosin **62**.⁵⁹

Als hauptsächliche Triebkraft für diese Depurinierung ist die Bildung des α,β -ungesättigten Ketones **63** durch Eliminierung der Kernbase Adenin (**64**) anzusehen. Diese Reaktion verläuft vermutlich bei Basenkatalyse nach einem E2-Mechanismus (Abbildung 37). Unter Lewissäurekatalyse sollte die Depurinierung nach einem E1-Mechanismus über das resonanzstabilisierte Oxocarbeniumion **94** verlaufen.

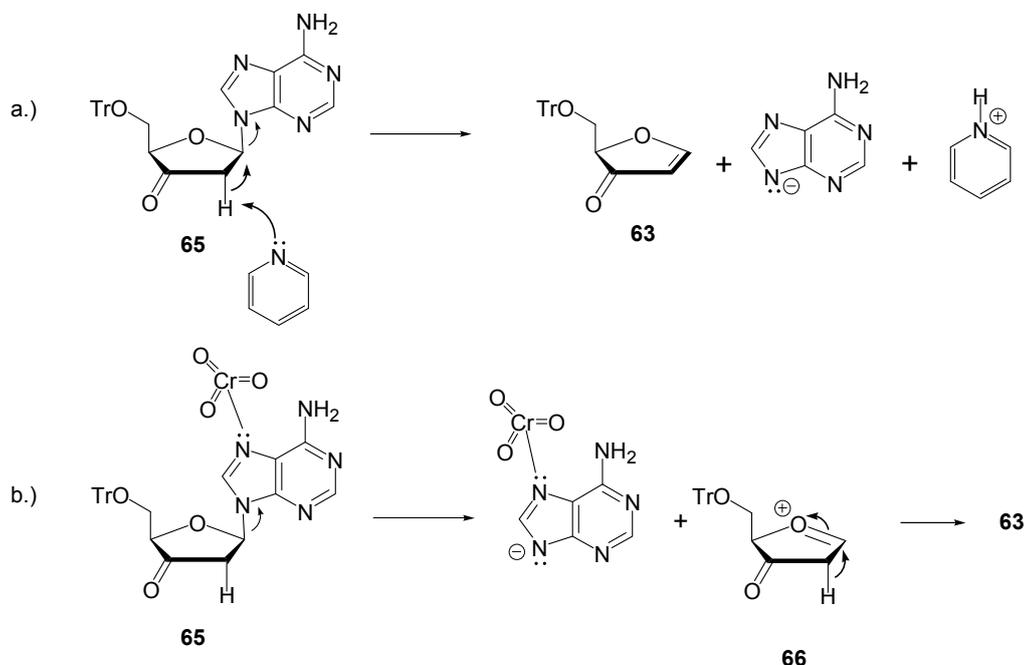


Abbildung 37: Mögliche Eliminierungsmechanismen für den Zerfall des 3'-Ketons **65**.

Durch den Einsatz des Dess-Martin-Periodinans⁷⁰ als mildes Oxidationsmittel ist Robins und Mitarbeitern ausgehend von 5'-TBDPS-geschütztem 2'-Desoxyadenosin (**67**) im Jahre 1990 die in Abbildung 38 dargestellte Synthese des entsprechenden 3'-Ketons **68** gelungen.⁷¹ Die Gruppe berichtete jedoch, dass das Keton bei Temperaturen über 25 °C spontan zerfällt und wie erwartet sowohl basen- als auch säurelabil ist.

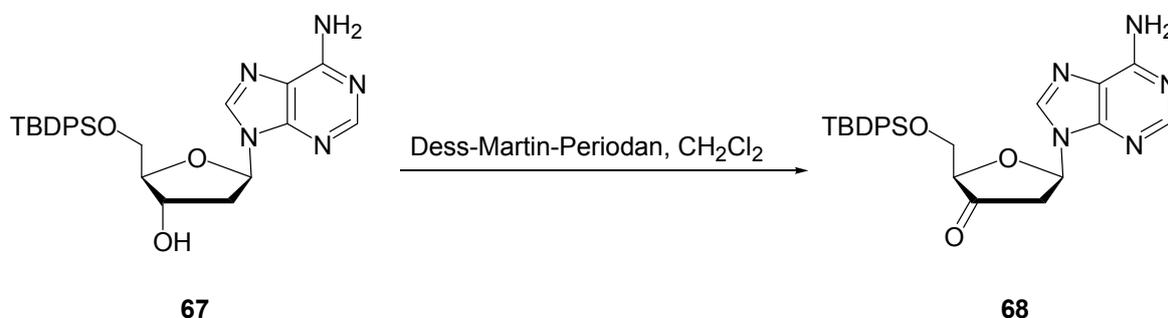


Abbildung 38: Synthese von 5'-*O*-*tert*-Butyldiphenylsilyl-3'-keto 2',3'-dideoxyadenosin **68** nach Robins und Mitarbeitern.⁷¹

Die analoge Synthese von *N*2-Benzoyl-3'-keto-5'-*O*- *tert*-butyldiphenylsilyl -2',3'-dideoxy-guanosin wurde im Jahre 2000 von Rosenberg und Mitarbeitern beschrieben.⁷²

Die entsprechenden Ketone sollten einen neuen Zugang zu den Xylopurinen geben. Die Synthesen dieser sollten, wie in Abbildung 39 dargestellt, durch Oxidation gefolgt von Reduktion zum entsprechenden Xylonukleosid führen.

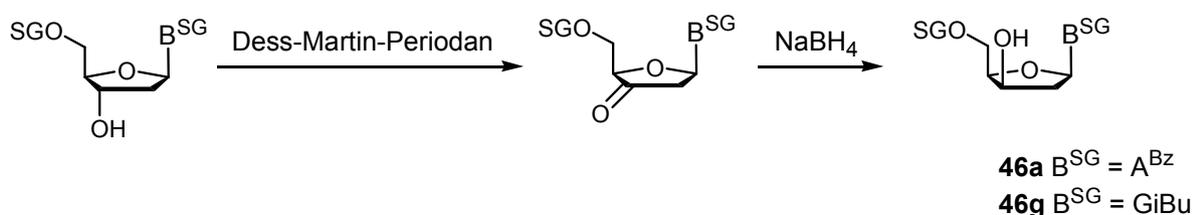


Abbildung 39: Synthesepfad zur Synthese der Xylonucleoside **46a/g**. Sg = Schutzgruppe.

Die Wahl eines Silylethers als 5'-Alkoholschutzgruppe basierte hierbei neben der Literaturpräzedenz auf den folgenden Überlegungen: die entsprechenden 5'-Ester sind, wie bei der Durchführung der Herdewijn-Route festgestellt wurde, nur sehr aufwendig in guten Ausbeuten zu erhalten. Die häufig zum Schutz der 5'-Alkoholfunktion eingesetzten Tritylderivate (DMT- oder MMT-geschützt) sind unter den leicht sauren Bedingungen der Oxidation nicht stabil. Bei der Abspaltung der wesentlich stabileren Tritylgruppe könnte es in späteren Stufen zu Produktverlusten durch Depurinierung kommen. Aufgrund des sterischen Anspruches der *tert*-Butyldiphenylsilyl-Gruppe (TBPDS)⁷³ wurde weiterhin eine bessere Selektivität und somit höhere Ausbeuten bei der Synthese des 5'-geschützten Nucleosides **67** erwartet.

Verbindung **67** konnte nach einer Literaturvorschrift⁷³ in 72% Ausbeute erhalten werden. Diese mäßige Ausbeute ist auf Doppelsilylierung zurückzuführen. Oxidation bei Raumtemperatur, gefolgt von einer raschen Aufarbeitung, ergab die Ketoverbindung **68**. Eine NMR-spektroskopische Untersuchung des Rohproduktes ließ erkennen, dass die Abtrennung des Dess-Martin-Periodinans und seinen Abbauprodukten durch die wässrige Aufarbeitung nicht vollständig gelungen war. Weiterhin wurde Depurinierung in nicht zu vernachlässigendem Maße beobachtet. Eine säulenchromatographische Aufreinigung von **68** war aufgrund der schon erwähnten säuren- als auch basenlabilität⁷¹ nicht leicht möglich. Das Rohprodukt wurde deshalb ohne weitere Aufreinigung direkt für die Reduktion mit NaBH₄ in Ethanol bei 0°C eingesetzt. Erhalten wurde die erwartete Mischung aus Verbindung **67** und

dem epimeren Xylonukleosid **69**. Die Diastereoselektivität betrug bei dieser Reduktion 2:8 (Ribo zu Xylonukleosid).

Die Stereoselektivität kann in diesem Fall durch Substratkontrolle erklärt werden (Abbildung 40).

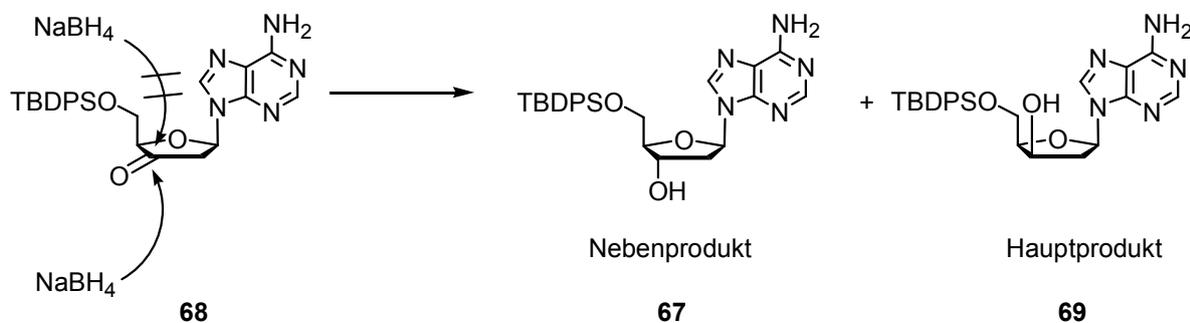


Abbildung 40: Mechanistische Betrachtung der durch Substratkontrolle erreichten Selektivität bei der Reduktion von Keton **68** mit Natriumborhydrid.

Eine genauere Betrachtung von Abbildung 40 zeigt, dass der obere Halbraum durch die Kernbase und die 5'-Schutzgruppe eingeschränkt wird. Der Angriff ist somit aus dem sterisch ungehinderten unteren Halbraum begünstigt, was zu dem gewünschten Xylonukleosid **69** führt. Die säulenchromatographische Auftrennung der Epimere war jedoch nur mit der 750fachen Menge* an Kieselgel möglich. Das Xyloderivat konnte aus den wenigen Reifractionen nur in Milligramm Mengen (22 % Gesamtausbeute) erhalten werden. Ein Grund für die geringen Ausbeuten ist, neben der sehr schwierigen Trennung der Epimere die starke Polarität des Moleküls. Durch diese könnte es zu Ausbeuteverlusten während der säulenchromatographischen Aufreinigung gekommen sein. In der Hoffnung weniger polare Produkte zu erhalten und unnötige Schutzgruppenoperationen in späteren Schritten der Synthesen zu vermeiden, wurde in nachfolgenden Versuchen mit kernbasengeschützten Nucleosiden gearbeitet.

Da als Nebenreaktion Depurinierung beobachtet wurde, wurde zunächst die erstmals 1966 von Smrt, zum Schutz der exocyclischen Aminofunktion von Guanosen, eingesetzte Dimethylformamidin-Gruppe⁷⁴ (dmf) getestet. Diese hat neben der einfachen Einführung weiterhin den Vorteil der Verlangsamung der säurekatalysierten Depurinierungsreaktion.^{75,76}

* Bezogen auf die aufgetragene Menge an Rohprodukt.

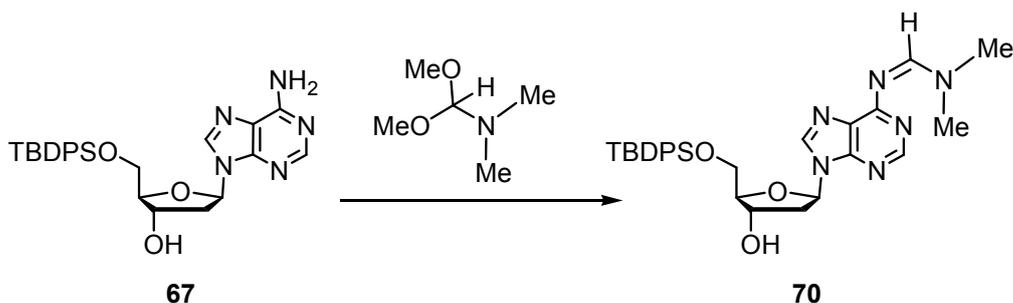


Abbildung 41: Schützung der exocyclischen Aminofunktion von Adenin.

Umsetzung von **67** mit Dimethylformamidinodimethylacetal in Ethanol ergab das dmf-geschützte Nucleosid **70** in 82% Ausbeute (Abbildung 41). Bei der Durchführung der Oxidation wurde jedoch bei Reaktionskontrollen vollständige Depurinierung beobachtet.

Die nächste Schutzgruppe, die getestet wurde, war die Benzoylschutzgruppe. Diese ist die Standardschutzgruppe für die exocyclische Aminofunktion von Adenosin. Weiterhin ist *N*6-Benzoyl-2'-desoxyadenosin käuflich oder durch "Transient-Protection"⁷⁷ leicht herzustellen. Die Umsetzung von *N*6-Benzoyl-2'-desoxyadenosin mit TBDPS-Cl in Pyridin ergab das 5'-TBDPS-geschützte Nucleosid **71** in 64 % Ausbeute. Oxidation, wässrige Aufarbeitung und anschließende Reduktion ergab das Xylonucleosid **72** in einer Ausbeute von 25 % (Abbildung 42).

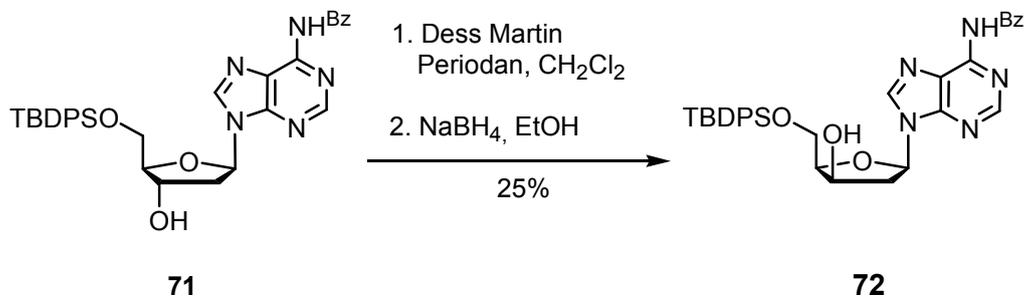


Abbildung 42: Synthese von *N*6-Benzoyl-5'-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl-2'-desoxyxyloadenosin **72** über Oxidation und Reduktion

Die schlechte Ausbeute ist zumindest teilweise durch die Säurelabilität der Verbindung zu erklären.* Weiterhin ist die säulenchromatographische Trennung der beiden Epimere **71** und **72** durch die nahezu identischen R_f -Werte schwierig. Der Grund hierfür ist vermutlich der sterische Anspruch der TBDPS-Gruppe. Der einzige Unterschied zwischen den beiden

* Eine NMR Probe depurinierte innerhalb von Minuten in $CDCl_3$, das nicht vorher über $NaCO_3$ gelagert worden war.

Epimeren ist die Position der 3'-OH-Gruppe. Diese wird jedoch aufgrund der voluminösen TBDPS- und der nun ebenfalls vorhandenen Kernbasenschutzgruppe erheblich abgeschirmt. Eine sterisch weniger anspruchsvolle Schutzgruppe am 5'-Alkohol sollte somit die säulenchromatographische Trennung der Epimere erleichtern. Es sollte aber weiterhin mit einer Silylschutzgruppe für die 5'-Position gearbeitet werden. Die *tert*-Butyldimethylsilylschutzgruppe (TBDMS)^{78,79} war hierzu eine nahe liegende Wahl. Aufgrund des geringeren sterischen Anspruchs war jedoch mit Problemen bei der Synthese von *N*6-Benzoyl-5'-*O*-TBDMS-2'-desoxyadenosin **73** zu rechnen. Die Anwendung der Standardprotokolle⁷⁹ für die Silylierung lieferten dementsprechend nur mäßige Ausbeuten von maximal 61% an **73**. Als Nebenprodukt wurde wie erwartet das 3'-5'-disilylierte Nukleosid identifiziert. Aus der Kohlenhydratchemie ist bekannt, dass die Selektivität von TBDMS-Cl gegenüber primären Alkoholgruppen ansteigt, wenn Pyridin statt DMF als Lösungsmittel verwendet wird.^{80,81} Durch den zusätzlichen Verzicht auf Imidazol als Katalysator/Base, und der damit einhergehenden Verminderung der Reaktivität des Silylierungsreagenzes, konnten nach der Optimierung der Reaktionsbedingungen ausgehend von **51a** Ausbeuten von bis zu 88% an **73** erhalten werden (Abbildung 43)

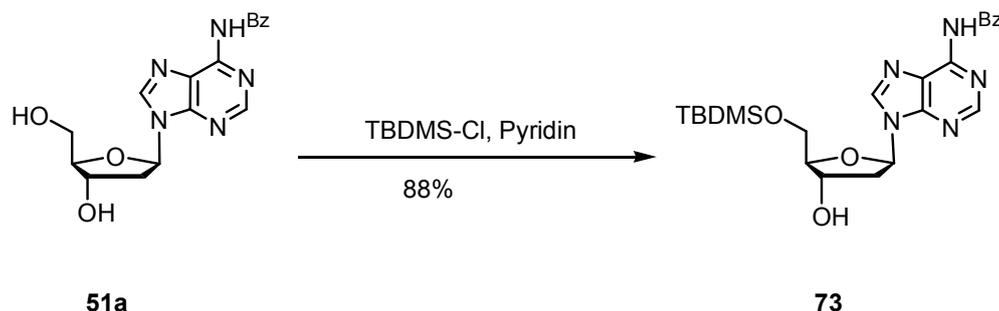


Abbildung 43: Synthese von *N*6-Benzoyl-5'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyadenosin (**73**) nach dem zur selektiven 5'-Silylierung optimierten Protokoll.

Da zu erwarten war, dass auch das 5'-TBDMS-geschützte Keton während der Isolierung zumindest teilweise zerfällt, wurde eine Eintopf-Methode zur Oxidation und Reduktion entwickelt. Hierbei wurden folgende Einzelmaßnahmen zur Optimierung durchgeführt:

Durch Zugabe des Nucleosides zu der auf 0°C vorgekühlten Lösung des Dess-Martin-Periodinans in CH₂Cl₂ als Feststoff konnte eine Verdoppelung der Konzentration der Reaktanten erreicht werden. Hiermit konnte die Reaktionsdauer der Oxidation von sechs bis sieben Stunden auf 90 bis 120 Minuten verringert werden. Nach beendeter Oxidation wurde überschüssiges Dess-Martin-Periodinan mit einem Überschuss an Isopropanol gequenchet. Das Isopropanol dient gleichzeitig als Lösungsvermittler für die nachfolgende Reduktion mit

Natriumborhydrid. Um die Zersetzung des Produktes durch überschüssiges Natriumborhydrid während der Auftauphase und Aufarbeitung zu vermeiden, wurde mit einem Überschuss an Aceton gequencht. Eine Erniedrigung der Temperatur während der Reduktion auf $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ verbesserte das Epimerenverhältnis von 8:2 auf nahezu 95:5 (Xylo:Ribo).

Mit der in Abbildung 44 zusammengefassten optimierten Synthesesequenz war es möglich das 5'-TBDMS-geschützte Xylonukleosid **73** in 80% Ausbeute über zwei Stufen zu erhalten.

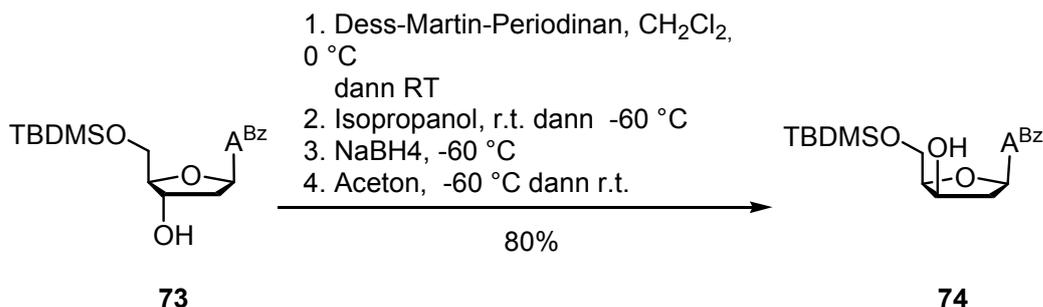


Abbildung 44: Optimiertes Protokoll zur Synthese von *N*6-Benzoyl-5'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl -2'-desoxyxyloadenosin **74**.

Aufgrund der bei der Synthese des Xyloderivates von 2'-Desoxyadenosin gesammelten Erfahrungen wurde bei der Synthese des 2'-Desoxyguanosinderivates von Anfang an mit der TBDMS-Gruppe als 5'-Alkoholschutzgruppe gearbeitet. Es musste jedoch noch eine geeignete Schutzgruppe für die exocyclische Aminofunktion gefunden werden.

Guanosin und viele seiner Derivate sind für ihre schlechte Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln bekannt. Der Grund hierfür ist die Bildung von Tetraden.⁸² Eine Möglichkeit, dieses Problem zumindest teilweise zu umgehen, ist der Einsatz von Schutzgruppen auf Formamidinbasis mit langen lipophilen Seitenketten. Eine hierfür von Caruthers und Mitarbeitern⁷⁵ etablierte Schutzgruppe ist die Di-*n*-butylformamidingruppe (DBF).

Die TBDMS-Schätzung der 5'-Position von *N*2-[(Di-*n*-butylamino)methylen]-2'-desoxyguanosin nach der Literaturvorschrift⁷⁹ ergab *N*2-[(Di-*n*-butyl-amino)methylen]-5'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyguanosin in 47% Ausbeute.* Die Durchführung der Oxidations- und Reduktionssequenz ergab das erwartete Gemisch der beiden Epimere. Dieses Gemisch war jedoch nicht durch Chromatographie an Kieselgel trennbar.

Als nächste Kernbasenschutzgruppe wurde die dmf-Schutzgruppe in Betracht gezogen. Von ihr wurde aufgrund des geringeren sterischen Anspruches eine bessere Trennbarkeit

* Diese Synthesen wurden vor dem Wechsel auf Pyridin als Lösungsmittel für die selektive TBDMS-Schätzung des 5'-Alkohols durchgeführt.

der Epimere bei der Säulenchromatographie erwartet. Die Umsetzung von *N*2-[(*Di-n*-methylamino)methylen]-2'-desoxy-guanosin **75** mit TBDMS-Cl nach Literaturprotokollen ergab das 5'-geschützte Nukleosid **76** in 52% Ausbeute. Nach der Durchführung der Oxidation/Reduktionssequenz wurde festgestellt, dass die dmf-Gruppe teilweise (bis zu 33%) abgespalten wird (Abbildung 45). Weiterhin legte die Literatur nahe, dass die dmf-Schutzgruppe nicht mit der geplanten Reduktion des Azides durch katalytische Hydrierung kompatibel ist.⁸³ Wegen des partiellen Verlustes der Schutzgruppe bei der Reduktion mit Natriumborhydrid und der inkompatiblen katalytischen Hydrierung wurde die dmf-Schutzgruppe nicht weiter eingesetzt.

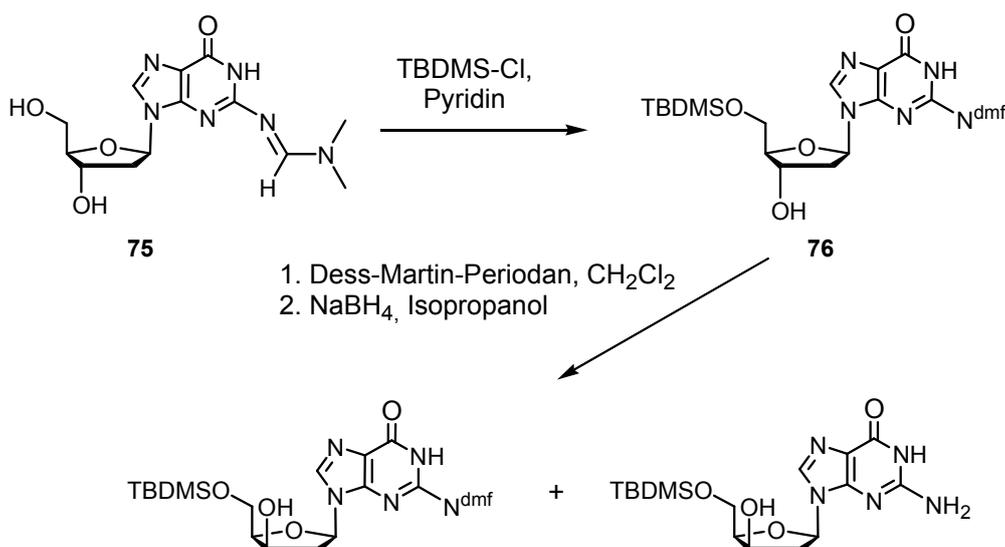


Abbildung 45: Ergebnis der Untersuchung zur Eignung der dmf-Schutzgruppe für die Oxidations/Reduktions Synthesesequenz.

Eine für die exocyclische Aminofunktion von Guanosin häufig eingesetzte Schutzgruppe ist die Isobutyrylgruppe. Diese ist sehr stabil und der sterische Anspruch ist nur etwas größer als der der dmf-Gruppe. Umsetzung von *N*2-Isobutyryl-2'-desoxyguanosin **77** mit TBDMS-Cl in Pyridin ergab nach dem für *N*6-Benzoyl-2'-desoxyadenosin optimierten Protokoll das 5'-TBDMS-geschützte Nukleosid **78** in 84% Ausbeute. Die Oxidations/Reduktions-Synthesesequenz ergab das Xylonukleosid **79** in 77% Ausbeute. Die eingesetzte Synthesesequenz mit den für 2'-Desoxyguanosin optimierten Schutzgruppen ist in Abbildung 46 dargestellt.

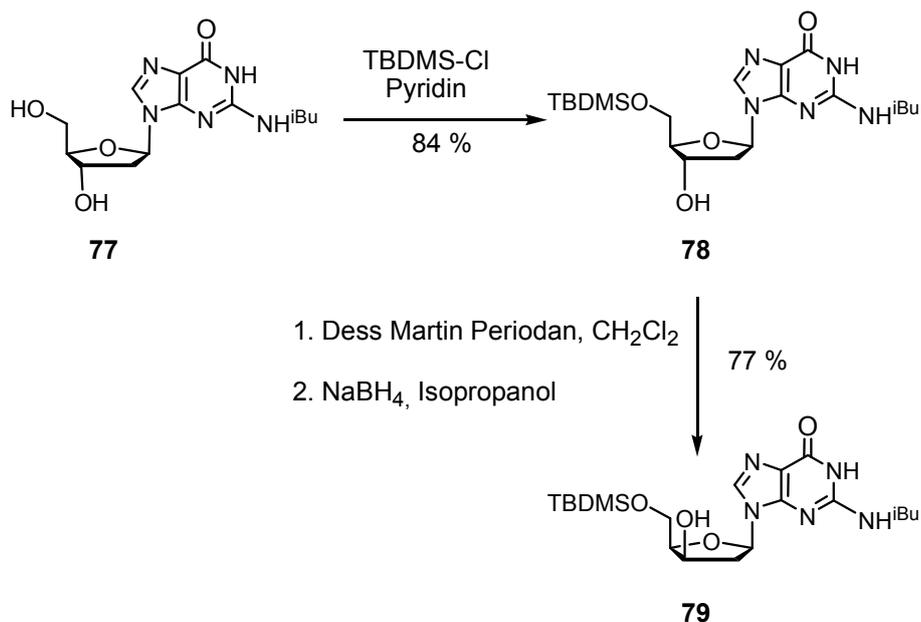


Abbildung 46: Synthese von *N*2-Isobutyryl-5'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyxylo-guanosin **79** mit den für Guanosin optimierten Schutzgruppen.

Nach dem nun ein einfacher Zugang zu den beiden 5'-TBDMS-geschützten Xylonukleosiden **74** und **79** gefunden war, konnte die Synthese der 5'-TBDMS-geschützten 3'-Azidonukleoside **80** und **81** durchgeführt werden. (Abbildung 47)



Abbildung 47: Geplante Umwandlung der 2'-Xylonukleoside **74** und **79** zu den 5'-TBDMS-geschützten 3'-Azidonukleosiden **80** und **81**. SG = Schutzgruppe.

In den literaturbekannten Synthesen von 3'-Azidonukleosiden wurde eine von vier Methoden zur Einführung der 3'-Azidofunktion eingesetzt. Eine Mitsunobu-Reaktion mit Lithiumazid,¹⁷ eine S_N2 Reaktionen über das 3'-Triflat⁶¹ oder 3'-Mesylat⁸⁴ oder eine Reaktion vom Appel-Typ mit Triphenyl-phosphin, Tetrabromkohlenstoff und Lithiumazid.⁶²

In der Synthese der 5'-TBDMS-geschützten 3'-Azidonukleoside **80** und **81** nach Hirschbein und Mitarbeitern¹⁷ wird die 3'-Azidofunktion durch die schon erwähnte Mitsunobu-Reaktion⁸⁵ eingeführt. Eine chromatographische Abtrennung der Folgeprodukte der Mitsunobu-

Reagenzien ist hierbei jedoch nicht möglich. Sie muss auf der nächsten Stufe, der des wesentlich polaren freien Amins, durchgeführt werden. Da die Reduktion der Azidofunktion erst in der letzten Stufe der Gesamtsynthesen geplant war, wurden zuerst andere etablierte Methoden zur Einführung der Azidofunktion getestet.

Die erste getestete Methode war die Azideinführung über das *in situ* hergestellte 3'-Triflat nach Herdewijn und Mitarbeitern. Umsetzung des eigenen Substrates (**74**) mit Triflatanhydrid in Pyridin nach Literaturvorschrift⁶¹ ergab das entsprechende 3'-Triflat, welches ohne weitere Aufarbeitung mit Natriumazid in DMF bei Raumtemperatur umgesetzt wurde. Die erhaltene Ausbeute an 3'-Azido-*N*6-benzoyl-5'-*O*-TBDMS-2',3'-desoxyadenosin **80** lag jedoch nur bei 30%. Diese niedrige Ausbeute konnte auf den teilweisen Verlust der Kernbasenschutzgruppe zurückgeführt werden (Abbildung 48). Das verbliebene Proton der als Benzoylamid geschützten exocyclischen Aminfunktion ist sauer genug, um zum Teil von Pyridin abstrahiert zu werden. Die Reaktion mit Triflatanhydrid kann dann zu dem Diamid* **82** führen, welches offensichtlich in das gewünschte Produkt **80** und das entsprechende an der Kernbase nicht geschützte 3'-Azidonukleosid **83** zerfallen kann, denn diese Verbindung wurde als Nebenprodukt isoliert.

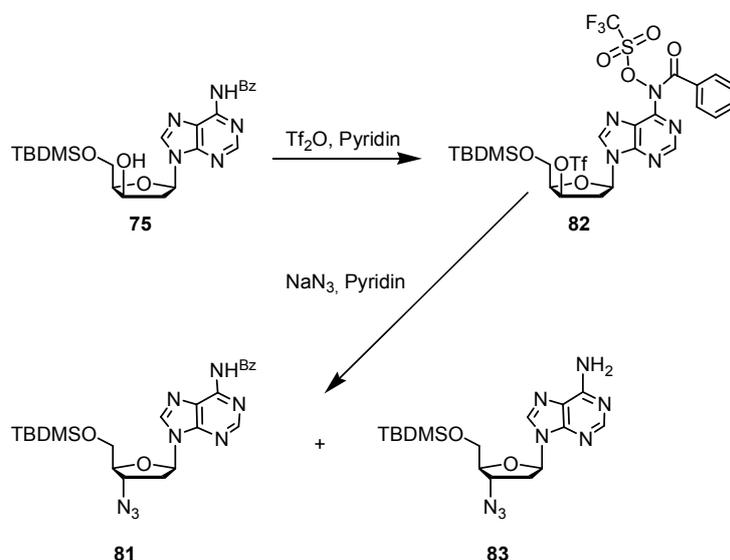


Abbildung 48: Beobachtete Nebenreaktion bei der Azideinführung über das 3'-Triflat nach Herdewijn und Mitarbeitern.⁶¹

In der publizierten Synthese⁶¹ ist diese Nebenreaktion irrelevant, da im letzten Schritt der Route die Kernbasenschutzgruppe und der 5'-Benzoessäureester durch Aminolyse abgespalten werden. Eine nachträgliche Schützung der Kernbase ist keine Option, weshalb die

* Dieser Effekt tritt auch bei der "Transient Protection" zur Synthese von *N*6-Benzoyl-2'-desoxyadenosin auf.

Azideinführung über das 3'-Triflat als ungeeignet für die eigene Syntheseroute eingestuft wird.

Als nächste potentielle Abgangsgruppe wurde ein Mesylat an der 3'-Position getestet. Es wurde erwartet, dass es bei der Einführung dieser Abgangsgruppe nicht zu einer Nebenreaktion an der 6-Position der Kernbase und nachfolgend zu einem partiellen Verlust der Kernbasenschutzgruppe kommen würde. Die Umsetzung von **74** mit Methansulfonsäurechlorid nach einer Literaturvorschrift⁸⁴ ergab das 3'-Mesylat **84** in 72% Ausbeute. Die säulenchromatographische Aufreinigung des 3'-Mesylats **84** erwies sich aufgrund nahezu identischer R_f -Werte von Edukt und Produkt als sehr aufwendig. Die Umsetzung mit Natriumazid in DMF bei 60 °C ergab nach 16 Stunden keinen detektierbaren Umsatz (Abbildung 49).

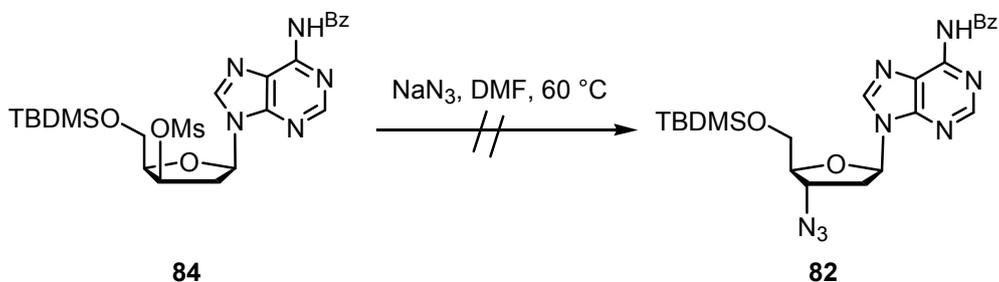


Abbildung 49: Versuchte Umsetzung zu 3'-Azido-*N*6-benzoyl-5'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2',3'-dideoxyadenosin **82**, ausgehend von dem 3'-Mesylat **84**.

Erhitzen der Aufschlämmung auf 100 °C führte zur Zersetzung von **84**. Es gelang nicht, eine ausreichende Menge an 3'-Azidonukleosid **82** zu isolieren, um einen Strukturbeweis per NMR zu führen. Es wurde deshalb von weiteren Versuchen mit dem 3'-Mesylat als Abgangsgruppe abgesehen.

Appel-artige Umsetzung der 5'-benzoylgeschützten Xylonukleoside von 2'-Desoxyadenosin⁸⁶ und 2'-Desoxyguanosin⁶² zu den 3'-Aziden mit Ribokonfiguration sind in der Literatur beschrieben. Die Anwendung des Literaturprotokolls⁶² für Xyloguanosin auf das eigene Substrat **79** ergab das 5'-TBDMS-geschützte 3'-Azidonukleosid **81** in 56% Ausbeute (Abbildung 50).

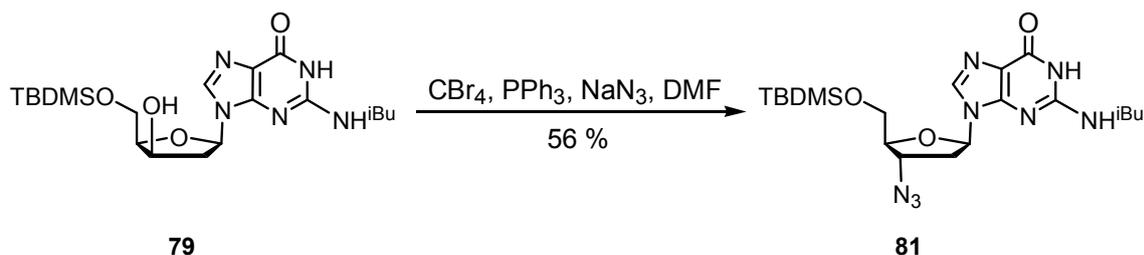


Abbildung 50: Synthese von 3'-Azido- *O tert-butyl*dimethylsilyl-*N*2-isobutyryl-5'-2'-desoxyxyloguanosin **81**.

Es gelang jedoch nicht, das entstandene Triphenylphosphinoxid vollständig durch Säulenchromatographie abzutrennen. Eine Anwendung der gleichen Reaktionsbedingungen auf das Adenosinderivat **74** führte zur Zersetzung des Eduktes.

Es wurde deshalb auf eine literaturbekannte Mitsunobu-Reaktion zurückgegriffen. Es war jedoch, wie in der Literatur beschrieben,¹⁷ nicht möglich die Folgeprodukte der Mitsunobu-Reaktion von den nukleosidischen Produkten **80** und **81** abzutrennen. Versuche die Aufreinigung auf der Stufe der wesentlich polarerer 5'-ungeschützten Azide durchzuführen waren ebenfalls nicht erfolgreich. Solche Probleme treten bei der Abtrennung der Mitsunobu-"Reagenzien" relativ häufig auf. Es gibt für dieses Problem verschiedene mögliche Lösungen.

Der Einsatz von festphasengebundenem Triphenylphosphin⁸⁷ erbrachte auch nach zwei Tagen keinen detektierbaren Umsatz. Es wird davon ausgegangen, dass die Reaktion am sterischen Anspruch des Substrates gescheitert ist. Es ist jedoch auch nicht auszuschließen, dass die entstehenden Azide **80** oder **81** im Sinne einer Staudinger-Reduktion mit nicht umgesetztem Triphenylphosphin zu den entsprechenden Iminophosphoranen reagierten und somit der überstehenden Lösung entzogen wurden.

Beim Einsatz von *tert*-Butylphosphin als Reagenz für die Mitsunobu-Reaktion⁸⁸ war auch nach vier Stunden kein Umsatz detektierbar. Bei der Zugabe des Phosphins konnte jedoch eine starke Gasentwicklung beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass anstelle der gewünschten Reaktion die Staudinger-Reduktion zwischen dem Phosphin und Natriumazid stattfand.

Pyridinyldiphenylphosphin **85** (Abbildung 51) wurde entwickelt, um das daraus entstehende Pyridinyldiphenylphosphinoxid durch eine wässrige saure Extraktion aus der organischen Phase während der Aufarbeitung zu entfernen.⁸⁹ Versuche, dies zu reproduzieren scheiterten. Jedoch wurde während der Aufarbeitung bei DC-Kontrollen festgestellt, dass Pyridinyldiphenylphosphinoxid polar genug ist, um säulenchromatographisch von den Produkten abgetrennt werden zu können. Ein Wechsel von DEAD auf DIAD vereinfachte die säulenchromatographische Aufreinigung noch zusätzlich. Mit dieser Kombination an

Mitsunobureagenzien konnten erstmals die Verbindungen **80** und **81** in Ausbeuten von 81% und 86% als Reinstoffe erhalten werden.

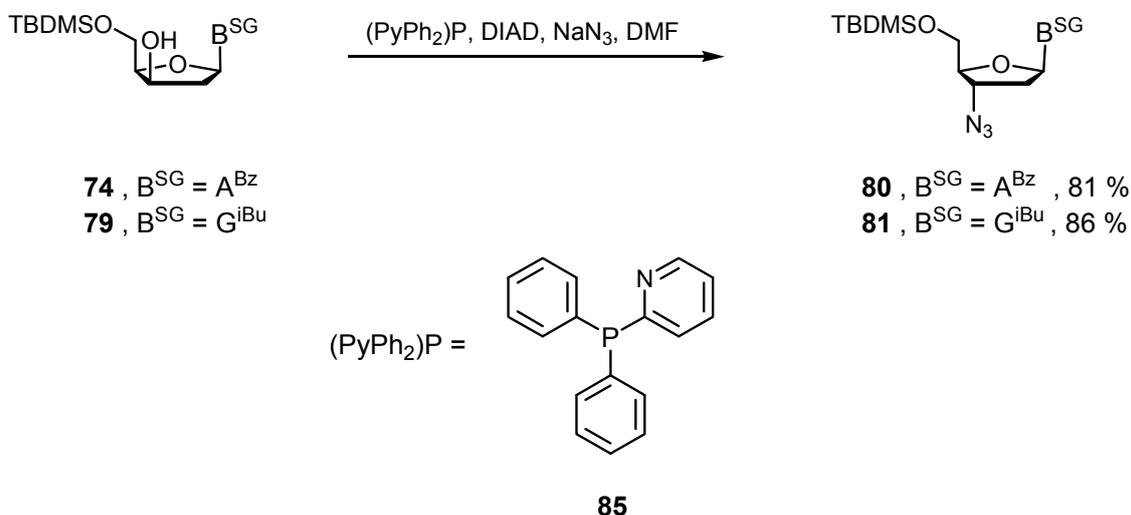


Abbildung 51: Umsetzung zu 3'-Azido-*N*6-benzoyl-5'-*O*- *tert*-butyldimethylsilyl-2',3'-desoxyadenosin **80** 3'-Azido-5'-*O*- *tert*-butyldimethylsilyl-*N*2-isobutyryl-2',3'-didesoxyguanosin **81**. SG = Schutzgruppe.

Um zu den Zielmolekülen **25** und **26** zu gelangen, war nun noch ein Schutzgruppenwechsel an der 5'-Position und die Reduktion des Azides notwendig. Die Entschützung des 5'-Alkohols wurde mit TBAF in THF durchgeführt. Erhalten wurden Ausbeuten von 92% (Adenosin) und 87% (Guanosin). Die anschließende Schützung der 5'-Hydroxylfunktion mit DMT-Cl in Pyridin ergab Ausbeuten von 96% (Adenosin) und 79% (Guanosin). Die Reduktion der Azidofunktion zum Amin wurde durch katalytische Hydrierung mit Palladium auf Aktivkohle durchgeführt. Die erhaltenen Ausbeuten waren hierbei 90% (Adenosin) und 95% (Guanosin). In der Abbildung 52 sind die Einzelschritte, die hierbei erhaltenen Ausbeuten und die Gesamtausbeuten zusammengefasst

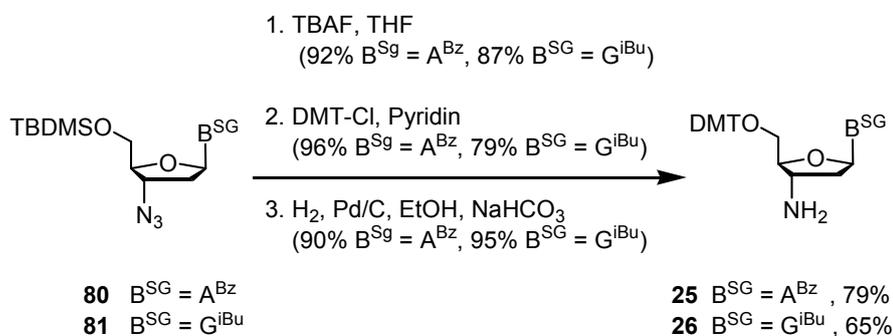


Abbildung 52: Letzte Schritte und Gesamtausbeuten der Syntheseroute zu 3'-Amino-*N*6-benzoyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2',3'-didesoxyadenosin **25** und 3'-Amino-*N*2-isobutyryl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2',3'-didesoxyguanosin **26**. SG = Schutzgruppe.

Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick

Bei der Synthese von 3'-Amino-5'-*O*-dimethoxytrityl-3'-desoxythymidin **23** konnte gegenüber literaturbekannten Routen keine Ausbeuteverbesserung erreicht werden. Mit einer Gesamtausbeute von 50% über 5 Stufen, ausgehend von Thymidin wurde aber ein Ergebnis erzielt, das der Literaturvorgabe (81% über 3 Stufen, aber ausgehend von 5'-DMT-geschütztem Thymidin) ähnlich ist.

Aufgrund des Schutzgruppenwechsels ist die neue Syntheseroute zu 3'-Amino-*N*4-benzoyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2',3'-didesoxycytidin **24** eine Stufe länger als die literaturbekannte Synthese. Die Gesamtausbeute ist mit 40% vergleichbar mit den 39% der publizierten Synthese.¹⁶ Es kann jedoch von dem preiswerten *N*4-Benzoyl-2'-desoxycytidin ausgegangen werden und der Einsatz von HMPA zur Azideinführung kann umgangen werden.

Eine neue Syntheseroute zur Synthese der 5'-TBDMS geschützten Xylonukleoside von Adenosin und Guanosen konnte etabliert werden. Die Anzahl der notwendigen Schritte wurde von vier auf zwei reduziert. Gleichzeitig konnten gegenüber der Literatursynthese die Gesamtausbeuten um 28% für Adenosin und 25% für Guanosen erhöht werden. Diese Xylonukleoside sind wichtige Intermediate in einer Vielzahl von Synthesen von 3'-modifizierten Nucleosiden und Nucleotiden.^{90,91,92,93,94,95} In Abbildung 53 sind ausgewählte Verbindungen, die über Xylonukleoside synthetisiert wurden dargestellt.

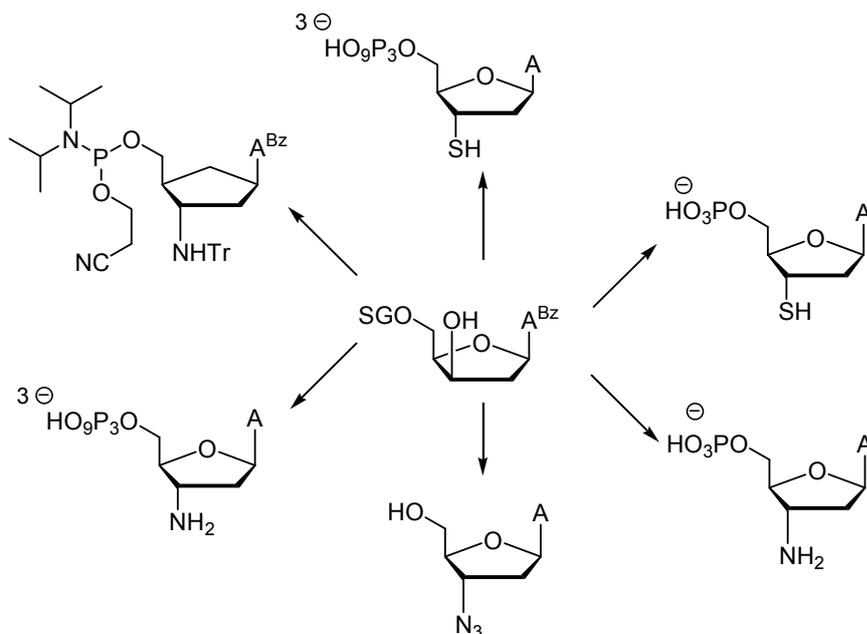


Abbildung 53: Übersicht über einige Verbindungen die ausgehend von Xyloadenosin (mitte) synthetisiert wurden.

Bei den Gesamtsynthesen der 3'-Amino-5'-*O*-dimethoxytrityl-2',3'-didesoxypurine Adenosin **25** und Guanosin **26** konnte die Anzahl der Stufen aufgrund eines Schutzgruppenwechsels nicht verringert werden. Jedoch ist es gelungen, die Gesamtausbeuten um 7% für die Adenosinroute und 17% für die Guanosinroute zu erhöhen.

Tabelle 1 fasst die erhaltenen Gesamtausbeuten zusammen und vergleicht sie mit den Ausbeuten der etablierten Synthesen.

B ^{SG}	Stufen / Ausbeute literaturbekannte Route ¹⁶	Stufen / Ausbeute hier beschriebene Route
A ^{Bz}	6 / 37%	6 / 44%
G ^{iBu}	6 / 20%	6 / 37%
C ^{Bz}	4 / 39%*	5 / 41%
T	3 / 81%*	5 / 50%

Tabelle 1: Vergleich der in dieser Arbeit entwickelten Routen zu den 3'-Aminonukleosiden mit den literaturbekannten Synthesen.¹⁶ Bei den (*) markierten Synthesen wurde von den 5'-DMT-geschützten Nukleosiden ausgegangen.

Entwicklung der festen Phase zur Synthese von 3'-Aminoprimern bei Kettenverlängerung mit 3'-Phosphitamiden

Nach dem Abschluss der Synthesen der 3'-Aminonukleoside konnte die Herstellung der festen Phase in Angriff genommen werden (Abbildung 54). Das 3'-Aminonukleosid musste hierbei über ein geeignetes Linkersystem mit der festen Phase verbunden werden. Um zur Synthese von 3'-Aminoprimer mittels Kettenverlängerung mit regulären 3'-Phosphitamiden geeignet zu sein, muss ein solches mehrere Bedingungen erfüllen. Es muss die leicht sauren Bedingungen der Detritylierung und die wässrig basischen Bedingungen der Oxidation überstehen. Die zur Immobilisierung der 3'-Aminonukleoside eingesetzte Chemie muss mit der säurelabilen DMT-Schutzgruppe und den basenlabilen Kernbasen-schutzgruppen kompatibel sein. Es sollten Beladungen von 20-30 $\mu\text{mol/g}$ erreicht werden und die Freisetzung des 3'-Aminoprimer sollte in einem Schritt durch Abspaltung mit Ammoniakwasser geschehen.

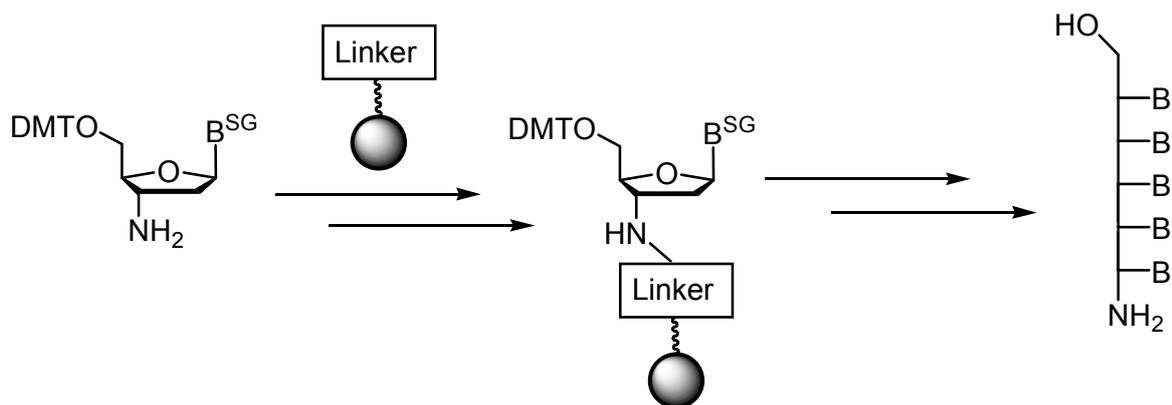


Abbildung 54: Immobilisierung von 3'-Aminonucleosiden auf einer festen Phase die Ausgangspunkt für die Synthese von 3'-Aminoprimern ist. SG = Schutzgruppe.

Aus der Peptidchemie gibt es etablierte Linkersysteme für die Immobilisierung von Aminosäuren an der Aminofunktion. Die Freisetzung der Amine erfolgt nach vollendeter Synthese jedoch zumeist durch Behandlung der festen Phasen mit Säuren. Saure Bedingungen können in Oligonucleotiden jedoch zu Depurinierung der Kernbasen Adenin und Guanin führen, weshalb solche Bedingungen vermieden werden sollen. Zur Synthese von Oligonucleotiden mit 3'-Aminofunktionen mit 3'-Phosphitmiden gibt es fünf literaturbekannte Systeme. Diese sollen im Folgenden vorgestellt werden und auf ihre Eignung zur Synthese von 3'-Aminoprimern untersucht werden.

Die Synthese der festen Phase **90** zur Synthese von 3'-Aminohexyl-Oligonucleotiden, die auf der Phthalimidenschutzgruppe basiert, ist in Abbildung 55 dargestellt. Diese feste Phase wurde 1992 von Meyer und Mitarbeitern⁹⁶ entwickelt und wird von der Firma *Glen Research* vertrieben.

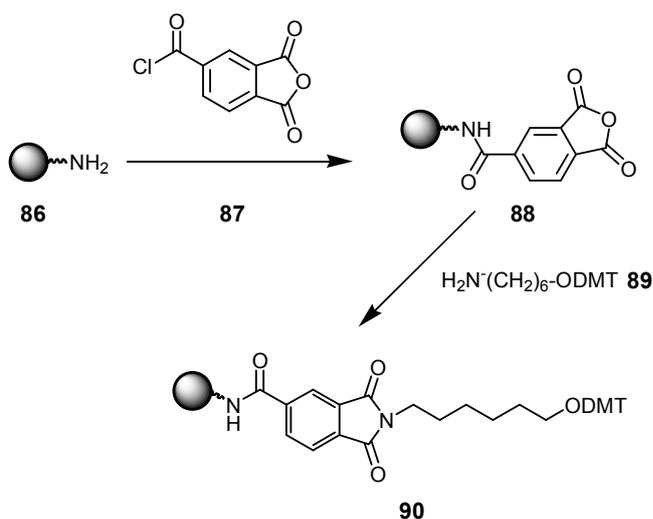


Abbildung 55: Synthese des phthalimidbasierten 3'-Aminohexyllinker Supports nach Meyer und Mitarbeitern.⁹⁶

Die Herstellung des Trägers beginnt mit der Reaktion des käuflichen Säurechlorids des Anhydrids der Trimellitsäure (**87**) mit den aliphatischen Aminogruppen der festen Phase **86**. Die Umsetzung des Anhydrids **88** mit dem *O*-DMT-geschützten Aminoalkohol **89** geschieht unter Rückfluss- (165° C in DMF)⁹⁶ oder Mikrowellenbedingungen.^{97,98} Unter diesen Reaktionsbedingungen muss jedoch mit einer teilweisen Migration der Kernbasenschutzgruppen auf die 3'-Aminofunktionen der 3'-Aminonucleoside gerechnet werden. Weiterhin wurde berichtet, dass bei der ammoniakalischen Abspaltung der modifizierten Oligonucleotide etwa 15% dieser auf der festen Phase verbleiben.

Eine weitere feste Phase zur Synthese von 3'-Aminohexyl-Oligonucleotiden basiert auf der 2-(Acetoxymethyl)-benzoyl-(AMB)-Aminoschutzgruppe.^{99,100} Diese feste Phase wurde erstmals im Jahre 2004 von Wolter und Mitarbeitern¹⁰¹ beschrieben und wird von der Firma *Proligo* (Hamburg) vertrieben. Die Abspaltung des Amines erfolgt in diesem Fall nach dem Prinzip des "assisted cleavage". Die Synthese dieser festen Phase ist in Abbildung 56 dargestellt.

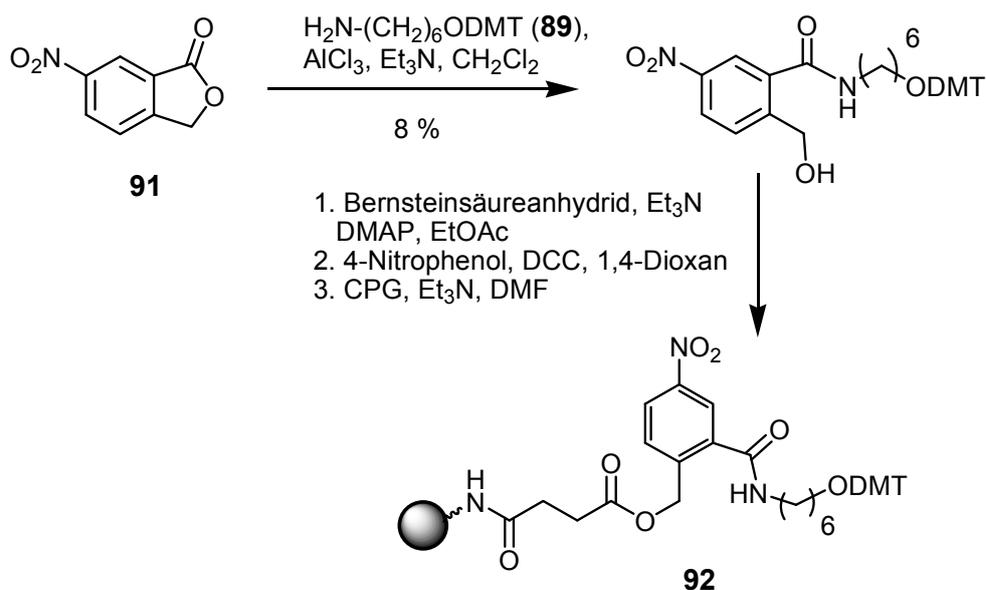


Abbildung 56: Synthese, der von der Firma *Proligo* vertriebenen festen Phase zur Synthese von 3'-aminohexyl-modifizierten Oligonucleotiden.

Der Schlüsselschritt in dieser Synthese ist die lewissäurekatalysierte Öffnung des 6-Nitrophthalids (**91**) durch den *O*-DMT-geschützten Aminoalkohol **89**. Der weitere Aufbau der festen Phase **92** geschieht in dieser Synthese durch Reaktionen, die der Peptidchemie entlehnt wurden. Die geringe Ausbeute der ersten Stufe dieser Synthese wird auf die Abspaltung der DMT-Gruppe durch die zur Öffnung des Esters benötigte Lewissäure zurückgeführt.¹⁰⁹ Bei einem Substrat, welches in drei Stufen in sehr guten Ausbeuten¹⁰² erhältlich ist, sind solche

geringen Ausbeuten in der ersten Stufe einer Synthese eher zu verkraften. Bei einer Übertragung auf die 3'-Aminonucleoside ist der Schritt mit der niedrigen Ausbeute aber die sechste Synthesestufe für die Pyrimidine beziehungsweise die siebte für die Purine. Auch die photochemische Abspaltung führt leicht zu Nebenprodukten und ist für große Ansätze schwierig durchzuführen.

Im Jahre 1996 beschrieben Avino und Mitarbeiter eine feste Phase¹⁰³ zur Synthese von 3'-aminomodifizierten Oligonucleotiden und Oligonucleotiden mit einer 3'-terminalen Aminofunktion. Diese basiert auf der 2-(2-Nitrophenyl)-ethoxycarbonyl-(NPEOC)-Aminoschutzgruppe¹⁰⁴ und ist in Abbildung 57 dargestellt.

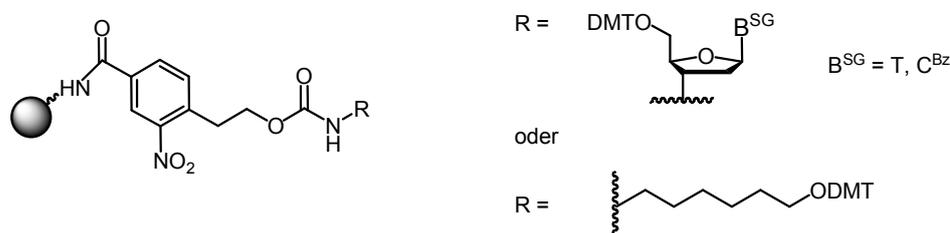


Abbildung 57: Von Avino und Mitarbeitern beschriebene feste Phasen zur Synthese von 3'-aminohexyl-modifizierten Oligonucleotiden und Oligonucleotiden mit einer 3'-terminalen Aminofunktion. SG = Schutzgruppe.

Diese feste Phase wurde sowohl zur Synthese von Oligonucleotiden mit einem 3'-Aminoethyl-linker als auch zur Synthese von Oligonucleotiden mit den 3'-terminalen Nucleotiden 3'-Amino-3'-desoxythymidin und 3'-Amino-2',3'-dideoxycytidin eingesetzt. Bei der Beladung der festen Phasen mit den 3'-Aminonucleosiden konnten jedoch nur Beladungen von maximal 6 $\mu\text{mol/g}$ erreicht werden. Typische Beladungen bei konventionellen Trägern für die DNA-Synthesen liegen zwischen 20-30 $\mu\text{mol/g}$. Die geringen Beladungsdichten wurden von Avino und Mitarbeitern auf die geringe Reaktivität der Aminofunktion der 3'-Aminonucleoside zurückgeführt. Weiterhin wurde berichtet, dass bei der ammoniakalischen Abspaltung ungefähr 15% des Oligonucleotides auf der festen Phase verbleiben.

Ein auf der Säurelabilität von Phosphorsäureamiden basierendes System zur Synthese von 3'-aminoterminalen Oligonucleotiden wurde von Letsinger und Mitarbeitern im Jahre 1992 vorgestellt.¹⁰⁵ Dieses System wurde in der hiesigen Arbeitsgruppe erfolgreich zur Synthese eines 3'-Aminothymidinprimers eingesetzt.³² Die Synthese dieser festen Phase erfolgt hier ausgehend von einem auf einer festen Phase immobilisierten Nucleosid. Das entsprechende 3'-Aminonucleosid wird hierbei unter Atherton-Todd¹⁰⁶ Bedingungen mit dem auf der festen Phase synthetisierten H-Phosphonat gekuppelt. Hierzu wurden 20 Äquivalente des

3'-Aminonukleosides eingesetzt. Zur Abspaltung des 3'-Aminoprimeres von der festen Phase ist der in Abbildung 58 dargestellte zweistufige Prozess notwendig.

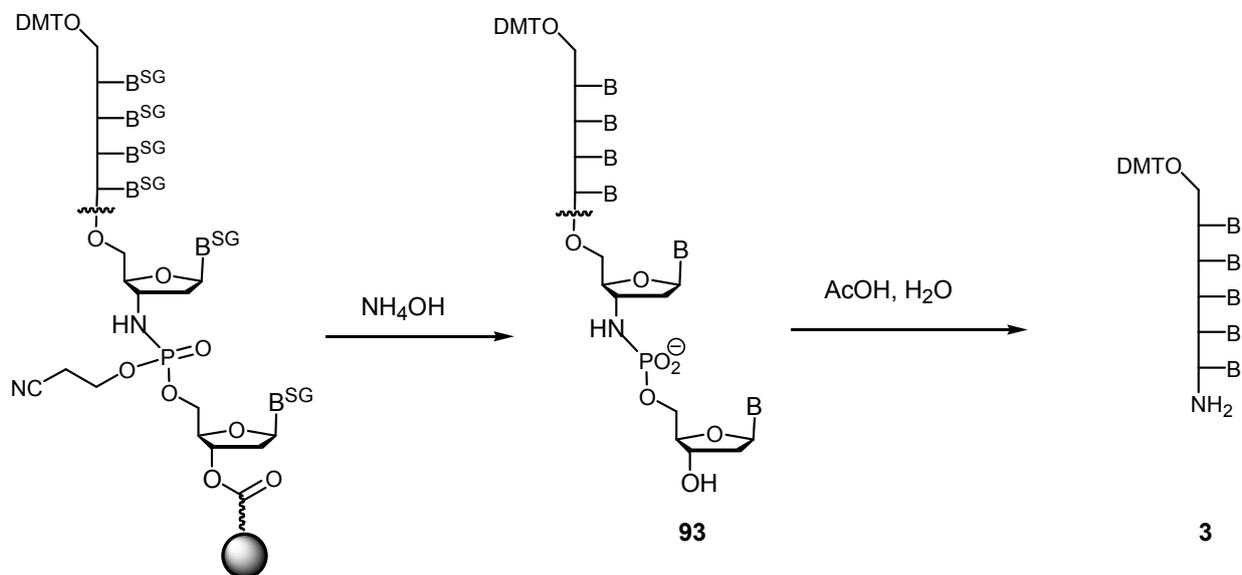


Abbildung 58: Zweistufige Abspaltungsprozess des 3'-Aminoprimeres **3** von der festen Phase. SG = Schutzgruppe.

In einem ersten basischen Schritt wird das Oligonukleotid von der festen Phase abgelöst und die Phosphat- und Kernbasenschutzgruppen abgespalten. In einem zweiten Schritt wird das Amin durch saure Spaltung des in der ersten Stufe erhaltenen Phosphorsäureamids **93** freigesetzt. Die zweite Stufe ist aber aufgrund der als Nebenreaktion auftretenden Depurinierung nicht unproblematisch.

Eine verbesserte Variante wurde im Jahre 1993 ebenfalls von Letsinger und Mitarbeitern vorgestellt.¹⁰⁷ Die Synthese eines 3'-aminoterminalen Oligonukleotides auf dieser festen Phase ist in Abbildung 59 dargestellt. Sie erfolgt über die schon beschriebene H-Phosphonatchemie. Eine Verbesserung des Systems wird durch den Einsatz des "Phosphat-ON"-Reagenzes der Firma *Cruachem* erreicht.* Während der basischen Entschützung des Oligonukleotides wird durch β -Eliminierung das Phosphorsäureamidat **94** freigesetzt. Dieses ist unter den gegebenen Bedingungen nicht stabil (die analogen 5'-Phosphoramidate zerfallen schon im schwach basischen Milieu)¹⁰⁸ und zerfällt in den 3'-Aminoprimer **3**.

* Dieses Reagenz wird heute unter anderem von der Firma *Glen Research* vertrieben.

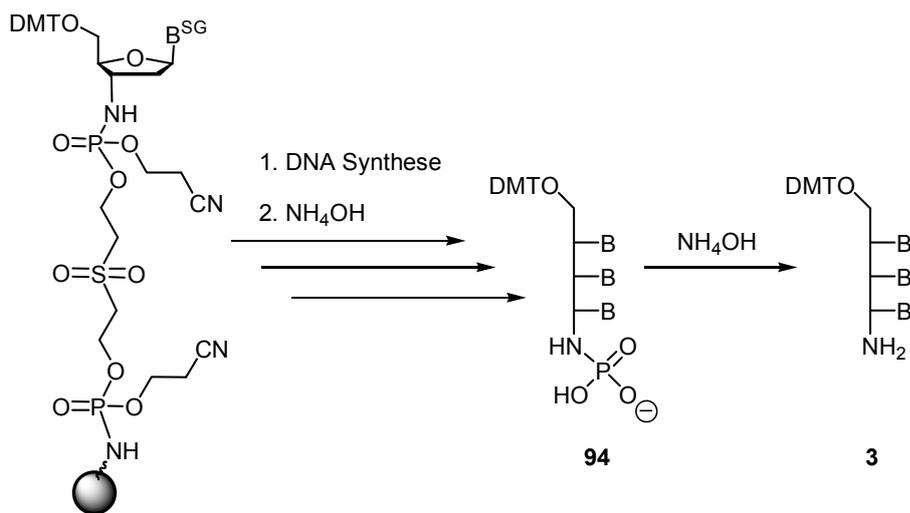


Abbildung 59: Synthese eines 3'-Aminoprimers mit der auf dem Phosphat-ON-Reagenz basierenden festen Phase von Letsinger und Mitarbeitern. SG = Schutzgruppe.

Zur Beladung wurden 18 Äquivalente der Aminkomponente verwendet. Da zudem das Phosphat-ON Reagenz relativ teuer ist, wurde von einer Anwendung dieses Supports abgesehen.

Die etablierten Systeme wurden somit nur als bedingt zur Synthese von 3'-Aminoprimern geeignet eingeschätzt. Deshalb sollte eine neue feste Phase entwickelt werden.

Bei festen Phasen zur Synthese von unmodifizierten Oligonukleotiden ist das erste Nukleosid über einen Bernsteinsäurelinker immobilisiert (Abbildung 60a).¹⁰⁹ Eine analoge Immobilisierung von 3'-Aminonukleosiden zur Synthese von 3'-Aminoprimern ist aufgrund der Stabilität der erhaltenen Amidbindung nicht sinnvoll. Denkbar ist aber ein auf einem perfluorierten Analogon der Bernsteinsäure basierendes Linkersystem, wie in Abbildung 60b dargestellt.

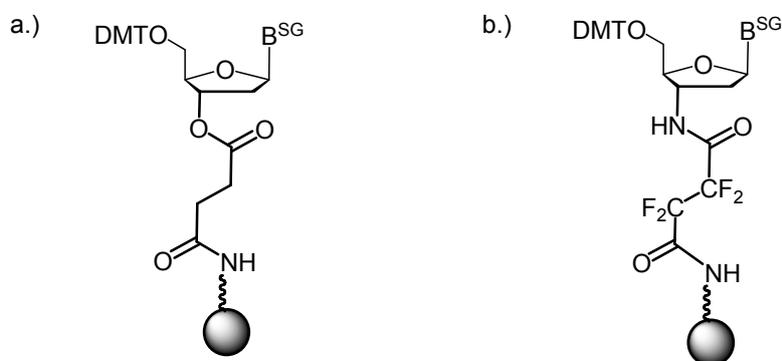


Abbildung 60: a.) Feste Phase, mit einem über einen Bernsteinsäurelinker immobilisierten Nukleosid, zur Synthese von Oligonukleotiden b) Feste Phase, mit einem über einen Tetrafluorbernsteinsäurelinker immobilisierten 3'-Aminonukleosid, zur Synthese von 3'-Aminoprimern. SG = Schutzgruppe.

Die Tetrafluorbernsteinsäure ist das "bivalente Äquivalent" zur Trifluoressigsäure, von der bekannt ist, dass sich ihre Amide leicht unter milden basischen Bedingungen spalten lassen. Weiterhin wurde die TFA-Schutzgruppe bereits erfolgreich in DNA-Synthesen zum Schutz von aliphatischen Aminogruppen eingesetzt.¹¹⁰ Die Amide der Tetrafluorbernsteinsäure sollten eine ähnliche Stabilität aufweisen wie die Ester der Bernsteinsäure. Aufgrund der kommerziellen Verfügbarkeit des Anhydrides der Hexafluorglutarsäure wurde jedoch das Linkersystem auf deren Basis entwickelt. Die vorgesehenen Synthesen der festen Phasen **96a-t** sind in Abbildung 61 dargestellt.

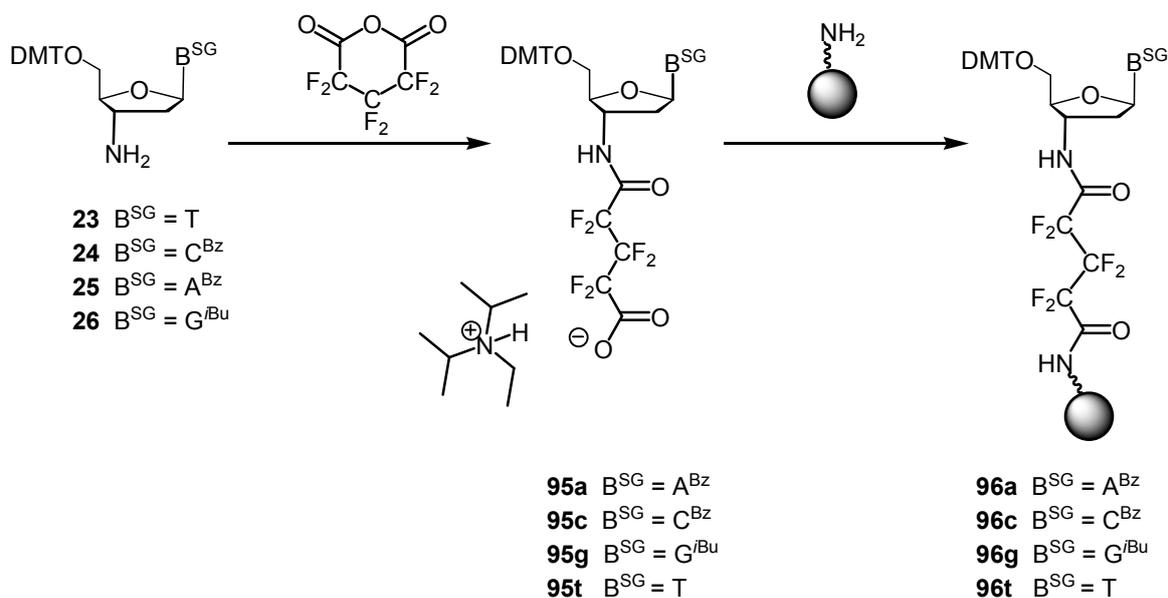


Abbildung 61: Syntheseplan zur Herstellung der festen Phasen **96a-t**. SG = Schutzgruppe.

Die zur Synthese dieser festen Phasen benötigten acylierten 3'-Aminonucleoside **95a-t** sollten durch Umsetzung der 3'-Aminonucleoside **23-26** mit Hexafluorglutarsäureanhydrid erhältlich sein. Die Kupplung der acylierten 3'-Aminonucleoside **95a-t** an die feste Phase sollte zunächst über Standard-Acylierungschemie versucht werden.

Die Umsetzung von 3'-Aminothymidin **23** mit Hexafluorglutarsäureanhydrid ergab das DIEA-Salz **95t** in 81% Ausbeute. Da davon auszugehen war, dass deaktivierte Carbonsäuren wie die Hexafluorglutarsäure nur sehr schwer zu kuppeln sind, wurde zuerst die Kupplungschemie in Lösung untersucht. Dies hatte neben der schnelleren Kinetik den Vorteil, dass die Reaktionen direkt per Dünnschichtchromatographie kontrolliert werden können. Das zum Test von verschiedenen Kupplungsreagenzien eingesetzte System ist in Abbildung 62 dargestellt.

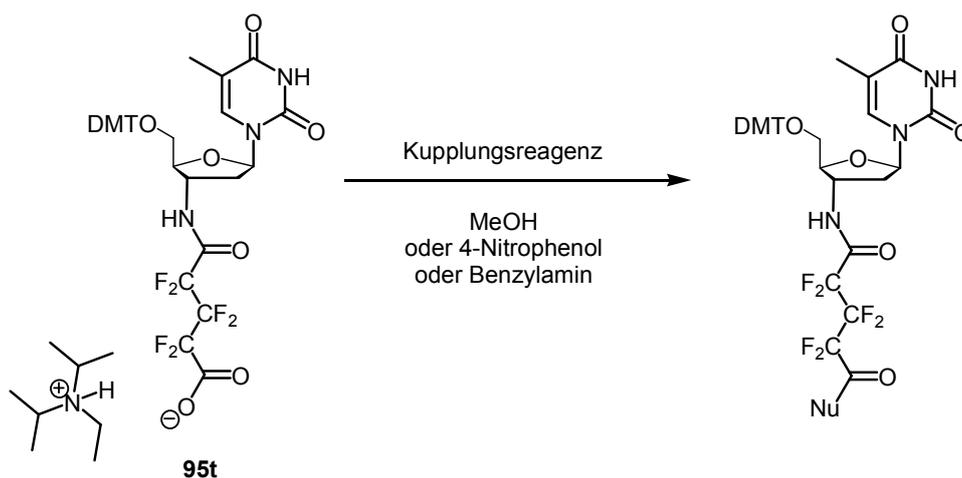


Abbildung 62: Umsetzung von **95t** mit verschiedenen Kupplungsreagenzien und Nucleophilen.

Zum Testen von verschiedenen Kupplungsreagenzien wurde zu einer Lösung von **95t** (1 mg/ml in DMF) Stammlösungen der Kondensationsreagenzien (3 Äquiv.), des Katalysators (3 Äquiv.) und des Nucleophils (3 Äquiv.) gegeben. Die erhaltenen Mischungen wurden bei Raumtemperatur geschüttelt oder einer Mikrowellenbestrahlung unterzogen. Die in diesem System getesteten Kondensationsreagenzien und kovalente Katalysatoren waren DCC, DIC, EDC·HCl, HATU¹¹¹ (HOAt), HBTU (HOBt) und TFFH.¹¹² Als Nucleophile wurden Methanol, 4-Nitrophenol und Benzylamin eingesetzt. Bei keinem dieser getesteten Kupplungsreagenzien konnte Umsatz detektiert werden.

Im Jahre 2000 beschrieben Chen und Mitarbeiter die Kupplung von Salzen der Trifluoressigsäure an Amine durch ein Triphenylphosphin/Iod "Redoxsystem".¹¹³ In Vorversuchen konnte mit diesem erfolgreich mit der Hexafluoroglutarensäure acyliertes Benzylamin an Boc-L-Valin gekuppelt werden (Abbildung 63).

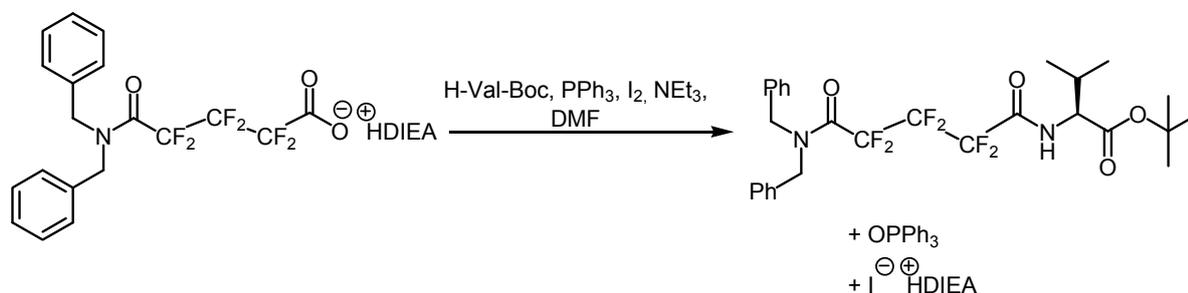


Abbildung 63: Kupplung von acyliertem Benzylamin mit L-Boc-Val durch das von Chen und Mitarbeitern beschriebene Redoxsystem.¹¹³

Mit diesem "Redoxsystem", welches vermutlich das entsprechende Acylphosphoniumion als "Aktivester" generiert, sollte deshalb ein Aufbau der festen Phase **96a-t** möglich sein.

Der Aufbau der festen Phase sollte jedoch nicht nach dem ursprünglichen Synthesepfad sondern nach einem überarbeiteten Plan, der in Abbildung 64 dargestellt ist, stattfinden.

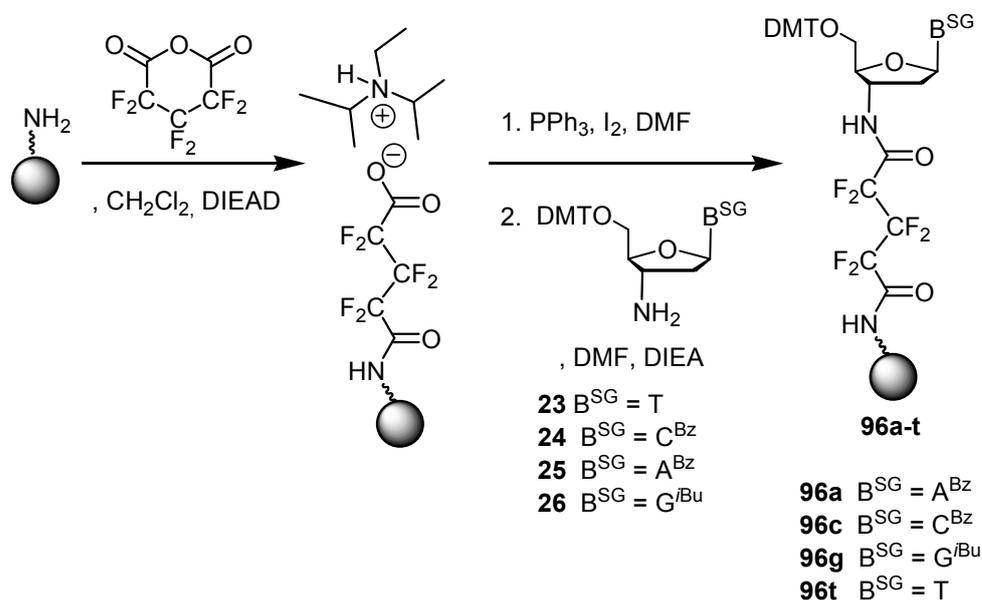


Abbildung 64: Aufbau der festen Phasen **96a-t** durch Acylierung von lcaa-CPG und anschließender Redoxkupplung der 3'-Amino-nucleoside **23-26**. SG = Schutzgruppe.

Bei diesen Synthesen wurde das lcaa-CPG mit Hexafluoroglutarinsäureanhydrid acyliert und anschließend die 3'-Aminonucleoside **23-26** gekuppelt. Diese Vorgehensweise hatte den Vorteil, dass die Aminonucleoside nicht in einem ersten Schritt in Lösung acyliert werden müssen.

Bei ersten Synthesen der festen Phase **96t** wurden unter Verwendung der Literaturbedingungen¹¹³ Beladungen zwischen 10 und 14 $\mu\text{mol/g}$ erhalten. Als ideal für DNA-Synthesen gelten jedoch Beladungen zwischen 20 und 25 $\mu\text{mol/g}$. Da bei der zur Beladung eingesetzten "Redoxreaktion" ein Äquivalent HI freigesetzt wird, lag die Vermutung nahe, dass es während der Kupplung zu einer partiellen Abspaltung der DMT-Schutzgruppe kommt. Diese Hypothese konnte durch die Beobachtung eines Dinucleotides als Produkt einer Umsetzung mit der nicht DMT-entschützten festen Phase **96t** überprüft werden (Abbildung 65).

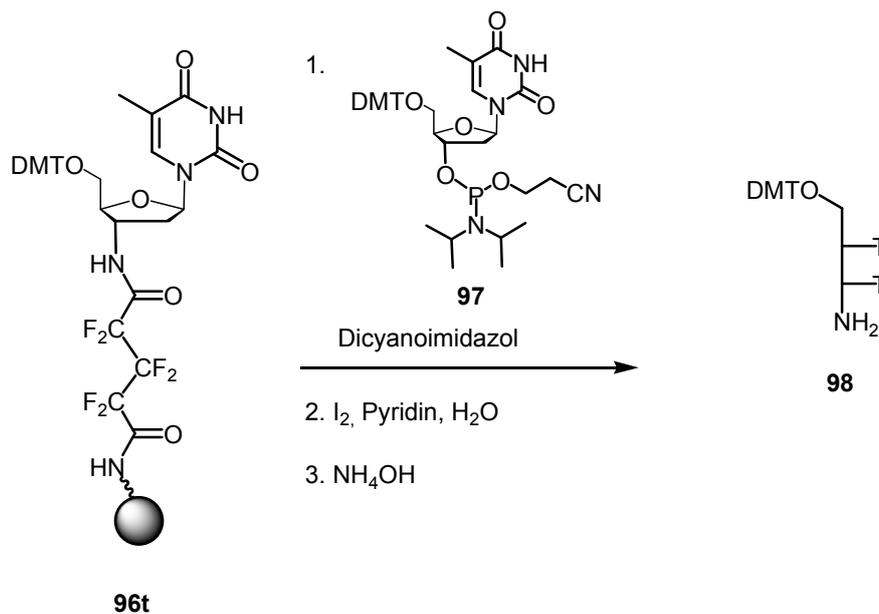


Abbildung 65: Syntheseplan zur Überprüfung der Theorie das es zu einem partiellen Verlust der DMT-Schutzgruppe während der Synthese der festen Phase **96t** kommt.

Die Durchführung eines DNA-Synthesesykluses mit dem 3'-Phosphitamid **97** ohne vorherige Abspaltung der DMT-Schutzgruppe auf der festen Phase sollte nicht zu detektierbaren Mengen an Dimer **98** führen. Wenn bei der Beladung ein partieller Verlust der DMT-Schutzgruppe auftritt, sollte aber die Verbindung **98** massenspektrometrisch detektierbar sein.

Abbildung 66 zeigt das von der ammoniakalischen Entschützungslösung erhaltene Massenspektrum nach der manuellen Durchführung eines DNA-Synthesesyklus, ausgehend auf der festen Phase **96t** ohne vorherige Abspaltung der DMT-Schutzgruppe.

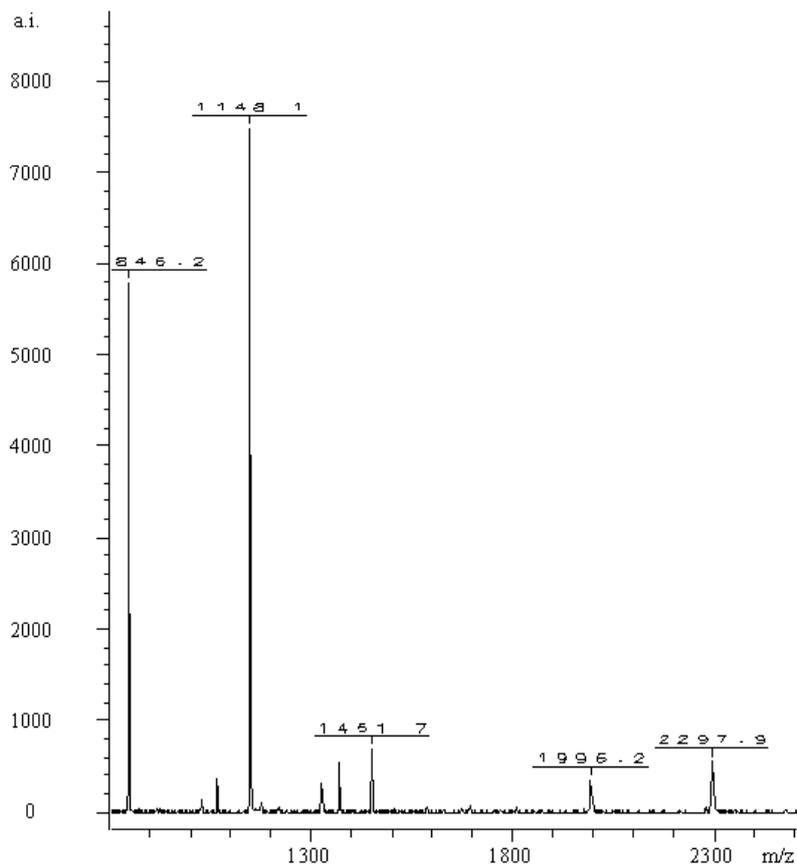


Abbildung 66: Massenspektrum der ammoniakalischen Entschüttungslösung nach der manuellen Durchführung eines DNA-Synthesesyklus, ausgehend von der festen Phase **96t** ohne vorherige Abspaltung der DMT-Schutzgruppe.

Da das Dimer **98** massenspektroskopisch detektiert werden konnte, war der Leitgedanke der darauf folgenden Optimierungsschritte die lokale Konzentration an HI so gering wie möglich zu halten und somit den partiellen Verlust der DMT-Schutzgruppe zu minimieren. Hierbei ist jedoch zu bedenken, dass die tatsächliche Beladung nicht sinkt. Es ist jedoch nicht möglich, die tatsächliche Beladung zu bestimmen, und es ist davon auszugehen, dass es zu unerwünschten Nebenreaktionen während den Synthesen kommen kann. Die Verdopplung der eingesetzten Basenmenge auf zehn Äquivalente ergab nur mäßig höhere Beladungsdichten. Die Verwendung von Pyridin als Lösungsmittel ergab ebenfalls keine Verbesserung. Durch Änderung der Reihenfolge der Zugabe der Reagenzien konnten jedoch Beladungen zwischen 17 und 28 $\mu\text{mol/g}$ erreicht werden. In Abbildung 67 ist die Reihenfolge der Zugabe der Reagenzien nach Literaturangaben (a) und die optimierte Zugabesequenz (b) mit den jeweils erreichten Beladungen dargestellt.

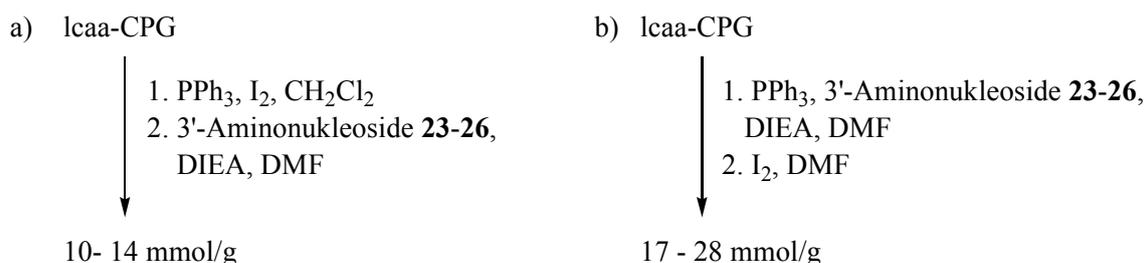


Abbildung 67: Umsetzungen und erhaltene Beladungen bei den Synthesen der festen Phase **96a-t**. a) Unter Verwendung der Literaturangaben. b) Unter Verwendung des optimierten Protokolls.

Bei den zur Optimierung der Zugabereihenfolge durchgeführten Versuchen wurde weiterhin festgestellt, dass drei Äquivalente Aminkomponente ausreichend sind, um Beladungen von bis zu 28 $\mu\text{mol/g}$ zu erreichen. Tabelle 2 führt die für die vier synthetisierten festen Phasen erhaltenen Beladungen auf.

Aminkomponente	Feste Phase	Erhaltene Beladung ($\mu\text{mol} / \text{g}$)
3'-Amino-2',3'-dideoxyadenosin	96a	18
3'-Amino-2',3'-dideoxycytidin	96c	24
3'-Amino-2',3'-dideoxyguanosin	96g	17
3'-Aminothymidin	96t	28

Tabelle 2: Mit den optimierten Bedingungen erhaltene Beladungsdichten der festen Phasen **96a-t**.

3'-Aminoprimer-synthese und chemische Primerverlängerung

Die erhaltenen festen Phasen **96a-t** mussten nun auf ihre Eignung zur Synthese von 3'-Aminoprimern unter "Anwenderbedingungen" getestet werden. Hierzu wurden die vier 3'-Aminoprimer der Sequenz CGCACGB* (**99a-t**, B* = A, C, G, T) nach Standardprotokollen auf einem DNA-Synthesizer synthetisiert. Unter identischen Bedingungen wurde als Kontrolle eine Standard-DNA-Synthese, ausgehend von käuflichem, nukleosidbeladenem CPG durchgeführt. Zur Kontrolle der Reinheit und Bestimmung der Ausbeuten wurden HPLC-Analysen durchgeführt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die 3'-Aminoprimer schon als Rohprodukt in mindestens 85% Reinheit erhalten wurden.

Die Abbildung 68 zeigt beispielhaft das erhaltene HPLC-Chromatogramm bei Einspritzung der Entschützungslösung einer 0.5 μ molaren DNA-Synthese ausgehend von dem eigenen Support **96a**.

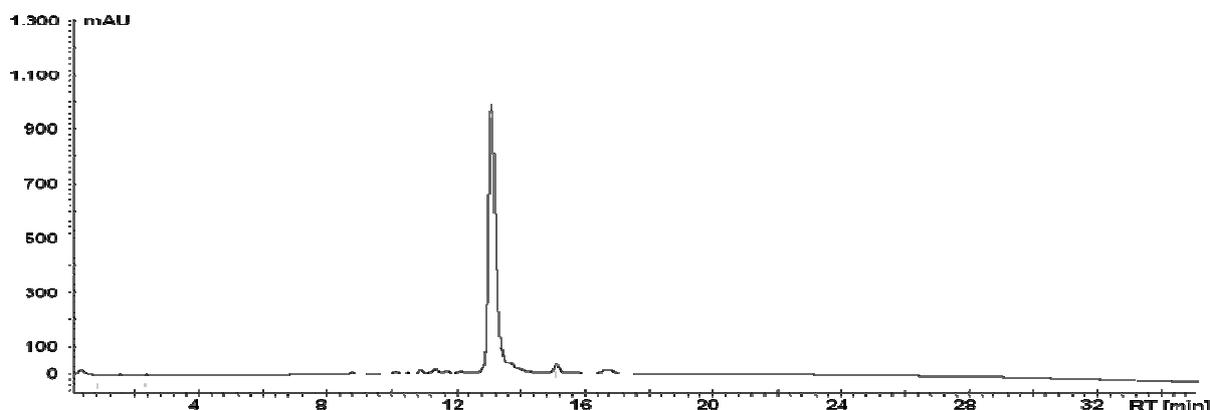


Abbildung 68: Erhaltenes HPLC-Chromatogramm bei Einspritzung der Entschützungslösung einer 0.5 μ molaren DNA-Synthese ausgehend von dem eigenen Support **96a**.

Zum Vergleich ist in Abbildung 69 das erhaltene Chromatogramm bei der Einspritzung der Entschützungslösung der Kontrollsynthese dargestellt.

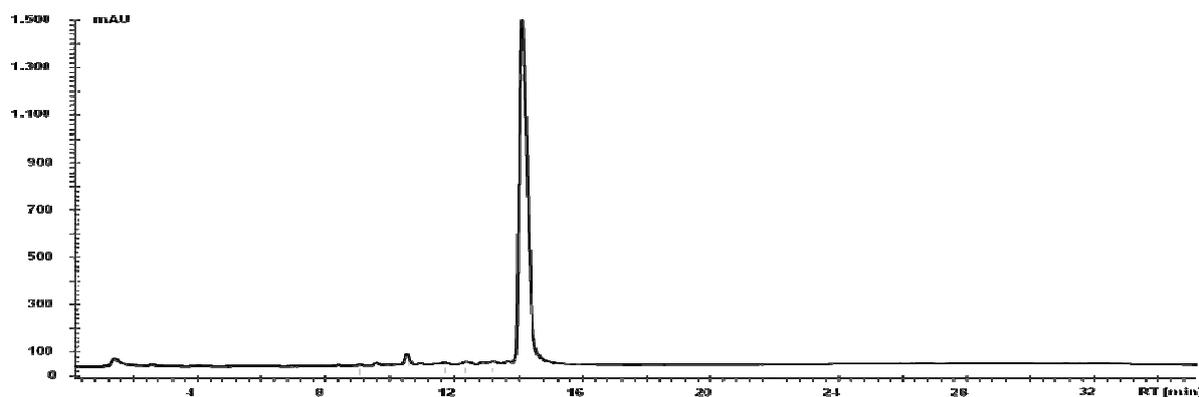


Abbildung 69: Erhaltenes HPLC Chromatogramm bei Einspritzung der Entschützungslösung einer 0.5 μ molaren DNA-Synthese ausgehend von käuflichem nukleosidbeladenem CPG.

Die Rohprodukte von 1 μ molaren Synthesen der 3'-Aminoprimer **99a-t** wurden über eine mit RP-C-18-Umkehrphasenmaterial gefüllte Kartusche aufgereinigt. Hierbei konnten, ohne Optimierung des Gradienten für die Aufreinigung, Ausbeuten zwischen 15-25% erzielt werden. Als zusätzliche Kontrolle wurden alle vier 3'-Aminoprimer durch "Reversed-DNA-Synthese" mit den käuflichen 3'-Tritylaminophosphitamidn synthetisiert. Die Ausbeuten aller durchgeführten Synthesen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Feste Phase/ Synthesemethode	Sequenz gemäß	Nummer	Ausbeute HPLC-Analyse	Ausbeute Cartridge Nach Aufreinigung
96t / 3'-Phosphitamide	CGCACGT*	99t	33 %	20 %
96a / 3'- Phosphitamide	CGCACGA*	99a	37%	24 %
96c / 3'- Phosphitamide	CGCACGC*	99c	43 %	15 %
96g / 3'- Phosphitamide	CGCACGG*	99g	47 %	21 %
T /Standard	CGCACGT	Kontrolle	50 %	nicht bestimmt
T / 5'-Phosphitamide	CGCACGT*	99t	34 %	nicht bestimmt
A / 5'-Phosphitamide	CGCACGA*	99a	25 %	nicht bestimmt
C / 5'-Phosphitamide	CGCACGC*	99c	16 %	nicht bestimmt
G / 5'-Phosphitamide	CGCACGG*	99g	12 %	nicht bestimmt

Tabelle 3: Erhaltene Ausbeuten der durchgeführten Synthesen von 3'-Aminoprimern und der unmodifizierten Kontrollsynthese. (B* = 3'-Amino-2',3'-didesoxynukleotid).

Um die strukturelle Integrität der erhaltenen 3'-Aminoprimere zu prüfen wurden chemische Primerverlängerungsreaktionen durchgeführt. Sollte es zum Beispiel während der Abspaltung zu Isomerisierungsreaktionen gekommen sein, so sollte sich dies durch nicht vollständigen Umsatz des 3'-Aminoprimers zu erkennen geben. Verwendet wurde hierzu das in der Gruppe etablierte und in Abbildung 70 gezeigte Sequenzsystem* zur enzymfreien Primerverlängerung.

* Die Primerverlängerungsreaktionen wurden von Annette Hochgesandt durchgeführt.

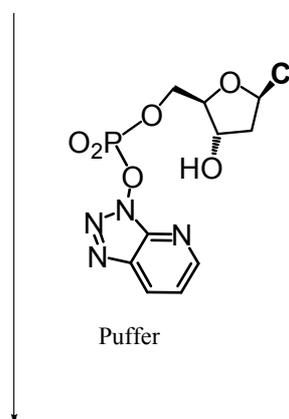


Abbildung 70: Schematische Darstellung eines einzelnen Primerverlängerungsschrittes mit als HOAt-Aktivester aktiviertem Monomer zum Testen der Integrität der dargestellten 3'-Aminoprimer **99a-t**.

Für alle vier 3'-Aminoprimer wurde vollständiger Umsatz beobachtet. Der Vergleich mit den durch die käuflichen 3'-Aminotriptyl-CEPAs synthetisierten 3'-Aminoprimer zeigt keinen erkennbaren Unterschied in Umsatz und Halbwertszeiten im Rahmen der Fehlergrenzen (Tabelle 4).

Sequenz	Reagenzien	Umsatz
3'-Aminoprimer		
CGCACGT* (99t)	96t , 3'-Phosphitamide	92 %
CGCACGT* (99t)	5'-Phosphitamide	95 %
CGCACGG* (99g)	96g , 3'-Phosphitamide	99 %
CGCACGG* (99g)	5'-Phosphitamide	99 %
CGCACGC* (99c)	96c , 3'-Phosphitamide	99 %
CGCACGC* (99c)	5'-Phosphitamide	97 %
CGCACGA* (99a)	96a , 3'-Phosphitamide	95 %
CGCACGA* (99a)	5'-Phosphitamide	99 %

Tabelle 4: Bei chemischen Primerverlängerungsreaktionen erhaltene Umsätze mit den synthetisierten 3'-Aminoprimeren. **B*** = 3'-Amino-2',3'-didesoxynukleotid.

Abbildung 71 zeigt beispielhaft die bei der in Abbildung 70 dargestellten Primerverlängerungsreaktion erhaltenen Umsätze in Bezug auf Primer und dessen Verlängerungsprodukt für den Fall von Primer **99t**.

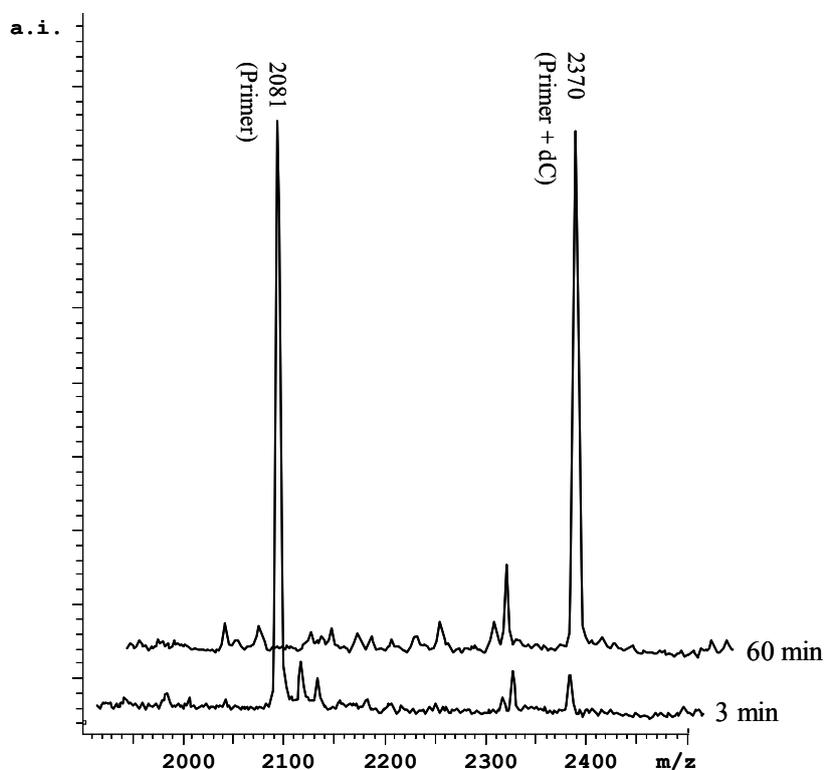


Abbildung 71: MALDI-TOF-Massenspektren von Primer **99t** und dessen Verlängerungsprodukt nach 3 bzw. 60 Minuten.

Zusammenfassende Diskussion

Es konnten feste Phasen zur Synthese von 3'-Aminoprimern mit jeder der vier Kernbasen an der 3'-terminalen Position auf der Basis der Hexafluorglutarsäure etabliert werden. Die bei der Beladung der festen Phase eingesetzten Chemikalien sind günstig und die Synthese erfordert nur zwei Stufen. Die zur Beladung benötigte Äquivalentmenge an Aminkomponenten **23-26** konnte auf drei Äquivalente verringert werden. Durch Optimierung der Reaktionsbedingungen konnten Beladungen zwischen 17 und 28 $\mu\text{mol/g}$ erreicht werden. Diese Beladungsdichten sind "ideal" für automatisierte DNA-Synthesen auf konventionellen Syntheseautomaten.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass alle vier synthetisierten festen Phasen zur Synthese von 3'-Aminoprimern durch Standard DNA Synthese mit 3'-Phosphitmiden geeignet sind. Die Ausbeuten sind hierbei mit 33-47% bei HPLC-Aufreinigung für

Oligonukleotide als gut zu bezeichnen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine einfache SepPak-Aufreinigung ausreichend ist, um sauberes Material in Ausbeuten von 15-24% zu erhalten. Dies steigert die Attraktivität der neuen festen Phasen. Die Isomerenreinheit der erhaltenen 3'-Aminoprimer konnte durch vollständigen Umsatz bei chemischen Primerverlängerungsreaktionen gezeigt werden. Hierbei war kein Unterschied zwischen den eigenen Primern und denen aus den käuflichen 3'-Aminotriethylphosphitamid-hergestellten feststellbar. Damit hat sich der Ansatz des Acyl-Linkers mit durch Fluoratome labilisiertem Amid bewährt.

3.2. Synthese der 3'-Amino-2',3'-desoxyukleosid-5'-monophosphate

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, neben der Synthese der 3'-Aminoprimer, die Synthese der kernbasengeschützten 3'-Aminophosphate **100a-t** (Abbildung 72a). Solche Moleküle sind wichtige Zwischenstufen bei der Herstellung von Nucleosiden, die bei der mehrfachen chemischen Primerverlängerung benötigt werden.¹¹⁴ Als Zugang zu 3'-Aminophosphaten waren zu Beginn dieser Arbeit nur Synthesen ausgehend von den 3'-Triethylaminophosphitamid- (**11a-t**, Abbildung 72b) üblich. Diese können durch Oxidation und Entschützung der Phosphat- und Aminogruppe in Lösung zu den Aminophosphorsäuren umgesetzt werden. Aufgrund der basischen Entschützung bei der Durchführung dieser Synthesen ist es jedoch nicht möglich, die Kernbasenschutzgruppen zu erhalten. Der Erhalt dieser hätte den Vorteil, dass Reaktionen an der aliphatischen Aminofunktion durchgeführt werden können, ohne Nebenreaktionen an den exocyclischen Aminofunktionen befürchten zu müssen. Die Acylierung der aliphatischen Aminofunktion ist zur Fluorophormarkierung sinnvoll.

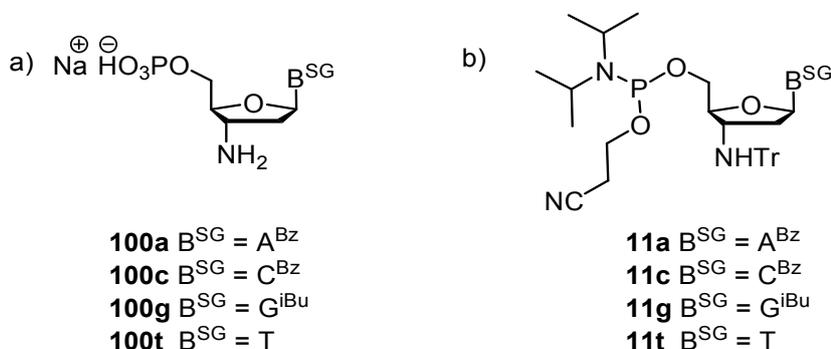


Abbildung 72: a) Kernbasengeschützte 3'-Aminophosphate **100a-t**, die Zielmoleküle in diesem Abschnitt. b) 5'-Phosphitamide der Triethylaminonucleoside **11a-t**. SG = Schutzgruppe.

Da auch die kommerzielle Verfügbarkeit der 3'-Tritylaminophosphitamide **11a-t** nicht dauerhaft gewährleistet war, sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Synthesen der 3'-Aminophosphate **100a-t**, ausgehend von den käuflichen 2'-Desoxynucleosiden, entwickelt werden. Diese sollten in Lösung durchgeführt werden, um in späteren Synthesen größere Stoffmengen generieren zu können.

Bei den eigenen Synthesen konnte auf die in den Synthesen der 3'-Aminonucleosiden als Intermediate erhaltenen 3'-Azidonucleoside zurückgegriffen werden. Ausgehend von diesen ist nur noch die Anbringung der 5'-Phosphatgruppe und die Reduktion der Azidofunktion zur Aminofunktion notwendig, um die kernbasengeschützten 3'-Aminophosphate **100a-t** zu erhalten. Zur Einführung der 5'-Phosphatfunktion wurden vier mögliche Zugänge in Betracht gezogen, von denen eine in Abbildung 73 dargestellt ist.

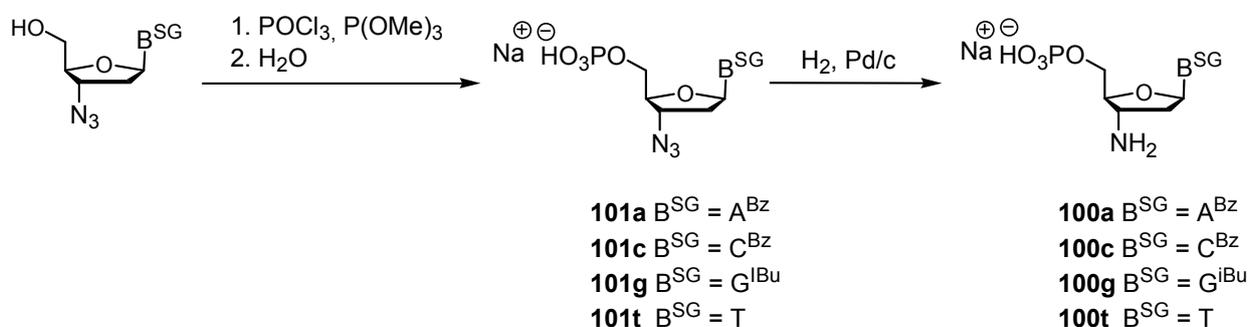


Abbildung 73: Mögliche Synthese der 3'-Aminophosphate **100a-t** durch Phosphorylierung mit POCl_3 und nachfolgender katalytischer Hydrierung. $B^{SG} = A^{Bz}$, C^{Bz} , G^{iBu} oder T. SG = Schutzgruppen.

In dieser Synthese würde die 5'-Phosphatfunktion durch Umsetzung der 5'-Hydroxylgruppe der 3'-Azidonucleoside mit POCl_3 in P(OMe)_3 , einer für solche Umsetzungen erprobten Kombination aus Reagenz und Lösungsmittel, mit nachfolgender Hydrolyse erhalten werden. Durch katalytische Hydrierung der Azidofunktion der intermediären 3'-Azidophosphate **101a-t** sollten die 3'-Amino-phosphate **100a-t** erhalten werden. Bei solchen Phosphatsynthesen sind Ausbeuten von unter 60% typisch, da es zu Nebenreaktionen, wie der Bildung von Pyrophosphaten, kommen kann. In dieser potentiellen Syntheseroute wäre auch die Handhabung von geladenen Molekülen und die Aufreinigung eben dieser durch Ionenaustauscherchromatographie notwendig.

Ein weiterer Zugang zu 3'-Aminophosphaten sollte über die in Abbildung 74 dargestellten Monocyanoethylester **102a-t** möglich sein.

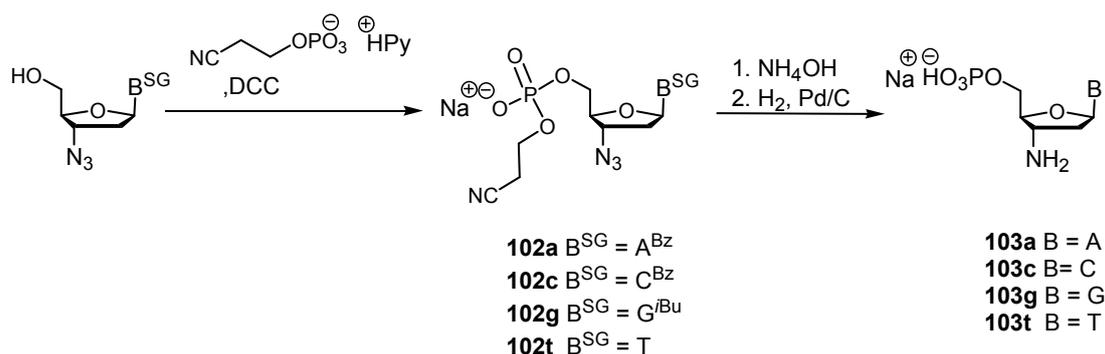


Abbildung 74: Mögliche Synthese der an den Kernbasen ungeschützten 3'-Aminophosphate **103a-t** über die Monocyanoethylester **102a-t**. B^{SG} = A^{Bz}, C^{Bz}, G^{iBu} oder T. SG = Schutzgruppen.

Die Monocyanoethylester **102a-t** sollten aus den 3'-Azidonukleosiden durch eine DCC-vermittelte Kupplung mit dem Pyridiniumsalz des Monocyanoethylphosphorsäureesters zugänglich sein.^{115,116} Die an der Kernbase ungeschützten 3'-Aminophosphate **103a-t** sollten durch basische Entschützung des Phosphates und katalytische Hydrierung des Azids aus den Verbindungen **102a-t** zugänglich sein. Ein Verlust der Kernbasenschutzgruppen wäre bei dieser Syntheseroute durch die notwendige basische Abspaltung der Cyanoethylschutzgruppe fast unvermeidlich. Diese Syntheseroute wurde von Kalamas und Mitarbeitern erfolgreich zur Synthese des Thymidinderivates **103t** eingesetzt.¹¹⁷ Das Pyridiniumsalz des Monocyanoethylphosphorsäureesters ist jedoch nicht käuflich und müsste in einem zeitaufwendigen Prozess zum Beispiel aus dem käuflichen Bariumsalz hergestellt werden.¹¹⁸ Auch bei dieser Syntheseroute wäre die Handhabung einer geladenen Zwischenstufe und deren Aufreinigung durch Ionenaustauscherchromatographie notwendig.

Eine weitere Alternative zur Darstellung der 3'-Aminophosphate ist die Entschützung der Phosphorsäureamide **104a-t**, die auf einer in der hiesigen Gruppe etablierten Methode beruht (Abbildung 75).¹¹⁹

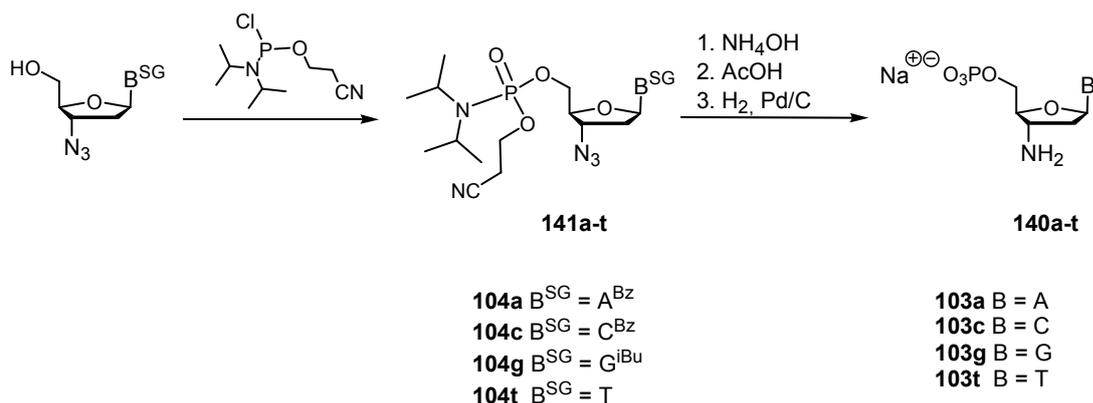


Abbildung 75: Mögliche Synthese der an den Kernbasen ungeschützten 3'-Aminophosphate **103a-t** über intermediäre Phosphorsäureamide **104a-t**. B^{SG} = A^{Bz}, C^{Bz}, G^{iBu} oder T. SG = Schutzgruppen.

Die Phosphorsäureamide **104a-t** sollten ausgehend von den 3'-Azidonucleosiden durch Phosphitylierung, gefolgt von einer Oxidation zur Phosphor-(V)-Spezies erhältlich sein. Die Entschützung der Phosphorsäureamide zu den Phosphaten in einem zweistufigen Prozess mit nachfolgender Reduktion der Azidofunktion würde die an der Kernbase ungeschützten 3'-Aminophosphate **103a-t** ergeben. Problematisch bei dieser Syntheseroute wäre allerdings die saure Spaltung der Phosphorsäureamide, da es dabei zu Depurinierungsreaktionen kommen kann. Auch in dieser Synthese müssten geladene Zwischenstufen gehandhabt und durch Ionenaustauscherchromatographie aufgereinigt werden.

Als letzte Möglichkeit zur Synthese der 3'-Aminophosphate **100a-t** könnte die Bildung von Phosphorsäuretriestern herangezogen werden (Abbildung 76).

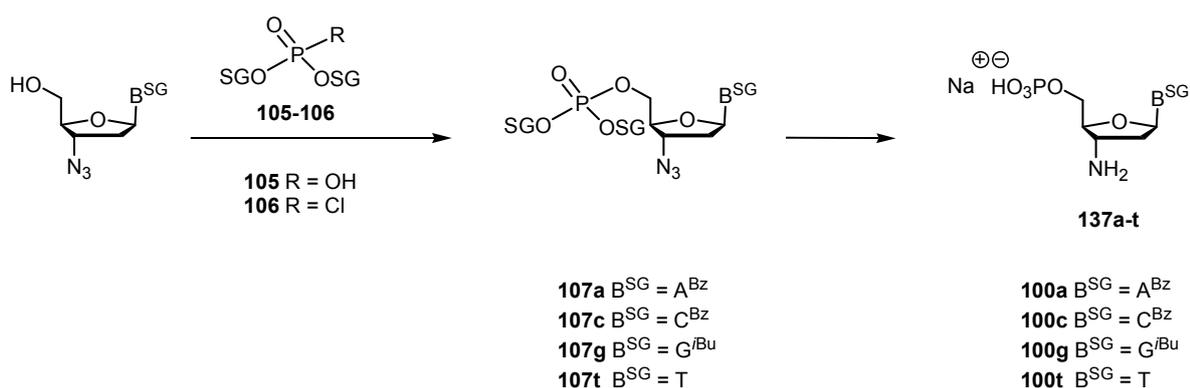


Abbildung 76: Mögliche Synthese der kernbasengeschützten 3'-Aminophosphate **100a-t** über die Phosphorsäuretriestern **107a-t**. B^{SG} = A^{Bz}, C^{Bz}, G^{iBu} oder T. SG = Schutzgruppen.

Die Phosphorsäuretriestern **107a-t** sollten aus den 3'-Azidonucleosiden durch eine Mitsunobu-Reaktion mit den entsprechend geschützten Phosphaten (**105**) oder durch Umsetzung mit den

Säurechloriden **106** zugänglich sein. Die kernbasengeschützten 3'-Aminophosphate **100a-t** sollten aus den Phosphorsäuretriestern **107a-t** durch Entschützung des Phosphats und Reduktion des Azids zugänglich sein. Einsetzbare Schutzgruppen für die Phosphatgruppe wären die Benzyl-, die Cyanoethyl- und die Phenylschutzgruppe.

Alle vier mögliche Syntheserouten zur Darstellung der 3'-Aminophosphorsäuren haben ihre Vor- und Nachteile. Ausgewählt wurde letztendlich Syntheseroute 4 (Abbildung 76). Bei dieser wurde erhofft, ein geladenes Molekül erst im letzten Schritt der Synthesesequenz, der Reduktion des Azides zum Amin, zu erhalten. Die Entschützung des 5'-Phosphates sollte hierbei durch katalytische Hydrierung erfolgen. Als Phosphatschutzgruppen kamen somit nur Schutzgruppen in Frage, welche durch diese Bedingungen abspaltbar sind, also die Benzyl- und die Phenylschutzgruppe. Die Phenylschutzgruppe wird durch katalytische Hydrierung mit Platindioxid abgespalten. Hierbei wird der Phenylring zum entsprechenden Cyclohexan "durchhydriert", welches als eigentliche Abgangsgruppe fungiert. Unter diesen Bedingungen war zu befürchten, dass es zu einer partiellen Hydrierung der Kernbasen kommen würde. Die Benzylschutzgruppe wird unter milderen Bedingungen mit Palladium auf Aktivkohle abgespalten.¹²⁰¹²¹ Von diesen Bedingungen war aus den Synthese der 3'-Aminonukleoside **23-26** bekannt, dass es nicht zur Hydrierung der Kernbasen kommen würde.

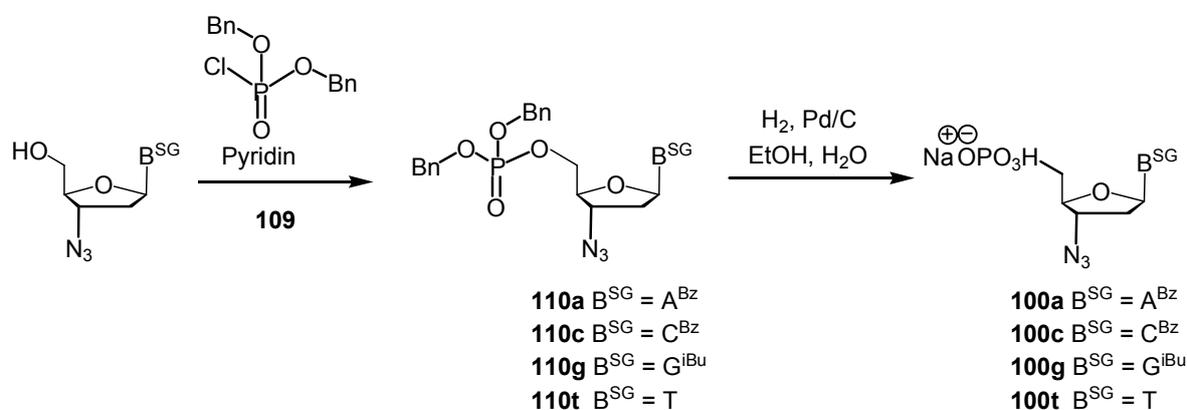


Abbildung 77: Synthesepfad zur Synthese der 3'-Aminophosphate **100a-t** ausgehend von den 3'-Aziden. SG = Schutzgruppe.

Die Phosphorsäuretriestere **110a-t** sollten aus den 3'-Azidonukleosiden durch Umsetzung mit dem käuflichen Säurechlorid der Dibenzylphosphorsäure^{122*} (**109**) erhalten werden. Wie oben

* Das Säurechlorid der Dibenzylphosphorsäure **109** ist als eine 10%ige Lösung in Benzol käuflich oder kann in einer Stufe aus Dibenzylphosphit und N-Chlorsuccinimid hergestellt werden.

beschrieben, sollten die 3'-Aminophosphate **100a-t** dann aus den Phosphorsäuretriestern **110a-t** durch katalytische Hydrierung erhalten werden.

Die Umsetzung der 3'-Azidonukleoside mit Säurechlorid **109** bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Pyridin ergab die Phosphorsäuretriestere **110a-t** in Ausbeuten zwischen 69 und 79%. Eine säulenchromatographische Aufreinigung des Guanosinderivates **110g** scheiterte jedoch an den nahezu identischen R_f -Werten von Edukt und Produkt.

Die finale Entschützung wurde, aufgrund der absehbaren unterschiedlichen Löslichkeiten der Edukte **110a/c/t** und der Zwischenstufen **111a/c/t**, in einem zweistufigen Prozess durchgeführt (Abbildung 78).

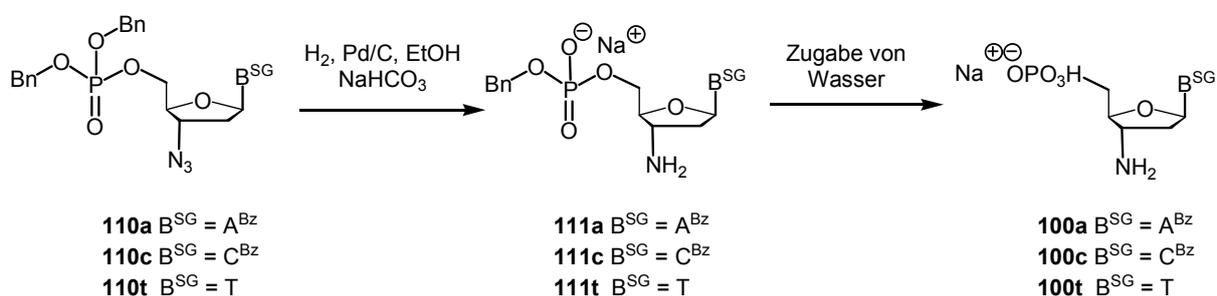


Abbildung 78: Zweistufige katalytische Hydrierung zur Entschützung der Phosphorsäuretriestere **110a/c/t**.

Im ersten Schritt der Hydrierung wurde in Ethanol, unter Zugabe von $100\text{ }\mu\text{L}$ NaHCO_3 pro 5 ml Lösungsmittel, hydriert, bis bei der DC-Reaktionskontrolle keine migrierenden Substanzen mehr detektiert werden konnten. Nach Zugabe eines gleichen Volumens an Wasser wurde dann "weiterhydriert" bis das Dünnschichtchromatogramm nur noch einen Spot zeigte. Die Aufarbeitung bei dieser Reaktion beschränkte sich auf das Abfiltrieren des Katalysators und dem Gefriertrocknen der resultierenden Lösungen. Die kernbasengeschützten 3'-Aminophosphate **100a/c/t** konnten so aus den Phosphorsäuretriestern **110a/c/t** in Ausbeuten zwischen 78 und 83% erhalten werden. Tabelle 5 fasst die einzelnen Ausbeuten zusammen.

Reaktion	Base	Produkt	Ausbeute
Bildung des Phosphorsäuretriesters			
	<i>N</i> 6-Benzoyladenin	110a	69 %
	<i>N</i> 4-Benzoylcytosin	110c	74 %
	<i>N</i> 2-Isobutyrylguanin	110g	0%
	Thymin	110t	79 %
Entschützung des Phosphates und Reduktion des Azids			
	<i>N</i> 6-Benzoyladenin	100a	81 %
	<i>N</i> 4-Benzoylcytosin	100c	83 %
	<i>N</i> 2-Isobutyrylguanin	100g	0%
	Thymin	100t	78 %

Tabelle 5: Erhaltene Ausbeuten bei den in diesem Abschnitt beschriebene Umsetzungen.

Zusammenfassung

Eine neue Syntheseroute zur Herstellung der kernbasengeschützten 3'-Aminophosphate **100a/c/t** in Lösung wurde etabliert. Aus Zeitgründen konnte die Synthese des Guanosinderivates **100g** nicht optimiert und bis zum 3'-Aminophosphat durchgeführt werden. Es gelang, die Synthesen so zu konzipieren und durchzuführen, dass bei allen Schritten, bei denen eine Aufreinigung notwendig war, Verbindungen erhalten wurden, die sich säulenchromatographisch mit organischen Lösungsmitteln als Eluenten aufreinigen ließen. Die abschließende Entschützung zu den Zielmolekülen (**100a/c/t**) war durch katalytische Hydrierung in einem Schritt möglich. Die Aufreinigung auf der letzten Stufe beschränkte sich hierbei auf das Abfiltrieren des Katalysators und das Gefriertrocknen der resultierenden Lösung. Die Produkte wurden nach der Hydrierung und der Entfernung des Lösungsmittels als Reinstoffe erhalten. In Abbildung 79 ist das Spektrum der Rohsubstanz der Synthese des Thymidinderivats **100t** dargestellt.

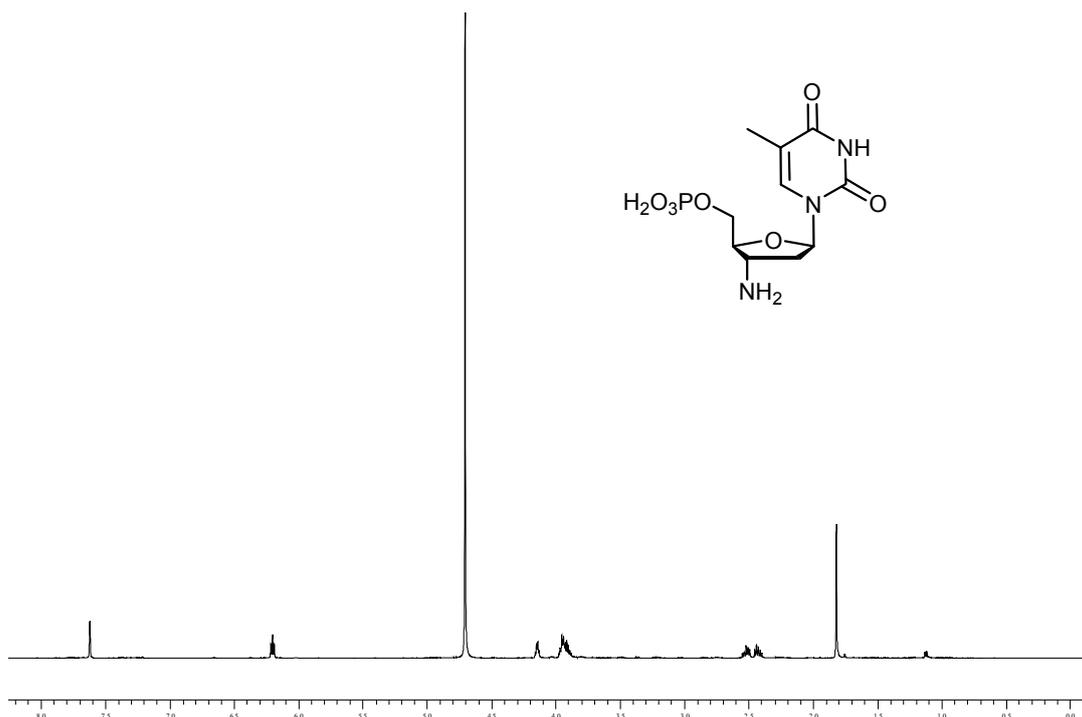


Abbildung 79: ¹H-NMR (500 MHz) von 3'-Amino-3'-desoxythymidin-5'-phosphat **100t** nach der Entfernung der Schutzgruppen und Gefriertrocknung der erhaltenen Lösung.

Tabelle 6 fasst die Anzahl der Stufen ausgehend von den entsprechenden kernbasengeschützten 2'-Desoxynukleosiden zusammen sowie die erhaltenen Ausbeuten.

Ausgangsverbindung	Zielverbindung	Anzahl der Stufen	Gesamtausbeute
N6-Benzoyl-2'-desoxyadenosin	100a	5	38%
N4-Benzoyl-2'-desoxycytidin	100c	5	28%
Thymidin	100t	6	31%

Tabelle 6: Übersicht über die Anzahl der Stufen und Gesamtausbeuten der Synthese der 3'-Aminophosphate **100a/c/g**.

Mit diesen neuen Syntheserouten sollte der Zugang zu den 3'-Aminophosphaten **100a-t**, nach Optimierung der Synthese des Guanosinderivates, in großen Mengen gewährleistet sein.

4. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird über die Synthese von 3'-Amino-2,3'-didesoxynukleosiden berichtet. Ausgehend von den natürlich vorkommenden 2'-Desoxynukleosiden des Adenins, Cytosins, Guanins und Thymins konnten diese in 5 bis 6 Stufen in Gesamtausbeuten zwischen 37 und 50% zugänglich gemacht werden. Schlüsselintermediate waren bei den Pyrimidinen die 2,3'-Anhydronukleoside, die zu den Aziden geöffnet wurden. Die 2'-Desoxyribonnukleoside der Purine wurden durch Oxidation und *in situ* Reduktion in ihre Xyloanaloga überführt, deren 3'-Hydroxylgruppe sodann unter Mitsunobu-Bedingungen substituiert wurde. Nach der Schützung der 5'-Position der Azide wurden diese zu den entsprechenden Aminen reduziert und schließlich auf "Controlled Pore Glass" (CPG) immobilisiert. Für diese erwies sich ein Hexafluorglutarsäurelinker als besonders geeignet. Er erlaubte es, an der 5'-Position des immobilisierten Nukleosids Kettenverlängerungsreaktionen mittels automatisierter DNA-Synthese durchzuführen. So konnten Oligonukleotide mit 3'-terminaler Aminogruppe zugänglich gemacht werden, die rasche und vollständige Umsetzungen bei der chemischen Primerverlängerung eingingen. Schließlich konnte ein Zugang zu den 3'-Amino-2,3'-didesoxynukleosid-5'-monophosphaten von Adenosin, Thyminidin und Cytidin in Gesamtausbeuten zwischen 28 und 38% erarbeitet werden. Diese Aminophosphorsäuren eignen sich zur Herstellung von fluorophormarkierten Monomeren für die chemische Primerverlängerung.

5. Experimenteller Teil

5.1. Allgemeines

Lösungsmittel und Reagenzien

Lösungsmittel und Reagenzien wurden in bestmöglicher Qualität von *Acros* (Geel, Belgien), *Aldrich/Fluka/Sigma* (Deisenhofen, Deutschland) oder *Merck/VWR* (Darmstadt, Deutschland) bezogen und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Deuterierte Lösungsmittel wurden von der EURISOTOP GmbH (Saarbrücken, Deutschland) bezogen. Acetonitril und Dichlormethan wurden über P_4O_{10} getrocknet, THF über Natrium absolutiert. Absolute Lösungsmittel wurden in Schlenckflaschen über Molekularsieb aufbewahrt. Die kernbasengeschützten Nukleoside (dA^{Bz} , dG^{iBu} und dC^{Bz}), Thymidin und 5'-Phosphitamide wurden von *Chemgenes* (Wilmington, USA, MA) erworben. Alle anderen zur DNA-Synthese eingesetzten Reagenzien wurden von der Firma *Proligo* (Hamburg, Deutschland) bezogen. 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorphosphitamid war von *TRC-Canada* (North, York, Kanada). Die 3'-Aminotriethylphosphitamide wurden von *Transgenomics* (Glasgow, Schottland) bezogen.

Analytik – Geräte und Methoden

MALDI-TOF-Massenspektren wurden auf einem *REFLEX-IV*-Spektrometer von *Bruker Daltonics* (Billerica, MA, USA) aufgenommen. Oligonukleotide und negativ geladene kleine Moleküle wurden im linear negativen Modus gemessen. Als Matrix für diese diente hierbei eine Mischung aus 2,4,6-Trihydroxyacetophenon (THAP, 0.3 M in Ethanol) und Diammoniumcitrat (0.1 M in H_2O) (2:1, v/v). Kleine Moleküle wurden im linear positiven Modus mit 6-Aza-2-thiothymin (ATT) (gesättigte Lösung in Acetonitril) als Matrix gemessen. **FAB**-Massenspektren wurden auf einem MAT FAB/EI Spektrometer aufgenommen. Die angegebenen m/z Werte entsprechen den pseudomolekularen Ionen ($[M-H]^-$ oder $[M+H]^+$). **NMR**-Spektren wurden auf Spektrometer von *Bruker* mit 250 MHz, 400 MHz, 500 MHz oder 600 MHz aufgenommen.

Analytische Dünnschichtchromatographie wurde auf Kieselgel 60 Platten der Firma *Merck* (Darmstadt, Deutschland) (0.25 mm Schichtdicke) durchgeführt. Zur Anfärbung wurde eine Lösung von Cer-(IV)-Sulfat (10 g Cer-(IV)-sulfattetrahydrat, 25 g Polymolybdänsäure, 60 mL konzentrierte Schwefelsäure aufgefüllt mit Wasser auf einen Liter Lösung) verwendet. Flashchromatographie wurde mit Kieselgel der Firma *Merck* (Darmstadt, Deutschland) oder

neutralem Aluminiumoxid (Tpy 507c) der Firma *Fluka* (Deisenhofen, Deutschland) durchgeführt.

Synthese von 3'-Aminoprimer mit 3'-Phosphitamiden

Die Synthesen der 3'-Aminoprimer mit den festen Phasen **96a-t** und 3'-Phosphitamiden wurden auf einem *Perseptive Biosystems 8909 Expedite* DNA-Syntheseautomaten der Firma *Applied Biosystems* (Foster City, USA,CA) in 0.5 oder 1.0 μmol Maßstäben nach den Protokollen des Herstellers durchgeführt. Die Abspaltung der Oligonukleotide von den festen Phase geschah für 16 Stunden bei 55 °C mit konz. Ammoniakwasser. Zur Chromatographischen Aufreinigung wurden Umkehrphasengefüllte Kartuschen (RP-C₁₈, Sep-Pak Vac 3cc, Walters, Eschborn, Deutschland) eingesetzt. Für die Aufreinigung wurde folgendes Protokoll verwendet:

Konditionierung der festen Phase :	2 M CH ₃ CN	(2 mL)
Äquilibrierung der stationären Phase:	TEAA-Puffer	(4 mL)
Auftragung des 3'-Aminprimers:	gelöst in H ₂ O	
Entfernung der Abbruchsequenzen:	5, 10, 15, 20 % CH ₃ CN in 0.1 M TEAA-Puffer	(4 mL)
Entschützung:	2% TFA in H ₂ O	(2 mL)
Neutralisation:	2 M TEAA-Puffer	(6 mL)
Eluirung des Produktes:	2, 5, 7, 10, 15, 20, 70 % CH ₃ CN in 0.1 M TEAA-Puffer	(4 mL)

HPLC-Analysen der Rohprodukte der 0.5 $\mu\text{molaren}$ 3'-Aminoprimer-synthesen und der Kontroll-synthese wurden auf einer Ionenaustauscher-HPLC von *Varian Prostar* mit einer Nucleogel SAX1000-8 Säule (50 x 4.6 mm) durchgeführt. Verwendet wurde hierbei ein Gradient von 5% der Lösung B pro Minute (10 mM NaOH + 1 M KCl) in A (10 mM NaOH [pH 12]) und einem Fluss von 1mL/min. Die bestimmten Reinheiten basierten auf der Intensität des Produktpeaks (260 nm) im HPLC Chromatogramm des Rohproduktes. Zur Bestimmung der Ausbeuten durch HPLC-Analyse wurden die Rohprodukte der 0.5 $\mu\text{molaren}$ Synthesen in H₂O (bidest., 1 mL) aufgenommen und 20 μL dieser Lösung eingespritzt. Die Produkt enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt, gefriergetrocknet und der Rückstand zur UV-spektrometrischen Ausbeutebestimmung in einer in Wasser (500 μL) aufgenommen.

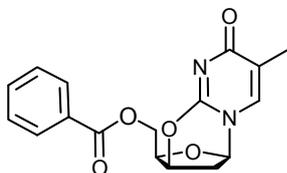
Synthese von 3'-Aminoprimer mit 5'-Phosphitamiden

Die Synthesen der 3'-Aminoprimer mit den käuflichen 3'-Aminotriethylphosphitamiden und dem synthetisierten 3'-Phthalimidophosphitamid wurden maschinell auf einem *Perseptive Biosystems 8909 Expedite* DNA-Syntheseautomaten der Firma *Applied Biosystems* (Foster City, USA,CA) in 1.0 μmol Maßstäben durchgeführt. Der mit dem 3'-Phthalimidophosphitamid synthetisierte Primer wurde durch Behandlung mit einer Mischung aus 40% Methylamin/konz.NH₄OH (1/1, v/v) bei 55 °C innerhalb von 16 Stunden abgespalten und entschützt. Die Aufreinigung per Sep-Pak Kartusche geschah nach folgendem Protokoll:

Konditionierung der festen Phase :	2 M CH ₃ CN	(2 mL)
Äquilibration der stationären Phase:	TEAA-Puffer	(4 mL)
Auftragung des 3'-Aminprimers:	gelöst in H ₂ O	
Eluierung des Produktes:	5, 7, 10, 13, 15, 20 % CH ₃ CN in 0.1 M TEAA-Puffer	(4 mL)

5.2. Synthese des 3'-Phthalimidothymidin-5'-phosphitamides

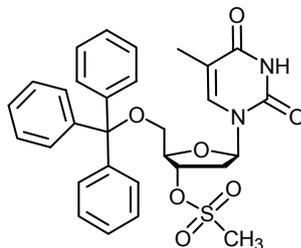
02,3'-Anhydro-5'-*O*-benzoylthymidin (14)



Zu einer Lösung von Thymidin (1 g, 4.1 mmol) und Triphenylphosphin (1.62 g, 6.2 mmol, 1.5 Äquiv.) in absolutem DMF (15 mL) wurde eine Mischung aus DIAD (1.2 mL, 6.2 mmol, 1.5 Äquiv.) und Benzoesäure (756 mg, 6.2 mmol, 1.5 Äquiv.) in DMF (4 mL), innerhalb von 15 Minuten, zutropft. Die resultierende orange Lösung wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 15 Minuten wurde eine Mischung aus DIAD (1.2 mL, 6.2 mmol, 1.5 Äquiv.) und Triphenylphosphin (1.62 g, 6.2 mmol, 1.5 Äquiv.) in DMF (4 mL) zugegeben und weiter bei Raumtemperatur gerührt. Nach zwei Stunden wurde die tiefrote Lösung in eisgekühlten Diethylether (100 mL) gegossen und die resultierende Aufschlämmung zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene weiße Feststoff wurde abgenutscht, fünfmal mit eiskaltem Diethylether (20 mL) gewaschen, und bis zur Gewichtskonstanz bei 0.1 Torr getrocknet. Die Titelverbindung **14** wurde mit einer Ausbeute von 1.02 g (3.1 mmol, 76%) erhalten.

Die spektroskopischen Daten entsprachen der Literatur.¹²³

3'-*O*-Mesyl-5'-*O*-tritylthymidin (16)

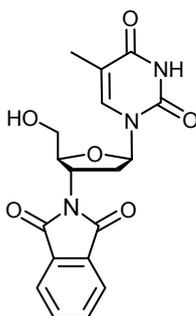


Thymidin (3 g, 12.3 mmol), Tritylchlorid (4.5 g, 16.1 mmol, 1.3 Äquiv.) und ein paar Kügelchen Molekularsieb wurden über Nacht bei 0.1 Torr getrocknet. Nach Zugabe von absolutem Pyridin (20 mL) wurde 40 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abkühlen

der Lösung auf 0 °C wurde Methansulfonsäurechlorid (3.3 mL, 42.6 mmol, 2.6 Äquiv.) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach erneutem Abkühlen auf 0 °C wurde Methanol (5 mL) zugegeben und 60 Minuten unter Kühlung gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abgezogen und der Rückstand in Dichlormethan (500 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 1%iger Zitronensäure (250 mL) und ges. NaCl-Lösung (250 mL) gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit Dichlormethan (200 mL) reextrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgezogen. Der Rückstand wurde durch Chromatographie an Kieselgel (aufgeschlämmt und eluiert mit CH₂Cl₂/MeOH 98/2, v/v) aufgereinigt und die Titelverbindung als leicht gelber Schaum mit einer Ausbeute von 5.4 g (9.5 mmol, 77%) erhalten.

Die spektroskopischen Daten entsprachen der Literatur.¹²⁴

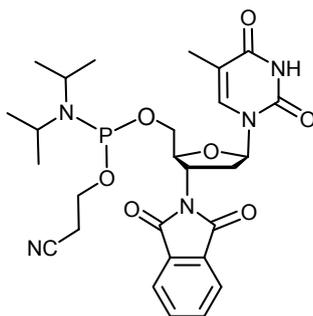
3'-Phthalimido-3'-Desoxythymidin (19)



Eine Aufschlammung von 3'-*O*-Mesyl-5'-*O*-tritylthymidin (**16**) (290 mg, 0.5 mmol) und Kaliumphthalimidat (283 mg, 1.5 mmol, 3 Äquiv.) in absolutem DMF (10 mL) wurde zum Rückfluss erhitzt. Nach 12 Stunden wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgezogen, der Rückstand mit Ethanol (4 mL) und konz. HCl (20 µL) versetzt und zwei Stunden refluxiert. Die erhaltene Lösung wurde mit NaOH neutralisiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde aus Methanol (3 mL) umkristallisiert und das ausgefallene Produkt abfiltriert, mit Diethylether (dreimal 5 mL) digeriert und bei 0.1 Torr zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Titelverbindung wurde als weißer Feststoff in 46 mg (0.12 mmol, 24%) Ausbeute erhalten.

Die spektroskopischen Daten entsprachen der Literatur.¹²⁵

3'-Phthalimido-3'-desoxythymidin-5'-O-(2-cyanoethyl)diisopropylphosphitamid (12t)

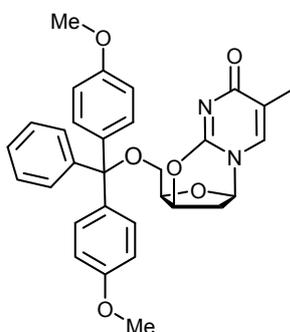


Zu einer Aufschlämmung von 3'-Phthalimido-3'-Desoxythymidin (**19**) (35 mg, 0.09 mmol) in absolutem Acetonitril (2 mL) und NEt_3 (45 μL , 0.27 mmol, 3 Äquiv.) wurde 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorphosphitamid (32 μL , 0.14 mmol, 1.5 Äquiv.) zugegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltene klare Lösung wurde zwischen Dichlormethan (10 mL) und gesättigter NaHCO_3 (10 mL) verteilt. Die organische Phase wurde mit NaHCO_3 (5 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und auf ein Volumen von einem Milliliter eingengt. Die verbliebene organische Phase wurde in Pentan (20 mL) gegeben und das Reaktionsgefäß über Nacht bei 4 °C gelagert. Dekantieren der überstehenden Lösung und Trocknen des Rückstandes bei 0.1 Torr bis zur Gewichtskonstanz ergab die Titelverbindung **12t** in 47 mg (0.08 mmol, 81%) Ausbeute als ein farbloses Glas.

R_f (Toluol/Aceton 2/1, v/v, 1% NEt_3) = 0.52. ^{31}P -NMR (ppm) ($\{^1\text{H}\}$) (101 MHz, CD_3CN) δ 150.3, 149.7. MS (MALDIT-TOF) 594 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

5.3. Synthese der DMT-geschützten 3'-Aminonukleoside

02,3'-Anhydro-5'-O-dimethoxytritylthymidin (28)

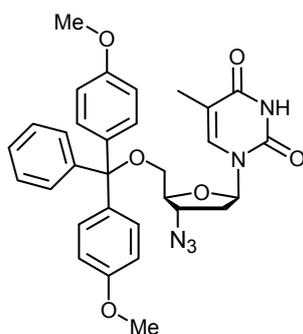


Zu einer Lösung von Thymidin (3g, 12.34 mmol) in absolutem Pyridin (20 mL) wurden ein paar Kügelchen Molekularsieb gegeben. Nach 15 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wurde DMT-Cl (3.3 g, 13.57 mmol, 1.05 Äquiv.) in 4 Portionen zugegeben und weiter bei

Raumtemperatur gerührt. Nach 40 Minuten wurde mit Eis/Wasser gekühlt, MeSO₂Cl (1.91 mL, 24.68 mmol, 2 Äquiv.) langsam zugetropft und die Lösung bei Raumtemperatur gerührt. Nach 16 Stunden wurde H₂O (dest., 500 µL) zugegeben und die leicht gelbe Lösung in Essigsäureethylester (500 mL) überführt. Die erhaltene organische Phase wurde mit ges. NaHCO₃-Lösung (zweimal 250 mL), H₂O (dest., 250 mL) und ges. NaCl-Lösung (250 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene gelbe Schaum wurde in absolutem Dichlormethan (100 mL) gelöst. Nach Zugabe von DBU (2.2 mL, 14.81 mmol, 1.2 Äquiv.) wurde die erhaltene tiefrote Lösung bei Raumtemperatur gerührt. Nach 16 Stunden wurde die Reaktionslösung mit Dichlormethan (400 mL) verdünnt. Die erhaltene organische Phase wurde mit H₂O (dest., zweimal 250 mL) und ges. NaCl-Lösung (250 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene gelbe Schaum wurde durch Chromatographie an Kieselgel (aufgeschlämmt mit CH₂Cl₂ (1% NEt₃), eluiert mit einem Gradienten von CH₂Cl₂ (1% NEt₃) bis CH₂Cl₂/MeOH (1% NEt₃) 97/5, v/v) aufgereinigt. Die Titelverbindung **28** konnte als ein leicht gelber Schaum in 5.08 g (9.63 mmol, 78%) Ausbeute erhalten werden.

Die Spektroskopischen Daten entsprachen der Literatur.¹²⁶

3'-Azido-5'-O-dimethoxytrityl-3'-desoxythymidin (**29**)



Protokoll 1:

Eine Aufschlammung von 2,3'-Anhydro-5'-O-dimethoxytritylthymidin (**28**) (520 mg, 0.984 mmol) und NaN₃ (191 mg, 2.95 mmol, 3 Äquiv.) in absolutem DMF (5 mL) wurde unter Schutzgasatmosphäre bei 120 °C gerührt. Nach 13 Stunden wurde die dunkelbraune Aufschlammung in Essigsäureethylester (150 mL) überführt. Die organische Phase wurde mit ges. NH₄Cl-Lösung (zweimal 75 mL), H₂O (zweimal 50 mL) und ges. NaCl-Lösung (75 mL)

gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene gelbe Schaum wurde durch Chromatographie an Kieselgel (aufgeschlämmt mit CH_2Cl_2 (1% NEt_3), eluiert mit einem Gradienten von CH_2Cl_2 (1% NEt_3) bis $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1% NEt_3) 97/3, v/v). Die Titelverbindung **29** wurde als ein leicht gelber Schaum in 420 mg (0.74 mmol, 75%) Ausbeute erhalten.

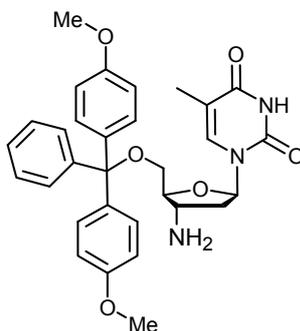
Die Spektroskopischen Daten entsprachen der Literatur.¹⁶

Protokoll 2:

Zu 3'-Azido-3'-desoxythymidin (**30**) (760 mg, 2.84 mmol) wurde Dichlormethan (10 mL) und DIEA (1.4 mL, 8.52 mmol, 3 Äquiv.) gegeben und die resultierende Aufschlämmung 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Zugabe von DMT-Cl (1 g, 2.95 mmol, 1.04 Äquiv.) wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 30 Minuten wurden 96 mg DMT-Cl (0.28 mmol, 0.1 Äquiv.) zugegeben und weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltene tiefrote Lösung wurde mit Dichlormethan (190 mL) verdünnt. Die leicht gelbe organische Phase wurde mit H_2O (zweimal 100 mL) und ges. NaCl -Lösung (100 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene gelbe Schaum wurde durch eine Filtriersäule mit Aluminiumoxid (neutral, aufgeschlämmt mit CH_2Cl_2 , eluiert mit CH_2Cl_2 und $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95/5, v/v) aufgereinigt. Die Titelverbindung **29** wurde als ein leicht gelber Schaum in 1.54 g (2.61 mmol, 92%) Ausbeute erhalten,

Die Spektroskopischen Daten entsprachen der Literatur.¹⁶

3'-Amino-5'-*O*-dimethoxytrityl-3'-desoxythymidin (**23**)

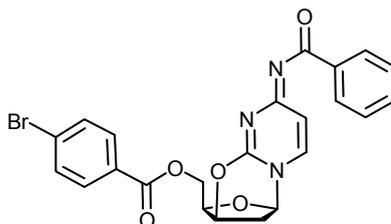


Zu einer Lösung von 3'-Azido-5'-*O*-dimethoxytrityl-3'-desoxythymidin (**29**) (300 mg 0.53 mmol) in Isopropanol (10 mL) wurde Natriumborhydrid (101 mg, 2.65 mmol, 5 Äquiv.) zugegeben und die Aufschlämmung unter Rückfluss erhitzt. Nach 13 Stunden wurde die Aufschlämmung in Chloroform (150 mL) gegossen. Die erhaltene organische Phase wurde

mit H₂O (dest., zweimal 75 mL) und ges. NaCl-Lösung (75 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Titelverbindung **23** konnte in einer Ausbeute von 275 mg (0.51 mmol, 96%) als ein farbloser Schaum erhalten werden.

Die spektroskopischen Daten entsprachen der Literatur.¹⁶

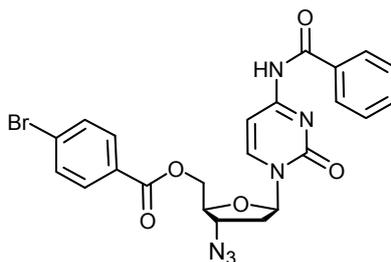
***O*2,3'-Anhydro-*N*4-Benzoyl-5'-*O*-(*p*-brombenzoyl)-2'-desoxycytidin (**39**)**



Zu einer Lösung von *N*4-Benzoyl-2'-desoxycytidin (2 g, 6.04 mmol), Triphenylphosphin (2.38 g, 9.06 mmol, 1.5 Äquiv.) und *para*-Brombenzoesäure (1.82 g, 9.06 mmol, 1.5 Äquiv.) in absolutem DMF (15 mL) wurde unter Kühlung in vier Portionen DIAD (1.76 mL, 9.06 mmol, 1.5 Äquiv.) zugegeben. Die resultierende leicht rote Lösung wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 30 Minuten wurde eine Mischung aus Triphenylphosphin (2.38 g, 9.06 mmol, 1.5 Äquiv.) und DIAD (1.76 mL, 9.06 mmol, 1.5 Äquiv.) in absolutem DMF (3 mL) zugegeben und weiter bei Raumtemperatur gerührt. Nach 30 Minuten konnte ein gelber Niederschlag beobachtet werden. Nach weiteren 90 Minuten wurde die tiefrote Lösung in eisgekühlten Diethylether (150 mL) gegossen und das Reaktionsgefäß 2 Stunden bei 4 °C aufbewahrt. Der resultierende Niederschlag wurde abgenutscht, mit kaltem Diethylether gewaschen und bis zur Gewichtskonstanz bei 0.1 Torr getrocknet. Die Titelverbindung **39** wurde als ein farbloses Pulver in 2.4 g (4.83 mmol, 80%) Ausbeute erhalten.

¹H-NMR (ppm) (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.95-7.92 (m, 2H, Ar-*H*), 7.83-7.80 (m, 2H, Ar-*H*), 7.75-7.71 (m, 2H, Ar-*H*), 7.66 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, *H*₆), 7.54-7.50 (m, 1H, Ar-*H*), 7.46-7.41 (m, 2H, Ar-*H*), 6.46 (d, *J* = 7.6, 1H, *H*₅), 6.00 (bd, *J* = 3.8, 1H, *H*_{1'}), 5.49-5.46 (m, 1H, *H*_{3'}), 4.63-4.58 (m, 2H, *H*_{5'} + *H*_{5''}), 4.46-4.40 (m, 1H, *H*_{4'}), 2.74-2.66 (m, 1H, *H*_{2''}), 2.60-2.54 (m, 1H, *H*_{2'}). ¹³C-NMR (ppm) (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 177.2, 164.6, 161.9, 152.8, 139.8, 136.5, 131.9, 131.5, 131.1, 128.8, 128.1, 128.0, 127.6, 105.7, 87.2, 81.8, 77.9, 62.3, 32.6. MS (FAB) 496.4 (M+H)⁺.

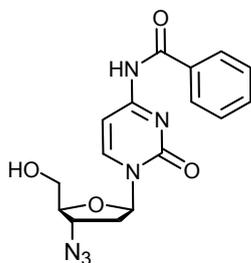
3'-Azido-N4-Benzoyl-5'-O-(*p*-brombenzoyl)-2',3'-dideoxycytidin (**42**)



Eine Aufschlammung von 2,3'-Anhydro-N4-Benzoyl-5'-O-(*p*-brombenzoyl)-2'-desoxycytidin (**39**) (2.2 g, 4.44 mmol) und NaN₃ (866 mg, 13.32 mmol, 3 Äquiv.) in absolutem DMF (15 mL) wurde bei 130 °C Ölbadtemperatur gerührt. Nach 2 Stunden wurde die braune Aufschlammung in ges. NH₄Cl-Lösung (100 mL) über-führt und der ausgefallene gelbe Niederschlag mit Essigsäureethylester (400 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit H₂O (200 mL) und ges. NaCl-Lösung (200 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene gelbe Rückstand wurde durch Chromatographie an Kieselgel (aufgeschlammmt und eluiert mit Hexan/EE (0.1% H₂O) 1/2, v/v) aufgereinigt. Die Titelverbindung **42** wurde als ein gelber Schaum in 1.6 g (2.98 mmol, 67%) Ausbeute erhalten.

R_f (Hexan/EE (0.1% H₂O)) = 0.34. ¹H-NMR (ppm) (250 MHz, CDCl₃) δ 7.98 (d, J = 7.6 Hz, 1H, *H*6), 7.85-7.76 (m, 4H, *Ar-H*), 7.59-7.34 (m, 6H, *Ar-H* + *H*5), 6.05 (t, J = 5.6 Hz, 1H, *H*1'), 4.60-4.55 (m, 2H, *H*4' + *H*3'), 4.27-4.12 (m, 2H, *H*5' + *H*5''), 2.81-2.68 (m, 1H, *H*2''), 2.48-2.36 (m, 1H, *H*2'). ¹³C-NMR (ppm) (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.3, 162.4, 143.7, 133.2, 132.8, 132.0, 131.0, 129.0, 127.9, 127.5, 87.6, 82.6, 63.6, 60.0, 38.7. MS (FAB) 514.5 (M+H)⁺.

3'-Azido-N4-benzoyl-2',3'-dideoxycytidin (**43**)

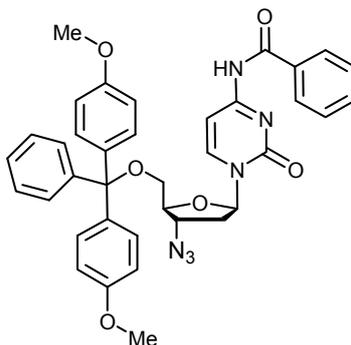


Zu einer Lösung von 3'-Azido-N4-Benzoyl-5'-O-(*para*-brombenzoyl)-2',3'-dideoxycytidin (**42**) (750 mg, 1.39 mmol) in THF (8 mL) wurde LiOH-Lösung (1M in Wasser, 5.5 mL, 5.5 mmol, 4 Äquiv.) zugegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 40 Minuten wurde die

Aufschlammung in Chloroform (200 mL) überführt. Die organische Phase wurde mit ges. NH_4Cl -Lösung (50 mL) und ges. NaCl -Lösung (50 mL) gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit Chloroform (50 mL) reextrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgezogen und der erhaltene Rückstand bei 0.1 Torr bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Titelverbindung **43** konnte als ein leicht gelbes Pulver in 459 mg (129 μmol , 93%) Ausbeute erhalten werden.

R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95/5) = 0.3. $^1\text{H-NMR}$ (ppm) (400 MHz, DMSO-d_6) δ 11.30 (s, 1H, N-H), 8.47 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H6), 8.09-8.05 (m, 1H, Ar-H), 7.71-7.66 (m, 1H, Ar-H), 7.60-7.55 (m, 2H, Ar-H), 7.43 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H5), 6.13 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H, H1'), 5.36 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H, OH), 4.44 (q, $J = 6.1$ Hz, 1H, H4'), 4.03-3.99 (m, 1H, H3'), 3.81-3.67 (m, 2H, H5' + H5''), 2.57-2.42 (m, 2H, H5' + H5''). $^{13}\text{C-NMR}$ (ppm) (100 MHz, DMSO-d_6) δ 167.2, 163.1, 154.3, 144.9, 133.0, 132.7, 128.4, 95.9, 85.9, 84.8, 60.3, 59.4, 37.6. MS (FAB) 357.3 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

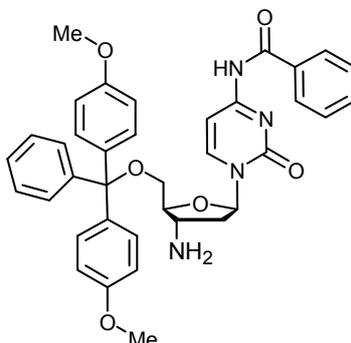
3'-Azido-N4-benzoyl-5'-O-dimethoxytrityl-2',3'-dideoxycytidin (**33**)



Zu 3'-Azido-N4-benzoyl-2',3'-dideoxycytidin (**43**) (300 mg, 0.85 μmol) in absolutem Pyridin (5 mL) wurden ein paar Kügelchen Molekularsieb gegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 30 Minuten wurde DMT-Cl (245 mg, 0.72 μmol , 1.3 Äquiv.) zugegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Nicht umgesetztes DMT-Cl wurde nach einer Stunde mit Methanol (500 μL) gequenchet. Die gelbe Lösung wurde in Essigsäureethylester (300 mL) überführt und die erhaltene organische Phase mit ges. NaHCO_3 -Lösung (150 mL), H_2O (dest., 150 mL) und ges. NaCl -Lösung (150 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na_2SO_4 wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene gelbe Rückstand wurde durch Chromatographie an Kieselgel (aufgeschlammte CH_2Cl_2 (1% NEt_3), eluiert mit CH_2Cl_2 und EE) aufgereinigt. Die Titelverbindung **33** konnte als ein leicht gelber Schaum in 476 mg (0.73 μmol , 86%) Ausbeute erhalten werden.

Die spektroskopischen Daten entsprachen der Literatur.¹⁰³

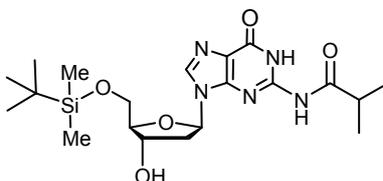
3'-Amino-*N*4-benzoyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2',3'-dideoxycytidin (**24**)



Zu einer Lösung von 3'-Azido-*N*4-benzoyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2',3'-dideoxycytidin (**33**) (300 mg, 0.46 mmol) in Ethanol (10 mL) wurde ges. NaHCO₃-Lösung (200 µL) gegeben und die leicht trübe Lösung unter eine Argonatmosphäre gesetzt. Nach der Zugabe von Palladium auf Aktivkohle (90 mg,) wurde in einer Wasserstoffatmosphäre gerührt. Die Wasserstoffatmosphäre wurde alle 2 Stunden ausgetauscht. Nach 8 Stunden wurde der Katalysator über Kieselgur abfiltriert und mit Ethanol (40 mL) gewaschen. Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck und Trocknen des erhaltenen Rückstandes bei 0.1 Torr über Nacht ergab die Titelverbindung **24** als einen leicht gelben Schaum in 269 mg (0.42 mmol, 93%) Ausbeute.

Die spektroskopischen Daten entsprachen der Literatur.¹⁶

5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-*N*2-isobutyryl-2'-desoxyguanosin (**78**)

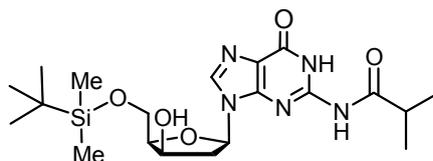


Zu über Nacht bei 0.1 Torr getrocknetem *N*2-isobutyryl-2',3'-dideoxyguanosin (1.5 g, 4.45 mmol) wurde absolutes Pyridin (12 mL) gegeben und die resultierende Aufschlämmung bei Raumtemperatur gerührt. Nach 30 Minuten wurde TBDMS-Cl (773 mg 4.89 mmol, 1.1 Äquiv.) als Feststoff zugegeben und die resultierende Lösung bei Raumtemperatur gerührt. Nach 16 Stunden wurde die gelbe Aufschlämmung in Essigsäureethylester (300 mL) überführt. Die organische Phase wurde mit H₂O (zweimal 150 mL) und ges. NaCl-Lösung (150 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem

Druck entfernt. Der erhaltene ölige Rückstand wurde mit Toluol (50 mL) coevaporiert und über Nacht bei 0.1 Torr getrocknet. Der erhaltene farblose Schaum wurde durch Chromatographie an Kieselgel (aufgeschlämmt und eluiert mit CH₂Cl₂/Methanol 9/1, v/v) gereinigt. Die Titelverbindung **78** wurde mit einer Ausbeute von 1.68 g (3.67 mmol, 84%) erhalten.

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9/1, v/v) = 0.31. ¹H-NMR (ppm) (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.13 (bs, 1H, H8), 6.19 (t, J = 6.6 Hz, 1H, H1'), 5.34 (d, J = 3.8 Hz, 1H, O-H), 4.37-4.31 (m, 1H, H3'), 3.85-3.81 (m, 1H, H4'), 3.70-3.64 (m, 2H, H5' + H5''), 2.74 (sept., J = 6.8 Hz, 1H, CH-CH₃, iBu), 2.59-2.51 (m, 1H, H2''), 2.35-2.25 (m, 1H, H2'), 1.10 (d, J = 6.8 Hz, 6H, CH-CH₃, iBu), 0.83 (s, 9H, Si-C-CH₃), 0.00 (s, 6H, Si-CH₃). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 180.0, 154.7, 148.2, 148.0, 137.0, 120.2, 87.1, 82.9, 70.0, 63.1, 34.7, 25.7, 18.8, 18.7, 17.9, -5.4, -5.5. MS (FAB) 452.3 (M+H)⁺.

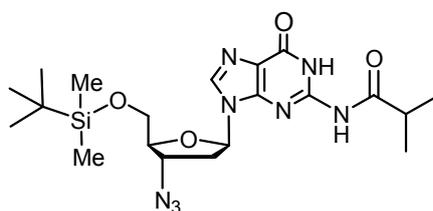
5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-*N*2-isobutyryl-2'-desoxyxyloguanosin (**79**)



Zu einer mit Eis/Wasser gekühlten Lösung von *N*2-isobutyryl-5'-*O*-*tert*-butyl-dimethylsilyl-2',3'-didesoxyxyloguanosin (**78**) (1.6 g, 3.55 mmol) in absolutem Dichlormethan (10 mL) wurden 11 mL einer 10%igen Lösung von Dess-Martin-Periodinan in Dichlormethan (5.32 mmol, 1.5 Äquiv) zugegeben. Nach 60 minütigem Rühren wurde das Eisbad entfernt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 3 Stunden wurde Isopropanol (10 mL) zugegeben und die resultierende Aufschlämmung auf – 60 °C gekühlt. Nach Zugabe von Natriumborhydrid (270 mg, 7.10 mmol, 2 Äquiv.) wurde die Aufschlämmung bei – 60 °C gerührt. Nach 13 Stunden wurde die Aufschlämmung langsam auf Raumtemperatur erwärmt und in Essigsäureethylester (300 mL) überführt. Die organische Phase wurde mit ges. NaHCO₃-Lösung (zweimal 150 mL), H₂O (150 mL) und ges. NaCl-Lösung (150 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgezogen. Der erhaltene gelbe Schaum wurde durch Chromatographie an Kieselgel (aufgeschlämmt und eluiert mit Dichlormethan/MeOH 93/7, v/v) aufgereinigt. Erhalten wurden 1.23 g (2.73 mmol, 77%) der Titelverbindung als ein farbloser Schaum.

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9/1, v/v) = 0.33. ¹H-NMR (ppm) (500 MHz, CDCl₃) δ 12.17 (b, 1H, N-H), 8.23 (bs, 1H, H8), 6.14 (dd, J = 1.9 Hz, J = 8.5 Hz, 1H, H1'), 4.99 (b, 1H, O-H), 4.61 (bs, 1H, H3'), 4.09-3.99 (m, 3H, H4' + H5' + H5''), 2.82 (sept. J = 6.9 Hz, 1H, CH-CH₃, iBu), 2.73-2.66 (m, 1H, H2''), 2.61-2.56 (m, 1H, H2'), 1.26-1.22 (m, 6H, CH-CH₃, iBu), 0.89 (s, 9H, Si-C-CH₃), 0.08 (s, 3H, Si-CH₃), 0.06 (s, 3H, Si-CH₃). ¹³C-NMR (ppm) (125 MHz, CDCl₃) 178.8, 154.8, 147.2, 146.9, 138.3, 119.3, 83.7, 82.1, 69.7, 61.3, 40.2, 35.0, 24.8, 18.0, 17.2, -6.3, -6.4. MS (FAB) 452.2 (M+H)⁺.

3'-Azido-5'-O-tert-butyltrimethylsilyl-N2-isobutyryl-2',3'-dideoxyguanosin (81)

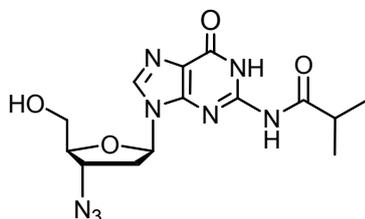


Zu einer Aufschlammung von N2-isobutyryl-5'-O-tert-butyltrimethylsilyl-2',3'-dideoxyguanosin (**79**) (580 mg, 1.28 mmol) und Natriumazid (250 mg, 3.84 mmol, 3 Äquiv.) in trockenem DMF (6 mL) wurde eine Mischung aus Pyridinyldiphenylphosphin (504 mg, 1.93 mmol, 1.5 Äquiv.) und DIAD (374 µL, 1.93 mmol, 1.5 Äquiv.) in absolutem DMF (1.5 mL) innerhalb von fünf Minuten zugegeben. Die erhaltene rötliche Aufschlammung wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 4 Stunden wurde H₂O (dest., 2 mL) zugegeben, die erhaltene klare Lösung in Essigsäureethylester (200 mL) überführt. Die organische Phase wurde mit H₂O (dest. zweimal 150 mL) und ges. NaCl-Lösung (100 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene braune Öl wurde über Nacht bei 0.1 Torr getrocknet und durch Chromatographie an Kieselgel (aufgeschlammte und eluiert mit CH₂Cl₂/EE 1/1.5, v/v, Substanz in Essigsäureethylester aufgetragen) aufgereinigt. Die Titelverbindung **81** wurde als ein leicht gelber Schaum in 522 mg (1.10 mmol, 86%) Ausbeute erhalten.

R_f (CH₂Cl₂/Methanol 9/1) = 0.49. ¹H-NMR (ppm) (400 MHz, CDCl₃) δ 12.31 (bs, 1H, N-H), 10.56 (bs, 1H, N-H), 7.96 (bs, 1H, H8), 6.03 (t, J = 6.0 Hz, 1H, H1'), 4.31 (q, J = 5.7 Hz, 1H, H3'), 3.97-3.93 (m, 1H, H4'), 3.84-3.72 (m, 2H, H5' + H5''), 2.89 (sept. J = 6.8 Hz, 1H, CH-CH₃), 2.62-2.54 (m, 1H, H2''), 2.42-2.34 (m, 1H, H2'), 1.20-1.15 (m, 6H, CH-CH₃, iBu), 0.81 (s, 9H, Si-C-CH₃), 0.01 (s, 3H, Si-CH₃), 0.00 (s, 3H, Si-CH₃). ¹³C-NMR (ppm) (125 MHz,

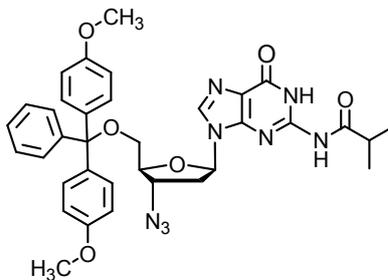
CDCl₃) δ 180.0, 155.9, 148.2, 148.1, 136.9, 120.9, 84.9, 83.8, 62.8, 60.2, 38.3, 36.0, 25.8, 19.0, 18.9, 18.3, -5.4, -5.5. MS (FAB) 477.1 (M+H)⁺.

3'-Azido-N2-isobutyryl-2',3'-dideoxyguanosin



Zu einer Lösung von 3'-Azido-5'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-N2-isobutyryl-2',3'-dideoxyguanosin (**81**) (200 mg, 0.42 mmol) in THF (2 mL) wurde TBAF (1M-Lösung in THF, 844 μ L, 0.844 mmol, 2 Äquiv.) zugegeben und die gelbe Lösung bei Raumtemperatur gerührt. Nach 2 Stunden wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der ölige Rückstand ohne weitere Aufarbeitung einer Chromatographie an Kieselgel (aufgeschlämmt und eluiert mit CH₂Cl₂/MeOH 9/1, v/v) unterzogen. Die Titelverbindung wurde als ein weißer Feststoff in 133 mg (0.37 mmol, 87%) Ausbeute erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmten mit den Literaturbekannten überein.⁵⁹

3'-Azido-5'-*O*-dimethoxytrityl-N2-isobutyryl-2',3'-dideoxyguanosin

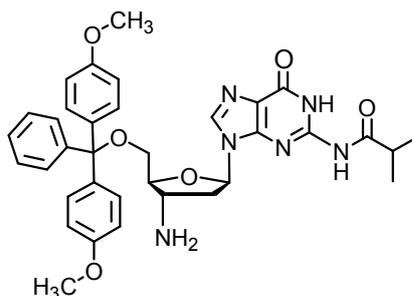


Über Nacht bei 0.1 Torr getrocknetes 3'-Azido-N2-isobutyryl-2',3'-dideoxy-guanosin (132 mg, 0.37 mmol) wurde in absolutem Pyridin (3 mL) gelöst. Nach der Zugabe von DMT-Cl (161 mg, 0.48 mmol, 1.3 Äquiv.) wurde die erhaltene Lösung bei Raumtemperatur gerührt. Nach 3 Stunden wurde Methanol (500 μ L) zugegeben und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die leicht gelbe Lösung wurde in Dichlormethan (100 mL) überführt und die resultierende organische Phase mit H₂O (dest., zweimal 50 mL) und ges. NaCl-Lösung (50 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das resultierende Öl wurde mit Toluol (30 mL) coevaporiert und der Rückstand über Nacht bei 0.1 Torr getrocknet. Der erhaltene farblose Schaum wurde

durch Chromatographie an Kieselgel (aufgeschlämmt mit CH_2Cl_2 (1% NEt_3), eluiert mit CH_2Cl_2 (1% NEt_3) und $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95/5 (1% NEt_3), v/v) aufgereinigt. Die Titelverbindung wurde in 191 mg (0.29 mmol, 79%) Ausbeute als ein farbloser Schaum erhalten.

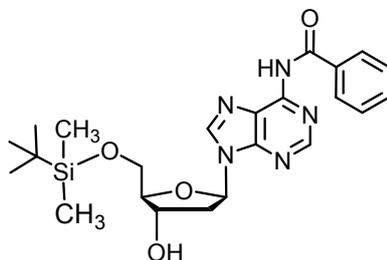
Die spektroskopischen Daten stimmten mit den Literaturbekannten überein.⁵⁹

3'-Amino-5'-*O*-dimethoxytrityl-*N*2-isobutyryl-2',3'-dideoxyguanosin (26)



Zu einer Lösung von 3'-Azido-*N*2-isobutyryl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2',3'-dideoxyguanosin (190 mg, 0.29 mmol) in Ethanol (5 mL) wurden 100 μL einer gesättigten NaHCO_3 -Lösung gegeben und die leicht trübe Lösung unter eine Argonatmosphäre gesetzt. Nach der Zugabe von Palladium auf Aktivkohle (60 mg.) wurde in einer Wasserstoffatmosphäre gerührt, wobei diese alle 60 Minuten ausgetauscht wurde. Nach 6 Stunden wurde der Katalysator über Celite ab filtriert und mit Ethanol (30 mL) gewaschen. Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck und trocknen des Rückstandes bei 0.1 Torr über Nacht ergab die Titelverbindung **26** als einen farblosen Schaum in 179 mg (0.27 mmol, 95%) Ausbeute. Die spektroskopischen Daten entsprachen der Literatur.¹⁶

*N*6-Benzoyl-5'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyadenosin (73)

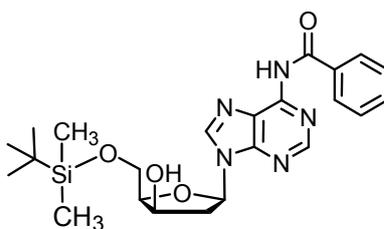


Zu über Nacht bei 0.1 Torr getrocknetem *N*6-Benzoyl-2'-desoxyadenosin (2.5 g, 7.04 mmol) wurden Pyridin (18 mL) und ein paar Kügelchen Molekularsieb gegeben und die resultierende Aufschlämmung bei Raumtemperatur gerührt. Nach 60 Minuten wurde TBDMS-Cl (1.5 g, 9.86 mmol, 1.4 Äquiv.) als Feststoff zugegeben und die Lösung bei Raumtemperatur gerührt.

Nach einer Stunde wurden nochmals TBDMS-Cl (530 mg, 3.53 mmol, 0.5 Äquiv.) zugegeben und die Aufschlammung weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nicht abreagiertes TBDMS-Cl wurde mit Methanol (1 mL) umgesetzt und die resultierende Lösung in Essigsäureethylester (500 mL) überführt. Die organische Phase wurde mit ges. NaHCO₃-Lösung (zweimal 200 mL), Wasser (zweimal 200 mL) und ges. NaCl-Lösung (200 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgezogen. Der leicht gelbe Rückstand wurde zweimal mit Toluol (50 mL) coevaporiert. Durch Chromatographie an Kieselgel (aufgeschlammmt und eluiert mit CH₂Cl₂/MeOH 93/7, v/v) konnte die Titelverbindung als farbloser Schaum mit einer Ausbeute von 2.91g (6.19 mmol, 88 %) erhalten werden.

Die spektroskopischen Daten stimmten mit den Literaturbekanntem überein.¹²⁷

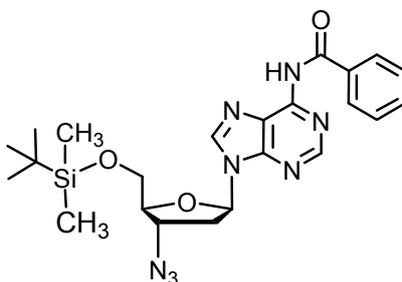
***N*6-Benzoyl-5'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyadenosin (74)**



Zu einer mit Eis/Wasser gekühlten 10%igen Lösung von Dess-Martin-Periodinan in Dichlormethan (24 mL, 11.56 mmol, 2.25 Äquiv.) wurde als Feststoff *N*6-Benzoyl-5'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-desoxyadenosin (**73**) (2.4 g, 5.13 mmol) zugegeben und 30 Minuten unter Eis/Wasser-Kühlung gerührt. Nach Entfernen des Kühlbades wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 90 Minuten wurde Isopropanol (25 mL) zugegeben und die resultierende Aufschlammung bei –60 °C gerührt. Nach einer Stunde wurde frisch gemörsertes Natriumborhydrid (607 mg, 10.26 mmol, 2 Äquiv.) zugegeben und weiter bei –60 °C gerührt. Nach 2 Stunden wurde Aceton (25 mL) zugegeben und die Aufschlammung 30 Minuten bei –60 °C gerührt. Nach langsamem Erwärmen auf Raumtemperatur wurde die Aufschlammung in Essigsäureethylester (500 mL) überführt. Die organische Phase wurde mit ges. NaHCO₃-Lösung (zweimal 200 mL), H₂O (zweimal 200 mL) und ges. NaCl-Lösung (200 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgezogen. Der erhaltene leicht gelbe Schaum wurde durch Chromatographie an Kieselgel (aufgeschlammmt und eluiert mit CH₂Cl₂/MeOH 95/5, v/v, Produkt in CH₂Cl₂/Methanol 9/1, v/v aufgetragen) aufgereinigt. Die Titelverbindung (**74**) wurde mit einer Ausbeute von 1.85 g (3.95 mmol, 77 %) erhalten.

R_f (CH₂Cl₂/MeOH 95/5) = 0.26. ¹H-NMR (ppm) (500 MHz, CDCl₃) δ 9.32 (b, 1H, N-H), 8.88 (s, 1H, H8), 8.35 (s, 1H, H2), 8.04 (d, J = 7.5 Hz, 2H, Ar-H), 7.62 (t, J = 7.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.53-7.50 (m, 2H, Ar-H), 6.32 (dd, J = 2.1 Hz, J = 9.1 Hz, 1H, H1'), 5.91 (d, J = 6.9 Hz, 1H, O-H), 4.58-4.53 (bs, 1H, H3'), 4.13-3.99 (m, 3H, H4' + H5' + H5''), 2.94-2.85 (m, 1H, H2''), 2.60-2.54 (m, 1H, H2'), 0.89 (s, 9 H, Si-CH-CH₃), 0.08 (s, 3H, Si-CH₃), 0.07 (s, 3H, Si-CH₃). ¹³C-NMR (ppm) (125 MHz, CDCl₃) δ 164.7, 152.0, 150.5, 149.9, 143.0, 133.5, 132.8, 128.8, 127.9, 123.7, 84.8, 84.2, 71.1, 62.1, 40.9, 25.8, 18.3, -5.3. MS (FAB) 495.1 (M+H)⁺.

3'-Azido-N6-benzoyl-5'-O-tert-butyltrimethylsilyl-2',3'-dideoxyadenosin (**82**)

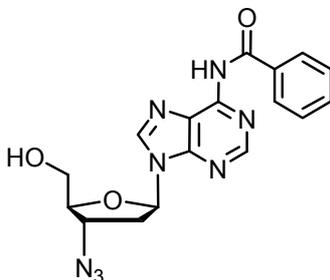


Zu einer Aufschlammung von N6-Benzoyl-5'-O-tert-butyltrimethylsilyl-2',3'-dideoxyadenosin (**74**) (710 mg, 1.50 mmol) und Natriumazid (293 mg, 4.52 mmol, 3 Äquiv.) in trockenem DMF (5 mL) wurde eine Lösung von Pyridinyldiphenylphosphin (590 mg, 2.26 mmol, 1.5 Äquiv.) und DIAD (438 µL, 2.26 mmol, 1.5 Äquiv.) in DMF (XX mL) innerhalb von 10 Minuten zugetropft. Die erhaltene tiefrote Aufschlammung wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 4 Stunden wurde H₂O (dest., 2 mL) zugegeben und wurde weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltene klare Lösung wurde in Essigsäureethylester (150 mL) überführt und die organische Phase mit Wasser (zwei mal 100 mL) und ges. NaCl (100 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene rötliche Schaum wurde durch Chromatographie an Kieselgel (aufgeschlammte und eluiert mit CH₂Cl₂/Essigsäureethylester 1.5/1, v/v, Substanz in Essigsäureethylester aufgetragen) aufgereinigt und die Titelverbindung **82** in 605 mg (1.22 mmol, 81%) Ausbeute erhalten.

R_f (CH₂Cl₂/Essigsäureethylester 1/1.5) = 0.4. ¹H-NMR (ppm) (400 MHz, CDCl₃) δ 8.76 (s, 1H, H8), 8.32 (s, 1H, H2), 8.02 (d, J = 7.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.59-7.55 (m, 1H, Ar-H), 7.50-7.46 (m, 2H, Ar-H), 6.43 (t, J = 6.0 Hz, 1H, H1'), 4.50 (q, J = 5.5 Hz, 1H, H3'), 4.08 (q, J = 3.9 Hz, 1H, H4'), 3.86-4.82 (m, 2H, H5' + H5''), 2.93-2.86 (m, 1H, H2''), 2.64-2.58 (m, 1H, H2'), 0.90 (s, 9 H, Si-CH-CH₃), 0.10 (s, 3H, Si-CH₃), 0.09 (s, 3H, Si-CH₃). ¹³C-NMR (ppm) (125 MHz,

CDCl₃) δ 164.9, 152.5, 151.1, 149.6, 141.4, 133.7, 132.7, 128.7, 127.9, 123.4, 85.0, 84.4, 62.7, 60.4, 38.0, 25.9, 18.4, -5.3, -5.4. MS (FAB) 495.1 (M+H)⁺.

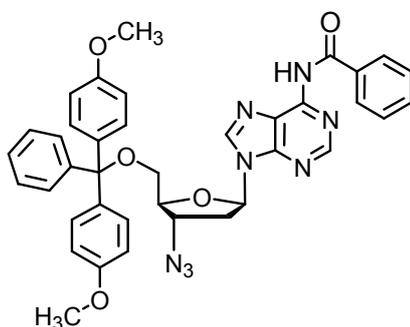
3'-Azido-N6-benzoyl-2',3'-dideoxyadenosin



Zu einer Lösung von 3'-Azido-N6-benzoyl-5'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2',3'-dideoxyadenosin **82** (200 mg, 0.41 mmol) in THF (2 mL) wurden 820 μ L TBAF-Lösung in THF (1M, 0.82 mmol, 2 Äquiv.) zugegeben und die erhaltene gelbe Lösung bei Raumtemperatur gerührt. Nach 90 Minuten wurde Methoxytrimethylsilan (120 μ L) zugegeben und weitere 60 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand direkt einer Chromatographie an Kieselgel (aufgeschlämmt und eluiert mit CH₂Cl₂/MeOH 95/5, v/v, Substanz in CH₂Cl₂/MeOH 9/1, v/v aufgetragen) unterzogen. Die Titelverbindung wurde mit einer Ausbeute von 142 mg (0.37 mmol, 92%) erhalten.

Die spektroskopischen Daten entsprachen den Literaturbekanntem.¹²⁸

3'-Azido-N6-benzoyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2',3'-dideoxyadenosin

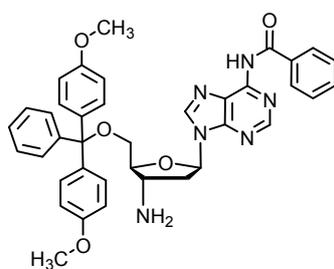


Über Nacht bei 0.1 Torr getrocknetes 3'-Azido-N6-benzoyl-5'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2',3'-dideoxyadenosin (140 mg, 0.37 mmol) wurde in absolutem Pyridin (2 mL) gelöst. Nach der Zugabe von DMT-Cl (162 mg, 0.48 mmol, 1.3 Äquiv.) wurde die erhaltene rötliche Lösung bei Raumtemperatur gerührt. Nach 4 Stunden wurde Methanol (500 μ L) zugegeben und

weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die leicht gelbe Lösung wurde in Dichlormethan (200 mL) überführt und die organische Phase mit H₂O (dest., zweimal 100 mL) und ges. NaCl-Lösung (50 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit Toluol (30 mL) coevaporiert und über Nacht bei 0.1 Torr getrocknet. Der erhaltene leicht gelbe Schaum wurde durch Chromatographie an Kieselgel (aufgeschlämmt mit CH₂Cl₂ (1% NEt₃), eluiert mit CH₂Cl₂ (1% NEt₃) und CH₂Cl₂/MeOH 95/5, v/v) aufgereinigt und die Titelverbindung in 241 mg (0.35 mmol, 96%) Ausbeute erhalten.

R_f(CH₂Cl₂/MeOH 95/5) = 0.6. ¹H-NMR (ppm) (400 MHz, CD₃CN) δ 8.58 (s, 1H, *H*8), 8.29 (s, 1H, *H*2), 8.00-7.94 (m, 2H, *Ar-H*), 7.59-7.55 (m, 1H, *Ar-H*), 7.48-7.43 (m, 2H, *Ar-H*), 7.36-7.35 (m, 2H, *Ar-H*), 7.28-7.15 (m, 7H, *Ar-H*), 6.82-6.76 (m, 4H, *Ar-H*), 6.39 (dd, *J* = 4.5, *J* = 4.7 Hz, 1H, *H*1'), 4.72 (q, *J* = 6.4 Hz, 1H, *H*3'), 4.10-4.06 (m, 1H, *H*4'), 3.72 (s, 6H, O-CH₃), 3.42-4.40 (m, 2, *H*5' + *H*5''), 3.15-3.08 (m, 1H, *H*2''), 2.63-2.54 (m, 1H, *H*2'). ¹³C-NMR (ppm) (125 MHz, CD₃CN) δ 166.0, 159.3, 159.3, 145.6, 143.3, 136.4, 136.3, 133.2, 130.6, 130.6, 129.2, 128.8, 128.6, 128.5, 127.5, 125.4, 118.1, 113.7, 86.9, 84.8, 84.3, 63.8, 61.3, 55.6, 36.8. MS (FAB) 683.4 (M+H)⁺.

3'-Amino-*N*6-benzoyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2',3'-dideoxyadenosin (25)



Zu einer Lösung von 3'-Azido-*N*6-benzoyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2',3'-dideoxyadenosin (300 mg, 0.30 mmol) in Ethanol (5 mL) wurden 100 µL ges. NaHCO₃-Lösung gegeben und die erhaltene leicht trübe Lösung unter eine Argonatmosphäre gesetzt. Nach der Zugabe von Palladium auf Aktivkohle (60 mg) wurde unter einer Wasserstoffatmosphäre gerührt, wobei die Wasserstoffatmosphäre alle 60 Minuten ausgetauscht wurde. Nach 7 Stunden wurde der Katalysator über Celite ab filtriert und mit Ethanol (30 mL) gewaschen. Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck und Trocknen des erhaltenen Rückstandes bei 0.1 Torr über Nacht ergab die Titelverbindung in 260 mg (0.40 mmol, 90%) Ausbeute als einen farblosen Schaum.

Die spektroskopischen Daten entsprachen den Literaturbekanntem.¹⁶

5.4. Synthesen der festen Phasen

Acylierung von Icaa-Cpg mit Hexafluoroglutarensäure

Vor der Durchführung der Acylierung wird das Cpg mit zweimal absolutem Toluol coevaporiert und über Nacht bei 0.1 Torr getrocknet. Unter einer Argonatmosphäre wird das Cpg mit soviel absolutem Dichlormethan versetzt, dass eine 0.5 Zentimeter überstehende Lösung erhalten wird. Nach der Zugabe von DIEA (12 Äquiv. bezogen auf die vom Hersteller angegebene Beladung) wird Hexafluoroglutaräureanhydrid (10 Äquiv.) zügig zugegeben und die Aufschlämmung geschüttelt. Nach 16 Stunden wird das Cpg über einen Glasfiltertiegel abgenutscht, mit 1% NEt_3 in DMF, Methanol und Dichlormethan gewaschen und bei 0.1 Torr getrocknet.

Beladung der festen Phasen mit den Aminonukleosiden

Das acylierte Cpg und das 3'-Aminonukleosid (3 Äquiv. bezogen auf die vom Hersteller angegebene Beladung) werden in einem 25 mL Rundkolben mit absolutem Toluol coevaporiert (zweimal 20 mL) und der erhaltene Rückstand über Nacht bei 0.1 Torr getrocknet. Unter einer Argonatmosphäre werden Triphenylphosphin (5 Äquiv.), absolutes DMF und DIEA (12 Äquiv.) zugegeben. Unter sanftem Schütteln wird anschließend eine Lösung von Iod (5 Äquiv.) in absolutem DMF portionsweise zugetropft und die erhaltene Aufschlämmung geschüttelt. Nach 16 Stunden wird die feste Phase über einen Glasfiltertiegel abgenutscht, mit 1% NEt_3 in DMF, Methanol und Dichlormethan gewaschen und über Nacht bei 0.1 Torr getrocknet.

3'-Amino-A-CPG (96a)

Die feste Phase wurde nach dem allgemeinen Protokoll beladen. Eingesetzt wurden hierzu CPG (1.4 g, 75 $\mu\text{mol/g}$ Beladung), 3'-Amino-N⁶-benzoyl-5'-O-dimethoxy-trityl-2',3'-didesoxyadenosin **25** (260 mg, 315 μmol , 3 Äquiv.), Triphenylphosphin (173 mg, 665 μmol , 5 Äquiv.), DIEA (217 μL , 1.5 mmol, 12 Äquiv.), Iod (169 mg, 665 μmol , 5 Äquiv.) und absolutes DMF (8 mL als Vorlage und 2 mL für die Iod-Lösung). Die Bestimmung der Beladungsdichte ergab eine Beladung von 18 $\mu\text{mol/g}$.

3'-Amino-C-CPG (96c)

Die feste Phase wurde nach dem allgemeinen Protokoll beladen. Eingesetzt wurden hierzu CPG (1.32 g, 95 $\mu\text{mol/g}$ Beladung), 3'-Amino-*N*4-benzoyl-5'-*O*-dimethoxy-trityl-2',3'-didesoxycytidin **24** (240 mg, 376 μmol , 3 Äquiv.), Triphenylphosphin (162 mg, 627 μmol , 5 Äquiv.), DIEA (207 μL , 1.5 mmol, 12 Äquiv.), Iod (156 mg, 626 μmol , 5 Äquiv.) und absolutes DMF (10 mL als Vorlage und 2 mL für die Iod-Lösung). Die Bestimmung der Beladungsdichte ergab eine Beladung von 24 $\mu\text{mol/g}$.

3'-Amino-G-CPG (96g)

Die feste Phase wurde nach dem allgemeinen Protokoll beladen. Eingesetzt wurden hierzu CPG (1.1 g, 75 $\mu\text{mol/g}$ Beladung), 3'-Amino-5'-*O*-dimethoxytrityl-*N*2-isobutyryl-2',3'-didesoxyguanosin **26** (164 mg, 247 μmol , 3 Äquiv.), Triphenyl-phosphin (125 mg, 413 μmol , 5 Äquiv.), DIEA (255 μL , 940 μmol , 12 Äquiv.), Iod (120 mg, 413 μmol , 5 Äquiv.) und absolutes DMF (8 mL als Vorlage und 2 mL für die Iod-Lösung). Die Bestimmung der Beladungsdichte ergab eine Beladung von 17 $\mu\text{mol/g}$.

3'-Amino-T-CPG (96t)

Die feste Phase wurde nach dem allgemeinen Protokoll beladen. Eingesetzt wurden hierzu CPG (1.3 g, 75 $\mu\text{mol/g}$ Beladung), 3'-Amino-3'-desoxythymidin **23** (160 mg, 293 μmol , 3 Äquiv.), Triphenylphosphin (128 mg, 488 μmol , 5 Äquiv.), DIEA (317 μL , 1.17 mmol, 12 Äquiv.), Iod (126 mg, 488 μmol , 5 Äquiv.) und absolutes DMF (10 mL als Vorlage und 2 mL für die Iod-Lösung). Die Bestimmung der Beladungsdichte ergab eine Beladung von **28** $\mu\text{mol/g}$

5.5. Synthese der 3'-Amino-2',3'-didesoxynukleotid-5'-monophosphate

Allgemeines Protokoll zur Hydrierung der Phosphorsäuretriester

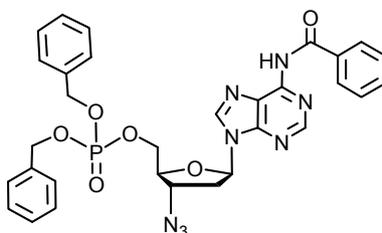
Der Phosphorsäuretriester wird in Ethanol, unter Zugabe von 100 μL NaHCO_3 pro 5 ml Lösungsmittel, mit Palladium auf Aktivkohle in einer Wasserstoffatmosphäre gerührt bis bei DC-Reaktionskontrollen ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9/1 v/v) keine migrierenden Substanzen mehr detektiert werden. Nach Zugabe der gleichen Menge H_2O (bidest.) wird solange in einer Wasserstoffatmosphäre weitergerührt, bis bei DC-Reaktionskontrollen nur ein Spot detektierbar ist. Der Katalysator wird über Kieselgur oder Celite ab filtriert und mit H_2O

(bidest.) gewaschen. Die erhaltenen Lösungen werden gefriergetrocknet und bis zur Gewichtskonstanz bei 0.1 Torr getrocknet.

Synthese des Phosphorylierungsreagenzes

Zu einer Lösung von Dibenzylphosphit (1.25 mL, 4.04 mmol) in absolutem Toluol (20 mL) wird N-Chlorsuccinimid (540 mg, 4.04 mmol, 1 Äquiv.) gegeben und die resultierende Lösung bei Raumtemperatur gerührt. Nach 2 Stunden wird das ausgefallene N-Hydroxysuccinimid unter einer Schutzgasatmosphäre ab filtriert und das Lösungsmittel in der Kälte unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene ölige Rückstand wird ohne weitere Aufarbeitung in den Phosphorylierungsreaktionen eingesetzt.

3'-Azido-N6-benzoyl-2',3'-dideoxyadenosin-5'-O-dibenzylphosphat (110a)

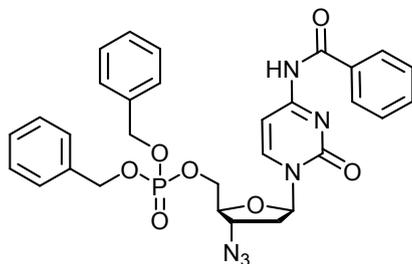


Vor der Umsetzung wurde 3'-Azido-N6-benzoyl-2',3'-dideoxyadenosin (150 mg, 0.42 mmol) zweimal mit absolutem Pyridin (5 mL) coevaporiert. Der ölige Rückstand wurde in absolutem Pyridin (5 mL) aufgenommen und die erhaltene Lösung auf $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Nach der Zugabe von Dibenzylphosphorsäurechlorid (400 μL , 1.89 mmol, 4.6 mmol) wurde bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Nach 6 Stunden wurde die erhaltene Aufschlämmung in Essigsäureethylester (200 mL) überführt. Die resultierende organische Phase wurde mit ges. NaHCO_3 -Lösung (zweimal 100 mL), H_2O (zweimal 100 mL) und ges. NaCl -Lösung (100 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene gelbe Öl wurde durch Chromatographie an Kieselgel (aufgeschlämmt und eluiert mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EE}$ 6/4, v/v) aufgereinigt. Die Titelverbindung **110a** wurde als ein gelbes Öl in 180 mg (0.41 mmol, 69%) Ausbeute erhalten.

$R_f(\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EE}$ 6/4) = 0.27. $^1\text{H-NMR}$ (ppm) (500 MHz, CDCl_3) δ 9.22 (b, 1H, N-H), 8.76 (s, 1H, H8), 8.20 (s, 1H, H2), 8.04 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, Ar-H), 7.64-7.59 (m, 1H, Ar-H), 7.55-7.51 (m, 2H, Ar-H), 7.36-7.32 (m, 10H, Ar-H), 6.37 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, H1'), 5.09-5.00 (m, 4, O- CH_2 -Ph), 4.39-4.35 (m, 1H, H3'), 4.27-4.07 (m, 3H, H4' + H5' + H5''), 2.92-2.87 (m, 1H, H2''), 2.56-2.60 (m, 1H, H2'). $^{13}\text{C-NMR}$ (ppm) (125MHz, CDCl_3) δ 164.7, 152.6, 151.2, 149.7, 141.5, 135.5, 135.4, 135.4, 135.4, 133.6, 132.8, 128.8, 128.8, 128.7, 128.6, 128.6,

128.1, 128.1, 127.9, 123.6, 82.8, 82.7, 69.7, 69.7, 69.7, 69.7, 66.2, 66.1, 60.7, 37.1. ^{31}P -NMR (ppm) ($\{^1\text{H}\}$) (101 MHz, D_2O) δ –0.04 ppm. MS (MALDI-TOF) m/z 641.4 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

3'-Azido-N4-benzoyl-2',3'-dideoxycytidin-5'-O-dibenzylphosphat (110c)

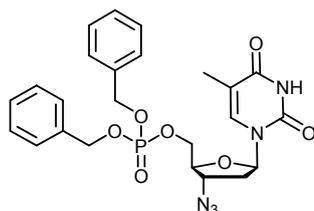


Vor der Umsetzung wurde 3'-Azido-N4-benzoyl-2',3'-dideoxycytidin (140 mg, 0.39 mmol) zwei mal mit absolutem Pyridin (4 mL) coevaporiert. Der ölige Rückstand wurde in absolutem Pyridin (4 mL) aufgenommen und die erhaltene Lösung auf –30 °C gekühlt. Nach der Zugabe von Dibenzylphosphorsäurechlorid (370 μL , 1,76 mmol, 4.6 Äquiv.) wurde bei –30 °C gerührt. Nach 6 Stunden wurde die erhaltene Aufschlämmung in Essigsäureethylester (200 mL) überführt. Die resultierende organische Phase mit 5%ger Zitronensäure (fünfmal 100 mL), H_2O (zweimal 100 mL) und ges. NaCl -Lösung (100 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene gelbe Öl wurde durch Chromatographie an Kieselgel (aufgeschlämmt und eluiert mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EE}$ 6/4 (0.1% H_2O), v/v) aufgereinigt. Die Titelverbindung **110c** wurde als gelbes Öl in 180 mg (0.41 mmol, 74%) Ausbeute erhalten.

R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95/5) = 0.38. ^1H -NMR (ppm) (500 MHz, CDCl_3) δ 8.74 (b, 1H, N-H), 8.04 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H6), 7.96-7.91 (m, 2H, Ar-H), 7.67-7.63 (m, 1H, Ar-H), 7.59-7.50 (m, 3H, Ar-H + H5), 7.43-7.35 (m, 10H, Ar-H), 6.13 (t, J = 6.0 Hz, 1H, H1'), 5.13-5.03 (m, 4, O- CH_2 -Ph), 4.26-4.11 (m, 2H, H5' + H5''), 4.02-3.99 (m, 1H, H4'), 3.97-3.92 (m, 1H, H3'), 2.67-2.61 (m, 1H, H2''), 2.20-2.14 (m, 1H, H2').

^{13}C -NMR (ppm) (125 MHz, CDCl_3) δ 135.4, 135.4, 135.4, 135.3, 133.2, 129.1, 128.9, 128.8, 128.8, 128.3, 128.2, 86.9, 82.9, 82.9, 70.0, 69.9, 69.9, 69.9, 65.7, 65.7, 59.3, 38.6. ^{31}P -NMR (ppm) ($\{^1\text{H}\}$) (101 MHz, D_2O) δ 0.35 ppm. MS (MALDI-TOF) 613 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

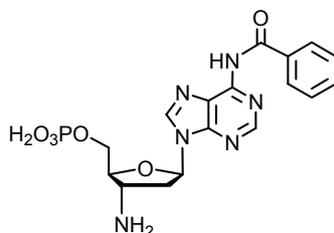
3'-Azido-3'-desoxythymidin-5'-*O*-dibenzylphosphat (**110t**)



Vor der Umsetzung wurde 3'-Azido-3'-desoxythymidin (120 mg, 0.52 mmol) zweimal mit absolutem Pyridin (3 mL) coevaporiert. Der ölige Rückstand wurde in absolutem Pyridin (3 mL) aufgenommen und die erhaltene Lösung auf $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Nach der Zugabe von Dibenzylphosphorsäurechlorid (480 μL , 2.37 mmol, 4.6 Äquiv.) wurde bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Nach 4 Stunden wurde die erhaltene Aufschlämmung in Essigsäureethylester (200 mL) überführt. Die resultierende organische Phase wurde mit ges. NaHCO_3 -Lösung (zwei mal 100 mL), H_2O (dest. zwei mal 100 mL) und ges. NaCl -Lösung (100 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene gelbe Öl wurde durch Chromatographie an Kieselgel (aufgeschlämmt und eluiert mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95/5, v/v) aufgereinigt. Die Titelverbindung **110t** wurde als ein gelbes Öl in 186 mg (0.41 mmol, 79%) Ausbeute erhalten.

R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95/5) = 0.31. $^1\text{H-NMR}$ (ppm) (500 MHz, CDCl_3) δ 9.10 (b, 1H, N-H), 7.42-7.36 (m, 11H, H6 + Ar-H), 6.15 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, H1'), 5.12-5.08 (m, 4, O- CH_2 -Ph), 4.30-4.18 (m, 3H, H3' + H5' + H5''), 4.02-3.98 (m, 1H, H4'), 2.39-2.25 (m, 2H, H2' + H2'') 1.79 (d, $J = 1.3$ Hz, 3H, CH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (ppm) (125MHz, CDCl_3) δ 163.5, 150.1, 135.7, 135.6, 135.4, 128.2, 127.6, 110.2, 84.1, 81.5, 81.4, 69.0, 69.0, 68.9, 68.9, 66.1, 66.1, 59.6, 36.1, 11.2. $^{31}\text{P-NMR}$ (ppm) ($\{^1\text{H}\}$) (101 MHz, D_2O) δ 0.46 ppm. MS (MALDI-TOF) = 538.3 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

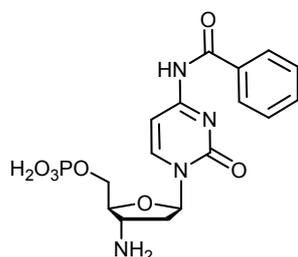
3'-Amino-*N*6-benzoyl-2',3'-didesoxyadenosin-5'-monophosphat (**100a**)



Der Phosphorsäuretriester **110a** (125 mg, 0.20 mmol) wurde nach dem allgemeinen Protokoll zur Entschützung durch katalytische Hydrierung umgesetzt. Die eingesetzten Lösungsmittel waren Ethanol (5 mL), ges. NaHCO_3 (100 μL) und H_2O (dest., 3 mL). Die Titelverbindung **100a** konnte in 66 mg (0.16 mmol, 81%) Ausbeute erhalten werden.

R_f (Isopropanol/Wasser/ NEt_3 7/2/1, v/v/v) = 0.07-0.1. $^1\text{H-NMR}$ (ppm) (600 MHz, D_2O) δ 8.65 (s, 1H, H_8), 8.58 (s, 1H, H_2), 7.86-7.83 (m, 2H, Ar- H), 7.57-7.53 (m, 1H, Ar- H), 7.45-7.42 (m, 2H, Ar- H), 6.50-6.48 (m, 1H, $H_{1'}$), 4.20-4.17 (m, 1H, $H_{4'}$), 4.95-3.88 (m, 2H, $H_{5'} + H_{5''}$), 4.20-4.17 (m, 1H, $H_{4'}$), 4.04-4.00 (m, 1H, $H_{3'}$), 2.88-2.83 (m, 1H, $H_{2''}$), 2.61-2.56 (m, 1H, H_2'). $^{13}\text{C-NMR}$ (ppm) (125 MHz, D_2O) δ 169.0, 151.7, 151.4, 148.9, 143.4, 133.3, 132.7, 128.7, 128.0, 123.8, 83.7, 63.5, 63.5, 50.9, 37.6. $^{31}\text{P-NMR}$ (ppm) ($\{^1\text{H}\}$) (101 MHz, D_2O) δ 4.65. MS (MALDI-TOF) 433.2 (M- H^-).

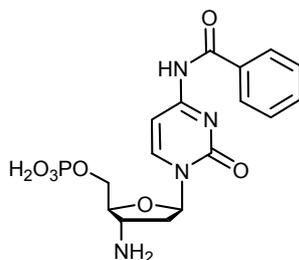
3'-Amino-*N*4-benzoyl-2',3'-didesoxycytidin-5'-monophosphat (**100c**)



Der Phosphorsäuretriester **110c** (170 mg, 0.27 mmol) wurde nach dem allgemeinen Protokoll zur Entschützung durch katalytische Hydrierung umgesetzt. Die eingesetzten Lösungsmittel waren Ethanol (5 mL), ges. NaHCO_3 (100 μL) und H_2O (dest., 3 mL). Die Titelverbindung **100c** konnte in 102 mg (0.22 mmol, 83%) Ausbeute erhalten werden.

R_f (Isopropanol/Wasser/ NEt_3 7/2/1, v/v/v) = 0.1-0.15. $^1\text{H-NMR}$ (ppm) (400 MHz, D_2O) δ 8.33 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H_6), 7.78-7.75 (m, 2H, Ar- H), 7.58-7.53 (m, 1H, Ar- H), 7.46-7.41 (m, 2H, Ar- H), 7.38 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H_5), 6.15 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H, $H_{1'}$), 4.38-4.4.34 (m, 1H, $H_{4'}$), 4.04-3.97 (m, 3H, $H_{3'} + H_5 + H_{5''}$), 2.72-2.52 (m, 1H, $H_{2''} + H_2'$). $^{13}\text{C-NMR}$ (ppm) (100 MHz, D_2O) 169.7, 163.2, 156.7, 145.7, 133.4, 132.6, 128.8, 128.7, 127.9, 127.3, 98.5, 86.9, 50.1, 36.4. $^{31}\text{P-NMR}$ (ppm) ($\{^1\text{H}\}$) (101 MHz, D_2O) δ 3.33 ppm. MS (MALDI-TOF) 409.2 (M- H^-).

3'-Amino-*N*4-benzoyl-2',3'-dideoxycytidin-5'-monophosphat (**100c**)

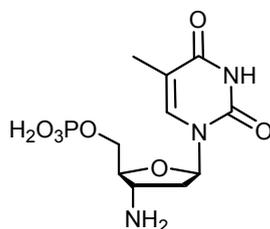


Der Phosphorsäuretriester **110c** (170 mg, 0.27 mmol) wurde nach dem allgemeinen Protokoll zur Entschützung durch katalytische Hydrierung umgesetzt. Die eingesetzten Lösungsmittel

waren Ethanol (5 mL), ges. NaHCO₃ (100 µL) und H₂O (dest., 3 mL). Die Titelverbindung **100c** konnte in 102 mg (0.22 mmol, 83%) Ausbeute erhalten werden.

R_f (Isopropanol/Wasser/NEt₃ 7/2/1, v/v/v) = 0.1-0.15. ¹H-NMR (ppm) (400 MHz, D₂O) δ 8.33 (d, J = 7.6 Hz, 1H, *H6*), 7.78-7.75 (m, 2H, *Ar-H*), 7.58-7.53 (m, 1H, *Ar-H*), 7.46-7.41 (m, 2H, *Ar-H*), 7.38 (d, J = 7.6 Hz, 1H, *H5*), 6.15, (t, J = 6.1 Hz, 1H, *H1'*), 4.38-4.4.34 (m, 1H, *H4'*), 4.04-3.97 (m, 3H, *H3' + H5 + H5''*), 2.72-2.52 (m, 1H, *H2'' + H2'*). ¹³C-NMR (ppm) (100 MHz, D₂O) 169.7, 163.2, 156.7, 145.7, 133.4, 132.6, 128.8, 128.7, 127.9, 127.3, 98.5, 86.9, 50.1, 36.4. ³¹P-NMR (ppm) ({ ¹H }) (101 MHz, D₂O) δ 3.33 ppm. MS (MALDI-TOF) 409.2 (M-H)⁻.

3'-Amino-3'-desoxythymidin-5'-monophosphat (**100t**)



Der Phosphorsäuretriester **110t** (93 mg, 0.18 mmol) wurde nach dem allgemeinen Protokoll zur Entschützung durch katalytische Hydrierung umgesetzt. Die eingesetzten Lösungsmittel waren Ethanol (5 mL), ges. NaHCO₃ (100 µL) und H₂O (dest., 3 mL). Die Titelverbindung **100t** konnte in 47 mg (0.14 mmol, 78%) Ausbeute erhalten werden.

R_f (Isopropanol/Wasser/NEt₃ 7/2/1, v/v/v) = 0.1-0.13. ¹H-NMR (ppm) (500 MHz, D₂O) δ 7.62 (s, 1H, *H6*), 6.20, (t, J = 6.6 Hz, 1H, *H1'*), 4.16-4.30 (m, 1H, *H4'*), 3.98-3.87 (m, 3H, *H3' + H5 + H5''*), 2.55-2.48 (m, 1H, *H2'*), 2.46-2.39 (m, 1H, *H2''*). ¹³C-NMR (ppm) (125 MHz, D₂O) δ 137.6, 84.7, 82.2, 82.2, 63.4, 63.4, 50.8, 35.6, 11.5. ³¹P-NMR (ppm) ({ ¹H }) (101 MHz, D₂O) δ 4.41 ppm. MS (MALDI-TOF) 320.3 (M-H)⁻.

5.6. Durchgeführte 3'-Aminoprimer und Oligonukleotidsynthesen

1 µ-molare Synthesen der 3'-Aminoprimer mit den festen Phasen 96a-t

Sequenz: 5'-CGCACGA*-3' (99a)

Ausbeute: 24 %; Aufreinigung: Sep-Pak Kartusche. MS (MALDI-TOF) [M-H]⁻: berechnet 2090.4 , gefunden 2087.9.

Sequenz: 5'-CGCACGC*-3' (99c)

Ausbeute: 15 %; Aufreinigung: Sep-Pak Kartusche. MS (MALDI-TOF) [M-H]⁻ : berechnet 2066.4 , gefunden 2063.1.

Sequenz: 5'-CGCACGG*-3' (99g)

Ausbeute: 21 %; Aufreinigung: Sep-Pak Kartusche. MS (MALDI-TOF)[M-H]⁻: berechnet 2106.4 , gefunden 2104.5

Sequenz: 5'-CGCACGT*-3' (99t)

Ausbeute: 20 %; Aufreinigung: Sep-Pak Kartusche. MS (MALDI-TOF) [M-H]⁻: berechnet 2080.4, gefunden 2079.0.

0.5µ-molare Synthesen der 3'-Aminoprimer mit den festen Phasen 160a-t und Synthese der Kontrolle

Sequenz: 5'-CGCACGA*-3' (99a)

Ausbeute: 37 %; Aufreinigung: Ionenaustauscher-HPLC. MS (MALDI-TOF)[M-H]⁻: berechnet 2090.4, gefunden 2088.0.

Sequenz: 5'-CGCACGC*-3' (99c)

Ausbeute: 47 %; Aufreinigung: Ionenaustauscher-HPLC. MS (MALDI-TOF)[M-H]⁻: berechnet 2066.4, gefunden 2064.1.

Sequenz: 5'-CGCACGG*-3' (99g)

Ausbeute: 43 %;Aufreinigung: Ionenaustauscher-HPLC. MS (MALDI-TOF) [M-H]⁻: berechnet 2106.4, gefunden 2105.2.

Sequenz: 5'-CGCACGT*-3' (99t)

Ausbeute: 33 %; Aufreinigung: Ionenaustauscher-HPLC. MS (MALDI-TOF) [M-H]⁻: berechnet 2080.6 , gefunden 2079.1.

Sequenz: 5'-CGCACGT-3' (Kontrolle)

Ausbeute: 50 %, Aufreinigung: Ionenaustauscher-HPLC. MS (MALDI-TOF) [M-H]⁻: berechnet 2081.6, gefunden 2082.2

Synthese der 3'-Aminoprimer mit 5'-Phosphitamiden

Sequenz: 5'-CGCACGA*-3' (99a)

Ausbeute: 25 %; Aufreinigung: HPLC. MS (MALDI-TOF) [M-H]⁻: berechnet 2090.4, gefunden 2089.7.

Sequenz: 5'-CGCACGC*-3' (99c)

Ausbeute: 16 %; Aufreinigung: HPLC. MS (MALDI-TOF) [M-H]⁻: berechnet 2066.4, gefunden 2067.5.

Sequenz: 5'-CGCACGG*-3' (99g)

Ausbeute: 12 %; Aufreinigung: HPLC. MS (MALDI-TOF) [M-H]⁻: berechnet 2106.4, gefunden 2105.7.

Sequenz: 5'-CGCACGT*-3' (99t)

Ausbeute: 34 %; Aufreinigung: HPLC. MS (MALDI-TOF) [M-H]⁻: berechnet 2081.4, gefunden 2080.6.

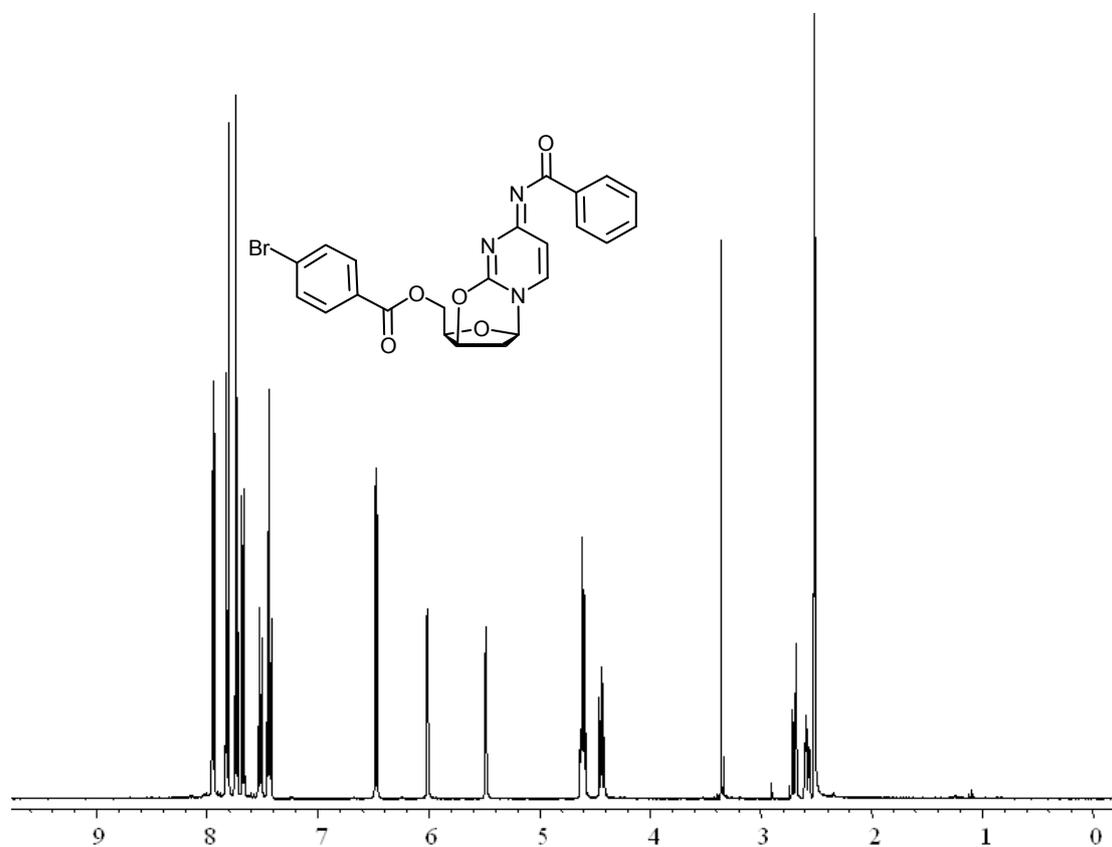
Synthese des 3'-Aminoprimer mit dem 3'-Phthalimidothymidin-5'-phosphitamid

Sequenz: 5'-CTGT*-3'

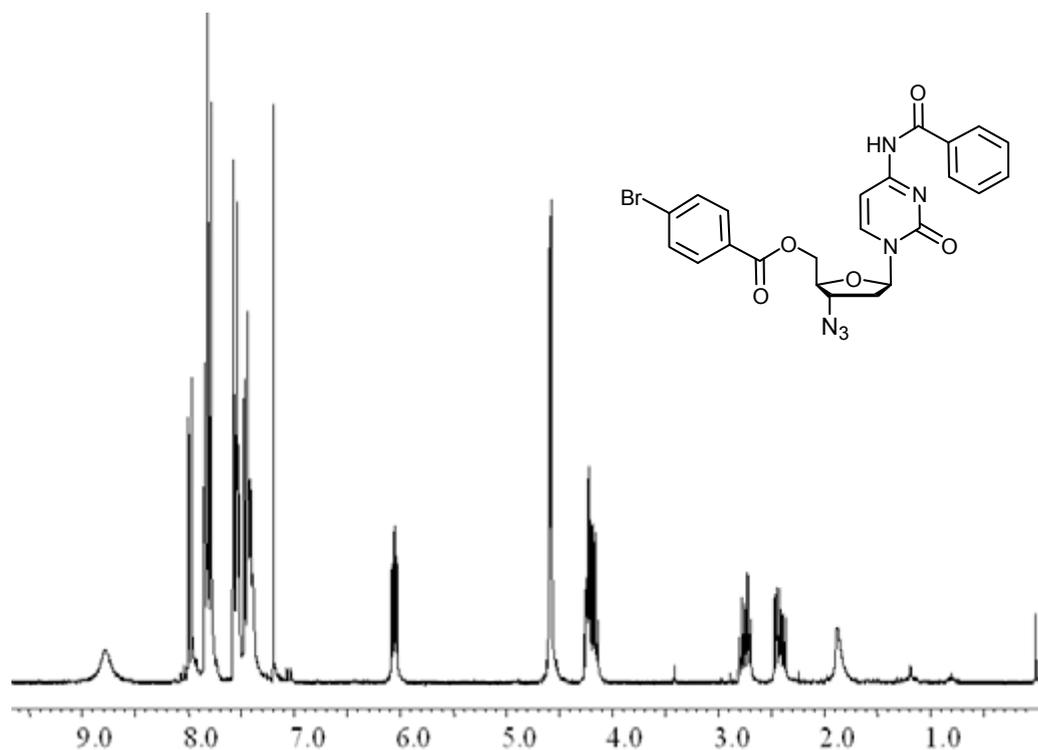
Ausbeute: 20% Aufreinigung Sep-Pak Kartusche. MS (MALDI-TOF) [M-H]⁻: berechnet 1162.8, gefunden 1161.4.

6. Anhang

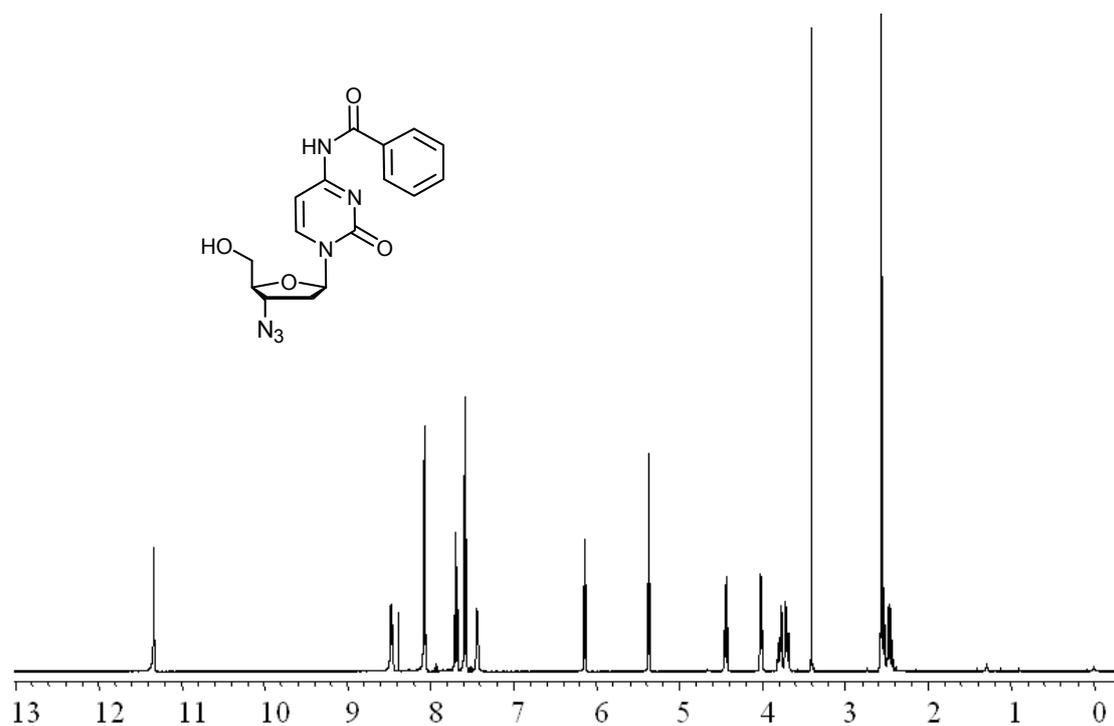
6.1. NMR-Spektren



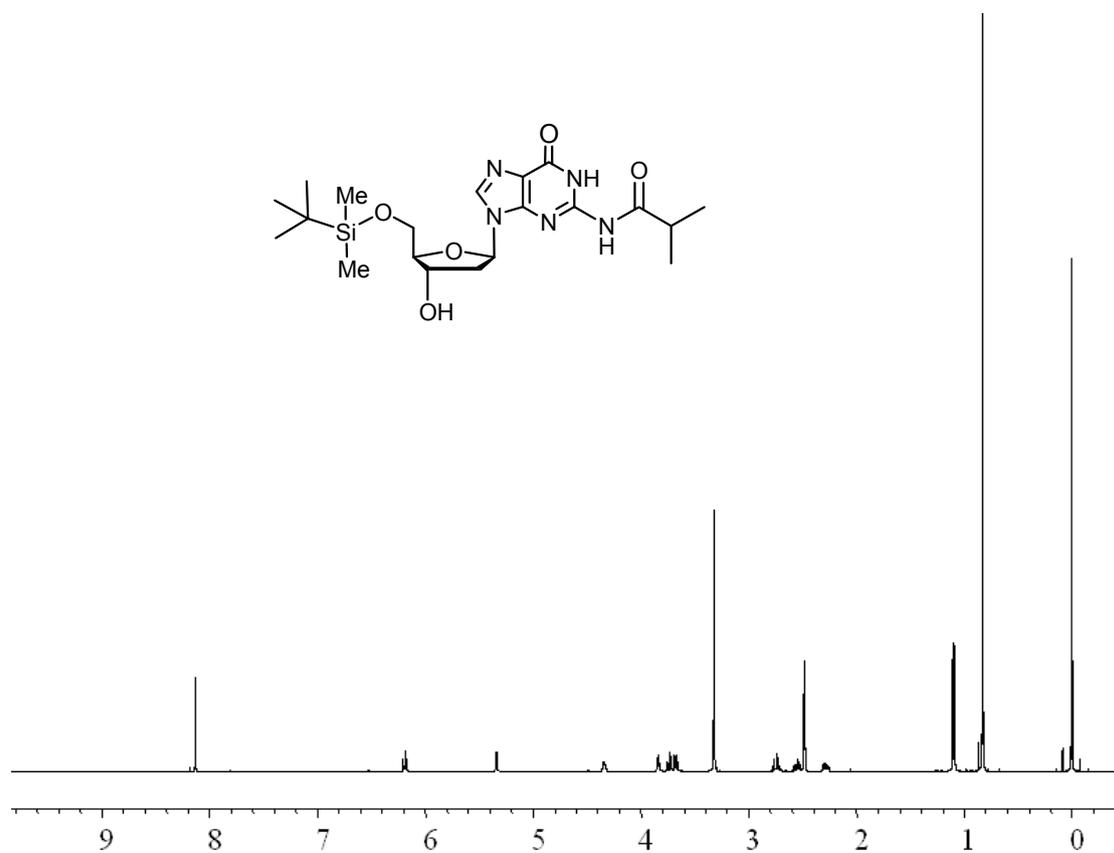
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆), *O*2,3'-Anhydro-*N*4-Benzoyl-5'-*O*-(*p*-brombenzoyl)-2'-desoxycytidin (**39**)



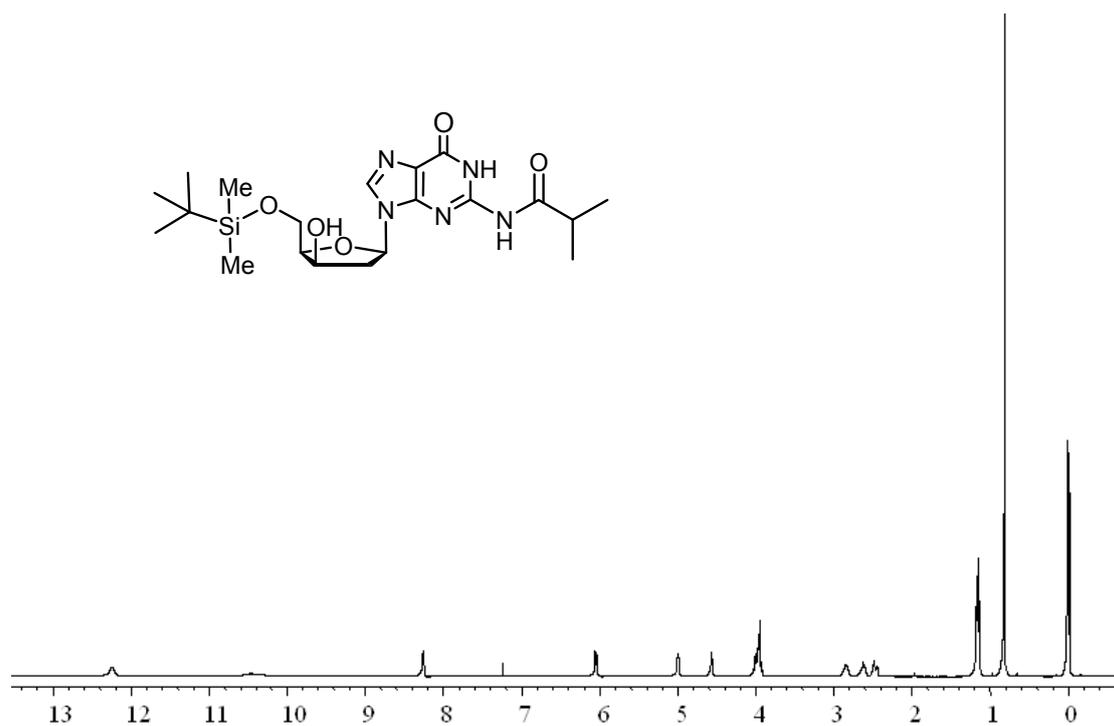
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃), 3'-Azido-*N*4-Benzoyl-5'-*O*-(*para*-brombenzoyl)-2',3'-didesoxycytidin (**42**)



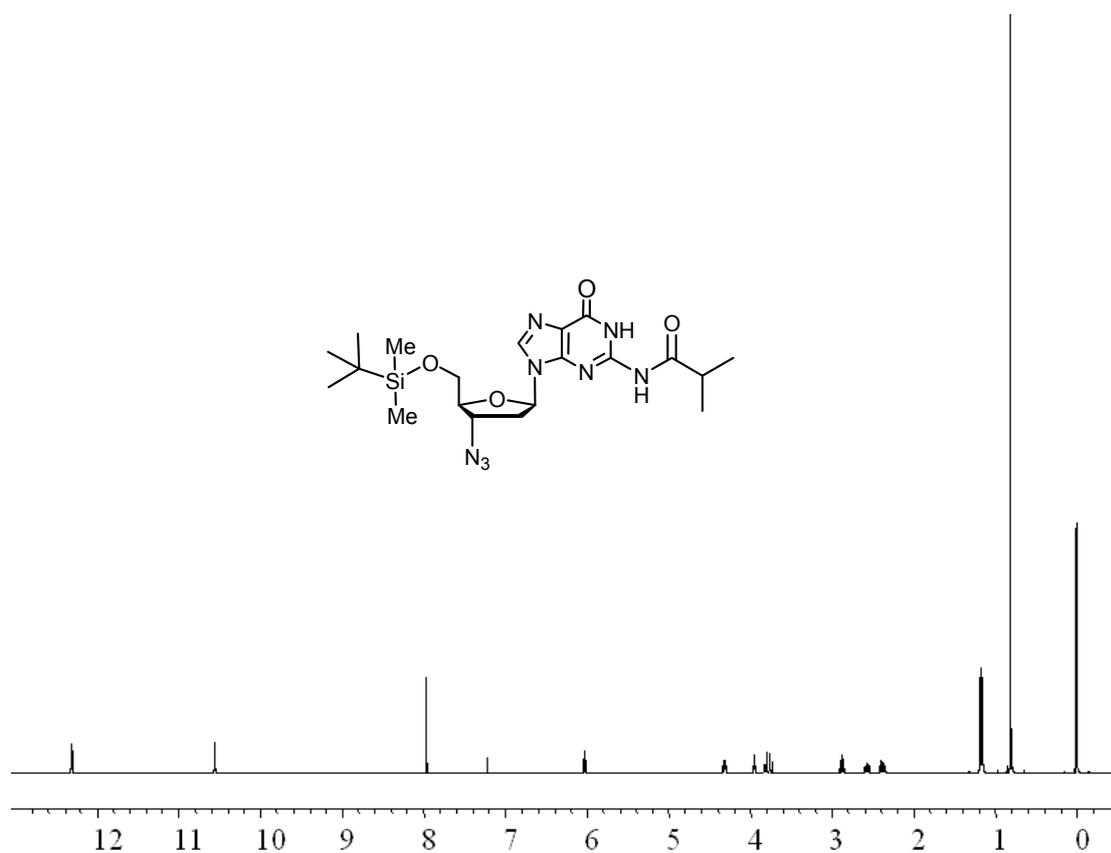
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆), 3'-Azido-N⁴-benzoyl-2',3'-dideoxycytidin (**43**)



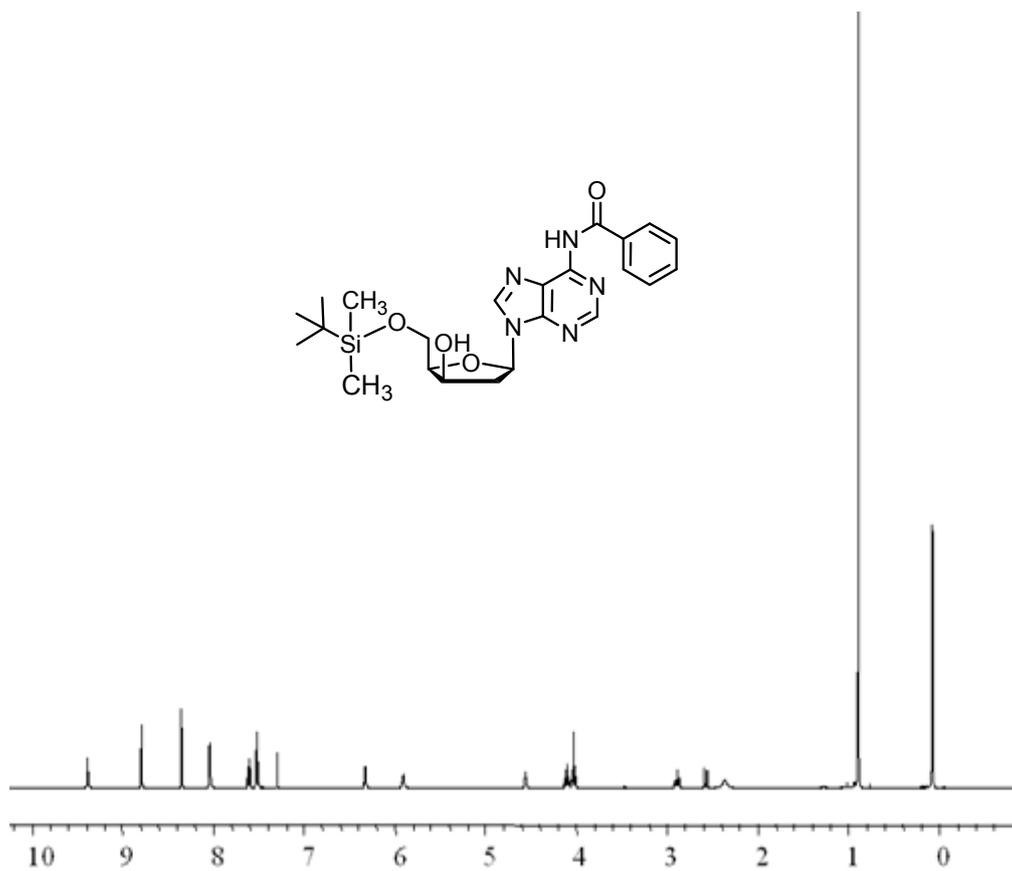
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆), -5'-O-tert-Butyldimethylsilyl-N²-isobutyryl-2'-desoxyguanosin (**78**)



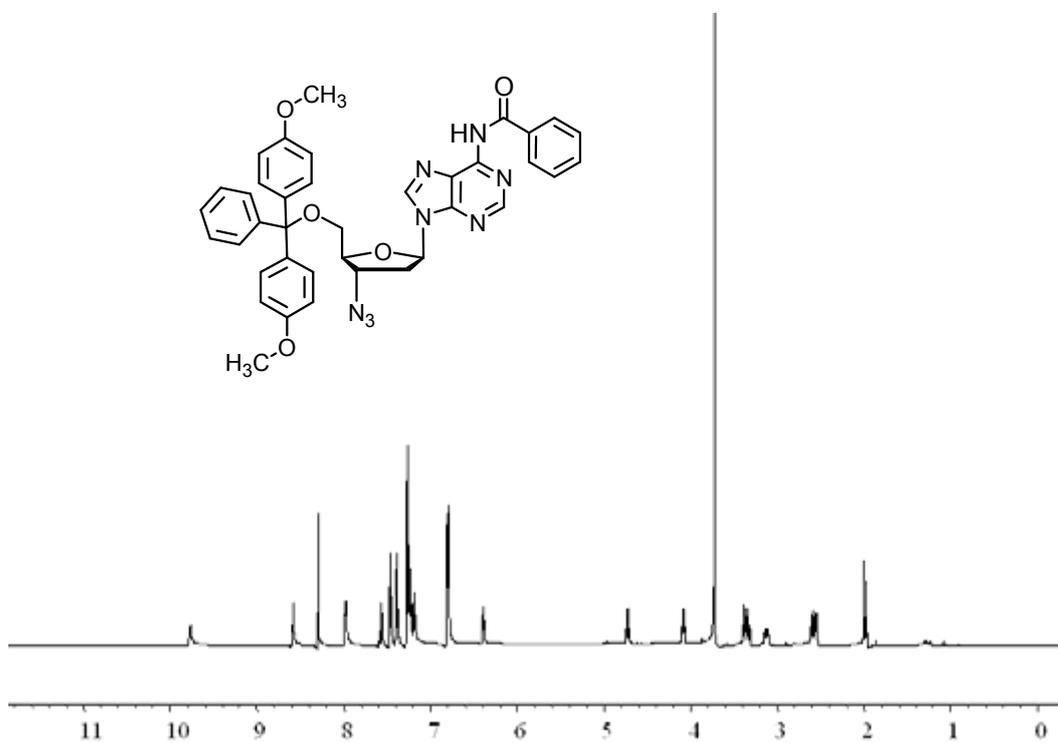
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃), 5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl- *N*²-isobutyryl-2'-dideoxyxyloguanosin (**79**)



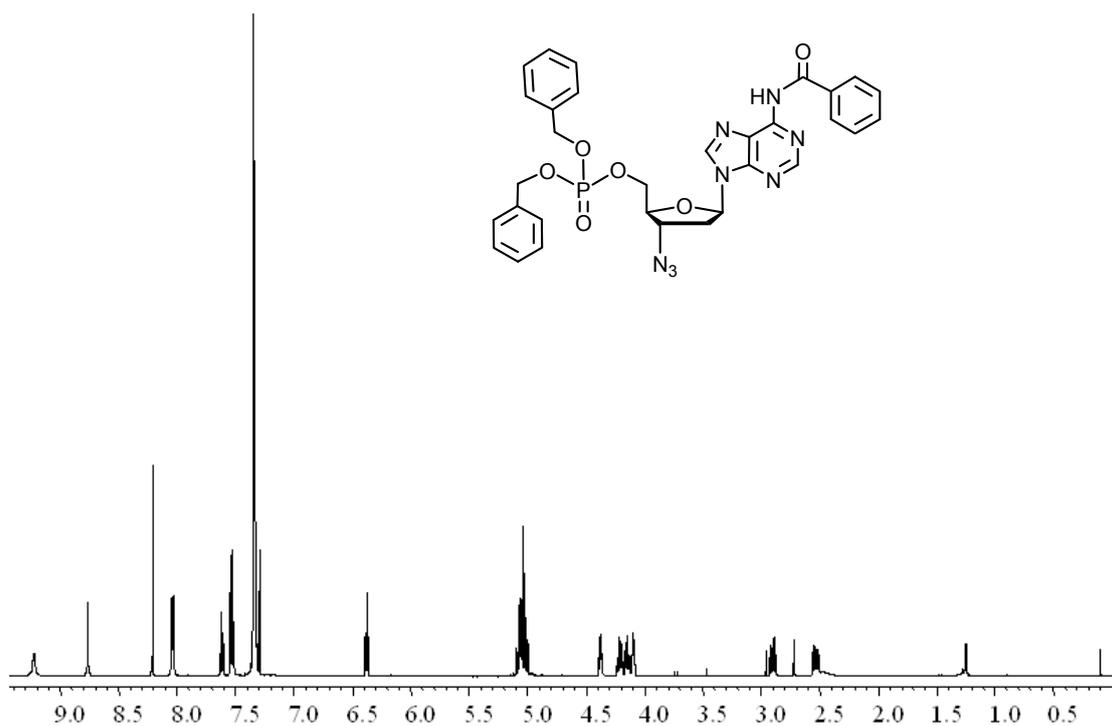
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), 3'-Azido-5'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-*N*²-isobutyryl-2',3'-dideoxy-guanosin (**81**)



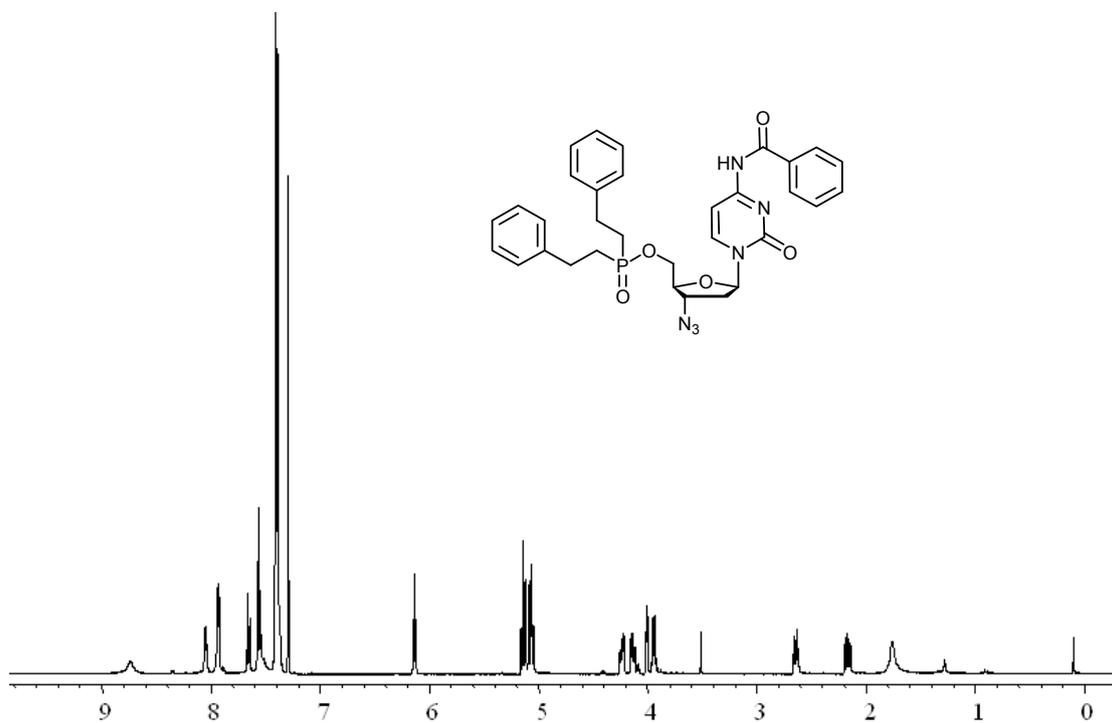
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) *N*6-Benzoyl-5'-*O*-*tert*-butyl dimethylsilyl-2'-dideoxyadenosin



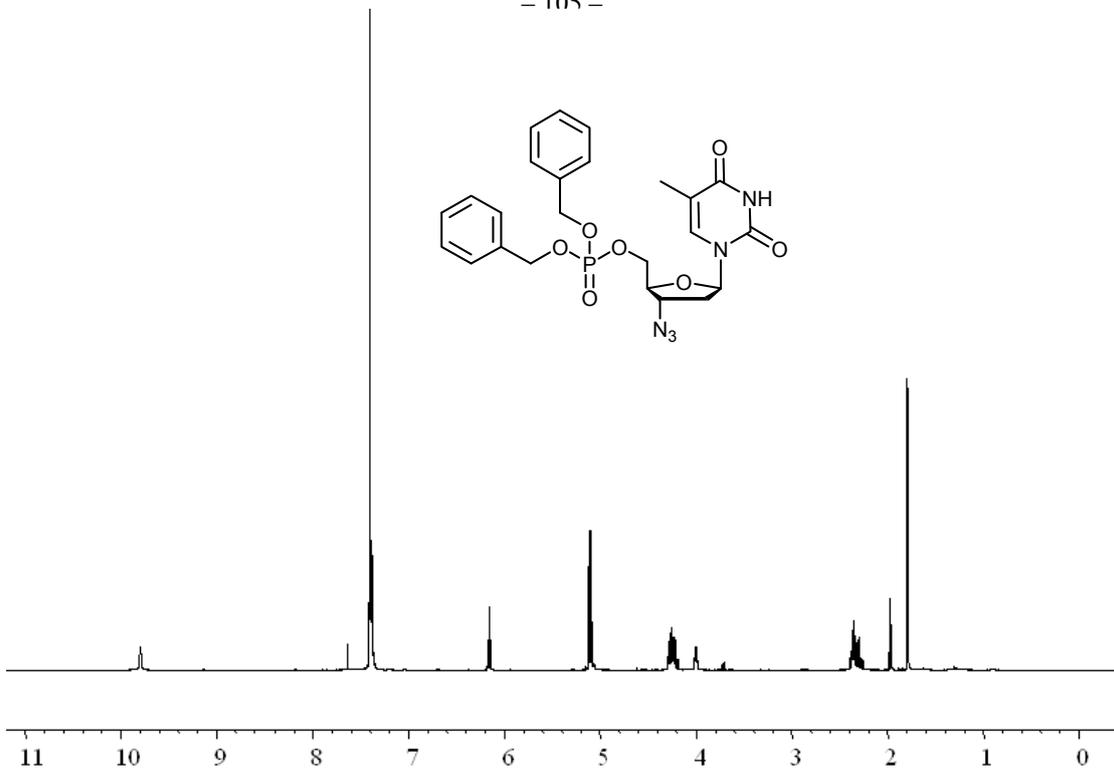
¹H-NMR (400 MHz, CD₃CN), 3'-Azido-*N*6-benzoyl-5'-*O*-dimethoxytrityl-2',3'-dideoxyadenosin



¹H-NMR(500 MHz, CDCl₃), 3'-Azido-*N*6-benzoyl-2',3'-dideoxyadenosin-5'-*O*-dibenzylphosphat (**110a**)

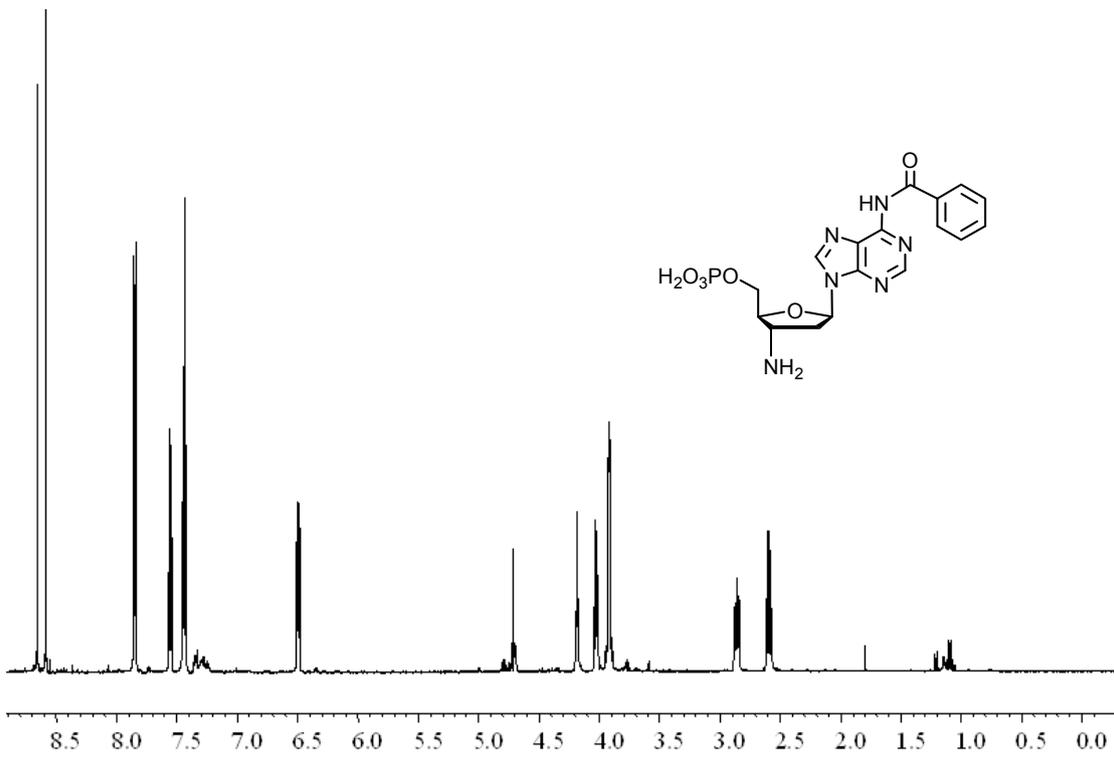


¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃), 3'-Azido-*N*4-benzoyl-2',3'-dideoxycytidin-5'-*O*-dibenzylphosphat (**110c**)

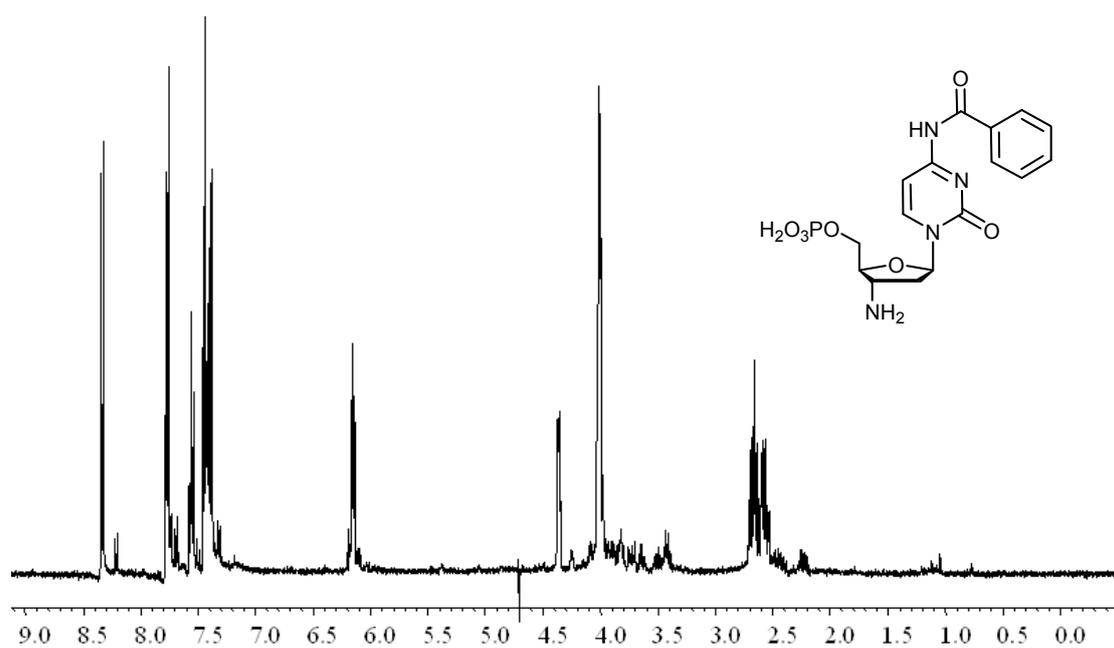


1

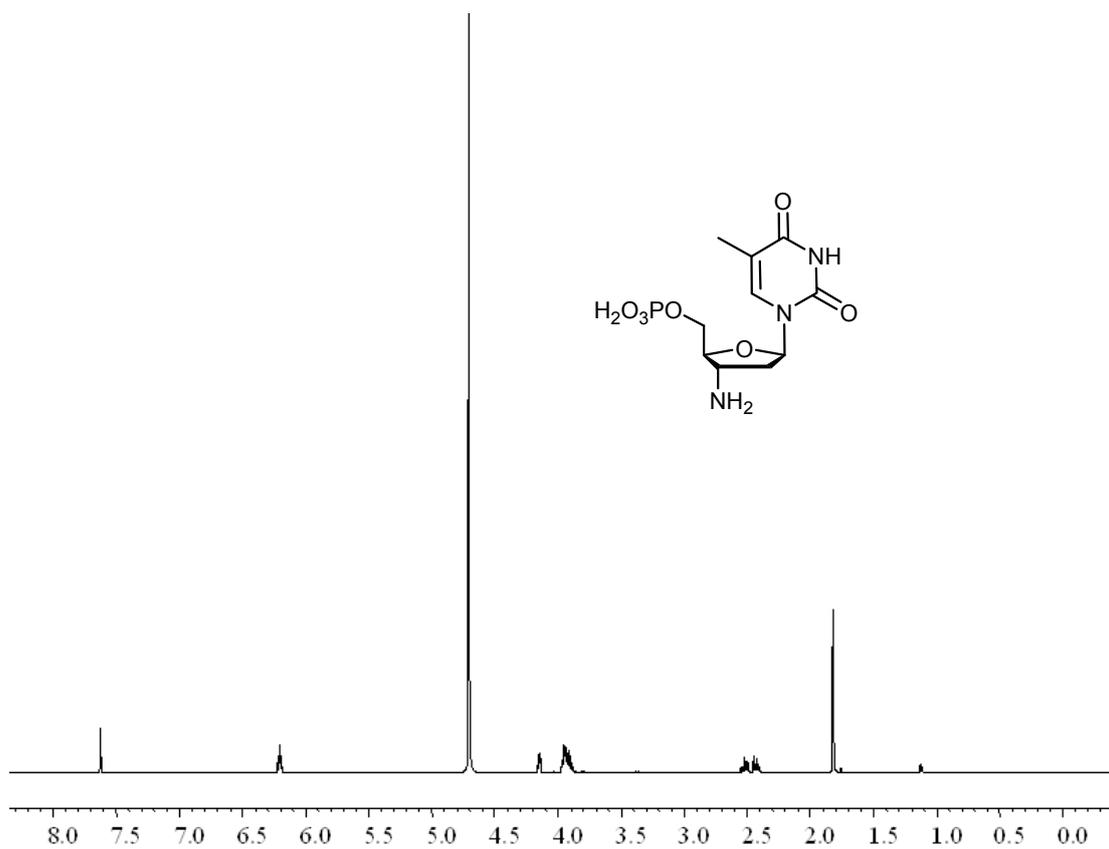
¹H-NMR (ppm) (500 MHz, CDCl₃), 3'-Azido -2',3'-dideoxythymidin-5'-O-dibenzylphosphat (**110t**)



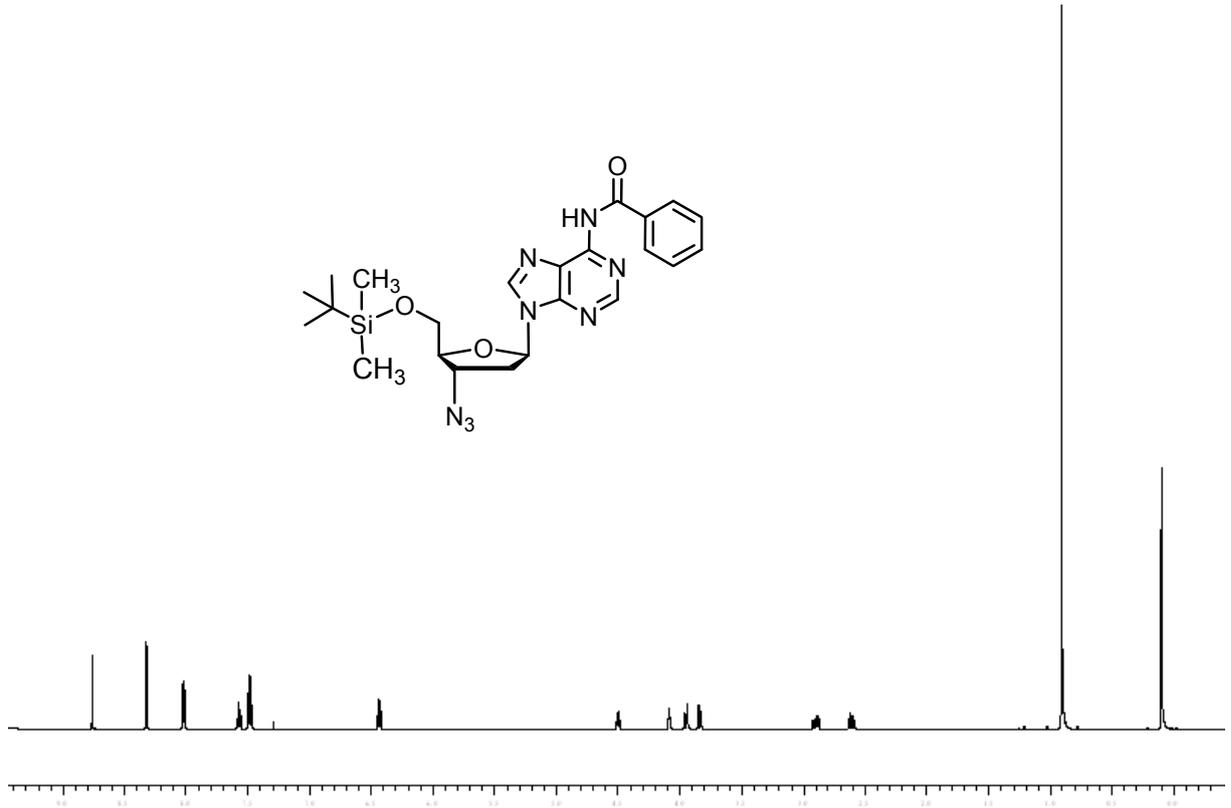
¹H-NMR (ppm) (600 MHz, D₂O), 3'-Amino-N6-benzoyl-2',3'-dideoxyadenosin-5'-monophosphat (**100a**)



¹H-NMR (ppm) (400 MHz, D₂O), 3'-Amino-N⁴-benzoyl-2',3'-dideoxycytidin-5'-monophosphat (**100c**)

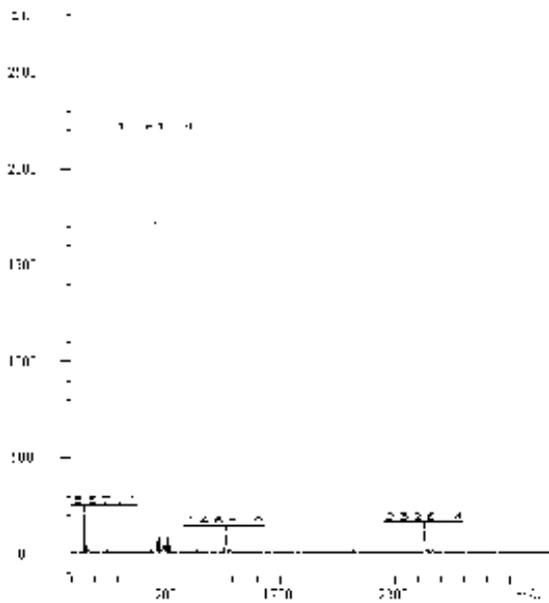


¹H-NMR (ppm) (500 MHz, D₂O), 3'-Amino-3'-desoxythymidin-5'-monophosphat (**100t**)

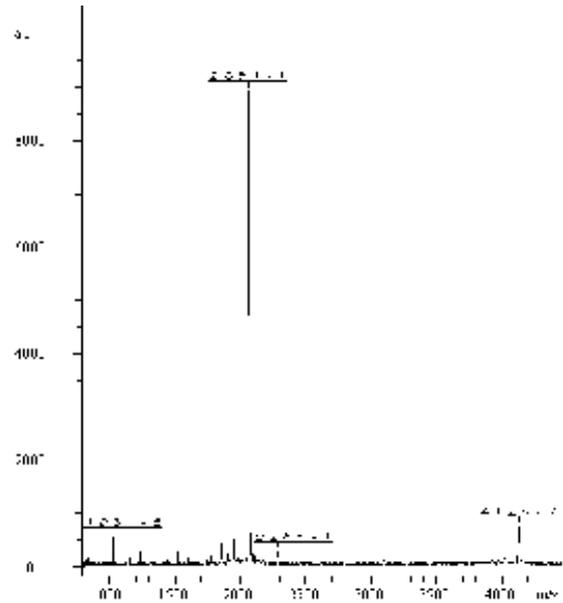


¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), 3'-Azido-N⁶-benzoyl-5'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-2',3'-dideoxyadenosin (**82**)

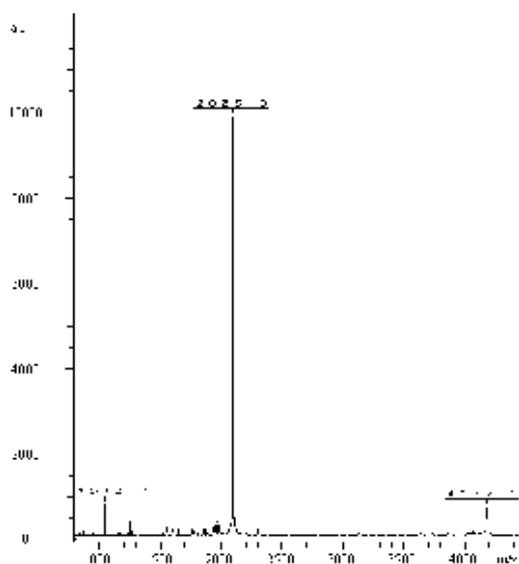
6.2. MALDI-TOF-MS Spektren



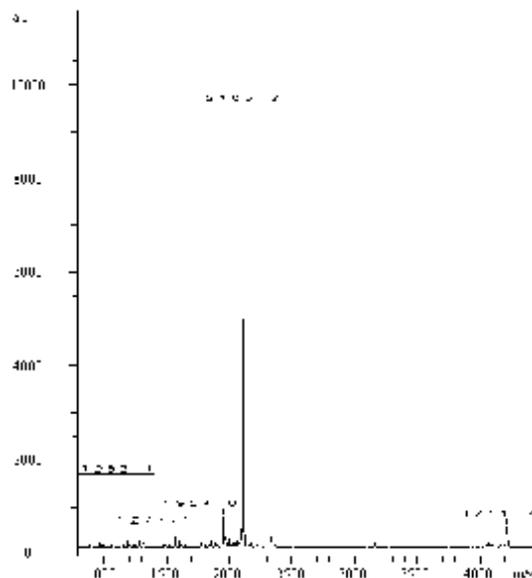
MALDI-TOF-MS Spektrum des Phthalimidoprimers



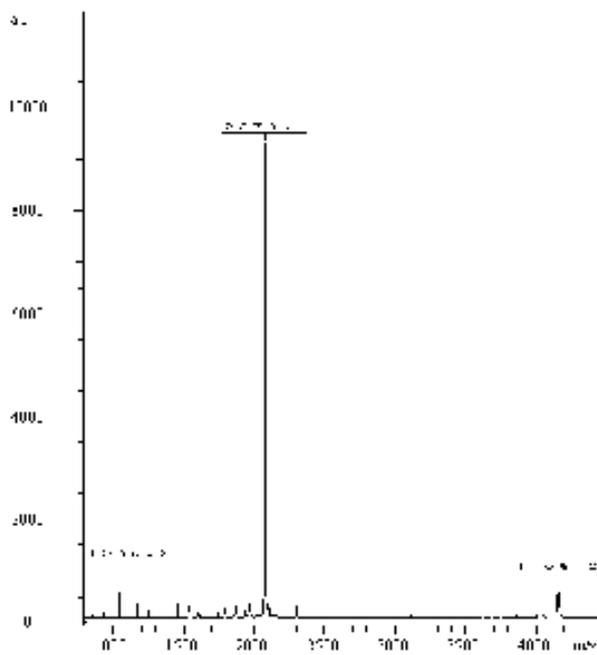
MALDI-TOF-MS Spektrum von Primer **99c**



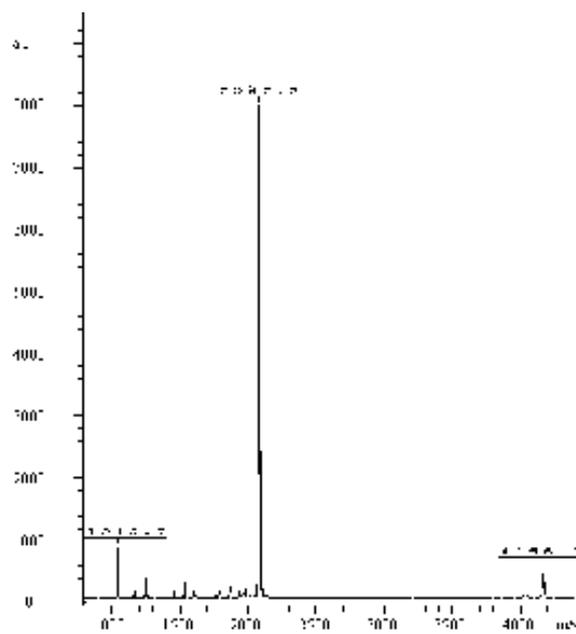
MALDI-TOF-MS Spektrum von Primer **99a**



MALDI-TOF-MS Spektrum von Primer **99g**



MALDI-TOF-MS Spektrum von **99t**



MALDI-TOF-MS Spektrum der Kontroll-
synthese (**Kontrolle**)

Literaturverzeichnis

- ¹ Horwitz, J. P.; Tomson, A. J.; Urbanski, J. A.; Chua, J. Nucleosides. I. *J. Org. Chem.* **1962**, *29*, 3045-3048.
- ² Horwitz, J. P.; Chua, J.; Noel, M. Nucleosides. V. *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 2076-2078.
- ³ Letsinger, R. L.; Wilkes, J. S.; Dumas, L. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 292-293.
- ⁴ Letsinger, R. L.; Wilkes, J. S. *Biochemistry* **1976**, *15*, 2810-2816.
- ⁵ <http://portal.isiknowledge.com/>
- ⁶ Schultz, R. G.; Gryaznov, S. M. *Nuc. Acids Res.* **1996**, *24*, 2966-2973.
- ⁷ Gryaznov, S. M.; Letsinger, R. L. *Nuc. Acids Res.* **1992**, *20*, 3403-3409.
- ⁸ Schultz, Ronald G.; Gryaznov, Sergei M. *Tet. Lett.* **2000**, *41*, 1895-1899.
- ⁹ Krug, A.; Oretskaya, T. S.; Volkov, E. M.; Cech, D.; Shabarova, Z. A.; Rosenthal, *Nucleosides Nucleotides* **1989**, *8*, 1473-1483.
- ¹⁰ Schultz, R. G.; Gryaznov, S. M. *Nucleic Acids Resesearch* **1996**, *24*, 2966-2973.
- ¹¹ Gryaznov, S.; Chen, J.-K. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3143-3144.
- ¹² Gryaznov, S. M.; Lloyd, D. H.; Chen, J.-K.; Schultz, R. G.; DeDinonizio, L.e A.; Ratmeyer, L.; Wilson, W. D. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 5798-5802.
- ¹³ Gryaznov, S.; Skorski, T.; Cucco, C.; Nieborowska-Skorska, M.; Chiu, C. Y.; Lloyd, D.; Chen, J.-K.; Koziolkiewicz, M.; Calabretta, B. *Nuc. Acids Res.* **1996**, *24*, 1508-1514.
- ¹⁴ Gryaznov, S. M. *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 899-905.
- ¹⁵ Pongracz, K.; Gryaznov, S. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7661-7664.
- ¹⁶ Chen, J. K.; Schultz, R. G.; Lloyd, D. H.; Gryaznov, S. M. *Nuc. Acids Res.* **1995**, *23*, 2661-2668.
- ¹⁷ Nelson, J. S.; Fearon, K. L.; Nguyen, M. Q.; McCurdy, S. N.; Frediani, J. E.; Foy, M.I F.; Hirschbein, B. L. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7278-7287.
- ¹⁸ Freier, S. M.; Altmann, K. H. *Nuc. Acids Res.* **1997**, *25*, 4429-4443.
- ¹⁹ Rajwanshi, V.K.; Hakansson, A.E.; Sorensen, M.D.; Pitsch, S.; Singh, S.K.; Kumar, R.; Nielsen, P.; Wengel, *J. Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 1656-1659.
- ²⁰ Larsen, H.J., Bentin T.; Nielsen; P.E. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1489*, 159-166
- ²¹ Iwai, S.; Koizumi, M.; Ikehara, M.; Ohtsuka, E. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 59-67.
- ²² Tanaka, T.; Sakata, T.; Fujimoto, K.; Ikehara, M. *Nuc. Acids Res.* **1987**, *15*, 6209-6024.
- ²³ Shchepinov, M.S., Denissenko, M.F., Smylie, K.J., Wörl, R.J., Leppin, A.L., Cantor, C.R., Rodi, C.P. *Nuc. Acids Res.* **2001**, *29*, 3864-3872.
- ²⁴ Wolfe, J.L., Kawate, T., Belenky, A., Stanton, V. *Nuc. Acids Res.* **2002**, *30*, 3739-3747.
- ²⁵ Mag M.; Engels J. W. *Nuc. Acids Res.* **1989**, *17*, 5973-5988.
- ²⁶ Bannwarth, W. *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 1517-1527.
- ²⁷ Rojas Stutz, J. A.; Richert, C. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 509-513.
- ²⁸ Lohrmann, R.; Orgel, L. E. *Nature* **1976**, *261*, 342-344.
- ²⁹ Zielinski, W. S.; Orgel, L. E. *Nuc. Acids Res.* **1987**, *15*, 1699-1715.

-
- ³⁰ Tohidi, M.; Zielinski W. S.; Chen, C. H.; Orgel, L. E. *Journal of molecular evolution* **1987**, *25*, 97-99.
- ³¹ Zielinski, W. S.; Orgel, L. E. *Nature* **1987**, *327*, 346-347.
- ³² Rojas Stuetz, J. A.; Richert, Clemens. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12718-12719.
- ³³ Doktorarbeit Jan Rojas-Stütz, Universität Karlsruhe (TH), 2004.
- ³⁴ Stuetz Rojas, J. A.; Kervio, E.; Deck, C.; Richert, C. *Chemistry & Biodiversity* **2007**, *4*, 784-802.
- ³⁵ Hagenbuch, P.; Kervio, E.; Hochgesand, A.; Plutowski, U.; Richert, C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 6588-6592.
- ³⁶ Griesang N.; Giessler K.; Lommel T.; Richert C. *Angewandte Chemie* **2006**, *45*, 6144-6148.
- ³⁷ Griesang, N.; Kervio, E.; Richert, C. *Synthesis* **2005**, 2327-2334.
- ³⁸ Vu H; Joyce N; Rieger M; Walker D; Goldknopf I; Hill T S; Jayaraman K; Mulvey D. *Bioconjugate chemistry* **1995**, *6*, 599-607.
- ³⁹ Kehler, J.; Henriksen, U.; Vejbjerg, H.; Dahl, O. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1998**, *6*, 315-322.
- ⁴⁰ Kimura, J.; Fujisawa, Y.; Yoshizawa, T.; Fukuda, K.; Mitsunobu, O. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1979**, *52*, 1191-1196.
- ⁴¹ Czernecki, S.; Valery, J. M. *Chem. Commun.* **1990**, *11*, 801-802.
- ⁴² Miller, N.; Fox, J. J. *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 1772-1776.
- ⁴³ Martin, S. J.; Eisenbarth, J. A.; Wagner-Utermann, U.; Mier, W.; Henze, M.; Pritzkow, H.; Haberkorn, U.; Eisenhut, M. *Nuclear Medicine and Biology* **2002**, *29*, 263-273.
- ⁴⁴ Reddy, M. P.; Hanna, N. B.; Farooqui, F. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4311-4314.
- ⁴⁵ Agyei-Aye, K.; Yan, S.; Hebbler, A. K.; Baker, D. C. *Nucleosides Nucleotides* **1989**, *8*, 327-337.
- ⁴⁶ Persönliche Mitteilung Siegfried Herzberger, 2005
- ⁴⁷ Czernecki, S.; Valery, J. M. *Synthesis* **1991**, 239-240.
- ⁴⁸ Celewicz, L.; Urjasz, W.; Golankiewicz, K. *Nucleosides Nucleotides* **1993**, *12*, 951-956.
- ⁴⁹ Kierzek, R. *Nucleosides Nucleotides* **1985**, *4*, 641-649.
- ⁵⁰ Sabbagh, G.; Fettes, K. J.; Gosain, R.; O'Neil, I. A.; Cosstick, R. *Nuc. Acids Res.* **2004**, *32*, 495-501.
- ⁵¹ Mikhailopulo, I. A.; Zaitseva, G. V.; Vaaks, E. V.; Rosemeyer, H.; Seela, F. *Nucleosides Nucleotides* **1992**, *11*, 273-238.
- ⁵² Czernecki, S.; Valery, J. M. *Chem. Commun.* **1990**, 801-802.
- ⁵³ Gomez-Vidal, J. A.; Forrester, M. T.; Silverman, R. B. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2477-2479.
- ⁵⁴ Gao, X.; Gaffney, B. L.; Hadden, S.; Jones, R. A. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 755-758.
- ⁵⁵ Persönliche Mitteilung Piet Herdewijn, 2005.
- ⁵⁶ Imazawa, M.; Eckstein, F. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 3044-3048.
- ⁵⁷ Hansske F.; Robins M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6736-6737.
- ⁵⁸ Robins, M. J.; Nowak, I.; Wnuk, S. F.; Hansske, F.; Madej, D. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 8216-8221.
- ⁵⁹ Timoshchuk, V. A.; Hogrefe, R. I.; Vaghefi, M. M. *Nucleosides, Nucleotides Nucl. Acids* **2004**, *23*, 171-181.
- ⁶⁰ Wagner, D.; Verheyden, J. P. H.; Moffatt, J.G. *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 24-30.
- ⁶¹ Herdewijn, P. A. M. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5050-5053.
- ⁶² Herdewijn, P.; Van Aerschot, A. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 855-858.
- ⁶³ Seela, F.; Woerner, K.; Rosemeyer, H. *Helv. Chim. Acta* **1994**, *77*, 883-896.
- ⁶⁴ Nishino, S.; Yamamoto, H.; Nagato, Y.; Ishido, Y. *Nucleosides Nucleotides* **1986**, *5*, 159-168.

-
- ⁶⁵ Robins, M. J.; Samano, V.; Johnson, M. D. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 410-412.
- ⁶⁶ Kim, B.-T.; Kim, Seung-Ki; L., Seung-Jae; H., K.-J. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2004**, *25*, 243-248.
- ⁶⁷ Pfitzner, K. E.; Moffatt, J. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 5661-70.
- ⁶⁸ Cook, A. F.; Moffatt, J. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 2697-2705.
- ⁶⁹ Hansske, F.; Robins, M. J. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 1589-1592.
- ⁷⁰ Dess, D. B.; Martin, J. C. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4155-4156.
- ⁷¹ Samano, V.; Robins, M. J. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5186-5188.
- ⁷² Kralikova, S.; Budesinsky, M.; Masojdkova, M.; Rosenberg, I. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2000**, *19*, 1159-1183.
- ⁷³ Hanessian, S.; Lavalley, P. *Can. J. Chem.* **1975**, *53*, 2975-2977.
- ⁷⁴ Zemlicka, J.; Chladek, S.; Holy, A.; Smrt, J. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1966**, *31*, 3198-3212.
- ⁷⁵ McBride, L. J.; Kierzek, R.; Beaucage, S. L.; Caruthers, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2040-2048.
- ⁷⁶ Froehler, B. C.; Matteucci, M. D. *Nuc. Acids Res.* **1983**, *11*, 8031-8036.
- ⁷⁷ Ti, G. S.; Gaffney, B. L.; Jones, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1316-1319.
- ⁷⁸ Stork, G.; Hudriik, P. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 4462-4464.
- ⁷⁹ Corey, E. J.; Venkateswarlu, A. *Protection J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6190-6191.
- ⁸⁰ Ogilvie, K. K.; Schiffman, A. L.; Penney, C. L. *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 2230-2238.
- ⁸¹ Kinzy, W.; Schmidt, R. R. *Liebigs Annalen der Chemie* **1987**, *5*, 407-415.
- ⁸² Marlow, A. L.; Mezzina, E.; Spada, G. P.; Masiero, S.; Davis, J. T.; Gottarelli, Gi. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5116-5123
- ⁸³ Vincent, S.; Mioskowski, C.; Lebeau, L. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 991-997.
- ⁸⁴ Herdewijn, P.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Pauwels, R.; Baba, M.; Broder, S.; Vanderhaeghe, H. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1270-1278.
- ⁸⁵ Mitsunobu, O. *Synthesis* **1981**, 1-28.
- ⁸⁶ Herdewijn, P.; Balzarini, J.; Baba, M.; Pauwels, R.; Van Aerschot, A.; Janssen, G.; De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 2040-2048.
- ⁸⁷ Amos, R. A.; Emblidge, R. W.; Havens, N. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3598-600.
- ⁸⁸ Von Itzstein, M.; Jenkins, I. D. *Aust. J. Chem.* **1983**, *36*, 557-563.
- ⁸⁹ Camp, D.; Jenkins, I. D. *Aust. J. Chem.* **1988**, *41*, 1835-1839.
- ⁹⁰ Chiba, J.; Tanaka, K.; Ohshiro, Y.; Miyake, R.; Hiraoka, S.; Shiro, M.; Shionoya, M. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 331-338.
- ⁹¹ Chidgivadze, Z. G.; Bibilashvili, R. S.; Kraevskii, A. A.; Kukhanova, M. K. *Biochimica et Biophysica Acta* **1986**, *868*, 145-52.
- ⁹² Herrlein, M. K.; Konrad, R. E.; Engels, J. W.; Holletz, T.; Cech, D. *Helv. Chim. Acta* **1994**, *77*, 586-596.
- ⁹³ Yuzhakov, A. A.; Chidgeavadze, Z. G.; Bibilashvili, R. Sh. *FEBS Letters* **1992**, *306*, 185-188.
- ⁹⁴ Chiba, J.; Tanaka, K.; Ohshiro, Y.; Miyake, R.; Hiraoka, S.; Shiro, M.; Shionoya, M. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 331-338.
- ⁹⁵ Meena, S., M.; Pierce, K.; Szostak, J. W.; McLaughlin, L. W. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1161-1163.
- ⁹⁶ Petrie, C. R.; Reed, M. W.; Adams, A. D.; Meyer, R. B. Jr. *Bioconjugate chemistry* **1992**, *3*, 85-87.

-
- ⁹⁷ Goussu, C.; Vasseur, J.-J.; Bazin, H.; Morvan, F. *Nucleosides, Nucleotides Nucl. Acids* **2005**, *24*, 623-627.
- ⁹⁸ Goussu, C.; Vasseur, J.-J.; Bazin, H.; Trinquet, E.; Maurin, F.; Morvan, F. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 465-470.
- ⁹⁹ Kuijpers, W. H. A.; Kuyl-Yeheskiely, E.; van Boom, J. H.; van Boeckel, C. A. A. *Nuc. Acids Res.* 1993, *21*, 3493-500.
- ¹⁰⁰ Kuijpers, W. H. A.; Huskens, J.; Van Boeckel, C. A. A. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6729-32.
- ¹⁰¹ Leuck, M.; Giare, R.; Paul, M.; Zien, N.e; Wolter, A. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 317-320.
- ¹⁰² Mahajan, S.; Garg, A.; Goel, M.; Kumar, P.; Gupta, K. C. *Analytical Biochemistry* **2006**, *351*, 273-281.
- ¹⁰³ Avino, A.; Garcia, R. G.; Albericio, F.; Mann, M.s; Wilm, M.; Neubauer, G.; Eritja, R. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1996**, *4*, 1649-1658.
- ¹⁰⁴ Himmelsbach, F.; Schulz, B. S.; Trichtinger, T.; Charubala, R.; Pfeleiderer, W. *Tetrahedron* **1984**, *40*, 59-72.
- ¹⁰⁵ Gryaznov S M; Letsinger R L. *Nucleic Acids Research* **1992**, *20*, 3403-3409.
- ¹⁰⁶ Atherton, F. R.; Openshaw, H. T.; Todd, A. R. *Journal of the Chemical Society* **1945**, 660-63.
- ¹⁰⁷ Gryaznov, S.M.; Letsinger, R.L. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1261-1264.
- ¹⁰⁸ Jastorff, B.; Hettler, H. *Tetrahedron Lett.* **1969**, 2543-2544.
- ¹⁰⁹ Matteucci, M. D.; Caruthers, M. H *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 3185-3191.
- ¹¹⁰ Schwope, I.; Bleczynski, C. F.; Richert, C. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4749-4761.
- ¹¹¹ Carpino, L. A.; El-Faham, A.; Albericio, F. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3561-4.
- ¹¹² Carpino, L. A.; El-Faham, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5401-5402.
- ¹¹³ Zhou, Q.Z. Chen, Z.C. *Synth. Commun.* **2000**, *30*, 3189-3194.
- ¹¹⁴ Lommel, T., Dissertation, Universität Karlsruhe (TH), voraussichtlich 2008.
- ¹¹⁵ Tener, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 159-168.
- ¹¹⁶ Weimann, G.; Khorana, H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84* 4329-4341.
- ¹¹⁷ Gliniski R P; Khan M S; Kalamas R L; Sporn, M. B. *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 4299-4305.
- ¹¹⁸ Sarfati, R. S.; Namane, A.; Munier, H.; Barzu, O. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4699-4702.
- ¹¹⁹ Gryaznov, Sergei M.; Letsinger, Robert L. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 4127-4128.
- ¹²⁰ Michelson, A. M.; Todd, A. R. *Journal of the Chemical Society* **1949**, 2476-2486.
- ¹²¹ Sim, M. M.; Kondo, H.; Wong, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2260-2267.
- ¹²² Gilham, P. T.; Khorana, H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 6212-6222.
- ¹²³ Naimi, E.; Zhou, A.; Khalili, P.; Wiebe, L. I.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Knaus, E. E. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 995-1004.
- ¹²⁴ Martin, S. J.; Eisenbarth, J. A.; Wagner-Utermann, U.; Mier, W.; Henze, M.; Pritzkow, H.; Haberkorn, U.; Eisenhut, M. *Nuclear Medicine and Biology* **2002**, *29*, 263-273.
- ¹²⁵ Roesler, G.; Jastorff, B. *Bioorganic Chemistry* **1978**, *7*, 35-45.
- ¹²⁶ Sabbagh, G.; Fettes, K. J.; Gosain, R.; O'Neil, I. A.; Cosstick, R. *Nuc. Acids Res.* **2004**, *32*, 495-501.
- ¹²⁷ Ogilvie, K. K. *Can. J. Chem.* **1973**, *51*, 3799-807.
- ¹²⁸ Herdewijn, P.; Pauwels, R.; Baba, M.; Balzarini, J.; De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 2131-2137.

Abkürzungsverzeichnis

δ	chemische Verschiebung
A	Adenin/Adenosin
Ar	Aromat
ATT	6-Aza-2-thiothymin
abs.	absolutiert
Ac	Acetyl-Gruppe
Bz	Benzoyl-Schutzgruppe
C	Cytidin/Cytosin
cpg	"controlled pore glass"
dest.	destilliert
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	Dimethoxytrityl-Gruppe
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Äquiv.	Äquivalent
G	Guanin/Guanosin
ges.	gesättigt
HATU	7-Azabenzotriazol-1-yl- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat ^{i,1}
HOAt	7-Aza-1-hydroxybenzotriazol
HPLC	"High Performance Liquid Chromatography"
iBu	Isobutyrylgruppe
lcaa	"long chain alkyl amine"-Rest
konz.	konzentriert
MALDI-TOF-MS	" <u>M</u> atrix <u>A</u> ssisted <u>L</u> ASER <u>D</u> esorption <u>I</u> onization <u>T</u> ime of <u>F</u> light <u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry"
nm	Nanometer
OAt	7-Aza-1-oxybenzotriazol-Rest
OBt	1-Oxybenzotriazol-Rest
ppm	"parts per million"
R_f	"Retention Factor"

RNA	Ribonukleinsäure
RP	"Reversed Phase"
r.t.	Raumtemperatur
T	Thymin/Thymin
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl-Gruppe
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldidiphenylsilyl-Gruppe
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triethylamin
TEAA	Triethylammoniumacetat
TFA	Trifluoressigsäure
THAP	2,4,6-Trihydroxyacetophenon
THF	Tetrahydrofuran
t_r	Retentionszeit
U	Uridin/Uracil

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ralf Eisenhuth
Geburtstag: 08.12.1977
Geburtsort: Bühl (Baden)

Schulbildung

1984-1988 Grundschule Sasbachried
1988-1997 Gymnasium Achern
18.06.1997 abgeschlossen mit Abitur

Zivildienst

1997-1998 Rotes Kreuz Bühl

Studium

1998-2003 Chemiestudium Universität Karlsruhe (TH)
01.12.2000 Vordiplom
10.11.2003 Diplom
Diplomarbeit durchgeführt im Arbeitskreis Ulrich im Institut für Organische Chemie
Titel: FEP-Alleskönner oder Spezialwerkzeug in der Peptidsynthese ?
01.2004-05.2004 Hilfwissenschaftlicher Mitarbeiter Arbeitskreis Ulrich
Ab 01.06.2004 Doktorand in der Arbeitsgruppe Richert im Institut für Organische Chemie

Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte Herr Prof. Dr. Dr. Clemens Richert für die Stellung dieses interessanten Themas und seine hervorragende Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit aussprechen.

Besonders danken möchte ich auch meinen Kollegen in der Arbeitsgruppe von Prof. Richert (Uli, Stephanie, Carolin, Amritraj, Nils, Jan, Sukunath, Tine, Martin, Katha, Tanja, Kerstin, Manuel, Michael) für die angenehme Arbeitsatmosphäre und hilfreichen Diskussionen. Hierbei möchte ich mich bei Siegfried Herzberger und Peter Grünefeld für die gute Zusammenarbeit und bei Christopher Deck für seine große Hilfsbereitschaft bedanken. Eric Kervio möchte ich für die vielen gehaltvollen Diskussionen und seine einzigartige Hilfsbereitschaft danken

Meinen Kommilitonen und Assistenten Nils, Andreas, Ari, Christian, Ben, Daniel, Sonja, Betti, Patrick (Henke und Baumhoff), Michael, Ulf, Daniel Tom, Oliver, Christoph, Simon, Kai, Jens und alle die ich vergessen habe für die schöne Studienzeit und die daraus entstandenen Freundschaften.

Weiterhin danke den Mitarbeitern der NMR-Abteilung Dr. Andreas Rapp, Annelie Kuiper und Pia Lang und den Mitarbeitern der Massenspektroskopie-Abteilung Dr. Norbert Foitzik, Angelika Kernert und Ingrid Roßnagel für ihre Hilfsbereitschaft.

Bei meiner Familie bedanke ich mich ganz großartige Unterstützung während des Studiums und der Promotion für die persönliche Unterstützung.

