

Synthese modifizierter Nukleosidanaloga als wichtige Werkzeuge zur Generierung
funktionaler Oligonukleotide

I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Greifswald

vorgelegt von

Frederik Alexander Müggenburg

Greifswald, 26. September 2022

Dekan*in: Prof. Dr. Gerald Kerth (Universität Greifswald)

1. Gutachter*in: Prof. Dr. Sabine Müller (Universität Greifswald)

2. Gutachter*in: Prof. Dr. Stephanie Kath-Schorr (Universität zu Köln)

Tag der Promotion: 12.12.2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung und Zielstellung.....	1
2 Synthese eines 8-Aza-7-deaza-2'-desoxyadenosinderivats für die Generierung längendiverser Oligonukleotide	6
2.1 Hintergrund der Arbeiten.....	6
2.2 Herstellung der für die Oligonukleotidsynthese benötigten 8-Aza-7-deaza-2'- desoxyadenosinbausteine.....	9
2.3 Untersuchungen zur Herstellung längendiverser Oligonukleotide	15
2.4 Verwendung der hergestellten 8-Aza-7-deaza-2'-desoxyadenosinderivate in der chemischen Festphasensynthese	23
3 Synthese und Analyse Azido-modifizierter Oligonukleotide	27
3.1 Herstellung Azido-modifizierter Oligonukleotide zur Untersuchung von Oxazaborolidin- Verbindungen	27
3.2 Synthese eines 2'-Azido-modifizierten Adenosinbausteins.....	30
3.3 Synthese eines 3'-Azido-modifizierten Adenosinbausteins.....	34
3.4 Synthese eines 3'-Azido modifizierten Uridinbausteins	39
3.5 Ergebnisse der Ligationsexperimente	43
3.6 Untersuchungen bezüglich der Stabilität der Azidogruppe bei iterativer Exposition mit Phosphoramiditen.....	45
4 Untersuchungen zur Synthese eines Borono-modifizierten Adenosinderivats	49
4.1 Motivation der Untersuchungen und Entwicklung einer Synthesestrategie.....	49
4.2 Synthese eines geschützten Adenosinderivats als Ausgangsmolekül für die Oxidationsreaktionen	52
4.3 Wechsel der Synthesestrategie.....	56
5 Zusammenfassung und Ausblick.....	59
6 Experimentalteil.....	62
6.1 Geräte und Software.....	62

6.2 Material und Methoden	63
6.2.1 Puffer und Lösungen	63
6.2.2 Chemische DNA-Festphasensynthese	63
6.2.3 Detritylierung	65
6.2.4 Reinigung mit Sepak-Säule	65
6.2.5 Denaturierende PAGE	65
6.2.6 Ethanolfällung.....	66
6.2.7 Butanolfällung.....	66
6.2.8 Konzentrationsbestimmung	66
6.2.9 Massenspektrometrie (MALDI-Tof).....	67
6.2.10 Enzymatischer Verdau.....	67
6.2.11 HPLC.....	67
6.2.12 LC-MS	69
6.3 Chemische Synthesen	70
6.3.1 Allgemein	70
6.3.2 8-Aza-7-deaza-6-methoxypurin (9)	70
6.3.3 2-Desoxy-1-methoxy-3,5-O-ditoluoyl-ribose (11)	71
6.3.4 α -1-Chloro-2-desoxy-3,5-O-ditoluoyl-ribose (12).....	72
6.3.5 2'-Desoxy-3',5'-ditoluoyl-8-aza-7-deaza-6-methoxy-9- β -D-ribofuranosylpurin (13).....	73
6.3.6 2'-Desoxy-8-aza-7-deaza-adenosin (14).....	74
6.3.7 2'-Desoxy-8-aza-7-deaza-6-N-isobutyryl-adenosin (15).....	75
6.3.8 2'-Desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-8-aza-7-deaza-6-N-isobutyryl-adenosin (16)	76
6.3.9 Dipentafluorophenyladipinsäureester (17)	77
6.3.10 2'-Desoxy-3'-O-[1,6-dioxo-6-(pentafluorophenyl)hexyl]-5'-O-(4,4'-dimethoxy- trityl)-8-aza-7-deaza-6-N-isobutyryl-adenosin (1).....	78
6.3.11 2'-Desoxy-5'-O-DMT-8-aza-7-deaza-6-N-isobutyryl-adenosin-3'-O-(cyanoethyl- N,N-diisopropylphosphoramidit) (2)	79

6.3.12 Immobilisierung des Nukleosids 1 an einem CPG-Träger.....	80
6.3.13 Immobilisierung des Thymidinderivats 18 an einem CPG- bzw. TentaGel-Träger	81
6.3.14 6- <i>N</i> -Isobutyryl-9-β-D-arabinofuranosyladenosin (20).....	82
6.3.15 3',5'- <i>O</i> -(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-6- <i>N</i> -isobutyryl-9-β-D-arabino- furanosyl-adenosin (21).....	83
6.3.16 3',5'- <i>O</i> -(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'- <i>O</i> -[(trifluoromethyl)sulfonyl]-6- <i>N</i> -isobutyryl-9-β-D-arabinofuranosyl-adenosin (22).....	84
6.3.17 Lithiumazid	85
6.3.18 2'-Azido-2'-deoxy-3',5'- <i>O</i> -(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)-6- <i>N</i> -isobutyryl- adenosin (23).....	85
6.3.19 2'-Azido-2'-desoxy-6- <i>N</i> -isobutyryl-adenosin (24).....	86
6.3.20 2'-Azido-2'-deoxy-5'- <i>O</i> -(4,4'-dimethoxytrityl)-6- <i>N</i> -isobutyryl-adenosin (25).....	87
6.3.21 2'-Azido-2'-deoxy-3'- <i>O</i> -[1,6-dioxo-6-(pentafluorophenyl)oxy]hexyl]-5'- <i>O</i> -(4,4'- dimethoxytrityl)-6- <i>N</i> -isobutyryl-adenosin (3)	88
6.3.22 Immobilisierung des Nukleosids 3 an den Festphasenträger	89
6.3.23 5'- <i>O</i> -(4,4'-Dimethoxytrityl)-6- <i>N</i> -isobutyryl-9-β-D-arabinofuranosyladenosin (26) .	90
6.3.24 2',3'-Anhydro-5'- <i>O</i> -(4,4'-dimethoxytrityl)-6- <i>N</i> -isobutyryl-9-β-D-lyxofuranosyl- adenosin (27)	92
6.3.25 3'-Azido-3'-deoxy-5'- <i>O</i> -(4,4'-dimethoxytrityl)-6- <i>N</i> -isobutyryl-9-β-D-arabino- furanosyl-adenosin (28).....	93
6.3.26 3'-Azido-3'-deoxy-5'- <i>O</i> -(4,4'-dimethoxytrityl)-6- <i>N</i> -isobutyryl-adenosin (29).....	94
6.3.27 3'-Azido-3'-deoxy-2'- <i>O</i> -[1,6-dioxo-6-(pentafluorophenyl)oxy]hexyl]-5'- <i>O</i> -(4,4'- dimethoxytrityl)-6- <i>N</i> -isobutyryl-adenosin (4)	95
6.3.28 Immobilisierung des Nukleosids 4 an den Festphasenträger	96
6.3.29 5'- <i>O</i> -(4,4'-Dimethoxytrityl)-uridin (31)	97
6.3.30 2',3'- <i>O</i> -Dimethylsulfonyl-5'- <i>O</i> -(4,4'-dimethoxytrityl)-uridin (32)	98
6.3.31 2',3'-Anhydro-5'- <i>O</i> -(4,4'-dimethoxytrityl)-1-β-D-lyxofuranosyl-uracil (33)	99
6.3.32 3'-Azido-3'-deoxy-5'- <i>O</i> -(4,4'-dimethoxytrityl)-1-β-D-arabinofuranosyl-uracil (34)	100

6.3.33 3'-Azido-3'-deoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-uridin (35)	101
6.3.34 3'-Azido-3'-deoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-O-[1,6-dioxo-6-(pentafluorophenoxy)hexyl]-uridin (5)	102
6.3.35 Immobilisierung des Nucleosids 5 an den Festphasenträger	103
6.3.36 2'-O-(<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl)-3',5'-O-(di- <i>tert</i> -butylsilyl)-adenosin (43).....	104
6.3.37 2'-O-(<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-adenosin (44).....	105
6.3.38 2'-O-(<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl)-3'-O-6- <i>N</i> -(diisobutyryl)-adenosin (45)	106
6.3.39 Moffatt-Oxidation an Verbindung 45	107
6.3.40 Dess-Martin-Oxidation an Verbindung 45	108
6.3.41 2',3'-Isopropyliden-adenosin (50).....	109
6.3.42 2',3'-Isopropyliden-6- <i>N</i> -isobutyryl-adenosin (51)	110
6.3.43 Dess-Martin-Oxidation an Verbindung 51	111
6.3.44 Swern-Oxidation an Verbindung 51	112
7 Anhang.....	113
Literaturverzeichnis	120
Abbildungsverzeichnis.....	CXXVII
Tabellenverzeichnis.....	CXXXI
Eigenständigkeitserklärung	CXXXII
Publikationsliste.....	CXXXIII
Danksagung	CXXXIV

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
Äq.	Äquivalente
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CPG	<i>Controlled Pore Glas</i>
CuAAC	<i>Copper-Catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition</i>
dC	2'-Desoxycytidin
DCE	Dichlorethan
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMTr	4,4'-Dimethoxytrityl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IE-HPLC	<i>ION Exchange High Performance Liquid Chromatography</i>
LNA	<i>Locked Nucleic Acid</i>
LC-MS	<i>Liquid chromatography–mass spectrometry</i>
MALDI-Tof	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of flight</i>

MeOH	Methanol
MS-Cl	Methansulfonylchlorid
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
ODN	Oligodesoxynukleotid
ON	<i>Oligonukleotid</i>
PAA	Polyacrylamid
Pfp	Pentafluorophenol
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RP-HPLC	<i>Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography</i>
RT	Raumtemperatur
SPAAC	<i>Strain Promoted Azide Alkyne Cycloaddition</i>
SV	Säulenvolumen
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TMS	Tetramethylsilan
TMS-Cl	Trimethylsilylchlorid
TEA	Triethylamin
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i>

1 Einleitung und Zielstellung

Alle derzeit bekannten lebenden Organismen von einfachen prokaryotischen Bakterien bis hin zu komplexen eukaryotischen Lebensformen benötigen für ihre Existenz die Makromoleküle Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Ribonukleinsäure (RNA). Lange Zeit wurde angenommen, dass die DNA als Speicher der genetischen Information dient, während die RNA lediglich als Botenmolekül fungiert, um die für die Proteinbiosynthese notwendigen Informationen zu übertragen. Diese Annahme ist spätestens seit Entdeckung katalytisch aktiver RNA-Sequenzen, sog. Ribozyme, überholt.^[1,2] Heutzutage ist bekannt, dass Nukleinsäuren in allen Organismen eine Reihe essentieller Funktionen übernehmen, die weit über die Aufgabe der Informationsspeicherung oder -weitergabe hinausgehen.^[3,4] So spielen z.B. ribosomale RNAs (rRNAs) eine wesentliche Rolle bei den entscheidenden Schritten der Proteinbiosynthese.^[5,6] Des Weiteren wird die Genexpression in prokaryotischen und auch in einigen eukaryotischen Lebewesen in Teilen durch sog. *Riboswitches* reguliert. Dabei handelt es sich um besondere RNA-Strukturen, die spezifische Moleküle binden und anhand der dadurch induzierten Strukturänderung Einfluss auf die Genexpression nehmen können.^[7-9] Auch das für die Gentechnik revolutionäre CRISPR-Cas-System, welches in Bakterien der Abwehr viraler Infektionen dient, basiert auf der Erkennung viralen Erbguts durch kurze Ribonukleinsäure-Sequenzen.^[10,11]

Angesichts dieser funktionellen Vielfalt der Nukleinsäuren ist es nicht weiter verwunderlich, dass das wissenschaftliche Interesse an der *in vitro*- und *in vivo*-Erforschung dieser Makromoleküle immens ist. Eine wichtige Methode zur Charakterisierung dieser vielfältigen Molekülfamilie ist die kovalente Einführung verschiedener molekularer Markierungen, auch bekannt als *labeling*.^[12,13] Hierbei werden Nukleinsäuren mit unterschiedlichen Modifikationen versehen. Die Modifikationsmöglichkeiten reichen dabei von Fluoreszenzfarbstoffen zur Visualisierung,^[14] über FRET-Paare und EPR-Sonden zur Strukturaufklärung,^[15,16] bis hin zur Einführung von Affinitätsmarkern (z.B. Biotin) für eine selektive Isolierung.^[17] Die jeweiligen Modifikationen können dabei entweder an einer Nukleobase, der Ribosekomponente, oder auch im Phosphatrückgrat eingebracht werden (Abbildung 1 A).

Abgesehen von den soeben aufgeführten *labeling*-Modifikationen, welche häufig verhältnismäßig groß und sterisch anspruchsvoll sind (Abbildung 1 B), können Nukleinsäuren auch mit kleineren Molekülgruppen modifiziert werden (z.B. Methyl- oder Fluorgruppen, Abbildung 1 C). Derartige Modifikationen dienen häufig dem Zweck, die Struktureigenschaften der Nukleinsäuren zu verändern,^[18] oder diese mit Resistenzeigenschaften gegenüber Nukleasen auszustatten.^[19]

Die kontrollierte und selektive Einbringung der jeweiligen Modifikationen ist dabei häufig kein triviales Unterfangen.^[20] Die jeweiligen Nukleotide verfügen über eine Vielzahl an potentiellen Reaktionszentren, welche in den meisten Fällen eine ortspezifische Einbringung von Modifikationen in Oligonukleotide unmöglich machen. Diese Problematik wird zusätzlich verschärft, wenn die Modifikationen *in vivo* oder in komplexen Systemen mit zahlreichen anderen potentiellen Reaktionspartnern eingebracht werden sollen.

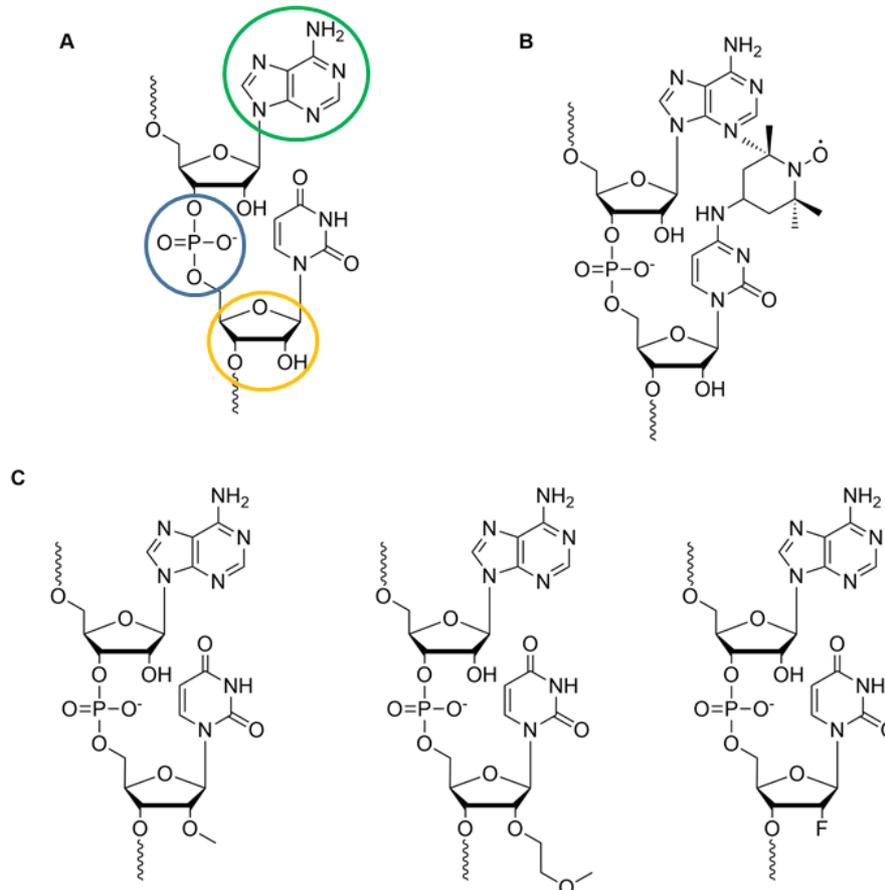


Abbildung 1: Beispiele für modifizierte Nucleinsäuren. **A:** mögliche Positionen für die Einführung von Modifikationen in einer kanonischen Nucleinsäure; grün: Nucleobase, blau: Phosphatrückgrat, gelb: Ribosekomponente; **B:** Basenmodifizierte Nucleinsäure (EPR-Sonde);^[16] **C:** Ribosomodifizierte Nucleinsäuren.^[19]

Einen Ansatz zur Lösung dieses Spezifitätsproblems stellen sog. bioorthogonale Reaktionen dar.^[21] Reaktionen dieser Klasse laufen zwischen Molekülgruppen ab, welche in der Natur nicht vorkommen wie z.B. Alkine und Azide. Einer der wichtigsten Vertreter bioorthogonaler Reaktionen ist die *Copper-Catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition* (CuAAC, Abbildung 2 A).^[22] Diese basiert auf der Huisgen-Reaktion bei der ein Azid mit einem Alkin in einer 1,3-dipolaren Cycloaddition zu einem Triazol reagiert.^[23] Unter physiologischen Bedingungen läuft die Huisgen-Reaktion jedoch sehr langsam und mit geringer Regiospezifität ab. Erst durch den Einsatz Kupfer-basierter Katalysatoren konnten diese Probleme behoben werden.^[24,25]

Die CuAAC ist eine sehr beliebte bioorthogonale Reaktion, allerdings weist sie auch Nachteile auf. Die Cu-Katalysatoren können reaktive Sauerstoffspezies erzeugen, welche eine zytotoxische Wirkung haben, was die Anwendung in lebenden Systemen erschwert und den Einsatz spezieller Cu-Liganden erforderlich macht.^[26,27]

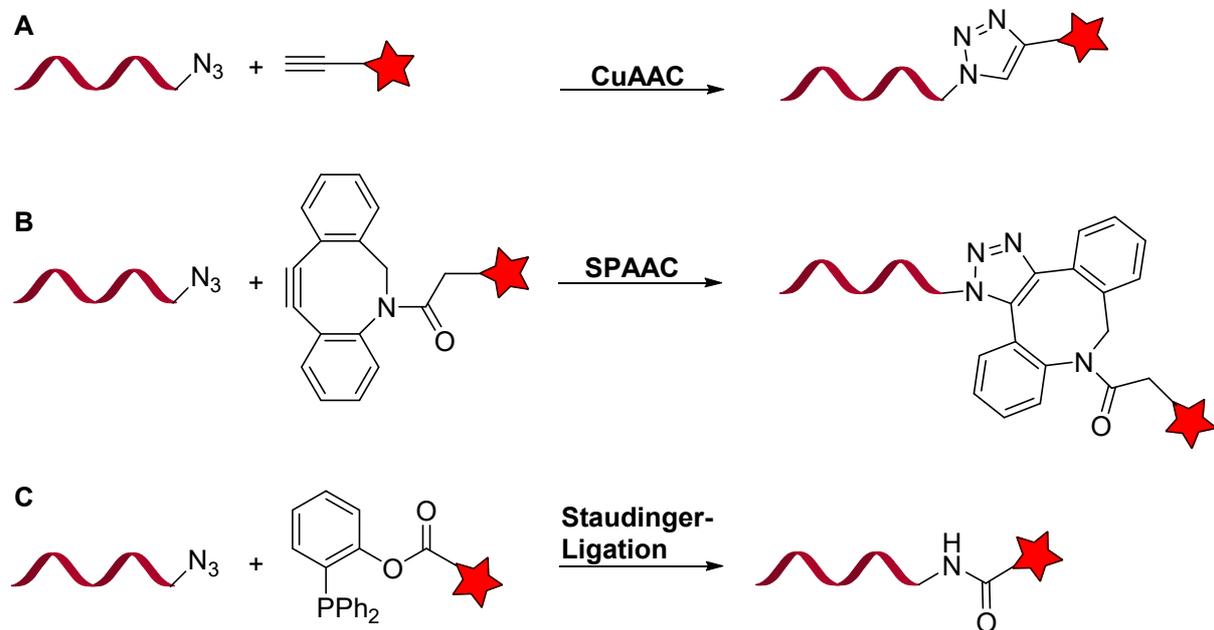


Abbildung 2: Beispiele bioorthogonaler Reaktionen. **A:** CuAAC; **B:** SPAAC; **C:** *Traceless Staudinger Ligation*.

Eine Alternativreaktion, bei der keine Metall-basierten Katalysatoren eingesetzt werden müssen, ist die *Strain Promoted Azide Alkyne Cycloaddition* (SPAAC).^[28] Bei dieser Reaktion werden Cyclooctine eingesetzt (Abbildung 2 B), welche aufgrund der Ringspannung reaktiver als lineare Alkine sind, sodass keine Katalysatoren verwendet werden müssen. Nachteilig bei dieser Reaktion sind der größere sterische Einfluss der Cyclooctinderivate, sowie die langsameren Reaktionsraten im Vergleich zur CuAAC.^[29] Eine weitere bioorthogonale Reaktion ist die *Traceless Staudinger Ligation* (Abbildung 2 C).^[30,31] Diese läuft zwischen einem Azid und einem acylierten Phosphon unter Entstehung einer Amidbindung ab.

In allen beschriebenen Fällen weisen die Reaktionspartner sehr hohe Spezifitäten zueinander auf und die Reaktionen liefern häufig exzellente Ausbeuten. Allerdings müssen für den Einsatz bioorthogonaler Reaktionen die entsprechenden Reaktanden erst in die jeweilige Nukleotidsequenz eingebracht werden. Dies kann entweder im Zuge der chemischen Oligonukleotidsynthese geschehen,^[32] oder *in vitro* über geeignete Enzyme.^[33] Ebenfalls möglich ist eine Inkorporation *in vivo* über die natürliche oder modifizierte Stoffwechselmaschinerie des entsprechenden Organismus'.^[34]

Bioorthogonale Reaktionen sind essentiell für die Nukleinsäureforschung und haben in den vergangenen Jahren dazu beigetragen, neue und wertvolle Erkenntnisse zu liefern. So ermöglichte z.B. die metabolische Inkorporation verschiedener Azido-modifizierter Adenosinderivate die Visualisierung naszierender RNAs in lebenden Zellen mittels Fluoreszenz-Sonden, welche durch SPAAC an die Azido-funktionalisierten RNA-Oligomere angefügt wurden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass RNA Polymerase 1 und 2, sowie RNA Poly(A) Polymerase unterschiedliche Präferenzen für verschiedene modifizierte Nucleoside aufweisen.^[35] Durch enzymatische Modifikation der 5'-Cap-Struktur eukaryotischer mRNAs mit Azidogruppen konnte die Visualisierung der mRNAs *in vivo* ermöglicht werden.^[36] Des Weiteren können mittels bioorthogonaler Reaktionen wichtige Biokonjugate hergestellt werden, welche eine zielgerichtete und effiziente Aufnahme therapeutischer Oligonucleotide in lebende Zellen ermöglichen.^[37,38] Mittels CuAAC können auch einzelne DNA- bzw. RNA-Fragmente miteinander verbunden werden, was die Generierung verhältnismäßig langer Nucleinsäuresequenzen ermöglicht, welche sich ansonsten nur schwer enzymatisch oder chemisch synthetisieren ließen.^[39] Auf diese Weise können z.B. *guide*-RNA-Sequenzen hergestellt werden, welche einen zielgerichteten Einsatz des CRISPR-Cas Systems in der Gentechnik erforderlich sind.^[40]

All diese Einsatzmöglichkeiten bioorthogonaler Reaktionen haben gemeinsam, dass in den allermeisten Fällen zunächst ein mit entsprechenden Molekülgruppen modifiziertes Nucleosid synthetisiert werden muss. Allerdings werden modifizierte Nucleoside nicht nur für die Durchführung bioorthogonaler Reaktionen benötigt. Fluorierte Nucleoside sind z.B. ein beliebtes Werkzeug für NMR-spektroskopische Untersuchungen von Nucleinsäuren,^[41,42] während Azido-modifizierte Nucleoside als Ausgangsstoffe für die Herstellung besonderer LNA-Bausteine dienen können.^[43] Des Weiteren haben viele nicht-kanonische Nucleosidanaloga eine wichtige Bedeutung für die Forschung zum Ursprung des Lebens.^[44,45] Auch für die Medizin sind diese besonderen Moleküle relevant, da viele modifizierte Nucleoside antivirale und antitumorale Wirkungen aufweisen.^[46-48]

Es ist daher offensichtlich, dass modifizierte und nicht-kanonische Nucleoside essentielle Werkzeuge für viele wissenschaftliche Bereiche darstellen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher umfassend mit der Synthese verschiedener modifizierter Nucleosidanaloga mit unterschiedlichen Anwendungsbereichen (Abbildung 3).

1. Synthese eines 8-Aza-7-deaza-2'-desoxyadenosinderivats mit den notwendigen Funktionalitäten für einen Einsatz in der automatisierten Oligonucleotid-Festphasensynthese, um anschließend funktionelle Ribozymstudien zu ermöglichen.

- Synthese verschiedener Azido-modifizierter Nucleoside zur Herstellung 3'-Azido-modifizierter Oligodesoxynucleotide (ODNs). Die entsprechenden ODNs sollten für Untersuchungen zur Ausbildung neuartiger internucleosidischer Bindungen verwendet werden. Des Weiteren sollten Untersuchungen bezüglich der Stabilität der Azidogruppe unter den Bedingungen der chemischen ODN-Festphasensynthese durchgeführt werden.
- Untersuchungen zur Herstellung eines 5'-Borono-modifizierten Adenosinderivats, welches potenziell ebenfalls für die Ausbildung nicht-kanonischer internucleotidischer Bindungen verwendet werden kann.

Detailliertere Informationen bezüglich der theoretischen Hintergründe der einzelnen Projekte sind in den jeweiligen Abschnitten der vorliegenden Arbeit dargelegt.

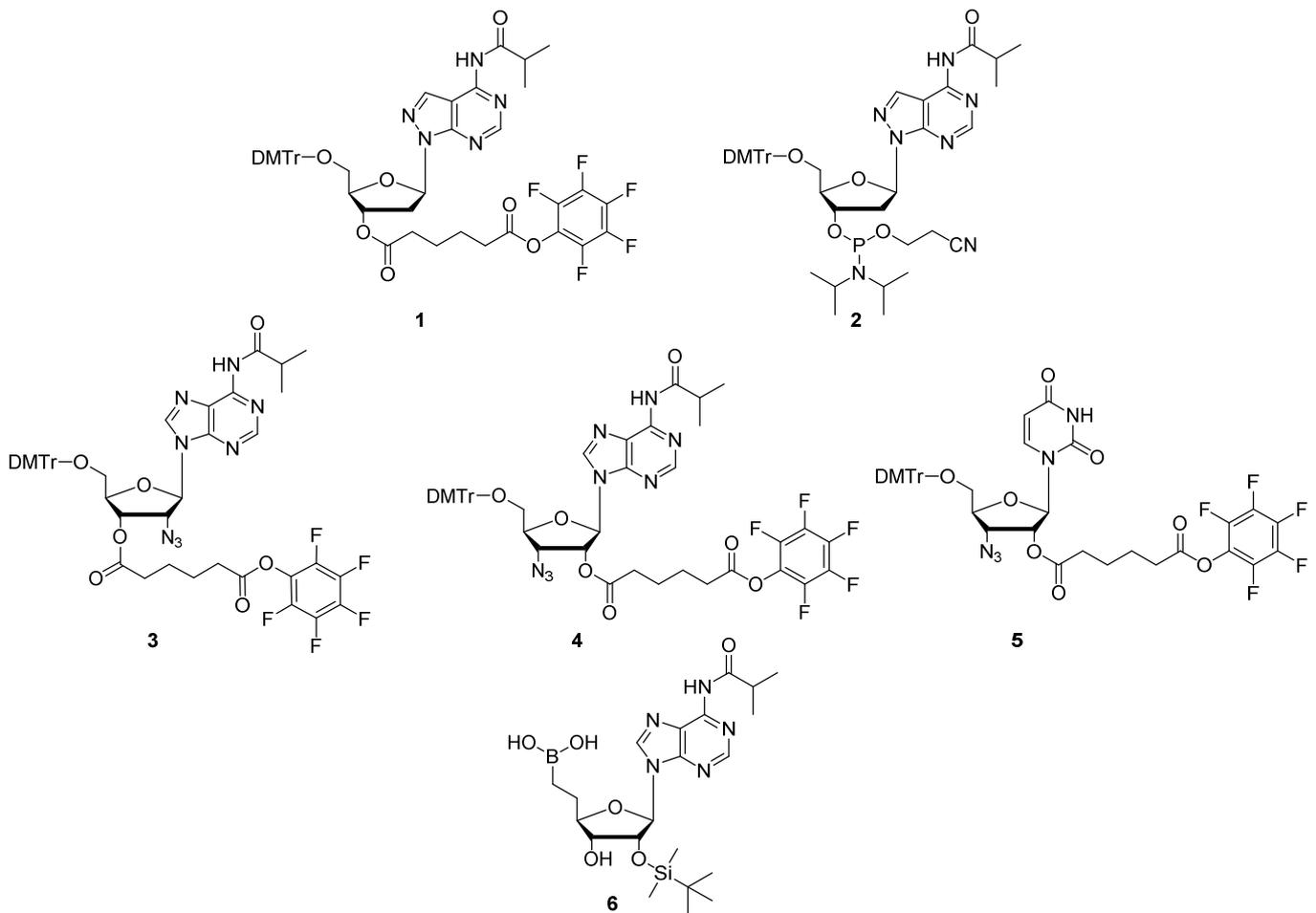


Abbildung 3: Zielmoleküle. **1 – 2:** Funktionalisierte 8-Aza-7-deaza-2'-desoxyadenosinderivate; **3 – 5:** Azido-modifizierte Nucleosidderivate; **6:** Borono-modifiziertes Adenosinderivat.

2 Synthese eines 8-Aza-7-deaza-2'-desoxyadenosinderivats für die Generierung längendiverser Oligonukleotide

2.1 Hintergrund der Arbeiten

Gemäß der durch Gilbert geprägten RNA-Welt-Hypothese liegt der Ursprung des heutigen Lebens in der RNA.^[49] Die Bedeutsamkeit der RNA für den Ursprung erster Lebewesen wurde schon vorher in Betracht gezogen, jedoch war es die Entdeckung katalytisch aktiver RNA-Sequenzen, sog. Ribozyme, die dieser Annahme ein größeres Gewicht verlieh. In komplexen Lebensformen sind die Speicherung genetischer Information und die Katalyse der Stoffwechselfunktionen weitestgehend getrennt voneinander kompartimentiert. Durch die Entdeckung der Ribozyme konnte jedoch gezeigt werden, dass RNA als Biomolekül in der Lage ist, nicht nur als Informationsspeicher, sondern auch als Katalysator zu agieren. Es ist daher plausibel anzunehmen, dass RNA die Basis erster einfacher Lebensformen war. Eine der grundlegendsten Eigenschaften lebender Organismen ist die Fähigkeit der Replikation und die RNA-Welt-Hypothese setzt voraus, dass zu einem frühen Zeitpunkt der Evolutionsgeschichte Ribozyme mit der Fähigkeit der Selbstreplikation existiert haben.^[50] Allerdings konnten bis heute noch keine derartigen Replikasen identifiziert werden, auch wenn es in den letzten Jahren bedeutende Fortschritte auf diesem Gebiet gab.^[51]

Es gibt allerdings Beispiele RNA-basierter Polymerasen wie das R18 Polymerase Ribozym und entsprechend weiter entwickelte Varianten davon,^[52,53] zu denen auch das Pol1e Ribozym zählt (Abbildung 4).^[54,55] Dieses Ribozym ist in der Lage, eine Primersequenz entlang eines Templates zu verlängern. Die Polymeraseaktivität ist allerdings gering. So verlängert die Wildtypform des Pol1e Ribozyms nur etwa 3% der Primer vollständig bis zum Ende der Templatesequenz.^[56,57] Entscheidend für die Polymeraseaktivität ist dabei ein bestimmtes Heptanukleotid, welches einen Cofaktor darstellt. (Abbildung 4, rote Sequenz). In Abwesenheit dieses Cofaktors wird die Primersequenz nur um fünf bis sechs Nukleotide verlängert, bevor die Polymerisation zum Erliegen kommt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Anbindung des Cofaktors einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung der korrekten Sekundärstruktur des Ribozyms hat. Die Arbeitsgruppe um Prof. U. Müller konnte zeigen, dass sich die Polymeraseaktivität des Ribozyms durch Veränderungen der Cofaktorsequenz stark beeinflussen lässt.^[57] So konnte z.B. gezeigt werden, dass eine Änderung der Cofaktorsequenz zu 5'-GGCGCC-3' die Polymeraseaktivität mehr als verzehnfacht. Der neue Cofaktor kann besser an das Ribozym binden, da es nicht länger eine Basenfehlpaarung in der Mitte des Duplex' gibt.

Durch die Entfernung des Adenosins am 3'-Ende der Cofaktorsequenz werden des Weiteren vermutlich hinderliche Interaktionen zwischen den 2'-OH-Gruppen der Templatessequenz und dem Cofaktor unterbunden.^[57] Die Forschungsgruppe wollte ebenfalls prüfen, ob in einigen Fällen auch eine Verlängerung der Cofaktorsequenz am 3'-Ende eine Steigerung der Polymeraseaktivität bewirken kann. Aus Kostengründen wurden für die entsprechenden Untersuchungen DNA-Cofaktoren eingesetzt.^[57]

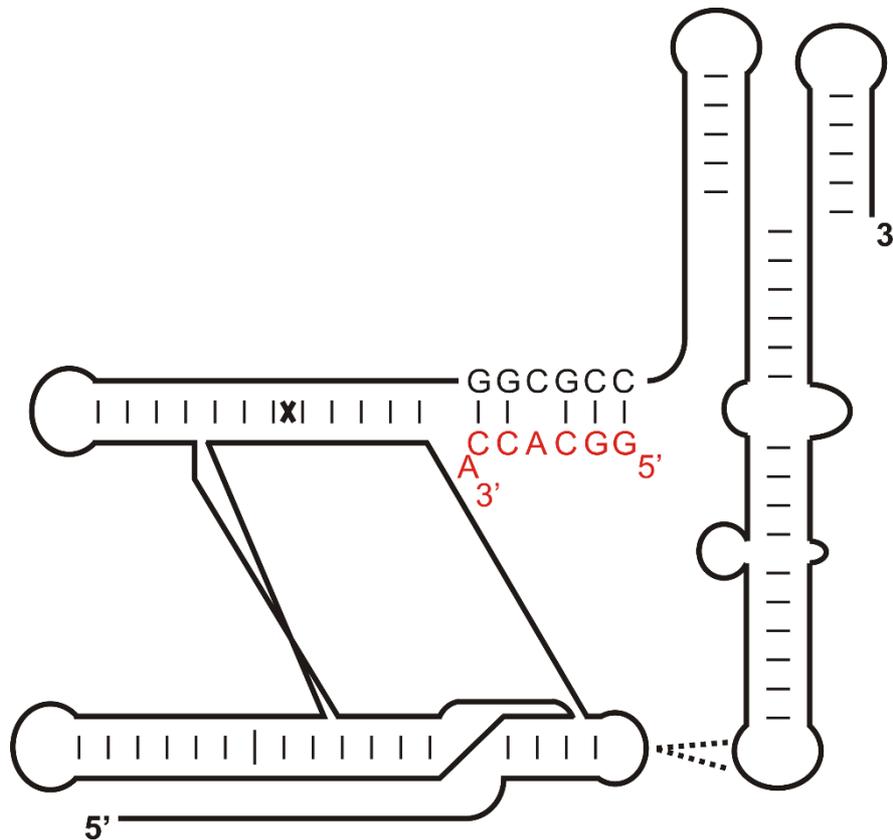


Abbildung 4: Sekundärstruktur des Pol1E Ribozyms mit gebundener Cofaktorsequenz (rot); adaptiert nach Yao und Müller.^[57]

Tatsächlich konnte eine Erhöhung der Polymeraseaktivität beobachtet werden, wenn die modifizierte Cofaktorsequenz 5'-GGCGCC am 3'-Ende um bis zu 20 Nucleotide verlängert wurde. Die Effizienzsteigerung war dabei am deutlichsten ausgeprägt, wenn die Cofaktorsequenz um 15 Nucleotide mit 60% Guanosin und zu 40% Thyminid verlängert wurde (5'-GGCGCC-(G/T)₁₅-3'). Vermutlich ermöglicht der auf diese Weise modifizierte Cofaktor die Ausbildung vereinzelter Basenpaarungen zur Templatesequenz, welche einerseits stark genug sind, um das Template in einer vorteilhaften Position zum katalytischen Zentrum des Ribozyms zu halten und andererseits so schwach sind, dass eine Repositionierung des Templates bei fortschreitender Primerverlängerung nicht behindert wird.^[57]

In weiteren Untersuchungen soll nun gezeigt werden, wie die Polymeraseaktivität durch die Inkorporation nicht-kanonischer Nukleotide in die Cofaktorsequenz beeinflusst werden kann. Ein interessanter Ansatz hierfür ist die Verlängerung des Cofaktors mit 8-Aza-7-deaza-2'-desoxyadenosin. Die Arbeitsgruppe um Prof. F. Seela konnte zeigen, dass DNA-Sequenzen, welche dieses nicht-kanonische Nukleotid anstelle von Adenosin enthielten, eine höhere Duplex-Stabilität aufwiesen.^[58] Allerdings soll nicht nur geprüft werden, welchen Einfluss die bloße Präsenz des Adenosinderivats in der Cofaktor-Sequenz auf die Polymeraseaktivität ausübt, sondern auch wie sich dieser Einfluss verändert, wenn der Anteil des Adenosinderivats an der Cofaktor-Sequenz variiert wird. Es sollten daher verschiedene DNA-Oligomere hergestellt werden, welche die Cofaktor-Sequenz 5'-GGCGCC-3' und 1- bis 15-mal das 8-Aza-7-deaza-2'-desoxyadenosin-Nukleotid am 3'-Ende der Sequenz enthielten. Entsprechende Oligonukleotide sollten chemisch mit dem Phosphoramiditverfahren an fester Phase hergestellt werden. Dies erforderte die Synthese geeigneter Nukleosidbausteine (siehe Abschnitt 2.2) Da die individuelle Synthese und Aufreinigung 15 verschiedener Nukleotid-Sequenzen einen zeit- und materialintensiven Prozess darstellt, war es das Ziel, gleichzeitig eine Methode zu etablieren, welche die Synthese möglichst vieler längendiverser Oligonukleotide in einem einzigen Syntheseansatz ermöglicht. Hierfür wurde ein Verfahren entwickelt, welches auf einer statistischen Verlängerung der wachsenden Oligonukleotidketten beruht. Die Details diesbezüglich werden ausführlich in Abschnitt 2.3 geschildert. Im nachfolgenden Teil soll zunächst die Synthese der 8-Aza-7-deaza-2'-desoxyadenosinbausteine geschildert werden.

2.2 Herstellung der für die Oligonukleotidsynthese benötigten 8-Aza-7-deaza-2'-desoxyadenosinbausteine

Die Strategie für die Synthese der benötigten 8-Aza-7-deaza-2'-desoxyadenosinderivate beruhte auf einer Vorschrift der Arbeitsgruppe um Prof. F. Seela.^[58,59] Basierend auf initialen Ergebnissen der von mir durchgeführten Masterarbeit wurde die in Abbildung 5 dargestellte Synthesestrategie entwickelt, um die Nucleoside **1** und **2** in ausreichenden Mengen für die chemische Oligonukleotidsynthese zu erhalten.

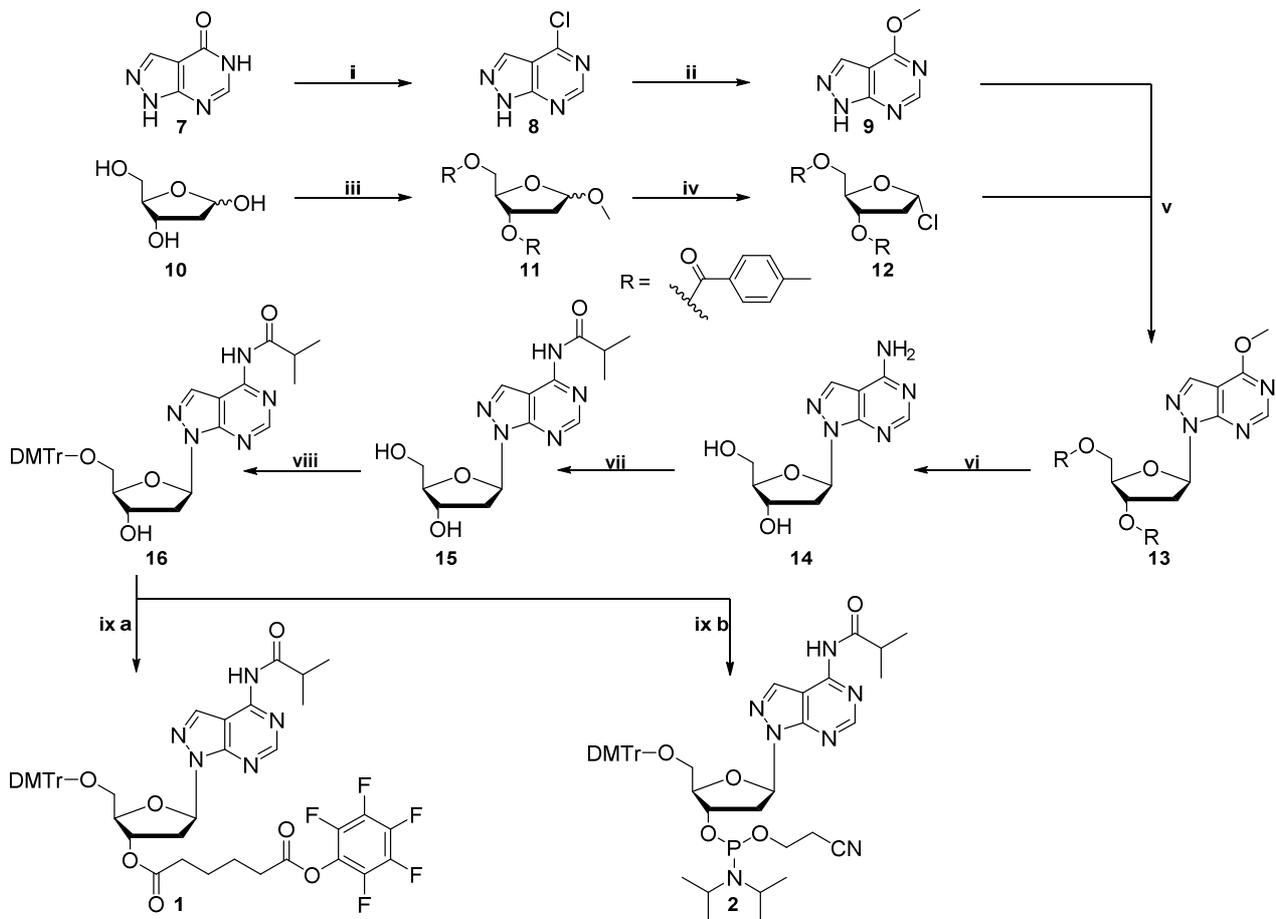


Abbildung 5: Synthesepfad für die Herstellung der funktionalisierten 8-Aza-7-deaza-2'-desoxyadenosinderivate **1** und **2**.

Die Synthese begann ausgehend von Allopurinol. Dieses musste zunächst in 6-Methoxypurin überführt werden, um eine selektive Glykosylierung zu ermöglichen. Hierfür wurde das Allopurinol zunächst mittels POCl_3 an der C6-Position chloriert, bevor eine nukleophile Substitution mit Natriummethanolat durchgeführt wurde (Abbildung 6 A). Die Ribose musste ebenfalls für die Glykosylierungsreaktion vorbereitet werden. Hierfür wurde zunächst die OH-Gruppe an der C1-Position in eine Methoxygruppe überführt. Dies konnte mit einer methanolischen HCl-Lösung erreicht werden.

Da es sich bei dem C1-Atom der Ribose um ein halbacetalisches C-Atom handelt, kann diese Position unter sauren Bedingungen selektiv methoxyliert werden, wobei ein Vollacetal entsteht. Anschließend wurden die verbliebenen Hydroxylgruppen mittels p-Toluoylchlorid geschützt.

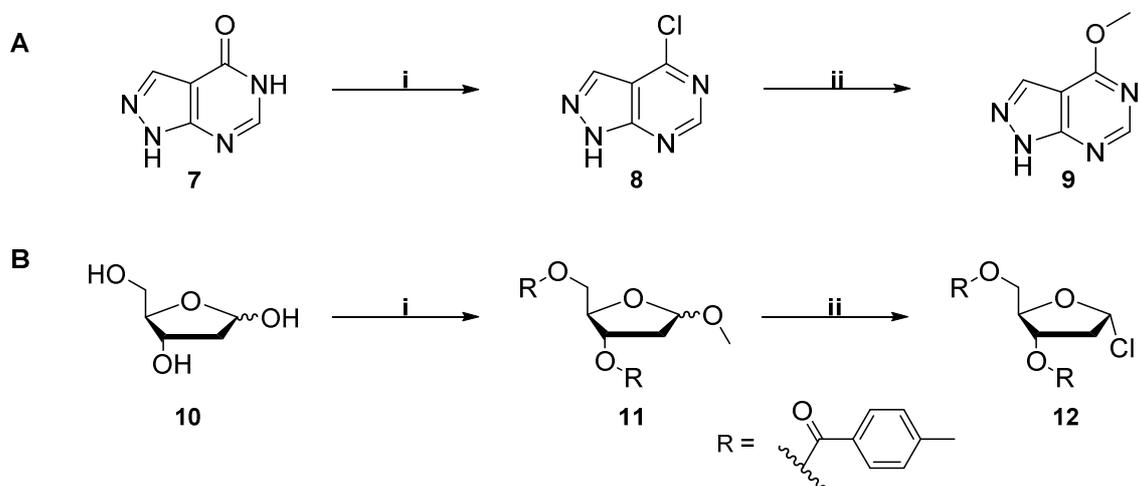


Abbildung 6: Synthese der Ausgangsverbindungen für die Glykosylierungsreaktion. A: Präparation der Nucleobase; (i) 13,41 Äq. POCl_3 , Pyridin/DMF, ÜN, 115 °C; (ii) 1,2 M Name, MeOH, ÜN, 75 °C, 41% (über beide Schritte); B: Präparation der Ribose-Komponente; (i a) 1% $\text{HCl} \cdot \text{MeOH}$, Methanol, 1 h, RT; (i b) 2,23 Äq. Toluoylchlorid, Pyridin, ÜN, RT, 83%; (ii) $\text{HCl}_{(g)}$, Diethylether, 1 h, 0 °C, 46%.

Für die Glykosylierungsreaktion musste eine gute Abgangsgruppe an der C1-Position generiert werden, weshalb die Methoxygruppe in eine Chlorgruppe überführt wurde. Dies geschah unter Verwendung gasförmigen Chlorwasserstoffs, welcher in das Reaktionsgemisch geleitet wurde.^[60] Die eingesetzte Methoxyribose **11** lag als Gemisch der α - und β -Anomere vor (Abbildung 6 B). Da die Glykosylierung jedoch einem $\text{S}_{\text{N}}2$ -Mechanismus folgt, war es erforderlich, bei dieser Reaktion das α -Chlororibose-Isomer **12** einzusetzen, um ein Nucleosid in der kanonischen β -Konfiguration zu generieren. Die Chlorierungsreaktion selbst ist nicht stereospezifisch, da sowohl das α - als auch das β -Isomer gebildet werden. Jedoch fällt bei der Reaktion das gewünschte α -Isomer als kristalliner Niederschlag aus, wodurch es vom β -Isomer getrennt werden kann. Die NMR-Eigenschaften der isolierten Verbindung stimmten mit den publizierten Werten überein.^[60] Die gewünschte Konfiguration des isolierten Ribose-Derivats konnte außerdem NMR-spektroskopisch bestätigt werden. Mittels eines 2D-NOESY-NMR-Spektrums konnte eine qualitative Aussage über die Abstandsverhältnisse zwischen dem H1- und den beiden H2-Protonen getroffen werden (Abbildung 7). Die beiden H2-Protonen lassen sich über die Intensität des jeweiligen NOESY-Kontakts zum benachbarten H3-Atom unterscheiden. Da das H2a-Proton räumlich näher an dem H3-Proton liegt als H2b, muss das entsprechende Kontaktsignal stärker sein.

Anhand dieser Unterscheidung kann man nun auch erkennen, dass das H1-Proton ebenfalls ein stärkeres Kontaktsignal zu H2a erzeugt, was nur möglich ist, wenn die chlorierte Ribose in der α -Konfiguration vorliegt. Für die Glykosylierungsreaktion wurde entschieden, von der ursprünglichen Synthesestrategie der Seela-Gruppe abzuweichen. In der ursprünglichen Vorschrift wurde die Glykosylierung in einer Phasentransfer-Reaktion mit Dichlormethan, konzentrierter Natronlauge und Bu_4NHSO_4 als Phasentransferkatalysator durchgeführt.^[59]

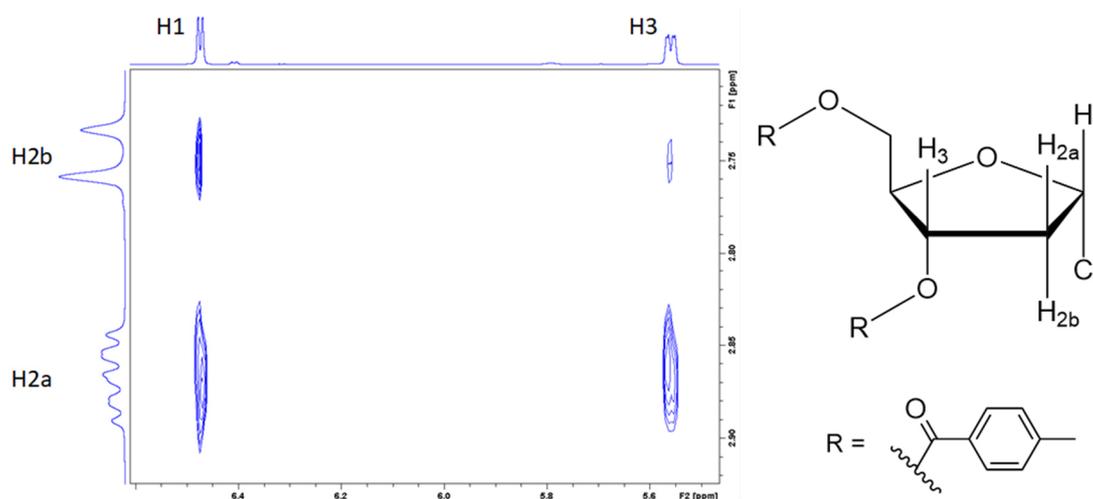


Abbildung 7: Ausschnitt NOESY-Spektrum zur Bestätigung der Anomerkonfiguration von Verbindung **12**.

Bei dieser Reaktion wurde jedoch auch das α -Isomer des Nucleosids **13** in signifikanten Mengen gebildet, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass die α -Chlororibose in Dichlormethan schnell anomerisiert.^[61,62] Die Trennung der beiden Isomere erwies sich als äußerst aufwändig und führte zu einer sehr geringen Reaktionsausbeute. Aus diesem Grund wurde entschieden, die Reaktion mit Natriumhydrid in Acetonitril durchzuführen (Abbildung 8).^[63,64] Bei der Reaktion wird das Purinderivat mittels Natriumhydrid unter Wasserstofffreisetzung deprotoniert. Über das negativ geladene N9-Atom erfolgt dann ein nukleophiler Angriff an der chlorierten C1-Position und somit die Knüpfung der glykosidischen Bindung. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die Anomerisierung der chlorierten Ribose in Acetonitril deutlich langsamer abläuft als der nukleophile Angriff des Nucleobasen-anions.^[63,65] In diesem Fall schien die Reaktion nahezu vollständig einem $\text{S}_{\text{N}}2$ -Mechanismus zu folgen, da ausschließlich die Entstehung des β -Isomers beobachtet werden konnte.

Prinzipiell ist auch eine Glykosylierung über die benachbarte N8-Position möglich. Bei der Synthese nach Seela wird diese Verbindung allerdings nur als Nebenprodukt gebildet.^[59] Bei der Glykosylierung mit Natriumhydrid wurde jedoch nur die Entstehung eines einzigen Nucleosid-isomers beobachtet.

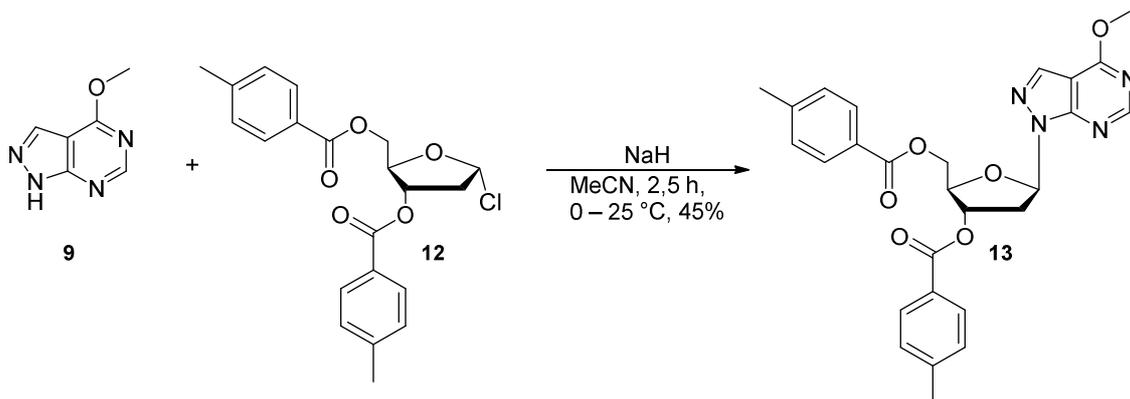


Abbildung 8: Synthese des Nucleosids **13** durch eine Glykosylierungsreaktion.

Die NMR-Signale dieser isolierten Verbindung stimmten mit den publizierten Daten für das gewünschte N9-glykosylierte, β -konfigurierte Nucleosid überein.^[59] Eigene zusätzlich durchgeführte HMBC-NMR-Untersuchungen stützten diese Ergebnisse. Bei einem HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*)-NMR-Spektrum werden Signale zwischen H- und C-Atomen detektiert, welche zwei bis drei (in manchen Fällen auch vier) kovalente Bindungen voneinander entfernt liegen. So konnte z.B. in den aufgenommenen HMBC-NMR-Spektren für Verbindung **14** und **15** jeweils ein H1'-/C4-Signal nachgewiesen werden. Dagegen konnte für keines der Nucleoside eine H1'-/C7-Korrelation detektiert werden. Dies wäre bei einer Glykosylierung über die N8-Position zu erwarten gewesen (Abbildung 9).

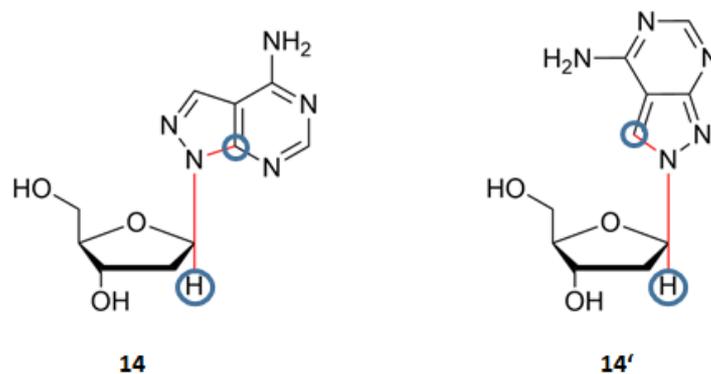


Abbildung 9: Erwartete HMBC-Korrelationen zwischen H1' und C4 (blau) bei einer N9-Glykosylierung (links) bzw. zwischen H1' und C7 bei einer N8-Glykosylierung (rechts).

Darüber hinaus konnte für eine nach dieser Methode hergestellte Verbindung **13** eine Kristallstruktur aufgenommen werden (Abbildung 10). Diese bestätigte eindeutig die β -Konfiguration des Nucleosids, sowie die Glykosylierung über die N9-Position.^[66] Die für diese Verbindung beschriebenen NMR-Spektren stimmten mit denen des im Zuge der vorliegenden Arbeit synthetisierten Nucleosids **13** überein. Daher kann zweifelsfrei davon ausgegangen werden, dass auch in diesem Fall das gewünschte Nucleosid erfolgreich hergestellt wurde.

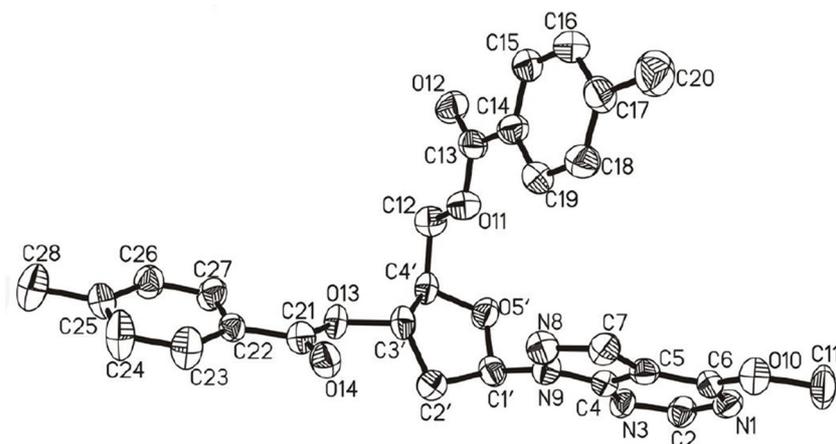


Abbildung 10: Kristallstruktur der Verbindung **13**.

Nach der Glykosylierungsreaktion musste das Nukleosid entschützt und aminiert werden. Hierfür wurde die Verbindung **13** zunächst mit Natriummethanolat behandelt, um die Toluoylschutzgruppen im Zuge einer Umesterungsreaktion zu entfernen (Abbildung 11). Anschließend wurde das entschützte Nukleosid mit konzentrierter Ammoniaklösung behandelt, um die Methoxygruppe gegen eine Aminogruppe zu substituieren. Abschließend musste das 8-Aza-7-deaza-2'-desoxyadenosinderivat **14** noch mit den notwendigen Schutzgruppen und Funktionalitäten für einen Einsatz in der chemischen Oligonukleotidsynthese ausgestattet werden. Hierfür wurde die exozyklische Aminofunktion zunächst mit Isobutyrylchlorid geschützt. Anschließend wurde die 5'-OH-Gruppe mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (DMTr-Cl) maskiert.

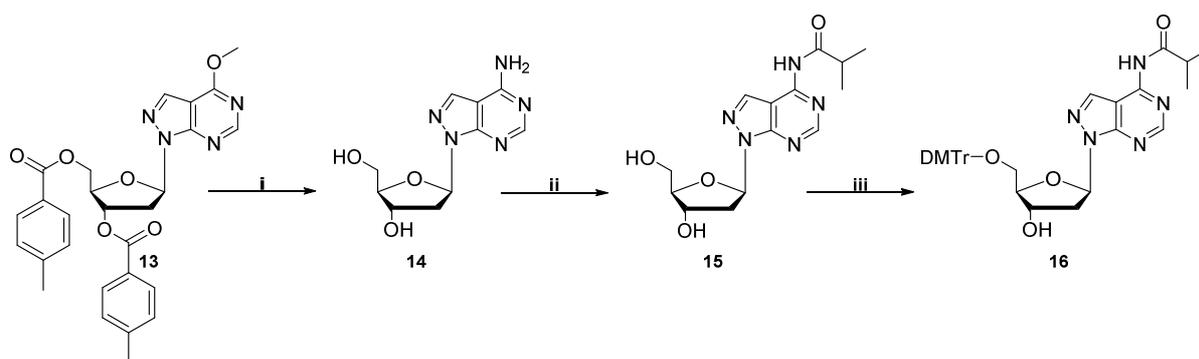


Abbildung 11: Synthese des Nucleosids **16** als Ausgangsverbindung für die Herstellung der Zielmoleküle **1** und **2**. (i a): 1,2 M NaOMe, Methanol, 3 h, RT; (i b): konz. NH₃-Lsg._(aq), 3 Tage, RT, 82%; (ii a): 5 Äq. TMS-Cl, Pyridin, 1 h, RT; (ii b): 2 Äq. Isobutyrylchlorid, Pyridin, ÜN, RT; (ii c): NH₃/H₂O, Pyridin, 30 min, RT, 79%; (iii): 1,3 Äq. DMTr-Cl, Pyridin, 4,5 h, RT, 32%

Das bei dieser Reaktion erhaltene Nucleosid **16** war die Ausgangsverbindung für zwei unterschiedliche Reaktionen. Zum einen musste ein Startbaustein für die Festphasensynthese generiert werden. Hierfür wurde das Nucleosid an der 3'-OH-Gruppe mit einem Aktivester versehen (Abbildung 12).

Bei dem Aktivester handelte es sich um eine Verbindung aus Adipinsäure und Pentafluorphenol.^[67] Durch den starken elektronenziehenden Effekt der Fluorgruppen wird die Esterbindung relativ labil, wodurch der Angriff eines Nucleophil begünstigt wird. Des Weiteren bewirken die Fluorsubstituenten eine Erhöhung der Säurestärke des Pentafluorphenols im Vergleich zum Phenol (pKs 5,5 anstatt 9,9).^[68] Dies führt zu einer verringerten Basizität des Pentafluorphenolats, was die Abgangsgruppenqualität verbessert. Bei der Reaktion wurde das Dipentafluorphenoladipat in nahezu 5-fachem Überschuss eingesetzt, um eine ungewollte Dimerisierung zweier Nucleoside zu vermeiden. Bei der säulenchromatographischen Aufreinigung musste ein Lösungsmittelgemisch aus DCM und Aceton verwendet werden. Die Verwendung eines alkoholischen Lösungsmittels wie z.B. Methanol hätte eine Umesterungsreaktion mit der verbliebenden Pentafluorphenolgruppe einleiten können.

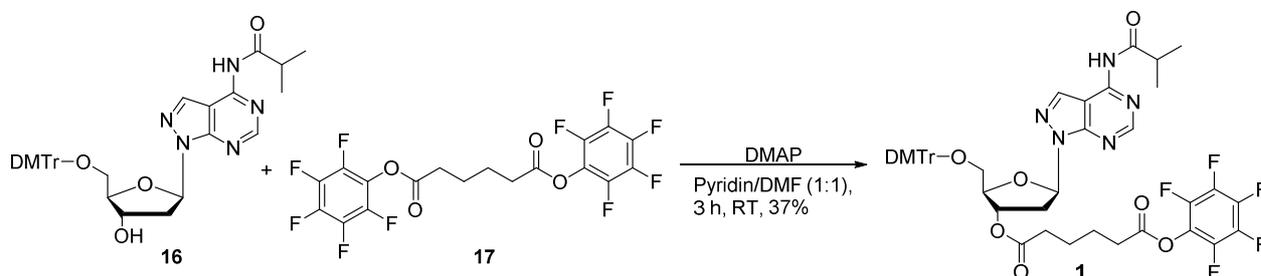


Abbildung 12: Funktionalisierung des Nucleosids **16** mit einem Linkermolekül **17** für eine Anbindung an die feste Phase.

Der andere erforderliche Baustein war ein Phosphoramidit für die iterative Verlängerung der Nucleotidkette. Als Phosphitylierungsreagenz wurde 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorphosphoramidit gewählt (Abbildung 13), da Cyanoethylphosphoramidite die Standardbausteine in der chemischen Oligonucleotid-Festphasensynthese darstellen. Aufgrund der geringen Stabilität der Phosphoramidite wurde die Verbindung **2** allerdings erst synthetisiert, nachdem grundlegende Strategie-Untersuchungen zur Synthese längendiverser Oligonucleotide durchgeführt worden waren. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im folgenden Abschnitt detailliert erläutert.

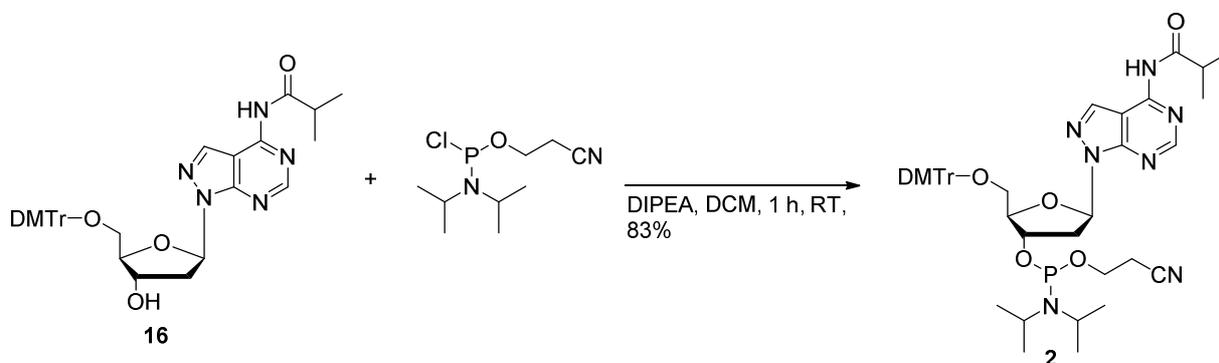


Abbildung 13: Phosphitylierung der Verbindung **16**.

2.3 Untersuchungen zur Herstellung längendivergener Oligonukleotide

In der chemischen Festphasensynthese werden Oligonukleotide primär nach dem Phosphoramiditverfahren synthetisiert. Dieses Verfahren wurde in den frühen 80er Jahren durch die Arbeitsgruppe um Prof. Marvin Caruthers etabliert und in den folgenden Jahren weiterentwickelt und optimiert.^[69,70] Heutzutage gibt es eine Vielzahl an unterschiedlichen Herangehensweisen für die Oligonukleotid-Festphasensynthese mit unterschiedlichen Trägermaterialien, Aktivator-Reagenzien, oder Nucleosidbausteinen. Das Grundprinzip ist jedoch nahezu immer gleich. Zunächst wird das an einen Träger gebundene Startnucleosid detrityliert und so für den nachfolgenden Kopplungsschritt mit einem Phosphoramidit-Baustein vorbereitet. Nach diesem Schritt erfolgt eine Acetylierung (Capping-Schritt) zur Inaktivierung aller Nucleoside, welche bei dem Kopplungsschritt nicht reagiert haben. Dies ist erforderlich, um die Entstehung von Mischsequenzen im Laufe der Synthese zu vermeiden. Im nächsten Schritt wird das Phosphit zu einem Phosphat oxidiert. Abschließend wird die DMTr-Gruppe an der verlängerten Nucleosidkette entfernt und der Synthesekreislauf kann erneut beginnen. Abbildung 14 zeigt ein vereinfachtes Schema des Synthesekreislaufs.

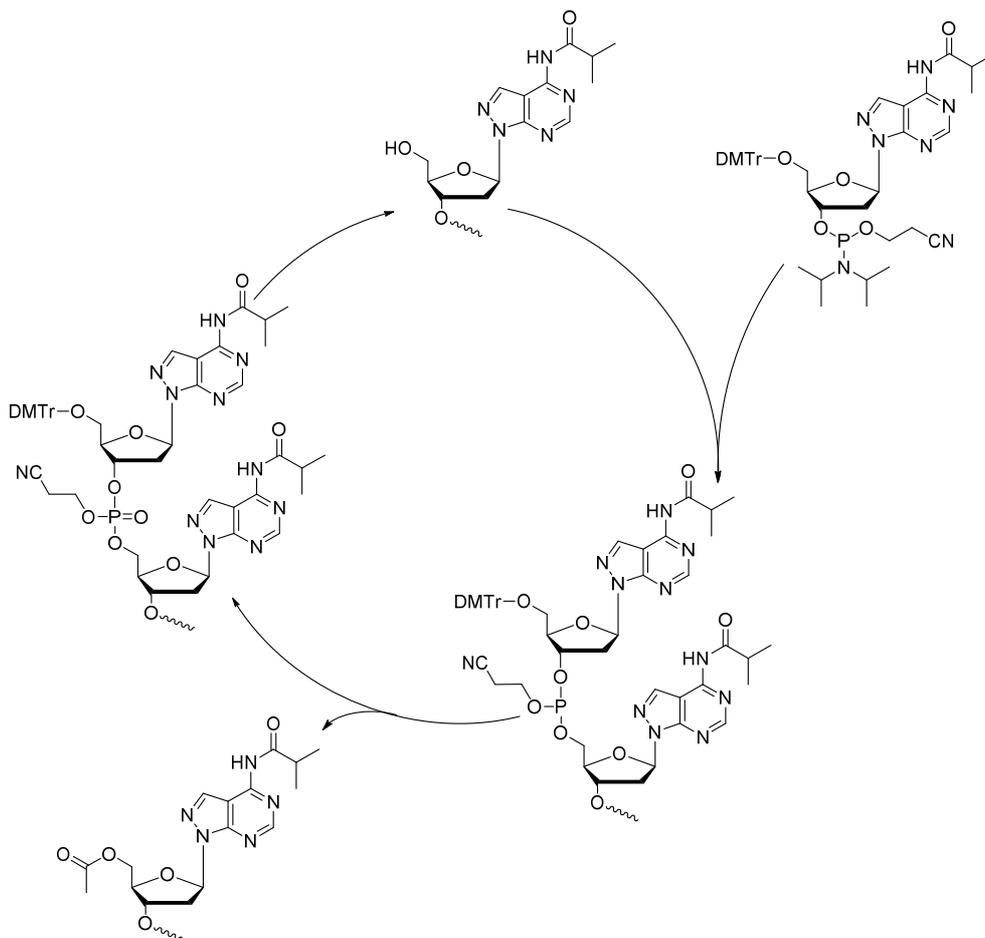


Abbildung 14: Vereinfachte Darstellung des Synthesekreislaufs im Phosphoramiditverfahren.

Das Phosphoramiditverfahren wurde im Laufe der Jahre soweit optimiert, dass inzwischen Ausbeuten von >99,5% pro Kopplungsschritt möglich sind. Derartig hohe Kopplungseffizienten sind auch erforderlich, um die chemische Synthese längerer Oligonukleotidsequenzen überhaupt möglich zu machen. Berechnungen zeigen, dass eine Reduktion der Kopplungseffizienz von 2,5 % (von 99,5% auf 97%) bereits ausreicht um die Gesamtausbeute bei 40 Kopplungsschritten von etwa 90% auf knapp 40% zu verringern.^[71]

Die grundsätzlich hohen Reaktionsausbeuten in der Phosphoramidit-basierten chemischen Oligonukleotidsynthese stellten für die vorliegende Arbeit jedoch ein Problem dar. Wie bereits in Abschnitt 2.1 erwähnt, war es das Ziel, möglichst viele Oligonukleotide unterschiedlicher Länge in einem einzigen Syntheseansatz herzustellen. Im Idealfall sollte nach Abschluss der Synthese ein möglichst ausgeglichenes Verhältnis zwischen den hergestellten Oligonukleotiden vorliegen. Das heißt, dass die unterschiedlich langen Oligonukleotidfragmente jeweils zu etwa gleich großen Anteilen vorkommen sollten.

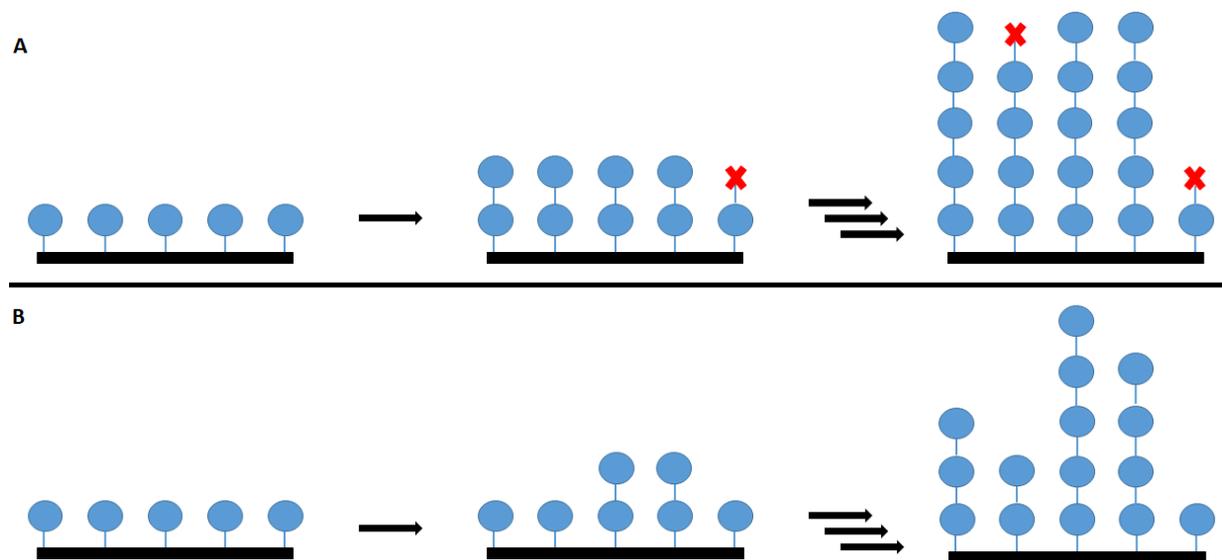


Abbildung 15: Schematische Darstellung für die Ausbildung unterschiedlicher Längenverhältnisse in der chemischen Oligonukleotidsynthese an fester Phase. **A:** Übliche Längenverhältnisse für unter Standardbedingungen synthetisierte Oligonukleotide. **B:** beabsichtigte Längenverhältnisse bei der Herstellung längendiverser Oligonukleotide unter abgewandelten Bedingungen; blau: immobilisierte Nucleoside bzw. Oligonukleotide, rot: Capping-Gruppen

Durch hohe Kopplungsausbeuten werden jedoch zwangsläufig primär längere Oligonukleotidsequenzen generiert, da nahezu alle verfügbaren Nucleoside mit den Phosphoramidit-Bausteinen reagieren und das Auftreten von Abbruchfragmenten minimiert wird (Abbildung 15 A). Der Capping-Schritt bewirkt außerdem, dass Oligonukleotide, welche bei der Kopplungsreaktion nicht verlängert wurden, in nachfolgenden Synthesesyklen nicht länger als Reaktionspartner für die Phosphoramidit-Bausteine zur Verfügung stehen. Daher wurde für die Synthese längendiverser Oligonukleotide entschieden, eine geringere

Konzentration an Phosphoramidit-Bausteinen einzusetzen, um so die Ausbeuten der einzelnen Kopplungsschritte zu verringern und auf diese Weise sicherzustellen, dass pro Syntheszyklus nicht mehr nahezu alle freien Nucleoside mit den Phosphoramiditen reagieren (Abbildung 15 B). Durch den Verzicht auf das Capping sollte außerdem garantiert werden, dass die Menge an potentiellen Reaktionspartnern für die Phosphoramidit-Bausteine während der gesamten Synthese konstant bleibt.

Auch der Einfluss des Trägermaterials wurde überprüft. Es wurden sowohl *Controlled Pore Glass* (CPG)-Träger unterschiedlicher Porengröße, als auch ein Amino-funktionalisierter Polystyrol-Träger getestet. Um die Untersuchungen möglichst ökonomisch zu halten, wurden zur Ermittlung der optimalen Synthesebedingungen zunächst ausschließlich Thymidinsequenzen hergestellt. Die jeweils abgeänderten Bedingungen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die aus den verschiedenen Synthesen erhaltenen längendiversen Oligomere wurden mittels IE-HPLC analysiert. Bei der nachfolgenden Vorstellung der Ergebnisse sind nicht alle aufgenommenen Chromatogramme aufgeführt. Eine Gesamtübersicht aller relevanten Chromatogramme ist im Anhang enthalten (Anhang 1 – Anhang 9).

Tabelle 1: Herstellung längendiverser Oligonucleotide. Synthesebezeichnungen und jeweils veränderte Variablen.

Synthesename	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Phosphoramiditkonzentration [M]	0,1	0,05	0,025	0,025	0,025	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04
Trägermaterial	CPG 1000 Å	CPG 1000 Å	CPG 1000 Å	CPG 500 Å	Tenta- Gel	CPG 500 Å	Tenta- Gel	CPG 500 Å (sb*)	Tenta- Gel (sb*)	Tenta- Gel (sb*)
*sb: selbst beladen										

Zunächst wurde überprüft, welchen Einfluss der Verzicht des Cappingschritts auf das Synthesergebnis hat. Hierfür wurde die Oligonucleotid-Synthese unter Standardbedingungen durchgeführt (Synthese **A**), während die Capping-Reagenzien A und B gegen Acetonitril ausgetauscht wurden. Eine nachfolgende Analyse der synthetisierten Sequenzen mittels *Ionexchange*-HPLC (IE-HPLC) zeigte bereits mehrere Oligonucleotidfragmente unterschiedlicher Länge auf. Allerdings dominierten in diesem Fall Oligonucleotide mit einer

Länge von 12 bis 15 Nukleotiden. Daher wurde für die nächste Synthese die Phosphoramiditkonzentration von 0,1 M auf 0,05 M reduziert (Synthese **B**).

Eine Halbierung der Standardkonzentration an Phosphoramiditen führte bereits dazu, dass in einer einzigen Synthese alle ODN-Fragmente mit einer Länge von 1 bis 15 Nukleotiden hergestellt werden konnten (Abbildung 16). Die Peakflächen aus dem Chromatogramm lassen sich allerdings nicht direkt miteinander vergleichen, da die unterschiedlichen langen ODN-Fragmente über unterschiedliche Extinktionskoeffizienten verfügen. Aus diesem Grund wurden die integrierten Peakflächen auf den Extinktionskoeffizienten des jeweiligen Oligonukleotids normiert. Diese normierten Peakflächen wurden anschließend addiert, so dass für jeden einzelnen Peak der Anteil an der Gesamtfläche ausgerechnet werden konnte (Abbildung 17).

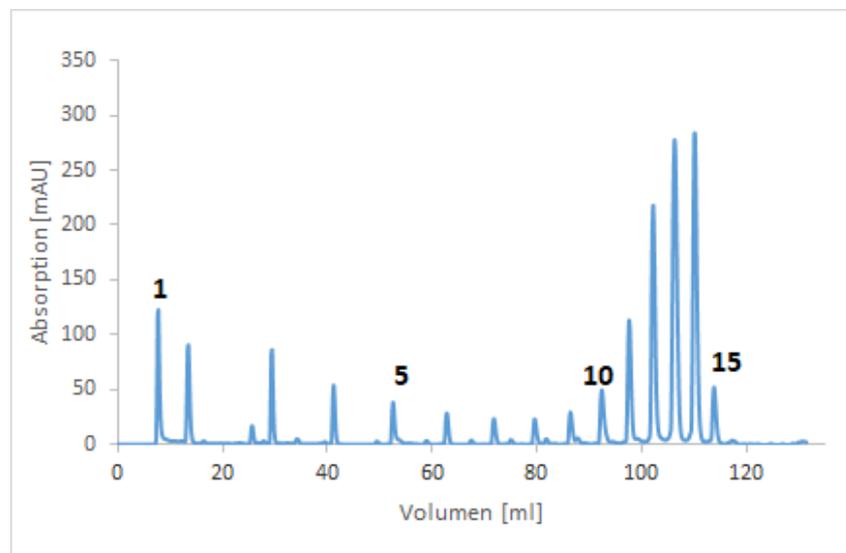


Abbildung 16: IE-HPLC Chromatogramm für Synthese **B**. Phosphoramiditkonzentration: 0,05 M; Träger: CPG 1000 Å; HPLC-Gradient 3 (siehe Abschnitt (6.2.11), Absorptionsmessung bei 260 nm.

Interessant an diesen Ergebnissen ist, dass eine wellenartige Verteilung mit hauptsächlich kürzeren und längeren Fragmenten zu erkennen ist. Es ist ein generell beobachtetes Phänomen, dass die ersten Kopplungsschritte in der Festphasensynthese mit geringerer Ausbeute ablaufen. Vermutlich sind längere Oligonukleotide in Bezug auf die flüssige Phase stärker exponiert und reagieren daher bevorzugt mit den Phosphoramidit-Bausteinen. Dieser Effekt ist abhängig vom verwendeten Trägermaterial unterschiedlich stark ausgeprägt, weshalb für spätere Synthesen andere Träger getestet wurden.

Eine Verringerung der Phosphoramiditkonzentration auf 0,025 M (Synthese **C**, Anhang 2) führte zwar dazu, dass vermehrt Oligonukleotide mittlerer Länge synthetisiert wurden, allerdings war auch in diesem Fall eine wellenartige Verteilung der Längenverhältnisse zu

beobachten. Des Weiteren wurde unter diesen Synthesebedingungen die Entstehung des 15-mers nahezu vollständig unterbunden. Aus diesem Grund wurde beschlossen, einen CPG-Träger mit geringerer Porengröße (500 Å anstatt 1000 Å) einzusetzen.

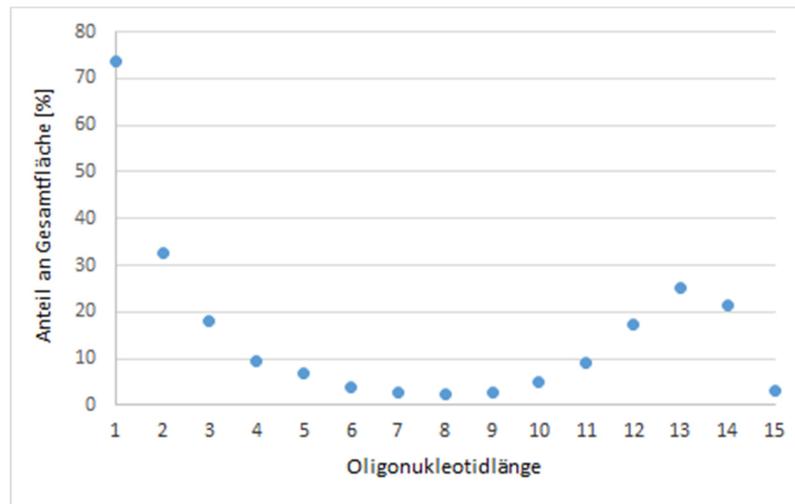


Abbildung 17: Prozentualer Anteil der einzelnen Oligomere an der normierten Gesamtfläche (Synthese B).

CPG-Träger mit kleineren Porengrößen sind für die Synthese kürzerer Nukleotidsequenzen besser geeignet, da bei diesen das Verhältnis zwischen Beladungsdichte und Porenoberfläche besser ist. Erst bei längeren Oligomeren (>60-mer) werden die sterischen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Nukleotidketten so groß, dass die Kopplungsausbeute deutlich abnimmt und die Verwendung eines Trägers mit größeren Poren vorteilhaft wird.^[72] Die Verwendung des 500 Å CPG-Trägers in Kombination mit einer Phosphoramiditkonzentration von 0,025 M (Synthese D) führte zu einem wesentlich ausgeglichenerem Längenverhältnis der synthetisierten ODNs (Abbildung 18). Abgesehen von dem hohen Anteil an Monomeren folgt die Peakflächenverteilung annähernd einer Gauß-Kurve. Bedauerlicherweise konnten unter diesen Bedingungen weder das 15- noch das 14-mer in befriedigender Ausbeute synthetisiert werden.

Als nächstes wurde ein TentaGel-Träger (Rapp Polymere) eingesetzt. Bei diesem Träger handelt es sich um ein Co-Polymer bestehend aus geringvernetztem Polystyrol und Polyethylenglycol (PEG). Die PEG-Einheit verleiht dem TentaGel ein konstantes Quellverhalten in den meisten organischen und wässrigen Lösungsmitteln und verleiht dem Träger gelartige Eigenschaften, die eher einer flüssigen als einer festen Phase gleichen.^[72,73] Dies ist vermutlich der Grund, warum anders als bei CPG-Trägern, bei denen die Kopplungsausbeuten bei einer Beladungsdichte von >40 µmol/g abnehmen, mit TentaGel-Trägern sehr hohe Beladungsdichten ohne Effizienzverluste möglich sind.^[74] Die Verwendung des TentaGel-Trägers in Kombination mit einer Phosphoramiditkonzentration von 0,025 M

(Synthese **E**) ergab einen sehr hohen Anteil an Monomeren, während die übrigen Oligomere in vergleichbaren Verhältnissen vorlagen (Anhang 4). Die Peakflächenverteilung glich nun einer exponentiell abfallenden Kurve.

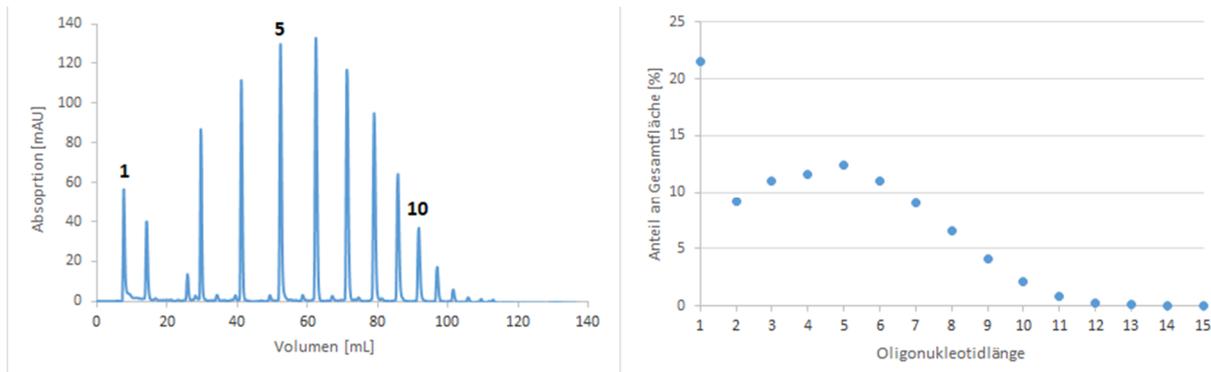


Abbildung 18: IE-HPLC Chromatogramm und Peakflächenverteilung der Oligomere für Synthese **D**. Phosphoramiditkonzentration: 0,025 M; Träger: CPG 500 Å; HPLC-Gradient 3 (siehe Abschnitt (6.2.11)), Absorptionsmessung bei 260 nm.

Allerdings konnte auch in diesem Fall kein 15-mer isoliert werden, weshalb entschieden wurde, die Phosphoramiditkonzentration auf 0,03 M zu erhöhen. Bei dieser Konzentration konnten sowohl mit dem CPG- als auch mit dem TentaGel-Träger alle Oligonukleotid-Fragmente synthetisiert werden. Jedoch trat beim CPG-Träger unter diesen Bedingungen (Synthese **F**, Anhang 5) eine Häufung der längeren Oligomere (12-15 Nukleotide) auf, während die Längenverhältnisse beim TentaGel-Träger (Synthese **G**), abgesehen vom hohen Monomer-Anteil, ausgeglichener waren (Abbildung 19).

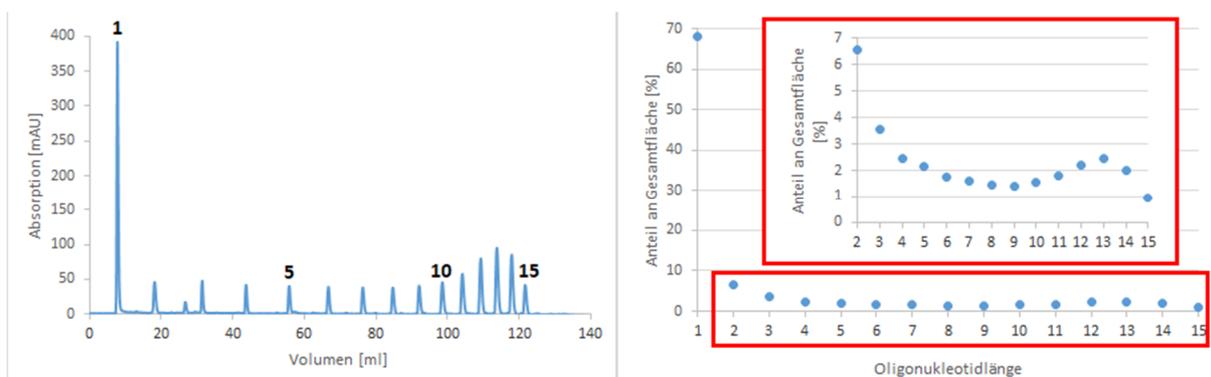


Abbildung 19: IE-HPLC Chromatogramm und Peakflächenverteilung der Oligomere für Synthese **G**. Phosphoramiditkonzentration: 0,03 M; Träger: TentaGel; HPLC-Gradient 3 (siehe Abschnitt (6.2.11)), Absorptionsmessung bei 260 nm.

Angesichts dieser Ergebnisse (Abbildung 19) erwiesen sich die Bedingungen aus Synthese **G** als vielversprechend für weitere Untersuchungen. Allerdings konnte durch die Untersuchungen ebenfalls gezeigt werden, dass bereits kleine Veränderungen der Synthesebedingungen die Ergebnisse der Synthese erheblich beeinträchtigen können.

Bis zu diesem Zeitpunkt wurden die Tests mit kommerziell erworbenen und bereits beladenen Trägermaterialien durchgeführt. Diese Träger wiesen relativ hohe Beladungsdichten auf (CPG 500 Å: 62,2 $\mu\text{mol/g}$, TentaGel: 195 $\mu\text{mol/g}$). Für die spätere Herstellung längendiverser Oligonukleotide mit dem synthetisierten 8-Aza-7-deaza-2'-desoxyadenosinderivat war es allerdings erforderlich den Träger eigenständig mit dem Nukleosid **1** (Abbildung 12, Abschnitt 2.2) zu beladen, da es keine kommerziell verfügbaren Trägermaterialien gibt, welche bereits mit dem Zielmolekül **1** beladen sind.

Da nicht sichergestellt werden konnte, ob bei der Immobilisierung des Adenosinderivats **1** ähnlich hohe Beladungsdichten erzielt werden könnten, wurde beschlossen, die Synthesen **F** und **G** mit eigenständig beladenen Trägermaterialien zu wiederholen. Hierfür wurde DMTr-geschütztes Thymidin **18** an der 3'-OH-Gruppe mit dem Pfp-Adipinsäure-Linkermolekül **17** verestert und an einem CPG- bzw. TentaGel-Träger immobilisiert (Abbildung 20).

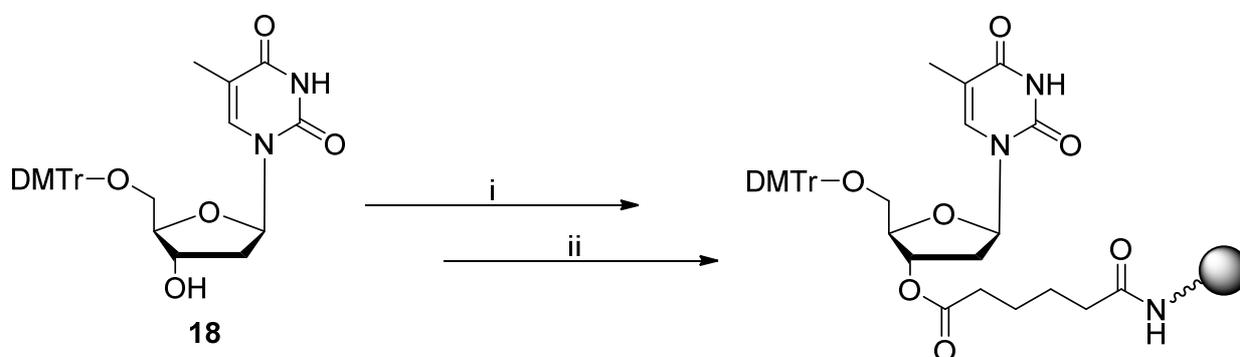


Abbildung 20: Funktionalisierung eines Thymidinderivats mit einem Pfp-Linkermolekül und anschließende Immobilisierung an einem Träger. (i): 1 Äq. DMAP, 4,9 Äq. Pfp-Adipinsäureester, Pyridin/DMF (1:1), 3 h, RT; (ii a): 1 Äq. CPG- bzw. TentaGel-Träger, 2 Äq. Pyridin, DMF, ÜN, RT; (ii b): 0,5 M DMAP in MeCN, Essigsäureanhydrid/syn-Collidin/MeCN (2/3/5), 20 min, RT.

Die Bestimmung der Beladungsdichte erfolgte photometrisch. Eine Probe der beladenen Trägermaterialien wurde mit Trifluoressigsäure (TFA) behandelt, um die DMTr-Gruppe abzuspalten. Anschließend erfolgten UV-Vis-Messungen, aus denen über die eingesetzte Probenmenge und den spezifischen Extinktionskoeffizienten des DMTr-Kations die jeweilige Beladungsdichte des Trägers zweifelsfrei ermittelt werden konnte (siehe Abschnitt 6.3.13).^[75] Hierbei konnte für den CPG-Träger eine Beladungsdichte von 27 $\mu\text{mol/g}$ und für den TentaGel Träger eine Beladungsdichte von 115 $\mu\text{mol/g}$ erzielt werden. Interessanterweise konnte in den nachfolgenden Synthesen **H** (Anhang 7) und **I** (Anhang 8) das 15-mer gar nicht oder nur in äußerst geringen Mengen hergestellt werden, obwohl die Phosphoramiditkonzentration mit 0,3 M unverändert war. Dieses Ergebnis war überraschend, da eine geringere Beladungsdichte keinen negativen Einfluss auf die Kopplungsausbeute haben sollte.

Wie bereits zuvor erwähnt, kann die Kopplungseffizienz bei Verwendung besonders dicht beladener CPG-Träger aufgrund sterischer Wechselwirkungen abnehmen. Allerdings wird für die Synthese langer Oligomere (>100 NTs) die Verwendung dünn beladener CPG-Träger (~5 µmol/g) empfohlen, da dies die Kopplungsausbeuten verbessert.^[72] Im Falle einer verhältnismäßig niedrigen Phosphoramiditkonzentration scheint allerdings eine hohe Beladungsdichte des Trägers von Vorteil zu sein.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde entschieden, bei der Verwendung des selbstbeladenen TentaGel-Trägers eine Phosphoramiditkonzentration von 0,04 M einzusetzen, um die Herstellung aller benötigter Oligonukleotide sicherzustellen (Synthese J). Eine nachfolgende Analyse ergab, dass unter diesen Bedingungen erneut ein großer Monomerüberschuss generiert wurde, aber alle weiteren Oligomere in ausgeglichenen Mengen vorlagen (Abbildung 21). Somit wurde beschlossen, die Bedingungen aus Synthese J für die weiteren Untersuchungen zu verwenden.

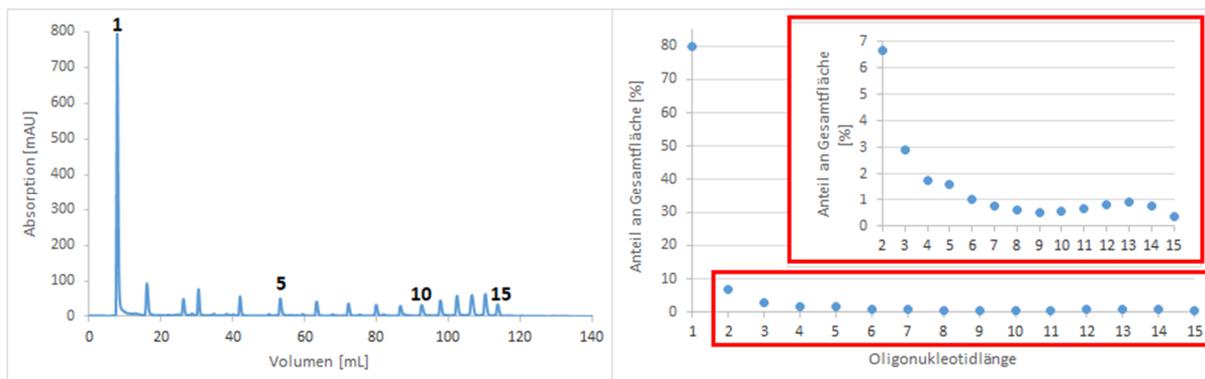


Abbildung 21: IE-HPLC Chromatogramm und Peakflächenverteilung der Oligomere für Synthese J. Phosphoramiditkonzentration: 0,04 M; Träger: TentaGel; HPLC-Gradient 3 (siehe Abschnitt (6.2.11), Absorptionmessung bei 260 nm.

2.4 Verwendung der hergestellten 8-Aza-7-deaza-2'-desoxyadenosinderivate in der chemischen Festphasensynthese

Wie bereits in Abschnitt 2.1 erläutert, war es wichtig, dass alle generierten längendiversen Oligonukleotide am 5'-Ende die Cofaktor-Sequenz 5'-GGCGCC-3' aufwiesen. Dies bedeutete, dass zunächst die längendiversen Oligomere mit den Bedingungen aus Synthese J hergestellt werden mussten, um diese dann unter Standardbedingungen (Abschnitt 6.2.2, Tabelle 6) mit der oben genannten Sequenz zu verlängern. Durch dieses kombinierte Syntheseverfahren sollten am Ende Oligomere mit einer Länge von 7 bis 21 Nukleotide hergestellt werden. Dieser Längenbereich ergibt sich aus dem Größenverhältnis der längendiversen Oligomere (1-15 NTs) und der Länge der Cofaktor-Sequenz (6 NTs).

Für die gezielte Isolierung dieses Oligomerpools musste allerdings im Vorfeld noch die Aufreinigungsmethodik optimiert werden. Da die Ausbeuten der einzelnen Kopplungsschritte auch unter Standardbedingungen nicht bei 100% liegen, ist bei der Anfügung der Cofaktor-Sequenz mit der Entstehung von Abbruchfragmenten zu rechnen. Größentechnisch wären ein Oligomer mit einer 15 NTs-langen 8-Aza-7-deaza-2'-desoxyadenosin-Kette und einer um 2 Nukleotide verkürzten Cofaktor-Sequenz nicht von einem Oligomer mit 13 Adenosinderivat-Nukleotiden und einer vollständigen Cofaktor-Sequenz unterscheidbar. Es wäre außerdem nicht möglich, diese beiden Oligomere mittels IE-HPLC voneinander zu trennen. Zwar sollte aufgrund der üblicherweise sehr hohen Kopplungsausbeuten unter Standardbedingungen die Entstehung von Abbruchfragmenten gering sein, dennoch war es wichtig, eine Strategie zu entwickeln, um sicherzustellen, dass nur Oligomere isoliert würden, welche die vollständige Cofaktor-Sequenz am 5'-Ende aufwiesen. Aus diesem Grund wurde entschieden, die Anfügung dieser Sequenz unter *DMT-ON* Bedingungen durchzuführen. Dies bedeutet, dass die DMTr-Gruppe nach dem letzten Kopplungsschritt nicht von der Oligomerkette abgespalten wird. Die vorhandene DMTr-Gruppe ermöglicht eine Aufreinigung mittels *reversed-phase*-HPLC (RP-HPLC). Im Prinzip sollte es möglich sein, mit dieser Methode nur die Oligonukleotide zu isolieren, welche eine 5'-DMTr-Gruppe aufweisen, da DMTr-geschützte Oligonukleotide in diesem Fall deutlich später eluiert werden sollten als ungeschützte DNA-Sequenzen. Durch die Durchführung des Cappingschritts bei der Anfügung der festen Sequenz wurde sichergestellt, dass alle Oligonukleotide mit einer DMTr-Gruppe zwangsläufig über die vollständige Cofaktor-Sequenz verfügen mussten (*full-length*-Oligomere). Nach der vorausgegangenen Aufreinigung mittels RP-HPLC müsste es möglich sein, die verschiedenen langen *full-length*-Oligomere mittels IE-HPLC voneinander zu trennen.

Um die Praktikabilität dieser Methode zu verifizieren, wurden erneut längendiverse Thymidinoligonukleotide unter den Bedingungen der Synthese **J** hergestellt. Nachdem diese Synthese abgeschlossen war, wurde direkt mit der Anfügung der Cofaktor-Sequenz an die noch immobilisierten längendiversen Oligonukleotide begonnen. Anschließend wurden die Oligomere mit einer Ammoniak/Methylamin-Lösung entschützt und von der festen Phase abgespalten, bevor eine vorläufige Aufreinigung mittels RP-HPLC durchgeführt wurde. Bei dieser konnten drei klar voneinander abgegrenzte Fraktionen identifiziert werden (Abbildung 22). Es wurde davon ausgegangen, dass es sich bei dem ersten Peak um Monomere oder nicht nukleosidische polare Verbindungen handelte. Die zweite Fraktion enthielt dagegen vermutlich ungeschützte Abbruchfragmente, während die dritte Fraktion die gewünschten 7 bis 21 NTs langen DMTr-geschützten Oligomere enthalten sollte.

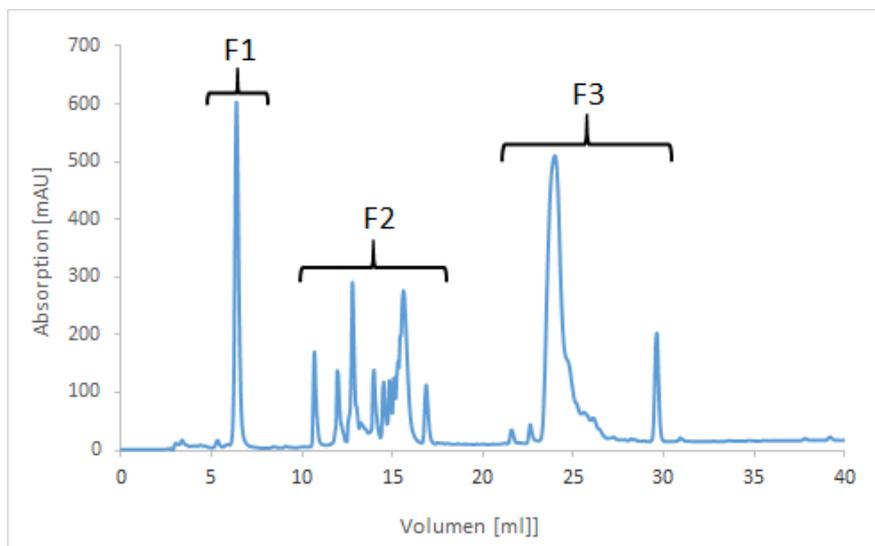


Abbildung 22 RP-HPLC Chromatogramm aus kombinierter ODN-Synthese; HPLC-Gradient 2 (siehe Abschnitt 6.2.11), Absorptionsmessung bei 260 nm.

Zur Sicherheit wurden sowohl Fraktion 2, als auch Fraktion 3 gesammelt und einer sauren Entschützung zur Abspaltung der DMTr-Gruppe unterzogen. Um eine ausreichende Probenmenge für die nachfolgenden Analysen zu erhalten, wurden die jeweiligen Fraktionen aus vier RP-HPLC-Aufreinigungen gesammelt und zusammengeführt. Anschließend wurden die entschützten Fraktionen mittels IE-HPLC analysiert. Bedauerlicherweise erbrachte die IE-Analyse keine aussagekräftigen Ergebnisse. Die jeweiligen Oligomere wurden nicht in den erwarteten Pufferbereichen eluiert. Außerdem konnte keine klare Auftrennung der einzelnen Fragmente erreicht werden. Es ist davon auszugehen, dass mittels der RP-HPLC-Aufreinigung keine klare Trennung der DMT-ON und der DMT-OFF Oligomere erzielt werden konnte.

Obwohl bei der RP-HPLC Aufreinigung die Fraktionen 2 und 3 klar voneinander abgegrenzt waren, kann angesichts der Ergebnisse aus der IE-HPLC Analyse nicht ausgeschlossen werden, dass beispielsweise kurze DMT-ON und lange DMT-OFF Oligomere gemeinsam eluiert wurden. Es ist ebenfalls möglich, dass es während der sauren Abspaltung der DMTr-Gruppe zu Depurinierungsreaktionen kam, was eine Erklärung für die unzureichende Auflösung des IE-Chromatogramms darstellen könnte. Insgesamt konnte festgestellt werden, dass das Aufreinigungsverfahren zur Isolierung der längendiversen Oligonukleotide weiterer Optimierungsarbeiten bedarf.

Aus diesen Gründen wurde beschlossen, die Oligomere mit dem 8-Aza-7-deaza-2'-desoxyadenosinderivat unter Standardbedingungen herzustellen, um die synthetisierten Zielmoleküle **1** und **2** möglichst effizient einzusetzen. Da die Menge des synthetisierten Phosphoramidits (Verbindung **2**) nicht ausreichte, um individuell 15 verschiedene Sequenzen mit einem jeweils unterschiedlichen 8-Aza-7-deaza-2'-desoxyadenosin zu generieren, wurde entschieden, einzelne Sequenzen mit einem sehr unterschiedlichen Anteil des Adenosinderivats herzustellen. Es wurden insgesamt drei unterschiedliche Oligomere im 0,2 µmol-Maßstab synthetisiert, welche das Adenosinderivat 1-, 5- bzw. 20-mal in der Sequenz enthielten (Tabelle 2).

Tabelle 2: Synthetisierte ODNs mit unterschiedlichem Anteil an 8-Aza-7-deaza-2'-desoxyadenosin.

Name	Sequenz	Länge (NTs)
ODN 1	5'-GGCGCC A*-3'	7
ODN 2	5'-GGCGCC A* ₅ -3'	11
ODN 3	5'-GGCGCC A* ₂₀ -3'	26
A* = 8-Aza-7-deaza-2'-desoxyadenosin		

Die hergestellten Oligomere wurden mittels einer analytischen Gelelektrophorese unter Verwendung verschiedener Referenzsequenzen geeigneter Länge untersucht (Anhang 10). ODN **3** zeigte dabei ein leicht unterschiedliches Laufverhalten im Vergleich zur Referenzsequenz. Vermutlich beeinflusst der hohe Anteil an 8-Aza-7-deaza-2'-desoxyadenosin die polymeren Eigenschaften des Oligonukleotids aufgrund besonderer konformativer Eigenschaften, sowie durch veränderte *base stacking* Effekte.^[76,77] Eine Bestätigung der Molekülmasse mittels MALDI-Tof war aufgrund der geringen Probenmenge nicht möglich.

Grundsätzlich stellt die im Zuge dieser Arbeit etablierte Methode zur Generierung längendiverser Oligonukleotide einen vielversprechenden Ansatz dar. Es konnte gezeigt

werden, dass es möglich ist, viele unterschiedlich lange Oligomere in einem einzigen Syntheseansatz herzustellen. Allerdings bedarf es weiterer Optimierungsarbeiten, bevor die Methode zuverlässig eingesetzt werden kann. Infrage kämen dabei unter anderem eine sanftere Methode zur Entfernung der DMTr-Gruppe, um ungewollte Depurinierungsreaktionen ausschließen zu können.^[78] Prinzipiell erscheint eine Voraufreinigung der längendiversen Oligonukleotide mittels RP-HPLC weiterhin als das naheliegendste Verfahren, um die *full-length*-Oligomere zu isolieren. Es muss allerdings sichergestellt werden können, dass DMT-ON und DMT-OFF Oligonukleotide nicht gemeinsam eluiert werden. Daher sollten in weiterführenden Arbeiten die RP-HPLC-Gradienten variiert und ggf. alternative Puffersysteme getestet werden.

3 Synthese und Analyse Azido-modifizierter Oligonukleotide

3.1 Herstellung Azido-modifizierter Oligonukleotide zur Untersuchung von Oxazaborolidin-Verbindungen

Wie bereits in Abschnitt 2.1 geschildert, liegt der Ursprung des Lebens gemäß der RNA-Welt-Hypothese in katalytisch aktiven RNA-Sequenzen.^[49,50] Lebende Systeme müssen jedoch nicht nur die Fähigkeit der Selbstreplikation, sondern auch der Veränderung und somit der Adaptivität besitzen.^[79] Im Laufe der Jahre wurden verschiedene Systeme entwickelt, um diese Eigenschaften zu simulieren. So wurden beispielsweise durch die Arbeitsgruppe um Prof. M. Smietana Oligonukleotid-Sequenzen entwickelt, welche mit einer Boronsäure-Gruppe am 5'-Ende ausgestattet waren.^[80,81] Es konnte gezeigt werden, dass derartig veränderte Oligonukleotide in der Lage sind, eine Esterbindung mit anderen DNA-Fragmenten einzugehen. Die Ausbildung einer solchen Boronoesterbindung erfordert das Vorhandensein eines Ribonukleosid-Bausteins am 3'-Ende der zu ligierenden DNA-Sequenz, sowie einen zu beiden Sequenzen komplementären DNA-Strang, um die beiden Fragmente in räumliche Nähe zueinander zu bringen (Abbildung 23 A). Die entstehende Boronoester-Bindung ist dabei reversibel und sowohl die Bindungsstärke, als auch das Bindungsgleichgewicht können durch die Variation der Temperatur, des pH-Werts, oder der Konzentration bestimmter Salze variiert werden.^[82] Somit stellen derartige Sequenzen ein einfaches, aber dynamisches System dar, welches reversibel auf äußere Stimuli reagieren kann.

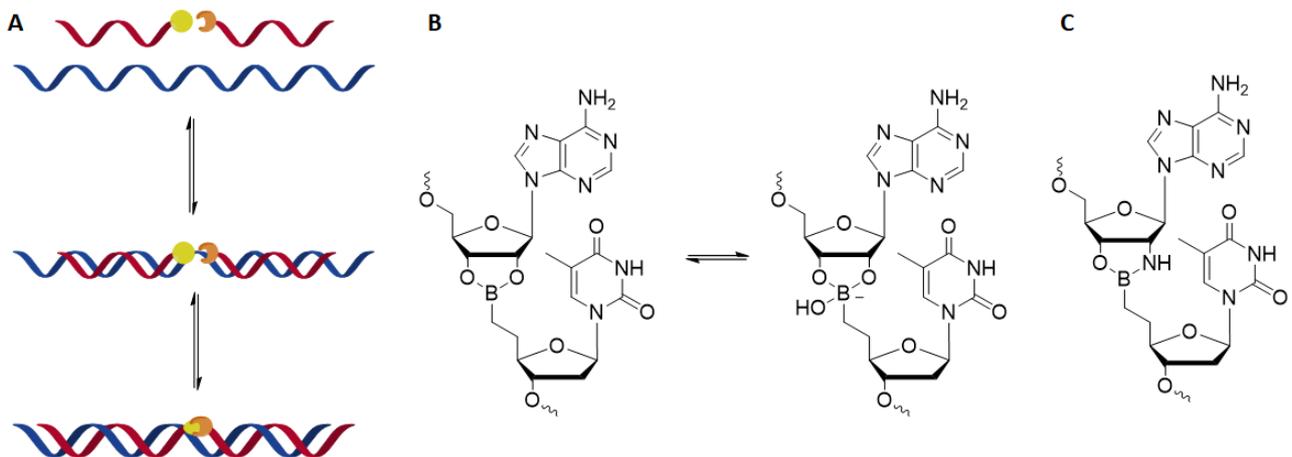


Abbildung 23 A: Schematisches Beispiel für die chemische Ligation zweier DNA-Fragmente (rot) entlang eines komplementären DNA-Templates (blau);^[82] **B:** Beispiel für eine internukleosidische Boronoesterbindung; **C:** Beispiel für eine internukleosidische Oxazaborolidinbindung.

Die Entstehung und Stabilität der internukleosidischen Boronoesterbindung lässt sich dabei über die Schmelztemperatur (T_M) des gebildeten DNA-Duplex' feststellen. Bei einer Ligation

der beiden DNA-Fragmente durch Bildung einer Boronat-Bindung erhöht sich die Schmelztemperatur im Vergleich zu einem Duplex dessen DNA-Fragmente nicht ligiert werden können, weil die entsprechenden funktionellen Gruppen fehlen.^[80,82]

Im Zuge weiterer Untersuchungen konnte die Forschungsgruppe feststellen, dass es ebenfalls möglich ist, eine reversible Bindung zwischen Amino- und Borono-funktionalisierten Nucleosiden herzustellen (Abbildung 23 C). Diese sog. Oxazaborolidin-Bindung ist ebenfalls reversibel und die Stabilität der Bindung kann durch Variation verschiedener Parameter beeinflusst werden. Interessanterweise war es bei den dieser Arbeit vorausgegangenen Untersuchungen lediglich möglich, eine Oxazaborolidin-Verknüpfung zwischen einem 5'-Borono-modifizierten DNA-Fragment und einem Oligonucleotid mit einem 3'-Amino-Adenosin-Baustein an der 3'-Position auszubilden. Wenn die entsprechende Sequenz dagegen mit einem 2'-Aminouridin-Baustein modifiziert war, konnte keine Ausbildung einer Oxazaborolidin-Bindung beobachtet werden (Abbildung 24).^[83]

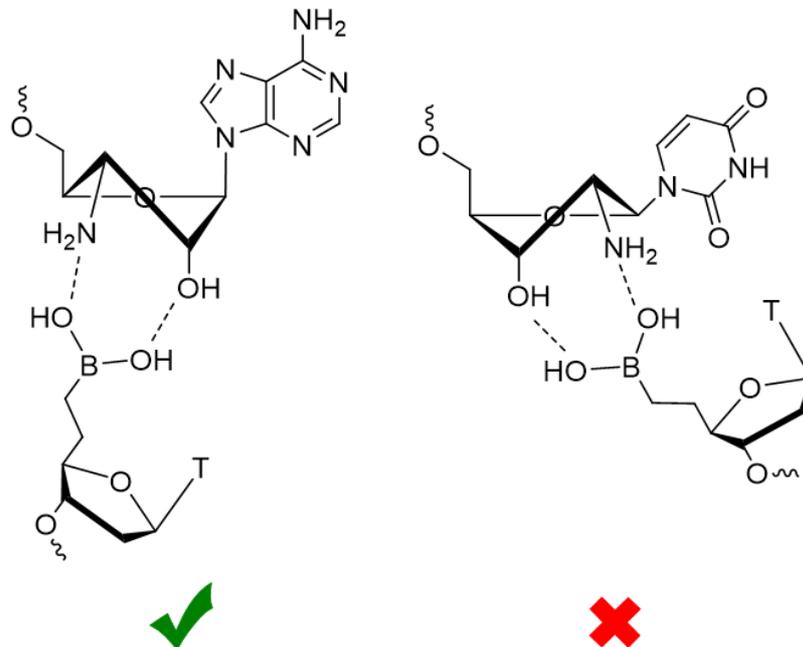


Abbildung 24: Beispiele für die bevorzugte Zuckerkonformation eines 3'-Amino-Adenosin- und eines 2'-Aminouridin-Nucleotids, sowie deren Einfluss auf die Ausbildung einer Oxazaborolidinbindung.

Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass für die Entstehung der Oxazaborolidin-Bindung die Zuckerkonformation des Aminobausteins von entscheidender Bedeutung ist. Diese unterscheidet sich erheblich zwischen einem 2'- und einem 3'-Amino-modifizierten Nucleosid (Abbildung 24).^[84] Um diese Hypothese zu verifizieren, bedurfte es der Synthese von DNA-Sequenzen, welche jeweils mit einem 2'-Amino-Adenosin- oder einem 3'-Aminouridin-Baustein modifiziert waren.

Aminogruppen lassen sich leicht aus Azidogruppen im Zuge einer Staudinger-Reduktion herstellen.^[85] Somit, sollten im Zuge dieser Arbeit als Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe um Prof. M. Smietana eine Reihe modifizierter Nucleoside hergestellt werden, welche neben der Azido-Modifikation über die notwendigen Schutzgruppen für einen Einsatz in der Phosphoramidit-basierten Oligonucleotid Festphasensynthese verfügten. Da die Azidogruppen am 3'-Ende der zu synthetisierenden Oligonucleotide lokalisiert sein sollten, mussten die jeweiligen Nucleoside auch eine Linker-Funktionalität für eine Anbindung an die feste Phase besitzen, da die chemische Oligonucleotidsynthese vom 3'- zum 5'-Ende erfolgt. Als Linkermolekül wurde erneut der Pfp-Adipinsäureester **17** verwendet (Abbildung 12).

3.2 Synthese eines 2'-Azido-modifizierten Adenosinbausteins

Für die Synthese des 2'-AzidoAdenosins (2'-AzA) wurde auf eine Synthesestrategien der Arbeitsgruppe um Prof. R. Micura für ein 2'-Azido-modifiziertes Guanosinderivat zurückgegriffen.^[86]

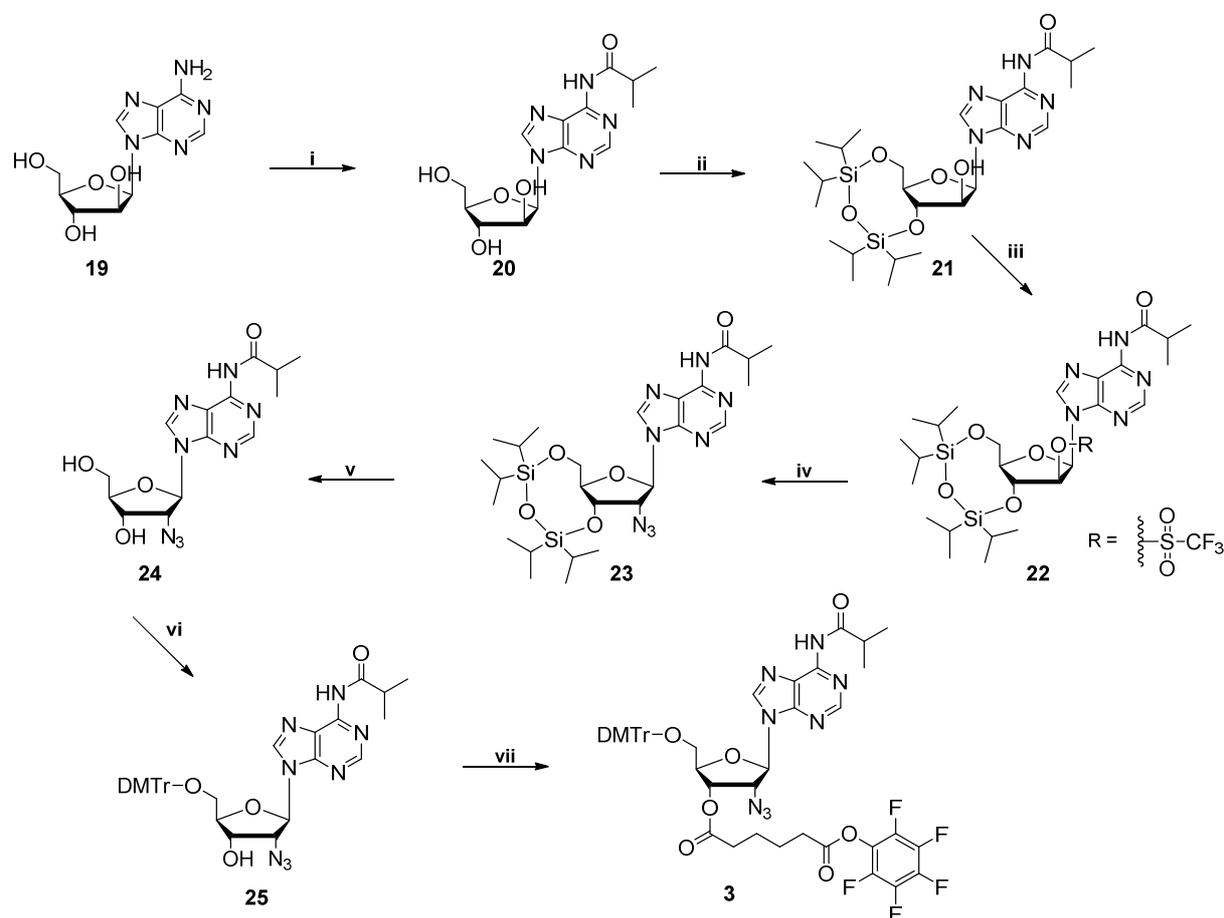


Abbildung 25: Synthesepfad für das funktionalisierte 2'-Azido-adenosinderivat **3**.

Die Synthese wurde ausgehend von einem Arabinose-konfigurierten Isomer des Adenosins begonnen (Abbildung 25). Da Azidogruppen potentiell durch die Einwirkung von hohen Temperaturen, Licht, oder Säuren reduziert werden können, wurde entschieden möglichst viele Schutzgruppenreaktionen vor der Einführung der Azido-Funktionalität durchzuführen. Dementsprechend wurde zunächst die exozyklische Aminofunktion des Adenosinderivats mittels Isobutyrylchlorid geschützt. Dies erfolgte im Zuge einer transienten Schutzgruppenstrategie mittels Trimethylsilylchlorid (TMS-Cl).^[87] Gemäß des HSAB-Konzepts reagieren die Silylgruppen als harte Elektrophile bevorzugt mit den ebenfalls harten Hydroxylgruppen (Abbildung 26). Die exozyklische Aminofunktion stellt dagegen ein eher weiches Nukleophil dar. Des Weiteren handelt es sich um eine aromatische Aminogruppe, was die Reaktivität gegenüber Elektrophilen allgemein verringert. Diese Eigenschaften

ermöglichen in Kombination eine selektive und temporäre Maskierung der Hydroxylgruppen mit TMS. Im nächsten Schritt kann dann die Aminogruppe durch eine Reaktion mit Isobutyrylchlorid in eine Amidgruppe überführt werden. Anschließend können die hydrolyseempfindlichen TMS-Gruppen durch Hinzugabe einer verdünnten Ammoniak-Lösung entfernt werden.

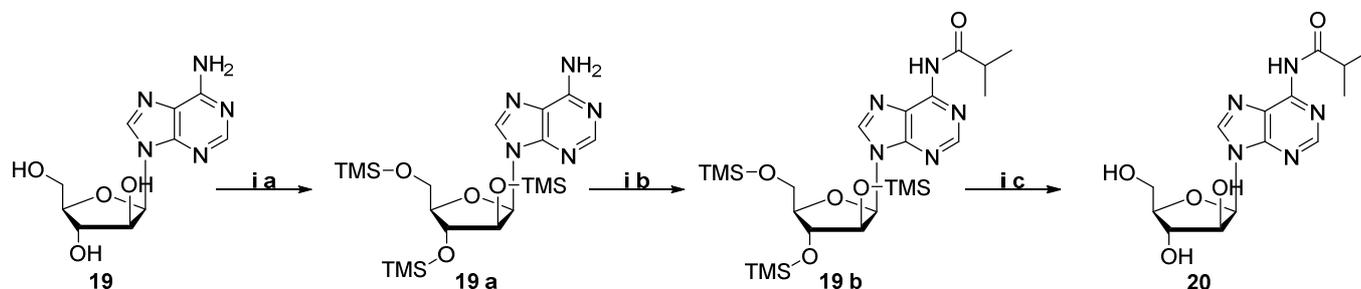


Abbildung 26: Maskierung der exozyklischen Aminofunktion der Verbindung **19** unter Verwendung transientscher Schutzgruppen. (i a) 5 Äq. TMS-Cl, Pyridin, 1 h, RT; (i b) 2 Äq. Isobutyrylchlorid, Pyridin, ÜN, RT; (i c) NH₃/H₂O, Pyridin, 30 min, RT, 74% (Gesamtausbeute).

Als nächstes erfolgte die selektive Maskierung der 5'- und 3'-Hydroxylgruppen mittels 1,3-Dichlor-1,1,3,3-Tetraisopropyl-disiloxan (TIPDS-Cl). Diese auch als Markiewicz-Reagenz bekannte Verbindung reagiert zunächst bevorzugt mit der 5'-OH-Gruppe, da es sich hierbei um eine primäre Alkoholgruppe handelt, deren Nucleophilie aufgrund der besseren sterischen Zugänglichkeit ausgeprägter ist als die der sekundären 2'- und 3'-OH-Gruppen. Nach einer Anbindung der Silylgruppe an die 5'-OH-Position befindet sich die verbleibende chlorierte Silylgruppe in räumlicher Nähe zur 3'-OH-Gruppe und kann von dieser angegriffen werden. Dabei entsteht eine stabile Ringstruktur (Abbildung 27). Nach der erfolgreichen Einbringung der erforderlichen Schutzgruppen konnte die 2'-Hydroxylgruppe als einziges verbliebenes freies Reaktionszentrum durch eine Reaktion mit Trifluormethansulfonylchlorid aktiviert werden, wodurch wiederum die Einführung der Azidogruppe ermöglicht wurde. Die korrekte Positionierung und Ausrichtung der Azidogruppe war hierbei mechanistisch vorgegeben. Zum einen war die C2'-Position das einzig mögliche Reaktionszentrum für die Substitutionsreaktion (Abbildung 27). Zum anderen ist davon auszugehen, dass die Reaktion im Zuge eines S_N2-Mechanismus' erfolgte, bei dem es im Zuge eines nucleophilen Rückseitenangriffs zu einer Konfigurationsinversion kommt. Für die Reaktion wurde das aprotische Lösungsmittel DMF verwendet, welches S_N2-Reaktionen stark begünstigt.

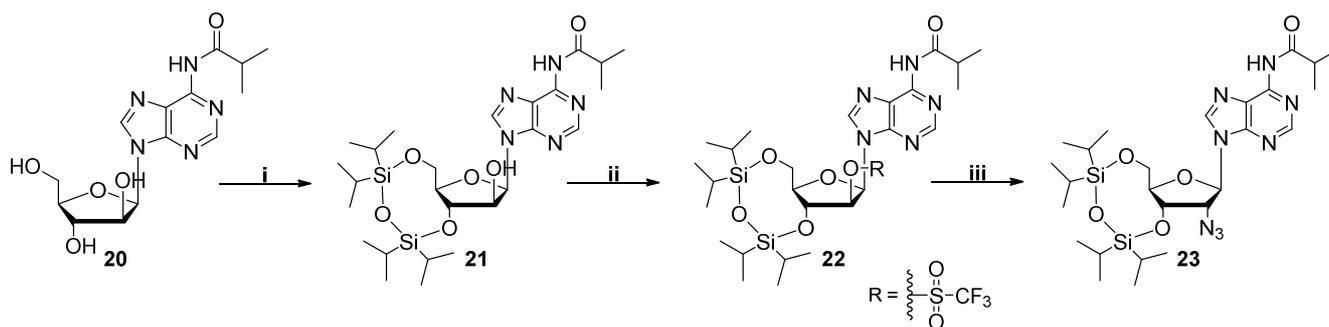


Abbildung 27: Synthese der Verbindung **23**. (i) 1,2 Äq. 1,3-dichloro-1,1,3,3-tetraisopropyl-disiloxan, Pyridin ÜN, RT, 67%; (ii) 1,5 Äq. DMAP, 2,5 Äq. Et₃N, 1,5 Äq. Trifluormethansulfonylchlorid, CH₂Cl₂, 30 min, 0 °C; (iii) 5 Äq. LiN₃, DMF, ÜN, RT, 90%.

Des Weiteren konnte bei der Reaktion lediglich die Entstehung eines einzigen Produkts beobachtet werden, was ebenfalls für eine Reaktion nach S_N2 spricht. Ein Vergleich der ¹H-NMR-Spektren der Verbindungen **21** und **23** (Abbildung 28) zeigt unter anderem eine deutliche Verschiebung des H1'-Signals in Richtung Hochfeld, sowie eine signifikante Verringerung der dazugehörigen Kopplungskonstante von 6,3 (Verbindung **21**) zu 1,4 Hz (Verbindung **23**). Diese Art der Signalveränderung ähnelt Beobachtungen, welche für die Einführung einer Azidogruppe an der C2'-Position eines vergleichbaren Guanosinderivats unter den gleichen Bedingungen wie im vorliegenden Fall beschrieben wurden.^[86] Somit ist davon auszugehen, dass die Azidogruppe in der gewünschten Konfiguration vorlag.

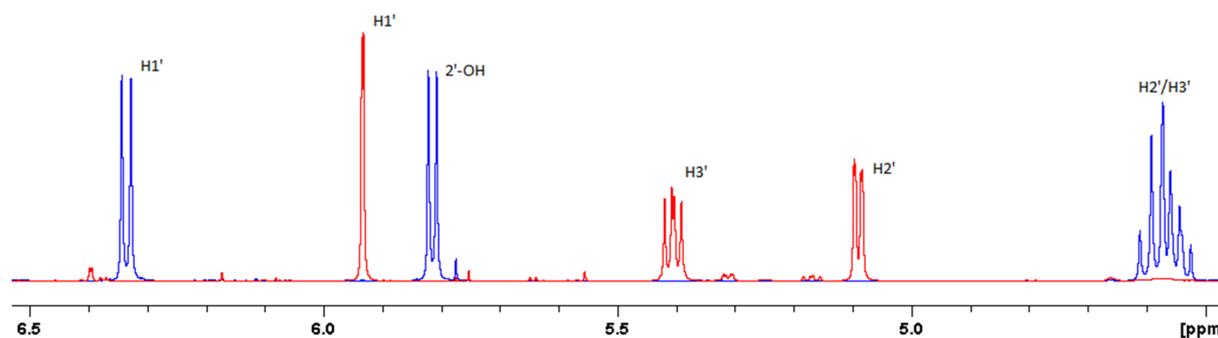


Abbildung 28: Signalverschiebung im ¹H-NMR-Spektrum für Verbindung **21** (blau) und **23** (rot).

Als nächstes wurde die TIPDS-Schutzgruppe durch Tetrabutylammoniumfluorid entfernt. Bei dieser Reaktion wird die hohe Affinität der Silylgruppen zu den Fluoridionen genutzt, um eine selektive Abspaltung zu ermöglichen.

Abschließend erfolgte eine Tritylierung der 5'-OH-Gruppe sowie die Anbindung eines Aktivesters an die 3'-Hydroxylgruppe (Abbildung 29) für eine Immobilisierung der Adenosinderivats an die feste Phase.

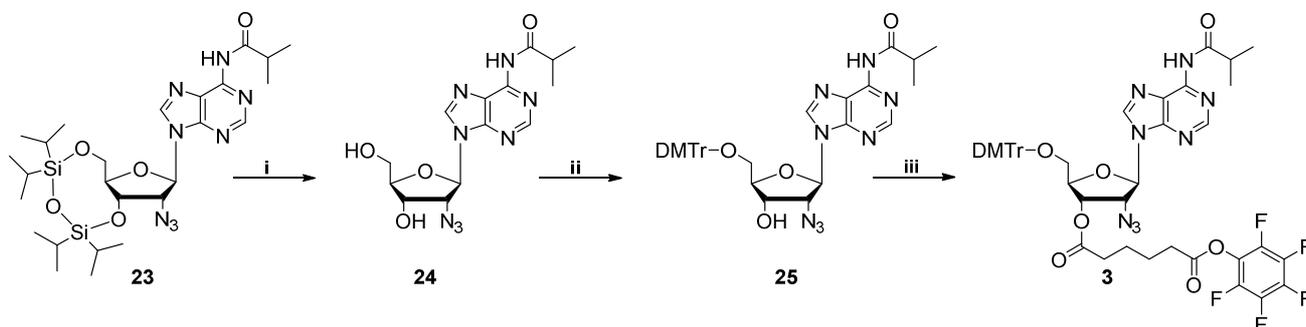


Abbildung 29: Synthese des Zielmoleküls **3**. (i) 1 M Tetrabutylammoniumfluorid, 1,9 Äq. CH₃COOH, THF, 30 min, RT, 71%; (ii) 1,3 Äq. DMTr-Cl, Pyridin, 4,5 h, RT, 57%; (iii) 1 Äq. DMAP, 4,9 Äq. Pfp-Adipinsäureester, Pyridin/DMF (1:1), 2 h, RT, 60%.

3.3 Synthese eines 3'-Azido-modifizierten Adenosinbausteins

Für die Darstellung des 3'-Azido-Isomers der Verbindung **4** wurde auf eine bereits in der Arbeitsgruppe etablierte Strategie zurückgegriffen.^[88] Allerdings wurde in diesem Fall der Synthesepfad insofern abgeändert, dass möglichst viele Schutzgruppenreaktionen vor der Einführung der Azido-Modifikation durchgeführt wurden (Abbildung 30). Dies ist darin begründet, dass bei der ursprünglichen Strategie an mehreren Stellen ein unerwünschter Zerfall der Azidgruppe beschrieben wurde. Der modifizierte Synthesepfad ist in der nachfolgenden Abbildung 30 dargestellt. In diesem Fall konnte zu keinem Zeitpunkt eine ungeplante Reduktion der Azidgruppe beobachtet werden.

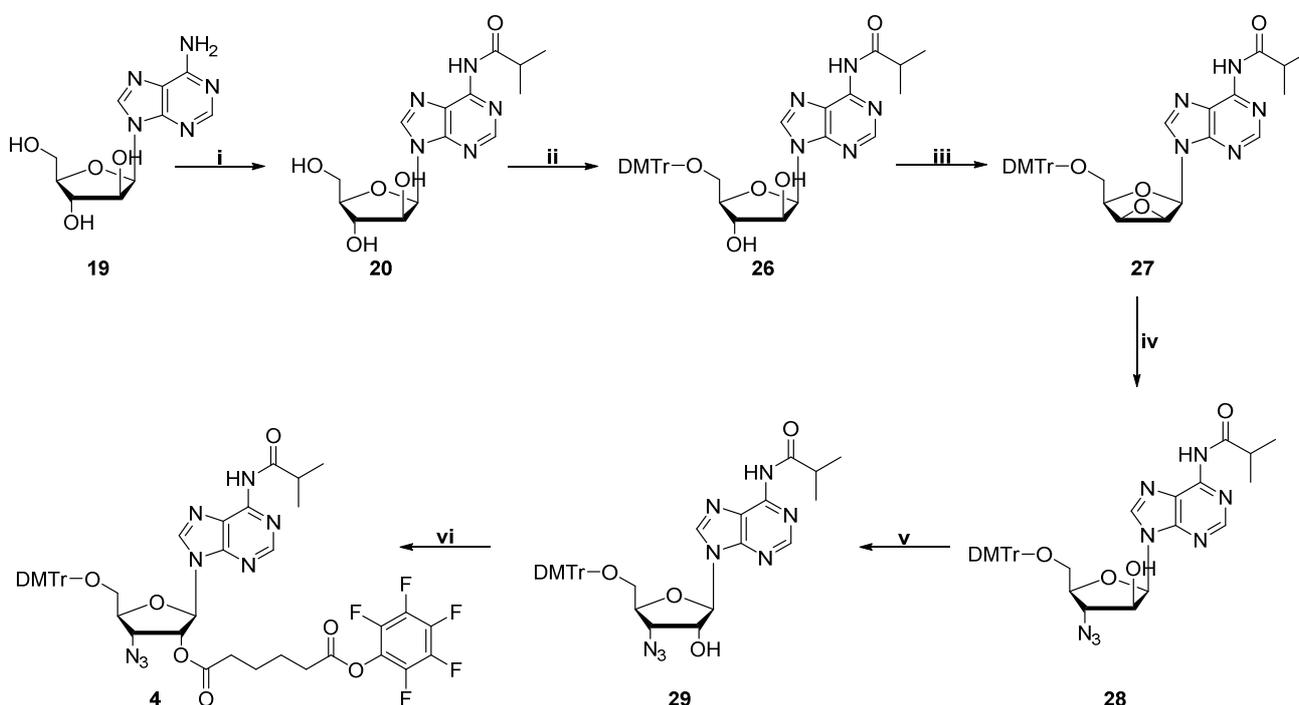


Abbildung 30: Synthesepfad für das funktionalisierte 3'-Azido-adenosinderivat **4**.

Erster Schritt der Synthese war wie in Abschnitt 3.2 (Abbildung 26) die Schützung der exozyklischen Aminofunktion mittels Isobutyrylchlorid. Anschließend erfolgte die selektive Dimethoxytritylierung der 5'-OH-Gruppe. Es empfahl sich, die Isobutyryl-Schützung vor der Tritylierung durchzuführen, da bei ungeschütztem Adenosin eine Tritylierung der exozyklischen Aminofunktion möglich ist.^[89] Als nächstes musste eine 2',3'-Epoxidfunktion generiert werden, um das Nukleosid für die nukleophile Einführung der Azidofunktion vorzubereiten (Abbildung 31 A). Die Epoxidgenerierung erfolgte unter Verwendung von Triphenylphosphin (PPh₃) und Diisopropylazodicarboxylat (DIAD). Letzteres wurde als Alternative zu dem bekannteren aber potentiell explosionsgefährlichen Reagenz Diethylazodicarboxylat (DEAD) eingesetzt. Bei der Reaktion wird das Triphenylphosphin durch

das DIAD aktiviert, wodurch anschließend ein nukleophiler Angriff seitens der 3'-OH-Gruppe erfolgen kann. Dies ermöglicht wiederum einen nukleophilen Angriff der 2'-Hydroxylgruppe auf das C3'-Atom (Abbildung 31 B). Hierbei wird Triphenylphosphinoxid als stabiles Reaktionsprodukt abgespalten. Da sich die 2'-OH-Gruppe im vorliegenden Fall in der arabino-Konfiguration befindet, entsteht bei dieser Reaktion ausschließlich das lyxo-konfigurierte Epoxid **27**.

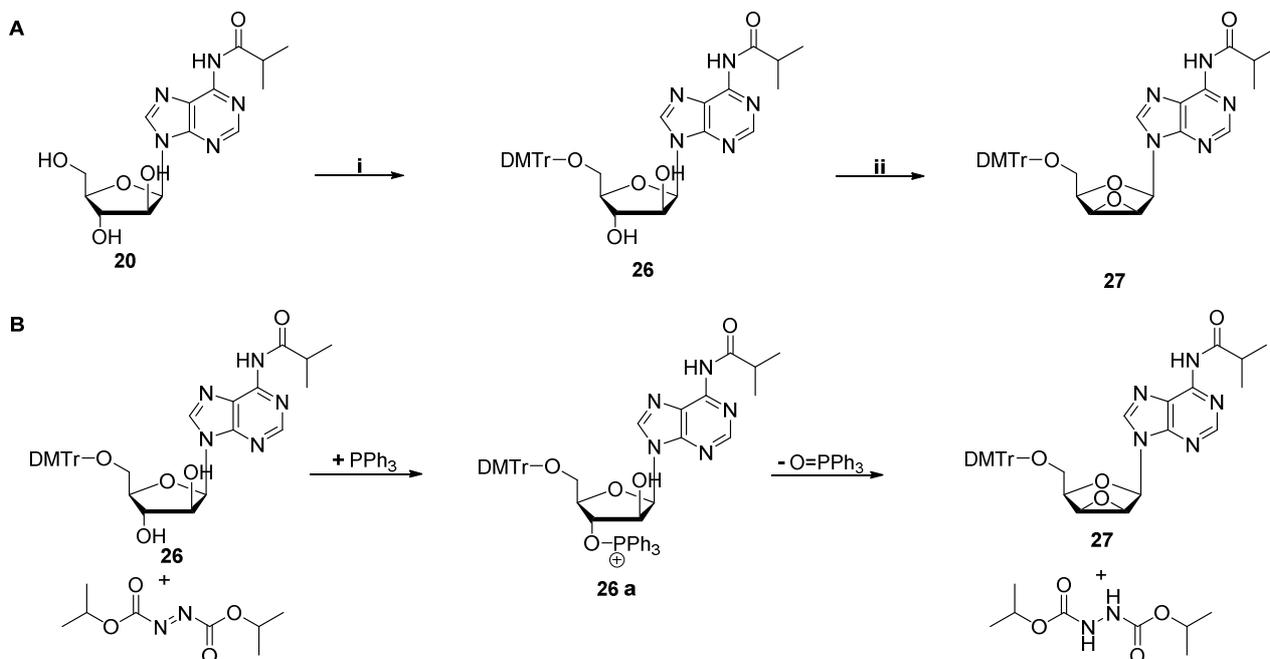


Abbildung 31: Synthese des Epoxids **27**. **A:** Herstellung des Epoxids **27** ausgehend von Verbindung **20**; (i) 1.3 Äq. DMTr-Cl, Pyridin, ÜN, RT, 53%; (ii) 1.85 Äq. PPh₃, 1.85 Äq. DIAD, DMF, 1 h, 55 °C, 85%; **B:** Detaillierterer Reaktionsablauf der Epoxidsynthese.

Prinzipiell könnte auch das ribo-konfigurierte Epoxid entstehen. Hierfür wäre aber eine Aktivierung der 2'-OH-Gruppe mit PPh₃ erforderlich. Da das Triphenylphosphin sterisch sehr anspruchsvoll ist und die arabino-konfigurierte 2'-OH-Gruppe aufgrund der Nähe zur Adeninbase nur sehr eingeschränkt zugänglich ist (Abbildung 31 B), findet diese Reaktion allerdings in keinem signifikanten Maße statt. Somit wurde im vorliegenden Fall ausschließlich die Entstehung der lyxo-Epoxids beobachtet. Der sterische Einfluss der Nukleobase ist dabei so groß, dass selbst bei Verwendung des xylo-konfigurierten Adenosinderivats das lyxo-Epoxid als Hauptprodukt gebildet wird,^[90] obwohl in diesem Fall die 3'-OH-Gruppe leichter zugänglich ist als die 2'-OH-Gruppe beim arabino-Isomer.

Im nächsten Schritt wurde die Azidfunktion eingeführt indem das Epoxid **27** mit Lithiumazid versetzt wurde. Bei dieser Reaktion reagiert das Azid im Zuge eines S_N2-Mechanismus' mit dem Nucleosid an der C3'-Position. Hierbei kommt es zu einer Öffnung des Epoxids und einer Wiederherstellung der 2'-OH-Gruppe in der arabino-Konfiguration. Die C3'-Position ist dabei

das bevorzugte Angriffsziel des Azids aufgrund der höheren Elektrophilie des C3'-Atoms im Vergleich zum C2'-Atom. Diese Präferenz ist besonders ausgeprägt, wenn sich stark elektronenziehende Substituenten an der C5'-Position befinden. Bei einem ungeschützten Adenosinepoxid mit freier 5'-Hydroxylgruppe liegt das Verhältnis zwischen den entstehenden 3'- und 2'-Azidoadenosin-Isomeren bei etwa 15:1.^[91] Im vorliegenden Fall, bei dem das Epoxid an der 5'-Position mit einer DMTr-Gruppe geschützt war, wurde das gewünschte 3'-Azidoadenosin-Isomer weiterhin als Hauptprodukt gebildet. Das Verhältnis der beiden Isomere war allerdings deutlich ausgeglichener, da der elektronenschiebende Effekt der DMTr-Gruppe die Elektrophilie der C3'-Position vermindert. Dies führte zu einer erschwerten Isolation des 3'-Isomers aufgrund der ähnlichen Polaritätseigenschaften der beiden gebildeten Isomere. Letztlich konnte die gewünschte Verbindung mit einer Ausbeute von etwa 40% isoliert werden (Abbildung 32 A).

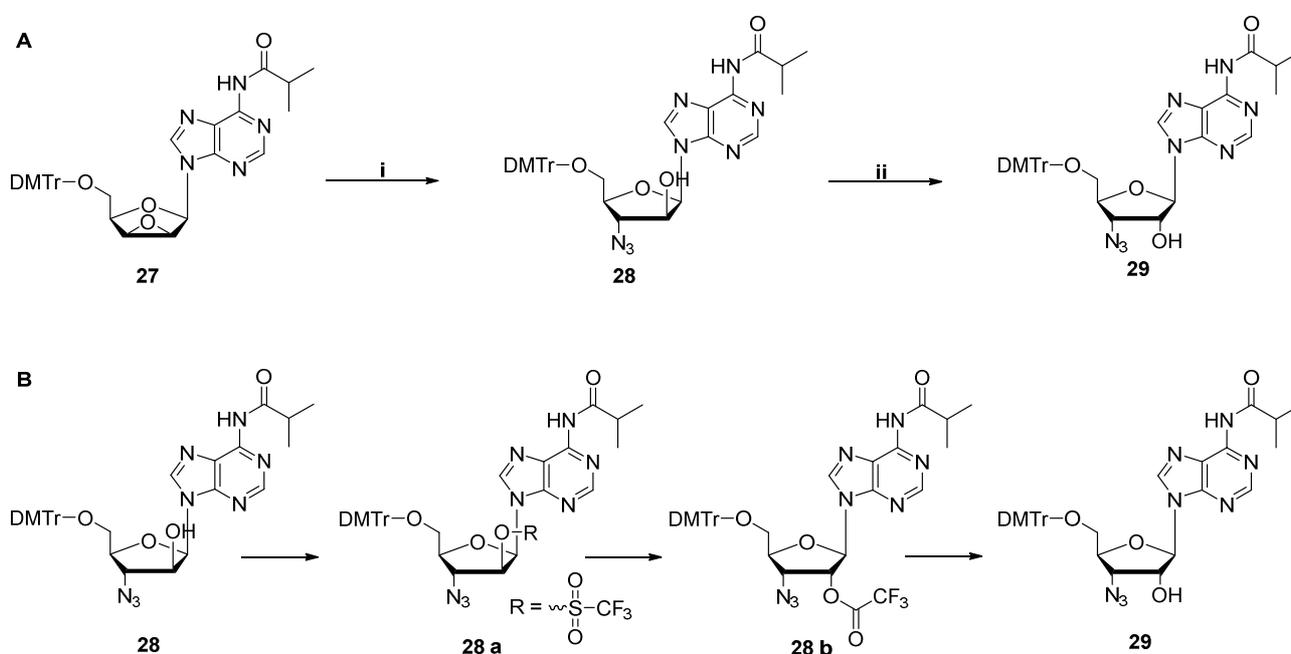


Abbildung 32: Einführung der Azidogruppe und Inversion der Stereokonfiguration. **A:** Synthese des arabino-konfigurierten 3'-Azido-Nukleosids **28** und Epimerisierung; %; (i) 5 Äq. LiN_3 , DMF, 3 h, 55 °C, 40%; (ii a) 3 Äq. DMAP, 1.5 Äq. Trifluormethansulfonylchlorid, CH_2Cl_2 , 30 min, 0 °C; (ii b) 5 Äq. $\text{CF}_3\text{COO}^- \text{K}^+$, 2 Äq. 18-Krone-6-Ether, 1.5 Äq. DIPEA, Toluol, 2 h, 60 °C, 64%; **B:** Detailliertere Darstellung der Epimerisierungsreaktion.

Mittels 2D-COSY-NMR-Spektroskopie konnte zweifelsfrei bestätigt werden, dass es sich bei dem isolierten Produkt um das 3'-Azido-Isomer handelte (Abbildung 33). Mit einem COSY-Spektrum kann gezeigt werden, zwischen welchen Kernen in einem Molekül (in diesem Fall ^1H -Kernen) eine Spin-Kopplung besteht. Eine solche Kopplung liegt vor, wenn die jeweiligen Kerne drei kovalente Bindungen voneinander entfernt liegen, was im COSY-Spektrum in Form sog. Kreuzpeaks detektiert werden kann.

Die beobachtete Anordnung der Kreuzpeaks ist nur möglich, wenn sich die Hydroxylgruppe an der C2'-Position befindet. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass die Azidgruppe am C3'-Atom lokalisiert sein muss.

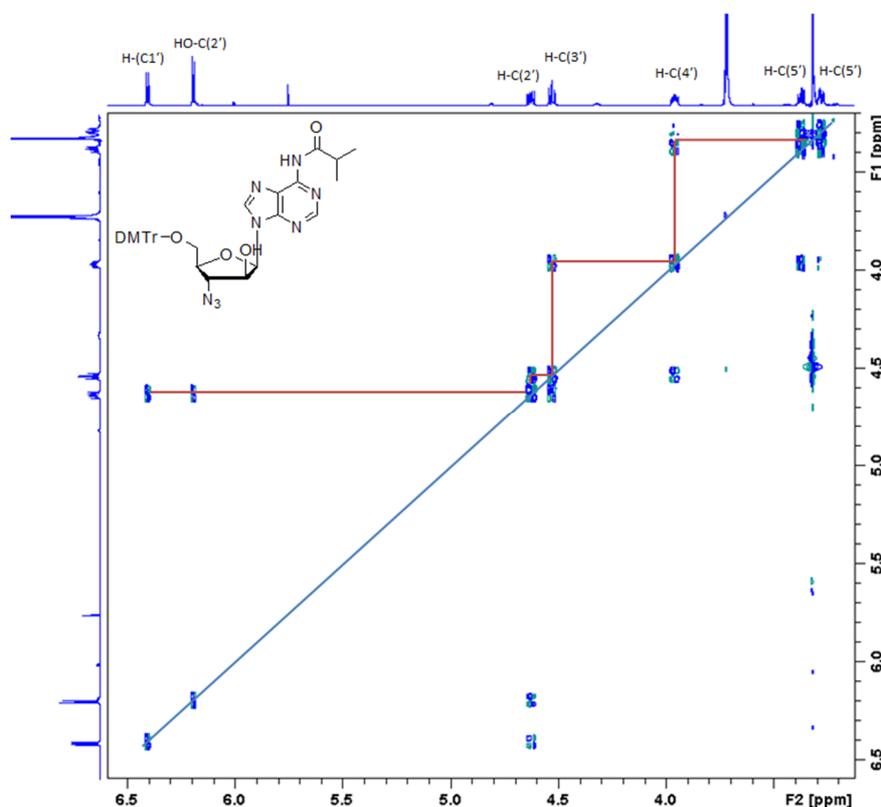


Abbildung 33: 2D COSY-NMR-Spektrum zur Lokalisierung der Azidgruppe bei Verbindung **28**.

Für die Stereo inversion der 2'-OH-Gruppe wurde eine von Moroder et al. beschriebene Methode gewählt.^[92] Hierbei wird die arabino-konfigurierte Hydroxylgruppe in eine Triflatgruppe überführt. Anschließend wird das reaktive Intermediat mit Kaliumtrifluoracetat und 18-Krone-6-Ether behandelt. Der Kronenether komplexiert das Kaliumion und verbessert dadurch die Löslichkeit des Trifluoracetats in Toluol. Dieses kann nun das C2'-Atom des Nucleosids in einer S_N2 -Reaktion angreifen. Die dabei entstehende Esterbindung ist sehr labil und wird bei der anschließenden wässrigen Aufarbeitung mit ges. NaHCO_3 -Lsg. hydrolysiert. Dabei entsteht erneut eine Hydroxylgruppe an der C2'-Position. Diesmal jedoch in der gewünschten ribo-Konfiguration (Abbildung 32 B).

Eine Alternative zu dieser Reaktion stellt eine von Klinchan et al. publizierte Methode dar.^[93] Hierbei wird das C2'-Atom zunächst zu einem Keton bzw. Diol oxidiert. Bei einer anschließenden Reduktion erfolgt die Rückbildung der 2'-OH-Gruppe ausschließlich in der ribo-Konfiguration. Diese Strategie ist jedoch aufwendiger und mit geringeren Ausbeuten verbunden.

Aus diesem Grund wurde im vorliegenden Fall die Methode nach Morodor et al. eingesetzt. Die Inversion der Stereokonfiguration der 2'-OH-Gruppe konnte wie bei Verbindung **23** (Abschnitt 3.2, Abbildung 27) NMR-spektroskopisch bewiesen werden (Abbildung 34). Vergleicht man die ¹H-NMR-Spektren der Verbindungen **28** und **29** so erkennt man eine Verschiebung des H1'-Signals in Richtung Hochfeld, während das Signal für die 2'-OH-Gruppe in Richtung Tieffeld wandert. Da die arabino-konfigurierte Hydroxylgruppe das einzig verfügbare Reaktionszentrum bei Verbindung **28** darstellt und außer der ribo-Konfiguration keine alternative Ausrichtung der OH-Gruppe in Frage kommt, ist die Inversion der Stereokonfiguration die einzige plausible Erklärung für die Verschiebung der NMR-Signale.

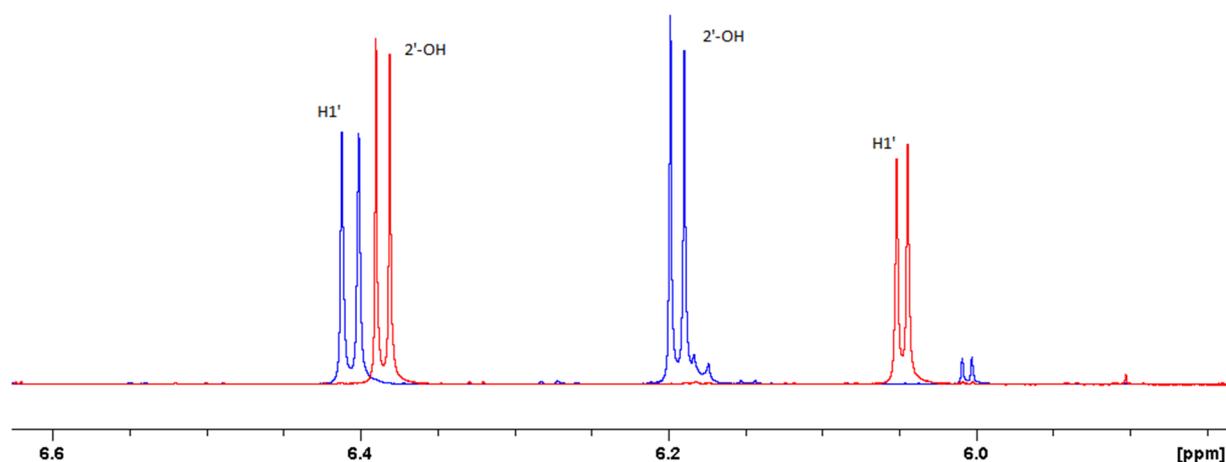


Abbildung 34: Signalverschiebung im ¹H-NMR-Spektrum für Verbindung **28** (blau) und **29** (rot).

Nachdem die korrekte Konfiguration der Verbindung **29** bestätigt werden konnte, wurde die 2'-Hydroxylgruppe mit einem Pentafluorophenol-Aktivester verbunden, um nachfolgend eine Anbindung an den CPG-Träger zu ermöglichen (Abbildung 35).

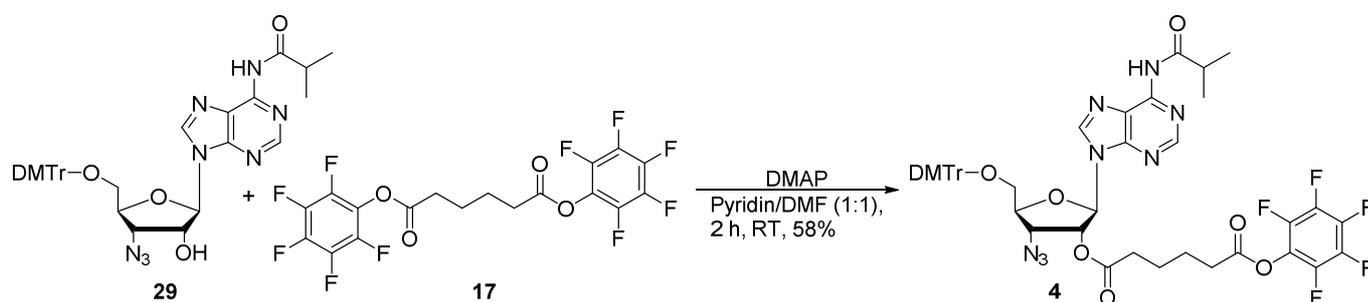


Abbildung 35: Synthese der Zielverbindung **4**.

3.4 Synthese eines 3'-Azido modifizierten Uridinbausteins

Die Synthese des 3'-Azido-modifizierten Uridinderivats basierte auf einer von Amin et al. publizierten Strategie für ein vergleichbares Uridinderivat mit einer Azidogruppe an der C3'-Position und ist in Abbildung 36 dargestellt.^[94] Der Synthesepfad ähnelt der Strategie zur Synthese der Verbindung **4** (Abbildung 30) insoweit, dass die Einführung der Azidogruppe über eine Epoxid-Vorstufe erfolgt. Allerdings wurde in diesem Fall das Epoxid über einen alternativen Reaktionspfad hergestellt. Zunächst wurde die 5'-OH Gruppe dimethoxytrityliert, bevor im nächsten Schritt die verbleibenden 2'- und 3'-Hydroxylgruppen mit Methylsulfonylchlorid (Ms-Cl) aktiviert wurden (Abbildung 37 A).

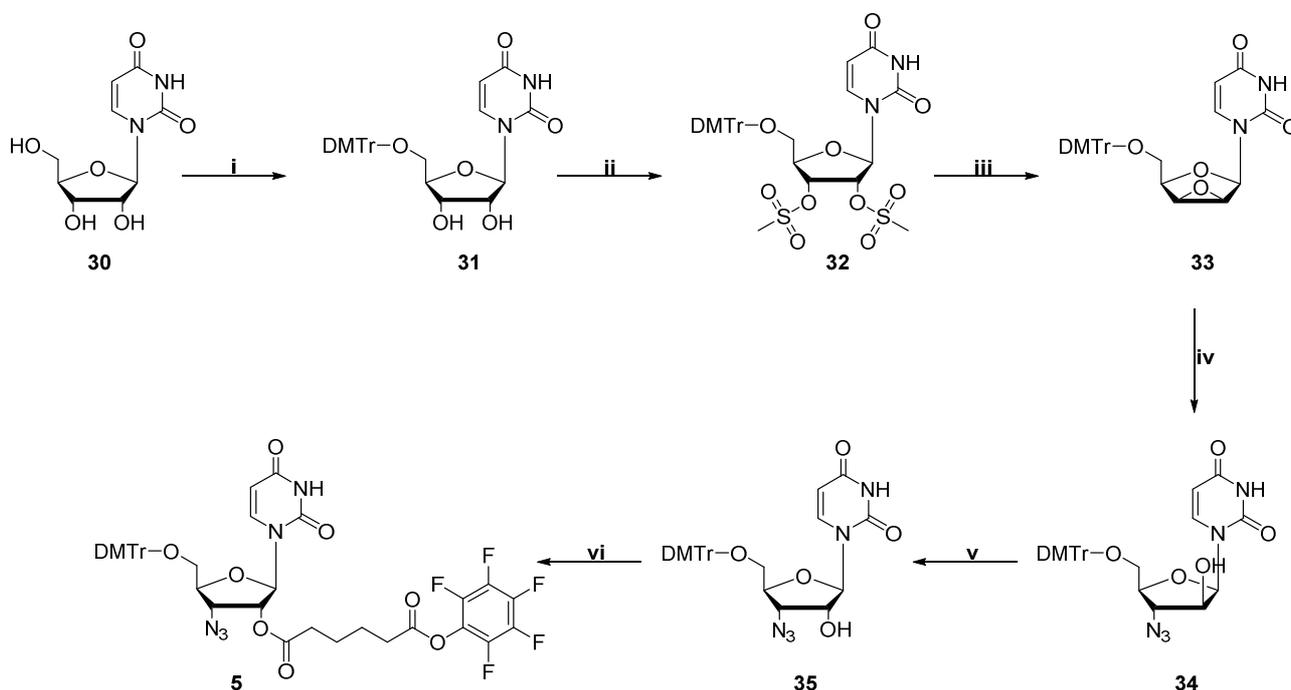


Abbildung 36: Synthesepfad für das funktionalisierte 3'-Azido-uridinderivat **5**.

Die daraus resultierende Verbindung wurde im nächsten Schritt mit Natronlauge behandelt. Bei dieser Reaktion greift ein Hydroxidion die C3'- bzw. C2'-Position im Zuge einer S_N2 -Reaktion rückseitig an, wobei Mesylat als gute Abgangsgruppe abgespalten wird. Die oberhalb des Riboserings stehende Hydroxylgruppe greift nun die verbliebene mesylierte C-Position in einer erneuten S_N2 -Reaktion an (Abbildung 37 B). Somit ist die Entstehung des gewünschten lyxo-konfigurierten Epoxids **33** mechanistisch vorgegeben. Der Vorteil dieser Reaktion ist, dass sie an einem ribo-konfigurierten Edukt abläuft und der Synthesepfad daher mit dem kanonischen Uridin beginnen kann (Abbildung 36) und nicht wie bei der Strategie zur Synthese der Verbindung **4** auf ein arabino-konfiguriertes Derivat als Ausgangsverbindung angewiesen ist (Abbildung 30). Für die Synthese der Verbindung **4** war die in Abbildung 36 dargestellte

Strategie allerdings nicht anwendbar. Dies lag daran, dass in diesem Fall die für die Epoxidbildung notwendige Natronlauge eine Abspaltung der Isobutyrylschutzgruppe an der exozyklischen Aminogruppe bewirkt hätte.

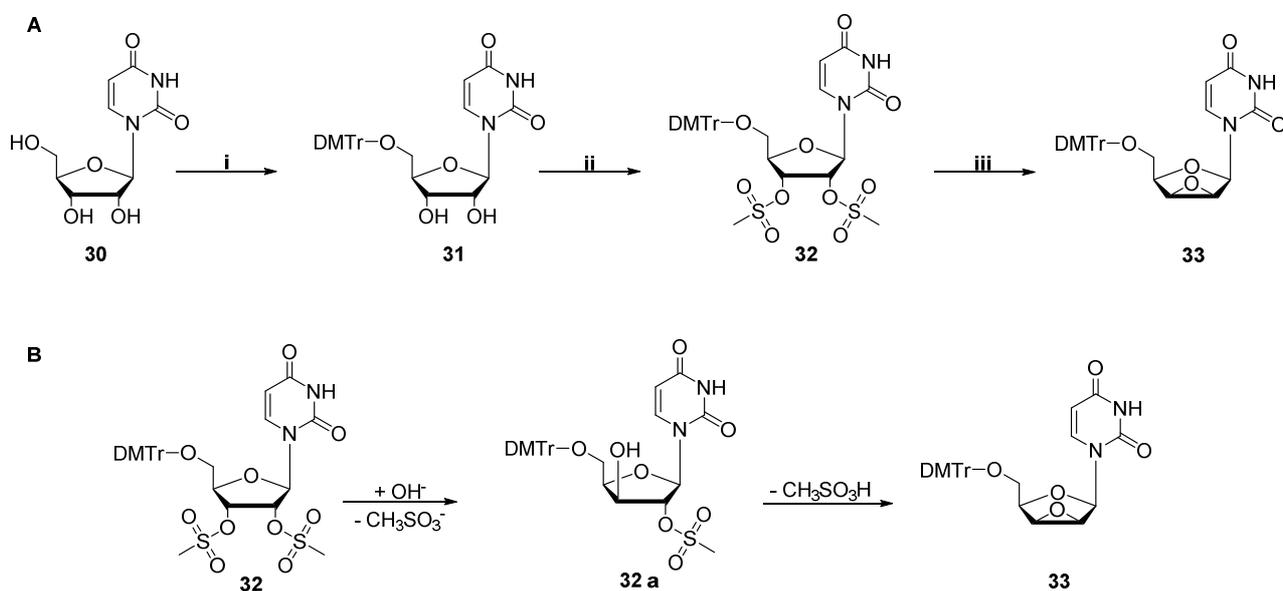


Abbildung 37: Synthese des lyxo-konfigurierten Epoxids **33**. A: einzelne Reaktionsschritte; (i) 1.3 Äq. DMTr-Cl, Pyridin, ÜN, RT, 67%; (ii) 15 Äq. Methansulfonylchlorid, Pyridin, 1.5 h, 0-25 °C, 98%; (iii) 1 M NaOH, Ethanol, 1 h, 60 °C, 89%; B: Entstehung des lyxo-konfigurierten Uridinepoxids im Detail.

Nach der erfolgreichen Synthese des Epoxids **33** konnten die nachfolgenden Reaktionsschritte jedoch analog zu dem 3'-Azido-modifizierten Adenosinderivat durchgeführt werden. Zunächst wurde die Azidogruppe an die C3'-Position des Epoxids angefügt (Abbildung 38). Wie bereits in Abschnitt 3.3 erläutert, ist bei dieser Reaktion die C3'-Position das bevorzugte Angriffsziel des Azidions.^[91] Jedoch war diese Präferenz für die C3'-Position bei dem Epoxid **33** ebenso verringert wie schon zuvor bei der Verbindung **27**. Die Position der Azidogruppe wurde mittels 2D-COSY-NMR verifiziert (Abbildung 39).

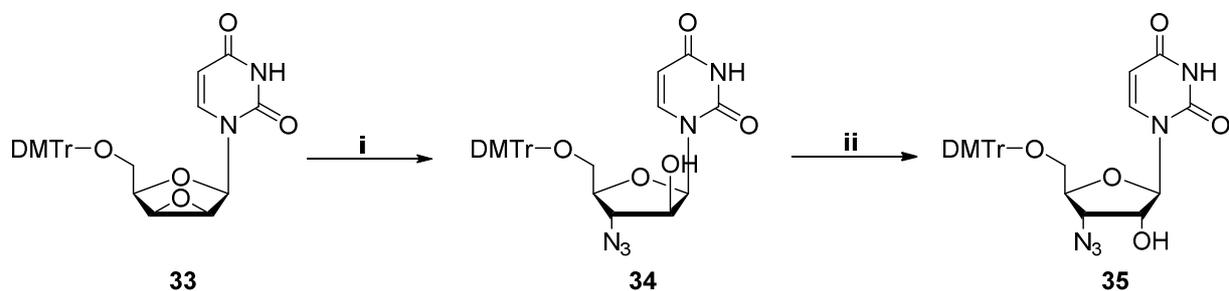


Abbildung 38: Synthese des ribo-konfigurierten Azidouridinderivats **35**. (i) 5 Äq. LiN₃ in DMF, ÜN, 55 °C, 44%; (ii a) 3 Äq. DMAP, 1.5 Äq. Trifluormethansulfonylchlorid, CH₂Cl₂, 30 min, 0 °C; (ii b) 5 Äq. CF₃COO⁻ K⁺, 2 Äq. 18-Krone-6-Ether, 1.5 Äq. DIPEA, Toluol, 2 h, 60 °C, 73%.

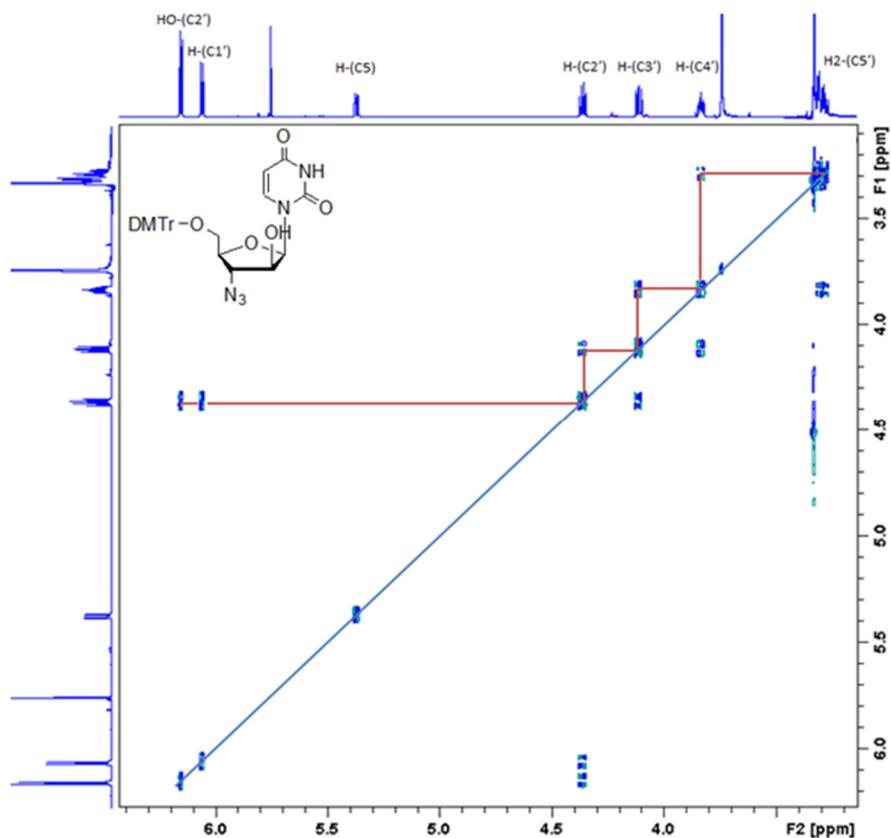


Abbildung 39: 2D COSY-NMR-Spektrum zur Lokalisierung der Azidgruppe bei Verbindung **34**.

Das entstandene arabino-konfigurierte Uridinderivat **34** wurde in die gewünschte ribo-konfigurierte Verbindung **35** überführt. Die Epimerisierung erfolgte unter den gleichen Bedingungen, welche auch für die Synthese der Verbindung **29** eingesetzt wurden (Abbildung 32 und Abbildung 38). Auch hier konnte die Inversion der Stereokonfiguration an der C2'-Position mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie anhand der Verschiebung der H1'- und 2'-OH-Signale bestätigt werden (Abbildung 40).

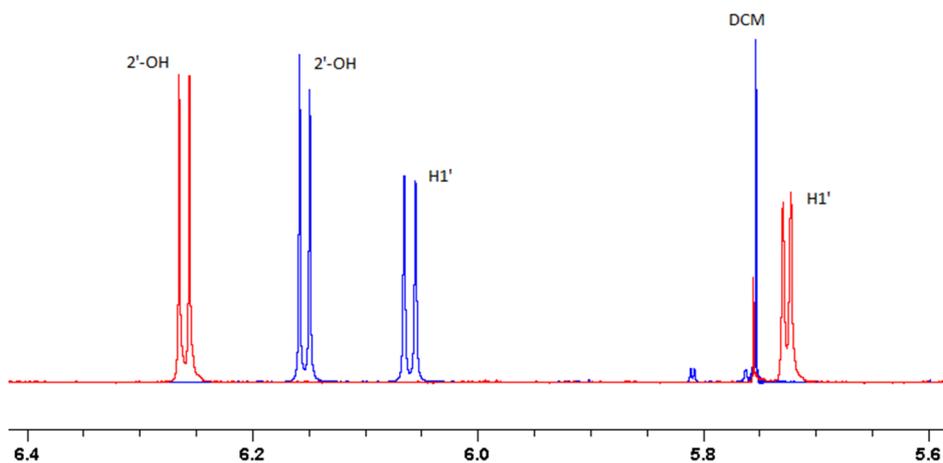


Abbildung 40: Signalverschiebung im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum für Verbindung **34** (blau) und **35** (rot).

Abschließender Syntheseschritt war erneut die Veresterung der 2'-OH-Gruppe mit dem Pfp-Aktivester für eine anschließende Immobilisierung des Nucleosids an einem CPG-Träger.

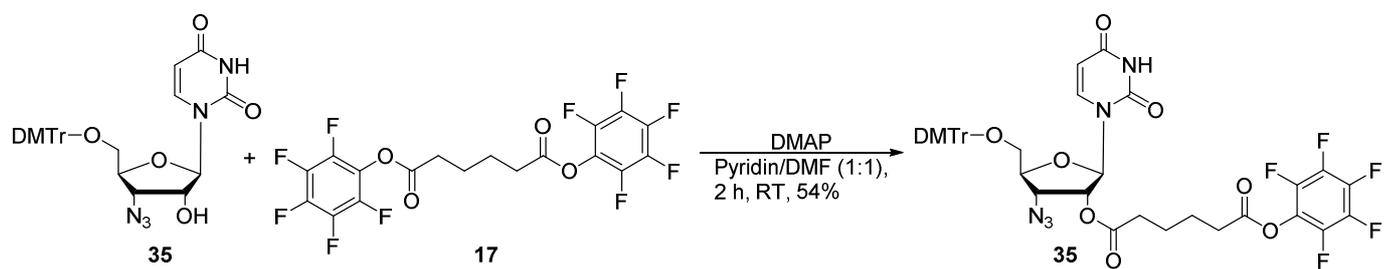


Abbildung 41: Synthese des Zielmoleküls 5.

3.5 Ergebnisse der Ligationsexperimente

Nachdem die Azido-modifizierten Nucleosidderivate erfolgreich synthetisiert werden konnten, wurden diese jeweils an einem CPG-Festphasenträger immobilisiert und an die Arbeitsgruppe des Kooperationspartners übergeben. Dort wurden sie für die Herstellung verschiedener Oligodesoxynucleotidsequenzen (ODNs) verwendet. Die Azidogruppen der Oligonucleotide wurden nach der Synthese chemisch zu Aminogruppen reduziert.^[95] Zusätzlich wurde noch ein Oligomer ausgehend von einem kommerziell erworbenen 2'-Aminouridin-CPG-Träger hergestellt. Die synthetisierten Amino-modifizierten Oligonucleotide sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Hergestellte Amino-modifizierte Oligodesoxynucleotide.

Name	Sequenz	Länge (NTs)
ODN 4	5'-CCGTCG A _{2'A} -3'	7
ODN 5	5'-CCGTCG A _{3'A} -3'	7
ODN 6	5'-CCGTCG U _{2'A} -3'	7
ODN 7	5'-CCGTCG U _{3'A} -3'	7
A _{2'A} = 2'AminoA; A _{3'A} = 3'AminoA; U _{2'A} = 2'AminoU; U _{3'A} = 2'AminoU		

Wie bereits in Abschnitt 3.1 erläutert, lässt sich die Ausbildung einer internucleotidischen Bindung zwischen zwei DNA-Fragmenten anhand der Schmelztemperatur des DNA-Duplex' feststellen. Aus diesem Grund wurden die Amino-modifizierten Oligomere jeweils mit einem Borono-modifizierten Thymidin-Oligomer im Beisein eines entsprechend komplementären Template-Strangs inkubiert. Für die Negativprobe wurde ein Thymidin-Oligomer verwendet, welches keine Borono-Modifikation aufwies und somit keine Oxazaborolidin-Bindung ausbilden konnte. Bei den 2'-Amino-modifizierten Oligomeren (ODN 4 und 6) trat keine Erhöhung der Schmelztemperatur im Vergleich zur Negativprobe ein. Bei den 3'-Amino-modifizierten DNA-Fragmenten (ODN 5 und 7) war dagegen der T_M-Wert gegenüber der Negativprobe erhöht.^[96] Diese Ergebnisse bestätigen die in Abschnitt 3.1 erwähnte Hypothese, wonach die Zuckerkonformation der Amino-modifizierten Nucleoside von entscheidender Bedeutung für die Ausbildung der Oxazaborolidin-Bindung ist. Die 2'-Amino-modifizierten Uridin- und Adenosinderivate liegen bevorzugt in der South-Type-Konformation (C2'-endo) vor (jeweils ~75% South-Type), während bei den jeweiligen 3'-Amino-Isomeren die North-Type-Konformation (C3'-endo) bevorzugt ist (jeweils ~85% North-Type).^[84,95] Abbildung 24 (Abschnitt 3.1) zeigt Beispiele für die jeweils bevorzugte North- bzw. South-Konformation. Interessanterweise scheint es für das North-/South-Type-Verhältnis bei Azido-modifizierten

Nukleosiden keine so deutliche Tendenz wie für die Amino-modifizierten Nukleoside zu geben. So wird zum Beispiel für 2'-Azidouridin ein North-Anteil von lediglich 58% angegeben.^[84] Dies deckt sich mit Beobachtungen für die im Zuge dieser Arbeit hergestellten Azido-modifizierten Nukleosidbausteine. Die Berechnung des North-/South-Verhältnisses für ein Nukleosid ist komplex und die Gleichgewichtslage ist sehr dynamisch, da sie von verschiedenen Faktoren wie z.B. der Umgebungstemperatur und dem jeweiligen Lösungsmittel beeinflusst wird.^[97,98] Näherungsweise lässt sich das Verhältnis aber mit folgender Formel abschätzen:

$$\% \text{South-Type} \approx 10J_{1'-2'}^{[99]}$$

Der Anteil der Nukleoside, welche in der South-Konformation vorliegen, beträgt also in etwa das 10-fache der H1'/H2'-Kopplungskonstante. Diese Formel gilt strenggenommen nur für einfache Nukleoside in wässriger Lösung,^[99] sie findet aber auch Anwendung für hochmodifizierte Nukleoside in nicht wässrigen Lösungsmittelsystemen.^[100,101] Wendet man die Formel auf die im Zuge der vorliegenden Arbeit generierten ¹H-NMR-Daten für die Azido-modifizierten Nukleoside **25**, **29** und **35** an, erhält man jeweils South-Anteile von ~41 – 54 % (Abbildung 42).

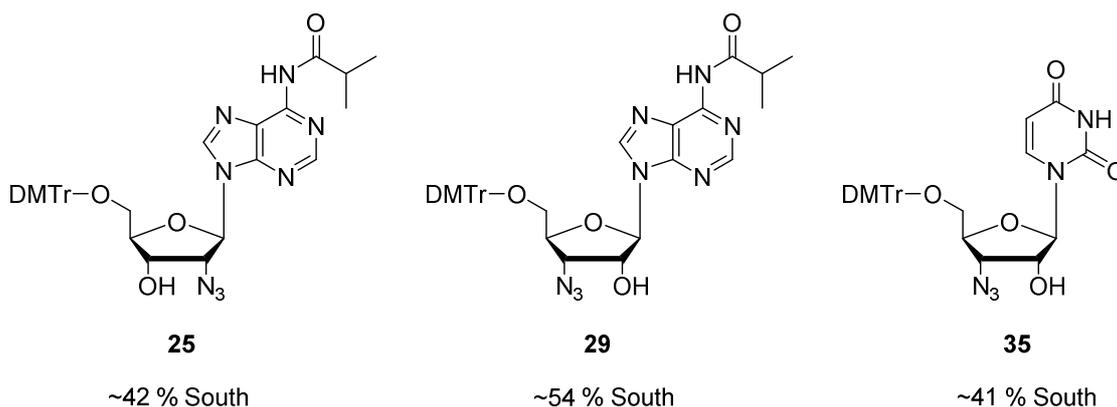


Abbildung 42: Geschätzter Anteil der South-Konformation für verschiedene Azido-modifizierte Nukleoside

Grundsätzlich gilt, dass der Einfluss eines Substituenten auf das North-/South-Type Gleichgewicht stark von dessen Elektronegativität abhängt. Bei ribo-konfigurierten Nukleosidderivaten führen stark elektronegative Substituenten an der C2'-Position zu einem zunehmenden North-Type-Anteil,^[102] während elektronegativere Substituenten an der C3'-Position das Gleichgewicht Richtung South-Type verschieben.^[103] Für die Azidogruppe wird in der Literatur eine höhere Elektronegativität angegeben als für die Amino-Gruppe.^[84] Dies bedeutet, dass im Falle von Amino-modifizierten Ribonukleosiden die 2'- bzw. 3'-OH-Gruppe die Gleichgewichtslage bestimmt, da diese eine deutlich höhere Elektronegativität aufweist als die Aminogruppe. Bei Azido-modifizierten Ribonukleosiden ist die Differenz der Elektronegativitäten zwischen der N₃- und der OH-Gruppe dagegen nicht so stark ausgeprägt, was die ausgeglichene Gleichgewichtslage erklärt.

3.6 Untersuchungen bezüglich der Stabilität der Azidogruppe bei iterativer Exposition mit Phosphoramiditen

Azido-funktionalisierte Oligonukleotide sind ein wichtiges Instrument zur Untersuchung von Nucleinsäuren *in vitro* und *in vivo*. Die Azidogruppe übt einen verhältnismäßig geringen sterischen Einfluss aus und ermöglicht eine bioorthogonale Einführung weiterer Modifikationen mittels CuAAC und SPAAC. Der Einsatz Azido-modifizierter Nucleoside bei der Phosphoramidit-basierten chemischen Oligonucleotidsynthese wird jedoch als potentiell problematisch angesehen.^[104,105] Wie bereits in vorherigen Abschnitten erwähnt, können Azide leicht zu Aminogruppen reduziert werden. Phosphoramidite lassen sich dagegen leicht oxidieren und weisen zudem eine hohe Reaktivität zu Aziden auf.^[106] Der kombinierte Einsatz dieser beiden Verbindungen kann daher zu unerwünschten Nebenreaktionen führen. Hinzu kommt, dass viele Azido-funktionalisierte Phosphoramidite nur eine sehr geringe Stabilität in Lösung aufweisen.^[107] Aus diesem Grund wurden Azido-modifizierte Oligonucleotide häufig unter besonderen Synthesebedingungen hergestellt. So können zum Beispiel für eine interne Einbringung der Azido-Funktionen spezielle Azido-modifizierte Phosphoramidite eingesetzt werden,^[108] oder die Azide werden über aktivierte Linkermoleküle an die Sequenz gebunden.^[109] Wenn sich die Modifikation am 5'-Ende des Oligonucleotids befinden soll, kann die chemische Oligonucleotidsynthese in umgekehrter Richtung vom 5'- zum 3'-Ende durchgeführt werden.^[110] Ebenso kann die Azidogruppe postsynthetisch über eine iodierte Zwischenstufe am 5'-Ende eingefügt werden.^[111] Eine enzymatische Einführung Azido-funktionalisierter Nucleosidbausteine ist ebenfalls möglich.^[112] Es gibt jedoch auch einzelne Berichte, bei denen Azidverbindungen erfolgreich unter Standardbedingungen im Phosphoramiditverfahren eingesetzt wurden.^[32,88] Diese Berichte haben gemeinsam, dass sich der Azido-funktionalisierte Baustein am 3'-Ende der synthetisierten Sequenz befand. Dies zeigt bereits, dass keine grundlegende Inkompatibilität zwischen Aziden und dem Phosphoramiditverfahren bestehen kann. Dennoch gab es nach bestem Wissen im Vorfeld dieser Arbeit noch keine gezielten Untersuchungen bezüglich der grundsätzlichen Stabilität der Azidogruppen bei einer iterativen Exposition mit Phosphoramiditen, wie sie bei der chemischen Festphasensynthese von Oligonucleotiden erfolgt.

Für eine genauere Betrachtung der Kompatibilität von Azido-Modifikationen mit dem Phosphoramiditverfahren wurde folgende Strategie entwickelt. Zunächst sollten drei 3'-Azido-funktionalisierte Oligonucleotide unterschiedlicher Länge im Zuge der Phosphoramidit-basierten Festphasensynthese unter Standardbedingungen hergestellt werden. Anschließend mussten diese für eine nachfolgende Analyse mittels RP-HPLC enzymatisch zu dephosphorylierten Monomeren verdaut werden.^[113]

Ziel war es, über diese Analyse das Verhältnis zwischen 2'-Desoxycytidin (dC) und 3'-Azidoadenosin (3'-AzA) zu bestimmen. Da das theoretische Verhältnis dieser beiden Nukleoside für jede der hergestellten DNA-Sequenzen bekannt ist, sollte es möglich sein, dieses mit dem detektierten Verhältnis zu vergleichen. Für den Fall, dass die Azidogruppen im Zuge der Phosphoramidit-basierten ODN Festphasensynthese degradiert werden, müsste eine deutliche Abweichung zwischen dem erwarteten und tatsächlichem dC/3'-AzA-Verhältnis feststellbar sein. Sollte außerdem die Degradation der Azidogruppen auf eine iterative Exposition mit den Phosphoramidit-Bausteinen zurückzuführen sein, müsste diese Diskrepanz mit steigender Länge der hergestellten ODNs zunehmen.

Als Startbaustein für die Testsequenzen wurde jeweils das am CPG-Träger immobilisierte 3'-Azidoadenosin-Derivat **4** aus Abschnitt 3.3 verwendet. Die Längen und Sequenzen der verschiedenen Oligonukleotide sind jeweils in der nachfolgenden Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Azido-modifizierte DNA-Sequenzen.

Name	Sequenz	Länge (NTs)	m/z [M+H] ⁺ berechnet	m/z [M+H] ⁺ gemessen
ODN 8	5'-GTTCC GTTCC A*-3'	11	3325,16	3325,23
ODN 9	5'-GTTCC GTTCC GTTCC A*-3'	16	4841,12	4841,11
ODN 10	5'-GTTCC GTTCC GTTCC GTTCC A*-3'	21	6357,08	6357,50
A* = 3'-AzA				

Die Oligonukleotide wurden aufgereinigt und die erfolgreiche Synthese der Sequenzen wurde mittels MALDI-ToF bestätigt (Tabelle 4). Anschließend wurden die Oligonukleotide unter Einsatz von Phosphodiesterase (PDE) aus Klapperschlangengift (*Crotalus atrox*) und Phosphatase über einen Zeitraum von 24 h enzymatisch zu dephosphorylierten Monomeren zersetzt. Bevor das Monomergemisch mittels RP-HPLC analysiert werden konnte, mussten noch die Enzyme entfernt werden. Üblicherweise nutzt man für diesen Zweck die Chloroform/Phenol-Extraktion. Ein Lösungsmittelgemisch denaturiert dabei die Enzyme, welche sich anschließend mit Chloroform aus der wässrigen Phase extrahieren lassen. Im vorliegenden Fall konnte diese Methodik allerdings nicht angewandt werden, da auch nach mehrfacher Extraktion mit Chloroform noch signifikante Phenolreste in der wässrigen Phase vorhanden waren, welche eine nachfolgende Analyse der Monomere unmöglich machten. Des Weiteren konnte mittels HPLC-Untersuchungen gezeigt werden, dass bei der Chloroform-Extraktion auch ein bedeutender Anteil der Nukleosid-Monomere aus der wässrigen Phase entfernt wurde. Aus diesem Grund wurden die Enzyme thermisch denaturiert und mittels

Sterilfiltration entfernt. Es wurde allerdings befürchtet, dass die hierfür erforderlichen hohen Temperaturen potentiell eine thermische Zersetzung der Azidogruppe bewirken könnten, was die Ergebnisse der Untersuchungen verfälscht hätte. Außerdem ist PDE aus Klapperschlangengift häufig mit Adenosin Desaminase (ADA) kontaminiert, welche die Umwandlung von Adenosin zu Inosin katalysiert. Eine Umwandlung von 3'-AzA zu dem entsprechenden Inosinderivat hätte die nachfolgenden Untersuchungen zur Integrität der Azidfunktion ebenfalls potentiell erschweren können. Aus diesem Grunde wurde eine Probe aus vollständig geschützten 3'-AzA und der Enzymlösung für den enzymatischen Verdau hergestellt. Die Probe wurde den gleichen Bedingungen ausgesetzt, wie sie zum Verdau der Oligonukleotide angewandt wurden; inklusiver thermischer Denaturierung der Enzyme. Bei einer anschließenden Analyse der Probe mittels RP-HPLC konnte keine Veränderung im Chromatogramm festgestellt werden (Anhang 11). Somit war es möglich eine thermische Zersetzung der Azidogruppe, sowie eine ungewollte ADA-Aktivität der Enzymlösung auszuschließen.

Die Monomer-Lösungen aus der enzymatischen Zersetzung der Oligonukleotide wurden nun mittels RP-HPLC in Triplikaten untersucht (Abbildung 43). Die einzelnen Peaks der resultierenden Chromatogramme konnten dabei unter Verwendung von Nukleosidstandardlösungen identifiziert werden. Des Weiteren wurde der 3'-AzA Peak zusätzlich mittels LC-MS untersucht (Anhang 12). Hierbei konnte bestätigt werden, dass es sich bei der isolierten Substanz um das 3'-Azido-modifizierte Adenosinderivat handelte (m/z $[M+H]^+$ berechnet: 293,1105; detektiert: 293,1270).

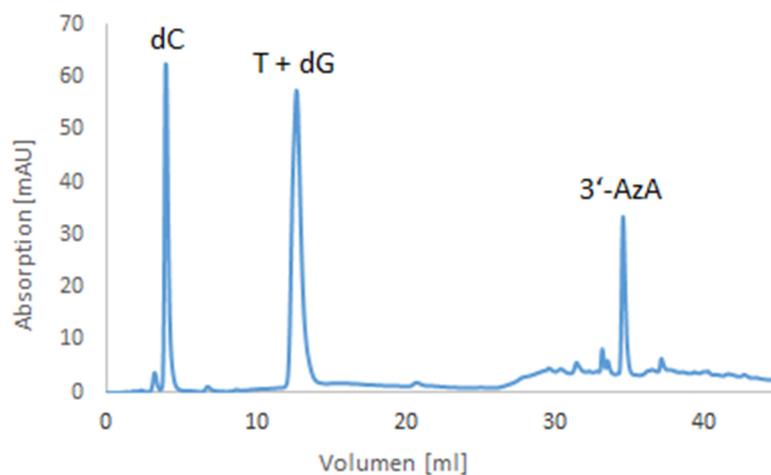


Abbildung 43: RP-HPLC Chromatogramm nach dem enzymatischen Verdau des ODNs 8. HPLC-Gradient 1 (siehe Abschnitt 6.2.11), Absorptionsmessung bei 260 nm.

Im nächsten Schritt wurden die integrierten Flächen des Desoxycytidin- und des 3'-AzA-Peaks verglichen. Die integrierten Peakflächen wurden hierfür durch den Extinktionskoeffizienten des

jeweiligen Nukleosids geteilt (Anhang 13 – 14). Für 3'-AzA wurde näherungsweise der Extinktionskoeffizient für Adenosin verwendet.^[114] Wie bereits erwähnt, ist das Verhältnis zwischen 2'-Desoxycytidin (dC) und 3'-AzA für jedes der drei Oligonukleotide bekannt. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden die Flächen der dC-Peaks zusätzlich auf den 2'-Desoxycytidingehalt der jeweiligen Sequenz normiert. Im Idealfall sollte dieses normierte Verhältnis zwischen dC und 3'-AzA 1:1 betragen. Falls die Azidogruppe unter den Bedingungen der Phosphoramidit-basierten Oligonukleotidsynthese reduziert wird, sollte eine Abweichung zwischen dem erwarteten und dem errechneten Verhältnis der Monomere auftreten. Des Weiteren sollte diese Abweichung mit steigender Sequenzlänge zunehmen. Die nachfolgende Tabelle 5 zeigt die erwarteten und berechneten Verhältnisse zwischen dC und 3'-AzA.

Tabelle 5: Errechnete und detektierte Nukleosid-Verhältnisse.

Name	Erwartetes Verhältnis (A*/dC)	Ermitteltes Verhältnis (A*/dC)	Normiertes Verhältnis (A*/dC)
ODN 5	1 zu 4	1 zu 4,4	0,91 zu 1
ODN 6	1 zu 6	1 zu 6,4	0,96 zu 1
ODN 7	1 zu 8	1 zu 8,7	0,92 zu 1
A* = 3'-AzA			

Man erkennt in allen Fällen nur eine geringe Abweichung zu den erwarteten Verhältnissen. Des Weiteren ist keine Zunahme der Abweichung bei steigender Sequenzlänge zu beobachten. Die Ergebnisse zeigen daher, dass während der Oligonukleotidsynthese kein signifikanter Abbau der Azidogruppe stattfinden kann. Vermutlich ist die Azido-Funktion aufgrund der Anbindung des Startnukleosids an den Festphasenträger sterisch von den Phosphoramiditen abgeschirmt. Es ist außerdem durchaus annehmbar, dass die gemessenen Abweichungen nicht durch eine Degradation der Azidgruppe, sondern vielmehr durch systematische Messungenauigkeiten bei der Aufnahme der Chromatogramme, oder die Verwendung eines approximierten Extinktionskoeffizienten für 3'-AzA verursacht wurden. Somit konnte durch die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zweifelsfrei gezeigt werden, dass immobilisierte Azido-modifizierte Nukleoside exzellente Startbausteine für eine problemlose Herstellung 3'-Azido-funktionalisierter Oligonukleotide in der Phosphoramidit-basierten Festphasensynthese darstellen.

4 Untersuchungen zur Synthese eines Borono-modifizierten Adenosinderivats

4.1 Motivation der Untersuchungen und Entwicklung einer Synthesestrategie

Wie im Abschnitt 3.1 erwähnt, können Borono-modifizierte Nucleoside verwendet werden, um reversible, nicht-kanonische internucleotidische Bindungen zwischen DNA-Fragmenten entlang eines komplementären Template-Strangs auszubilden. Soweit zum jetzigen Zeitpunkt bekannt, ist die Synthese C5'-Borono-modifizierter Nucleoside für alle kanonischen Desoxynucleoside und für Uridin beschrieben.^[80,115,116] Für die verbliebenen kanonischen RNA-Bausteine ist derzeit jedoch noch keine Synthesevorschrift für die Einführung einer Borono-Modifikation bekannt. Die publizierte Synthesevorschrift für das Borono-funktionalisierte Uridinderivat geht von einem kommerziell erworbenen Uridinbaustein aus, welcher bereits an der C5'-Position dimethoxytrityliert ist und an der 2'-OH-Gruppe mit einer Pivaloyloxymethyl (PivOM)-Schutzgruppe versehen ist (Abbildung 44).^[116]

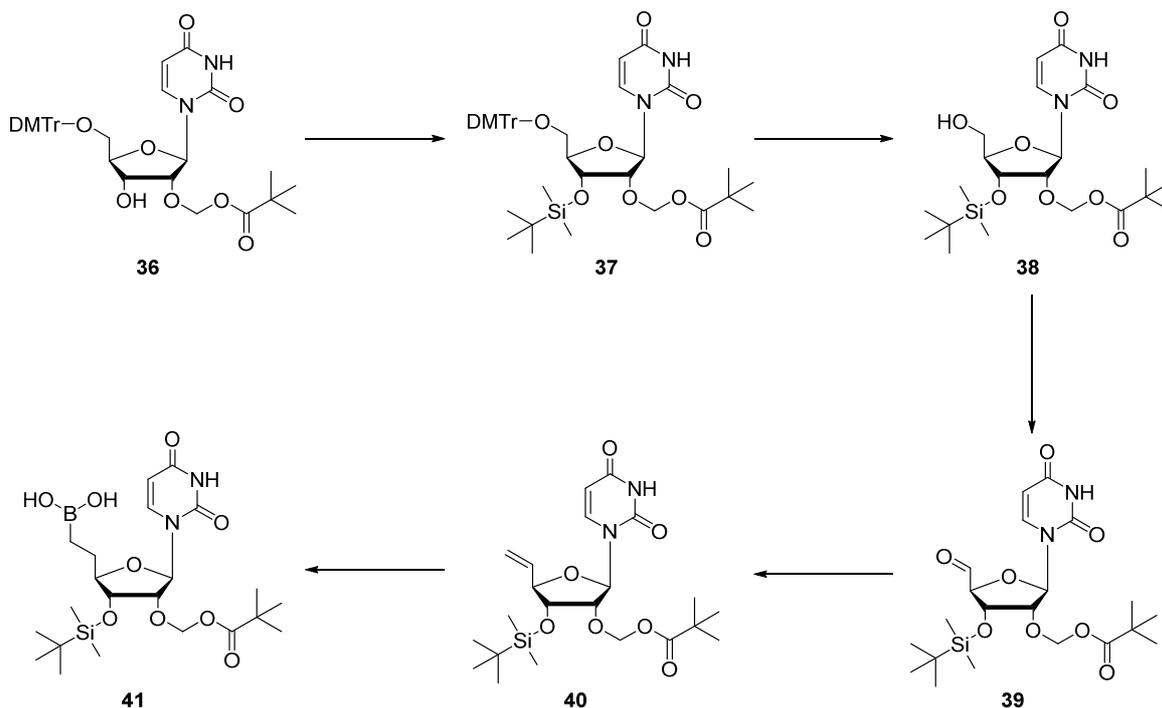


Abbildung 44: Synthesepfad für ein Borono-modifiziertes Uridinderivat.^[116]

Der Vorteil dieser Ausgangsverbindung besteht darin, dass die PivOM-Schutzgruppe orthogonal zu der klassisch verwendeten Silyl-basierten TBDMS-Schutzgruppe ist. Silylether werden hauptsächlich unter Verwendung von Fluoridsalzen wie z.B. tert-Butylammoniumfluorid (TBAF) entfernt, während die PivOM-Schutzgruppe als Acetalester

unter milden Bedingungen mittels Ammoniak entfernt werden kann. Dabei wird zunächst die Estergruppe durch Ammoniak gespalten, wobei an der C2'-Position ein Halbacetal zurückbleibt. Diese Gruppe reicht aus, um die RNA-Sequenz vor einer basischen Hydrolyse zu schützen. Sobald das Ammoniak evaporiert wird, verringert sich der pH-Wert und das Halbacetal zersetzt sich spontan zum Alkohol und Formaldehyd.^[117,118] Somit ist es möglich, die 3'-OH-Gruppe des PivOM-geschützten Uridinderivats mit einer TBDMS-Gruppe zu inaktivieren und anschließend die notwendigen Modifikationen an der 5'-Hydroxylgruppe durchzuführen. Anschließend kann der Silylether an der C3'-Position ohne ungewollte Abspaltung der PivOM-Gruppe entfernt werden.

Für die Synthese eines Borono-modifizierten Adenosinderivats wurde jedoch eine andere Strategie gewählt, da Nucleosidderivate wie Verbindung **34** häufig nur eine geringe kommerzielle Verfügbarkeit haben und die Einführung der PivOM-Schutzgruppe relativ aufwändig ist.^[118,119] Des Weiteren handelt es sich bei TBDMS-geschützten Nucleosiden um die Standardbausteine in der Phosphoramidit-basierten Oligonucleotidsynthese, weshalb im vorliegenden Fall die Synthese eines 2'-O-TBDMS-geschützten Nucleosids angestrebt wurde. Die entwickelte Strategie ist in Abbildung 45 zu sehen und sieht zunächst eine Maskierung der 3'- und 5'-OH Gruppen mit einer Silylgruppe vor, gefolgt von einer Schützung der 2'-OH-Position mit der tBDMS-Schutzgruppe. Anschließend kann die 3'-5'-Schutzgruppe entfernt und die 5'-Hydroxylfunktion trityliert werden.

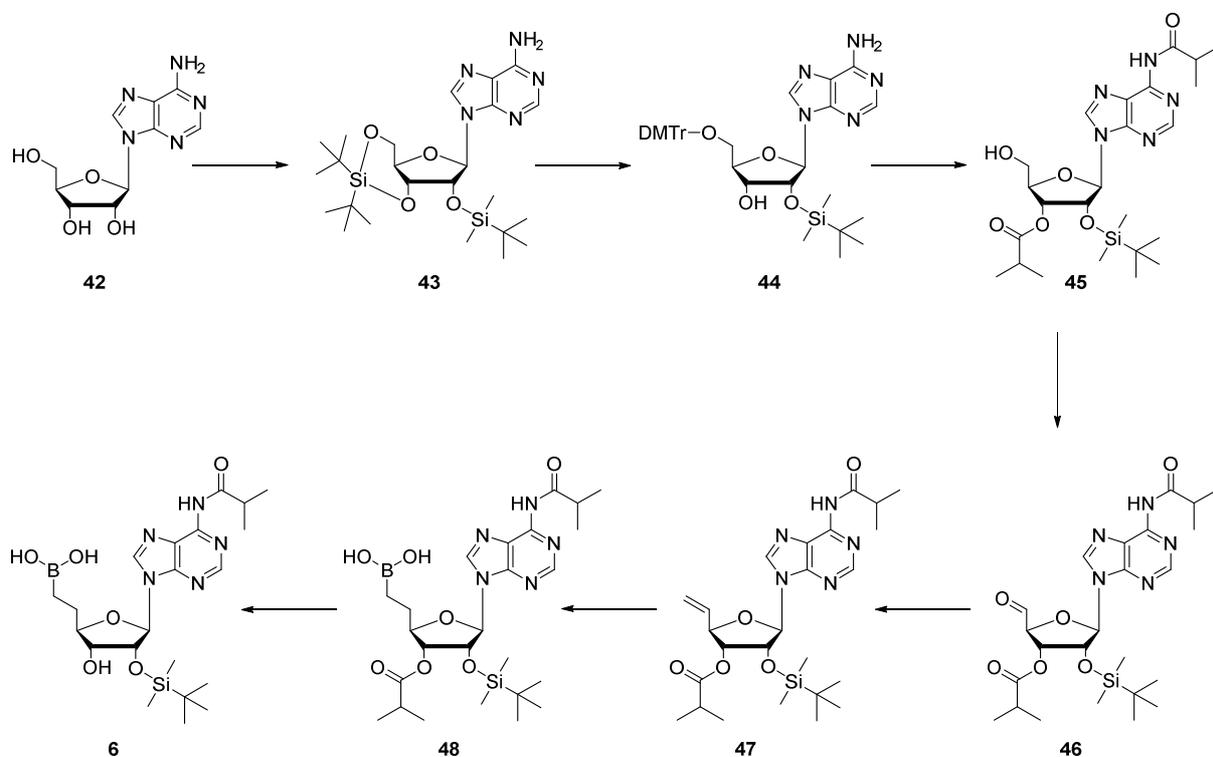


Abbildung 45: Vorgeschlagener Synthesepfad für ein Borono-modifiziertes Adenosinderivat.

Der nächste Syntheseschritt sieht eine Schützung der exozyklischen Aminofunktion mittels Isobutyrylchlorid vor. Allerdings sollte in diesem Fall keine transiente Schützung der Hydroxylgruppe mit TMS-Cl erfolgen. Dies führt dazu, dass an der C3'-Position ein Ester entsteht. Anschließend folgen die notwendigen Reaktionen für die Einführung der Borono-Funktion. Diese beinhalten zunächst eine Oxidation der 5'-OH-Gruppe zu einem Aldehyd. Hierfür sollte zunächst das verhältnismäßig sanfte und somit kontrollierbare Oxidationsmittel IBX verwendet werden, welches ein Vorläufermolekül des bekannteren Dess-Martin-Periodinan-Reagenz darstellt. Der nächste Schritt sah eine Methylierung an der C5'-Position vor. Hierfür kamen das Nysted- und das Tebbe-Reagenz in Frage (Abbildung 46).

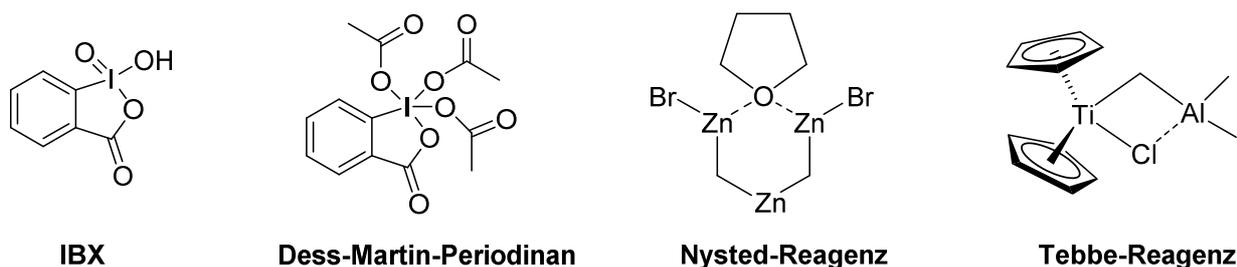


Abbildung 46: Oxidations- und Methylierungs-Reagenzien.

Nach Einführung der Borono-Modifikation mittels Diisopinocampheylboran,^[116] kann nun die Isobutyrylgruppe an der C3'-Position entfernt werden, ohne dabei die exozyklische Aminofunktion zu entschützen. Dies ist möglich, da die Esterbindung an der C3'-Position labiler ist als die Amidbindung am N6-Atom.^[120,121]

4.2 Synthese eines geschützten Adenosinderivats als Ausgangsmolekül für die Oxidationsreaktionen

Im ersten Syntheseschritt wurden die Hydroxylgruppen des Nucleosids maskiert. Dies geschah in zwei Stufen. Zunächst wurde Adenosin mit Di-*tert*-butylsilyl-ditriflat (DBTS) versetzt (Abbildung 47). Hierbei handelt es sich um eine Schutzgruppe für die 3'- und 5'-OH-Positionen. Der Mechanismus ist dabei vergleichbar mit der Einführung der TIPDS-Schutzgruppe. Zunächst reagiert die 5'-Hydroxylgruppe als primärer Alkohol mit dem DBTS, wobei Triflat als gute Abgangsgruppe abgespalten wird. Anschließend befindet sich die Silylgruppe in räumlicher Nähe für einen nukleophilen Angriff durch die 3'-OH-Gruppe, wobei die zweite Triflatgruppe eliminiert wird. Nachdem diese Reaktion abgeschlossen war, wurde das Reaktionsgemisch mit TBDMS-Cl und Imidazol versetzt. Hierbei entsteht ein Silylether an der C2'-Position. Das Imidazol fungiert dabei als Hilfsbase für die Deprotonierung der 2'-OH-Gruppe nach deren nukleophilen Angriff auf das TBDMS-Cl.

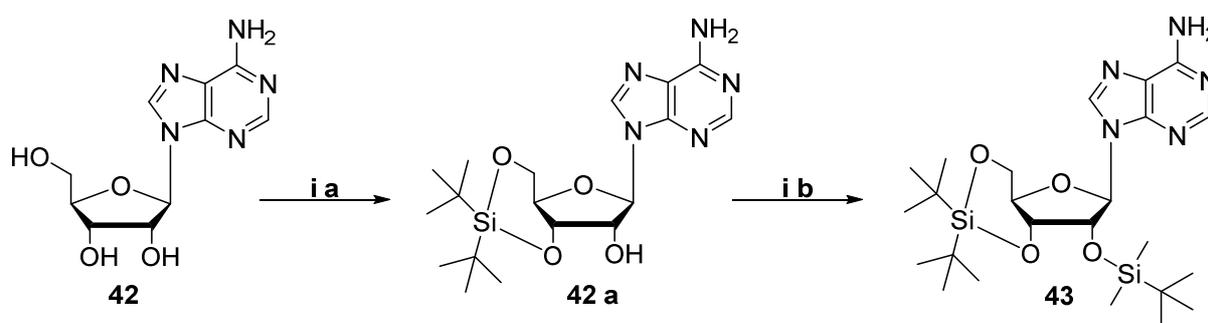


Abbildung 47: Einführung der Silylschutzgruppen; (i a) 1,2 Äq. DBTS, DMF, 1,5 h, 0 °C; (i b) 5 Äq. Imidazol, 1,5 Äq. *tert*-Butyldimethylsilylchlorid, DMF, ÜN, RT, 93% (über beide Schritte).

Im nächsten Schritt musste die DBTS-Gruppe entfernt werden, um eine Tritylierung der 5'-OH-Gruppe zu ermöglichen. Im Vergleich zu der TIPDS-Gruppe erzeugt die DBTS-Gruppe eine höhere Ringspannung am Nucleosid. Deshalb benötigt man kein TBAF um diese abzuspalten, sondern kann HF in Pyridin verwenden. Der Vorteil dabei ist, dass der Einsatz von HF, anders als TBAF, nicht zu einer Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppe führt (Abbildung 48 A). Nach Entfernung der DBTS-Gruppe und einer kurzen wässrigen Aufarbeitung des Zwischenprodukts konnte die 5'-OH-Gruppe erfolgreich dimethoxytrityliert werden. Im nächsten Schritt wurde die Verbindung **42** mit Isobutyrylchlorid versetzt (Abbildung 48 B). Da wie bereits zuvor erwähnt, nicht nur die exozyklische Aminofunktion, sondern auch die 3'-OH-Gruppe maskiert werden sollten, wurde auf den Einsatz von TMS-Cl verzichtet. Bei der Reaktion werden signifikante Mengen HCl freigesetzt. Da die DMTr-Gruppe säurelabil ist, musste ein basisches Lösungsmittel wie Pyridin eingesetzt werden. Pyridin bildet mit der

freiwerdenden Salzsäure Pyridinium-Hydrochlorid und verhindert somit eine ungewollte Detritylierung des Nucleosids.

Als nächstes musste das Nucleosid **43** für die Einführung der Borono-Modifikation vorbereitet werden. Dies ist ein 2-stufiger Prozess, bei dem die 5'-OH-Gruppe zunächst zu einem Aldehyd oxidiert wird. Anschließend wird eine Methylengruppe an die C5'-Position angefügt.^[116] Es wurde zunächst versucht, die Oxidation der 5'-OH-Gruppe analog zu der ursprünglichen Synthesevorschrift für das Uridinderivat mit dem Oxidationsmittel IBX durchzuführen. Hierbei handelt es sich, wie bereits zuvor erwähnt, um ein Vorgängermolekül des Dess-Martin-Periodinan-Oxidationsmittels.^[122]

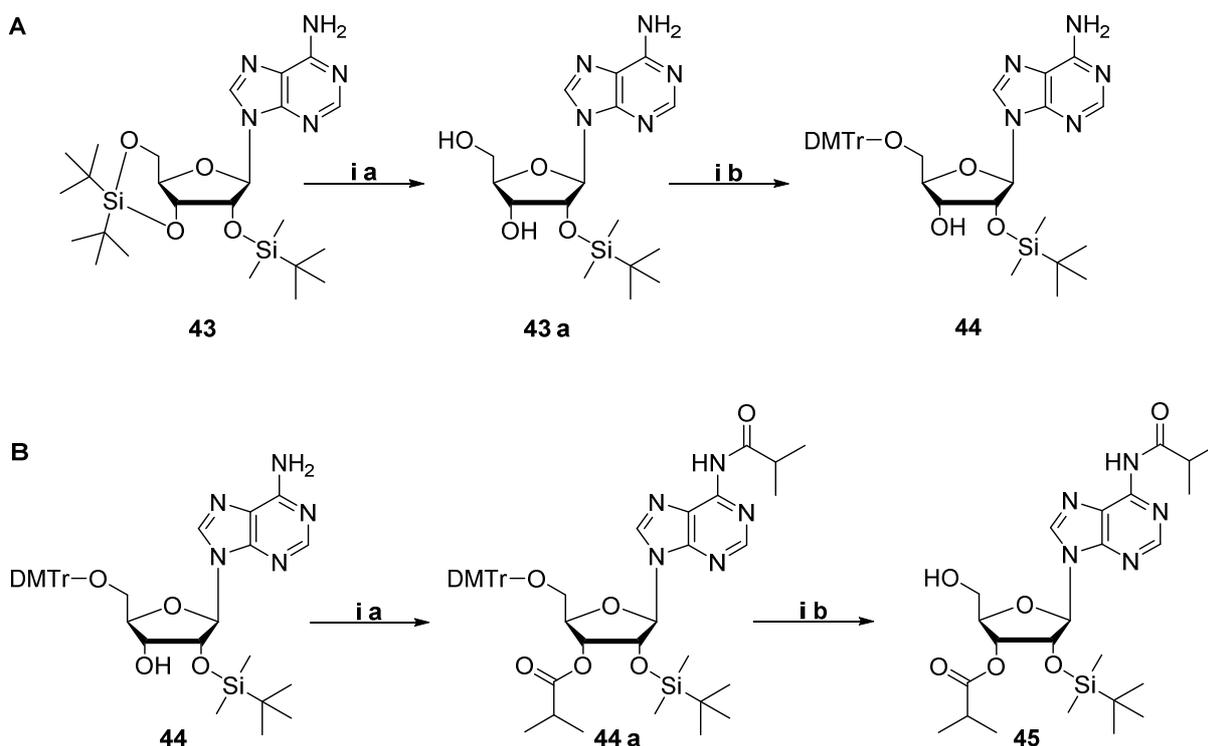


Abbildung 48: Synthese der Verbindungen **44** und **45** mit den jeweiligen Zwischenschritten. **A:** Synthese der DMTr-geschützten Verbindung **44**; (i a): 3,92 Äq. HF (70% in Pyridin, DCM, 2 h, RT); (i b) 1,3 Äq. DMT-Cl, Pyridin, ÜN, RT, 48% (über beide Schritte); **B:** Synthese der Isobutyryl-geschützten Verbindung **45**; (i a): (i a): 2,5 Äq. Isobutyrylchlorid, Pyridin, ÜN, RT; (i b) 2% Trifluoressigsäure, DCM, 15 min, RT, 51% (über beide Schritte).

Bedauerlicherweise konnte die Oxidation mit dem IBX-Reagenz nicht erfolgreich durchgeführt werden. Obwohl IBX ein verhältnismäßig mildes Oxidationsmittel darstellt, waren bereits nach einem kurzen Reaktionsverlauf bei Untersuchungen des Reaktionsgemischs mittels DC Anzeichen für die Entstehung einer freien Säuregruppe erkennbar. Des Weiteren ließ sich das Oxidationsmittel nur schwer von dem Produkt trennen. Auch nach mehrfachen säulenchromatographischen Aufreinigungen war das isolierte Produkt noch stark verunreinigt, so dass eine umfassende Analyse mittels NMR-Spektroskopie nicht möglich war. Aus diesem Grund wurde als nächstes versucht, die Aldehydfunktion mittels einer Moffatt-Reaktion zu

generieren.^[123] Der Vorteil dieser Reaktion ist, dass die Oxidation mechanistisch bedingt nur bis zum Aldehyd erfolgen kann. Eine ungewollte Entstehung einer Carbonsäurefunktion an der C5'-Position war somit ausgeschlossen. Allerdings entstanden bei dieser Reaktion eine Reihe an Nebenprodukten, wodurch die Isolation des Aldehyds erschwert wurde. Auch in diesem Fall bedurfte es mehrerer säulenchromatographischer Aufreinigungen bevor das Hauptprodukt isoliert werden konnte. Eine nachfolgende NMR-spektroskopische Untersuchung ergab zudem, dass während der Reaktion die Isobutyrylgruppe an der C3'-Position abgespalten wurde. Des Weiteren konnte kein Signal für die 3'-OH-Gruppe identifiziert werden. Zunächst wurde vermutet, dass die 3'-OH-Gruppe nach Abspaltung der Isobutyrylgruppe ebenfalls oxidiert wird und eine Keto-Gruppe bildet. Eine solche Verbindung hätte allerdings eine andere Signalverteilung im ¹H-NMR-Spektrum aufgewiesen und war auch nicht kompatibel mit der massenspektrometrisch detektierten Molekülmasse. Die Ergebnisse der NMR- und MALDI-Tof-Untersuchungen ergaben schließlich, dass es sich bei dem Nukleosid um eine Verbindung mit einer 3',4'-Doppelbindung handeln musste. Die Position der Doppelbindung wurde dabei durch die Kopplungskonstanten der relevanten ¹H-NMR-Signale und mittels 2D-NMR-Spektroskopie (Abbildung 49) ermittelt.

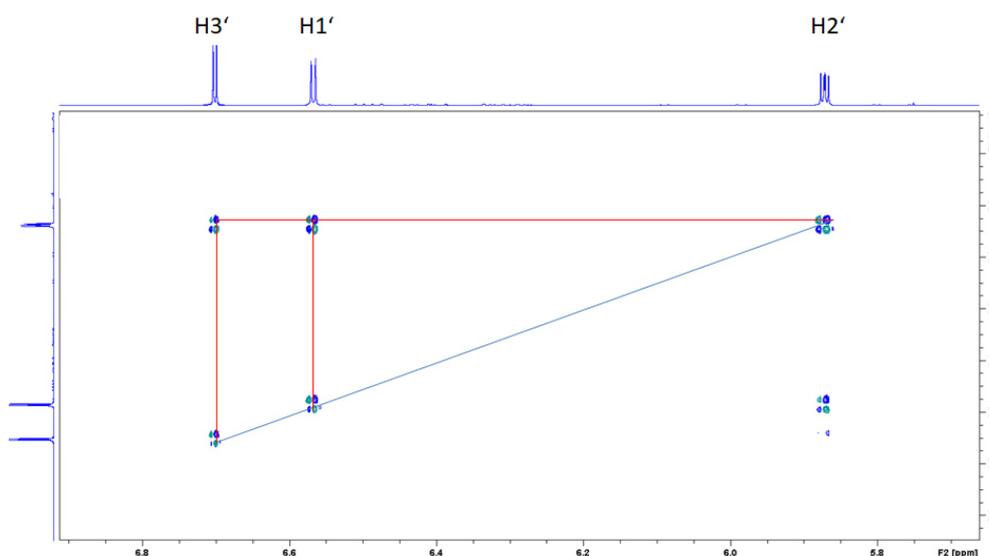


Abbildung 49: 2D-COSY-NMR-Spektrum zur genaueren Untersuchung der Isobutyrylabspaltung während der Oxidationsreaktion von Verbindung **45**.

Es ist davon auszugehen, dass die Bindung zwischen dem C4'- und dem H4'-Atom nach der Ausbildung der Aldehydgruppe stark polarisiert und somit sehr labil wird, was eine Deprotonierung des C4'-Position ermöglicht. Diese Deprotonierung wird dabei zusätzlich durch die Tatsache begünstigt, dass die entstehende negative Ladung des C-Atoms über das angrenzende Sauerstoffatom der Aldehydfunktion mesomeriestabilisiert ist. Des Weiteren kann Isobutyrat als stabile Abgangsgruppe eliminiert werden, wobei sich dann die 3',4'-Doppelbindung aufbaut (Abbildung 50).

Angesichts dieser Ergebnisse wurde nun versucht, die Oxidation mit dem Dess-Martin-Periodinan-Reagenz durchzuführen. Dies geschah unter der Annahme, dass sich das Dess-Martin-Reagenz aufgrund seiner geringeren Polarität leichter vom Reaktionsprodukt mittels Säulenchromatographie abtrennen ließe als das IBX-Oxidationsmittel.

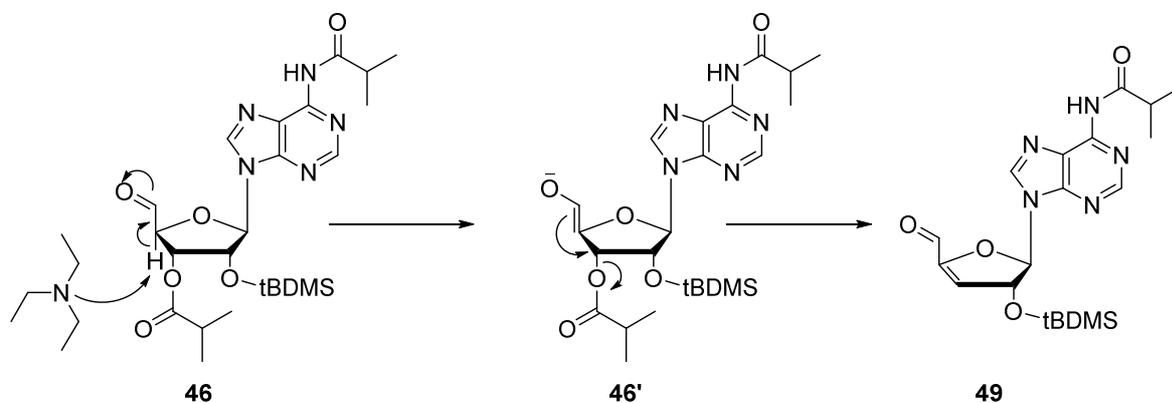


Abbildung 50: Angenommener Mechanismus für die basenkatalysierte Isobutyrylabsplattung bei Verbindung **46**.

Des Weiteren wird für die Dess-Martin-Oxidation Pyridin verwendet, welches eine deutlich schwächere Base darstellt als das Triethylamin in der Moffatt-Oxidation. Somit lag die Vermutung nahe, dass in diesem Fall keine Abspaltung der Isobutyryl-Gruppe auftreten würde. Bedauerlicherweise zeigten die NMR-Untersuchungen des Reaktionsprodukts erneut eine Eliminierung der Säuregruppe unter Ausbildung einer 3',4'-Doppelbindung. Es scheint also keine geeigneten Bedingungen zu geben, in denen das Nukleosid kontrolliert zu einem Aldehyd oxidiert werden kann. Als mögliche Alternativreaktion wurde noch die Albright-Goldmann-Oxidation in Betracht gezogen, welche unter Verwendung von DMSO und Acetanhydrid durchgeführt wird.^[124] Jedoch ist bei der Verbindung **46** auch eine säurekatalysierte Eliminierung der Isobutyrylgruppe denkbar (Abbildung 51), so dass diese Methodik nicht weiter in Betracht gezogen wurde. Stattdessen wurde beschlossen, die Synthesestrategie grundlegend zu überdenken.

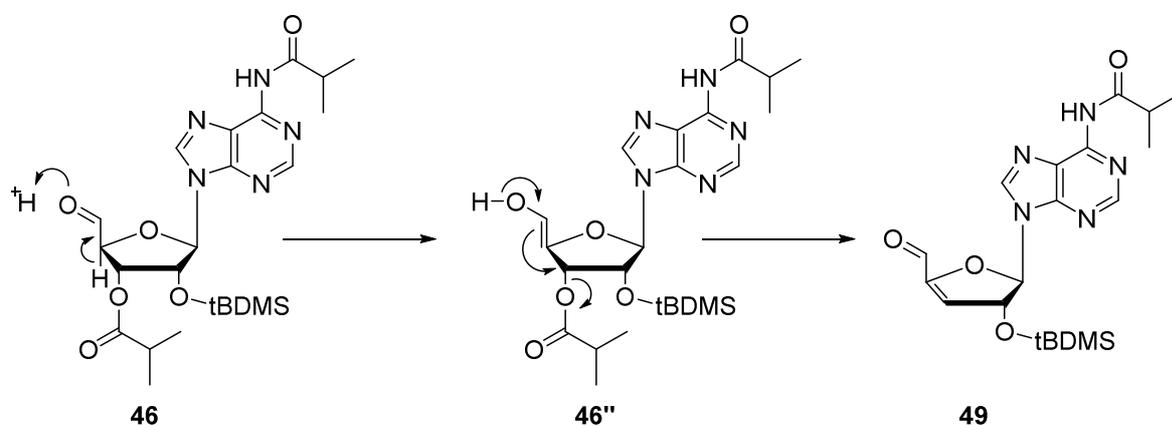


Abbildung 51: Angenommener Mechanismus für eine hypothetische säurekatalysierte Isobutyrylabsplattung bei Verbindung **46**.

4.3 Wechsel der Synthesestrategie

Die neue Synthesestrategie ist in Abbildung 52 dargestellt. Bei diesem Pfad wird mit einer säurekatalysierten 2',3'-Isopropylidin-Schätzung begonnen, bevor die Maskierung der exozyklischen Aminofunktion mittels Isobutyrylchlorid erfolgt (Abbildung 53). Bei der Isopropylidin-Schätzung wird 2,2-Dimethoxypropan in Kombination mit p-Toluolsulfonsäure eingesetzt. Die Säure protoniert dabei eine der Methoxygruppen und aktiviert so das Molekül für einen nukleophilen Angriff durch eine der beiden sekundären Hydroxylgruppen. Im Zuge dessen wird erneut ein Proton abgespalten, so dass die zweite Methoxygruppe protoniert werden kann. Bei der Reaktion entsteht ein stabiles cyclisches Ketal (Verbindung **50**).

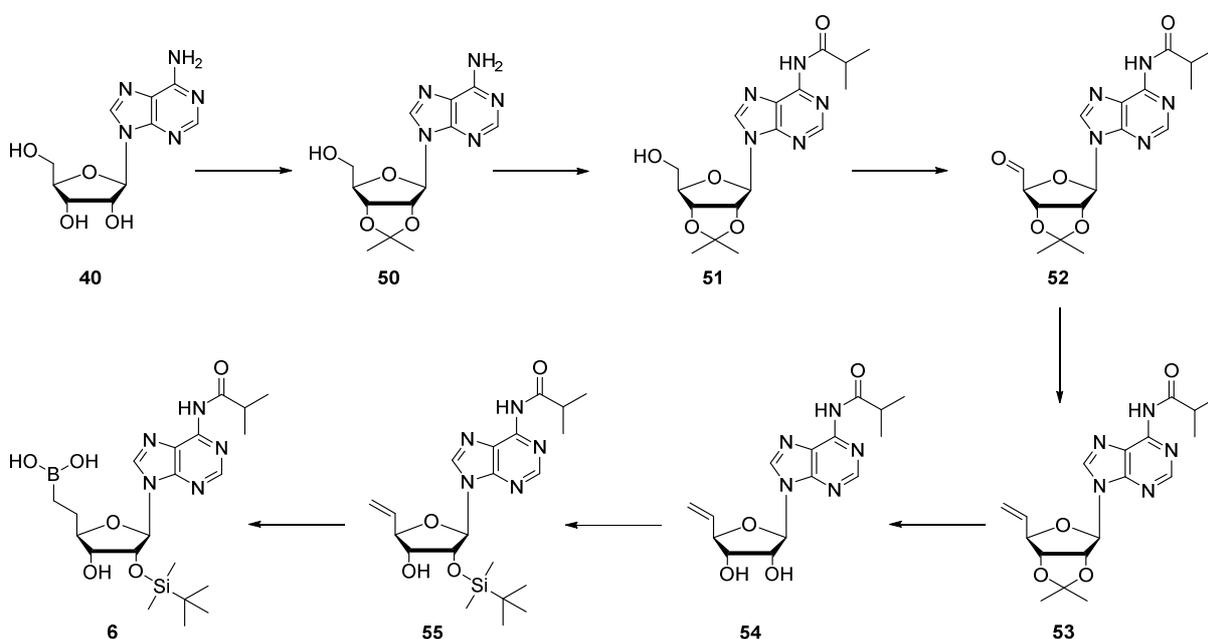


Abbildung 52: Alternative Synthesestrategie zur Darstellung eines 5'-Borono-modifizierten Adenosinderivats.

Nach der Schätzung der exozyklischen Aminofunktion kann die verbleibende freie 5'-OH-Gruppe oxidiert und mit dem Nysted-Reagenz methyliert werden. Die 2',3'-Isopropylidin-Gruppe kann im nächsten Schritt entfernt werden, was eine Schätzung der 2'-OH-Gruppe mittels TBDMS-Cl ermöglicht. Anschließend kann die Boronofunktion an der C6'-Position eingeführt werden. Diese Synthesestrategie beruhte auf einer vergleichbaren Strategie zur Darstellung eines 5'-Borono-modifizierten und 2'-TBDMS geschützten Uridinderivats, welche in der Arbeitsgruppe um Prof. M. Smietana im Zuge einer Promotionsarbeit entwickelt wurde.^[96] Dieser Ansatz ist jedoch mit Nachteilen verbunden, da die Silylierung der 2'-Position zur Generierung der Verbindung **53** im Normalfall nicht selektiv ist. Bei dieser Reaktion entstehen sowohl das 2'- als auch das 3'-TBDMS-geschützte Isomer in etwa gleichen Mengen. Dies führt zu einer erheblichen Reduzierung der Reaktionsausbeute, welche bei TBDMS-

Schützungen normalerweise annähernd quantitativ ist. Die schwierige Auftrennung der beiden Isomere führt dabei zu einer weiteren Verringerung der effektiven Ausbeute. Zwar gibt es Möglichkeiten die Selektivität der TBDMS-Schätzung durch Verwendung von Nitraten oder Perchloraten zugunsten der 2'-OH-Gruppe zu erhöhen,^[125] jedoch unterscheidet sich dieser Selektivitätsgewinn je nach Nucleosidderivat teilweise erheblich, weshalb unklar ist, ob diese Methodik bei der Silylierung von Verbindung **52** zu einer signifikanten Ausbeutenverbesserung beitragen würde. Des Weiteren gibt es Beispiele für eine unerwünschte Wanderung der TBDMS-Gruppe zwischen der 2'- und der 3'-OH-Position.^[126] Da der ursprünglichen Synthesestrategie allerdings keine Erfolgsaussichten mehr zugeschrieben wurden, stellte die neue Alternativstrategie einen vielversprechenden Ansatz dar.

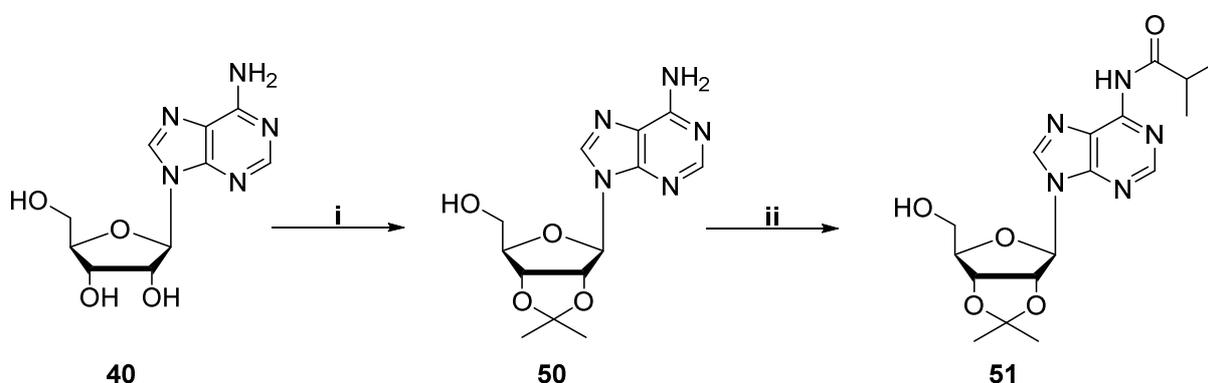


Abbildung 53: Synthese des geschützten Nucleosids **51** als Ausgangsverbindung für die Oxidationsreaktion. (i): 2 Äq. 2,2-Dimethoxypropan, 0,4 Äq. p-Toluolsulfonsäure, Aceton, 3 h, **50**, 74%; (ii a): 3 Äq. TMS-Cl, Pyridin, 30 min, 0 °C; (ii b): 1,5 Äq. Isobutyrylchlorid, Pyridin, ÜN, RT; (ii c): NH₃/H₂O, Pyridin, 30 min, RT, 81%.

Sowohl die selektive Schätzung der 2'- und 3'-Hydroxygruppen, als auch die Maskierung der exozyklischen Aminofunktion konnten erfolgreich und mit guten Ausbeuten durchgeführt werden. Die nachfolgenden Versuche, die 5'-OH-Gruppe des Nucleosids **51** zum Aldehyd **52** zu oxidieren waren jedoch erfolglos. Zunächst wurde eine Oxidationsreaktion mit dem Dess-Martin-Periodinan-Reagenz durchgeführt. Bedauerlicherweise wurden bei dieser Reaktion zahlreiche Nebenprodukte gebildet und es war nicht möglich, das Oxidationsprodukt in Reinform zu isolieren. Als nächstes wurde eine Swern-Oxidation durchgeführt.^[127] Diese ist mechanistisch ähnlich zur Moffatt-Oxidation und verhindert somit eine ungewollte Generierung einer Carboxylfunktion. Außerdem wird diese Reaktion bei sehr niedrigen Temperaturen von etwa -78 °C durchgeführt. Es wurde gehofft, dass die niedrige Reaktionstemperatur die Entstehung der Nebenprodukte verhindert oder zumindest stark reduziert. Dies war jedoch nicht der Fall.

Generell scheint es nur wenige Berichte über die erfolgreiche Synthese eines 5'-Aldehyd-Adenosinderivats zu geben. Derartige Adenosinverbindungen wurden als instabil beschrieben und neigen zur Ausbildung von Isomeren und Hydraten (Abbildung 54).^[128] Dies könnte die Ursache für die beobachtete Entstehung zahlreicher Nebenprodukte während der Oxidationsreaktionen sein.

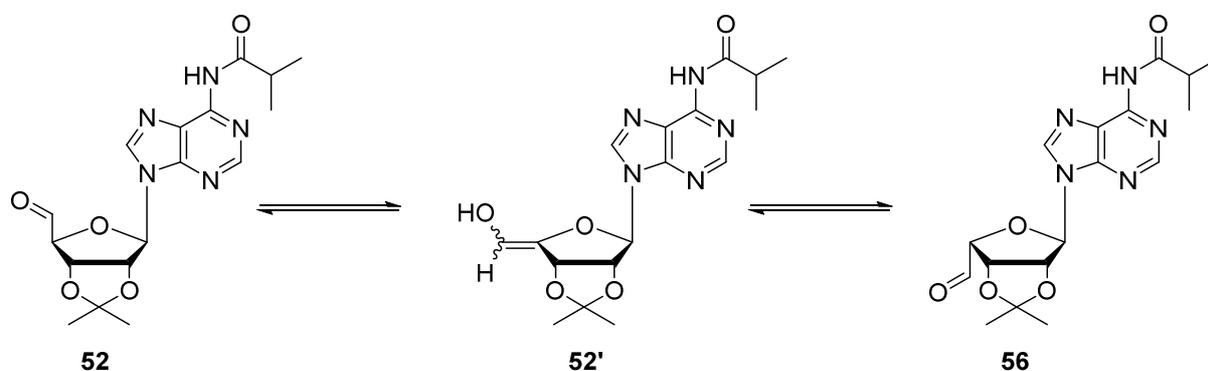


Abbildung 54: Tautomeriebedingte Isomerisierung am Beispiel der Verbindung 52.^[128]

Eine mögliche Alternativstrategie sieht eine Oxidation zum Aldehyd im Zuge einer Moffattoxidation in Kombination mit N,N'-Diphenyldiethylendiamin vor.^[129] Bei dieser Reaktion entsteht ein zyklisches 1,3-Diphenylimidazolidin-Derivat, welches (vermutlich aus sterischen Gründen) in der gewünschten Konfiguration vorliegt und in dieser fixiert ist. Anschließend kann eine saure Hydrolyse zum Aldehyd bzw. Hydrat erfolgen. Durch Sieden in Benzol unter Verwendung eines Wasserabscheiders, kann das Aldehyd in Reinform isoliert werden (Abbildung 55).^[129]

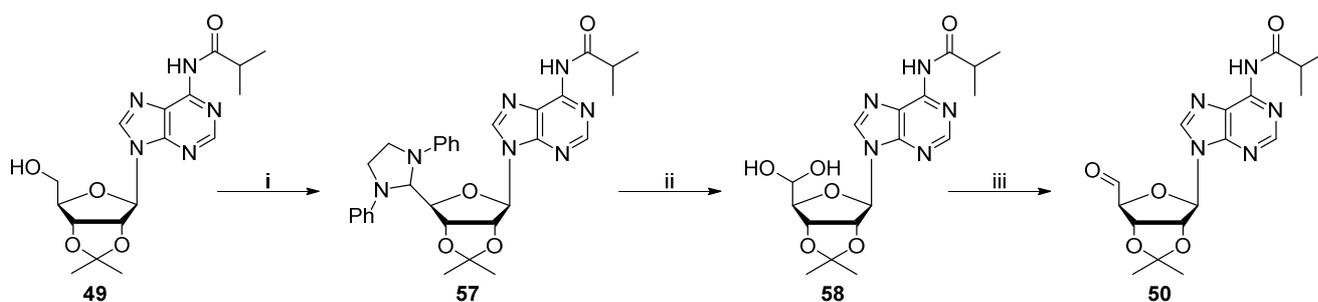


Abbildung 55: Mögliche Alternativstrategie zur Darstellung der Verbindung 50. i a): DMSO/DCC/Cl₂CHCO₂H; i b): (PhNHCH₂)₂; ii: Dowex (H⁺)/THF/H₂O; Wasserabscheider, Benzol/Δ.^[129,130]

Bei der Hydrolysierung des Diphenylimidazolidin-Derivats entstehen wieder die beiden Isomere 52 und 56. Allerdings liegt das Gleichgewicht zwischen den beiden Verbindungen auf der Seite der gewünschten Verbindung 52 und die beiden Isomere scheinen voneinander trennbar zu sein.^[128] Diese Strategie erscheint als vielversprechend für weiterführende Untersuchungen zur Synthese eines 5'-Borono-modifizierten Adenosinderivats.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich primär mit der Synthese modifizierter Nucleoside, welche ein wichtiges Werkzeug zur Erforschung und Charakterisierung von Nucleinsäuren darstellen.

Die Arbeit lässt sich dabei in drei Hauptabschnitte unterteilen. Der erste Abschnitt beschäftigte sich mit der Synthese zweier 8-Aza-7-deaza-2'-desoxyadenosinderivate mit den notwendigen Modifikationen für einen Einsatz in der Phosphoramidit-basierten chemischen ODN-Festphasensynthese. Ziel war es, ein Derivat mit einem Linker für die Anbindung an einen Festphasenträger sowie einen Phosphoramidit-Baustein herzustellen. Bei dem Projekt handelte es sich um eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. U. Müller. Im Zuge dessen sollten Cofaktor-Sequenzen mit einem unterschiedlichen Anteil des 8-Aza-7-deaza-2'-desoxyadenosinderivats hergestellt werden, um dessen Einfluss auf die Aktivität eines Polymeraseribozyms zu testen. Daher sollte zusätzlich eine Strategie für die Synthese längendiverser ODNs etabliert werden. Beide Adenosinderivate wurden erfolgreich hergestellt, wobei umfangreiche Analysen eingesetzt wurden, um die korrekte Produktkonfiguration zu verifizieren.

Die Untersuchungen zur Synthese längendiverser ODNs wurden aus ökonomischen Gründen mit Thymidinbausteinen durchgeführt. Es wurden verschiedene Trägermaterialien und Phosphoramiditkonzentrationen unter Auslassung des Capping-Schritts getestet, bevor schließlich Bedingungen identifiziert werden konnten, unter denen ODNs mit einer Länge von 1-15 Nucleotiden in vergleichbaren Mengenverhältnissen hergestellt werden konnten. Anschließend wurde untersucht, ob sich die etablierte Methodik mit ODN-Synthesen unter Standardbedingungen kombinieren ließe. Hierfür wurde versucht, die noch immobilisierten längendiversen ODNs mit der Sequenz 5'-GGCGCC-3' unter Standardbedingungen zu verlängern. Allerdings konnten bei der anschließenden Aufreinigung keine Oligonucleotide identifiziert werden, welche den erwarteten Längenbereich abdeckten. Es ist dabei unklar, ob dieses Problem durch eine Optimierung des Aufreinigungsprotokolls behoben werden könnte. Dennoch stellt die etablierte Methodik ein vielversprechendes Werkzeug für eine zeitsparende und kostengünstige Synthese längendiverser Oligonucleotide dar, welches weitere Untersuchungen in diesem Bereich rechtfertigt. Die synthetisierten 8-Aza-7-deaza-2'-desoxyadenosinderivate wurden schließlich erfolgreich verwendet, um drei ODN-Sequenzen unterschiedlicher Länge unter Standardbedingungen herzustellen.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit der Synthese dreier unterschiedlicher Azido-modifizierter Nucleoside. Auch hier sollten die entsprechenden Nucleosidderivate die notwendigen Modifikationen für einen Einsatz in der chemischen ODN-Festphasensynthese enthalten. Bei dem Projekt handelte es sich um eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. M. Smietana. Die Azido-modifizierten Nucleosidbausteine sollten in der Phosphoramidit-basierten ODN-Festphasensynthese als Startbausteine eingesetzt werden, um die daraus erhaltenen Oligonucleotide anschließend chemisch zu 3'-Amino-funktionalisierten ODNs reduzieren zu können. Ziel war es, jeweils ein 2'- bzw. 3'-Azido-modifiziertes Adenosinderivat sowie ein 3'-Azido-Uridinderivat herzustellen. Alle drei Bausteine konnte erfolgreich hergestellt werden, wobei in allen Fällen die gewünschte Produktkonfiguration mittels NMR-Analysen zweifelsfrei bestätigt werden konnte. Die jeweiligen Bausteine wurden an einem CPG-Festphasenträger immobilisiert und dem Kooperationspartner übergeben. Mithilfe dieser Bausteine konnte die Partnergruppe die benötigten 3'-Amino-funktionalisierten ODNs herstellen und die Untersuchungen bezüglich der internucleotidischen Oxazaborolidin-Bindungen erfolgreich durchführen.

Des Weiteren wurden im Zuge der vorliegenden Arbeit Untersuchungen bezüglich der Stabilität der Azidogruppe unter Standardbedingungen der chemischen Oligonucleotid-Festphasensynthese durchgeführt. Die Untersuchungen ergaben, dass die Azidogruppen an den 3'-Enden der synthetisierten ODNs größtenteils intakt waren somit und keine signifikante Degradation bei iterativer Exposition mit Phosphoramiditen stattfand. Dies ließ auf eine grundsätzlich hohe Stabilität der Azide unter den Standardbedingungen der Phosphoramidit-basierten Oligonucleotid-Festphasensynthese schließen und zeigte zweifelsfrei, dass 3'-Azido-modifizierte ODNs problemlos mit diesem Verfahren hergestellt werden können.^[113]

Der dritte Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit Untersuchungen bezüglich der Synthese eines 5'-Borono-modifizierten Nucleosids. Die chemische Einführung einer 5'-Borono-Modifikation ist für alle kanonischen Desoxynucleoside und Uridin, aber nicht für die übrigen kanonischen Ribonucleoside beschrieben. Somit sollten für dieses Projekt erste Untersuchungen für die Synthese eines 5'-Borono-modifizierten Adenosinderivats vorgenommen werden. Die ersten Syntheseschritte konnten erfolgreich durchgeführt werden, allerdings bereitete die Oxidation der 5'-Hydroxylgruppe Schwierigkeiten, da bei der Charakterisierung der Oxidationsprodukte festgestellt wurde, dass die Isobutyrylgruppe im Laufe der Reaktion unter Ausbildung einer 3',4'-Doppelbindung eliminiert wurde. Ein Versuch, die Oxidationsreaktion unter mildereren Bedingungen mit Hilfe des Dess-Martin-Periodinan-Oxidationsmittels durchzuführen, führte zum selben Ergebnis.

Aus diesem Grund wurde entschieden, auf eine alternative Synthesestrategie zu wechseln. Bedauerlicherweise konnte auch bei dieser Strategie die Oxidationsreaktion nicht erfolgreich durchgeführt werden. Es müssen daher in diesem Bereich noch weitere Nachforschungen durchgeführt werden. Allerdings konnten im Zuge dieser Arbeit bereits wertvolle Erkenntnisse gesammelt und Alternativstrategien für zukünftige weiterführende Untersuchungen in diesem Bereich identifiziert werden.

6 Experimentarteil

6.1 Geräte und Software

DNA/RNA-Syntheseautomat	Gene Assembler Special, Pharmacia
Gelelektrophorese	Electrophoresis Power Supply, EPS 3500, Pharmacia Biotech
HPLC	Äkta Purifier, Amersham Biosciences Pump: P-900, Amersham Biosciences UV-Detektor: UV-900, Amersham Biosciences IE-Säule: Dionex DNAPac, PA100, 250/9; RP-Säulen: Nucleosil EC 125/4, 120-5 C18; Nucleodur 250/4, 100-5, C18
HPLC-Software	Unicorn 4.0, Amersham Biosciences
Lyophilisieranlage	<i>Alpha 3-4 LSCbasic</i> , Christ Martin
Massenspektrometer	microflex MALDI-TOF MS, Bruker Daltonics
MALDI-ToF Software	Flexcontrol Software Bruker Daltonics
NMR-Spektrometer	Bruker Avance II 300 MHz, Bruker Avance III 400 bzw. 500 MHz, Bruker Avance III neo 600 MHz
NMR-Software	TopSpin 4.0.7, Bruker
Peakintegration (HPLC)	Origin 8.0; Unicorn 4.0
Photosystem	<i>Chemi-Smart 2000 Photosystems</i>
Schüttelinkubator	Thermomixer <i>comfort</i> , Eppendorf
UV/Vis-Spektrometer	NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific

6.2 Material und Methoden

6.2.1 Puffer und Lösungen

APS-Lösung (10%)	10 % APS in TBE-Puffer
Denaturierende PAA-Lösung	20% Acrylamid/Bisacrylamid (19:1), 1x TBE, 7 M Harnstoff
Denaturierender Ladepuffer	98 % (v/v) Formamid, 2 % (v/v) 0,5 M EDTA
Elutionspuffer	0,3 M NaOAc, pH 5,6
Harnstoff-Lösung	7 M Harnstoff in TBE
IE-HPLC Puffer	Puffer A: 25 mM Tris, 0, 5% ACN, pH 8,0 Puffer B: 25 mM Tris, 800 mM NH ₄ Cl, 0,5 % ACN, pH 8,0
RP-HPLC Puffer	Puffer A: 0,1 M TEAAc, 0-5 % ACN pH 7,5 Puffer B: 0,1 M TEAAc, 20-50 % ACN, pH 7,5
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8.0
TBE-Puffer	0,1 M EDTA; 0,1 M Tris; 0,83 M Borsäure, pH 8,0

6.2.2 Chemische DNA-Festphasensynthese

Die DNA-Oligonukleotide wurden nach der Standard-Phosphoramidit-Methode mit einem *Gene Assembler special* im 1,3 oder 0,2 µmol-Maßstab synthetisiert. Die Kopplungsschritte erfolgten mit 0,1 M 5'-O-DMTr-β-cyanoethyl-geschützten Phosphoramiditen (ChemGenes). Als Aktivatormolekül diente 1-(Benzylmercapto)-1H-tetrazol (BMT). Als Lösungsmittel wurde wasserfreies Acetonitril eingesetzt. Die BMT und Phosphoramidit-Lösungen wurden über 3 Å Molekularsieb gelagert. Die genauen Bedingungen für die chemische ODN-Herstellung sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Standardbedingungen für die chemische Festphasensynthese von DNA.

Schritt	Reagenzien	Dauer
5'-O-DMTr-Entschützung	3% Dichloressigsäure in 1,2-Dichlorethan	36 s
Aktivierung/Kopplung	100 µl Phosphoramiditlösung in MeCN (0,1 M) 200 µl BMT in MeCN (0,3 M)	5 min
Capping	Cap A: 0,5 M DMAP in MeCN Cap B: Ac ₂ O/ 2,4,6-Collidin/ MeCN (2:3:5; v/v/v)	48 s
Oxidation	0,02 M I ₂ in 2,4,6-Collidin/ H ₂ O/ MeCN (1:5:11; v/v/v)	18 s

Die unter Standardbedingungen hergestellten DNA-Sequenzen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Chemisch synthetisierte Oligonukleotide.

Name	Sequenz	Länge (NTs)	Maßstab (µmol)
ODN 1	5'-GGCGC C A*-3'	6	0,2
ODN 2	5'-GGCGC C A* ₅ -3'	11	0,2
ODN 3	5'-GGCGC C A* ₂₀ -3'	26	0,2
ODN 8	5'-GTTCC GTTCC A**-3'	11	1,3
ODN 9	5'-GTTCC GTTCC GTTCC A**-3'	15	1,3
ODN 10	5'-GTTCC GTTCC GTTCC GTTCC A**-3'	21	1,3

A* = 8-Aza-7-deaza-2'-desoxyadenosin; A** = 3'-Azidoadenosin

ODNs **1-3** wurden mittels Gelelektrophorese aufgereinigt (siehe Abschnitt 6.2.5). ODNs **8-10** wurden mittels IE-HPLC aufgereinigt (siehe Abschnitt 6.2.11).

Längendiverse Oligonukleotide wurden grundsätzlich unter den in Tabelle 6 aufgeführten Bedingungen hergestellt, allerdings wurden in diesem Fall die Cap A und Cap B Reagenzien gegen Acetonitril ausgetauscht und die Phosphoramiditkonzentration variiert (siehe Abschnitt 2.3, Tabelle 1).

Die fertigen Sequenzen wurden für 2 h bei 65 °C mit 2 ml konz. NH₃-Lsg und 8 M ethanolischer Methylamin-Lsg (1:1 V/V) behandelt, um den Träger und die Schutzgruppen abzuspalten.

6.2.3 Detritylierung

DMT-ON Oligonukleotide wurden nach der Aufreinigung mittels RP-HPLC detrityliert. Hierfür wurden die jeweiligen Proben unter Vakuum getrocknet und anschließend in jeweils 1 ml 80%iger, sterilfiltrierter Essigsäure aufgenommen und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mittels Triethylamin auf einen pH-Wert von 7 eingestellt, bevor die Proben unter Vakuum getrocknet wurden.

6.2.4 Reinigung mit Sepak-Säule

Die detritylierten Oligonukleotide wurden mittels Sepak-Säulen (12cc 2g C18) entsalzt. Hierfür wurde die Säule zunächst mit 10 ml Acetonitril gefüllt. Anschließend wurde mit 10 ml 100 mM Triethylammoniumbicarbonat (TBK) gespült, bevor die Proben mit einem Volumen von 500 µl aufgetragen wurde und erneut mit insgesamt 4 ml TBK gespült wurde. Die Salze wurden unter Zugabe von 20 ml Aqua dest. von der Säule eluiert. Schließlich wurden die Oligonukleotide mittels eines Gemischs aus MeCN/H₂O (6/4) isoliert, wobei 1 ml Fraktionen in entsprechenden Eppendorf-Gefäßen gesammelt wurden. Die einzelnen Fraktionen wurden unter Vakuum eingengt und mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht. Alle Fraktionen mit Oligonukleotiden wurden vereint, unter Vakuum bis zur Trockne eingengt und in 100 µl Wasser aufgenommen.

6.2.5 Denaturierende PAGE

Denaturierende Gele wurden entweder im präparativen (100 ml) oder analytischen Maßstab (20 ml) angefertigt. Der Acrylamid-Gehalt der Gellösung betrug abhängig von der Länge der aufzutragenden Sequenz 20% (ODN-Länge ≤ 11 NTs) bzw. 15% (ODN-Länge ≥ 12 NTs) mit jeweils 7 M Harnstoff. Die Polymerisation wurde durch 1% APS und 0,1% TEMED (jeweils bezogen auf das Endvolumen) initiiert. Die Gelelektrophorese wurde in TBE-Puffer durchgeführt. Bevor die Proben aufgetragen wurden, erfolgte ein Vorlauf bei 400 bzw. 140 V. Anschließend wurden die DNA-Proben in denaturierendem Ladepuffer aufgenommen und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Referenzbanden (Bromphenolblau und Xylencyanol) die gewünschte Laufweiten erreicht hatten. Analytische Gele wurden daraufhin mit SYBR-Gold in TAE-Puffer angefärbt. Präparative Gele wurden mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt, um die DNA-Banden sichtbar zu machen. Die gewünschten DNA-

Banden wurden aus dem Gel herausgeschnitten, in kleinere Stücke zerteilt und mit Extraktionspuffer überschichtet. Die DNA-Extraktion erfolgte bei 8 °C, wobei die Extraktionslösung in unterschiedlichen Abständen abgenommen wurde. Die ersten beiden Entnahmen erfolgten nach jeweils 1 h und die dritte Entnahme wurde nach 12 h durchgeführt. Die Extraktionslösungen wurden vereint und im Vakuum reduziert. Anschließend wurde die enthaltene DNA mittels einer DNA-Fällung isoliert.

6.2.6 Ethanolfällung

Für die Ethanolfällung wurde die DNA-Lösung mit 0,1 Vol-Äq. 0,3 M NaOAc-Puffer pH 5,4 und 3 Vol-Äq. Ethanol versetzt. Nach gründlicher Durchmischung wurde die Lösung über Nacht bei -20 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde die präzipitierte DNA bei 12000 rpm für 30 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert. Die erhaltenen DNA-Pellets wurden 2-mal mit je 150 µl kaltem 70%igen Ethanol gewaschen und anschließend unter Vakuum getrocknet.

6.2.7 Butanolfällung

Die Butanolfällung wurde ähnlich wie die Ethanolfällung durchgeführt. Allerdings wurde in diesem Fall die DNA-Lösung mit 20 Vol-Äq. Butanol versetzt. Nach gründlicher Durchmischung wurde die Lösung über Nacht bei -20 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde die präzipitierte DNA bei 6000 rpm für 45 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert. Die erhaltenen DNA-Pellets wurden 2-mal mit je 150 µl kaltem 70%igen Ethanol gewaschen und anschließend unter Vakuum getrocknet.

6.2.8 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der isolierten DNA-Sequenzen wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie bestimmt, wobei jeweils 1 µl Probenvolumen eingesetzt wurde. Es wurde die jeweilige Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, woraus über das Lambert-Beer'sche-Gesetz die jeweilige DNA-Konzentration ermittelt werden konnte. Die für die Berechnung notwendigen Extinktionskoeffizienten der DNA-Sequenzen wurden mittels der *nearest neighbor method* berechnet.

6.2.9 Massenspektrometrie (MALDI-ToF)

Niedermolekulare Verbindungen wurden in Methanol oder Aceton aufgenommen. Es wurde 1 µl der jeweiligen Probe zusammen mit 1 µl der Matrix 3-Hydroxypyridin-2-carboxylsäure (HPA) in MeCN/H₂O (1/1) auf eine Trägerplatte aufgetragen. Nach vollständiger Auskristallisation der Probe erfolgte die Messung mit einem Bruker microflex MALDI-ToF MS Spektrometer.

Für Messungen mit Oligonukleotiden wurde die Probe (2 µl) zusammen mit Dowex für 30 min bei RT inkubiert um eine Entsalzung durchzuführen. Anschließend wurde 1 µl der jeweiligen Probe zusammen mit 1 µl der Matrix (2,4,6-Trihydroxy-acetophenon in MeCN mit 0,1 M Citrat als Co-Matrix) auf eine Trägerplatte aufgetragen. Nach vollständiger Auskristallisation der Probe erfolgte die Messung mit einem Bruker microflex MALDI-ToF MS Spektrometer.

6.2.10 Enzymatischer Verdau

Es wurden 5 nmol der entsprechenden DNA zu 20 µl Tris-HCl-Puffer (40 mM Tris, 40 mM MgCl₂, pH 8,9) gegeben. Anschließend wurden 3 µl Phosphodiesterase (*Crotalus atrox*, 0,003 U/µl) und 1 µl *alkaline shrimp phosphatase* hinzugefügt. Der Ansatz wurde bei 37 °C für 24 h inkubiert, bevor die Probe mit 100 µl H₂O verdünnt wurde. Anschließend wurden die Enzyme für 8 min bei 90 °C denaturiert und abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch 0,22 µm Celluloseacetat *Costar Spin-X* Zentrifugenfilter filtriert und unter Vakuum auf ein Volumen von 15 µl eingeeengt. Als nächstes wurde die Probe mit 35 µl 0,1 M Triethylammoniumacetat versetzt und zur Analyse auf die HPLC aufgetragen.

6.2.11 HPLC

Für die HPLC-Analysen und -Aufreinigungen wurde das *Äkta Purifier* HPLC-System verwendet. Vor der Auftragung wurden alle Proben durch einen 0,45 µm Cellulosefilter filtriert, sofern nicht schon im Vorfeld eine Filtration der Proben stattgefunden hatte (siehe Abschnitt 6.2.10). Die Proben wurden mit einem Volumen von maximal 50 µl über einen 100 µl Probenschlauch injiziert. Die Gradienten wurden individuell auf die jeweiligen Proben angepasst. Es wurde zwischen den folgenden Methoden unterschieden:

RP-HPLC analytisch

Säule: Nucleosil EC 125/4, 120-5 C18

Säulenvolumen (SV) = 1,571 ml

Puffer: Puffer A: 0,1 M TEAAc, pH 7,5

Puffer B: 0,1 M TEAAc, 20 % ACN, pH 7,5

Flussrate: 0,5 ml/min

Temperatur: RT

Gradient 1: 1 % Puffer B für 1 SV → 10 % Puffer B in 12 SV → 100 % Puffer B in 10 SV;
100 % Puffer B für 2 SV.

RP-HPLC präparativ

Säule: Nucleodur VP 250/4; 100-5C18ec

SV = 3,142 ml

Puffer: Puffer A: 0,1 M TEAAc, pH 7,5

Puffer B: 0,1 M TEAAc, 20 % ACN, pH 7,5

Flussrate: 0,5 ml/min

Temperatur: RT

Gradient 2: 0 % Puffer B für 3 SV → 30 % Puffer B in 2 SV → 100 % Puffer B in 10 SV;
100 % Puffer B für 2 SV.

IE-HPLC

Säule: Dionex DNAPac PA-100 250/9

SV = 15,9 ml

Puffer: Puffer A: 25 mM Tris, 0,5 % Acetonitril, pH = 8,0

Puffer B: 25 mM Tris, 800 mM Ammoniumchlorid, 0,5 % Acetonitril, pH = 8,0

Flussrate: 1,5 ml/min

Temperatur: 40 °C (Säulenofen)

Gradient 3: 0 % Puffer B für 0,5 SV → 65 % Puffer B in 7 SV → 100 % Puffer B in 0,5 SV;
100 % Puffer B für 2 SV.

Gradient 4: 35 % Puffer B für 1 SV → 55 % Puffer B in 4 SV → 100 % Puffer B in 1 SV;
100 % Puffer B für 1 SV (Aufreinigung ODN **8**).

Gradient 5: 45 % Puffer B für 1 SV → 65 % Puffer B in 4 SV → 100 % Puffer B in 1 SV;
100 % Puffer B für 1 SV (Aufreinigung ODN **9** und **10**).

6.2.12 LC-MS

Es wurden 5 µl der zu analysierenden Probe mit einem ACQUITY UPLC System (Waters) analysiert. Dabei wurden folgende Parameter verwendet:

Detektor: ESI Mass spectrometer Q-ToF premier (Waters)
UPLC-Säule: Waters Acquity BEH C18 1.7 µm 2.1 * 100 mm
Laufmittel A: Aqua dest., 0.1% Methansäure
Laufmittel B: Methanol, 0.1% Methansäure
Laufzeit: 8.00 min
Temperatur: 35 °C
Flussrate: 0,6 ml/min
Gradient: 5% Laufmittel B → 100% Laufmittel B in 2,5 min; 100% Laufmittel B für 4 min → 5% Laufmittel B in 0,1 min; 5% Laufmittel B für 1,4 min.

Massenspektrometer/Q-ToF premier: ESI, positive Ionen

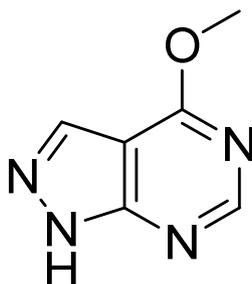
Kapillare: 3,0 kV
Sampling Cone: 30,0 V
Extraction Cone: 3,0 V
Ion Guide: 4,0 V
Source: 100 °C
Desolvation: 350 °C
Cone Gas Flow: 50,0 l/h
Desolvation Gas: 650,0 l/h

6.3 Chemische Synthesen

6.3.1 Allgemein

Alle Synthesen wurden, soweit nicht anderweitig beschrieben, unter einer Argonatmosphäre durchgeführt. Die meisten verwendeten wasserfreien Lösungsmittel (DMF, DCM und Pyridin) wurden kommerziell erworben und ohne zusätzliche Aufreinigung verwendet. Toluol wurde über Calciumhydrid getrocknet, destilliert und über 3 Å Molekularsieb gelagert. Die chemischen Verschiebungen der ^1H -NMR-Signale wurden entweder auf die residualen Protonensignale der deuterierten Lösungsmittel in Relation zu Tetramethylsylan oder direkt auf einen Tetramethylsylan-Standard innerhalb der NMR-Proben referenziert. Die ^{13}C -NMR-Spektren wurden ebenfalls auf das Lösungsmittelsignal (DMSO- d_6 : 39,52 ppm) referenziert. ^{19}F -NMR-Signale wurden indirekt auf CCl_3F referenziert.^[131] Die Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -Signale basierte auf COSY-, HSQC- und HMBC-Messungen.

6.3.2 8-Aza-7-deaza-6-methoxypurin (9)



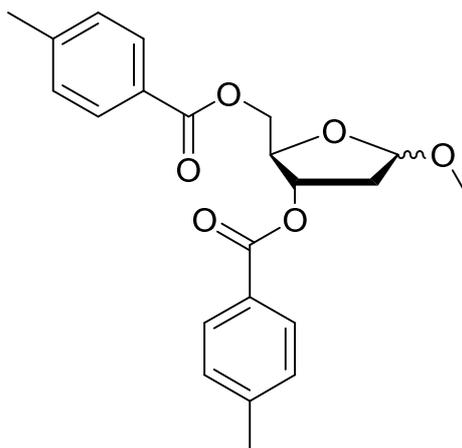
$$M = 150,14 \text{ g/mol}$$

Allopurinol (544 mg, 4 mmol) wurde in 5 ml POCl_3 (53,64 mmol, 13,41 Äq.) aufgenommen und mit 0,925 ml DMF versetzt. Die Reaktion lief über Nacht bei 115 °C. Am nächsten Tag wurde das Reaktionsgemisch in 100 ml eiskalte ges. NaHCO_3 -Lsg. überführt. Die wässrige Phase wurde 3-mal mit je 30 ml Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, über Na_2SO_4 getrocknet und eingeeengt. Das Zwischenprodukt wurde ohne weitere Aufreinigungsschritte in 10 ml einer 1,2 molaren methanolischen Natriummethanolat-Lsg. aufgenommen. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei 75 °C gerührt. Am nächsten Tag wurde die Reaktionslösung mit Eisessig auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH 95/5 \rightarrow 90/10) aufgereinigt. Das Produkt (243 mg, 1,62 mmol, 41 %) konnte als weißes Pulver isoliert werden.

^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 13.98 (s, 1H, NH), 8.56 (s, 1H, H-C(2)), 8.21 (s, 1H, H-C(7)), 4.10 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$);

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ 163.29 (C(6)), 156.08 (C(2)), 154.99 (C(4)), 131.68 (C(7)), 101.35 (C(5)), 53.98 ($-\text{OCH}_3$).

6.3.3 2-Desoxy-1-methoxy-3,5-O-ditoluoyl-ribose (11)

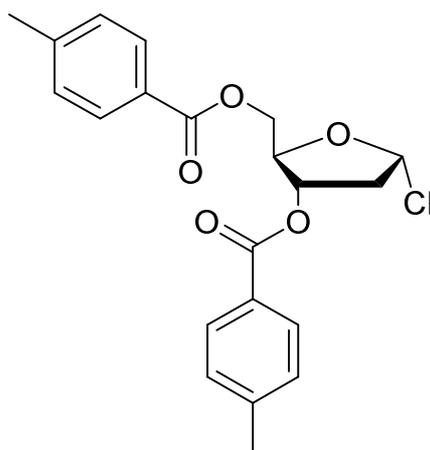


M = 384,42 g/mol

2-Desoxyribose (500 mg, 3,73 mmol) wurde in 60 ml trockenem Methanol aufgenommen. Es wurde 1 ml einer 1%igen $\text{HCl} \cdot \text{MeOH}$ -Lsg. hinzugegeben. Nach 1 h wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 mg NaHCO_3 beendet. Die Suspension wurde filtriert und das erhaltene Filtrat zur Trockne eingedunstet. Der ölige Rückstand wurde 3-mal mit je 10 ml trockenem Pyridin coevaporiert und in 6 ml wasserfreiem Pyridin aufgenommen. Im nächsten Schritt wurde p-Toluoylchlorid (1,1 ml, 8,34 mmol, 2,23 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktion lief über Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurde die Reaktionslösung in 40 ml ges. NaHCO_3 -Lsg. überführt. Die Phasen wurden getrennt, wobei die wässrige Phase 2-mal mit je 30 ml DCM extrahiert wurde. Die organischen Phasen wurden vereint, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedunstet. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Hexan/EtOAc 80/20) aufgereinigt. Das Produkt (1,1 g, 3,11 mmol, 83%) konnte als klares Öl isoliert werden.

^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 7,87 (m, 4H, Toluoyl H-C(ar)), 7,33 (m, 4H, Toluoyl H-C(ar)), 5,43 (m, 1H, H-C(1)), 5,20 (m, 1H, H-C(3)), 4,41 (m, 3H, H-C(4), H_2 -C(5)), 3,29 (2s, 3H, $\text{H}_3\text{CO-C}(1')$), 2,55 (m, 1 H, H(b)-C(2)), 2,38 (m, 6H, Toluoyl- CH_3), 2,32 (m, 1H H(a)-C(2)).

6.3.4 α -1-Chloro-2-desoxy-3,5-O-ditoluoyl-ribose (12)

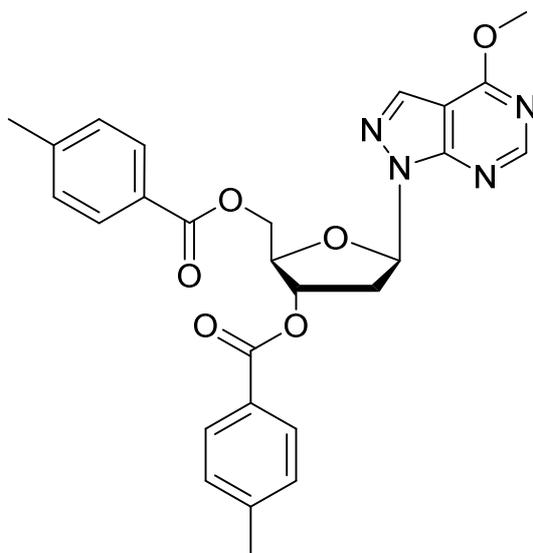


M = 388,84 g/mol

Verbindung **11** (1,36 g, 3,55 mmol) wurde 3-mal mit je 12 ml wasserfreiem DCM coevaporiert und in 16 ml trockenem Diethylether gelöst. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt woraufhin gasförmiges HCl eingeleitet wurde, bis ein weißer amorpher Niederschlag ausfiel. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei 8 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde der Niederschlag mit einem Büchnertrichter filtriert und mit eiskaltem Diethylether gewaschen. Das weiße pulvrige Produkt (638 mg, 1,64 mmol, 46%) wurde unter Vakuum über KOH gelagert.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7,99 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H, Toluoyl H-C(ar)), 7,89 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H, Toluoyl H-C(ar)), 7,25 (m, 4H, Toluoyl H-C(ar)), 6,47 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H, H-C(1)), 5,56 (m, 1H, H-C(3)), 4,86 (m, 1H, H-C(4)), 4,58-4,70 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-C}(5)$), 2,87 (m, 1H, H-C(2a)), 2,75 (m, 1H, H-C(2b)), 2,42 (2s, 6H, Toluoyl- CH_3).

6.3.5 2'-Desoxy-3',5'-ditoluoyl-8-aza-7-deaza-6-methoxy-9-β-D-ribofuranosylpurin (13)



M = 502,52 g/mol

Verbindung **9** (150 mg, 1 mmol) wurde 3-mal mit je 12 ml trockenem DCM coevaporiert und in 6 ml wasserfreiem Acetonitril aufgenommen. Die Suspension wurde mit NaH (60% in Mineralöl, 108 mg, 2,71 mmol, 2,71 Äq.) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Im nächsten Schritt wurde das Reaktionsgemisch auf 0 °C gekühlt und mit Verbindung **12** (438 mg, 1,13 mmol, 1,13 Äq.) versetzt. Die Reaktion lief für 2 h bei 0 °C und für weitere 30 min bei Raumtemperatur. Als nächstes wurde das Reaktionsgemisch mit 20 ml EtOAc verdünnt und filtriert. Das Filtrat wurde in einen Scheidetrichter mit 30 ml ges. NaHCO₃-Lsg. überführt. Die Phasen wurden getrennt, wobei die wässrige Phase 2-mal mit je 30 ml EtOAc extrahiert wurde. Die organischen Phasen wurden vereint, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Es folgte eine säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/Aceton 100/0 → 98/2) des Rohprodukts. Das Produkt (225 mg, 0,45 mmol, 45%) konnte als weißer kristalliner Schaum isoliert werden.

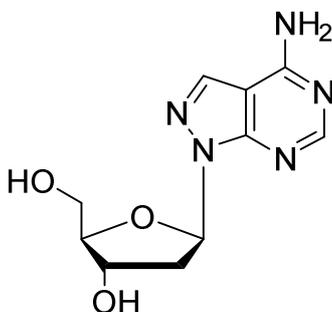
¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.65 (s, 1 H, H-C(2)), 8.38 (d, *J* = 0.6 Hz, 1 H, H-C(7)), 7.94 (m, 1H, Toluoyl H-C(ar)), 7.85 (m, 1H, Toluoyl H-C(ar)), 7.37 (m, 1H, Toluoyl H-C(ar)), 7.31 (m, 1H, Toluoyl H-C(ar)), 6.87 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H, H-C(1')), 5.88 (m, 1H, H-C(3')), 4.56 (m, 1H, H-C(4')), 4.51 (m, 1H, H_a-C(5')), 4.40 (m, 1H, H_b-C(5')), 4.12 (s, 3H, -OCH₃) 3.30 (m, 1H, H_a-C(2')), 2.80 (m, 1H, H_b-C(2')), 2.40 (s, 3H, Toluoyl-CH₃), 2.37 (s, 3H, Toluoyl-CH₃);

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ 165.45, 165.35 (C=O), 163.50 (C6), 155.71 (C(2)), 155.10 (C(4)), 144.07, 143.77 (Toluoyl-C(ar)), 132.78 (C(7)), 129.52, 129.34, 129.25, 126.62,

126.53 (Toluoyl-C(ar)), 102.61 (C(5)), 84.36 C(1'), 81.48 (C(4')), 74.74 (C(3')), 63.96 (C(5')), 54.41 (-OCH₃), 35.39 (C(2')), 21.23, 21.19 (Toluoyl-CH₃);

MALDI-Tof m/z berechnet für C₂₇H₂₆N₄O₆+H⁺: 503,19 [M+H]⁺; gefunden: 503,54.

6.3.6 2'-Desoxy-8-aza-7-deaza-adenosin (14)



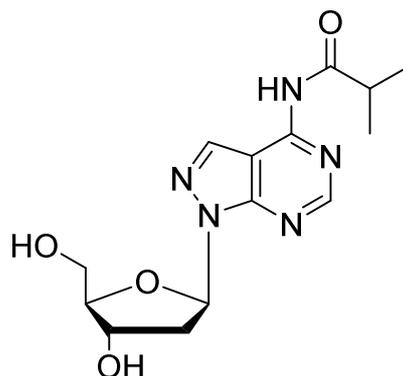
M = 251,24 g/mol

Verbindung **13** (225 mg, 0,45 mmol) wurde in 10 ml einer 0,12 molaren methanolischen Natriummethanolat-Lsg. aufgenommen. Die Reaktion lief für 3 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch unter Vakuum entfernt. Das Zwischenprodukt wurde ohne weitere Aufreinigungsschritte in 12 ml konzentrierter Ammoniak-Lsg. aufgenommen. Die Reaktion lief über einen Zeitraum von 3 Tagen. Als nächstes wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (DCM/MeOH 97/3 → 90/10). Das Produkt (92 mg, 0,37 mmol, 82%) konnte als weiße kristalline Substanz isoliert werden.

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8,18 (s, 1H, H-C(2)), 8,14 (d, *J* = 0,6 Hz, 1H, H-C(7)), 7,51-7,96 (s, 2 H, NH₂), 6,54 (t, *J* = 6,5 Hz, 1H, H-C(1')), 5,25 (d, *J* = 4,4 Hz, 1H, HO-C(3')), 4,81 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H, HO-C(5')), 4,43 (m, 1H, H-C(3)), 3,81 (m, 1H, H-C(4')), 3,52-3,38 (m, 2H, H₂C(5')), 2,80 (m, 1H, H_a-C(2')), 2,23 (m, 1H, H_b-C(2'));

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ 158,04 (C(6)), 156,07 (C(2)), 153,68 (C(4)), 133,07 (C(7)), 100,50 (C(5)), 87,60 (C(4')), 84,03 (C(1')), 71,13 (C(3')), 62,48 (C(5')), 37,99 (C(2'));

6.3.7 2'-Desoxy-8-aza-7-deaza-6-*N*-isobutyryl-adenosin (15)



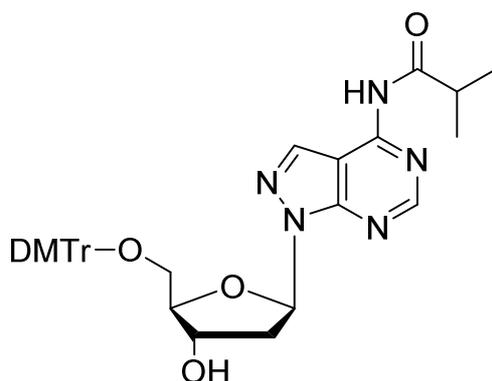
$$M = 321,33 \text{ g/mol}$$

Verbindung **14** (170 mg, 0,67 mmol) wurde 3-mal mit je 10 ml trockenem Pyridin coevaporiert und in 6 ml wasserfreiem Pyridin aufgenommen. Die Suspension wurde auf 0 °C gekühlt und mit TMS-Cl (625 μ l, 3,38 mmol, 5 Äq.) versetzt. Die Reaktion lief für eine Stunde bei Raumtemperatur, woraufhin das Reaktionsgemisch erneut auf 0 °C gekühlt wurde. Anschließend wurde Isobutyrylchlorid (140 μ l, 1,34 mmol, 2 Äq.) tropfenweise hinzugefügt. Die Reaktion lief über Nacht 3 h bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurden bei 0 °C jeweils 0,8 ml H₂O und konz. NH₃ hinzugegeben. Nach einer 1 Stunde wurden die Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wurde je 2-mal mit jeweils 12 ml Toluol und Ethanol coevaporiert. Anschließend wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH 95/5) aufgereinigt. Das Produkt (169 mg, 0,53 mmol, 79%) konnte als weißer kristalliner Schaum isoliert werden.

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 11,26 (s, 1H, NH), 8,68 (s, 1H, H-C(2)), 8,53 (d, $J = 0,6$ Hz, 1H, H-C(7)), 6,71 (t, $J = 6,4$ Hz, 1H, H-C(1')), 5,29 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H, HO-C(3')), 4,71 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H, HO-C(5')), 4,46 (m, 1H, H-C(3')), 3,82 (m, 1H, H-C(4')), 3,52 (m, 1H, H_a-C(5')), 3,35 (m, 1H, H_b-C(5')), 2,92 (sept, $J = 6,8$ Hz, 1H, CH-(CH₃)₂), 2,85 (m, 1H, H_a-C(2')), 2,30 (m, 1H, H_b-C(2')), 1,15 (dd, $J_1 = 1,53$ Hz, $J_2 = 6,8$ Hz 6H);

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-D₆) δ 176,65 (C=O), 154,90 (C(2)), 154,86 (C(4)), 152,23 (C(6)), 136,96 (C(7)), 103,78 (C(5)), 87,63 (C(4')), 83,72 (C(1')), 70,99 (C(3')), 62,35 (C(5')), 37,82 (C(2')), 34,44 (Isobutyryl-CH), 19,14, 19,12 (CH₃);

6.3.8 2'-Desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-8-aza-7-deaza-6-N-isobutyryl-adenosin (16)



M = 623.7 g/mol

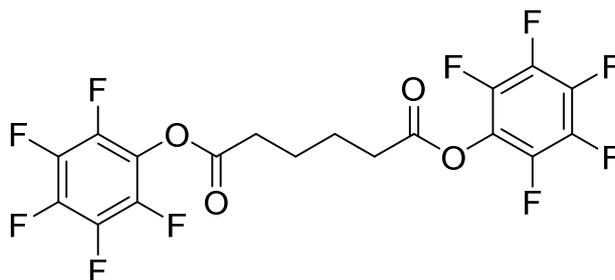
Verbindung **15** (160 mg, 0,5 mmol) wurde 2-mal mit je 12 ml trockenem Pyridin coevaporiert und in 8 ml wasserfreiem Pyridin aufgenommen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von DMT-Cl (219 mg, 0,65 mmol, 1,35 Äq.) gestartet. Nach 12 h wurde die Reaktion durch Zugabe von 4 ml Methanol beendet. Die Lösungsmittel wurden unter Vakuum entfernt und das Rohprodukt in wurde in 15 ml DCM aufgenommen. Es folgte eine wässrige Aufarbeitung mit 10 ml ges. NaHCO₃-Lösung, wobei die wässrige Phase 3-mal mit je 15 ml DCM extrahiert wurde. Die organischen Phasen wurden vereint, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (DCM/MeOH 99/1 → 95/5). Das Produkt (100 mg, 0,16 mmol, 32%) konnte als gelblicher kristalliner Schaum isoliert werden.

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 11,27 (s, 1H, NH), 8,70 (s, 1H, H-C(2)), 8,48 (d, *J* = 0,6 Hz, 1H, H-C(7)), 7,12-7,30 (m, 9H, DMTr H-C(ar)), 6,73 (m, 5H, DMTr H-C(ar), H-C(1')), 5,33 (d, *J* = 5,0 Hz, 1H, HO-C(3')), 4,56 (m, 1H, H-C(3')), 3,95 (m, 1H, HC(4')), 3,69 (2s, 6H, -OCH₃), 2,96-3,06 (m, 2H, H₂-C(5')), 2,92 (sept, *J* = 6,9 Hz, 1H, CH-(CH₃)₂), 2,84 (m, 1H, H_a-C(2')), 2,36 (m, 1H, H_b-C(2')), 1,15 (dd, *J*₁ = 2,1 Hz, *J*₂ = 6,9 Hz, 6H, CH₃);

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ 176,61 (C=O), 157,93, 157,86 (C(ar)-DMT), 154,88 (C(2)), 154,80 (C(4)), 152,21 (C(6)), 144,98 (C(ar)-DMT), 136,82 (C(7)), 135,63, 135,56, 129,67, 129,54, 127,65, 127,58, 126,44, 112,98, 112,92 (C(ar)-DMT), 103,76 (C(5)), 85,38 (C(4')), 85,14 (tert. C-DMT), 83,66 (C(1')), 70,74 (C(3')), 64,25 (C(5')), 54,93 (-OCH₃), 38,13 (C(2')), 34,43 (Isobutyryl-CH), 19,12 (CH₃);

MALDI-Tof m/z berechnet für C₃₅H₄₇N₅O₆+Na⁺: 646,26 [M+H]⁺; gefunden: 646,48.

6.3.9 Dipentafluorophenyladipinsäureester (17)



$$M = 478,24 \text{ g/mol}$$

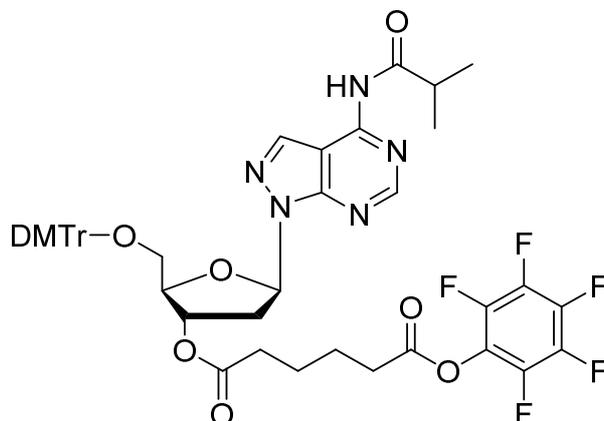
Adipinsäure (600 mg, 4,1 mmol) und DMAP (250 mg, 2,05 mmol, 0,5 Äq.) wurden 2-mal mit je 12 ml wasserfreiem DCM coevaporiert und in 8 ml trockenem DMF aufgenommen. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt und Pentafluorophenol (2 g, 11 mmol, 2,68 Äq.), sowie 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (1,57 g, 8,2 mmol, 2 Äq.) wurden hinzugefügt. Die Reaktion lief über Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt. Das Produkt (1,47 g, 3,08 mmol, 75%) konnte als weiße, kristalline Substanz isoliert werden.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 2,75 (m, 4H, 2x CH_2), 1,92 (m, 4H, 2x CH_2);

$^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ 169,06 (C=O), 142,12, 140,50, 138,84, (C(ar)), 32,97 (CH_2), 23,99 (CH_2);

$^{19}\text{F NMR}$ (565 MHz, CDCl_3) δ -152,86, -157,90, -162,27 (F-C(ar)).

6.3.10 2'-Desoxy-3'-O-[1,6-dioxo-6-(pentafluorophenyl)hexyl]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-8-aza-7-deaza-6-N-isobutyryl-adenosin (1)



M = 917.89 g/mol

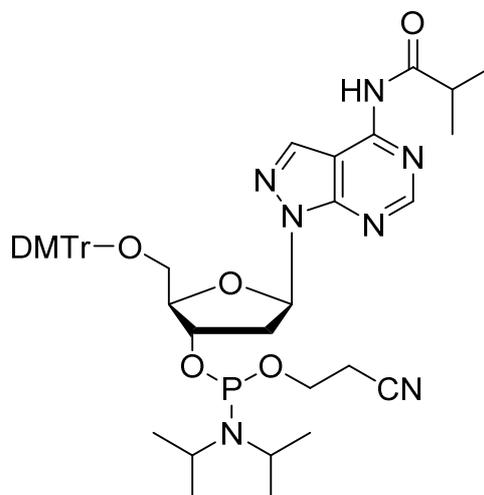
Verbindung **16** (230 mg, 0,37 mmol) und DMAP (45 mg, 0,37 mmol, 1 Äq.) wurden 2-mal mit je 6 ml trockenem Pyridin coevaporiert und in 3,4 ml wasserfreiem Pyridin/DMF (1:1, v/v) aufgenommen. Dipentafluorophenyladipinsäureester (835 mg, 1,75 mmol, 4,89 Äq.) wurde hinzugegeben. Die Reaktion lief über einen Zeitraum von 3 h. Anschließend wurden die Lösungsmittel unter Vakuum entfernt, wobei der ölige Rückstand 2-mal mit je 12 ml trockenem Toluol coevaporiert wurde. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH 96/4) aufgereinigt. Das Produkt (124 mg, 0,135 mmol, 37%) konnte als weiße kristalline Substanz isoliert werden.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- D_6) δ 11,30 (s, 1H, NH), 8,68 (s, 1H, H-C(2)), 8,48 (s, 1H, H-C(7)), 7,32-7,11 (m, 9H, DMT H-C(ar)), 6,76 (m, 5H, DMT H-C(ar), H-C(1')), 5,51 (m, 1H, H-C(3')), 4,16 (m, 1H, H-C(4')), 3,71 (2s, 6H, $-\text{OCH}_3$), 3,28 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-C}(5')$), 3,12 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-C}(2')$); 2,91 (sept, $J = 6,9$ Hz, 1H, **CH**-(CH_3) $_2$), 2,82 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H, CH_2), 2,43 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H, CH_2), 1,67 (m, 4H, 2x CH_2), 1,16 (d, $J_2 = 6,9$ Hz, 6H, **CH**-(CH_3) $_2$);¹

MALDI-Tof m/z berechnet für $\text{C}_{47}\text{H}_{44}\text{F}_5\text{N}_5\text{O}_9 + \text{Na}^+$: 940,30 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; gefunden: 940,87.

¹ Siehe Anhang 15

6.3.11 2'-Desoxy-5'-O-DMT-8-aza-7-deaza-6-N-isobutyryl-adenosin-3'-O-(cyanoethyl-N,N-diisopropylphosphoramidit) (2)



M = 823,93 g/mol

Nukleosid 16 (200 mg, 0,32 mmol) wurde 2-mal mit je 12 ml wasserfreiem DCM coevaporiert und in 4 ml trockenem DCM aufgenommen. Anschließend wurde DIPEA (225 μ l, 1,28 mmol, 4 Äq.) hinzugefügt und die Reaktion durch Zugabe von 2-Cyanethyl-N,N-diisopropylchlorphosphoramidit (85 μ l, 0,38 mmol, 1,2 Äq.) gestartet. Nach 1 h wurde das Reaktionsgemisch mit 10 ml DCM verdünnt und in 5 ml ges. NaHCO₃-Lsg. überführt. Die beiden Phasen wurden im Scheidetrichter voneinander getrennt, woraufhin die wässrige 1-mal mit 12 ml DCM extrahiert wurde. Die organischen Phasen wurden vereint, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (DCM/EtOAc/TEA 49,5/49,5/1) aufgereinigt. Das Produkt (218 mg, 0,26 mmol, 83%) konnte als weißer Schaum isoliert werden.

$R_f = 0,80$ (CH₂Cl₂/EtOAc/TEA 49,5/49,5/1);

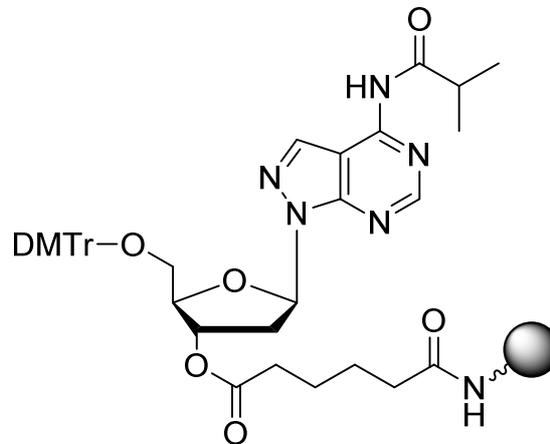
¹H NMR (300 MHz, CD₃CN) δ 9,12 (s, 1H, NH), 8,60 (s, 1H, H-C(2)), 8,53 (s, 1H, H-C(7)), 7,36-7,08 (m, 9H, DMT H-C(ar)), 6,72 (m, 5H, DMT H-C(ar), H-C(1')), 4,94 (m, 1H, H-C(3')), 4,13 (m, 1H, H-C(4')), 3,79 (m, 1H, H_a-C(5')) 3,71 (2s, 6H, -OCH₃), 3,68-3,50 (m, 3H, H_b-C(5'), O-CH₂-CH₂-CN), 3,21 (m, 1H, H_a-C(2')) 3,05 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-CN)); 2,85-2,45 (m, 4H, 3x CH-(CH₃)₂, H_b-C(2')), 2x CH₂), 1,18 (m, 6H, 3x CH-(CH₃)₂);²

³¹P NMR (121 MHz, CD₃CN) δ 148,16 (s), 147,87 (s).³

² Siehe Anhang 16

³ Siehe Anhang 17

6.3.12 Immobilisierung des Nukleosids 1 an einem CPG-Träger



Es wurden 55 mg (0,06 mmol) des Nukleosids **1** in 3 ml DMF gelöst und mit 10 μ l Pyridin (0,12 mmol, 2 Äq.) versetzt. Im nächsten Schritt wurde der Amino-funktionalisierte TentaGel-Festphasenträger (240 mg, Kapazität 250 μ l/g) hinzugefügt. Die Reaktion lief über Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurde das Reaktionsgemisch filtriert und der Rückstand mit DCM gewaschen. Anschließend wurde der Träger in je 3 ml Capping-Reagenz A (0,5 M DMAP in MeCN) und Capping-Reagenz B (Essigsäureanhydrid/syn-Collidin/MeCN; 2/3/5) aufgenommen. Nach 20 min wurde das Reaktionsgemisch erneut filtriert und der Rückstand abwechselnd mit Methanol und DCM gewaschen. Im nächsten Schritt wurde das gereinigte Trägermaterial (180 mg) unter Vakuum getrocknet, bevor die Beladungsdichte bestimmt wurde. Hierfür wurden 1,58 mg des Trägers in 1 ml Detritylierungsreagenz (3% TFA in Dichlorethan) aufgenommen. Die dabei erhaltene Stammlösung wurde zentrifugiert und 1:10 verdünnt. Für die anschließenden photometrischen Messungen wurde die Lösung in der Küvette erneut 1:10 verdünnt. Die Messung wurde in Triplikaten bei einer Wellenlänge von 503 nm durchgeführt.^[75] Auf Grundlage der Ergebnisse wurde die Beladungsdichte wie folgt berechnet:

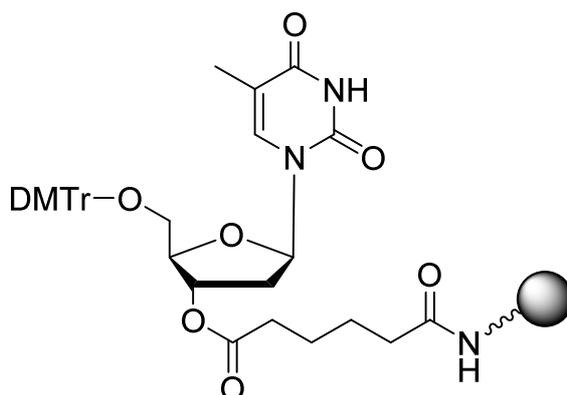
$$\emptyset(A_{503}) = 0,2099$$

$$c_{\text{Küvette}} = A/\varepsilon = 0,2099/76000 \text{ l/mol} = 2,76 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$$

$$c_{\text{Stammlösung}} = c_{\text{Küvette}} \cdot 100 = 2,76 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l} \cdot 100 = 2,76 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l} = 0,276 \text{ } \mu\text{mol/ml}$$

$$\text{Beladungsdichte} = c_{\text{Stammlösung}}/m_{\text{Träger}} = 0,276 \text{ } \mu\text{mol/ml}/1,58 \text{ mg} = 175 \text{ } \mu\text{mol/g}$$

6.3.13 Immobilisierung des Thymidinderivats **18** an einem CPG- bzw. TentaGel-Träger



Es wurden 110 mg (0,2 mmol) 5'-O-DMTr-Thymidin (**18**) mit DMAP (38 mg, 0,2 mmol, 1 Äq.) 2-mal mit je 12 ml wasserfreiem DCM coevaporiert und in 4 ml wasserfreiem DMF/Pyridin (1:1 v/v) aufgenommen. Anschließend wurde Dipentafluorophenyladipinsäureester (430 mg, 1,11 mmol, 5,56 Äq.) hinzugefügt. Die Reaktion lief über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Lösungsmittel unter Vakuum entfernt, wobei der ölige Rückstand 2-mal mit je 12 ml trockenem Toluol coevaporiert wurde. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH 96/4) aufgereinigt.

In zwei separaten Ansätzen wurden je 30 μmol des isolierten Produkts in 2 ml wasserfreiem DMF aufgenommen und mit 11 μl Pyridin, sowie 200 mg CPG 500 Å Festphasenträger (Kapazität 163 $\mu\text{mol/g}$), bzw. 130 mg TentaGel-Träger (Kapazität 250 $\mu\text{mol/g}$) versetzt. Die Reaktion lief über Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurden die Reaktionsgemische filtriert und die Rückstände mit DCM gewaschen. Anschließend wurden die Träger in je 3 ml Capping-Reagenz A (0,5 M DMAP in MeCN) und Capping-Reagenz B (Essigsäureanhydrid/syn-Collidin/MeCN; 2/3/5) aufgenommen. Nach 20 min wurden die Reaktionsgemische erneut filtriert und die Rückstände abwechselnd mit Methanol und DCM gewaschen. Im nächsten Schritt wurde das gereinigte Trägermaterial (138 mg CPG-Träger und 133 mg TentaGel-Träger) unter Vakuum getrocknet, bevor die Beladungsdichte bestimmt wurde. Hierfür wurden 1,45 mg des CPG-Trägers bzw. 1,42 mg des TentaGel-Trägers in jeweils 1 ml Detritylierungsreagenz (3% TFA in Dichlorethan) aufgenommen. Die dabei erhaltenen Stammlösungen wurden zentrifugiert und 1:5 verdünnt. Für die anschließenden photometrischen Messungen wurden die Lösungen in der Küvette erneut 1:5 verdünnt. Die Messungen wurden in Triplikaten bei einer Wellenlänge von 503 nm durchgeführt.^[75] Auf Grundlage der Ergebnisse wurden die Beladungsdichte wie folgt berechnet:

CPG: $\emptyset(A_{503}) = 0,1173$

$c_{\text{Küvette}} = A/\varepsilon = 0,1173/76000 \text{ l/mol} = 1,54 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$

$c_{\text{Stammlösung}} = c_{\text{Küvette}} \cdot 25 = 1,54 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l} \cdot 25 = 3,86 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l} = 0,0386 \text{ } \mu\text{mol/ml}$

$\text{Beladungsdichte} = c_{\text{Stammlösung}}/m_{\text{Träger}} = 0,0386 \text{ } \mu\text{mol/ml}/1,45 \text{ mg} = 26,6 \text{ } \mu\text{mol/g};$

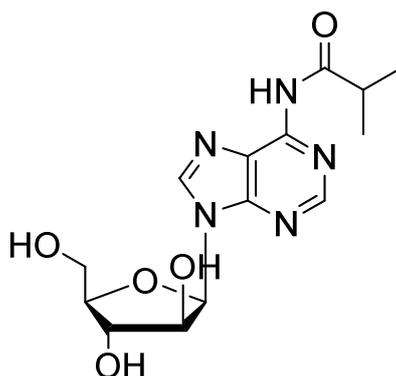
TentaGel: $\emptyset(A_{503}) = 0,4973$

$c_{\text{Küvette}} = A/\varepsilon = 0,4973/76000 \text{ l/mol} = 6,54 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$

$c_{\text{Stammlösung}} = c_{\text{Küvette}} \cdot 25 = 6,54 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l} \cdot 25 = 1,64 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l} = 0,164 \text{ } \mu\text{mol/ml}$

$\text{Beladungsdichte} = c_{\text{Stammlösung}}/m_{\text{Träger}} = 0,164 \text{ } \mu\text{mol/ml}/1,42 \text{ mg} = 115,5 \text{ } \mu\text{mol/g}.$

6.3.14 6-*N*-Isobutyryl-9- β -D-arabinofuranosyladenosin (20)



$M = 337.33 \text{ g/mol}$

Arabinoadenosin (1,6 g, 6 mmol) wurde 3-mal mit je 12 ml wasserfreiem DCM coevaporiert und in 42 ml trockenem Pyridin aufgenommen. Die Suspension wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Im nächsten Schritt wurde Trimethylsilylchlorid (TMS-Cl) (3,8 ml, 30 mmol, 5 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktion dauerte 1 h und wurde bei Raumtemperatur unter einer Argonatmosphäre durchgeführt. Als nächstes wurde das Reaktionsgemisch erneut auf 0 °C abgekühlt und Isobutyrylchlorid (1,26 ml, 12 mmol, 2 Äq.) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur durchrührt. Am nächsten Tag wurden die TMS-Schutzgruppen entfernt, indem jeweils 9 ml H₂O und konz. NH₃-Lösung bei 0 °C hinzugegeben wurden. Anschließend wurde das Eisbad entfernt und die Reaktion für 30 min bei Raumtemperatur fortgesetzt. Im nächsten Schritt wurden die Lösungsmittel entfernt.

Der dabei erhaltene ölige Rückstand wurde 3-Mal mit je 10 ml Toluol coevaporiert. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (DCM/MeOH 95/5 → 90/10). Es konnten 1,46 g (4,42 mmol, 74 %) Produkt als weißer Schaum isoliert werden.

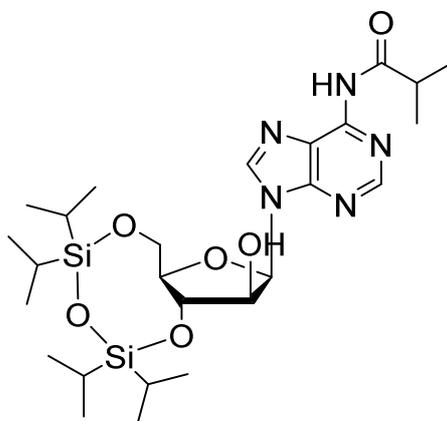
$R_f = 0,20$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1);

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,65 (s, 1H, H-N(6)), 8,68 (s, 1H, H-C(2)), 8,65 (s, 1H, H-C(8)), 6,01 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H, H-C(1')), 5,52 (d, $J = 4,9$ Hz, 1H, HO-C(2')), 5,22 (d, $J = 4,9$ Hz, 1H, HO-C(3')), 5,13 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H, HO-C(5')), 4,62 (q, $J = 5,1$ Hz, 1H, H-C(2')), 4,18 (m, 1H, H-C(3')), 3,97 (q, $J = 3,8$ Hz, 1H, H-C(4')), 3,69 (m, 2H, H₂-C(5')), 2,96 (sept, $J = 6,8$ Hz, 1H, -CH-(CH₃)₂), 1,13 (dd, $J_1 = 0,5$ Hz, $J_2 = 6,8$ Hz, 6H, -CH-(CH₃)₂);

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆): δ 175,33 (C=O), 151,82 (C(6)), 151,63 (C(2)), 149,87 (C(4)), 142,76 (C(8)), 124,19 (C(5)), 87,61 (C(1')), 85,69 (C(4')), 73,64 (C(2')), 70,33 (C(3')), 61,31 (C(5')), 34,34 (CH-(CH₃)₂), 19,25, 19,23 (CH-(CH₃)₂);

MALDI-TOF m/z berechnet für C₁₄H₁₉N₅O₅+H⁺: 338,15 [M+H]⁺, gefunden: 338,61.

6.3.15 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-6-*N*-isobutyryl-9-β-D-arabino-furanosyl-adenosin (21)



M = 579.84 g/mol

Verbindung **20** (1,46 g, 4,42 mmol) wurde 3-mal mit je 12 ml Pyridin coevaporiert und anschließend in 36 ml Pyridin gelöst. Der Lösung wurde 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxan (TIPDS-Cl) (1,69 ml, 5,28 mmol, 1.2 Äq.) hinzugefügt. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurde das Reaktionsgemisch fast bis zur Trockne eingengt, der ölige Rückstand wurde 2-mal mit je 10 ml Toluol coevaporiert und in 30 ml DCM aufgenommen. Es folgte eine wässrige Aufarbeitung mit 40 ml ges.

NaHCO₃-Lösung, wobei die wässrige Phase 3-mal mit je 30 ml DCM extrahiert wurde. Die organischen Phasen wurden vereint, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (DCM/MeOH 98/2). Es konnten 1,7 g (2,98 mmol, 67 %) Produkt als weißer Schaum isoliert werden.

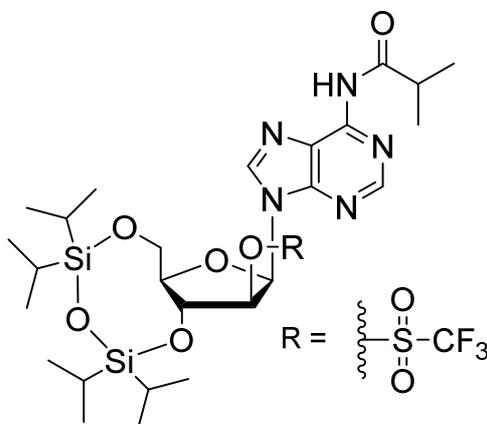
$R_f = 0,35$ (CH₂Cl₂/MeOH 95:5);

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,64 (s, 1H, H-N(6)), 8,61 (s, 1H, H-C(2)), 8,31 (s, 1H, H-(C8)), 6,35 (d, $J = 6,3$ Hz, 1H, H-(C1')), 5,82 (d, $J = 5,7$ Hz, 1H, HO-(C2')), 4,58 (m, 2H, H-(C2')/H-C(3')), 4,14 (m, 1H, H_a-C(5')), 3,95 (m, 1H, H_b-(C5')), 3,84 (m, 1H, H-(C4')), 2,97 (sept, $J = 6,8$ Hz, 1H, (CH)-CH₃)₂), 1,17-0,94 (m, 34H, CH-(CH₃)₂/ (CH)₄(CH₃)₈OSi₂);

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 175,30 (C=O), 151,95 (C(4)), 151,45 (C(2)), 149,70 (C(6)), 142,81 (C(8)), 123,51 (C(5)), 82,13 (C1')), 79,65 (C(4')), 75,32 (C(2')), 74,91 (C(3')), 61,52 (C(5')), 34,34 (CH-(CH₃)₂), 19,26, 19,24 (CH-(CH₃)₂), 17,37, 17,25, 17,24, 17,21, 16,94, 16,90, 16,84, 16,79 ((CH)₄(CH₃)₈OSi₂), 12,78, 12,45, 12,27, 11,98 ((CH)₄(CH₃)₈OSi₂);

MALDI-TOF m/z berechnet für C₂₆H₄₅N₅O₆Si₂+H⁺: 580,30 [M+H]⁺, gefunden: 580,47.

6.3.16 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-[(trifluoromethyl)sulfonyl]-6-*N*-isobutyryl-9-β-D-arabinofuranosyl-adenosin (**22**)



$M = 711.9$ g/mol

Verbindung **21** (1,39 g, 2,4 mmol) und Dimethylaminopyridin (DMAP) (440 mg, 3,6 mmol, 1,5 Äq.) wurden 3-mal mit je 16 ml DCM coevaporiert und in 100 ml Dichlormethan gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von Triethylamin (TEA) (840 µl, 6 mmol, 2,5 Äq.) und das Reaktionsgemisch wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Im nächsten Schritt wurde Trifluormethansulfonylchlorid (Tf-Cl) (385 µl, 3,6 mmol, 1,5 Äq.) tropfenweise hinzugegeben.

Das Reaktionsgemisch wurde für 30 min bei 0 °C durchrührt und anschließend mit 100 ml DCM verdünnt, bevor es einmalig mit 40 ml ges. NaHCO₃-Lsg. gewaschen wurde. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (DCM/MeOH 99/1). Es konnten 1,27 g (1,79 mmol, 74 %) Produkt als gelblicher Schaum gewonnen werden.

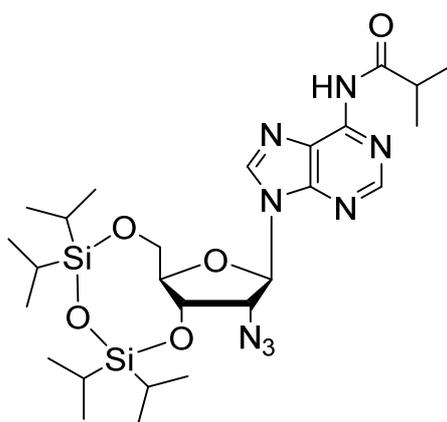
$R_f=0,45$ (CH₂Cl₂/MeOH 95:5);

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) 10,73 (s, 1H, H-N(1)), 8,63 (s, 1H, H-C(8)), 8,58 (s, 1H, H-C(2)), 6,62 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H, H-C(1')), 6,12 (t, $J = 7,5$, 1H, H-(C2')), 5,61 (t, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-C(3')), 3,81 (m, 1H, H-C(4')), 3,98 (m, 2 H, H₂-C(5')), 2,96 (sept, $J = 6,8$, 1 H, -CH-(CH₃)₂), 1,17 - 0,99 (m, 34 H, -CH-(CH₃)₂, 2 x (Si(CH(CH₃)₂)₂)).

6.3.17 Lithiumazid

LiCl (11 g, 259,5 mmol) und NaN₃ (18,6 g, 286,1 mmol, 1,1 Äq.) wurden gemeinsam in einen Rundkolben gegeben. Anschließend wurde Methanol (23 ml) tropfenweise hinzugefügt. Die Suspension wurde auf 60 °C erhitzt und die Reaktion lief 30 h unter Argon. Abschließend wurde das Reaktionsgemisch filtriert. Das Filtrat wurde unter Vakuum bis zur Trockne eingeeengt. Das Produkt (9,02 g, 184 mmol, 71%) konnte als weiße, kristalline Substanz isoliert werden.

6.3.18 2'-Azido-2'-deoxy-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxane-1,3-diyl)-6-N-isobutyryl-adenosin (23)



M = 604.85 g/mol

Verbindung **22** (1,01 g, 1,5 mmol) wurde in 15 ml DMF aufgenommen. Der Lösung wurde Lithiumazid (367 mg, 7,5 mmol, 5 Äq.) hinzugefügt. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur durchgeführt und dauerte 16 h. Nachdem ein quantitativer Umsatz des Edukts festgestellt werden konnte, wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und der ölige Rückstand 2-mal mit je 10 ml Toluol coevaporiert. Das Rohprodukt wurde in 40 ml Ethylacetat (EtOAc) aufgenommen und 40 ml ges. NaHCO₃-Lsg überführt. Die wässrige Phase wurde 3-mal mit je 30 ml EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, mit Na₂SO₄ getrocknet und eingengt. Es folgte eine säulenchromatographische Aufreinigung (Hexan/EtOAc 1/1). Es konnten 817 mg (1,35 mmol, 90 %) Produkt als weißer Schaum gewonnen werden.

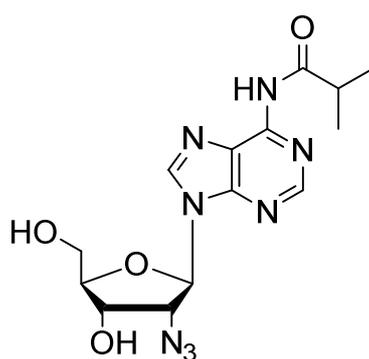
$R_f=0,45$ (CH₂Cl₂/MeOH 95:5);

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 10,69 (s, 1H, H-N(6)), 8,56 (s, 1H, H-C(2)), 8,52 (s, 1H, H-C(8)), 5,93 (d, $J = 1,4$ Hz, 1H, H-C(1')), 5,41 (dd, $J_1 = 5,9$ Hz, $J_2 = 8,35$ Hz, 1H, H-C(3')), 5,09 (dd, $J_1 = 1,4$ Hz, $J_2 = 5,9$ Hz, 1H, H-C(2')), 4,06-3,95 (m, 3H, H-C(4')/H₂-C(5')), 2,95 (sept, $J = 6,8$ Hz, 1H, CH(CH₃)₂), 1,17-1,01 (m, 34H, CH-(CH₃)₂/(CH)₄(CH₃)₈OSi₂);

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 175,30 (C=O), 151,45 (C(2)), 150,99 (C(4)), 150,03 (C(6)), 143,18 (C(8)), 124,36 (C(5)), 86,37 (C(1')), 81,05 (C(4')), 71,66 (C(3')), 64,42 (C(2')), 60,55 (C(5')), 34,35 (CH-(CH₃)₂), 19,24, 19,21 (CH-(CH₃)₂), 17,28 17,16, 17,14, 17,13, 17,07, 16,90, 16,81, 16,76 ((CH)₄(CH₃)₈OSi₂), 12,73, 12,36, 12,18, 12,15 ((CH)₄(CH₃)₈OSi₂);

MALDI-TOF m/z berechnet für C₂₆H₄₄N₈O₅Si₂+H⁺: 605,31 [M+H]⁺, gefunden: 605,14.

6.3.19 2'-Azido-2'-desoxy-6-N-isobutyryl-adenosin (**24**)



$M = 362,34$ g/mol

Verbindung **23** (817 mg, 1,35 mmol) wurde in 5,3 ml 1 M TBAF in THF gelöst. Unmittelbar im Anschluss wurde Essigsäure (153 µl, 2,57 mmol, 1,9 Äq.) hinzugefügt. Die Reaktion wurde 30

min lang bei Raumtemperatur durchgeführt, bevor das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand 2-mal mit je 15 ml DCM coevaporiert wurde. Es folgte eine säulenchromatographische Aufreinigung des Rohprodukts (DCM/MeOH 97/3). Das Produkt (345 mg, 0,96 mmol, 71%) konnte als weißer Schaum isoliert werden.

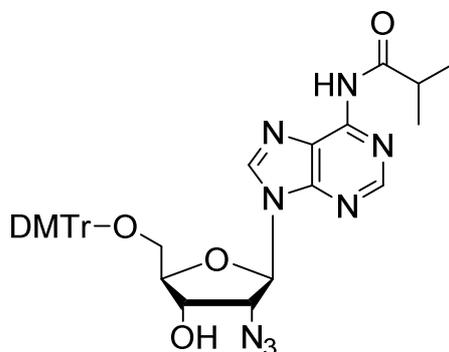
$R_f = 0,30$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5);

^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10,68 (s, 1H, H-N(6)), 8,69 (s, 1H, H-C(8)), 8,67 (s, 1H, H-C(2)), 6,14 (d, $J = 5,6$ Hz, 1H, H-C(1')), 6,07 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H, HO-C(3')), 5,15 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H, HO-C(5')), 4,71 (t, $J = 5,4$ Hz, 1H, H-C(2')), 4,59 (q, $J = 5,0$ Hz, 1H, H-C(3')), 4,01 (q, $J = 4,0$ Hz, 1H, H-C(4')), 3,70 (m, 1H, $\text{H}_a\text{-C}(5')$), 3,59 (m, 1H, $\text{H}_b\text{-C}(5')$), 2,96 (m, $J = 6,8$ Hz, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,13 (d, $J = 6,8$ Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$);

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 175,34 (C=O), 151,87 (C(2)), 151,58 (C(4)), 149,96 (C(6)), 142,42 (C(8)), 124,08 (C(5)), 85,88 (C(4')), 85,30 (C(1')), 70,86 (C(3')), 64,48 (C(2')), 60,72 (C(5)), 34,35 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 19,24, 19,22 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$);

MALDI-TOF m/z berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_8\text{O}_4 + \text{H}^+$: 363,15 $[\text{M} + \text{H}]^+$, gefunden: 363,53.

6.3.20 2'-Azido-2'-deoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-6-N-isobutyryl-adenosin (25)



$M = 664,71$ g/mol

Verbindung **24** (380 mg, 1,05 mmol) wurde 2-mal mit je 12 ml Pyridin coevaporiert und in 8 ml Pyridin aufgenommen. DMT-Cl (482 mg, 1,42 mmol, 1,35 Äq.) wurde in drei Portionen über einen Zeitraum von 1,5 h hinzugegeben. Nach 3 h wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 ml MeOH beendet. Das Reaktionsgemisch wurde auf 2 ml eingengt und in 15 ml DCM aufgenommen. Anschließend erfolgte eine wässrige Aufarbeitung mit 10 ml ges. NaHCO_3 -Lösung, bei der die wässrige Phase 3-mal mit je 10 ml DCM extrahiert wurde. Die organischen Phasen wurden vereint, mit Na_2SO_4 getrocknet und eingengt. Das Rohprodukt wurde mittels

Säulenchromatographie aufgereinigt (DCM/MeOH 98/2 → 95/5), bei der das Produkt (400 mg, 0,6 mmol, 57 %) als weißer Schaum isoliert werden konnte.

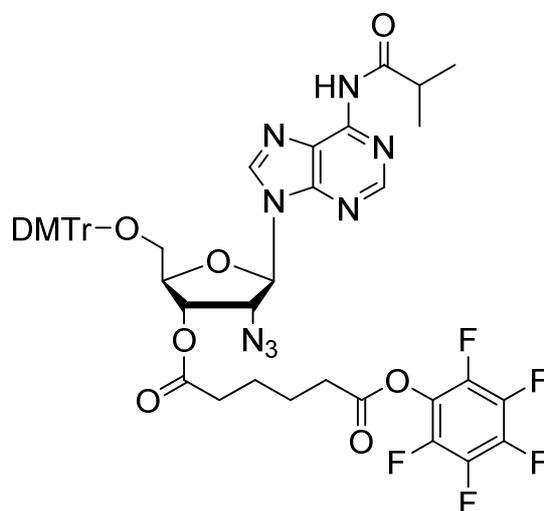
$R_f = 0,40$ (CH₂Cl₂/MeOH 95:5);

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,69 (s, 1H, H-N(6)), 8,61, 8,60 (2s, 2H, H-C(2)/H-(C(8))), 7,32 (m, 2H, H-DMTr), 7,20 (m, 7H, H-DMTr), 6,80 (m, 4H, H-DMTr), 6,12 (d, $J = 4,2$ Hz, 1H, H-C(1')), 6,07 (d, $J = 5,7$ Hz, 1H, HO-C(3')), 4,96 (m, 1H, H-C(2')), 4,82 (q, $J = 5,8$ Hz, 1H, H-C(3')), 4,10 (m, 1H, H-C(4')), 3,71 (2s, 6H, OCH₃), 3,24 (m, 2H, H₂-C(5')), 2,97 (sept, $J = 6,8$ Hz, 1H, CH(CH₃)₂), 1,13 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H, CH(CH₃)₂);

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 175,32 (C=O), 158,03, 158,01 (C(ar)-DMTr), 151,77 (C(2)), 151,37 (C(4)), 150,00 (C(6)), 144,75 (C(ar)-DMTr), 143,07 (C(8)), 135,45, 135,43, 129,67, 129,63, 127,74, 127,64, 126,63 (C(ar)-DMTr), 124,13 (C(5)), 113,11, 113,09 (C(ar)-DMTr), 86,09 (C(1')), 85,46 (tert. C-DMTr), 83,16 (C(4')), 70,79 (C(3')), 63,99 (C(2')), 63,05 (C(5')), 54,99 (DMTr-OCH₃), 34,36 (CH(CH₃)₂), 19,24, 19,22 (CH(CH₃)₂);

MALDI-TOF m/z berechnet für C₃₅H₃₆N₈O₆+H⁺: 665,28 [M+H]⁺, gefunden: 665,08.

6.3.21 2'-Azido-2'-deoxy-3'-O-[1,6-dioxo-6-(pentafluorophenoxy)hexyl]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)- 6-N-isobutyryl-adenosin (3)



M = 958.88 g/mol

Verbindung **25** (140 mg, 0,21 mmol) und DMAP (26 mg, 0,21 mmol, 1 Äq.) wurden 3-mal mit jeweils 6 ml Pyridin coevaporiert und in 4,8 ml DMF/Pyridin (1:1) gelöst. Anschließend wurde Verbindung **7** (495 mg, 1,03, 4,89 Äq) hinzugefügt. Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur.

Nach 3 h wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand 2-mal mit je 10 ml wasserfreiem Toluol coevaporiert. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (DCM/Aceton 96/4). Das Produkt (120 mg, 0,125 mmol, 60%) konnte als weißer Schaum isoliert werden.

$R_f = 0,20$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Aceton } 96:4$);

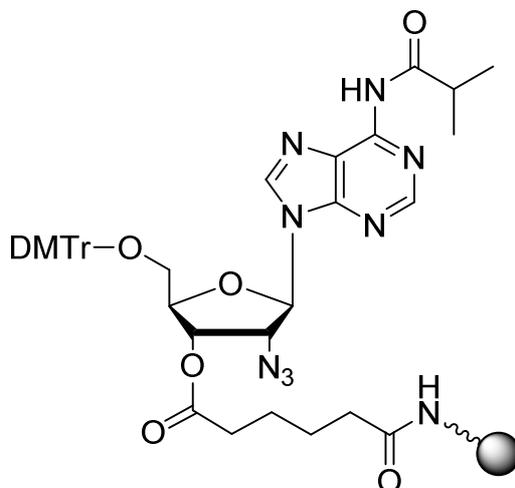
$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6) δ 10,72 (s, 1H, H-N(6)), 8,63 (s, 1H, H-C(8)), 8,55 (s, 1H, H-C(2)), 7,32 (m, 2H, H-DMTr) 7,21 (m, 7H, H-DMTr), 6,81 (m, 4H, H-DMTr), 6,15 (d, $J = 6,1$ Hz, 1H, H-C(1')), 5,71 (dd, $J_1 = 4,4$ Hz, $J_2 = 5,8$ Hz, 1H, H-C(3')), 5,47 (t, $J = 6,1$ Hz, 1H, H-C(2')), 4,26 (m, 1H, H-C(4')), 3,71 (2s, 6H, OCH_3), 3,30 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-C}(5')$), 2,96 (sept, $J = 6,9$ Hz, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,83 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H, CH_2), 2,52 (t, 2H, CH_2), 1,71 (m, 4H, 2x CH_2), 1,13 (dd, $J_1 = 1,1$ Hz, $J_2 = 6,9$ Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$);

$^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, DMSO-d_6) δ 175,32, 171,89, 169,38 ((C=O)), 158,08, 158,07 (C(ar)-DMTr), 151,79 (C(2)), 151,54 (C(4)), 150,10 (C(6)), 144,63 (C(ar)-DMTr), 143,23 (C(8)), 135,29, 129,66, 129,61, 127,75, 127,60, 126,68 (C(ar)-DMTr), 124,26 (C(5)), 113,10 (C(ar)-DMTr), 86,04 (C(1')), 85,71 (tert. C-DMTr), 81,37 (C(4')), 72,09 (C(3')), 62,91 (C(2')), 61,86 (C(5')), 54,99, 54,98 (DMTr- OCH_3), 34,36 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 32,69 (CH_2), 32,10 (CH_2), 23,52 (CH_2), 23,40 (CH_2), 19,23, 19,20 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$);

$^{19}\text{F NMR}$ (565 MHz, DMSO-d_6) δ -153.55 (F-C(ar)), -158.07 (F-C(ar)), -162.62 (F-C(ar));

MALDI-TOF m/z berechnet für $\text{C}_{47}\text{H}_{43}\text{F}_5\text{N}_8\text{O}_9 + \text{H}^+$: 959,31 $[\text{M} + \text{H}]^+$, gefunden: 959,83.

6.3.22 Immobilisierung des Nucleosids 3 an den Festphasenträger



Es wurden 60 mg (62,5 μmol) des Nukleosids **3** in 2 ml DMF gelöst und mit 10 μl Pyridin (0,12 mmol, 2 Äq.) versetzt. Im nächsten Schritt wurde der Amino-funktionalisierte CPG 500 Å Festphasenträger (380 mg, Kapazität 163 $\mu\text{mol/g}$) hinzugefügt. Die Reaktion lief über Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurde das Reaktionsgemisch filtriert und der Rückstand mit DCM gewaschen. Anschließend wurde der Träger in je 3 ml Capping-Reagenz A (0,5 M DMAP in MeCN) und Capping-Reagenz B (Essigsäureanhydrid/syn-Collidin/MeCN; 2/3/5) aufgenommen. Nach 20 min wurde das Reaktionsgemisch erneut filtriert und der Rückstand abwechselnd mit Methanol und DCM gewaschen. Im nächsten Schritt wurde das gereinigte Trägermaterial (140 mg) unter Vakuum getrocknet, bevor die Beladungsdichte bestimmt wurde. Hierfür wurden 1,6 mg des Trägers in 1 ml Detritylierungsreagenz (3% TFA in Dichlorethan) aufgenommen. Die dabei erhaltene Stammlösung wurde zentrifugiert und 1:10 verdünnt. Für die anschließenden photometrischen Messungen bei 503 nm wurde die Lösung in der Küvette erneut 1:5 verdünnt. Die Messung wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Beladungsdichte wurde wie folgt berechnet:

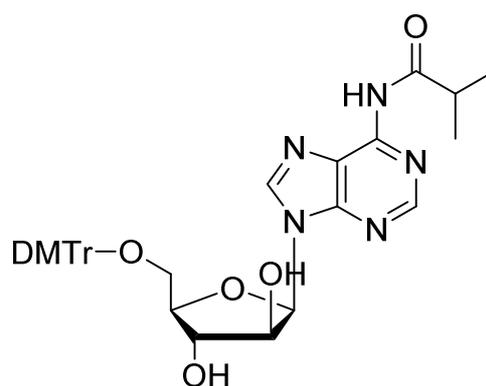
$$\emptyset(A_{503}) = 0,1795$$

$$c_{\text{Küvette}} = A/\varepsilon = 0,1794/76000 \text{ l/mol} = 2,36 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$$

$$c_{\text{Stammlösung}} = c_{\text{Küvette}} \cdot 50 = 2,36 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l} \cdot 50 = 1,18 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l} = 0,118 \mu\text{mol/ml}$$

$$\text{Beladungsdichte} = c_{\text{Stammlösung}}/m_{\text{Träger}} = 0,118 \mu\text{mol/ml}/1,6 \text{ mg} = 74 \mu\text{mol/g}$$

6.3.23 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-6-N-isobutyryl-9- β -D-arabinofuranosyladenosin (**26**)



$$M = 639.67 \text{ g/mol}$$

Verbindung **20** (663 mg, 2 mmol) wurde 3-mal mit trockenem Pyridin coevaporiert und in 15 ml wasserfreiem Pyridin suspendiert. Anschließend wurde DMTr-Cl (900 mg, 2,65 mmol 1,35 Äq.) in zwei Portionen über einen Zeiraum von einer Stunde hinzugefügt. Die Reaktion lief über Nacht bei Raumtemperatur. Am Folgetag wurde die Reaktion durch Zugabe von 12 ml Methanol beendet und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wurde in DCM aufgenommen und in 40 ml gesättigte NaHCO₃-Lösung überführt. Die wässrige Phase wurde anschließend 3-mal mit je 30 ml DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, über NaSO₄ getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (DCM/MeOH 98:2 → 95:5). Das Produkt (694 mg, 1,08 mmol, 53%) konnte als weißer Schaum isoliert werden.

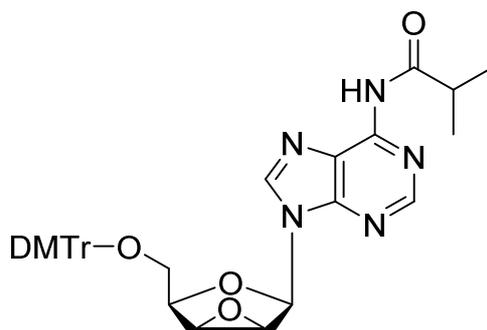
$R_f = 0,35$ (CH₂Cl₂/MeOH 95:5);

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 10,65 (s, 1H, H-N(6)), 8,58 (s, 1H, H-C(2)), 8,57 (s, 1H, H-C(8)), 7,35 (m, 2H, DMTr H-C(ar)), 7,22 (m, 7H, DMTr H-C(ar)), 6,82 (m, 4H, DMTr H-C(ar)), 6,03 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H, H-C(1')), 5,60 (d, $J = 5,6$ Hz, 1H, HO-C(2')), 5,26 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H, HO-C(3')), 4,76 (q, $J = 5,1$ Hz, 1H, H-C(2')), 4,33 (q, $J = 5,4$ Hz, 1H, H-C(3')), 4,10 (q, $J = 4,7$ Hz, 1H, H-C(4')), 3,72 (2s, 6H, O-CH₃), 3,23 (m, 2H, H₂-C(5')), 2,96 (sept, $J = 6,8$ Hz, 1H, -CH-(CH₃)₂), 1,13 (dd, $J_1 = 0,9$ Hz, $J_2 = 6,8$ Hz, 6H, -CH-(CH₃)₂, 6H, -CH-(CH₃)₂);

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆): δ 175,31 (C=O), 158,03 (C(ar)-DMTr), 158,01 (C(ar)-DMTr), 151,69 (C(6)), 151,65 (C(2)), 149,87 (C(4)), 144,82 (C(ar)-DMTr), 142,92 (C(8)), 135,54, 135,49, 129,68, 129,64, 127,76, 127,65, 126,63 (C(ar)-DMTr), 124,13 (C(5)), 113,12, 113,11 (C(ar)-DMTr), 88,18 (C(1')), 85,46 (tert. C-DMTr), 83,20 (C(4')), 72,91 (C(2')), 70,30 (C(3')), 63,66 (C(5')), 55,00, 54,99 (OCH₃), 34,34 (CH-(CH₃)₂), 19,24, 19,22 (CH-(CH₃)₂);

MALDI-TOF m/z berechnet für C₃₅H₃₇N₅O₇+Na⁺: 662,68 [M+Na]⁺, gefunden: 662,95.

6.3.24 2',3'-Anhydro-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-6-N-isobutyryl-9-β-D-lyxofuranosyladenosin (27)



621,68 g/mol

Verbindung **26** (694 mg, 1,08 mmol) und Triphenylphosphin (425 mg, 1,62 mmol, 1,85 Äq.) wurden 2-mal mit je 12 trockenem DCM coevaporiert und in 15 ml wasserfreiem DMF aufgenommen. Die Lösung wurde auf 55 °C erhitzt und DIAD (320 µl, 1,62 mmol, 1,85 Äq.) wurde tropfenweise hinzugefügt. Die Reaktion lief für eine Stunde bei Raumtemperatur. Das Reaktionsgemisch wechselte in diesem Zeitraum die Farbe von orange zu hellgelb. Nachdem die Reaktion abgeschlossen war, wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wurde in 30 ml DSCM aufgenommen und mit 40 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde im Anschluss 3-mal mit je 30 ml DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, über NaSO₄ getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (DCM/MeOH 99:1 → 98:2). Das Produkt (567 mg, 0,91 mmol, 85%) wurde als weißer Schaum isoliert.

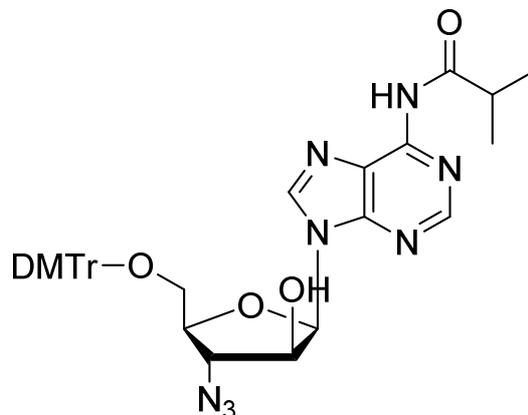
$R_f = 0,50$ (CH₂Cl₂/MeOH 95:5);

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 10,71 (s, 1H, H-N(6)), 8,69 (s, 1H, H-C(2)), 8,31 (s, 1H, H-C(8)), 7,41 (m, 2H, DMTr H-C(ar)), 7,28 (m, 7H, DMTr H-C(ar)), 6,86 (m, DMTr H-C(ar)), 6,45 (d, $J = 0,8$ Hz, 1H, H-C(1')), 4,36 (m, 2H H-C(2')/H-C(4')), 4,27 (m, 1H, H-C(3')), 3,73 (2 s, $J = 1,3$ Hz, 6H, O-CH₃), 3,25 (m, 2H, H₂-C(5')), 2,96 (sept, $J = 6,9$ Hz, 1H, -CH-(CH₃)₂), 1,13 ($J_1 = 0,9$ Hz, $J_2 = 6,9$ Hz, 6H, -CH-(CH₃)₂);

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ 175,30 ((C=O)), 158,12, 158,11 (C(ar)-DMTr), 152,10 (C(6)), 151,68 (C(2)), 149,90 (C(4)), 144,73 (C(ar)-DMTr), 141,60 (C(8)), 135,38, 135,33, 131,51, 131,45, 129,71, 129,69, 127,84, 127,65, 126,73 (C(ar)-DMTr), 123,13 (C(5)), 113,20 (C(ar)-DMTr), 85,70 (tert. C-DMTr), 80,74 (C(1')), 76,65 (C(4')), 62,39 (C(5')), 56,94 (C(3')), 56,27 (C(2')), 55,02 (OCH₃), 34,35 (CH-(CH₃)₂), 19,24, 19,21 (CH-(CH₃)₂);

MALDI-TOF m/z berechnet für C₃₅H₃₅N₅O₆+H⁺: 622,27 [M+H]⁺, gefunden: 622,09.

6.3.25 3'-Azido-3'-deoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-6-N-isobutyryl-9-β-D-arabino-furanosyl-adenosin (28)



664,71 g/mol

Verbindung **27** (567 mg, 0,91 mmol) wurde 2-mal mit je 12 ml trockenem DCM coevaporiert und in 12 ml wasserfreiem DMF aufgenommen. Die Lösung wurde auf 55 °C erwärmt und LiN₃ (223 mg, 4,56 mmol, 5 Äq.) wurde hinzugegeben. Nach 3 h wurde die Reaktion beendet und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 30 ml DCM aufgenommen und mit 20 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Anschließend wurde die wässrige Phase 3-mal mit je 30 ml DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, über NaSO₄ getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (DCM/MeOH 99:1 → 98:2). Das Produkt (224 mg, 0,37 mmol, 40%) konnte als weißer Schaum isoliert werden.

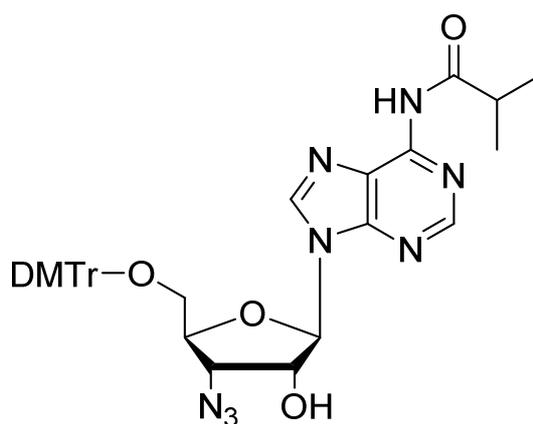
$R_f = 0,40$ (CH₂Cl₂/MeOH 95:5);

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 10,64 (s, 1H, H-N(6)), 8,59 (s, 1H, H-C(2)), 8,46 (s, 1H, H-C(8)), 7,37 (m, 2H, DMTr H-C(ar)), 7,24 (m, 7H, DMTr H-C(ar)), 6,83 (m, 4H, DMTr H-C(ar)), 6,41 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H, H-C(1')), 6,19 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H, HO-C(2')), 4,63 (m, 1H, H-C(2')), 4,53 (t, $J = 8,2$ Hz, 1H, H-C(3')), 3,96 (m, 1H, H-C(4')), 3,72 (2s, 6H, OCH₃), 3,37 (m, 1H, H_a-C(5')), 3,28 (m, 1H, H_b-C(5')), 2,97 (sept, $J = 6,8$ Hz, 1H, **CH**-(CH₃)₂), 1,13 (dd, $J_1 = 1,4$ Hz, $J_2 = 6,9$ Hz, 6H, -CH-(**CH**₃)₂);

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ 175,31 ((C=O)), 158,09, 158,07 (C(ar)-DMTr), 151,99 (C(6)), 151,59 (C(2)), 149,68 (C(4)), 144,61 (C(ar)-DMTr), 143,42 (C(8)), 135,33, 135,30, 129,67, 129,64, 127,81, 127,65, 126,73 (C(ar)-DMTr), 123,41 (C(5)), 113,17, 113,15 (C(ar)-DMTr), 85,70 (tert. C-DMTr), 82,52 (C(1')), 78,28 (C(4')), 74,14 (C(2')), 64,85 (C(3')), 63,30 (C(5')), 55,00 (OCH₃), 34,33 (**CH**-(CH₃)₂), 19,26, 19,23 (CH-(**CH**₃)₂);

MALDI-TOF m/z berechnet für C₃₅H₃₆N₈O₆+H⁺: 665,28 [M+H]⁺, gefunden: 665,56.

6.3.26 3'-Azido-3'-deoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-6-N-isobutyryl-adenosin (29)



664,71 g/mol

Verbindung **28** (224 mg, 0,37 mmol) und DMAP (136 mg, 1,11 mmol, 3 Äq.) wurden 2-mal mit je 10 ml trockenem DCM coevaporiert und in 20 ml wasserfreiem DCM gelöst. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt und Trifluormethansulfonylchlorid (53 µl, 0,56 mmol, 1,5 Äq.) wurde langsam hinzugegeben. Die Reaktion wurde nach 30 min beendet. Die Reaktionslösung wurde mit 30 ml DCM verdünnt und mit 20 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung versetzt. Nach Trennung der Phasen wurde die wässrige Phase 3-mal mit je 30 ml DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, über NaSO₄ getrocknet und eingedampft. Anschließend wurde der Rückstand in 20 ml wasserfreiem Toluol aufgenommen und mit Kaliumtrifluoracetat (281 mg, 1,85 mmol, 5 Äq.), 18-Krone-6-Ether (196 mg, 0,74 mmol, 2 Äq.), sowie DIPEA (96 µl, 0,56 mmol, 1,5 Äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde auf 60 °C erwärmt, woraufhin die Reaktion über einen Zeitraum von 2 h erfolgte. Als nächstes wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und der Rückstand in 20 ml DCM aufgenommen. Es folgte eine wässrige Aufarbeitung mit gesättigter NaHCO₃-Lösung, bei der die wässrige Phase jeweils 3-mal mit je 20 ml DCM extrahiert wurde. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (DCM/MeOH 99:1 → 98:2). Das Produkt (158 mg, 0,24 mmol, 64%) konnte als weißer Schaum isoliert werden.

$R_f = 0,40$ (CH₂Cl₂/MeOH 95:5);

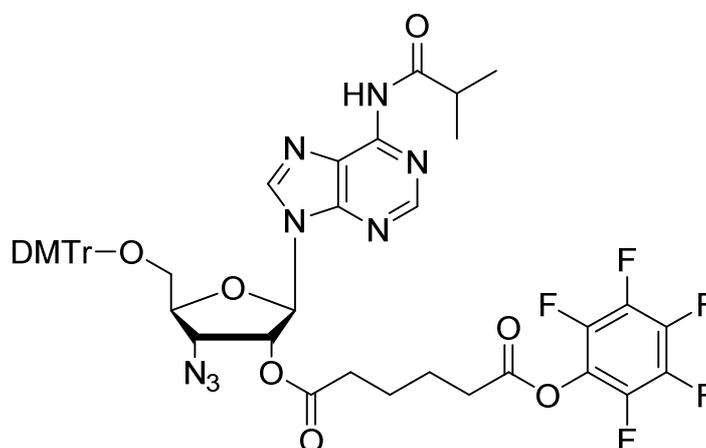
¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 10,67 (s, 1H, H-N(6)), 8,59 (s, 1H, H-C(2)), 8,58 (s, 1H, H-C(8)), 7,33 (m, 2H, DMTr H-C(ar)), 7,22 (m, 7H, DMTr H-C(ar)), 6,82 (m, 4H, DMTr H-C(ar)), 6,39 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H, HO-C(2')), 6,05 (d, $J = 4,3$ Hz, 1H, H-C(1')), 5,18 (q, $J = 5,1$ Hz, 1H, H-C(2')), 4,47 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H, H-C(3')), 4,15 (m, 1H, H-C(4')), 3,72 (2s, 6H, OCH₃), 3,27 (m,

2H, H₂-C(5')), 2,96 (sept, *J* = 6,9 Hz, 1H CH-(CH₃)₂), 1,13 (dd, *J*₁ = 0,6 Hz, *J*₂ = 6,9 Hz, 6H, CH-(CH₃)₂);

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ 175,31 ((C=O)), 158,08, 158,06 (C(ar)-DMTr), 151,72 (C(6)), 151,61 (C(2)), 149,95 (C(4)), 144,66 (C(ar)-DMTr), 142,97 (C(8)), 135,34, 129,66, 129,63, 127,80, 127,61, 126,70 (C(ar)-DMTr), 124,12 (C(5)), 113,16 (C(ar)-DMTr), 88,35 (C(1')), 85,68 (tert. C-DMTr), 80,29 (C(4')), 73,52 (C(2')), 63,16 (C(5')), 61,02 (C(3')), 55,00 (OCH₃), 34,34 (CH-(CH₃)₂), 19,23, 19,21 (CH-(CH₃)₂);

MALDI-TOF *m/z* berechnet für C₃₅H₃₆N₈O₆+H⁺: 665,28 [M+H]⁺, gefunden: 665,10.

6.3.27 3'-Azido-3'-deoxy-2'-O-[1,6-dioxo-6-(pentafluorophenyl)hexyl]-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-6-N-isobutyryl-adenosin (4)



958,88 g/mol

Verbindung **29** (158 mg, 0,24 mmol) und DMAP (29 mg, 0,24 mmol, 1 Äq.) wurden zusammen 2-mal mit je 8 ml trockenem DCM coevaporiert und in 4 ml DMF/Pyridin (1:1, V/V) aufgenommen. Im nächsten Schritt wurde der aktivierte Adipinsäure-Linker (561 mg, 1,17 mmol, 4,9 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 2 h. Anschließend wurden die Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und der ölige Rückstand 2-mal mit je 12 ml wasserfreiem Toluol coevaporiert. Das Rohprodukt wurde zügig über eine Kieselgelsäule aufgereinigt (DCM/Aceton 96/4). Das Produkt (154 mg, 0,14 mmol, 58%) konnte als weiße, kristalline Substanz isoliert werden.

R_f = 0.20 (CH₂Cl₂/Aceton 96:4);

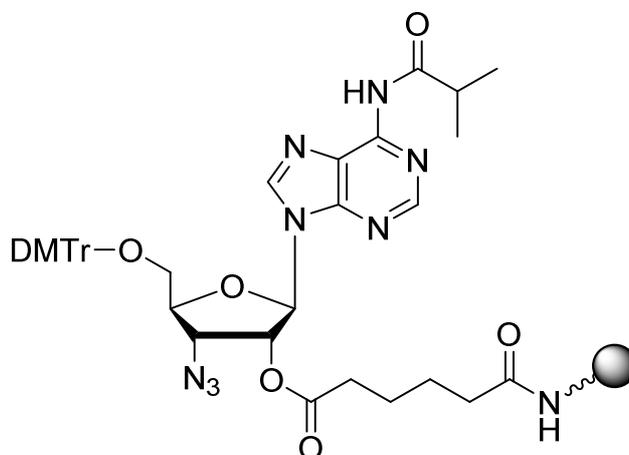
^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 10,70 (s, 1H, H-N(6)), 8,63 (s, 1H, H-C(2)), 8,62 (s, 1H, H-C(8)), 7,30 (m, 2H, DMTr-H-C(ar)), 7,20 (m, 7H, DMTr-H-C(ar)), 6,80 (m, 4H, DMTr-H-C(ar)), 6,30 (d, $J = 3,1$ Hz, 1H, H-C(1')), 6,18 (dd, $J_1 = 3,1$ Hz, $J_2 = 5,7$ Hz, 1H, H-C(2')), 5,03 (dd, $J_1 = 5,7$ Hz, $J_2 = 7,6$ Hz, 1H, H-C(3')), 4,15 (m, 1H, H-C(4')), 3,71 (2s, 6H, O-CH $_3$), 3,26 (m, 2H, H $_2$ -C(5')), 2,95 (sept, $J = 6,8$ Hz, 1H, CH-(CH $_3$) $_2$), 2,81 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H, CH $_2$), 1,69 (m, 4H, CH $_2$), 1,12 (d, $J = 6,8$ Hz, 6H, CH-(CH $_3$) $_2$);

^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ 175,28, 171,73, 162,30 (C=O), 158,08 (C(ar)-DMTr), 151,89 (C(2)), 151,35 (C(4)), 150,03 (C(6)), 144,53 (C(ar)-DMTr), 142,93 (C(8)), 135,25 (C(ar)-DMTr), 129,61, 127,78, 127,56, 126,70 (C(ar)-DMTr), 123,95 (C(5)), 113,14 (C(ar)-DMTr), 86,44 (C(1')), 85,68 (tert. C-DMTr), 80,56 (C(4')), 74,48 (C(2')), 62,07 (C(5')), 59,57 (C(3')), 54,99 (OCH $_3$), 34,35 (CH-(CH $_3$) $_2$), 32,62 (CH $_2$), 32,08 (CH $_2$), 23,46 (CH $_2$), 23,32 (CH $_2$), 19,20 (CH-(CH $_3$) $_2$);

^{19}F NMR (565 MHz, DMSO- d_6) δ -153,58 (F-C(ar)), -158,07 (F-C(ar)), -162,62 (F-C(ar));

MALDI-TOF m/z berechnet für C $_{47}$ H $_{43}$ N $_8$ O $_9$ +Na $^+$: 981,30 [M+Na] $^+$, gefunden: 981,81.

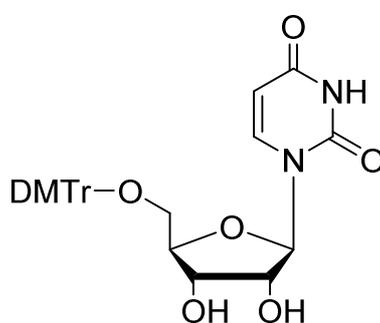
6.3.28 Immobilisierung des Nucleosids 4 an den Festphasenträger



Es wurden 67 mg (70 μmol) des Nucleosids 4 in 2 ml DMF gelöst und mit 11 μl Pyridin (0,14 mmol, 2 Äq.) versetzt. Im nächsten Schritt wurde der Amino-funktionalisierte CPG 500 Å Festphasenträger (420 mg, Kapazität 163 $\mu\text{mol/g}$) hinzugefügt. Die Reaktion lief über Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurde das Reaktionsgemisch filtriert und der Rückstand mit DCM gewaschen. Anschließend wurde der Träger in je 3 ml Capping-Reagenz A (0,5 M DMAP in MeCN) und Capping-Reagenz B (Essigsäureanhydrid/syn-Collidin/MeCN; 2/3/5) aufgenommen. Nach 20 min wurde das Reaktionsgemisch erneut filtriert und der

Rückstand abwechselnd mit Methanol und DCM gewaschen. Im nächsten Schritt wurde das gereinigte Trägermaterial (300 mg) unter Vakuum getrocknet, bevor die Beladungsdichte bestimmt wurde. Hierfür wurden 1,45 mg des Trägers in 1 ml Detritylierungsreagenz (3% TFA in Dichlorethan) aufgenommen. Die dabei erhaltene Stammlösung wurde zentrifugiert und 1:10 verdünnt. Für die anschließenden photometrischen Messungen bei 503 nm wurde die Lösung in der Küvette erneut 1:5 verdünnt. Die Messung wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Beladungsdichte wurde wie im Abschnitt 6.3.22 erläutert berechnet und ergab einen Wert von 42 $\mu\text{mol/g}$

6.3.29 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-uridin (31)



$$M = 546.57 \text{ g/mol}$$

Uridin wurde 3-mal mit je 12 ml Pyridin coevaporiert und in 30 ml trockenem Pyridin aufgenommen. Der Suspension wurde DMT-Cl (1,36 g, 4 mmol, 1 Äq.) in zwei Portionen über einen Zeitraum von 1 h hinzugefügt. Die Reaktion lief über Nacht und wurde am nächsten Tag durch die Zugabe von 12 ml MeOH beendet. Die Lösungsmittel wurden unter Vakuum entfernt und der ölige Rückstand wurde in 30 ml DCM aufgenommen. Als nächstes erfolgte eine wässrige Aufarbeitung mit 40 ml ges. NaHCO_3 -Lsg. Die wässrige Phase wurde 3-mal mit je 30 ml DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, über Na_2SO_4 getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (DCM/MeOH 98/2 \rightarrow 95/5). Das Produkt (1,458 g, 2,67 mmol, 67%) wurde als weißer Schaum isoliert.

$R_f = 0,30$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5);

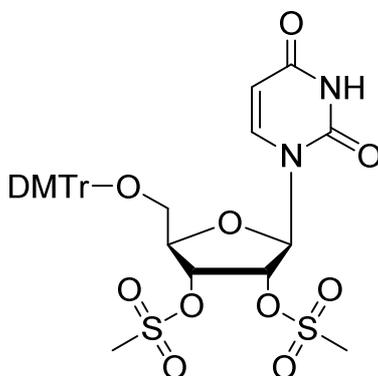
$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6) δ 11,35 (s, 1H, H-N(3)), 7,71 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-C(6)), 7,42-7,20 (m, 9H, DMT Tr H-C(ar)), 6,90 (m, 4H, DMT Tr H-C(ar)), 5,74 (d, $J = 4,3$ Hz, 1H, H-C(1')), 5,5 (d, $J = 4,8$ Hz, 1H, HO-C(2')), 5,30 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-C(5)), 5,17 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H, HO-

C(3')), 4,08 (m, 2H, H-C(2'), H-(C3')), 3,95 (m, 1H, H-C(4')), 3,74 (s, 6H, OCH₃), 3,23 (m, 2H, H₂-C(5));

¹³C NMR (DMSO-d₆, 150 MHz): δ 163,13 (C(4)), 158,21 (C(ar)-DMTr), 150,56 (C(2)), 144,74 (C(ar)-DMTr), 140,73 (C(6)), 135,47, 135,23, 129,85, 128,01, 127,77, 126,89, 113,34 (C(ar)-DMTr), 101,53 (C(5)), 88,96 (C(1')), 85,93 (tert. C-DMTr), 82,48 (C(4')), 73,57 (C(3')), 69,64 (C(2')), 63,31 (C(5')), 55,14 (OCH₃);

MALDI-ToF m/z berechnet für C₃₀H₃₀N₂O₈+Na⁺: 569.19 [M+Na]⁺, gefunden: 569.51.

6.3.30 2',3'-O-Dimethylsulfonyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-uridin (32)



M = 702.75 g/mol

Verbindung **31** (1,4 g, 2,56 mmol) wurde 3-mal mit je 12 ml DCM coevaporiert und in 15 ml Pyridin gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Im nächsten Schritt wurde Methansulfonylchlorid (2,97 ml, 38,42 mmol, 15 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktion lief für 30 min bei 0 °C und für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 40 ml DCM verdünnt, auf 0 °C abgekühlt und mit 40 ml ges. NaHCO₃-Lsg. versetzt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde 3-mal mit je 40 ml DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, über Na₂O₄ getrocknet und eingedampft. Das ölige Rohprodukt wurde 2-mal mit je 12 ml Toluol coevaporiert und anschließend mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (DCM/MeOH 99/1 → 98:2). Als Produkt (1,76 g, 2,5 mmol, 98%) wurde ein gelblicher Schaum isoliert.

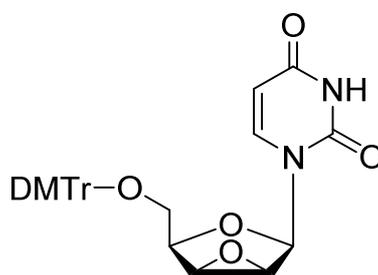
R_f = 0,40 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5); ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 11,54 (s, 1H, H-N(3)), 7,72 (d, J = 8,1 Hz, 1H, H-C(6)), 7,20-7,42 (m 9H, DMT H-C(ar)), 6,89 (m, 4H, DMT H-C(ar)), 5,96 (d, J = 3,7 Hz, 1H, H-C(1')), 5,59 (m, 1H, H-C(2')), 5,38-5,46 (m, 2H, H-C(3'), H-(C5)), 4,26 (m,

^1H , H-C(4')), 3,74 (s, 6H, OCH_3), 3,34-3,46 (m, 2 H, $\text{H}_2\text{-C}(5')$), 3,37 (s, 3 H, $\text{O-SO}_2\text{-CH}_3$), 3,27 (s, 3 H, $\text{O-SO}_2\text{-CH}_3$);

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz): δ 163,02 (C(4)); 157,21 (C(ar)-DMTr), 150,56 (C(2)), 148,39 (C(ar)-DMTr), 140,24 (C(6)), 140,21, 128,89, 127,67, 127,41, 126,43, 112,78 (C(ar)-DMTr), 102,46 (C(5)), 85,98 (C(1')), 82,55 (C(4')), 79,92 (tert. C-DMTr), 76,77 (C(3')), 75,72 (C(2')), 59,48 (C(5')), 55,04 (OCH_3), 37,99, 37,97 ($\text{O-SO}_2\text{-CH}_3$);

MALDI-Tof m/z berechnet für $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_{12}\text{S}_2+\text{Na}^+$: 725.15 [$M+\text{Na}$] $^+$; gefunden: 725.53.

6.3.31 2',3'-Anhydro-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-1- β -D-lyxofuranosyl-uracil (33)



$M = 528.55$ g/mol

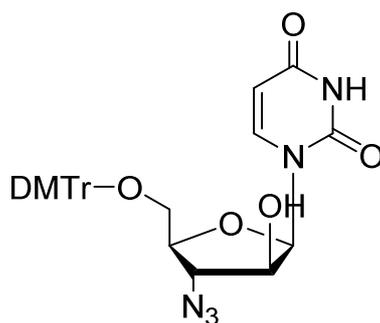
Verbindung **32** (1,75 g, 2,49 mmol) wurde in 50 ml Ethanol und 21 ml 1 M NaOH gelöst. Die Reaktionslösung wurde für eine Stunde auf 60 °C erhitzt. Nach Abschluss der Reaktion wurde die Lösung auf 20 °C abgekühlt, mit Eisessig auf pH 7 eingestellt und auf ein Volumen von 20 ml eingengt. Im nächsten Schritt wurde das Reaktionsgemisch mit 30 ml DCM verdünnt und in 30 ml ges. NaHCO_3 -Lsg. überführt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde 3-mal mit je 30 ml DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, über Na_2SO_4 getrocknet und eingengt. Das Produkt wurde durch Säulenchromatographie (DCM/MeOH 99/1 \rightarrow 98/2) als weißer Schaum isoliert (1,17 g, 2,2 mmol, 89%).

$R_f = 0,40$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5); ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 11,45 (s, 1H, H-N(3)), 7,51 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-C(6)), 7,20-7,42 (m 9H, DMTr H-C(ar)), 6,89 (m, 4H, DMTr H-C(ar)), 6,10 (s, 1H, H-C(1')), 5,62 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-C(5)), 4,24 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H, H-C(4')), 4,11 (m, 2H, H-C(2'), H-C(3')), 3,74 (s, 6H, OCH_3), 3,19 (m, 2 H, $\text{H}_2\text{-C}(5')$);

^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ 163,05 (C(4)), 158,03 (C(ar)-DMTr), 150,41 (C(2)), 144,69 (C(ar)-DMTr), 140,99 (C(6)), 135,45, 135,27, 129,71, 127,91, 127,64, 126,79, 113,26 (C(ar)-DMTr), 101,98 (C(5)), 85,73 (tert. C-DMTr), 80,94 (C(1')), 75,96 (C(4')), 62,21 (C(5')), 55,71 (C(3')), 55,58 (C(2')), 55,04 (OCH_3);

MALDI-Tof m/z berechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_7+\text{Na}^+$: 551.18 [$M+\text{Na}$] $^+$; gefunden: 551.38.

6.3.32 3'-Azido-3'-deoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-1-β-D-arabinofuranosyl-uracil (34)



M = 571,58 g/mol

Verbindung **33** (1,75 g, 2,49 mmol) wurde in 12 ml DMF gelöst. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf 55 °C erwärmt und mit LiN₃ (233 mg, 4,75 mmol, 5 Äq.) versetzt. Nach 20 h wurde das Lösungsmittel entfernt. Der ölige Rückstand wurde in 30 ml DCM aufgenommen und in 30 ml ges. NaHCO₃-Lsg. überführt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde 3-mal mit je 20 ml DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, über Na₂SO₄ getrocknet und eingengt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (DCM/MeOH 99:1 → 98:2). Das Produkt (247 mg, 0,42 mmol, 44%) konnte als weißer Schaum isoliert werden.

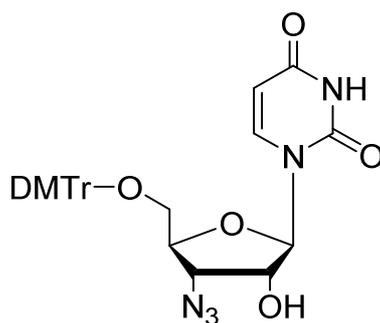
R_f = 0,40 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5);

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 11,34 (s, 1H, H-N(3)), 7,59 (d, J = 8,1 Hz, 1H, H-C(6)), 7,20-7,42 (m 9H, DMTr H-C(ar)), 6,89 (m, 4H, DMTr H-C(ar)), 6,15 (d, J = 5,4 Hz, 1H, HO-C(2')), 6,06 (d, J = 6,1 Hz, 1H, H-C(1')), 5,37 (d, J = 8,1 Hz, 1H, H-C(5)), 4,36 (dd, J₁ = 6,19 Hz, J₂ = 10,23 Hz, 1H, H-C(2')), 4,11 (m, 1H, H-C(3')), 3,83 (m, 1H, H-C(4')), 3,74 (s, 6H, OCH₃), 3,30 (m, 2 H, H₂-C(5'));

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ 163,05 (C (4)), 158,18 (C(ar)-DMTr), 150,48 (C (2)), 144,55 (C(ar)-DMTr), 141,85 (C (6)), 135,25, 135,15, 129,74, 127,94, 127,64, 126,88, 113,29 (C(ar)-DMTr), 100,54 (C(5)), 85,96 (tert. C-DMTr), 83,38 (C(1')), 78,09 (C(4')), 73,91 (C(2')), 64,82 (C(3')), 62,17 (C(5')), 55,07 (OCH₃);

MALDI-Tof *m/z* berechnet für C₃₀H₂₉N₅O₇+Na⁺: 594.20 [M+Na]⁺; gefunden: 594.25.

6.3.33 3'-Azido-3'-deoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-uridin (35)



M = 571,58 g/mol

Verbindung **34** (270 mg, 0,47 mmol) und DMAP (172 mg, 1,41 mmol, 3 Äq.) wurden 3-mal mit je 12 ml DCM coevaporiert und anschließend in 18 ml DCM gelöst. Die Reaktionslösung wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit Trifluormethansulfonylchlorid (76 µl, 0,71 mmol, 1,5 Äq.) versetzt. Nach 15 min wurde die Reaktionslösung mit 20 ml DCM verdünnt und mit 30 ml ges. NaHCO₃-Lsg. gewaschen. Die organische Phase wurde Natriumsulfat getrocknet und eingengt. Das Zwischenprodukt wurde in 20 ml wasserfreiem Toluol aufgenommen und mit Kaliumtrifluoracetat (358 mg, 2,35 mmol, 5 Äq.) sowie 18-Krone-6-Ether (248 mg, 0,94 Äq.) und DIPEA (121 µl, 0,7 mmol, 1,5 Äq.) versetzt. Die Reaktion lief für 2 h bei 60 °C unter einer Argonatmosphäre. Nach Abschluss der Reaktion wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde in 30 ml DCM gelöst und mit 30 ml ges. NaHCO₃-Lsg. wässrig aufgearbeitet, wobei die wässrige Phase 3-mal mit je 30 ml DCM extrahiert wurde. Die organischen Phasen wurden vereint, über Natriumsulfat getrocknet und eingengt. Es folgte eine säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 99:1 → 98:2), bei der das Produkt (195 mg, 0,34 mmol, 73%) als weißer Schaum isoliert werden konnte.

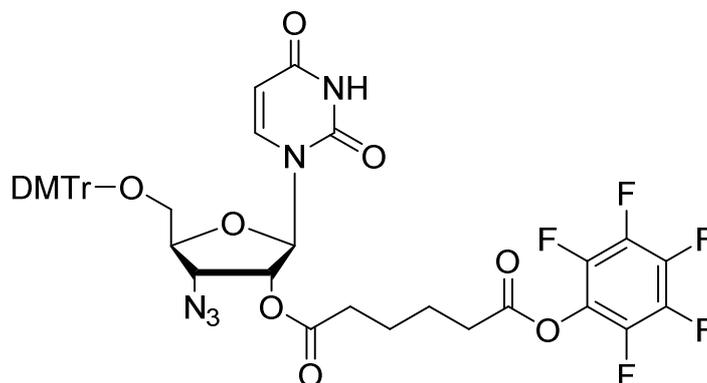
$R_f = 0,40$ (CH₂Cl₂/MeOH 95:5);

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 11,39 (s, 1H, H-N(3)), 7,69 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-C(6)), 7,23-7,41 (m, 9H, DMTr H-C(ar)), 6,91 (m, 4H, DMTr H-C(ar)), 6,26 (d, $J = 5,4$ Hz, 1H, 1H, HO-C(2')), 5,73 (d, $J = 4,1$ Hz, 1H, H-C(1')), 5,35 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-C(5)), 4,49 (m, 1H, H-C(2')), 4,17 (m, 1H, H-C(3')), 4,01 (m, 1H, H-C(4')), 3,74 (s, 6H, OCH₃), 3,23-3,31 (m, 2 H, H₂-C(5')),

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ 162,97 (C(4)), 158,18 (C(ar)-DMTr), 150,48 (C(2)), 144,54 (C(ar)-DMTr), 140,53 (C(6)), 135,20, 134,99, 129,77, 127,96, 127,67, 126,85, 113,31, 113,29 (C(ar)-DMTr), 101,61 (C(5)), 89,03 (C(1')), 86,12 (tert. C-DMTr), 79,70 (C(4')), 73,98 (C(2')), 62,68 (C(5')), 60,30 (C(3')), 55,06 (OCH₃);

MALD-Tof m/z berechnet für C₃₀H₂₉N₅O₇+Na⁺: 594.20 [$M+Na$]⁺; gefunden: 595.40.

6.3.34 3'-Azido-3'-deoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-O-[1,6-dioxo-6-(pentafluorophenoxy)hexyl]-uridin (5)



M = 865.75 g/mol

Verbindung **35** (190 mg, 0,33 mmol) und DMAP (41 mg, 0,33 mmol, 1 Äq.) wurden 2-mal mit je 10 ml trockenem DCM coevaporiert und in 6 ml wasserfreiem DMF/Pyridin (1:1, V/V) aufgenommen. Anschließend wurde der aktivierte Adipinsäure-Linker (1,61 mmol, 4,89 Äq) hinzugefügt. Die Reaktion lief daraufhin für einen Zeitraum von 3 h bei Raumtemperatur. Nach Abschluss der Reaktion wurden die Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und der ölige Rückstand 2-mal mit je 12 ml wasserfreiem Toluol coevaporiert. Das Rohprodukt wurde zügig mittels Säulenchromatographie aufgereinigt. Das Produkt (170 mg, 0,2 mmol, 54%) konnte als weiße, kristalline Substanz isoliert werden.

$R_f = 0,20$ (CH₂Cl₂/Aceton 96:4);

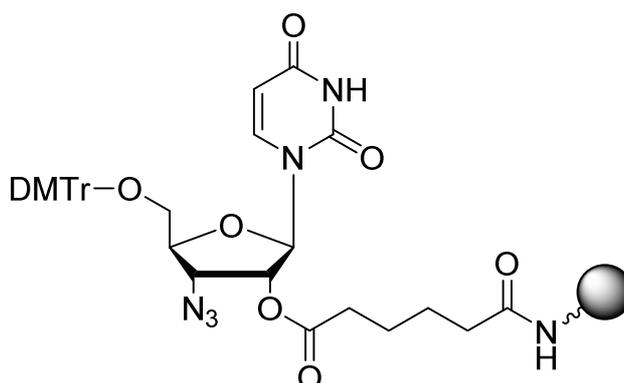
¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 11,44 (s, 1H, H-N(3)), 7,51 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-C(6)), 7,23-7,41 (m, 9H, DMTr H-C(ar)), 6,91 (m, 4H, DMTr H-C(ar)), 5,83 (d, $J = 3,2$ Hz, 1H, H-C(1')), 5,61 (dd, $J_1 = 3,2$ Hz, $J_2 = 5,8$ Hz, 1H, H-C(2')), 5,44 (d, $J = 8,1$, 1H, H-C(5)), 4,69 (dd, $J_1 = 5,9$ Hz, $J_2 = 7,8$ Hz, 1 H, H-C(3')), 3,96, (m, 1H, H-C(4')), 3,73 (2s, 6H, OCH₃), 3,26-3,31 (m, 2H, H₂-C(5')), 2,82 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H, CH₂), 1,69 (m, 4H, CH₂); 2,51 (m, 2H, CH₂),

¹³C NMR 150 MHz, DMSO-d₆) δ 171,68, 169,38 (C=O), 162,30 (C(4)), 158,18 (C(ar)-DMTr), 150,18 (C(2)), 144,46 C(ar)-DMTr, 140,90 (C(6)), 135,11, 134,97, 129,74, 127,92, 127,66, 126,84, 113,27 (C(ar)-DMTr), 101,78 (C(5)), 87,94 (C(1')), 86,10 (tert. C-DMTr), 80,06 (C(4')), 74,66 (C(2')), 61,90 (C(5')), 59,23 (C(3')), 55,04 (OCH₃), 32,63 (CH₂), 32,09 (CH₂), 23,47, 23,40 (CH₂);

¹⁹F NMR (565 MHz, DMSO-d₆) δ -153,56 (F-C(ar)), -158,09 (F-C(ar)), -162,63 (F-C(ar));

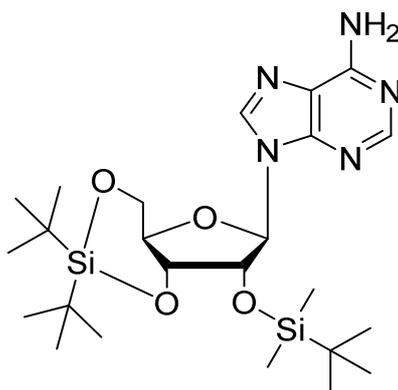
MALDI-Tof m/z berechnet für C₄₂H₃₆F₅N₅O₁₀+Na⁺: 888.23 [$M+Na$]⁺; gefunden: 888.59.

6.3.35 Immobilisierung des Nucleosids **5** an den Festphasenträger



Es wurden 70 mg (80 μmol) des Nucleosids **5** in 2 ml DMF gelöst und mit 13 μl Pyridin (0,16 mmol, 2 Äq.) versetzt. Im nächsten Schritt wurde der Amino-funktionalisierte CPG 500 Å Festphasenträger (480 mg, Kapazität 163 $\mu\text{mol/g}$) hinzugefügt. Die Reaktion lief über Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurde das Reaktionsgemisch filtriert und der Rückstand mit DCM gewaschen. Anschließend wurde der Träger in je 3 ml Capping-Reagenz A (0,5 M DMAP in MeCN) und Capping-Reagenz B (Essigsäureanhydrid/syn-Collidin/MeCN; 2/3/5) aufgenommen. Nach 20 min wurde das Reaktionsgemisch erneut filtriert und der Rückstand abwechselnd mit Methanol und DCM gewaschen. Im nächsten Schritt wurde das gereinigte Trägermaterial (295 mg) unter Vakuum getrocknet, bevor die Beladungsdichte bestimmt wurde. Hierfür wurden 0,98 mg des Trägers in 1 ml Detritylierungsreagenz (3% TFA in Dichlorethan) aufgenommen. Die dabei erhaltene Stammlösung wurde zentrifugiert und 1:10 verdünnt. Für die anschließenden photometrischen Messungen bei 503 nm wurde die Lösung in der Küvette erneut 1:5 verdünnt. Die Messung wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Beladungsdichte wurde wie im Abschnitt 6.3.22 erläutert berechnet und ergab einen Wert von 51 $\mu\text{mol/g}$

6.3.36 2'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-3',5'-O-(di-*tert*-butylsilyl)-adenosin (43)



M = 521.8 g/mol

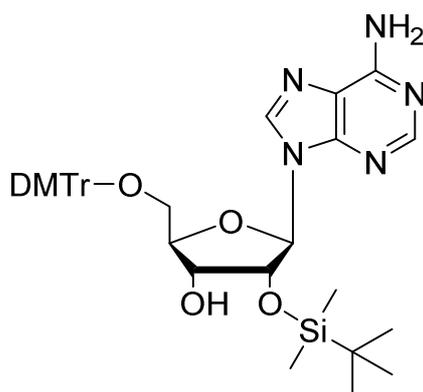
Adenosin (802 mg, 3 mmol) wurde 3-mal mit je 12 ml trockenem DCM coevaporiert und in 15 ml wasserfreiem DMF aufgenommen. Die Suspension wurde auf 0 °C gekühlt und Di-*tert*-butylsilyl-ditriflat (1,17 ml, 3,6 mmol, 1,2 Äq.) wurde tropfenweise hinzugefügt. Die Reaktion lief für 1,5 h bei 0 °C. Anschließend wurden Imidazol (1,021 g, 15 mmol, 5 Äq.), sowie *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (679 mg, 4,5 mmol, 1,5 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml Methanol beendet. Die Lösungsmittel wurden unter Vakuum entfernt und der dabei erhaltene Rückstand wurde in 20 ml DCM aufgenommen. Es folgte eine wässrige Ausarbeitung mit ges. NaHCO₃-Lsg. bei der die wässrige Phase 3-Mal mit je 30 ml DCM extrahiert wurde. Die organischen Phasen wurden vereint, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (DCM/MeOH 98/2 → 97/3). Das Produkt (1,46 g, 2,8 mmol, 93%) konnte als weiße kristalline Substanz isoliert werden.

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8,33 (s, 1H, H-C(8)), 8,12 (s, 1H, H-C(2)), 7,33 (s, 2H, NH₂-C(6)), 5,95 (s, 1H, H-C(1')), 4,74 (m, 1H, H-C(3')), 4,46 (d, *J* = 5,4 Hz, 1H (H-C(2')), 4,36 (dd, *J*₁ = 11,4 Hz, *J*₂ = 15,5 Hz, 1H, H(b)-C(5')), 3,99 (m, 2H, H-C(4'), H(a)-C(5')), 1,01 (s, 9H, Si-C(CH₃)₃); 1,07 (s, 9H, Si-C(CH₃)₃), 0,86 (s, 9H, Si-C(CH₃)₃), 0,09 (s, 3H, Si-CH₃), 0,07 (s, 3H, Si-CH₃),

¹³C NMR (600 MHz, DMSO) δ 156,13 (C6)), 152,72 (C2)), 148,78 (C4)), 139,76 (C8)), 119,09 (C5)), 91,02 (C1')), 75,21 (C3')), 74,81 (C(2')), 74,08 (C(4')), 67,03 (C(5')), 27,82 (CH₃, Si-C(CH₃)₃), 26,82 (CH₃, Si-C(CH₃)₃), 25,69 (CH₃, Si-C(CH₃)₃), 22,21 (tert. C, Si-C(CH₃)₃), 19,96 (tert. C, Si-C(CH₃)₃), 18,05 (tert. C, Si-C(CH₃)₃), -4,32 (Si-CH₃), -5,00 (Si-CH₃);

MALDI-ToF m/z berechnet für C₂₄H₄₃N₅O₄Si₂+H⁺: 522,29 [M+H]⁺; gefunden: 522,39.

6.3.37 2'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-adenosin (**44**)



M= 683.87 g/mol

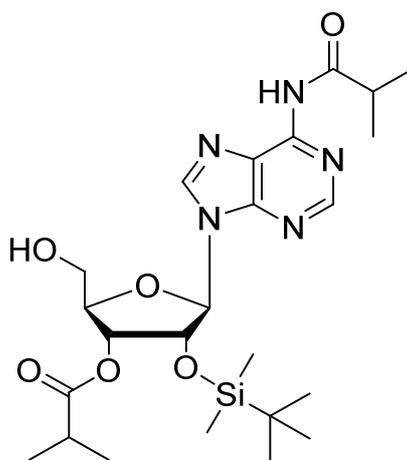
Verbindung **43** (1,6 g, 3,06 mmol) wurde 3-mal mit je 16 ml trockenem DCM coevaporiert und in 22 ml wasserfreiem DCM gelöst. Es wurden trockenes Pyridin (2,2 ml), sowie HF·Pyridin (70%, 220 µl, 12,03 mmol, 3,92 Äq.) hinzugefügt. Nach 2 h wurde die Reaktion durch Zugabe von 30 ml ges. NaHCO₃-Lsg beendet. Die Phasen wurden in einem Scheidetrichter getrennt, woraufhin die wässrige Phase 2-mal mit je 30 ml DCM extrahiert wurde. Die organischen Phasen wurden vereint, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Im nächsten Schritt wurde das Zwischenprodukt 3-mal mit je 12 ml trockenem Pyridin coevaporiert und in 12 ml wasserfreiem Pyridin aufgenommen. DMT-Cl (1,35 g, 4 mmol, 1,3 Äq) wurde hinzugefügt. Die Reaktion lief über Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurde die Reaktion durch Zugabe von 12 ml MeOH beendet. Die Lösungsmittel wurden unter Vakuum entfernt und der ölige Rückstand wurde in 20 ml DCM aufgenommen. Es folgte eine wässrige Aufarbeitung mit 30 ml ges. NaHCO₃-Lsg, wobei die wässrige Phase 3-mal mit je 20 ml DCM extrahiert wurde. Die organischen Phasen wurden vereint, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (DCM/MeOH 99/1 → 95/5). Das Produkt (462 mg, 0,67 mmol, 48%) konnte als weiße kristalline Substanz isoliert werden.

¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8,25 (s, 1H, H-C(8)), 8,07 (s, 1H, H-C(2)), 7,17-7,41 (s, 11H, NH₂-C(6), H-C(ar) DMT), 6,84 (m, 4H, H-C(ar) DMT), 5,94 (d, J = 5,1 Hz, 1H, H-C(1')), 5,11 (d, J = 5,9 Hz, 1H, OH-(C3')), 4,85 (t, J = 5,1 Hz, 1H, H-C(2')), 4,24 (m (H-C3')), 4,09 (dd, J₁ = 4,6 Hz, J₂ = 8,7 Hz, 1H, H(C(4')), 3,73 (s, 3H, DMT-OCH₃), 3,21-3,30 (m, 2H, H₂-C(5')), 0,75 (s, 9H, Si-C(CH₃)₃), -0,14 (s, 3H, Si-CH₃); -0,05 (s, 3H, Si-CH₃);

^{13}C NMR (600 MHz, DMSO) δ 158,05 (C(ar)-DMT), 156,1 (C6)), 152,61 (C2)), 149,28 (C4)), 144,89 (C(ar)-DMT), 139,49 (C8)), 135,53, 135,43, 129,73, 127,78, 127,67, 126,65, (C(ar)-DMT), 119,18 (C5)), 113,13 (C(ar)-DMT), 87,82 (C1')), 85,51 (tert. C-DMT), 83,35 (C(4')), 74,85 (C(2')), 70,25 (C3'), 63,44 (C(5')), 55,02 (DMT-OCH₃), 25,57 (CH₃, Si-C(CH₃)₃), 17,84 (tert. C, Si-C(CH₃)₃), -4,86 (Si-CH₃), -5,28 (Si-(CH₃));

MALDI-Tof m/z berechnet für C₃₇H₄₅N₅O₆Si+H⁺: 684,31 [M+H]⁺; gefunden: 684,20.

6.3.38 2'-O-(tert-Butyldimethylsilyl)-3'-O-6-N-(diisobutyryl)-adenosin (45)



M= 521.86 g/mol

Verbindung **44** (405 mg, 0,68 mmol) wurde 3-mal mit je 12 ml trockenem DCM coevaporiert und in 14 ml wasserfreiem Pyridin gelöst. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit Isobutyrylchlorid (175 μ l, 1,65 mmol, 2,5 Äq) versetzt. Die Reaktion lief über Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml Methanol beendet. Die Lösungsmittel wurden unter Vakuum entfernt und der dabei erhaltene ölige Rückstand wurde in 20 ml DCM gelöst. Das Rohprodukt wurde mit 30 ml ges. NaHCO₃-Lsg. wässrig aufgearbeitet, wobei die wässrige Phase 3-mal mit je 20 ml DCM extrahiert wurde. Die organischen Phasen wurden vereint, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt.

Das Zwischenprodukt wurde in 20 ml DCM mit 2% Trifluoressigsäure aufgenommen. Nach 15 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 ml ges. NaHCO₃-Lsg. beendet. Die Phasen wurden in einem Scheidetrichter voneinander getrennt, wobei die wässrige Phase 2-mal mit je 20 ml DCM extrahiert wurde. Die organischen Phasen wurden vereint, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Im nächsten Schritt folgte eine säulenchromatographische Aufreinigung

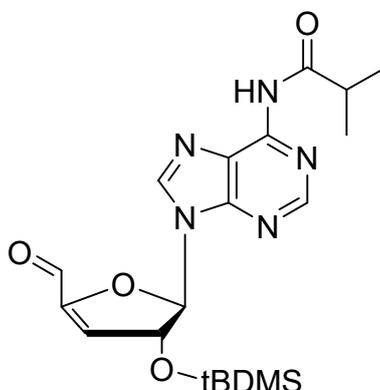
(DCM/MeOH 99/1 → 98/2). Das Produkt (175 mg, 0,34 mmol, 51%) konnte als weißer kristalliner Schaum isoliert werden.

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO) δ 10,71 (s, 1H, NH), 8,76 (s, 1H, H-(C8)), 8,68 (s, 1H, H-C(2)), 6,05 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H, H-C(1')), 5,43 (dd, $J_1 = 5,2$ Hz, $J_2 = 6,5$, 1H, HO-(C5')), 5,39 (dd, $J_1 = 1,5$ Hz, $J_2 = 5,0$ Hz, 1H, H-C(3')), 5,08 (dd, $J_1 = 5,0$ Hz, $J_2 = 7,1$ Hz, (H-C2')), 4,18 (m, 1H, H(C4')), 3,73 (s, 3H, DMT-OCH₃), 3,64-3,74 (m, 2H, H₂-C(5')), 2,96 (d sept, $J_1 = 6,9$, $J_2 = 10,1$ Hz, CH(CH₃)₂), 2,66 (sept $J = 6,9$ Hz, 1H, CH(CH₃)₂), 1,18 (dd, $J_1 = 6,9$, $J_2 = 10,1$ Hz, CH(CH₃)₂), 1,13 (d $J = 6,9$ Hz, 6H, CH(CH₃)₂), 0,62 (s, 9H, Si-C(CH₃)₃), -0,16 (s, 3H, Si-CH₃), -0,38 (s, 3H, Si-CH₃);

$^{13}\text{C NMR}$ (600 MHz, DMSO) δ 175,31, 174,94 (C=O), 152,87 (C2), 151,75 (C4), 150,14 (C6), 142,61 (C8), 124,02 (C5), 87,17 (C1'), 83,82 (C4'), 73,56 (C2'), 72,79 (C3'), 61,29 (C5'), 34,38 (ibu-CH), 33,28 (ibu-CH), 25,17 (CH₃, Si-C(CH₃)₃), 18,83 (ibu-(CH₃)₂), 18,68 (ibu-(CH₃)₂), 17,42 (tert. C, Si-C(CH₃)₃), -5,42 (Si-CH₃), -5,86 (Si-(CH₃));

MALDI-Tof m/z berechnet für C₂₄H₃₉N₅O₆Si+H⁺: 522,27 [M+H]⁺; gefunden: 522,24.

6.3.39 Moffatt-Oxidation an Verbindung 45



Verbindung **45** (420 mg, 0,8 mmol) wurde 2-mal mit je 12 ml wasserfreiem DCM coevaporiert. Anschließend wurde das Nukleosid zusammen mit Dicyclohexylcarbodiimid (907 mg, 4,39 mmol, 5,43 Äq.) in 12 ml wasserfreiem DMSO aufgenommen und mit Pyridin (180 μl , 2,25 mmol, 1,8 Äq.) versetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Trifluoressigsäure (56 μl , 0,73 mmol, 0,9 Äq.) gestartet. Im Laufe der Reaktion bildete sich ein weißer Niederschlag und das Reaktionsgemisch färbte sich gelblich. Nach 24 h wurde das Reaktionsgemisch mit 20 ml EtOAc verdünnt und der Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat wurde mit 30 ml H₂O gewaschen.

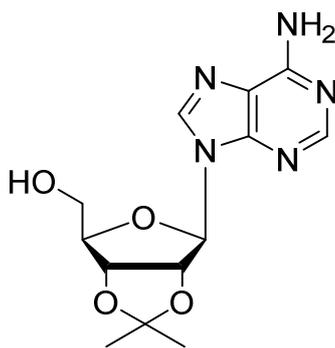
Die beiden Phasen wurden im Scheidetrichter voneinander getrennt und die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH 98/2) aufgereinigt. Nachfolgende Analysen ergaben, dass anstelle der gewünschten Verbindung **44** das oben abgebildete Nucleosid gebildet wurde.

^1H NMR (600 MHz, DMSO) δ 10,73 ((s, 1H, NH), 9,59 (s, 1H, C(5')-Aldehyd-H), 8,67 (s, 2H, H-C(2)/H-(C7)), 6,70 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H, H-C(3')), 6,57 (d, $J = 3,6$ Hz, 1H, H-C(1')), 5,87 (dd, $J_1 = 2,8$ Hz, $J_2 = 3,6$ Hz, (H-C2')), 2,95 (sept, $J = 6,8$ Hz, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,13 (d, $J = 6,8$ Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0,84 (s, 9H, $\text{Si-C}(\text{CH}_3)_3$), 0,03 (2s, 6H, Si-CH_3).

6.3.40 Dess-Martin-Oxidation an Verbindung 45

Verbindung **43** (235 mg, 0,45 mmol) wurde 2-mal mit je 12 ml wasserfreiem DCM coevaporiert. Anschließend wurde das Nucleosid in 18 ml wasserfreiem DCM aufgenommen und mit Pyridin (180 μl , 2,25 mmol, 5 Äq.) versetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Dess-Martin-Periodinan (382 mg, 0,9 mmol, 2 Äq.) gestartet. Im Laufe der Reaktion trat eine Trübung und leichte Gelbfärbung des Reaktionsgemischs ein. Nach 2 h wurde die Reaktionslösung in 20 ml ges. NaHCO_3 -Lsg. überführt. Die wässrige Phase wurde 3-mal mit je 230 ml DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint und mit 20 ml ges. NaCl -Lsg. gewaschen. Anschließend wurde die org. Phase über Na_2SO_4 getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH 99/1 \rightarrow 98/2) aufgereinigt. Nachfolgende Analysen ergaben, dass auch bei dieser Reaktion die Verbindung aus Abschnitt 6.3.39 anstelle des gewünschten Produkts gebildet wurde.

6.3.41 2',3'-Isopropyliden-adenosin (50)



M = 307,31 g/mol

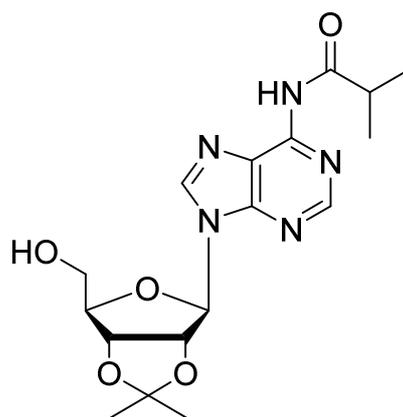
Adenosin (535 mg, 2 mmol) wurde 2-mal mit je 12 ml wasserfreiem DCM coevaporiert und in 15 ml trockenem Aceton aufgenommen. Anschließend wurden 2,2-Dimethoxypropan (980 μ l, 4 mmol, 2 Äq.) und p-Toluolsulfonsäure (304 mg, 0,8 mmol, 0,4 Äq.) hinzugefügt. Die Suspension wurde daraufhin auf 50 °C erwärmt. Nach 3 h wurde die Reaktion beendet. Die Reaktionslösung wurde mit 200 mg NaHCO₃ versetzt und filtriert. Das Filtrat wurde unter Vakuum bis zur Trockne eingeeengt, woraufhin der erhaltene Rückstand in 30 ml DCM aufgenommen und in einen Scheidetrichter mit 30 ml ges. NaHCO₃-Lsg. überführt wurde. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde 2 weitere Male mit je 30 ml DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Das Produkt (457 mg, 1,48 mmol, 74%) konnte ohne zusätzliche Aufreinigungsschritte für die nächste Reaktion verwendet werden.

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,34 (s, 1H, H-C(8)), 8,15 (s, 1H, H-C(2)), 7,34 (s, 2H, NH₂), 6,12 (d, $J = 3,1$ Hz, 1H, H-C(1')), 5,34 (dd, $J_1 = 3,1$ Hz, $J_2 = 6,1$ Hz, 1H, H-(C2')), 5,23 (t, $J = 5,8$ Hz, 1H, HO-C(5')), 4,96 (dd, $J_1 = 2,5$ Hz, $J_2 = 6,1$ Hz, 1H, H-(C3')), 4,21 (m, 1H, H-(C4')), 3,54 (m, 2H, H₂-(C5')), 1,54 (s, 3H, CH₃), 1,32 (s, 3H, CH₃);

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 156,12 (C(6)), 152,61 (C(2)), 148,79 (C(4)), 139,66 (C(8)), 119,08 (C(5)), 113,01 (Isopropylidin-C), 89,58 (C(1')), 86,32 (C(4')), 83,19 (C(2')), 81,33 (C(3')), 61,56 (C(5')), 27,05 (CH₃), 25,17 (CH₃);

MALDI-Tof m/z berechnet für C₁₃H₁₇N₅O₄+H⁺: 308,15 [M+H]⁺; gefunden: 308,49.

6.3.42 2',3'-Isopropyliden-6-*N*-isobutyryl-adenosin (51)



M = 377,40 g/mol

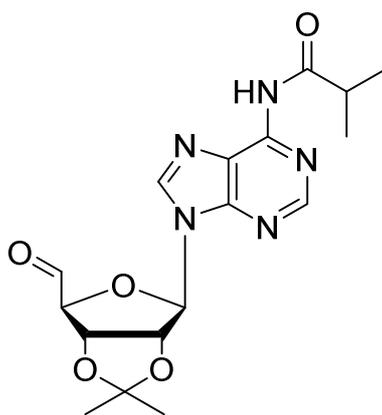
Verbindung **48** (820 mg, 2,6 mmol) wurde 2-mal mit je 12 ml wasserfreiem DCM coevaporiert und in 21 ml trockenem Pyridin gelöst. TMS-Cl (1,02 ml, 7,8 mmol, 3 Äq.) wurde bei 0 °C hinzuge tropft. Nach 30 min wurde Isobutyrylchlorid (410 µl, 3,9 mmol, 1,5 Äq.) ebenfalls bei 0 °C hinzugefügt. Die Reaktion lief bei Raumtemperatur über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Reaktionslösung erneut auf 0 °C gekühlt und mit je 4,5 ml H₂O und konz. NH₃-Lsg. versetzt. Nach 1h wurden die Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und der ölige Rückstand 2-mal mit je 12 ml Toluol coevaporiert. Das Rohprodukt wurde in 30 ml DCM aufgenommen und mit 30 ml ges. NaHCO₃-Lsg. versetzt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde 2 weitere Male mit je 30 ml DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Anschließend erfolgte eine säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 99:1 → 95:5). Das Produkt (797 mg, 2,11, 81%) konnte als weißer Schaum isoliert werden.

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,66 (s, 1H, NH), 8,67 (s, 1H, H-C(8)), 8,64 (s, 1H, (H-C(2))), 6,24 (d, *J* = 2,7 Hz, 1H, H-C(1')), 5,41 (dd, *J*₁ = 2,7 Hz, *J*₂ = 6,1 Hz, 1H, H-C(2')), 5,12 (t, *J* = 5,3 Hz, 1H, HO-C(5')), 4,99 (dd, *J*₁ = 2,4 Hz, *J*₂ = 6,1 Hz, 1H, H-C(3')), 4,26 (m, 1H, H-C(4')), 3,54 (m, 2H, H₂-C(5')), 2,96 (sept, *J* = 6,8 Hz, 1H, CH(CH₃)₂), 1,55 (s, 3H, CH₃), 1,34 (s, 3H, CH₃), 1,13 (d, *J* = 6,8 Hz, 6H, CH(CH₃)₂);

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 175,30 (C=O), 151,72 (C(2)), 151,41 (C(4)), 149,87 (C(6)), 142,71 (C(8)), 124,05 (C(5)), 113,03 (Isopropylidin-C), 89,78 (C(1')), 86,84 (C(4')), 83,47 (C(2')), 81,36 (C(3')), 61,45 (C(5')), 34,33 (ibu-CH), 27,00 (CH₃), 25,15 (CH₃), 19,22 (ibu-(CH₃)₂);

MALDI-Tof *m/z* berechnet für C₁₇H₂₃N₅O₅+H⁺: 378,18 [M+H]⁺; gefunden: 378,34.

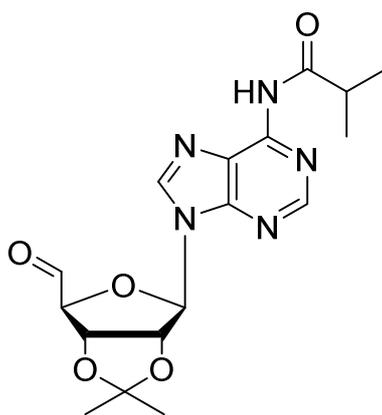
6.3.43 Dess-Martin-Oxidation an Verbindung 51



M = 375,39 g/mol

Verbindung **51** (377 mg, 1 mmol) wurde 2-mal mit je 12 ml wasserfreiem DCM coevaporiert. Anschließend wurde das Nucleosid in 18 ml wasserfreiem DCM aufgenommen und mit Pyridin (400 μ l, 5 mmol, 5 Äq.) versetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Dess-Martin-Periodinan (850 mg, 2 mmol, 2 Äq.) gestartet. Im Laufe der Reaktion trat eine Trübung und leichte Gelbfärbung des Reaktionsgemischs ein. Nach 2 h wurde die Reaktionslösung in 20 ml ges. NaHCO₃-Lsg. überführt. Die wässrige Phase wurde 3-mal mit je 230 ml DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint und mit 20 ml ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Anschließend wurde die org. Phase über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH 99/1 \rightarrow 98/2) aufgereinigt. Es war nicht möglich, das gewünschte Produkt **52** zu isolieren.

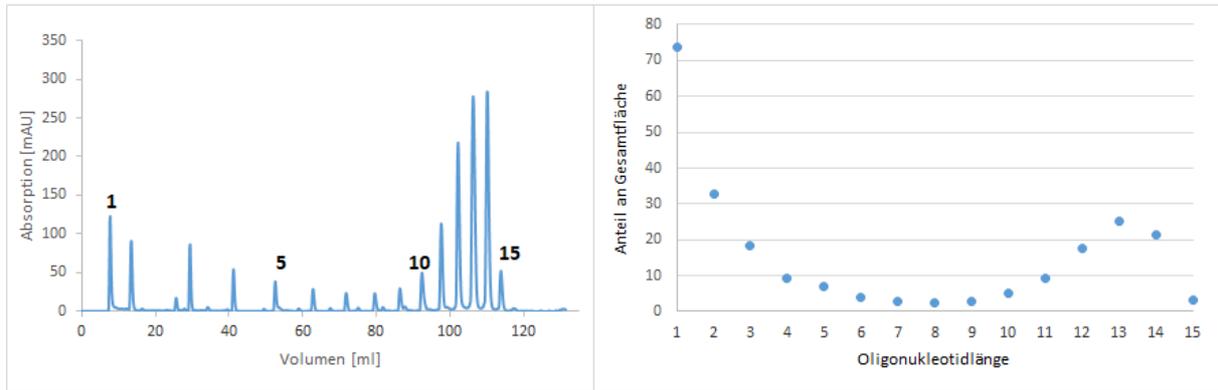
6.3.44 Swern-Oxidation an Verbindung 51



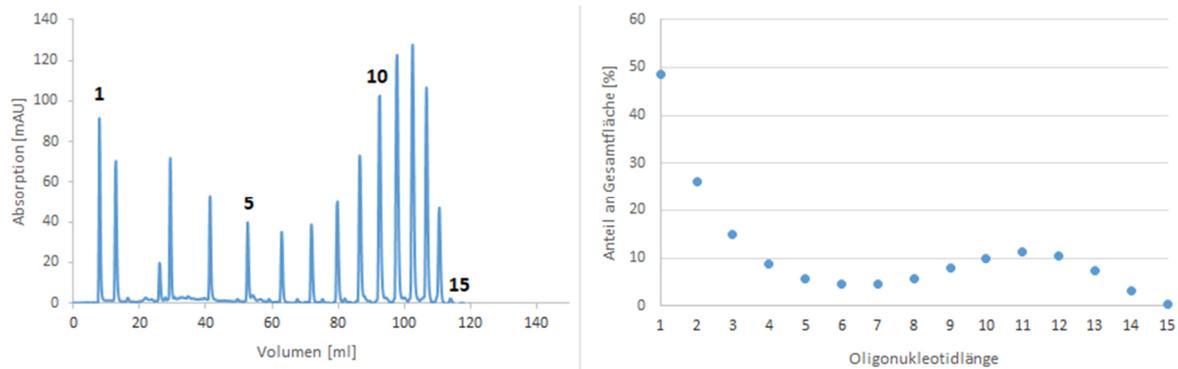
M = 375,39 g/mol

Das Nucleosid **51** (330 mg, 0,87 mmol) wurde 3-mal mit je 12 ml wasserfreiem DCM coevaporiert und in 3 ml trockenem DCM gelöst. Oxalylchlorid (373 μ l, 4,35 mmol, 5 Äq.) wurde in 1 ml trockenem DCM gelöst und auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. DMSO (620 μ l, 8,7 mmol, 10 Äq.) wurde in 3 ml DCM aufgenommen und langsam zu der Oxalylchlorid-Lösung hinzuge tropft. Nach 15 min wurde das gelöste Nucleosid langsam zur Reaktionslösung getropft. Nach weiteren 30 min wurde DIPEA (2,27 ml, 13,05 mmol, 15 Äq.) hinzugefügt. Nach 30 min wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit 20 DCM verdünnt und in 30 ml ges. NaHCO_3 -Lsg. überführt. Die wässrige Phase wurde 3-mal mit je 230 ml DCM extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint über Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (DCM/MeOH 99/1 \rightarrow 98/2) aufgereinigt. Es war nicht möglich, das gewünschte Produkt **52** zu isolieren.

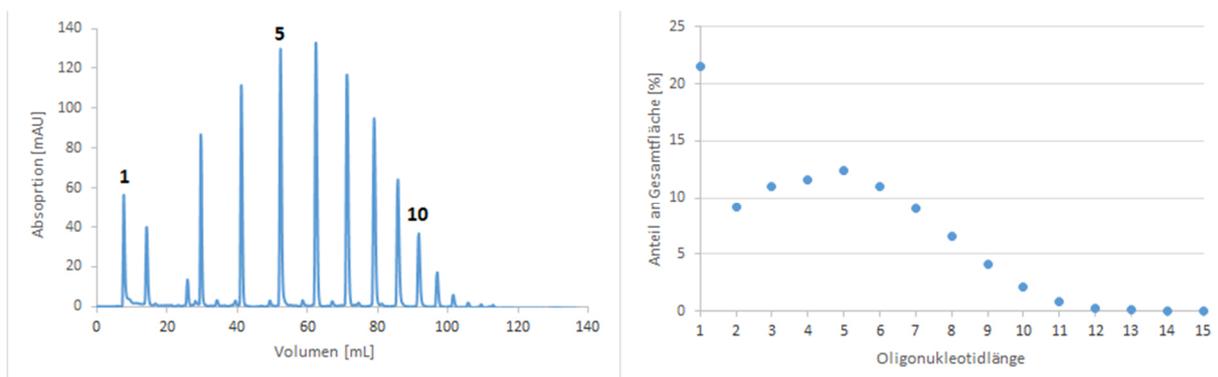
7 Anhang



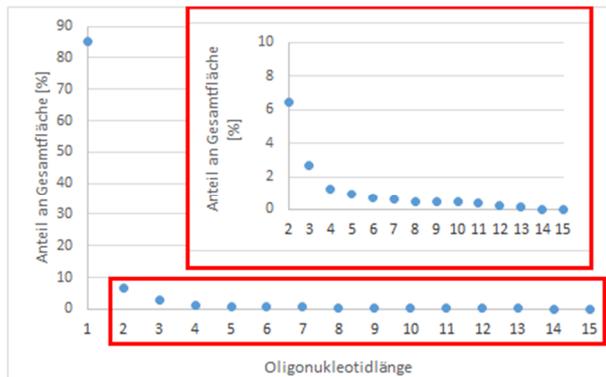
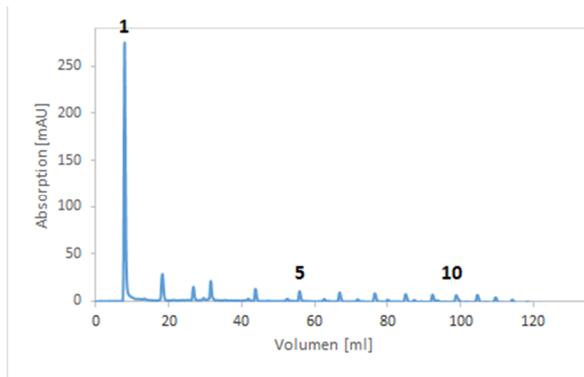
Anhang 1: IE-HPLC Chromatogramm und Peakflächenverteilung der Oligomere für Synthese **B**. Phosphoramiditkonzentration: 0,05 M; Träger: CPG 1000 Å; HPLC-Gradient 3 (siehe Abschnitt (6.2.11)), Absorptionsmessung bei 260 nm.



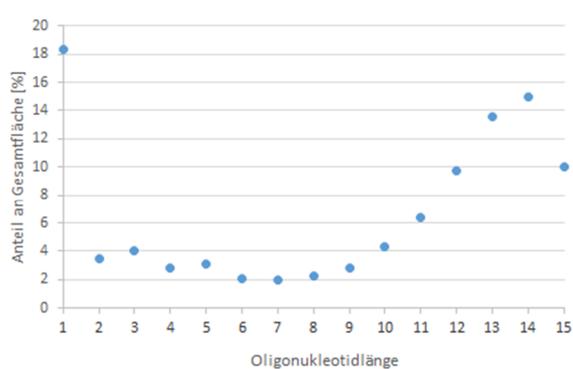
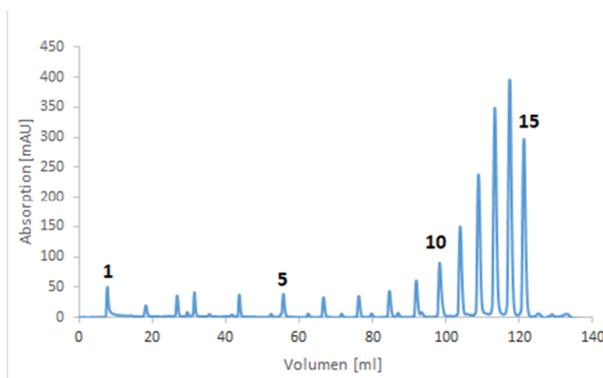
Anhang 2: IE-HPLC Chromatogramm und Peakflächenverteilung der Oligomere für Synthese **C**. Phosphoramiditkonzentration: 0,025 M; Träger: CPG 1000 Å; HPLC-Gradient 3 (siehe Abschnitt (6.2.11)), Absorptionsmessung bei 260 nm.



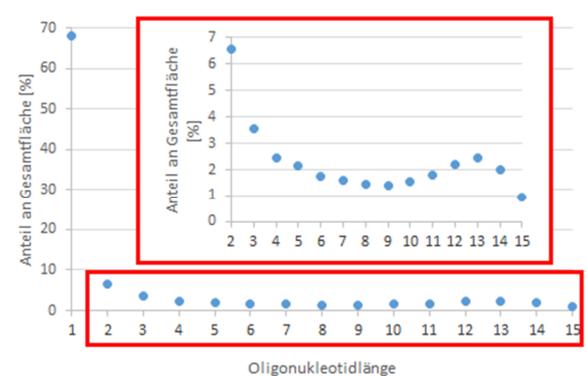
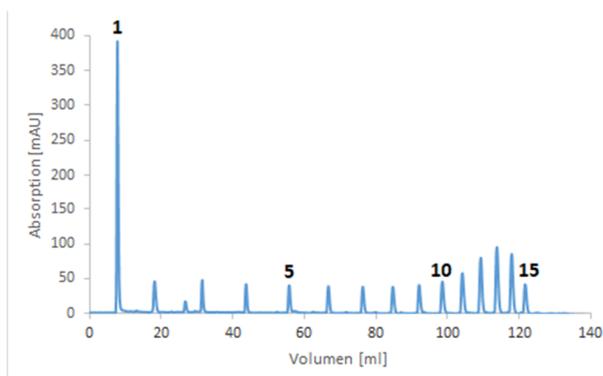
Anhang 3: IE-HPLC Chromatogramm und Peakflächenverteilung der Oligomere für Synthese **D**. Phosphoramiditkonzentration: 0,025 M; Träger: CPG 500 Å; HPLC-Gradient 3 (siehe Abschnitt (6.2.11)), Absorptionsmessung bei 260 nm.



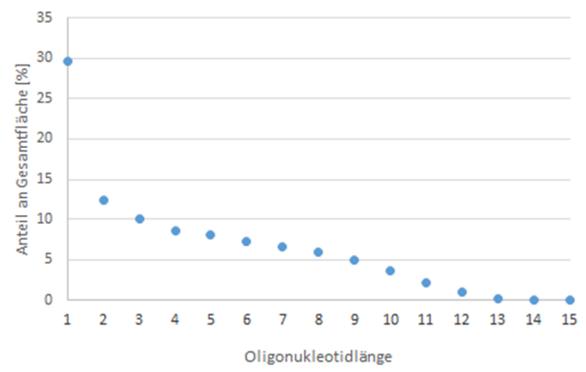
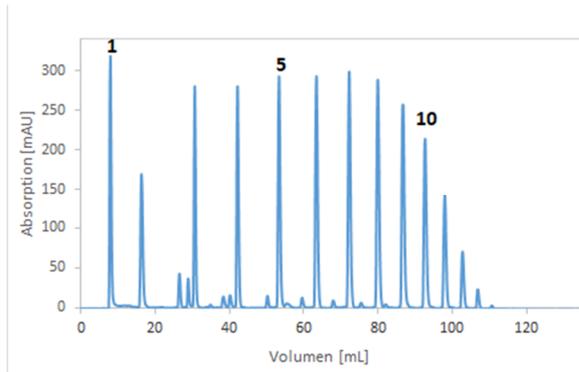
Anhang 4: IE-HPLC Chromatogramm und Peakflächenverteilung der Oligomere für Synthese **E**. Phosphoramiditkonzentration: 0,025 M; Träger: TentaGel; HPLC-Gradient 3 (siehe Abschnitt (6.2.11)), Absorptionsmessung bei 260 nm.



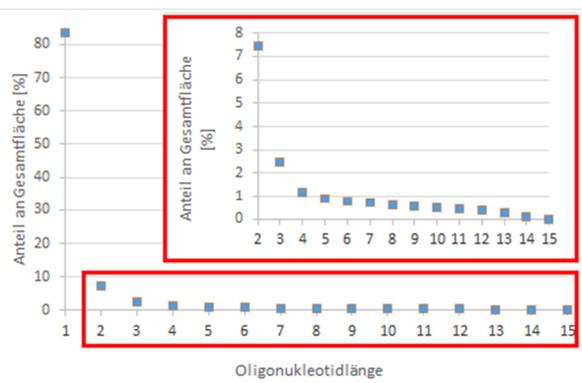
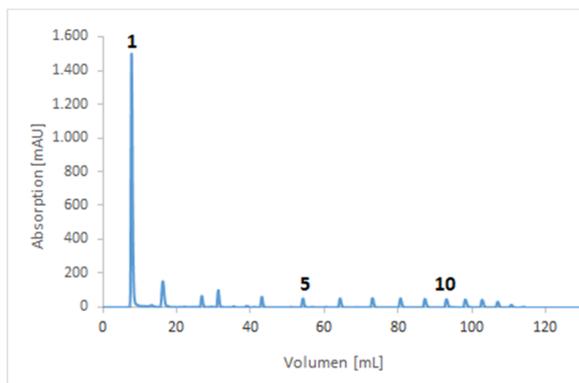
Anhang 5: IE-HPLC Chromatogramm und Peakflächenverteilung der Oligomere für Synthese **F**. Phosphoramiditkonzentration: 0,03 M; Träger: CPG 500 Å; HPLC-Gradient 3 (siehe Abschnitt (6.2.11)), Absorptionsmessung bei 260 nm.



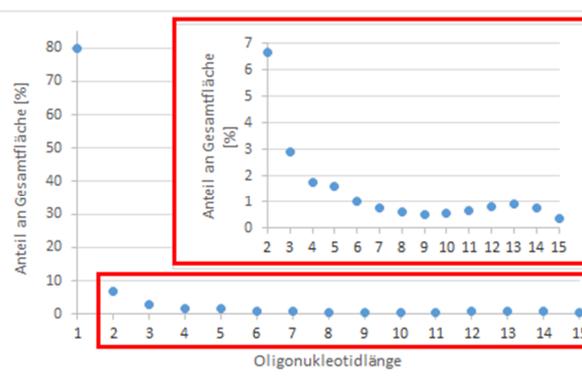
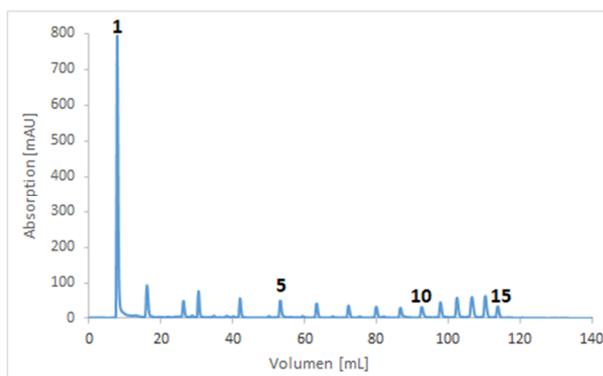
Anhang 6: IE-HPLC Chromatogramm und Peakflächenverteilung der Oligomere für Synthese **G**. Phosphoramiditkonzentration: 0,03 M; Träger: TentaGel; HPLC-Gradient 3 (siehe Abschnitt (6.2.11)), Absorptionsmessung bei 260 nm.



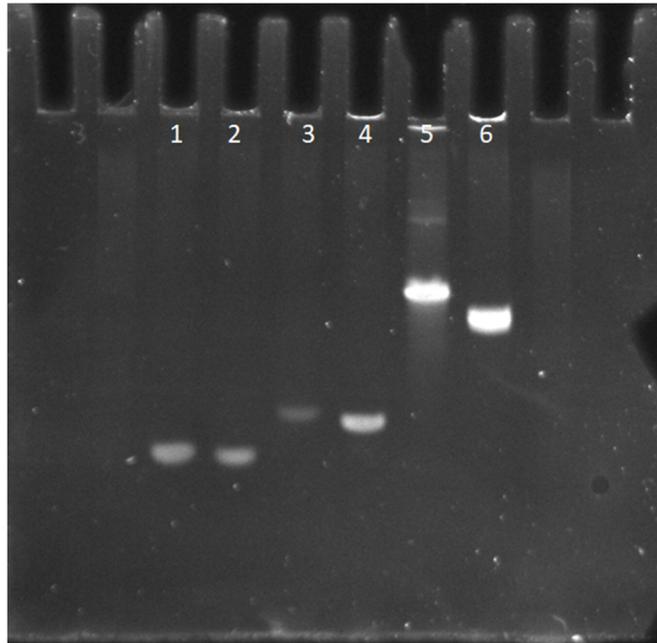
Anhang 7: IE-HPLC Chromatogramm und Peakflächenverteilung der Oligomere für Synthese H. Phosphoramiditkonzentration: 0,03 M; Träger: CPG 500 Å (selbst beladen); HPLC-Gradient 3 (siehe Abschnitt (6.2.11), Absorptionsmessung bei 260 nm.



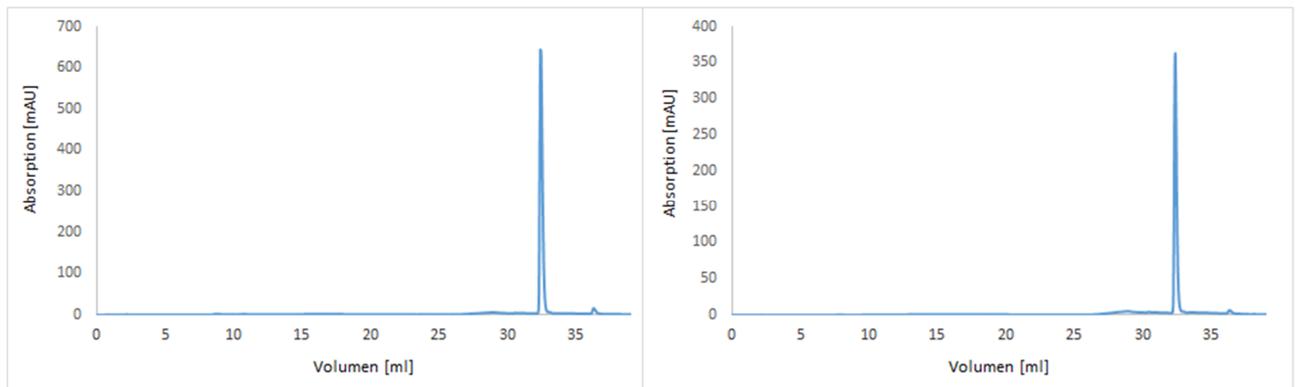
Anhang 8: IE-HPLC Chromatogramm und Peakflächenverteilung der Oligomere für Synthese I. Phosphoramiditkonzentration: 0,03 M; Träger: TentaGel (selbst beladen); HPLC-Gradient 3 (siehe Abschnitt (6.2.11), Absorptionsmessung bei 260 nm.



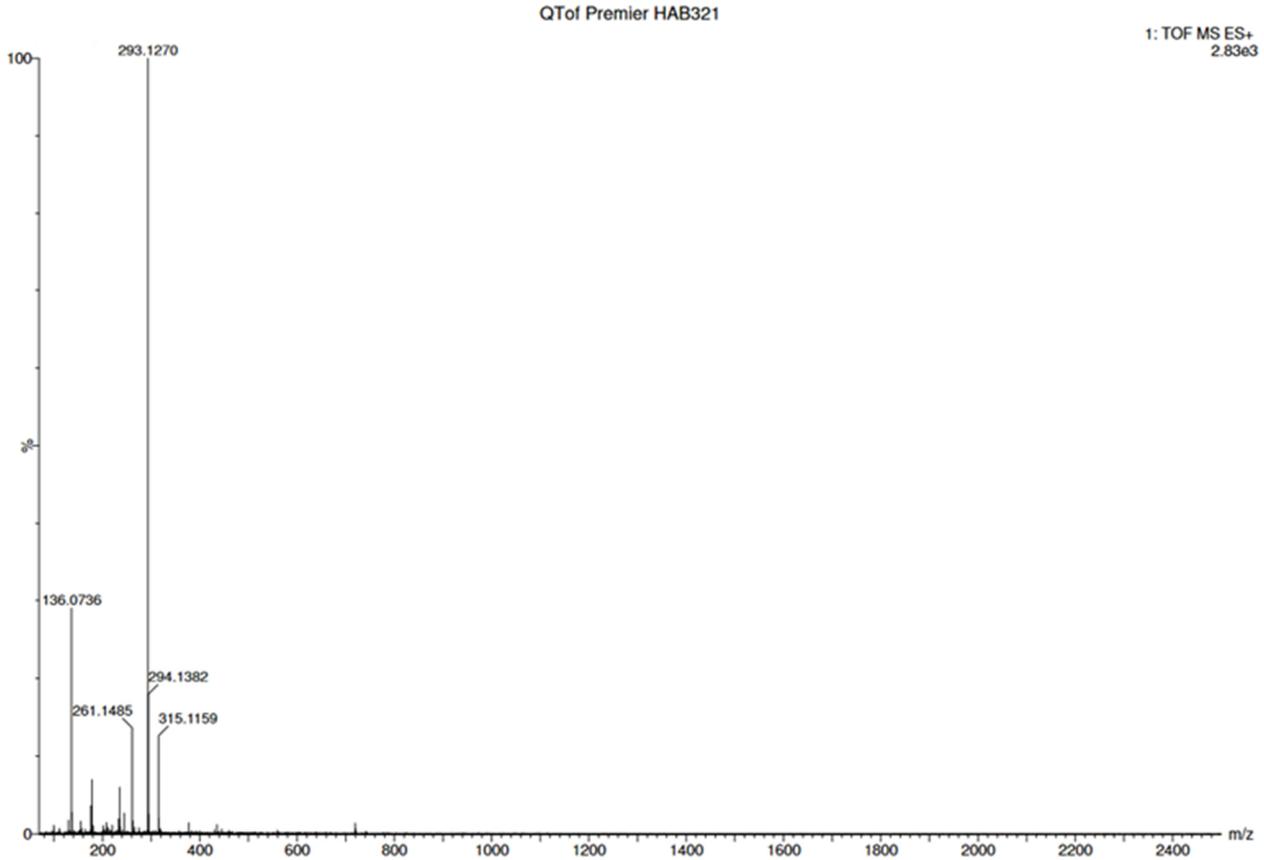
Anhang 9: IE-HPLC Chromatogramm und Peakflächenverteilung der Oligomere für Synthese J. Phosphoramiditkonzentration: 0,04 M; Träger: TentaGel (selbst beladen); HPLC-Gradient 3 (siehe Abschnitt (6.2.11), Absorptionsmessung bei 260 nm.



Anhang 10: Analytisches Gelbild der ODNs 1-3; 20 % PAA, denaturierend; 1: Referenzsequenz 7-mer; 2: ODN 1; 3: Referenzsequenz 11-mer; 4: ODN 2; 5: Referenzsequenz 26-mer; 6: ODN 3.



Anhang 11: RP-HPLC Chromatogramme der 3'-AzA-Referenz vor (links) und nach der Inkubation (rechts). HPLC-Gradient 1 (siehe Abschnitt 6.2.11), Absorptionsmessung bei 260 nm.



Anhang 12: ESI-MS Analyse des 3'-AzA-Peaks.

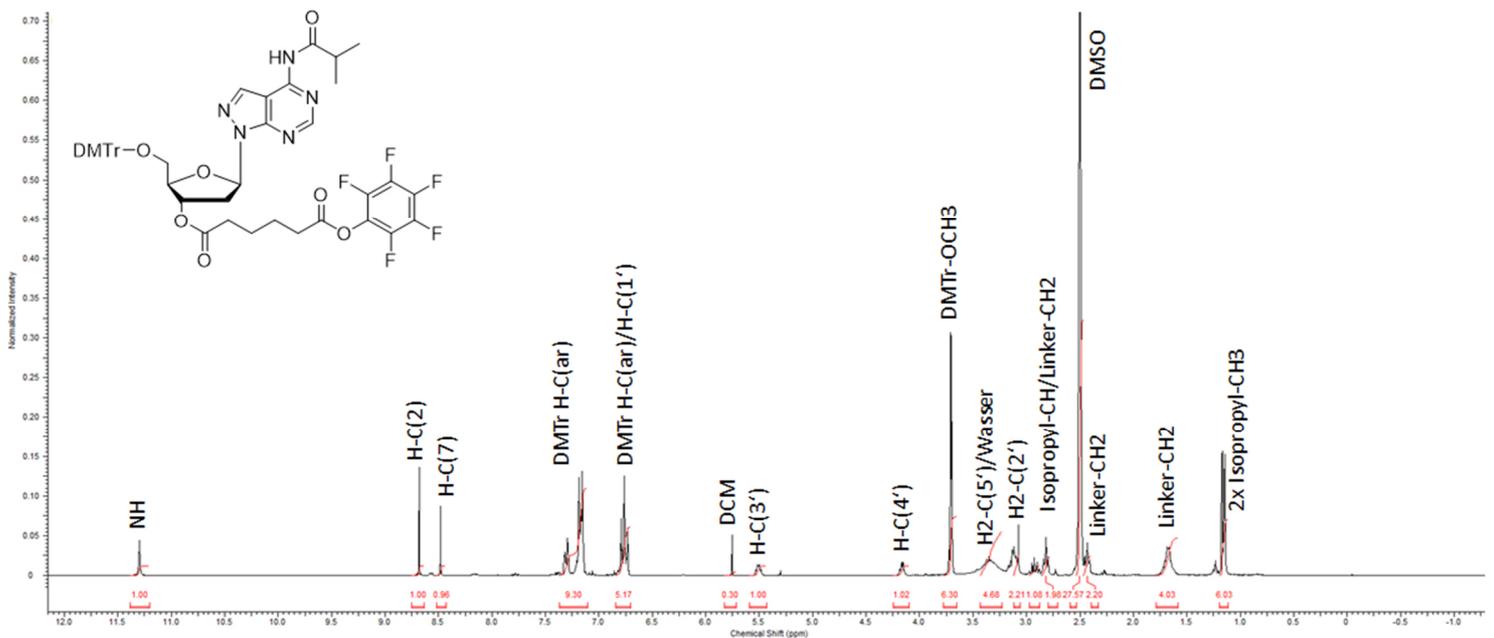
	Peak dC (Fläche)	Peak dC (normiert)	Peak 3'-AzA (Fläche)	Verhältnis Peak dC / Peak 3'-AzA
ODN 8	17,136	4,284	7,001	0,611
ODN 8	19,866	4,967	8,356	0,594
ODN 8	19,308	4,827	8,595	0,561
ODN 9	25,272	4,212	7,511	0,561
ODN 9	25,034	4,172	7,690	0,543
ODN 9	23,484	3,914	6,851	0,571
ODN 10	40,240	5,030	8,959	0,561
ODN 10	38,132	4,766	7,905	0,603
ODN 10	34,973	4,372	7,350	0,595

Anhang 13: Integrierte Peak-Werte aus den einzelnen chromatographischen Analysen (Abschnitt 3.6)

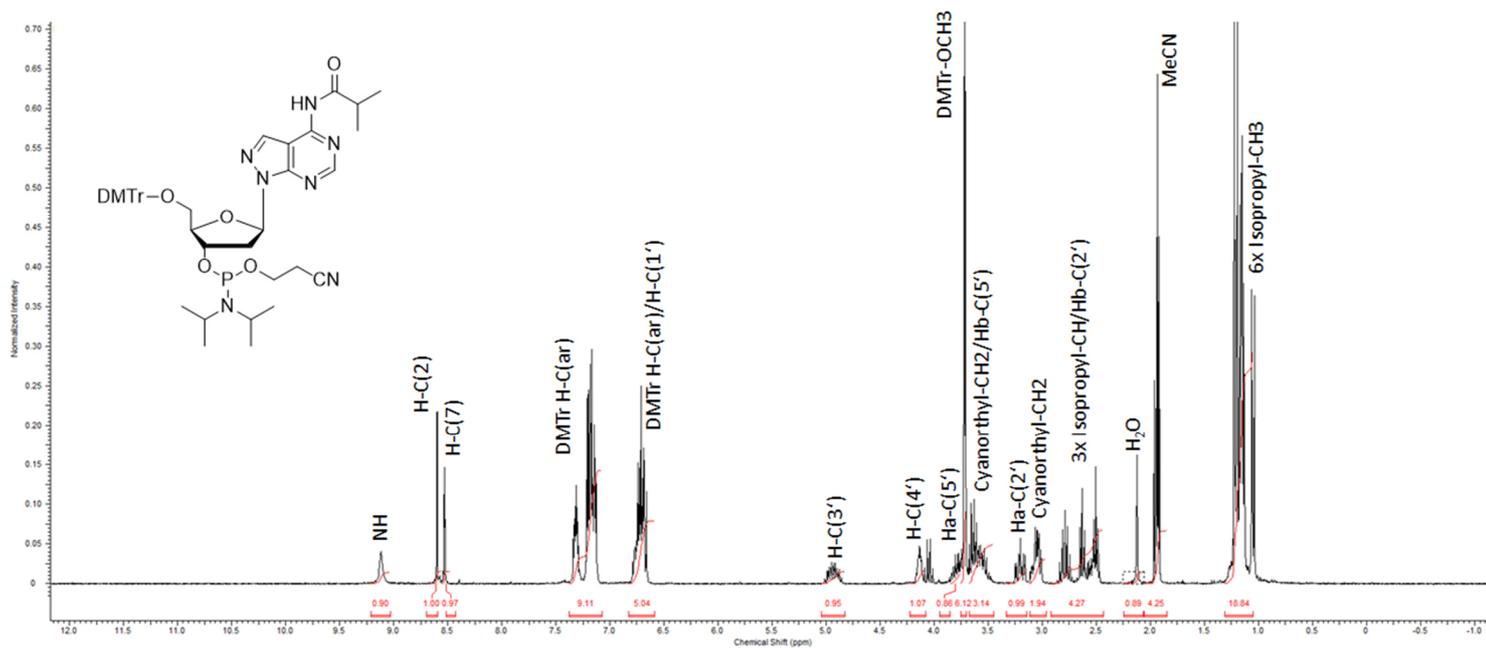
	Peak dC/ε260	Peak dC (normiert)/ε260*	Peak 3'-AzA/ε260**	Molares Verhältnis	Normiertes Molares Verhältnis
ODN 8	2,745	0,686	0,602	4,558	0,878
ODN 8	3,182	0,796	0,718	4,432	0,902
ODN 8	3,093	0,773	0,739	4,188	0,955
ODN 9	4,049	0,675	0,645	6,273	0,956
ODN 9	4,011	0,668	0,661	6,069	0,989
ODN 9	3,762	0,627	0,589	6,390	0,939
ODN 10	6,446	0,806	0,770	8,374	0,955
ODN 10	6,109	0,764	0,679	8,993	0,890
ODN 10	5,603	0,700	0,632	8,871	0,902

* ε260 = 6242,12 l/mol*cm⁻¹; ** ε260 = 11637,51 l/mol*cm⁻¹

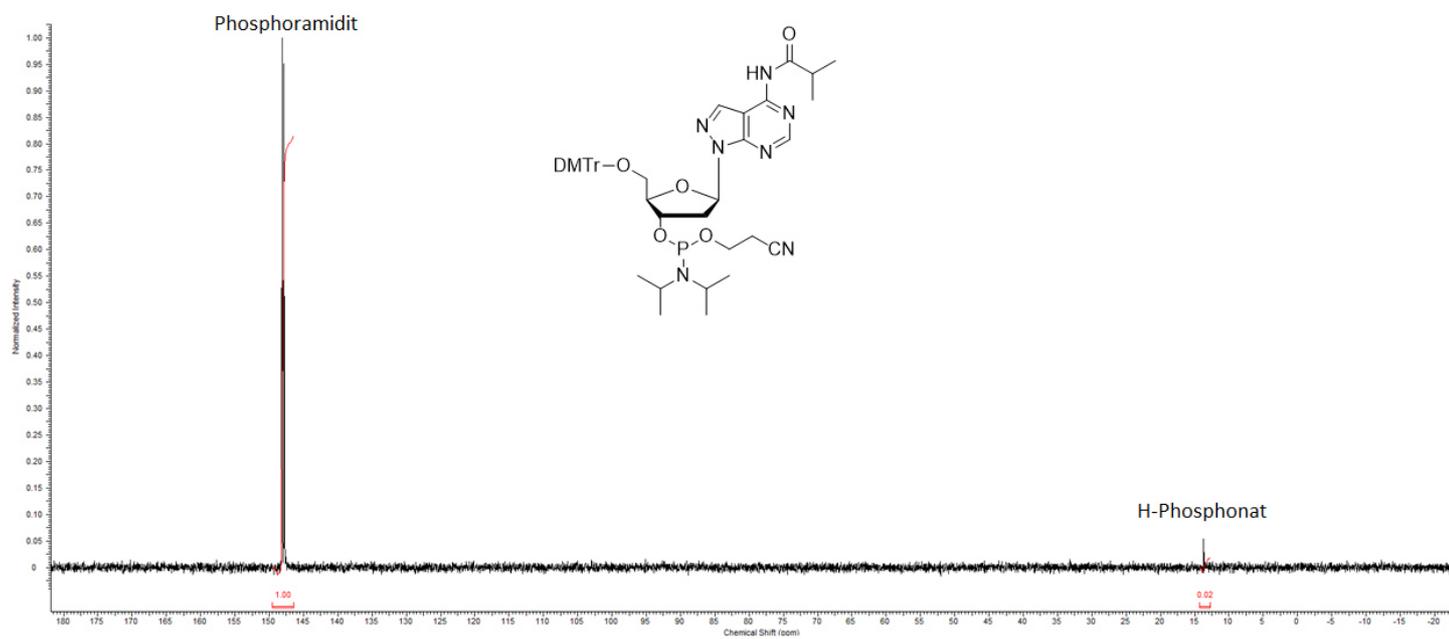
Anhang 14: Berechnete molare Verhältnisse aus den Werten der chromatographischen Analysen. Extinktionskoeffizienten nach Basanta-Sanchez et al.^[114]



Anhang 15: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung 1.



Anhang 16: ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung 2.



Anhang 17: ³¹P-NMR-Spektrum der Verbindung 2.

Literaturverzeichnis

- [1] K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaug, J. Sands, D. E. Gottschling, T. R. Cech, *Cell* **1982**, *31*, 147–157.
- [2] A. J. Zaug, P. J. Grabowski, T. R. Cech, *Nature* **1983**, *301*, 578–583.
- [3] E. Alessio, R. S. Bonadio, L. Buson, F. Chemello, S. Cagnin, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 302.
- [4] A. Maguregui, H. Abe, *ChemBioChem* **2020**, *21*, 1808–1815.
- [5] V. Ramakrishnan, *Cell* **2002**, *108*, 557–572.
- [6] D. E. Andreev, P. B. F. O'Connor, G. Loughran, S. E. Dmitriev, P. V. Baranov, I. N. Shatsky, *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 513–526.
- [7] A. Serganov, E. Nudler, *Cell* **2013**, *152*, 17–24.
- [8] T. S. Lotz, B. Suess, *Microbiol. Spectr.* **2018**, *6*, DOI 10.1128/microbiolspec.RWR-0025-2018.
- [9] M. E. Sherlock, N. Sudarsan, R. R. Breaker, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, *115*, 6052–6057.
- [10] L. A. Marraffini, *Nature* **2015**, *526*, 55–61.
- [11] M. Naeem, S. Majeed, M. Z. Hoque, I. Ahmad, *Cells* **2020**, *9*, 1608.
- [12] N. Klöcker, F. P. Weissenboeck, A. Rentmeister, *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 8749–8773.
- [13] H. Depmeier, E. Hoffmann, L. Bornewasser, S. Kath-Schorr, *ChemBioChem* **2021**, *22*, 2826–2847.
- [14] L. Anhäuser, S. Hüwel, T. Zobel, A. Rentmeister, *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, e42–e42.
- [15] K. C. Suddala, J. Cabello-Villegas, M. Michnicka, C. Marshall, E. P. Nikonowicz, N. G. Walter, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1896.
- [16] T. Weinrich, E. A. Jaumann, U. Scheffer, T. F. Prisner, M. W. Göbel, *Chem. - Eur. J.* **2018**, *24*, 6202–6207.
- [17] O. A. Krasheninina, J. Thaler, M. D. Erlacher, R. Micura, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 6970–6974.
- [18] L. Haase, K. Weisz, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 4539–4542.
- [19] W. B. Wan, P. P. Seth, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 9645–9667.
- [20] D. Gillingham, D. Rasale, *Chim. Int. J. Chem.* **2018**, *72*, 777–781.

- [21] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998.
- [22] N. Z. Fantoni, A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 7122–7154.
- [23] R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 565–598.
- [24] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- [25] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [26] C. J. Pickens, S. N. Johnson, M. M. Pressnall, M. A. Leon, C. J. Berkland, *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 686–701.
- [27] D. C. Kennedy, C. S. McKay, M. C. B. Legault, D. C. Danielson, J. A. Blake, A. F. Pegoraro, A. Stolow, Z. Mester, J. P. Pezacki, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17993–18001.
- [28] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.
- [29] K. Krell, D. Harijan, D. Ganz, L. Doll, H.-A. Wagenknecht, *Bioconjug. Chem.* **2020**, *31*, 990–1011.
- [30] B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1939–1941.
- [31] C. Kitoun, M. Fonvielle, M. Arthur, M. Etheve-Quellejeu, L. Iannazzo, *Curr. Protoc.* **2021**, *1*, DOI 10.1002/cpz1.42.
- [32] M. Fonvielle, N. Sakkas, L. Iannazzo, C. Le Fournis, D. Patin, D. Mengin-Lecreulx, A. El-Sagheer, E. Braud, S. Cardon, T. Brown, M. Arthur, M. Etheve-Quellejeu, *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 13751–13755.
- [33] M. Dülmen, N. Muthmann, A. Rentmeister, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 13280–13286.
- [34] S. Nainar, B. J. Cuthbert, N. M. Lim, W. E. England, K. Ke, K. Sophal, R. Quechol, D. L. Mobley, C. W. Goulding, R. C. Spitale, *Nat. Methods* **2020**, *17*, 311–318.
- [35] S. Nainar, S. Beasley, M. Fazio, M. Kubota, N. Dai, I. R. Corrêa, R. C. Spitale, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 2149–2152.
- [36] J. M. Holstein, L. Anhäuser, A. Rentmeister, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 10899–10903.
- [37] M. Nikan, M. Tanowitz, C. A. Dwyer, M. Jackson, H. J. Gaus, E. E. Swayze, F. Rigo, P. P. Seth, T. P. Prakash, *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 8471–8484.

- [38]L. Massaad-Massade, S. Boutary, M. Caillaud, C. Gracia, B. Parola, S. B. Gnaouiya, B. Stella, S. Arpicco, E. Buchy, D. Desmaële, P. Couvreur, G. Urbinati, *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 1961–1972.
- [39]A. Litovchick, C. E. Dumelin, S. Habeshian, D. Gikunju, M.-A. Guié, P. Centrella, Y. Zhang, E. A. Sigel, J. W. Cuozzo, A. D. Keefe, M. A. Clark, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 10916.
- [40]L. Taemaitree, A. Shivalingam, A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1610.
- [41]B. Puffer, C. Kreutz, U. Rieder, M.-O. Ebert, R. Konrat, R. Micura, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 7728–7740.
- [42]A. Kiviniemi, P. Virta, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8560–8562.
- [43]H. Sawamoto, Y. Arai, S. Yamakoshi, S. Obika, E. Kawanishi, *Org. Lett.* **2018**, *20*, 1928–1931.
- [44]H. Okamura, A. Crisp, S. Hübner, S. Becker, P. Rovó, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 18691–18696.
- [45]F. Müller, L. Escobar, F. Xu, E. Węgrzyn, M. Nainytė, T. Amatov, C. Chan, A. Pichler, T. Carell, *Nature* **2022**, *605*, 279–284.
- [46]C. Périgaud, G. Gosselin, J. L. Imbach, *Nucleosides Nucleotides* **1992**, *11*, 903–945.
- [47]S. Meneni, I. Ott, C. D. Sergeant, A. Sniady, R. Gust, R. Dembinski, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 3082–3088.
- [48]D. Perrone, E. Marchesi, L. Preti, M. L. Navacchia, *Molecules* **2021**, *26*, 3100.
- [49]W. Gilbert, *Nature* **1986**, *319*, 618–618.
- [50]G. F. Joyce, *Nature* **2002**, *418*, 214–221.
- [51]J. Attwater, A. Raguram, A. S. Morgunov, E. Gianni, P. Holliger, *eLife* **2018**, *7*, e35255.
- [52]A. Wochner, J. Attwater, A. Coulson, P. Holliger, *Science* **2011**, *332*, 209–212.
- [53]D. P. Horning, G. F. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113*, 9786–9791.
- [54]W. K. Johnston, P. J. Unrau, M. S. Lawrence, M. E. Glasner, D. P. Bartel, *Science* **2001**, *292*, 1319–1325.
- [55]M. S. Lawrence, D. P. Bartel, *RNA* **2005**, *11*, 1173–1180.
- [56]M. S. Lawrence, D. P. Bartel, *Biochemistry* **2003**, *42*, 8748–8755.
- [57]C. Yao, U. F. Muller, *RNA* **2011**, *17*, 1274–1281.

- [58]F. Seela, K. Kaiser, *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 1813–1823.
- [59]F. Seela, H. Steker, *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 563–570.
- [60]M. Maiti, S. Michielssens, N. Dyubankova, M. Maiti, E. Lescrinier, A. Ceulemans, P. Herdewijn, *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18*, 857–868.
- [61]A. K. Bhattacharya, R. K. Ness, H. G. Fletcher, *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 428–435.
- [62]V. Rolland, M. Kotera, J. Lhomme, *Synth. Commun.* **1997**, *27*, 3505–3511.
- [63]Z. Kazimierczuk, H. B. Cottam, G. R. Revankar, R. K. Robins, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6379–6382.
- [64]N. Minakawa, Y. Kawano, S. Murata, N. Inoue, A. Matsuda, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 464–470.
- [65]G. M. Blackburn, RSC Pub, Cambridge, UK, **2006**, p. 86.
- [66]F. Müggenburg, Masterarbeit: Synthese eines Desoxynukleosidanalogons zur Generierung einer DNA-Primerbibliothek, Universität Greifswald, **2016**.
- [67]J. Steger, D. Graber, H. Moroder, A.-S. Geiermann, M. Aigner, R. Micura, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7470–7472.
- [68]W. A. Sheppard, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5419–5422.
- [69]S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859–1862.
- [70]N. D. Sinha, J. Biernat, H. Köster, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 5843–5846.
- [71]J. W. Engels, E. Uhlmann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 716–734.
- [72]R. T. Pon, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2000**, *00*, 3.1.1-3.1.28.
- [73]R. Quarrell, T. D. W. Claridge, G. W. Weaver, G. Lowe, *Mol. Divers.* **1996**, *1*, 223–232.
- [74]P. Wright, D. Lloyd, W. Rapp, A. Andrus, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 3373–3376.
- [75]R. T. Pon, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2000**, *00*, 3.2.1-3.2.23.
- [76]S. Sprang, R. Scheller, D. Rohrer, M. Sundaralingam, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 2867–2872.
- [77]C. Oostenbrink, W. F. van Gunsteren, *Chem. - Eur. J.* **2005**, *11*, 4340–4348.
- [78]J. Salon, B. Zhang, Z. Huang, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2011**, *30*, 271–279.
- [79]Z. W. Kockler, D. A. Gordenin, *Cells* **2021**, *10*, 1557.
- [80]D. Luvino, C. Baraguey, M. Smietana, J.-J. Vasseur, *Chem. Commun.* **2008**, 2352.

- [81] A. R. Martin, I. Barvik, D. Luvino, M. Smietana, J.-J. Vasseur, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4193–4196.
- [82] R. Barbeyron, J.-J. Vasseur, M. Smietana, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 542–547.
- [83] R. Barbeyron, J. Wengel, J.-J. Vasseur, M. Smietana, *Monatshefte Für Chem. - Chem. Mon.* **2013**, *144*, 495–500.
- [84] W. Guschlbauer, K. Jankowski, *Nucleic Acids Res.* **1980**, *8*, 1421–1433.
- [85] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007–2010.
- [86] K. Fauster, M. Hartl, T. Santner, M. Aigner, C. Kreutz, K. Bister, E. Ennifar, R. Micura, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 581–589.
- [87] G. S. Ti, B. L. Gaffney, R. A. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1316–1319.
- [88] J. Frommer, R. Hieronymus, T. Selvi Arunachalam, S. Heeren, M. Jenckel, A. Strahl, B. Appel, S. Müller, *RNA Biol.* **2014**, *11*, 609–623.
- [89] H.-U. Blank, D. Frahne, A. Myles, W. Pfeleiderer, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1970**, *742*, 34–42.
- [90] R. Mengel, M. Bartke, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17*, 679–680.
- [91] E. J. Reist, D. F. Calkins, L. Goodman, *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 2538–2541.
- [92] H. Moroder, J. Steger, D. Graber, K. Fauster, K. Trappl, V. Marquez, N. Polacek, D. N. Wilson, R. Micura, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4056–4060.
- [93] C. Klinchan, Y.-L. Hsu, L.-C. Lo, W. Pluempunapat, P. Chuawong, *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 6204–6207.
- [94] M. A. Amin, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 1703–1708.
- [95] A. V. Azhayev, A. M. Ozols, A. S. Bushnev, N. B. Dyatkina, S. V. Kochetkova, L. S. Victorova, M. K. Kukhanova, A. A. Krayevsky, B. P. Gottikh, *Nucleic Acids Res.* **1979**, *6*, 625–643.
- [96] M. Debais, Utilisation d'acides Boroniques Pour l'assemblage et Le Contrôle d'acides Nucléiques Fonctionnels, **2020**.
- [97] F. A. A. M. de Leeuw, C. Altona, *J Chem Soc Perkin Trans 2* **1982**, 375–384.
- [98] H. Plach, E. Westhof, H.-D. Ludemann, R. Mengel, *Eur. J. Biochem.* **1977**, *80*, 295–304.
- [99] C. Altona, M. Sundaralingam, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 2333–2344.

- [100] E. Malek-Adamian, D. C. Guenther, S. Matsuda, S. Martínez-Montero, I. Zlatev, J. Harp, M. Burai Patrascu, D. J. Foster, J. Fakhoury, L. Perkins, N. Moitessier, R. M. Manoharan, N. Taneja, A. Bisbe, K. Charisse, M. Maier, K. G. Rajeev, M. Egli, M. Manoharan, M. J. Damha, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 14542–14555.
- [101] E. Malek-Adamian, M. B. Patrascu, S. K. Jana, S. Martínez-Montero, N. Moitessier, M. J. Damha, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 9839–9849.
- [102] S. Freier, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4429–4443.
- [103] C. Thibaudeau, J. Plavec, N. Garg, A. Papchikhin, J. Chattopadhyaya, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4038–4043.
- [104] M.-L. Winz, A. Samanta, D. Benzinger, A. Jäschke, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, e78.
- [105] H. Yang, F. Seela, *Chem. - Eur. J.* **2016**, *22*, 1435–1444.
- [106] J. Wu, L. Bishop, J. Guo, Z. Guo, *Synlett* **2019**, *30*, 348–352.
- [107] A. M. Jawalekar, N. Meeuwenoord, J. (Sjef) G. O. Cremers, H. S. Overkleeft, G. A. van der Marel, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 287–290.
- [108] M. A. Fomich, M. V. Kvach, M. J. Navakouski, C. Weise, A. V. Baranovsky, V. A. Korshun, V. V. Shmanai, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 4590–4593.
- [109] M. Shelbourne, T. Brown, A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 11184.
- [110] A. H. El-Sagheer, T. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3958–3964.
- [111] E. A. Osman, T. Gadzikwa, J. M. Gibbs, *ChemBioChem* **2018**, *19*, 2081–2087.
- [112] E. Paredes, S. R. Das, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 125–131.
- [113] F. Müggenburg, A. Biallas, M. Debiais, M. Smietana, S. Müller, *Eur. J. Org. Chem.* **2021**, *2021*, 6408–6416.
- [114] M. Basanta-Sanchez, S. Temple, S. A. Ansari, A. D'Amico, P. F. Agris, *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, e26.
- [115] A. R. Martin, K. Mohanan, D. Luvino, N. Floquet, C. Baraguey, M. Smietana, J.-J. Vasseur, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4369.
- [116] A. Gimenez Molina, I. Barvik, S. Müller, J.-J. Vasseur, M. Smietana, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 8824–8830.

- [117] T. Lavergne, J.-R. Bertrand, J.-J. Vasseur, F. Debart, *Chem. - Eur. J.* **2008**, *14*, 9135–9138.
- [118] T. Lavergne, C. Baraguey, C. Dupouy, N. Parey, W. Wuensche, G. Sczakiel, J.-J. Vasseur, F. Debart, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5719–5731.
- [119] A. Biscans, M. Bos, A. R. Martin, N. Ader, G. Sczakiel, J.-J. Vasseur, C. Dupouy, F. Debart, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2674–2679.
- [120] B. L. Gaffney, L. A. Marky, R. A. Jones, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 3–13.
- [121] M. L. Hamm, S. Rajguru, A. M. Downs, R. Cholera, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12220–12221.
- [122] M. Frigerio, M. Santagostino, S. Sputore, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4537–4538.
- [123] K. E. Pfitzner, J. G. Moffatt, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3027–3028.
- [124] J. Donald. Albright, Leon. Goldman, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 2416–2423.
- [125] G. H. Hakimelahi, Z. A. Proba, K. K. Ogilvie, *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 1106–1113.
- [126] S. S. Jones, C. B. Reese, *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1979**, 2762.
- [127] K. Omura, D. Swern, *Tetrahedron* **1978**, *34*, 1651–1660.
- [128] S. Liu, S. F. Wnuk, C. Yuan, M. J. Robins, R. T. Borchardt, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 883–887.
- [129] R. Ranganathan, G. H. Jones, J. G. Moffatt, *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 290–298.
- [130] S. F. Wnuk, C.-S. Yuan, R. T. Borchardt, J. Balzarini, E. De Clercq, M. J. Robins, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1608–1618.
- [131] R. K. Harris, E. D. Becker, R. Goodfellow, S. M. C. de Menezes, P. Granger, *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73*, 1795–1818.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispiele für modifizierte Nukleinsäuren. A: mögliche Positionen für die Einführung von Modifikationen in einer kanonischen Nukleinsäure; grün: Nukleobase, blau: Phosphatrückgrat, gelb: Ribosekomponente; B: Basenmodifizierte Nukleinsäure (EPR-Sonde); ^[16] C: Ribosemodifizierte Nukleinsäuren. ^[19]	2
Abbildung 2: Beispiele bioorthogonaler Reaktionen. A: CuAAC; B: SPAAC; C: <i>Traceless Staudinger Ligation</i>	3
Abbildung 3: Zielmoleküle. 1 – 2: Funktionalisierte 8-Aza-7-deaza-2'-desoxyadenosinderivate; 3 – 5: Azido-modifizierte Nukleosidderivate; 6: Borono-modifiziertes Adenosinderivat.....	5
Abbildung 4: Sekundärstruktur des Pol1E Ribozyms mit gebundener Cofaktorsequenz (rot); adaptiert nach Yao und Müller. ^[57]	7
Abbildung 5: Synthesepfad für die Herstellung der funktionalisierten 8-Aza-7-deaza-2'-desoxyadenosinderivate 1 und 2.	9
Abbildung 6: Synthese der Ausgangsverbindungen für die Glykosylierungsreaktion. A: Präparation der Nukleobase; (i) 13,41 Äq. POCl ₃ , Pyridin/DMF, ÜN, 115 °C; (ii) 1,2 M Name, MeOH, ÜN, 75 °C, 41% (über beide Schritte); B: Präparation der Ribose-Komponente; (i a) 1% HCl*MeOH, Methanol, 1 h, RT; (i b) 2,23 Äq. Toluoylchlorid, Pyridin, ÜN, RT, 83%; (ii) HCl _(g) , Diethylether, 1 h, 0 °C, 46%.....	10
Abbildung 7: Ausschnitt NOESY-Spektrum zur Bestätigung der Anomerkonfiguration von Verbindung 12.....	11
Abbildung 8: Synthese des Nukleosids 13 durch eine Glykosylierungsreaktion.....	12
Abbildung 9: Erwartete HMBC-Korrelationen zwischen H1' und C4 (blau) bei einer N9-Glykosylierung (links) bzw. zwischen H1' und C7 bei einer N8-Glykosylierung (rechts).....	12
Abbildung 10: Kristallstruktur der Verbindung 13.....	13
Abbildung 11: Synthese des Nukleosids 16 als Ausgangsverbindung für die Herstellung der Zielmoleküle 1 und 2. (i a): 1,2 M NaOMe, Methanol, 3 h, RT; (i b): konz. NH ₃ -Lsg. _(aq) , 3 Tage, RT, 82%; (ii a): 5 Äq. TMS-Cl, Pyridin, 1 h, RT; (ii b): 2 Äq. Isobutyrylchlorid, Pyridin, ÜN, RT; (ii c): NH ₃ /H ₂ O, Pyridin, 30 min, RT, 79%; (iii): 1,3 Äq. DMTr-Cl, Pyridin, 4,5 h, RT, 32%	13
Abbildung 12: Funktionalisierung des Nukleosids 16 mit einem Linkermolekül 17 für eine Anbindung an die feste Phase.....	14
Abbildung 13: Phosphitylierung der Verbindung 16.	14

Abbildung 14: Vereinfachte Darstellung des Syntheszyklus' im Phosphoramiditverfahren..	15
Abbildung 15: Schematische Darstellung für die Ausbildung unterschiedlicher Längenverhältnisse in der chemischen Oligonukleotidsynthese an fester Phase. A: Übliche Längenverhältnisse für unter Standardbedingungen synthetisierte Oligonukleotide. B: beabsichtigte Längenverhältnisse bei der Herstellung längendiverser Oligonukleotide unter abgewandelten Bedingungen; blau: immobilisierte Nukleoside bzw. Oligonukleotide, rot: Capping-Gruppen.....	16
Abbildung 16: IE-HPLC Chromatogramm für Synthese B. Phosphoramiditkonzentration: 0,05 M; Träger: CPG 1000 Å; HPLC-Gradient 3 (siehe Abschnitt (6.2.11), Absorptionsmessung bei 260 nm.	18
Abbildung 17: Prozentualer Anteil der einzelnen Oligomere an der normierten Gesamtfläche (Synthese B).	19
Abbildung 18: IE-HPLC Chromatogramm und Peakflächenverteilung der Oligomere für Synthese D. Phosphoramiditkonzentration: 0,025 M; Träger: CPG 500 Å; HPLC-Gradient 3 (siehe Abschnitt (6.2.11), Absorptionsmessung bei 260 nm.	20
Abbildung 19: IE-HPLC Chromatogramm und Peakflächenverteilung der Oligomere für Synthese G. Phosphoramiditkonzentration: 0,03 M; Träger: TentaGel; HPLC-Gradient 3 (siehe Abschnitt (6.2.11), Absorptionsmessung bei 260 nm.....	20
Abbildung 20: Funktionalisierung eines Thymidinderivats mit einem Pfp-Linkermolekül und anschließende Immobilisierung an einem Träger. (i): 1 Äq. DMAP, 4,9 Äq. Pfp-Adipinsäureester, Pyridin/DMF (1:1), 3 h, RT; (ii a): 1 Äq. CPG- bzw. TentaGel-Träger, 2 Äq. Pyridin, DMF, ÜN, RT; (ii b): 0,5 M DMAP in MeCN, Essigsäureanhydrid/syn-Collidin/MeCN (2/3/5), 20 min, RT.	21
Abbildung 21: IE-HPLC Chromatogramm und Peakflächenverteilung der Oligomere für Synthese J. Phosphoramiditkonzentration: 0,04 M; Träger: TentaGel; HPLC-Gradient 3 (siehe Abschnitt (6.2.11), Absorptionsmessung bei 260 nm.....	22
Abbildung 22 RP-HPLC Chromatogramm aus kombinierter ODN-Synthese; HPLC-Gradient 2 (siehe Abschnitt 6.2.11), Absorptionsmessung bei 260 nm.	24
Abbildung 23 A: Schematisches Beispiel für die chemische Ligation zweier DNA-Fragmente (rot) entlang eines komplementären DNA-Templates (blau); ^[82] B: Beispiel für eine internukleosidische Boronoesterbindung; C: Beispiel für eine internukleosidische Oxazaborolidinbindung.....	27

Abbildung 24: Beispiele für die bevorzugte Zuckerkonformation eines 3'-Amino-adenosin- und eines 2'-Amino-Uridin-Nukleotids, sowie deren Einfluss auf die Ausbildung einer Oxazaborolidinbindung.....	28
Abbildung 25: Synthesepfad für das funktionalisierte 2'-Azido-adenosinderivat 3.....	30
Abbildung 26: Maskierung der exozyklischen Aminofunktion der Verbindung 19 unter Verwendung transienter Schutzgruppen. (i a) 5 Äq. TMS-Cl, Pyridin, 1 h, RT; (i b) 2 Äq. Isobutrylchlorid, Pyridin, ÜN, RT; (i c) NH ₃ /H ₂ O, Pyridin, 30 min, RT, 74% (Gesamtausbeute).	31
Abbildung 27: Synthese der Verbindung 23. (i) 1,2 Äq. 1,3-dichloro-1,1,3,3-tetraisopropyl-disiloxan, Pyridin ÜN, RT, 67%; (ii) 1,5 Äq. DMAP, 2,5 Äq. Et ₃ N, 1,5 Äq. Trifluormethansulfonylchlorid, CH ₂ Cl ₂ , 30 min, 0 °C; (iii) 5 Äq. LiN ₃ , DMF, ÜN, RT, 90%.....	32
Abbildung 28: Signalverschiebung im ¹ H-NMR-Spektrum für Verbindung 21 (blau) und 23 (rot).	32
Abbildung 29: Synthese des Zielmoleküls 3. (i) 1 M Tetrabutylammoniumfluorid, 1,9 Äq. CH ₃ COOH, THF, 30 min, RT, 71%; (ii) 1,3 Äq. DMTr-Cl, Pyridin, 4,5 h, RT, 57%; (iii) 1 Äq. DMAP, 4,9 Äq. Pfp-Adipinsäureester, Pyridin/DMF (1:1), 2 h, RT, 60%.....	33
Abbildung 30: Synthesepfad für das funktionalisierte 3'-Azido-adenosinderivat 4.....	34
Abbildung 31: Synthese des Epoxids 27. A: Herstellung des Epoxids 27 ausgehend von Verbindung 20; (i) 1.3 Äq. DMTr-Cl, Pyridin, ÜN, RT, 53%; (ii) 1.85 Äq. PPh ₃ , 1.85 Äq. DIAD, DMF, 1 h, 55 °C, 85%; B: Detaillierterer Reaktionsablauf der Epoxidsynthese.	35
Abbildung 32: Einführung der Azidogruppe und Inversion der Stereokonfiguration. A: Synthese des arabino-konfigurierten 3'-Azido-Nukleosids 28 und Epimerisierung; %; (i) 5 Äq. LiN ₃ , DMF, 3 h, 55 °C, 40%; (ii a) 3 Äq. DMAP, 1.5 Äq. Trifluormethansulfonylchlorid, CH ₂ Cl ₂ , 30 min, 0 °C; (ii b) 5 Äq. CF ₃ COO ⁻ K ⁺ , 2 Äq. 18-Krone-6-Ether, 1.5 Äq. DIPEA, Toluol, 2 h, 60 °C, 64%; B: Detailliertere Darstellung der Epimerisierungsreaktion.	36
Abbildung 33: 2D COSY-NMR-Spektrum zur Lokalisierung der Azidgruppe bei Verbindung 28.	37
Abbildung 34: Signalverschiebung im ¹ H-NMR-Spektrum für Verbindung 28 (blau) und 29 (rot).	38
Abbildung 35: Synthese der Zielverbindung 4.	38
Abbildung 36: Synthesepfad für das funktionalisierte 3'-Azido-uridinderivat 5.....	39

Abbildung 37: Synthese des lyxo-konfigurierten Epoxids 33. A: einzelne Reaktionsschritte; (i) 1.3 Äq. DMTr-Cl, Pyridin, ÜN, RT, 67%; (ii) 15 Äq. Methansulfonylchlorid, Pyridin, 1.5 h, 0-25 °C, 98%; (iii) 1 M NaOH, Ethanol, 1 h, 60 °C, 89%; B: Entstehung des lyxo-konfigurierten Uridinepoxids im Detail.....	40
Abbildung 38: Synthese des ribo-konfigurierten Azidouridinderivats 35. (i) 5 Äq. LiN ₃ in DMF, ÜN, 55 °C, 44%; (ii a) 3 Äq. DMAP, 1.5 Äq. Trifluormethansulfonylchlorid, CH ₂ Cl ₂ , 30 min, 0 °C; (ii b) 5 Äq. CF ₃ COO ⁻ K ⁺ , 2 Äq. 18-Krone-6-Ether, 1.5 Äq. DIPEA, Toluol, 2 h, 60 °C, 73%.	40
Abbildung 39: 2D COSY-NMR-Spektrum zur Lokalisierung der Azidgruppe bei Verbindung 34.	41
Abbildung 40: Signalverschiebung im ¹ H-NMR-Spektrum für Verbindung 34 (blau) und 35 (rot).	41
Abbildung 41: Synthese des Zielmoleküls 5.	42
Abbildung 42: Geschätzter Anteil der South-Konformation für verschiedene Azido-modifizierte Nukleoside	44
Abbildung 43: RP-HPLC Chromatogramm nach dem enzymatischen Verdau des ODNs 8. HPLC-Gradient 1 (siehe Abschnitt 6.2.11), Absorptionsmessung bei 260 nm.	47
Abbildung 44: Synthesepfad für ein Borono-modifiziertes Uridinderivat. ^[116]	49
Abbildung 45: Vorgeschlagener Synthesepfad für ein Borono-modifiziertes Adenosinderivat.	50
Abbildung 46: Oxidations- und Methylierungs-Reagenzien.....	51
Abbildung 47: Einführung der Silylschutzgruppen; (i a): 1,2 Äq. DBTS, DMF, 1,5 h, 0 °C; (i b) 5 Äq. Imidazol, 1,5 Äq. tert-Butyldimethylsilylchlorid, DMF, ÜN, RT, 93% (über beide Schritte).	52
Abbildung 48: Synthese der Verbindungen 44 und 45 mit den jeweiligen Zwischenschritten. A: Synthese der DMTr-geschützten Verbindung 44; (i a): 3,92 Äq. HF (70% in Pyridin, DCM, 2 h, RT; (i b) 1,3 Äq. DMT-Cl, Pyridin, ÜN, RT, 48% (über beide Schritte); B: Synthese der Isobutyryl-geschützten Verbindung 45; (i a): (i a): 2,5 Äq. Isobutyrylchlorid, Pyridin, ÜN, RT; (i b) 2% Trifluoressigsäure, DCM, 15 min, RT, 51% (über beide Schritte).....	53
Abbildung 49: 2D-COSY-NMR-Spektrum zur genaueren Untersuchung der Isobutyrylabspaltung während der Oxidationsreaktion von Verbindung 45.	54

Abbildung 50: Angenommener Mechanismus für die basenkatalysierte Isobutyrylabspaltung bei Verbindung 46.	55
Abbildung 51: Angenommener Mechanismus für eine hypothetische säurekatalysierte Isobutyrylabspaltung bei Verbindung 46.	55
Abbildung 52: Alternative Synthesestrategie zur Darstellung eines 5'-Borono-modifizierten Adenosinderivats.	56
Abbildung 53: Synthese des geschützten Nukleosids 51 als Ausgangsverbindung für die Oxidationsreaktion. (i): 2 Äq. 2,2-Dimethoxypropan, 0,4 Äq. p-Toluolsulfonsäure, Aceton, 3 h, 50, 74%; (ii a): 3 Äq. TMS-Cl, Pyridin, 30 min, 0 °C; (ii b): 1,5 Äq. Isobutyrylchlorid, Pyridin, ÜN, RT; (ii c): NH ₃ /H ₂ O, Pyridin, 30 min, RT, 81%.	57
Abbildung 54: Tautomeriebedingte Isomerisierung am Beispiel der Verbindung 52. ^[128]	58
Abbildung 55: Mögliche Alternativstrategie zur Darstellung der Verbindung 50. i a): DMSO/DCC/Cl ₂ CHCO ₂ H; i b): (PhNHCH ₂) ₂ ; ii: Dowex (H ⁺)/THF/H ₂ O; Wasserabscheider, Benzol/Δ. ^[129,130]	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Herstellung längendiverser Oligonukleotide. Synthesebezeichnungen und jeweils veränderte Variablen.	17
Tabelle 2: Synthetisierte ODNs mit unterschiedlichem Anteil an 8-Aza-7-deaza-2'-desoxyadenosin.	25
Tabelle 3: Hergestellte Amino-modifizierte Oligodesoxynukleotide.	43
Tabelle 4: Azido-modifizierte DNA-Sequenzen.	46
Tabelle 5: Errechnete und detektierte Nukleosid-Verhältnisse.	48
Tabelle 6: Standardbedingungen für die chemische Festphasensynthese von DNA.	64
Tabelle 7: Chemisch synthetisierte Oligonukleotide.	64

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Greifswald noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel und Hilfen benutzt und keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen habe.

Publikationsliste

Publikationen

F. Müggenburg, A. Biallas, M. Debiais, M. Smietana, S. Müller (2021) Azido Functionalized Nucleosides Linked to Controlled Pore Glass as Suitable Starting Materials for Oligonucleotide Synthesis by the Phosphoramidite Approach, *Eur. J. Org. Chem.* 2021, 2021, 6408–6416.

F. Müggenburg, S. Müller (2022) Azido-modified nucleosides as versatile tools for bioorthogonal labeling and functionalization, *Chem. Rec.* 2022, e202100322

Posterbeiträge

September 2017 – 7th Cambridge Symposium Nucleic Acids Chemistry and Biology

(Cambridge): "Synthesis of a 3'-modified ATP-derivative for site-specific labeling of proteins"

September 2017 – VIII. Nukleinsäurechemietreffen (Mainz): "Synthesis of a 3'-modified ATP-derivative for site-specific labeling of proteins"

September 2019 – IX. Nukleinsäurechemietreffen (Saarbrücken): "Synthesis of azido-modified nucleosides as precursors for DNA-linkage via oxazaborolidine-bonds"

Vorträge

September 2018 – IV. Doktorandenseminar Nukleinsäurechemie (Bad Herrenalb):

"Synthesis of adenosine derivatives as versatile building blocks in bioorthogonal chemistry"

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Sabine Müller für die Möglichkeit bedanken, in ihrer Arbeitsgruppe an abwechslungsreichen und spannenden Themen forschen zu können. Außerdem möchte ich mich für die großartige Betreuung bedanken, bei der es viele Freiheiten für eigene Ideen und gleichzeitig auch immer ein offenes Ohr für Fragen und Probleme gab. Die offene und wertschätzende Arbeitsatmosphäre hatte immer einen sehr hohen Wert für mich.

Herrn Prof. Dr. Klaus Weisz und all seinen aktiven und ehemaligen Arbeitsgruppenmitgliedern, die ich während meiner Zeit an der Universität Greifswald kennenlernen durfte, möchte ich ganz herzlich für die zahlreichen NMR-Messungen, die hilfreichen Diskussionen und die angenehme Arbeitsgruppennachbarschaft danken.

Natürlich gilt mein Dank auch der gesamten OC-Arbeitsgruppe. Dies richtet sich insbesondere an Bettina für all die fachlichen und persönlichen Ratschläge, fürs Aufmuntern und Motivieren, wenn zwischendurch Alles sehr schwierig erschien und ganz allgemein für das große Engagement in der Arbeitsgruppe. Anne und Frau Turski möchte ich für ihren Einsatz hinter den Kulissen danken, der dafür sorgt, dass im Labor und im Praktikum Alles glatt läuft. Theo und Amandine danke ich für die Hilfe bei biochemischen Fragestellungen, die anregenden Pausenrunden und die wertvollen Freundschaften, die ich mit euch schließen durfte. Ruth danke ich für das allzeit offene Ohr bei fachlichen oder persönlichen Problemen, für die schönen Spaziergänge und ebenfalls für die tiefe Freundschaft, die sich während unserer gemeinsamen Zeit in der OC entwickelt hat. Des Weiteren danke ich allen anderen aktiven und ehemaligen Mitstreitern im AK-Müller, die dazu beigetragen haben, die Arbeitsatmosphäre so schön und einzigartig zu machen.

Ich bedanke mich außerdem bei all meinen Freunden und Freundinnen, die meine Zeit in Greifswald unvergesslich gemacht haben. Ein großer Dank gilt auch meiner Familie und insbesondere meinen Eltern, deren Unterstützung, Vertrauen und Liebe mir so Vieles ermöglicht haben und mir halfen, so weit zu kommen.

Abschließend möchte ich mich bei Linn bedanken, auf die ich mich immer verlassen konnte. Durch dich wurden die schönen Erlebnisse noch besser und die schwierigen Momente leichter. Ich bin sehr froh, dass wir uns gefunden haben.