

**Synthese von Fluorbenzol- und Fluorbenzimidazol-
Nukleosiden und ihr Einfluß auf die Stabilität von
RNA Duplexen**



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt dem Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Jörg Parsch
aus
Frankfurt am Main

Frankfurt am Main
Juni 2001
(D F 1)

Meinen Eltern,

Tante Käthe und Onkel Eberhard

in Dankbarkeit gewidmet

Das Bekannte ist endlich, das Unbekannte unendlich;
geistig stehen wir auf einem Inselchen inmitten eines
grenzenlosen Ozeans von Unerklärlichem.

Unsere Aufgabe ist es, von Generation zu Generation
ein klein wenig mehr Land trocken zu legen.

Thomas Huxley, englischer Zoologe (1825-1895)

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter Leitung von Herrn Prof. Dr. J. W. Engels in der Zeit von September 1997 bis Mai 2001 angefertigt.

Herrn Prof. Dr. J. W. Engels danke ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die interessante Themenstellung, die sehr guten experimentellen Bedingungen und die gewährte akademische Freiheit. Durch seine Kenntnisse und Erfahrungen sowie die stetige Bereitschaft zu anregenden Diskussionen hat er Einfluß auf diese Arbeit genommen.

Weiterhin danke ich allen, die direkt oder indirekt zur Durchführung dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders danken möchte ich:

- Meinen Kollegen Thorsten Strube, Stefan Amberg, Astrid Klöpffer, Dr. Markus Kircher, Dr. Valentin Wittmann und Dr. Uwe Parsch für die sehr gute Zusammenarbeit und die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.
- Dr. Zimmermann, seinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für die Messung zahlreicher NMR-Spektren.
- Dr. Jan W. Bats für die Durchführung der Röntgenstrukturanalysen und Auswertung der kristallographischen Daten.
- Dr. M. Bolte für die Durchführung einer Recherche in der Cambridge Structural Database.
- Dr. G. Dürner und seinen Mitarbeiterinnen für die präparativen HPLC-Trennungen der TBDMS-geschützten Nukleoside.
- Prof. Dr. D. Rehm für die Beschaffung eines Patents.
- Hannelore Brill und Ilona Priess für die Messung der Massenspektren.
- Marianne Christof für die Durchführung der Elementaranalysen.

- Thorsten Strube für die Zusammenarbeit bei der Synthese und Aufreinigung der RNA-Oligonukleotide.
- Beate Conrady für die Zusammenarbeit bei der Messung der HPLC-Retentionszeiten.
- Rainer Schmidt für seine stete Hilfsbereitschaft.
- Dr. Valentin Wittmann für seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und die Bestellung von Literatur.
- Dr. Uwe Parsch für seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, seine vielen praktischen Tips und für die kritische Durchsicht des Manuskripts.
- Stefan Amberg für seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und für die kritische Durchsicht des Manuskripts.
- Allen nicht namentlich genannten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Arbeitskreises für die angenehme Arbeitsatmosphäre.
- Dem Graduiertenkolleg „Chemische und Biologische Synthese von Wirkstoffen“ für ein dreijähriges Promotionsstipendium und die Übernahme der Tagungsgebühren des „XIth Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components“ vom 04.09. – 10.09.1999 in Spindleruv Mlýn, Tschechische Republik und des „XIVth International Roundtable Nucleosides, Nucleotides, and Their Biological Applications“ vom 10.09. – 14.09.2000 in San Francisco, USA.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 2 | Aufbau und Struktur von Nukleinsäuren | 7 |
| 2.1 | Aufbau der Nukleinsäuren | 7 |
| 2.2 | DNA-Strukturen..... | 10 |
| 2.3 | RNA-Strukturen | 14 |
| 2.4 | Duplex stabilisierende Wechselwirkungen..... | 16 |
| 2.4.1 | Wasserstoffbrücken..... | 16 |
| 2.4.2 | Basenstapelungswechselwirkungen | 17 |
| 2.4.3 | Solvatation und Salzeffekte | 19 |
| 3 | Einfluß von Fluor auf Nukleinsäuren und Wasserstoffbrücken | 21 |
| 3.1 | Fluor in Nukleinsäuren..... | 21 |
| 3.1.1 | Fluormodifikationen am Zucker | 22 |
| 3.1.1.1 | C2'-Fluornukleoside | 22 |
| 3.1.1.2 | C3'-Fluornukleoside | 24 |
| 3.1.1.3 | C4'-Fluornukleoside | 25 |
| 3.1.1.4 | C5'-Fluornukleoside | 26 |
| 3.1.2 | Fluormodifikationen an der Phosphatgruppe..... | 27 |
| 3.1.2.1 | Fluorphosphonate..... | 27 |
| 3.1.2.2 | Fluoralkylphosphonate..... | 27 |
| 3.1.3 | Fluormodifikationen an der Nukleobase..... | 28 |
| 3.1.3.1 | Fluormodifizierte Pyrimidine..... | 28 |
| 3.1.3.2 | Fluormodifizierte Purine..... | 30 |
| 3.1.3.3 | Fluormodifizierte Nukleobasen Analoga..... | 30 |
| 3.2 | Fluor in Wasserstoffbrücken..... | 32 |
| 3.2.1 | Kristallstrukturen von Fluorbenzolen | 34 |
| 4 | 1',2'-Didesoxy-1'-(2,4-difluortoluolyl)-β-D-ribofuranose und universelle Basen | 37 |
| 4.1 | 1',2'-Didesoxy-1'-(2,4-difluortoluolyl)- β -D-ribofuranose 19 | 37 |
| 4.1.1 | Chemische Synthese | 38 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.1.2 | Verhalten in biologischen Systemen..... | 41 |
| 4.2 | Universelle Basen..... | 45 |
| 5 | Aufgabenstellung..... | 49 |
| 6 | Chemische Synthesen..... | 51 |
| 6.1 | Auswahl der modifizierten Bausteine | 51 |
| 6.2 | Fluorbenzimidazole..... | 54 |
| 6.3 | Benzimidazol- und Fluorbenzimidazol-Nukleoside | 58 |
| 6.3.1 | Glykosylierung..... | 58 |
| 6.3.2 | Entschützung..... | 62 |
| 6.3.3 | Dimethoxytritylierung..... | 64 |
| 6.3.4 | Schützung der 2'-OH Funktion..... | 65 |
| 6.3.5 | Phosphitylierung | 67 |
| 6.3.6 | Syntheseübersichten..... | 68 |
| 6.4 | γ -Lacton..... | 72 |
| 6.5 | Benzol- und Fluorbenzol-Nukleoside | 74 |
| 6.5.1 | C-Glykosylierung und Dehydroxylierung | 75 |
| 6.5.2 | Debenzylierung | 79 |
| 6.5.3 | Dimethoxytritylierung..... | 81 |
| 6.5.4 | Schützung der 2'-OH Funktion..... | 82 |
| 6.5.5 | Phosphitylierung | 84 |
| 6.5.6 | Syntheseübersichten..... | 85 |
| 6.6 | Abasischer Baustein..... | 91 |
| 6.7 | Inosin..... | 93 |
| 6.7.1 | 3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5'-O-(4,4'- dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O- <i>tert.</i> -butyldimethylsilyl-inosin 131 | 93 |
| 6.7.2 | 3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5'-O-(4,4'-dimethoxytri- phenylmethyl)-2'-O- <i>tert.</i> -butyldimethylsilyl-6-O-(4-nitrophenylethyl)- inosin 137 | 95 |
| 6.8 | Die Triisopropylsilyloxymethyl-(TOM)-Schutzgruppe..... | 99 |
| 6.9 | 2-Cyanethoxydiisopropylchlorphosphoramidit 66 | 101 |
| 6.10 | Verteilungskoeffizienten und HPLC-Retentionszeiten..... | 102 |
| 6.10.1 | Verteilungskoeffizienten..... | 102 |

| | |
|--|------------|
| 6.10.2 HPLC-Retentionszeiten | 104 |
| 7 Kristallstrukturanalysen | 107 |
| 7.1 Theoretische Grundlagen | 107 |
| 7.2 Kristallstrukturanalysen der Fluorbenzol-Nukleoside | 111 |
| 8 Oligonukleotide | 117 |
| 8.1 Synthese von Oligonukleotiden | 117 |
| 8.1.1 Phosphordiester-Methode | 118 |
| 8.1.2 Phosphortriester-Methode | 118 |
| 8.1.3 H-Phosphonat-Methode | 119 |
| 8.1.4 Phosphoramidit-Methode | 120 |
| 8.2 Synthetisierte Oligonukleotide | 122 |
| 8.3 Aufreinigung von Oligonukleotiden | 125 |
| 8.4 Charakterisierung von Oligonukleotiden | 126 |
| 9 Spektroskopische Untersuchungen der Oligonukleotide | 131 |
| 9.1 UV-spektroskopische Untersuchungen | 131 |
| 9.1.1 Auswertung der UV-Schmelzkurven | 134 |
| 9.1.1.1 Bestimmung des T_m -Wertes | 134 |
| 9.1.1.2 Bestimmung der thermodynamischen Daten | 137 |
| 9.1.2 Ergebnisse der UV-Schmelzkurven | 142 |
| 9.1.3 Enthalpie – Entropie Kompensation | 159 |
| 9.2 CD-spektroskopische Untersuchungen | 161 |
| 9.2.1 CD-Spektroskopie | 161 |
| 9.2.2 Ergebnisse der CD-spektroskopischen Untersuchungen | 164 |
| 10 Zusammenfassung und Ausblick | 173 |
| 11 Experimenteller Teil | 177 |
| 11.1 Allgemeines | 177 |
| 11.1.1 Chromatographie | 177 |
| 11.1.2 Spektroskopie | 178 |
| 11.1.3 Massenspektrometrie | 179 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 11.1.4 | Elementaranalyse | 179 |
| 11.1.5 | Schmelzpunktbestimmung | 179 |
| 11.1.6 | Verwendete Chemikalien | 179 |
| 11.1.7 | Eingesetzte Pufferlösungen | 184 |
| 11.2 | Liste der synthetisierten Verbindungen | 185 |
| 11.3 | Darstellung und Eigenschaften der Einzelverbindungen | 190 |
| 11.4 | Synthese der Oligonukleotide | 298 |
| 11.5 | Aufreinigung und Analytik der Oligonukleotide | 299 |
| 11.5.1 | Aufreinigung durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie | 299 |
| 11.5.2 | Quantifizierung der Menge an Oligonukleotid | 299 |
| 11.5.3 | Bestimmung der Extinktionskoeffizienten von Oligonukleotiden | 299 |
| 11.6 | Aufnahme der UV-Schmelzkurven | 301 |
| 11.7 | CD-Spektroskopie der Oligonukleotide | 302 |
| 11.8 | Bestimmung der Verteilungskoeffizienten | 303 |
| 11.9 | Bestimmung der HPLC-Retentionszeiten | 303 |
| 12 | Literaturverzeichnis | 305 |
| 13 | Anhang | 327 |
| | Teil A: Kristallstrukturen | 328 |
| A1 | 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose <u>30</u> kristallisiert aus Wasser | 328 |
| A2 | 1'-Desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose <u>34</u> kristallisiert aus Wasser | 336 |
| A3 | 1'-Desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose <u>34</u> kristallisiert aus Methanol bei 20°C | 344 |
| A4 | 1'-Desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose <u>34</u> kristallisiert aus Methanol bei 4°C | 352 |
| A5 | 1'-Desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose <u>35</u> kristallisiert aus Methanol | 360 |
| A6 | 1'-Desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose <u>36</u> kristallisiert aus Methanol | 368 |
| A7 | 1'-Desoxy-1'-(2,4,6-trifluorphenyl)- β -D-ribofuranose <u>86</u> kristallisiert aus Methanol | 376 |

| | |
|-------------------------------------|-----|
| Teil B: Ausgewählte Spektren..... | 384 |
| Teil C: Abkürzungsverzeichnis | 399 |

1 Einleitung

Zu Beginn einer jeden wissenschaftlichen Tätigkeit stellt sich die Frage nach der Motivation der Arbeit. Auf dem Gebiet der Nucleinsäuren läßt sich diese Frage leicht beantworten. Die Nucleinsäuren sind die zentralen Moleküle des Lebens. Sie spielen in allen Bereichen der lebendigen Welt eine nicht zu unterschätzende Rolle. Man muß bei Nucleinsäuren zwischen der 2'-Desoxyribonucleinsäure (DNA) und der Ribonucleinsäure (RNA) unterscheiden. Während die DNA der Träger der genetischen Information in fast allen Bereichen der Tier- und Pflanzenwelt ist, ist die RNA hauptsächlich für die Umsetzung der Information der DNA in Proteine verantwortlich.

Obwohl die DNA so komplexe Moleküle wie Proteine codiert, ist ihre eigene Struktur doch als eher einfach anzusehen. Sie besteht aus einer Doppelhelix (Abb. 1.1), die aus zwei antiparallel zueinander orientierten Einzelsträngen aufgebaut ist. Die Einzelstränge wiederum bestehen aus einem Zucker-Phosphatrückgrat, an welchem die Nucleobasen befestigt sind. Die Sequenz der Nucleobasen ist der genetische Code, der die Aminosäuresequenz und damit auch die Struktur der Proteine codiert. Eine wichtige Eigenschaft der DNA-Struktur ist es, daß sie weitgehend unabhängig von der jeweiligen Sequenz der sie aufbauenden Nucleotide ist.

Im Unterschied zur DNA kann RNA weit komplexere Strukturen ausbilden. Obwohl sich DNA und RNA in ihrem molekularen Aufbau kaum unterscheiden, gibt es bei RNA, ähnlich wie bei Proteinen, Sekundär- und Tertiär- Strukturen. Während bei DNA der Zucker des Rückgrates 2'-Desoxyribose ist, ist es bei RNA Ribose. Außerdem ist die Nucleobase Thymin durch Uracil ersetzt.

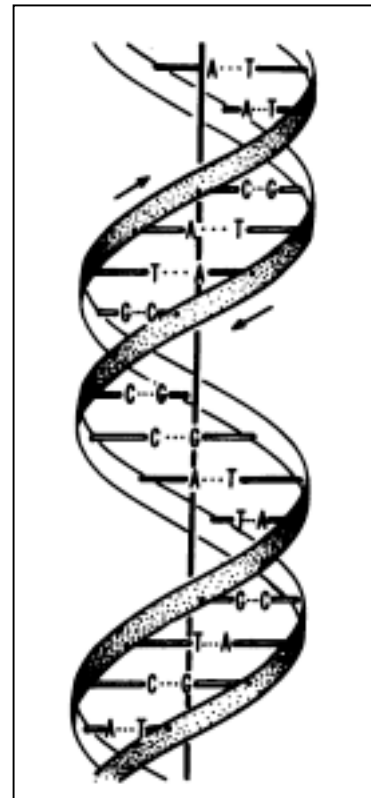


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der DNA Doppelhelix (Saenger, 1983)

Die Ausweitung der strukturellen Vielfalt geht allerdings mit einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Nukleasen einher, wodurch die durchschnittliche Lebenszeit der RNA gegenüber der DNA stark herabgesetzt ist.

Es stellt sich nun die Frage, wie die Wissenschaft zu diesen Ergebnissen gekommen ist. Dem *Homo sapiens sapiens*, dem denkenden Menschen also, war schon sehr früh bewußt, daß es einen Bauplan des Lebens geben müsse, nach dem sich neues Leben entwickelt. Das dieser Bauplan von der Elterngeneration auf die Nachkommen weitergegeben wird lehrten schon die Erfahrungen aus Ackerbau und Viehzucht. Erste wissenschaftliche Untersuchungen auf diesem Gebiet wurden von Gregor Mendel 1865 durch Kreuzungsversuche mit Erbsen durchgeführt. Es gelang Mendel die grundlegenden Gesetze der Vererbung aufzustellen (Mendel, 1865). Mendels Ergebnisse wurden allerdings kaum beachtet und gerieten schnell in Vergessenheit. Erst im Jahre 1900 wurden sie von Correns, Tschermak und de Vries wiederentdeckt. Zwischenzeitlich hatte Weismann (1883) die Chromosomen als Träger der Erbanlagen identifizieren können, wodurch die Mendelschen Gesetze mit ihren konstanten Zahlenverhältnissen verständlich wurden.

In den Jahren darauf wurde versucht, bestimmte Merkmale einzelnen Genen zuzuordnen und sie auf den Chromosomen zu lokalisieren. Schon zu dieser Zeit wurde die „Ein Gen ein Protein Hypothese“ aufgestellt.

Die DNA selbst wurde bereits 1868 von Johann Friedrich Miescher entdeckt, indem er sie aus Eiterzellen isolierte. Der Begriff Nukleinsäure wurde allerdings erst 1889 von Richard Altman eingeführt. Das es sich bei der DNA wahrscheinlich um die Erbsubstanz handelt konnte 1928 von Fred Griffith durch Untersuchungen an Pneumokokken gezeigt werden. Er vermischte eine nicht infektiöse mit einer abgetöteten infektiösen Pneumokokken-Form. Griffith konnte mit diesem Experiment wieder infektiöse Pneumokokken Stämme erhalten. Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet von Oswald Avery bestätigten die von Griffith erhaltenen Ergebnisse (Avery *et al.*, 1944). Bis 1944 hatte man allgemein angenommen, daß chromosomale Proteine die genetische Information in sich trügen und daß DNA nur eine zweitrangige Rolle spiele. Diese vorherrschende Meinung wurde aber durch die belegte Entdeckung von Avery, daß gereinigte DNA genetische Spezifität aufweist, widerlegt.

1951 entdeckte Erwin Chargaff, daß sich die Mengen an Adenin und Thymin sowie an Guanin und Cytosin in einem DNA Molekül jeweils entsprechen (Chargaff, 1951). Alexander Todd konnte durch Untersuchungen auf dem Gebiet der Synthese von Nukleinsäuren zeigen, daß Nukleotide durch Phosphordiesterbrücken verknüpft sind (Brown & Todd, 1952). Röntgenbeugungsuntersuchungen von Maurice H.F. Wilkins und Rosalind E. Franklin an

DNA Fasern zeigten, daß die DNA aus einer Doppelhelix, welche aus zwei antiparallelen Einzelsträngen aufgebaut ist, besteht. Der genaue Aufbau der DNA war allerdings immer noch unbekannt. Um dieses Problem zu lösen, trugen James D. Watson und Francis H.C. Crick alle bis dahin bekannten Einzelheiten zusammen und bauten ein Modell einer DNA Doppelhelix. Das Modell ließ sich nur verwirklichen, wenn die Zucker-Phosphat-Rückgrate nach außen und die Nukleobasen nach innen zeigten. Watson und Crick postulierten, daß Adenin und Thymin, verbunden über zwei Wasserstoffbrücken, und Guanin und Cytosin über drei Wasserstoffbrücken sogenannte Basenpaare bilden (Watson & Crick, 1953) (Abb. 1.2).

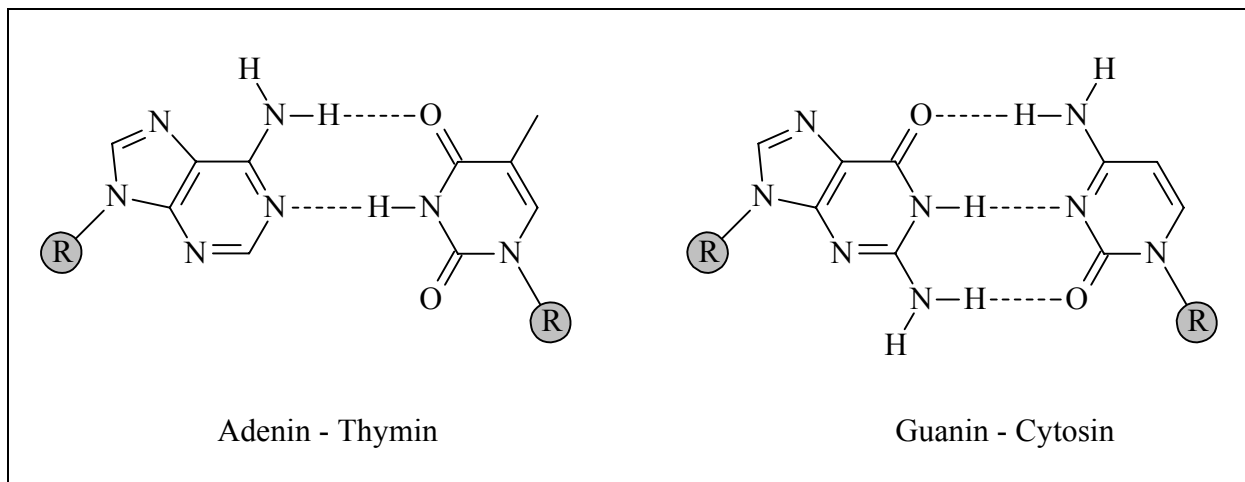


Abb. 1.2: Watson-Crick Basenpaare, R = 2'-Desoxyribose

Schon kurz nach der Veröffentlichung der DNA Struktur wurde ebenfalls von den selben Autoren ein Modell für die Replikation der DNA vorgeschlagen (Watson & Crick, 1953a). Auf dieser Grundlage wurde von Francis H.C. Crick das sogenannte zentrale Dogma der Molekularbiologie über den Informationsfluß in der Zelle aufgestellt. Danach ist die DNA für die Speicherung der genetischen Information in der Zelle verantwortlich. Diese wird bei der Transkription im Zellkern in mRNA übersetzt und bei der Translation an den Ribosomen im Cytoplasma in eine Proteinsequenz umgeschrieben. Dieses Grundprinzip ist auch heute mit einigen Ergänzungen noch gültig (Abb. 1.3). Ergänzt werden mußte z. B. die Übersetzung von genetischer Information von RNA in DNA bei der reversen Transkription, die Teil des Lebenszyklus von Retroviren (z.B. HIV) ist. Seit einigen Jahren wird auch über die sogenannte Prionen-Hypothese kontrovers diskutiert, die zu einer Verbreitung von Enzephalopathien führt (z.B. BSE, CJD). Hierbei wird zwar nicht die Aminosäuresequenz eines Proteins übertragen, sondern „nur“ die Information für dessen dreidimensionale Struktur. Es handelt sich dabei aber dennoch um eine Übertragung von Information von Protein zu Protein. Das diese Art der Informationsübertragung höchst wahrscheinlich nicht nur innerhalb einer Art auftreten kann, sondern auch von einer Tierart zu einer anderen

möglich ist, zeigen neuere Untersuchungen zum Thema BSE beim Rind und CJD beim Menschen (Almond & Pattison, 1997).

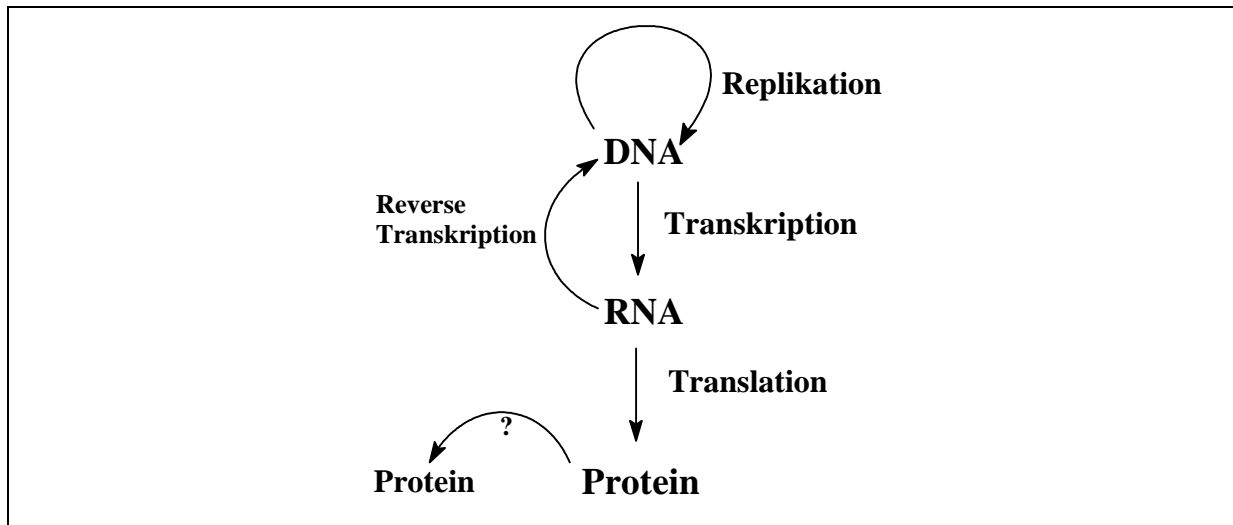


Abb. 1.3: Erweitertes Schema des Informationsflusses in biologischen Systemen

Nach den Entdeckungen von Watson und Crick wandte sich das Interesse der Translation zu. In der ersten Hälfte der sechziger Jahre wurde die Zuordnung der Nukleotidtripletts der Codons der mRNA zu den zugehörigen Aminosäuren aufgeklärt (Ochoa, 1963; Nirenberg *et al.*, 1963; Khorana, 1965). Dadurch wurde klar, daß viele Aminosäuren durch mehrere Codons codiert werden und daß drei Codons keiner Aminosäure entsprechen und dadurch einen Abbruch der Sequenz codieren. Ferner, daß das Basentriplett AUG neben dem Code für die Aminosäure Methionin auch der Code des Startsignals der Proteinsynthese ist.

Durch die Entdeckung sogenannter Restriktionsenzyme wurde Ende der sechziger Jahre das Tor zur Gentechnik aufgestoßen (Linn & Arber, 1968; Kelly & Smith, 1970; Smith & Wilcox, 1970). Dadurch war es erstmals möglich, lange DNA Sequenzen zu schneiden und durch Ligasen wieder neu zu verknüpfen. Allerdings dauerte es bis Ende der siebziger Jahre bis leistungsstarke Sequenziermethoden zur Verfügung standen. Dies waren die chemische Sequenziermethode von Allan M. Maxam und Walter Gilbert (Maxam & Gilbert, 1977) und die enzymatische Sequenziermethode von Frederick Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Die Methode von Sanger wurde im Laufe der folgenden Jahre so weit verbessert und automatisiert, daß es im Jahr 2000 sogar gelang, das ca. 3,3 Milliarden Basenpaare umfassende menschliche Genom zu entschlüsseln (Marshall, 2000). Auch die Genome anderer Tier- und Pflanzenarten wie z.B. von *Drosophila Melanogaster* (Fruchtfliege) wurde im Jahr 2000 entschlüsselt (Adams *et al.*, 2000). Dem Wissen über die Sequenz eines Genoms folgt nun die Frage nach ihrer Funktion und Bedeutung im Organismus.

Um diese Fragen beantworten zu können bedient sich die moderne Wissenschaft weiterer wichtiger Entwicklungen der letzten 20 Jahre. Dies sind, die Möglichkeit beliebige kurze DNA oder RNA Sequenzen chemisch zu synthetisieren oder lange Fragmente enzymatisch darzustellen. Im Falle der chemischen Synthese hat sich heutzutage die von Serge L. Beaucage und Marvin H. Caruthers entwickelte Phosphoramidit-Methode zur automatisierten Festphasensynthese kurzer Oligonukleotide durchgesetzt (Beaucage & Caruthers, 1981; Caruthers *et al.*, 1987). Die Entwicklung der Polymerasenkettenreaktion (PCR) durch Kary B. Mullis brachte hingegen den Durchbruch bei der Synthese längerer DNA Fragmente (Saiki *et al.*, 1985).

Heute weiß man um die zentrale Rolle von Nucleinsäuren in den Prozessen des Lebens. Sie dienen der Speicherung und Weitergabe der genetischen Information (DNA, mRNA), verknüpfen diese Welt mit der der Proteine (tRNA), sind essentieller Bestandteil funktioneller Einheiten der Zelle, wie z. B. der Ribosomen (rRNA) und besitzen sogar enzymatische Aktivität (Ribozyme).

2 Aufbau und Struktur von Nukleinsäuren

2.1 Aufbau von Nukleinsäuren

In der Natur kommen zwei Arten von Nukleinsäuren vor. Es sind die 2'-Desoxyribonukleinsäure (DNA) und die Ribonukleinsäure (RNA). Sie bestehen aus einer langen Abfolge von 2'-Desoxyribonukleotiden bei DNA bzw. Ribonukleotiden bei RNA. Während die Basen die genetische Information tragen erfüllen die Zucker- und Phosphatgruppen eine strukturelle Aufgabe.

Der Zucker ist bei DNA 2'-Desoxy-D-ribose und bei RNA D-Ribose. Die Verknüpfung der Zucker mit den Phosphordiestergruppen erfolgt über die 3'- und 5'- Hydroxylfunktionen der D-Ribose bzw. der 2'-Desoxy-D-ribose. Die heterozyklischen Nucleobasen sind stets β -N-glykosidisch mit dem 1'-Kohlenstoffatom der Zucker verbunden. Die Nucleobase kann relativ zum Zucker zwei Hauptorientierungen über die glykosidische C1'-N-Bindung einnehmen. Sie werden über den Torsionswinkel χ (bei Purinen: O4'-C1'-N9-C4 und bei Pyrimidinen: O4'-C1'-N1-C2) definiert (Abb. 2.1) (IUPAC, 1983). In der *anti*-Konformation zeigt der Hauptteil des Heterozyklus vom Zucker weg. Bei natürlichen Nucleosiden liegt normalerweise stets die *anti*-Konformation vor, eine Ausnahme bilden die Purine in der Z-DNA.

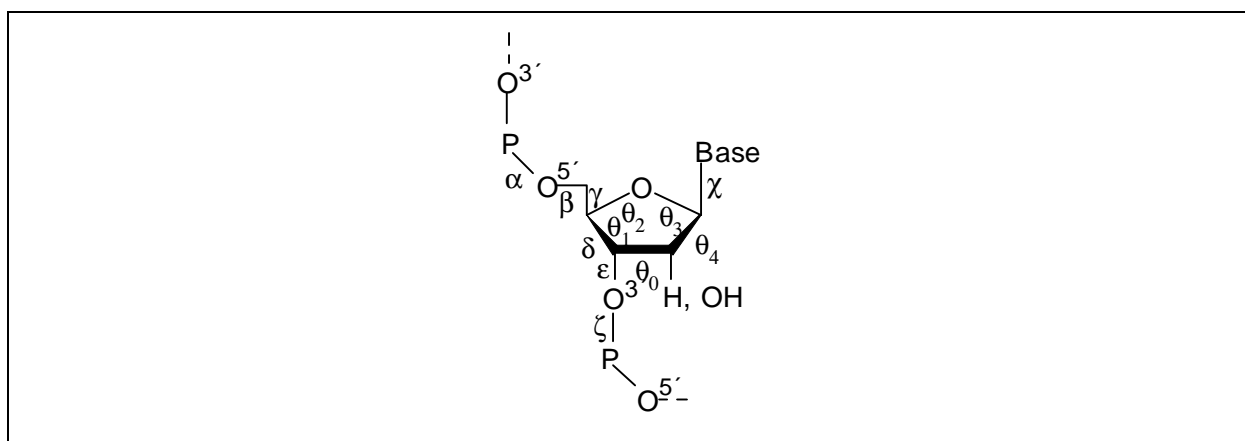


Abb. 2.1: Torsionswinkel bei Nucleotiden (Blackburn & Gait, 1996)

Die stickstoffhaltigen Nucleobasen sind Derivate des Purins bzw. des Pyrimidins. Als Purine kommen in der DNA Adenin (A) und Guanin (G), als Pyrimidine Thymin (T) und Cytosin (C) vor. In der RNA ersetzt Uracil (U) das Thymin. Es unterscheidet sich von diesem durch das Fehlen der Methylgruppe in 5-Position. Ein Nucleosid besteht aus heterozyklischer Base und Zucker, wobei an die Nummern der Kohlenstoffatome des Zuckers, zur Unterscheidung von denen der Nucleobase, ein Strich angefügt wird (IUPAC, 1983).

Die vier Nucleoside der DNA heißen Desoxyadenosin, Desoxyguanosin, Desoxythymidin und Desoxycytidin. In der RNA bezeichnet man die Nucleoside als Adenosin, Guanosin, Uridin und Cytidin. Unter Nucleotiden versteht man die Phosphatester der Nucleoside. Ein schematischer Aufbau einer DNA Kette ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

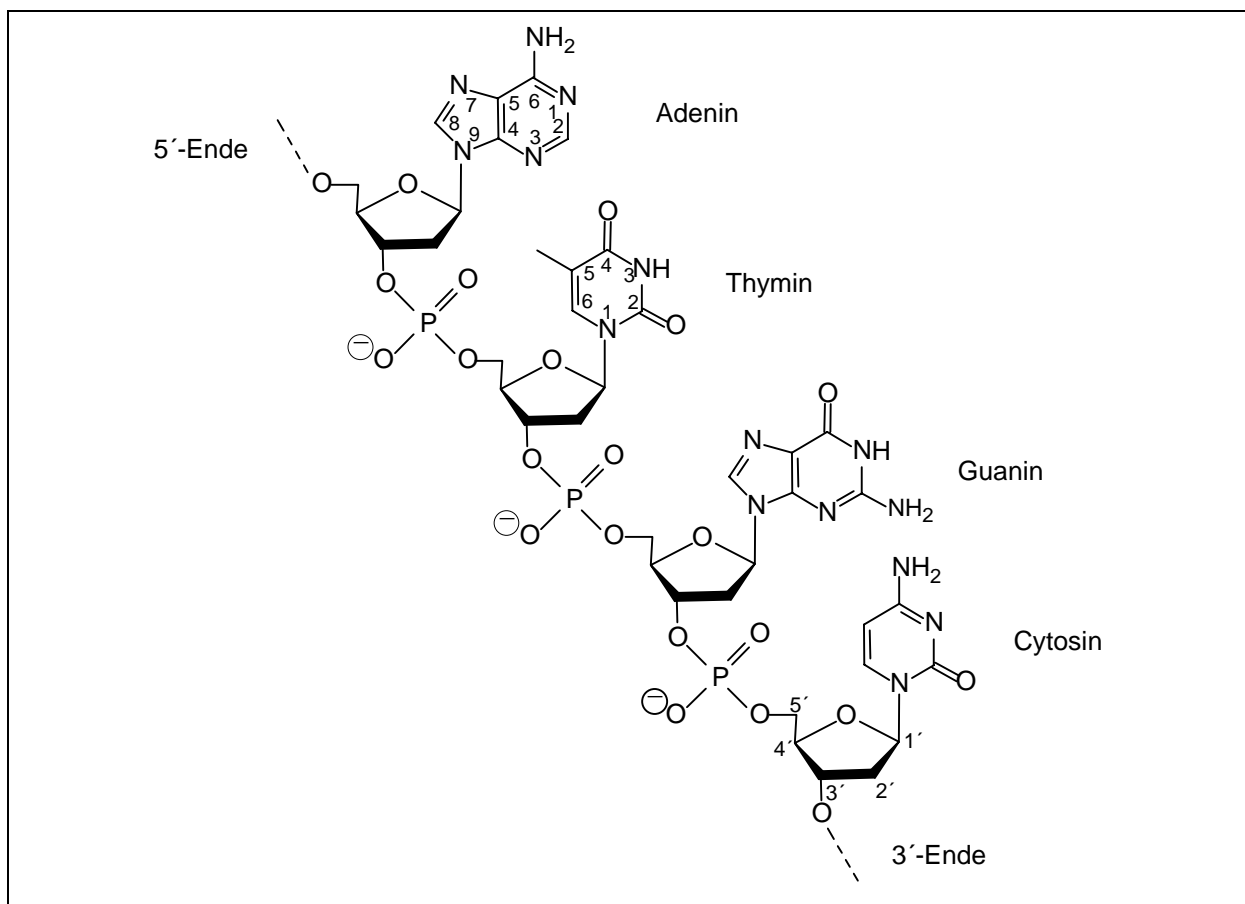


Abb. 2.2: Schematischer Aufbau einer DNA mit Nummerierung der Nucleobasen

Durch die Phosphatgruppen tragen die Nucleinsäuren Ladungen. Dieser polyanionische Charakter der Nucleinsäuren bewirkt ihre gute Wasserlöslichkeit. Die Nucleobasen können verschiedene tautomere Formen annehmen. Es existiert sowohl eine Keto-Enol- als auch eine Amino-Imino-Tautomerie. Spektroskopische Untersuchungen haben belegt, daß alle fünf natürlich vorkommenden Basen zu über 99,99% als Amino- bzw. Keto-Tautomer vorliegen.

Eine DNA Doppelhelix (B-DNA) ist nun folgendermaßen aufgebaut. Zwei Nucleotidstränge bauen die Doppelhelix auf. Sie verlaufen dabei antiparallel zueinander und bilden eine rechtsgängige Helix. Das Zucker-Phosphatrückgrat sitzt außen an der Helix, während die Nucleobasen nach innen stehen. Die Ringebene der Nucleobasen steht senkrecht auf der Helixachse, während die Zucker wiederum fast senkrecht zu den Nucleobasen angeordnet sind. Die beiden Nucleotidstränge sind durch Wasserstoffbrücken zwischen den sogenannten Watson-Crick Basenpaaren, die von den komplementären Nucleobasen Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin gebildet werden, miteinander verbunden. Die Doppelhelix wird außerdem durch sogenannte π - π -Basenstapelungswechselwirkungen zwischen den Nucleobasen des gleichen Stranges stabilisiert. Dadurch, daß sich die glykosidischen Bindungen eines Basenpaares nicht diametral gegenüberliegen entsteht eine große und eine kleine Furche. Neben der B-DNA-Struktur, wie sie von Watson und Crick vorgeschlagen wurde, sind heute noch mehrere andere DNA-Strukturen bekannt. Sie werden näher in Kapitel 2.2 beschrieben.

Einen ebenfalls großen Einfluß auf die Struktur der DNA hat die Konformation des Zuckers, da der Furanosering nicht planar ist. Er kann in der E-Konformation (envelope) oder in der T-Konformation (twist) vorliegen. Bei der envelope-Konformation liegen vier Atome des Furanoserings in einer Ebene und das fünfte steht ca. 0,5 Å nach oben oder unten aus der Ebene heraus. Bei der twist-Konformation liegen drei Zentren in einer Ebene und zwei benachbarte Zentren stehen eines nach oben und eines nach unten aus der Ebene heraus. Atome, die aus dieser drei oder vier Zentren-Ebene auf der selben Seite stehen wie C5' werden mit *endo*, solche die auf der anderen Seite wie C5' stehen mit *exo* bezeichnet (Abb. 2.3).

Während die Zucker in DNA C2'-*endo* (S) Konformation besitzen, liegen sie in RNA in C3'-*endo* Konformation vor.

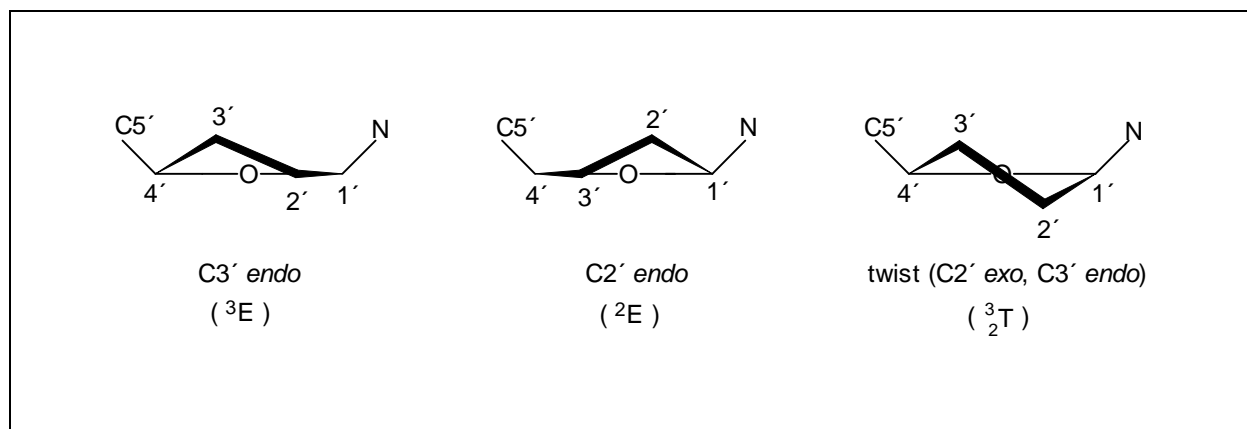


Abb. 2.3: Konformationen des Furanoseringes

2.2 DNA-Strukturen

Die Strukturen von DNA Doppelhelices lassen sich in verschiedene Konformationstypen einteilen. Die wichtigsten sind zum einen die rechtsgängigen A-DNA und B-DNA Typen und zum anderen der linksgängige Z-DNA Typ.

Die A-DNA entsteht durch Wasserentzug aus der B-DNA, sie hat im Vergleich zu dieser eine recht breite Gestalt (Abb. 2.4).

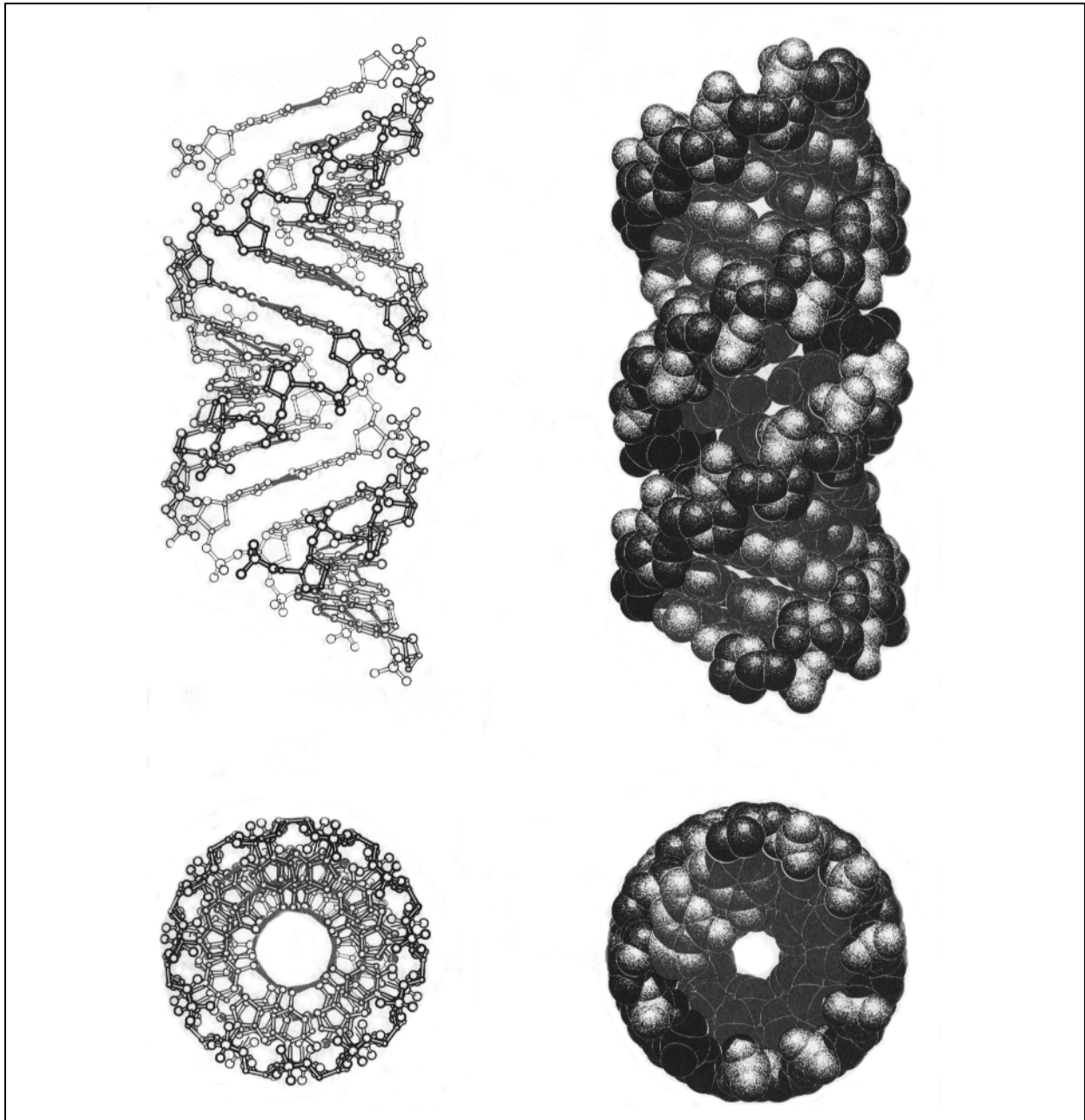


Abb. 2.4: Struktur einer A-DNA (Saenger, 1984)

Ihr Helixdurchmesser beträgt 2,55 nm, die Höhe pro Basenpaar 0,23 nm. In der rechtsgängigen Helix ist die Konformation der glykosidischen Bindung immer *anti*. 11

Basenpaare bilden eine volle Helixwindung, die Ganghöhe beträgt 2,53 nm. Besonders charakteristisch für A-DNA ist die starke Neigung der Basenpaare zur Helixachse, sie beträgt etwa 19° . Die große Furche ist eng und sehr tief, die kleine Furche sehr breit und flach. Die Zuckerkonformation ist *C3'-endo*. Die Orientierung über die C1'-N-glykosidische Bindung ist charakteristisch mit einem Torsionswinkel χ von -160° ($-ap$).

Der Helixdurchmesser der B-DNA beträgt 2,37 nm, die Höhe pro Basenpaar 0,34 nm. Die Helix ist rechtsgängig mit der *anti*-Konformation der glykosidischen Bindung (Abb. 2.5).

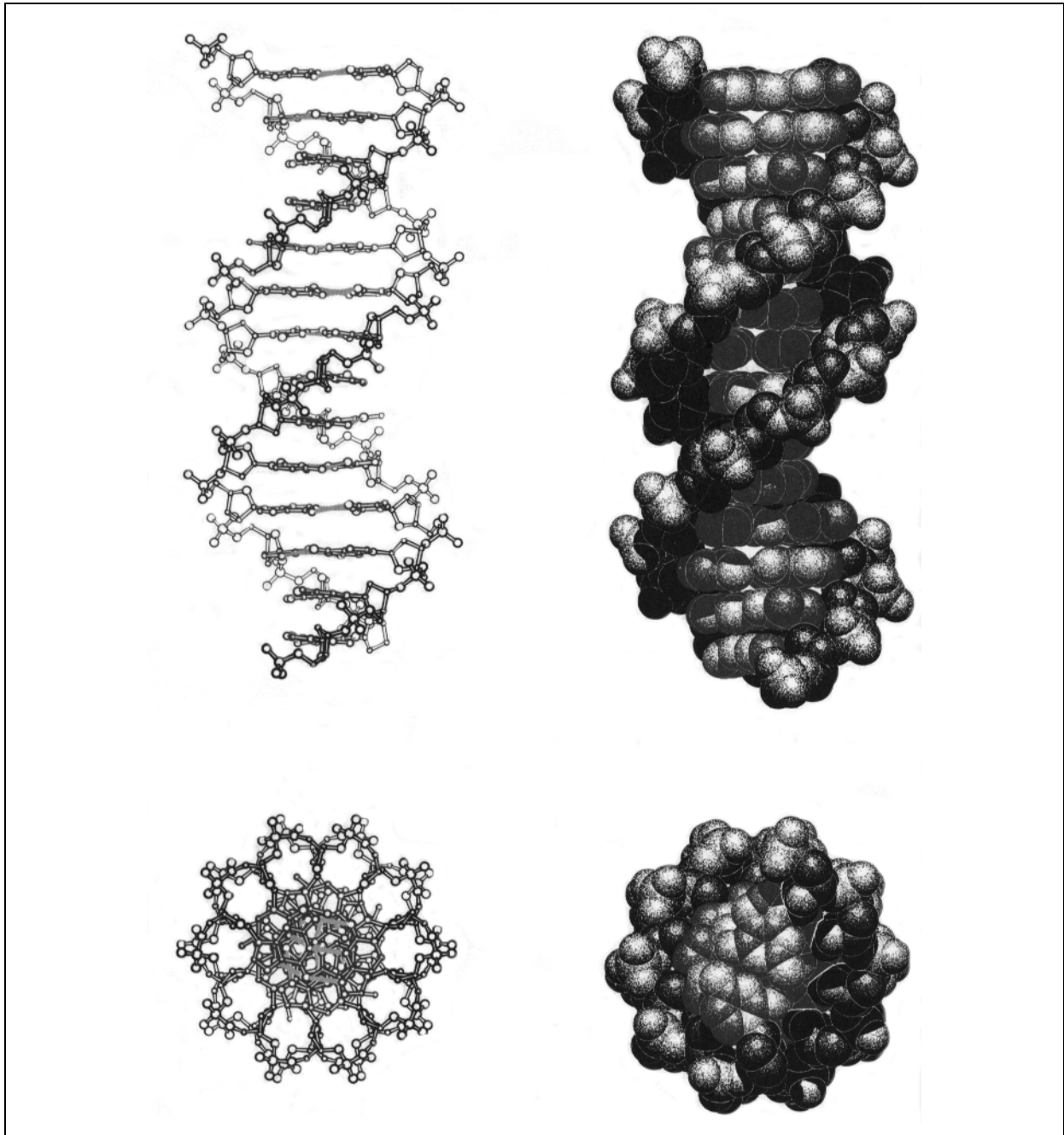


Abb. 2.5: Struktur einer B-DNA (Saenger, 1984)

Die Anzahl der Basenpaare pro Helixwindung beträgt 10,4. Die Ganghöhe ist gleich 3,54 nm. Die Basenpaare sind in Bezug auf die Helixachse lediglich um 1° geneigt. Die große Furche ist breit und ziemlich tief, während die kleine Furche ebenfalls tief aber schmal ist. Die Zuckerkonformation ist *C2'-endo*. Die Orientierung über die C1'-N-glykosidische Bindung zeigt einen Torsionswinkel χ von -120° ($-ac$). Im Falle der B-DNA, deren strukturelle Stabilität eng mit dem Vorhandensein von Wasser zusammenhängt, werden hochgeordnete Wassermoleküle sowohl in der großen als auch in der kleinen Furche gefunden. Im Gegensatz zu A- und B-DNA ist die Z-DNA linksgängig (Abb. 2.6).

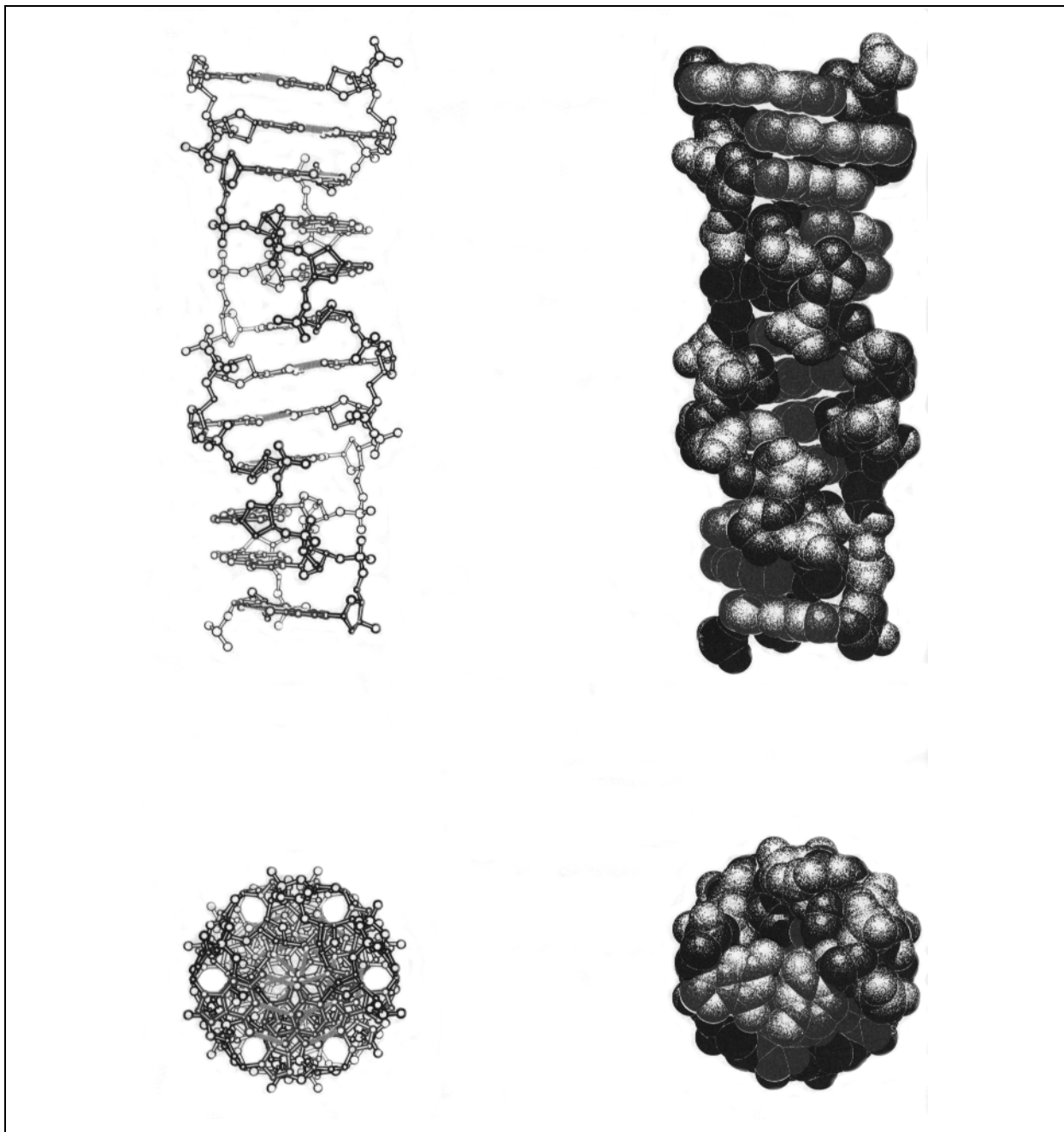


Abb. 2.6: Struktur einer Z-DNA (Saenger, 1984)

Sie hat eine langgezogene Gestalt mit einem Helixdurchmesser von lediglich 1,84 nm. Die Höhe pro Basenpaar beträgt 0,38 nm. 12 Basenpaare ergeben eine volle Windung der Helix. Die Ganghöhe beträgt 4,56 nm, die Neigung der Basenpaare zur Helixachse etwa 9°. Nur die Pyrimidinbasen haben *anti*-Konformation der glykosidischen Bindung. Die große Furche ist flach, die kleine Furche sehr eng und tief.

Zum besseren Vergleich der Unterschiede der einzelnen DNA-Typen sind die charakteristischen Daten von A-, B- und Z-DNA nochmals in Tabelle 2.1 zusammengefaßt.

| | A-DNA | B-DNA | Z-DNA |
|---|----------------------|-------------------------|---|
| Gestalt | am breitesten | zwischen A- und Z-Typ | am längsten |
| Höhe pro Basenpaar | 0,23 nm | 0,34 nm | 0,38 nm |
| Helixdurchmesser | 2,55 nm | 2,37 nm | 1,84 nm |
| Verwindungsrichtung | rechtsgängig | rechtsgängig | linksgängig |
| Konformation der glykosidischen Bindung | <i>anti</i> | <i>anti</i> | <i>anti</i> bei C und T <i>syn</i> bei G und A |
| Anzahl der Basenpaare pro Helixwindung | 11 | 10,4 | 12 |
| Ganghöhe | 2,46 nm | 3,32 nm | 4,56 nm |
| Neigung der Basenpaare zur Helixachse | 19° | 1° | 9° |
| große Furche | eng und sehr tief | breit und ziemlich tief | flach |
| kleine Furche | sehr breit und flach | eng und ziemlich tief | sehr eng und tief |

Tabelle 2.1: Vergleich von A-, B- und Z-DNA (Stryer, 1991)

Neben den Wasserstoffbrücken der Watson-Crick Basenpaare gibt es noch weitere Faktoren, die die Struktur und Stabilität von Nukleinsäuren maßgeblich beeinflussen. Dies sind vor allem die Hydratation der Helix und die sogenannten π - π Basenstapelungswchselwirkungen (base stacking). Einzelheiten hierzu befinden sich in Kapitel 2.4.

2.3 RNA Strukturen

Natürliche in Zellen vorkommende RNA läßt sich in drei Familien einteilen. Dies sind die messenger RNA (mRNA), die transfer RNA (tRNA) und die ribosomale RNA (rRNA). Ihr Vorkommen in der Zelle ist dabei höchst unterschiedlich. Während rRNA ca. 80-85% aller RNA in einer Zelle ausmacht, sind es nur 10-15% tRNA und 2-5% mRNA (Blackburn & Gait, 1996).

Im Hinblick auf die große Diversität der auf speziellen dreidimensionalen RNA Strukturen basierenden biologischen Funktionen muß RNA eine große Variationsbreite von Sekundär- und Tertiärstrukturen ausbilden können.

Eine RNA Doppelhelix hat immer die Form einer A-DNA. Ein Übergang in die B-Form ist aus sterischen Gründen nicht möglich. Einem Übergang steht die 2'-Hydroxylgruppe im Wege. In der B-Form würde sie zu nahe an die Phosphatgruppe und an die nächste Nucleobase heranstehen. Da RNA im Gegensatz zu DNA ein Einzelmolekül ist, das keinen Gegenstrang besitzt, liegt eine Helix nur vor, wenn sich zwei komplementäre Bereiche dieses Einzelstranges zu einer Helix verbinden. Deshalb gibt es auch längere einzelsträngige Bereiche in RNA. Weitere Sekundärstrukturen sind sogenannte Auswölbungen (bulges), interne Schleifen (internal loops), Haarnadelschleifen (hairpin loops) und Kreuzungen (junctions) (Abb. 2.7 und 2.8).

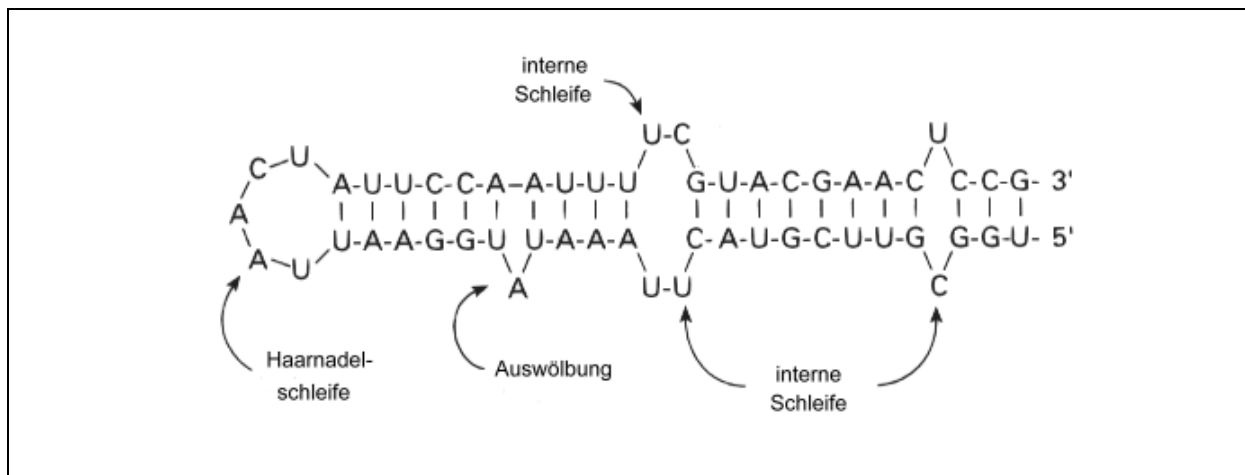


Abb. 2.7: RNA Sekundärstrukturen

Auswölbungen (bulges) sind kurze Bereiche eines Stranges, die ungepaart sind, während der Rest dieses und der gesamte Gegenstrang eine Doppelhelix bilden. Die Auswölbung kann aus einer aber auch aus mehreren Nucleotiden bestehen. Interne Schleifen (internal loops) ihrerseits bestehen aus ungepaarten sich gegenüber liegenden Nucleotiden. Links und rechts

dieser Schleifen geht die RNA wieder in eine Doppelhelix über. Erfahrungsgemäß sind solche interne Schleifen oft sehr reich an Purinen. Weit verbreitet sind auch sogenannte Haarnadelschleifen (hairpin loops). Dabei bildet ein Strang eine kurze Schleife, in der er seine Richtung ändert, und sich anschließend mit sich selbst zu einer Doppelhelix verbindet (Abb. 2.7). Diese Schleifen bestehen in der Regel aus vier bis sieben Nucleotiden. Am weitesten verbreitet sind Haarnadelschleifen aus vier Nucleotiden.

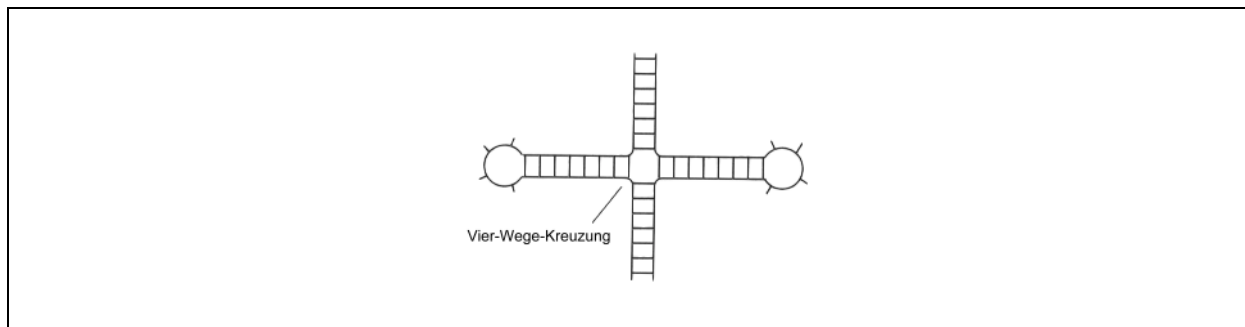


Abb. 2.8: RNA Sekundärstruktur

Eine weitere Sekundärstruktur ist die sogenannte Kreuzung (junction). In einer Kreuzung treffen sich mehrere helicale Bereiche in einem Punkt (Abb. 2.8). Dabei variiert die Größe der Kreuzungen von drei bis fünf Wege Kreuzungen.

Neben der Sekundärstruktur ist RNA auch in der Lage eine Tertiärstruktur auszubilden.

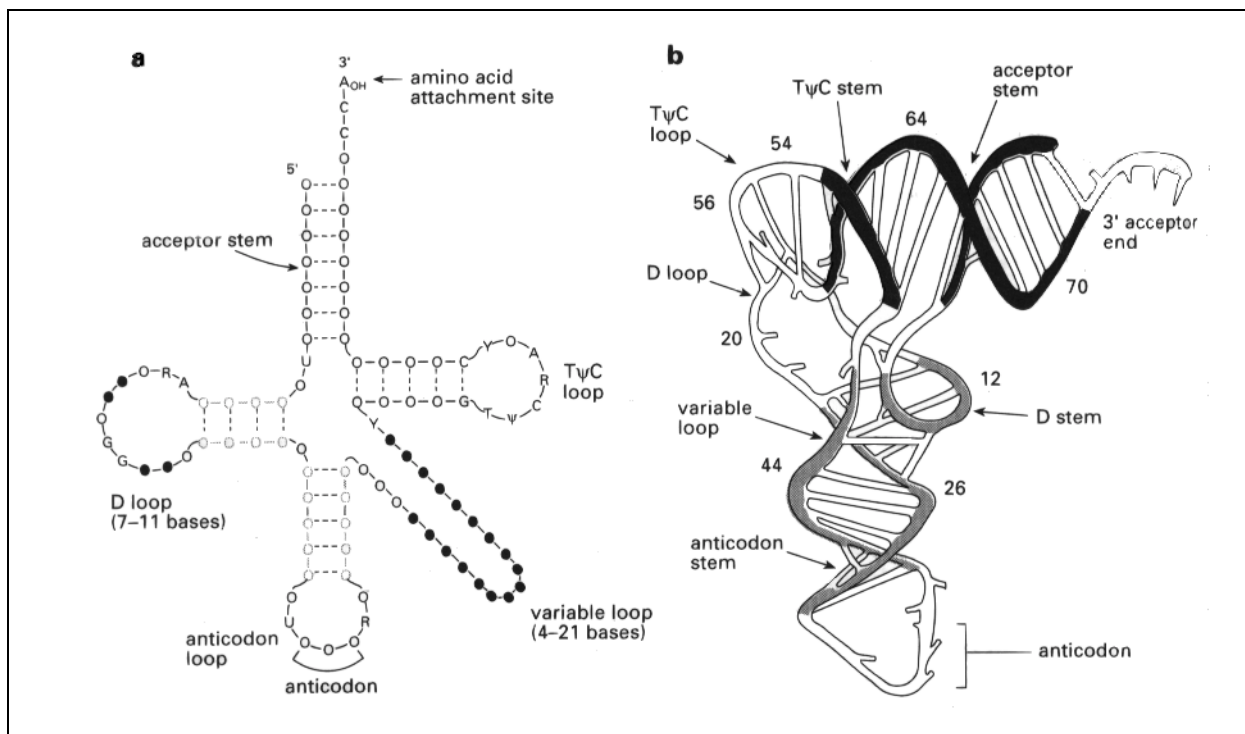


Abb. 2.9: a) Kleeblatt Sekundärstruktur einer tRNA; b) Dreidimensionale Tertiärstruktur einer tRNA (Blackburn & Gait, 1996)

Die Tertiärstruktur wird durch Wasserstoffbrücken und Basenstapelungswechselwirkungen stabilisiert. Abbildung 2.9 zeigt in Teil a die Sekundärstruktur einer tRNA und in Teil b die wirkliche dreidimensionale Tertiärstruktur derselben tRNA (Blackburn & Gait, 1996). Die definierte Tertiärstruktur vieler RNA Moleküle ist für ihre biologische Funktion unerlässlich.

2.4 Duplex stabilisierende Wechselwirkungen

2.4.1 Wasserstoffbrücken

Wasserstoffbrücken können sowohl zwischen ungeladenen als auch zwischen geladenen Molekülen entstehen. Dabei teilen sich jeweils zwei Atome ein Wasserstoffatom. Das Atom, an das der Wasserstoff fester gebunden ist wird Wasserstoffdonor, daß andere Wasserstoffakzeptor genannt. Der Wasserstoffakzeptor hat eine partielle negative Ladung, die den Wasserstoff anzieht. Das Donoratom in einer Wasserstoffbrücke ist in biologischen Systemen ein Sauerstoff- oder ein Stickstoffatom mit kovalent gebundenem Wasserstoff. Als Akzeptor tritt ebenfalls ein Sauerstoff- oder Stickstoffatom auf. Wasserstoffbrücken sind stärker als van-der-Waals-Bindungen, aber viel schwächer als kovalente Bindungen. Entsprechend ist auch die Länge einer Wasserstoffbrücke zwischen der einer van-der-Waals- und der einer kovalenten Bindung. Eine wichtige Eigenschaft von Wasserstoffbrücken ist ihre Richtungscharakteristik. Die stärkste Bindung liegt vor, wenn Donor-, Akzeptor- und Wasserstoffatom in einer Linie liegen. Je weiter diese die Ideallinie verlassen und der Bindungswinkel aufgeweitet wird, desto schwächer wird die entsprechende Wasserstoffbindung (Stryer, 1991).

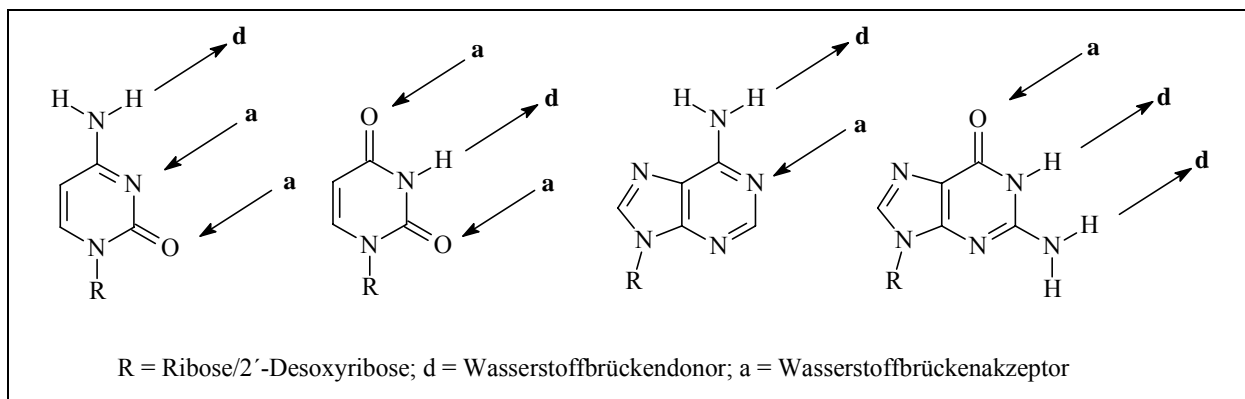


Abb. 2.10: Wasserstoffbrückendonor und -akzeptor Verteilungsmuster in natürlich vorkommenden Nucleosiden

Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb von Oligonucleotiden weisen eine Stärke von ca. 6-10 kJ/mol auf. Der Abstand zwischen Donor und Akzeptor einer Wasserstoffbrücke liegt zwischen 2,8 und 2,95 Å. Das Donor und Akzeptor Verteilungsmuster (Abb. 2.10) der einzelnen Nucleobasen ist entscheidend für die Bildung der Watson-Crick Basenpaare.

Neben Watson-Crick Basenpaaren gibt es noch Hoogsteen Basenpaare (Hoogsteen, 1959). Bei ihnen bilden sich die Wasserstoffbrücken zwischen der Watson-Crick Seite eines Pyrimidins und der Watson-Crick abgewandten Seite (Hoogsteen Seite) eines Purins. Sie spielen in einer Doppelhelix allerdings keine Rolle. Im Gegensatz dazu tritt die sogenannte Wobble-Basenpaarung bei RNA vereinzelt auf. Dabei werden die bindenden Nucleobasen leicht gegeneinander verschoben, so daß die Donor-Akzeptorverteilung für die Bildung von Wasserstoffbrücken wieder paßt. Beispiele hierfür sind das Uridin-Guanosin und das Uridin-Inosin Wobble-Paar (Abb. 2.11).

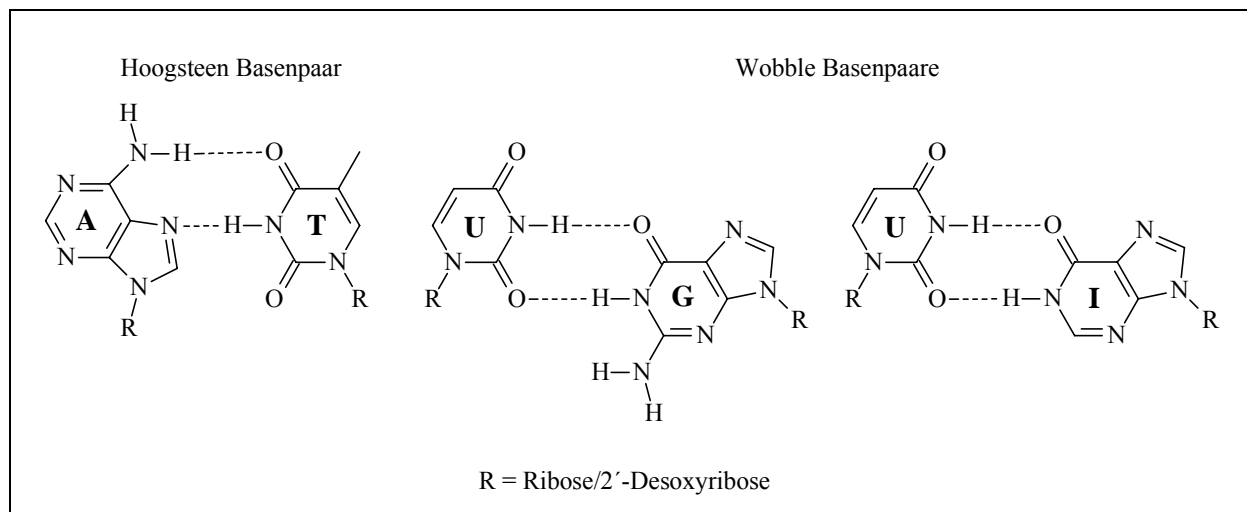


Abb. 2.11: Hoogsteen und Wobble Basenpaare

2.4.2 Basenstapelungswchselwirkungen

Basenstapelungswchselwirkungen zählen neben Wasserstoffbrückenbindungen zu den wichtigsten stabilisierenden Kräften einer Doppelhelix. Die π - π Basenstapelungswchselwirkungen wirken zwischen den Nucleobasen einer Helix. Dabei liegen die benachbarten Nucleobasen nicht exakt übereinander, da dies aus strukturellen Gründen nicht möglich ist. Die Verschiebung hängt maßgeblich vom Typ (A, B oder Z) und von der Sequenz der DNA ab. Auch Modifikationen wirken sich auf die Lage zweier Nucleobasen zueinander aus. So liegen die Bromatome an 8-Position bromierter Purine bevorzugt über dem Fünfring-Heterozyklus des benachbarten Purins. Die Lage der Basen zueinander

bestimmt aber maßgeblich die Stärke der Basenstapelungswechselwirkung. Abbildung 2.12 zeigt die verschiedenen Möglichkeiten der Orientierung und Verschiebung zweier Basen zueinander mit der entsprechenden Cambridge DNA Nomenklatur (Dickerson *et al.*, 1989).

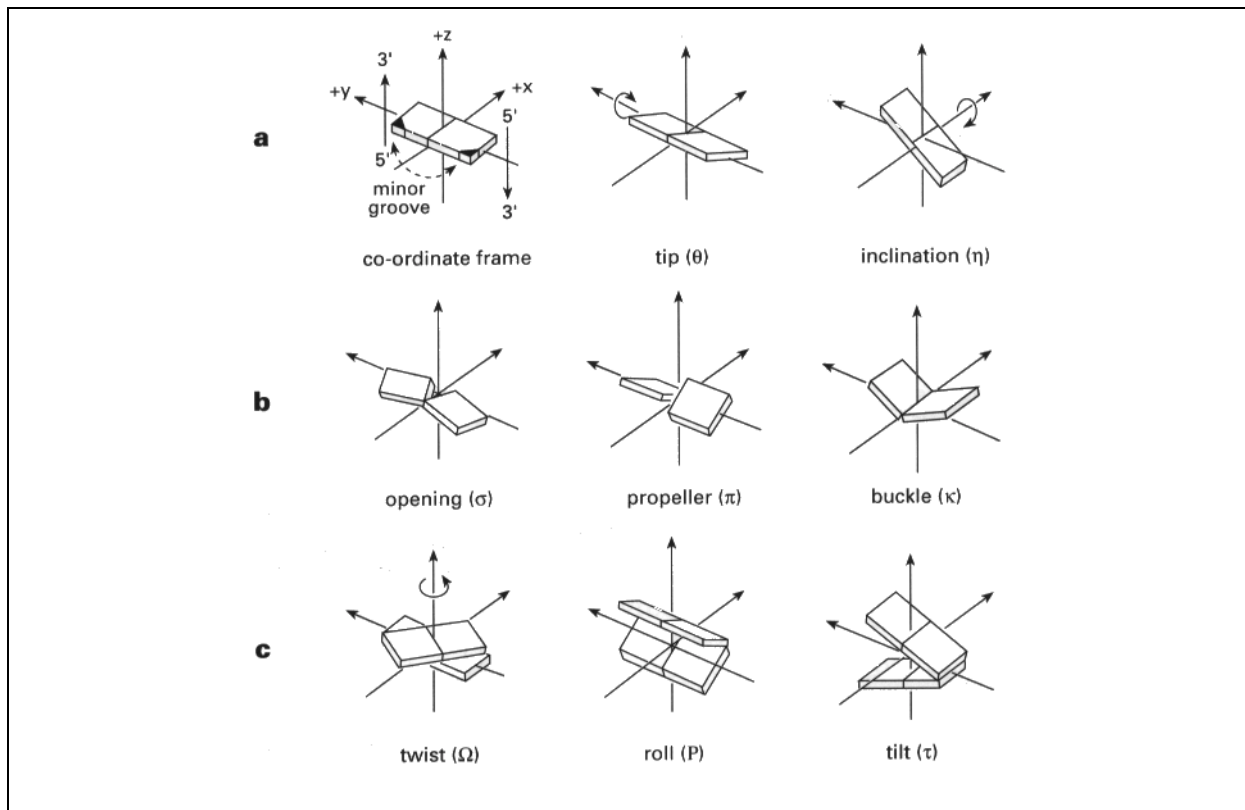


Abb. 2.12: Illustration der Bewegungsmöglichkeiten gepaarter Nucleobasen (Blackburn & Gait, 1996)

Hunter (Hunter, 1993) hat vier prinzipielle energetische Beiträge für π - π Wechselwirkungen zwischen DNA Basenpaaren identifiziert. Dies sind

1. van der Waals Wechselwirkungen (variieren mit r^{-6})
2. Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen partiellen Atomladungen (*atom-atom*; variieren mit r^{-1})
3. Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Ladungsverteilungen verbunden mit der π -Elektronendichte unter und über der Ebene der Nucleobase ($\pi\sigma$ - $\pi\sigma$; variieren mit r^{-5})
4. Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Ladungsverteilungen verbunden mit der π -Elektronendichte und den partiellen Atomladungen (*atom- $\pi\sigma$* ; variieren mit r^{-4})

Mit Hilfe dieser Zerlegung der Basenstapelungswechselwirkung in die einzelnen Teilkkräfte lassen sich die Orientierungen der einzelnen Nucleobasen in einem Oligonucleotid betrachten.

Studien über die Assoziation von Nucleobasen und Nucleosiden in wässrigen Lösungen lassen den Schluß zu, daß der Prozeß der Basenstapelung reversibel mit einem konstanten Beitrag an

freier Enthalpie für jeden Schritt abläuft. Daraus folgt, daß durch Zugabe einer Nucleobase zu einer anderen oder zu einem Verbund anderer gestapelter Nucleobasen sich die freie Enthalpie additiv und nicht kooperativ verhält. Die Stärke der Basenstapelungswechselwirkung ist für Purine und Pyrimidine unterschiedlich. Die Wechselwirkungen zwischen zwei Purinen sind dabei stärker als zwischen einem Purin und einem Pyrimidin, welche ihrerseits wieder stärker sind als solche zwischen zwei Pyrimidinen (Saenger, 1984). Sind die Nucleobasen wie in Oligonucleotiden miteinander verbunden, so bewirken die Basenstapelungswechselwirkungen, daß sich der Einzelstrang in einer helikalen Struktur orientiert (Haasnoot & Altona, 1979).

2.4.3 Solvatation und Salzeffekte

Das natürliche Solvatationsmittel von Nucleinsäuren ist Wasser. Wasser ist aber nicht nur ein Medium, welches die Nucleinsäuren in Lösung hält, sondern es ist auch mit für die Stabilisierung der Sekundär- und Tertiärstrukturen verantwortlich (Edelhoch & Osborne, 1976). Der Grad der Hydratation einer DNA spielt auch eine Rolle für die Ausbildung der Sekundärstruktur einer DNA. Eine hohe Hydratation fördert eine B-DNA, während eine niedrigere Hydratation eine A-DNA fördert.

Die Hydratation von Makromolekülen wird mit dem Parameter Γ beschrieben. Γ gibt für DNA/RNA die Mol Wassermoleküle pro Mol Nucleotid an. Die Sekundärstruktur hängt damit auch von Γ ab. Sie ist aber auch direkt korreliert mit der Wasseraktivität a_w , welche bei steigender Salzkonzentration abnimmt. Durch Erhöhung der Salzkonzentration kann eine DNA in die Z-Form überführt werden. Der Effekt von Ionen auf a_w ist hauptsächlich durch die Ionenstärke bestimmt und größtenteils unabhängig von der Natur der Ionen.

Experimente mit DNA haben ergeben, daß die DNA Doppelhelix stark hydratisiert ist und daß diese Hydratation nicht gleichmäßig um die DNA vorliegt. Die Hydratation kann am besten durch ein zwei Schalen Modell von Wassermolekülen um die DNA Doppelhelix beschrieben werden. Die innere Schale besteht bei einer B-DNA aus 11-12 Wassermolekülen pro Nucleotid. Dabei ist die Bindungsstärke der Wassermoleküle zur DNA sehr unterschiedlich. Abbildung 2.13 zeigt, welche Wassermoleküle am stärksten und welche weniger stark an die DNA binden. Die Wassermoleküle an den Nucleobasen lassen sich am leichtesten entfernen, gefolgt von denen am Zuckerring und zuletzt die Wassermoleküle am Phosphat. Entfernt man die Wassermoleküle um die Nucleobasen, so geht die Konformation

der DNA von der B-Form in die A-Form über. Die innere Schale von Wassermolekülen hat immer direkten Kontakt zur Nucleinsäure und ist deshalb für Ionen nicht permeabel (Saenger, 1984).

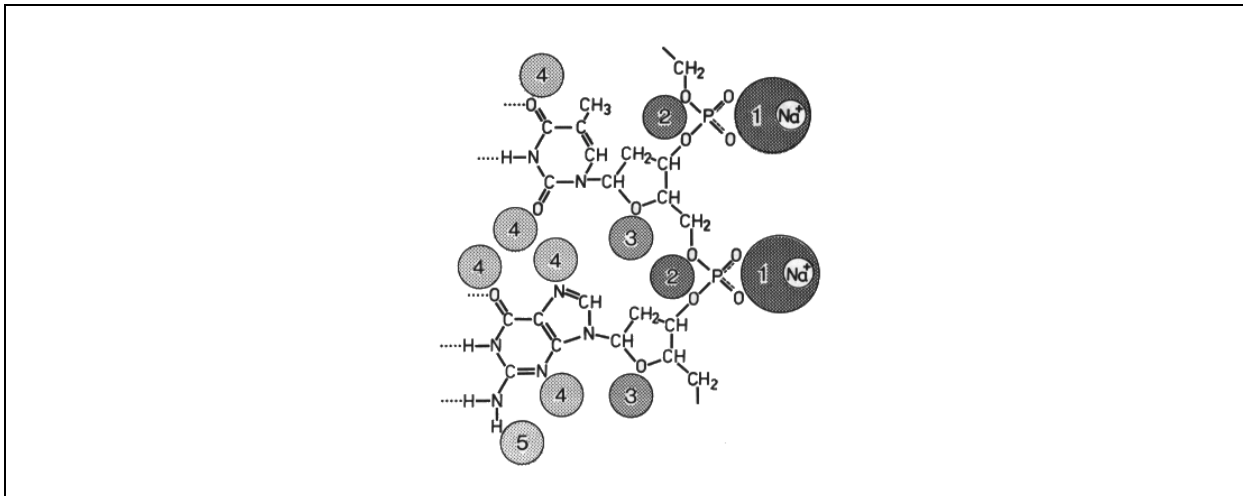


Abb. 2.13: Bevorzugte Hydratationsstellen einer B-DNA (Falk *et al.*, 1963)

Die äußere Schale von Wassermolekülen ist nicht zu unterscheiden vom Restwasser. Sie hat keinen direkten Kontakt zur Nucleinsäure und ist auch permeabel für Ionen.

Die Oberflächenverteilung einer ungefalteten DNA wurde mit einer DNA-Doppelhelix verglichen. Charakteristisch für die Doppelhelix ist, daß die Phosphat-Sauerstoffe für Wassermoleküle fast maximal frei zugänglich sind, während die Nucleobasen zu ca. 80% bedeckt sind. Die Phosphatgruppe nimmt ca. 45% der frei zugänglichen Oberfläche einer Doppelhelix ein. Der Zucker dagegen nur ca. 35% und die Nucleobasen ca. 20%. Die Polarität einer DNA nimmt zu, wenn sie eine Doppelhelix ausbildet, da die polaren Phosphatgruppen in einer Doppelhelix stärker exponiert und damit für Wassermoleküle besser zugänglich sind als im ungepaarten Einzelstrang.

Einkristall Untersuchungen an A/T reichen Regionen einer B-DNA haben gezeigt, daß die kleine Furche mit einem Rückgrat aus Wasserstoffbrücken bildenden Wassermolekülen gefüllt ist. In einer A-DNA dagegen sind Filamente aus Wassermolekülen miteinander und mit den Phosphatgruppen in der großen Furche verbunden (Blackburn & Gait, 1996).

3 Einfluß von Fluor auf Nukleinsäuren und Wasserstoffbrücken

3.1 Fluor in Nukleinsäuren

Fluor substituierte Analoga von natürlich vorkommenden Nukleinsäuren haben antivirale, antitumor und antimykotische Wirkung bewiesen. Eine Anzahl potentieller Wirkstoffe, in welchen die Fluorsubstitution der Schlüssel für ihre biologische Aktivität ist, wird intensiv untersucht. Hierzu zählen 5-Fluoruridin **1**, FLT (3'-Fluor-2',3'-dideoxythymidin) **2** (Etzold *et al.*, 1971) und FMAU (2'-Fluor-5-methyl-1- β -D-arabinofuranosyluracil) **3** (Watanabe *et al.* 1979) (Abb. 3.1), die sich als potente antivirale Wirkstoffe herausgestellt haben. Es gibt mehrere Substanzen, die sich als gute Proben für Untersuchungen von biochemischen Prozessen herausgestellt haben. Einige von ihnen haben bereits die klinische Prüfungsphase erreicht. Als Wirkstoff zugelassen ist bis zum heutigen Tage allerdings nur Gemcitabin **4** (Abb. 3.1).

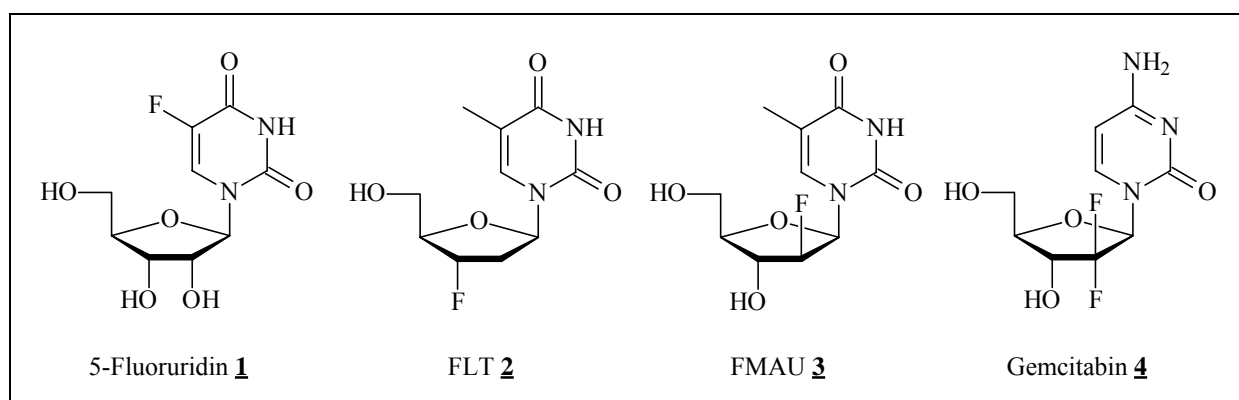


Abb. 3.1: Fluorhaltige Wirkstoffe auf Nucleosidbasis

Es ist nicht verwunderlich, daß eine außergewöhnlich große Anzahl von fluorierten Nukleinsäureanaloga eine signifikante biologische Aktivität aufweist. Es konnte in vielen Untersuchungen gezeigt werden, daß die fluorierten Nukleinsäureanaloga in ihrer dreidimensionalen Struktur kaum von denen der natürlich vorkommenden Nukleinsäuren

abweichen. Durch diese strukturelle Ähnlichkeit binden die fluorierten Nucleinsäuren sehr schnell an Enzyme, für welche natürliche Nucleinsäuren die Substrate bilden. In diesen Komplexen wiederum spielt das Fluor aufgrund seiner Polarität und starken Elektronegativität eine signifikante Rolle in Bezug auf die biologische Aktivität (Bergstrom & Swartling, 1988). Das Fluoratom wird als Mimetikum für Wasserstoff, aufgrund seiner geringen Größe, für Hydroxylgruppen, wegen seiner ähnlichen Polarität und für Carbonylsauerstoffe, wegen ähnlicher Größe und Polarität, verwendet. Für Sauerstoff wird auch die CF_2 -Gruppe als isosterer Ersatz verwendet. Sie wird hauptsächlich als Analogon für Phosphatsauerstoffe verwendet. Außerdem sind Fluoratome in der Lage als Akzeptoren Wasserstoffbrücken zu bilden (Pankiewicz, 2000).

In den nachfolgenden Abschnitten soll ein Überblick über synthetisierte Fluornucleoside gegeben werden. Es werden Beispiele für Zucker-, Phosphat- und Basen-modifizierte Nucleoside genannt.

3.1.1 Fluormodifikationen am Zucker

Fluoratome wurden an der Ribose Untereinheit von Nucleosiden an den Kohlenstoff von C2' bis C5' eingeführt. Die mit Abstand meisten Verbindungen tragen das Fluoratom am C2' Atom. Fluoratome an C3' und C5' sind etwa gleich oft anzutreffen, wogegen Fluor an C4' immer noch recht selten zu finden ist.

3.1.1.1 C2'-Fluornucleoside

2'-Fluornucleosid Analoga sind aus zwei Gründen von Interesse für die Wissenschaft. Dies ist zum einen die signifikante biologische Aktivität von Vertretern dieser Molekülgruppe und zum anderen die Informationen, die diese Moleküle über die Rolle der 2'-OH Gruppe in Nucleinsäurestrukturen liefern.

Der Effekt einer 2'-Fluor-Substitution auf die Konformation der Ribose wurde intensiv untersucht, da diese auf der Stufe der Oligonucleotide für die Bindung an Enzyme und die biologische Aktivität von fundamentaler Wichtigkeit ist. Röntgenstrukturanalysen von Nucleinsäuren zeigen, daß es zwei Vorzugskonformationen für die Ribose gibt. Dies sind die C2'-*endo* Form, wie sie in der B-DNA vorliegt und die C3'-*endo* Form, wie sie in der A-DNA vorliegt. Ein Übergang zwischen diesen beiden Zucker-Konformationen kann über den

Weg einer Pseudorotation, welche durch den gesamten Ring wandert, geschehen. Die beiden Energieminima dieser Pseudorotation entsprechen der C2'-*endo* und der C3'-*endo* Form. Ein Übergang dieser beiden Konformationen verläuft bei Nucleosiden im Nanosekunden Bereich. NMR Untersuchungen haben gezeigt, daß die Konformation mehr von der Elektronegativität der Substituenten, als von deren Größe oder Fähigkeit Wasserstoffbrücken bilden zu können, abhängt (Ikehara, 1984; Uesugi *et al.*, 1983; Cheng *et al.*, 1983). Als Beispiel hierfür kann 2'-Fluor-2'-desoxyadenosin angeführt werden, das zu 67% in C3'-*endo* Konformation vorliegt, während 2'-Iod-2'-desoxyadenosin und 2'-Desoxyadenosin nur zu 19% bzw. 7% C3'-*endo* Konformationen aufweisen (Uesugi *et al.*, 1979).

Die Synthese von 2'-Fluornucleosiden kann auf drei verschiedenen Wegen durchgeführt werden. Dies sind

- die direkte Fluorierung eines entsprechend geschützten Nucleosids
- die direkte Fluorierung eines entsprechend geschützten Zuckers, der anschließend in ein Nucleosid der Wahl überführt werden kann oder
- die Synthese eines fluorierten Zuckers aus einem fluorierten Ausgangsmolekül mit anschließender Überführung in ein Nucleosid der Wahl.

Die heutzutage am weitesten verbreitete Methode ist die Fluorierung entsprechend geschützter Nucleoside, gefolgt von der Fluorierung entsprechend geschützter Zucker. Als Fluorierungsmittel stehen eine Reihe von Reagenzien, die unter unterschiedlichen Bedingungen fluorieren, zur Verfügung. Dies sind neben Fluorwasserstoff (HF) und seinen Komplexen (z.B. HF*Pyridin), Kaliumfluorid (KF), Kaliumhydrogendifluorid (KHF₂), Diethylaminoschwefeltrifluorid (DAST) und Tris-(dimethylamino)-schwefel-(trimethylsilyl)-difluorid (TASF).

Die bedeutendsten Vertreter der Gruppe der 2'-Fluornucleoside sind 2'-Fluor modifizierte Thymidine und Cytidine. 2'-Fluor-5-methyl-1-β-D-arabinofuranosyluracil (FMAU, **3**) (Abb. 3.1), 2'-Fluor-5-iod-1-β-D-arabinofuranosylcytosin (FIAC, **5**) und 2'-Fluor-5-iod-1-β-D-arabinofuranosyluracil (FIAU, **6**) (Abb. 3.2) sind potente und selektive Inhibitoren des Herpes Simplex Virus Typ 1 und Typ 2, des Varizella-Zoster-Virus und des Cytomegalie-Virus (Watanabe *et al.*, 1983; Watanabe *et al.*, 1984). Sie wirken dabei über ihre 5'-Triphosphate, die als Substrate für den Einbau in die Virus DNA mittels viraler DNA Polymerasen dienen (Herada *et al.*, 1987).

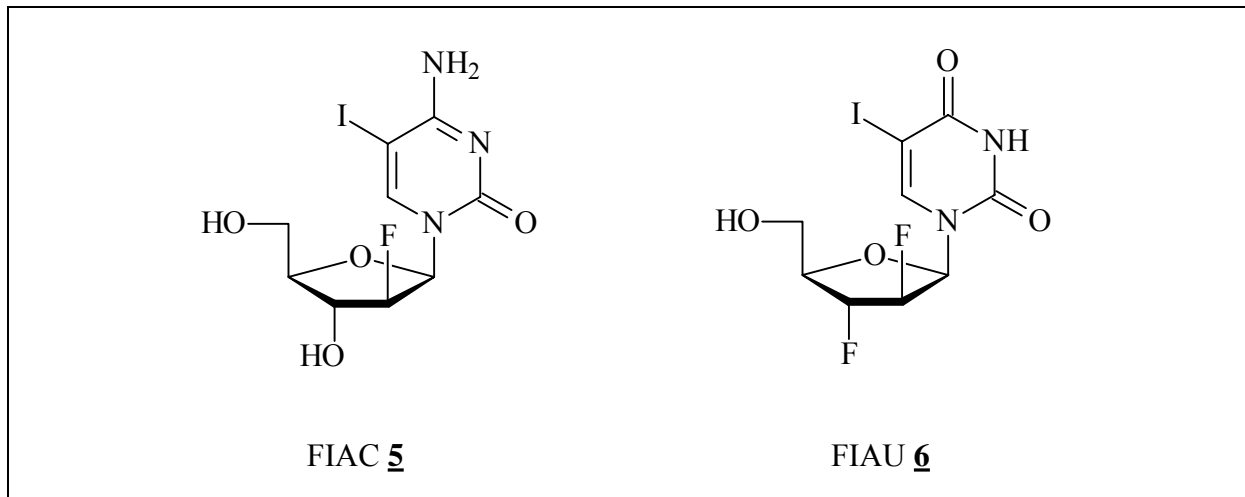


Abb. 3.2: Antivirale 2'-Fluornucleoside

2',3'-Didesoxypurinnucleoside besitzen eine starke anti-HIV Aktivität. Das entsprechende Inosin Analogon (ddI) ist bereits in der klinischen Testphase. Die Stabilität gegenüber Säure ist allerdings gering, wodurch eine orale Applikation erschwert wird. Das entsprechende 2'-fluorierte Analogon weist dagegen eine unbegrenzte Säurestabilität unter den Bedingungen auf, bei denen ddI und ddA binnen Minuten zersetzt werden. Die anti-HIV Aktivität der in 2'-Arabinostellung fluorierten ddI und ddA ist den nicht fluorierten Didesoxypurinnucleosiden dagegen vergleichbar (Pankiewicz, 2000).

Neben den einfach fluorierten Nucleosiden gibt es auch Nucleoside, die doppelt an C2' fluoriert sind. Der bekannteste Vertreter dieser Nucleosidklasse ist Gemcitabin **4** (2'-Desoxy-2',2'-difluorcytidin; Abb. 3.1). Gemcitabin wurde von der FDA zur Behandlung von Bauchspeicheldrüsenkrebs zugelassen. Sein Hydrochlorid ist unter dem Markennamen „Gemzar“ in vielen Ländern auf dem Markt. Gemcitabin zeigt einen komplizierten Mechanismus zur Inhibierung der Synthese sowohl von DNA als auch von RNA sowie einer Inhibierung der Ribonucleotid Reduktase (Plunkett *et al.*, 1997). Gandhi berichtet, daß 2'-Desoxy-2',2'-difluorganosin ähnliche Wirkungen aufweist wie Gemcitabin (Gandhi *et al.*, 1995). Die Synthese des doppelt fluorierten Nucleosids verläuft über die Synthese des entsprechenden Zuckers aus einem doppelt fluorierten Vorläufermolekül mit anschließender Glykosylierung zum Nucleosid (Hertel *et al.*, 1988).

3.1.1.2 C3'-Fluornucleoside

Die 3'-Fluor Substitution hat einen ähnlichen Effekt auf die 3'-Position der Ribose wie die 2'-Fluor Substitution auf die 2'-Position. NMR Untersuchungen zeigen, daß 2'-Fluor-2-

desoxyuridin zu 78% in der C2'-endo Form vorliegt, während 3'-Fluor-2',3'-didesoxyuridin zu 88% in der C3'-endo Form vorliegt (Joecks *et al.*, 1983).

Die Möglichkeiten der Synthese von 3'-Fluor modifizierten Nukleosiden sind der der 2'-Fluor modifizierten Nukleosiden sehr ähnlich. Meist werden die 3'-fluorierten Nukleoside über 3'-Anhydroverbindungen mit anschließender nukleophiler Öffnung der Anhydroverbindung dargestellt. Der bekannteste Vertreter der Gruppe der 3'-Fluornukleoside ist 3'-Fluor-2',3'-didesoxythymidin (FLT, **2**) (Abb. 3.1).

1988 wurde entdeckt, daß FLT **2** eine starke Wirksamkeit gegen HIV aufweist. Nach genauerer Untersuchung stellte sich heraus, daß die Wirksamkeit von FLT gegen HIV sogar größer ist als die von AZT (Balzarini *et al.*, 1988). Die entsprechenden Didesoxyadensin-, Didesoxycytidin-, Didesoxyuridin- und Didesoxyguanosin Derivate weisen dagegen eine geringere Wirksamkeit auf. Unglücklicherweise stellte sich bei diesen Untersuchungen auch heraus, daß FLT neben der starken Wirksamkeit gegen HIV auch eine hohe Cytotoxizität besitzt.

3'-Fluornukleoside wirken in ihrer 5'-Triphosphat Form als starke Inhibitoren von DNA Polymerasen wie zum Beispiel von *Micrococcus luteus*, *Streptomyces hygroscopicus* (Waehnert & Langen, 1979) oder E. coli DNA Polymerase I (Chidgeavadze *et al.*, 1985).

3.1.1.3 C4'-Fluornukleoside

Auf dem Gebiet der C4' Fluornukleoside wurden ungeachtet der Tatsache, daß es auch natürliche Vertreter dieser Gruppe gibt, wie das Antibiotikum Nucleocidin **7**, erst wenige Untersuchungen durchgeführt. Nucleocidin (Abb. 3.3) wurde 1957 isoliert und 1976 von Moffat zum ersten mal synthetisch hergestellt (Jenkins *et al.*, 1976).

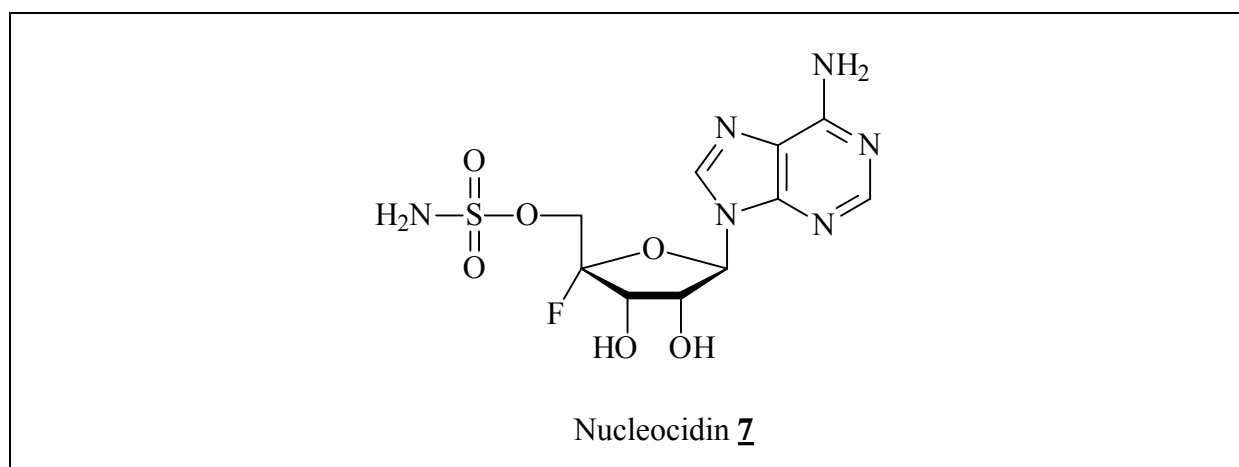


Abb. 3.3: Antibiotikum mit C4'-Fluoratom

Im Gegensatz zu C2' und C3' fluorierten Nucleosiden ist bei den C4' fluorierten Nucleosiden nicht nur ein Wasserstoff oder eine Hydroxylgruppe durch ein Fluoratom ersetzt, sondern sie besitzen noch weitere funktionelle Gruppen. Bei Nucleocidin ist diese funktionelle Gruppe eine Sulfonamidgruppe.

3.1.1.4 C5'-Fluornucleoside

Die letzte Gruppe von am Zucker fluorierten Nucleosiden sind die C5' Fluornucleoside. Es wurden verschiedene C5' Fluornucleoside synthetisiert, um die Möglichkeit der Phosphorylierung zu den entsprechenden Mono-, Di- und Triphosphaten in Zellen zu verhindern. Es wurde untersucht, ob diese Nucleoside ein Wirkungsspektrum besitzen, das nicht auf der Umwandlung in die entsprechenden Nucleotide beruht. Die Synthese dieser Nucleoside beruht auf einer Glykosylierung von 1-O-Acetyl-2,3-di-O-benzoyl-5-desoxy-5-fluor- α,β -D-ribofuranose mit der entsprechenden Nucleobase. Auch eine direkte Fluorierung des C5' Kohlenstoffs ist möglich.

Synthetisch anspruchsvoller war der Ersatz der 5'-Hydroxylgruppe durch eine CF₂-Gruppe, um Difluormethylenphosphat Nucleotide darzustellen (Abb. 3.4).

Durch den Einbau der Difluormethylengruppe entstand eine -CH₂-CF₂-P- Verknüpfung, welche ein gutes Mimetikum für die natürliche -CH₂-O-P- Verknüpfung ist. Zu dem Einsatz der CF₂-Gruppe hat die Überlegung geführt, daß die CF₂-P Bindung unter natürlichen Bedingungen nicht mehr hydrolysiert ist. Oligonucleotide mit diesen Molekülen wurden synthetisiert und werden untersucht.

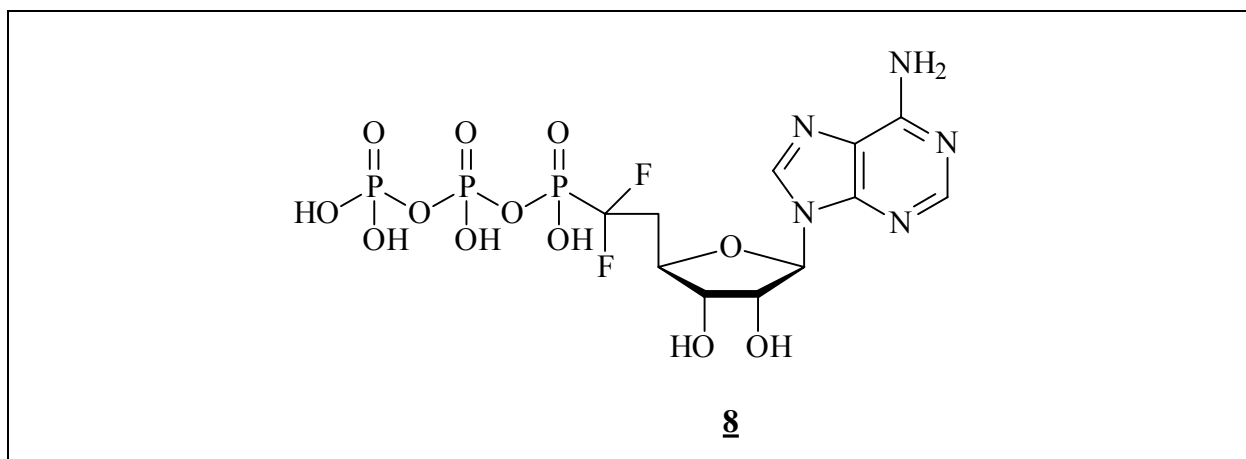


Abb. 3.4: 5'-Desoxy-5'-difluormethyl-adenosin-triphosphat **8**

3.1.2 Fluormodifikationen an der Phosphatgruppe

Es gibt zwei Möglichkeiten eine Phosphatgruppe eines Nukleotids mit Fluor zu modifizieren. Ersetzt man eine Hydroxylgruppe am Phosphat durch ein Fluoratom, so erhält man ein Fluorphosphonat. Ersetzt man eine Hydroxylgruppe dagegen durch eine CF_2 oder CHF Gruppe, so erhält man ein Fluoralkylphosphonat.

3.1.2.1 Fluorphosphonate

Fluorphosphonat Analoga von Nukleotiden werden zur Untersuchung der Rolle der Phosphatgruppe in Enzymstudien verwendet. Wird eine Hydroxylgruppe eines Phosphates durch ein Fluoratom ersetzt, so trägt das resultierende Nukleotid bei physiologischem pH nur noch eine negative Ladung. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, den Einfluß der Ladungen auf die Enzym-Substrat Bindung zu untersuchen. Andere Arten der Phosphat Modifikationen, wie z.B. Methylphosphonate, sind für diese Untersuchungen nicht so gut geeignet, da der Einbau einer Methylgruppe die Phosphatgruppe insgesamt vergrößert und damit einen störenden sterischen Faktor in die Untersuchungen mit einbringt. Durch seine hohe Elektronegativität hat ein Fluoratom einen weiteren wichtigen Einfluß auf die Phosphatgruppe. Der pK_a wird durch die Fluorierung stark erniedrigt. Dies hat zur Folge, daß z.B. Mg^{2+} -Ionen nur noch schwach an die Phosphatgruppe binden (Vogler & Bridger, 1982).

3.1.2.2 Fluoralkylphosphonate

Phosphatester und Phosphatanhydride gehören in lebenden Organismen zu den wichtigen strukturellen Gruppen. Der Transfer und Austausch von Phosphatgruppen gehört zu den essentiellen Vorgängen in der Vielfalt von biochemischen Reaktionen. Genaue Untersuchungen der chemischen Transformation, die während einer biochemischen Reaktion abläuft, werden mit Hilfe von Phosphonat-Analoga durchgeführt. In diesen Substanzen werden Methylen- oder Fluormethylengruppen als Ersatz für Sauerstoff-Atome eingebaut. Es hat sich gezeigt, daß eine CH_2 -Gruppe zwar der beste sterische Ersatz eines Sauerstoff-Atoms in Phosphonaten ist, daß die elektronische Ähnlichkeit durch die geringe Elektronegativität des Kohlenstoffs, verglichen mit Sauerstoff, aber doch sehr unterschiedlich ist. Blackburn hat gezeigt, daß Fluoralkylphosphonate bessere Analoga als Methylphosphonate sind, da sie

sowohl sterisch als auch elektronisch einem Sauerstoff-Atom in biologischen Phosphaten sehr nahe kommen (Blackburn, 1981).

Die Synthese Fluormethylen-modifizierter Triphosphate (Abb. 3.5) verläuft über das entsprechende Pyrophosphat.

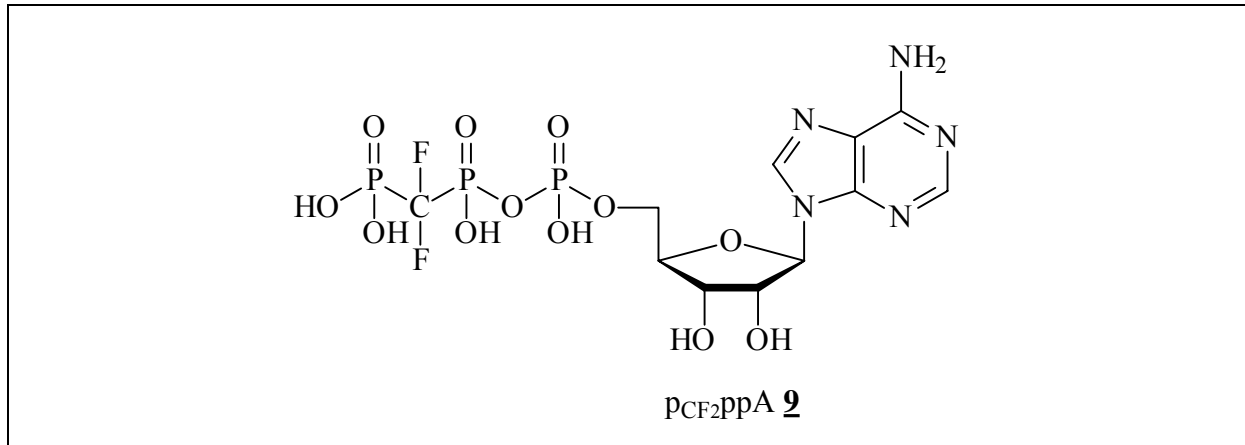


Abb. 3.5: Difluormethylenadenosin-Triphosphat

Untersuchungen mit β,γ -Difluormethylen-Triphosphaten haben gezeigt, daß diese Verbindungen biologisch wirksamer sind als die entsprechenden β,γ -Methylen-Triphosphate, aber weniger wirksam als natürliche Phosphate. Versuche mit pCF₂ppA (**9**) haben gezeigt, daß pCF₂ppA **9** ein guter Inhibitor für Kaninchenmuskelpyruvatkinase und ein gutes Substrat für Rinderherzadenylatkinase ist (Blackburn *et al.*, 1986).

3.1.3 Fluormodifikationen an der Nucleobase

Es gibt drei verschiedene Gruppen von fluormodifizierten Nucleobasen. Dies sind modifizierte Pyrimidine, modifizierte Purine und fluormodifizierte Nucleobasen, deren molekulare Struktur weder auf der der Pyrimidine noch auf der der Purine beruht.

3.1.3.1 Fluormodifizierte Pyrimidine

Fluor substituierte Pyrimidin Nucleoside, wie z.B. 5-Fluor-2'-desoxyuridin (FdU, **10**) oder 5-Trifluormethyl-2'-desoxyuridin (F₃CdU, **11**) sind als therapeutische Reagenzien bewährt (Abb. 3.6). Gegenwärtige Studien befassen sich hauptsächlich mit deren Pharmakokinetik und dem Einfluß des Fluoratoms auf die Struktur-Wirkungs-Beziehung und weniger mit neuen synthetischen Methoden.

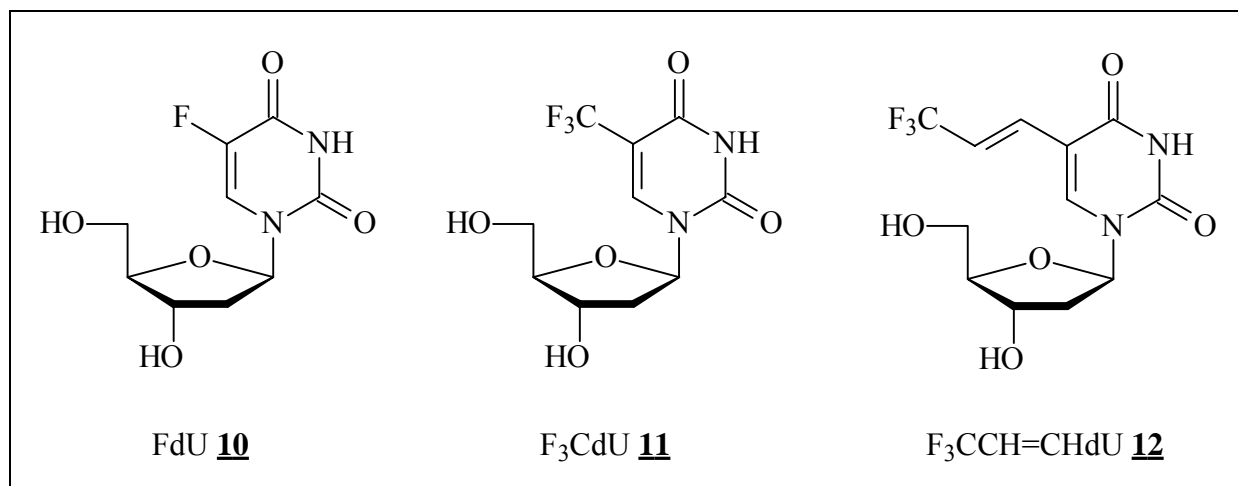


Abb. 3.6: Fluormodifizierte Pyrimidin-Nukleobasen

Eine Fluorierung an der 5-Position läßt sich durch direkte Fluorierung mit F₂ oder CF₃OF in wäßrigen Medien erreichen. Die Einführung eines Fluoratoms an eine an C-5 befindliche Seitenkette eines Pyrimidins ist dagegen nicht ganz so einfach und die Methode hängt stark von der beabsichtigten Position des Fluors ab. Während eine CF₃-Gruppe direkt durch eine Umsetzung von Trifluormethylidiod mit dem entsprechenden 5-Iod-Pyrimidin in Gegenwart von Kupfer eingeführt werden kann (Kobayashi *et al.*, 1977), wird für längere Alkylketten eine andere Strategie verwendet. Zuerst wird die 5-Position methyliert und anschließend bromiert (Matulic-Adamic *et al.*, 1986). Daran lassen sich Fluorverbindungen addieren, so daß man schließlich fluormodifizierte Alkylseitenketten verschiedener Länge am C5-Kohlenstoff der Nukleobase erhalten kann.

In den letzten Jahren sind Verbindungen mit längeren Seitenketten als Methylgruppen an C-5 verstärkt in den Mittelpunkt des Interesses gerückt, da Untersuchungen zu dem Ergebnis geführt haben, daß solche Verbindungen eine größere Aktivität gegen Herpes Viren aufweisen. Wichtig dabei ist, daß diese Verbindungen eine höhere Selektivität gegenüber der Inhibierung der Herpes Virus Replikation zeigen als die klassischen Antiherpes Wirkstoffe, wie z.B. 5-Iod-2'-desoxyuridin oder 5-(Trifluormethyl)-2'-desoxyuridin (F₃CdU, 11). Die Möglichkeiten zu C-5 Modifizierungen von Nukleosiden ist sehr groß und viele Verbindungen wurden und werden synthetisiert, um den Zusammenhang zwischen Struktur und antiviraler Aktivität zu klären. Die Untersuchungen haben aber auch gezeigt, daß es nicht die Fluorsubstitution per se ist, die für die Aktivität und Selektivität verantwortlich ist. Während z.B. F₃CdU 11 eine relativ hohe Aktivität gegenüber Herpes Simplex Virus Typ 2 aufweist, ist F₃CCH=CHdU 12 nahezu inaktiv (Bergstrom *et al.*, 1984). Die Einführung einzelner Fluoratome in die Seitenkette erhöht die antivirale Aktivität der Nukleinsäure

Analoga. Es ist deshalb um so überraschender, daß Nukleinsäuren mit voll fluorierten Seitenketten ihre antivirale Aktivität vollständig verlieren.

3.1.3.2 Fluormodifizierte Purine

Im Gegensatz zu den fluorierten Pyrimidinen wurden weniger fluorierte Purine dargestellt. Die in Abbildung 3.7 abgebildeten 2-Fluoradenosin (2FA, **13**) und 6-Fluornebularin (6FN, **14**) wurden schon in den späten sechzigern bzw. frühen siebziger Jahre synthetisiert.

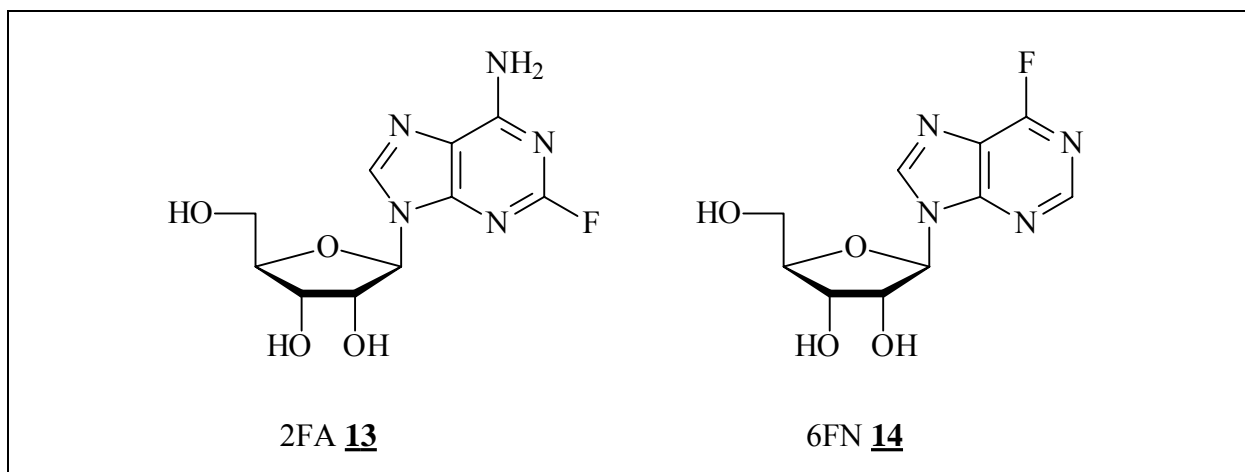


Abb. 3.7: Fluormodifizierte Purin-Nukleobasen

Untersuchungen zu ihrer antiviralen Aktivität wurden nicht durchgeführt oder führten zu keinen nennenswerten Ergebnissen, so daß fluorierte Purine als antivirale Wirkstoffe keine Rolle spielen.

3.1.3.3 Fluormodifizierte Nukleobasen Analoga

Es gibt zwei Gruppen von fluormodifizierten Nukleobasen Analoga. Dies sind zum einen solche, die durch chemische Reaktionen aus den natürlichen Nukleobasen gewonnen werden und zum anderen Nukleobasen Analoga, die nur noch bedingt Ähnlichkeiten mit den natürlichen Nukleobasen aufweisen und deshalb chemisch aufgebaut werden müssen.

Abbildung 3.8 zeigt zwei Beispiele für Nukleobasen, die aus natürlichen Basen gewonnen werden können. Molekül **15** läßt sich aus Uridin und Chlorfluorcarben in Gegenwart von Quecksilber mit anschließender Ringerweiterung der Nukleobase darstellen. Allerdings zeigt dieses Molekül keine signifikante biologische Aktivität (Thieller *et al.*, 1977). Läßt man 4-*O*-Trimethylsilylthymidin mit Difluorcarben reagieren, so erhält man Verbindung **16** (Pein & Cech, 1985). Sie zeigt eine antivirale Aktivität gegen Herpes Simplex Viren des Typs 1.

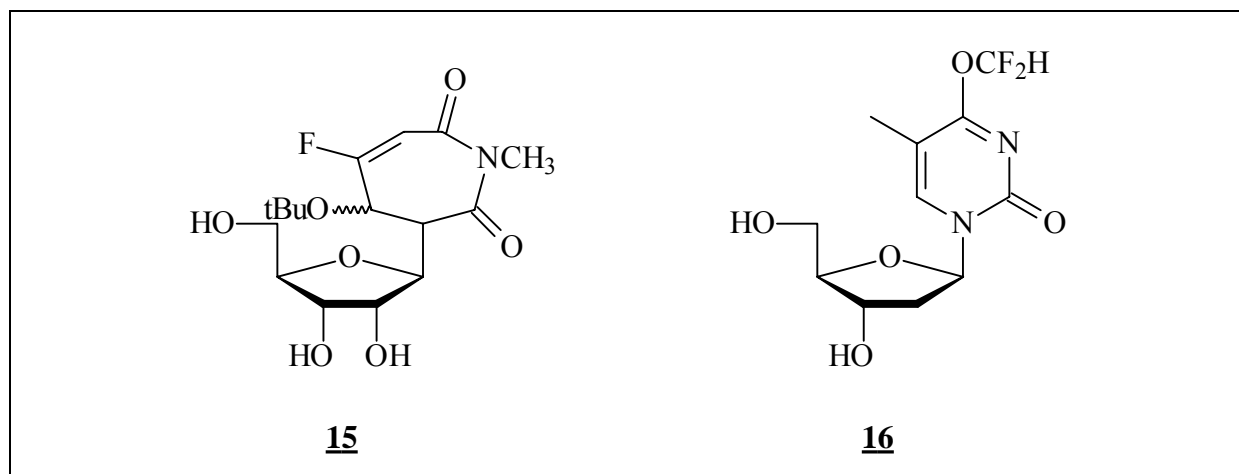


Abb. 3.8: Fluormodifizierte Basen erhalten aus natürlichen Nucleobasen

In Abbildung 3.9 sind drei verschiedene fluormodifizierte Nucleobasen Analoga abgebildet, die speziell chemisch aufgebaut wurden. Das Fluorpyridin **17** wurde als Wirkstoff gegen Lymphozyten Leukämie in Mäusen getestet. Dabei stellte sich seine hohe Wirksamkeit heraus (McNamara & Cook, 1987). Verbindung **18** wurde von Matulic-Adamic und Beigelman synthetisiert und in Ribozyme eingebaut, um dessen Einfluß auf Enzymaktivität zu testen (Matulic-Adamic & Beigelman, 1997).

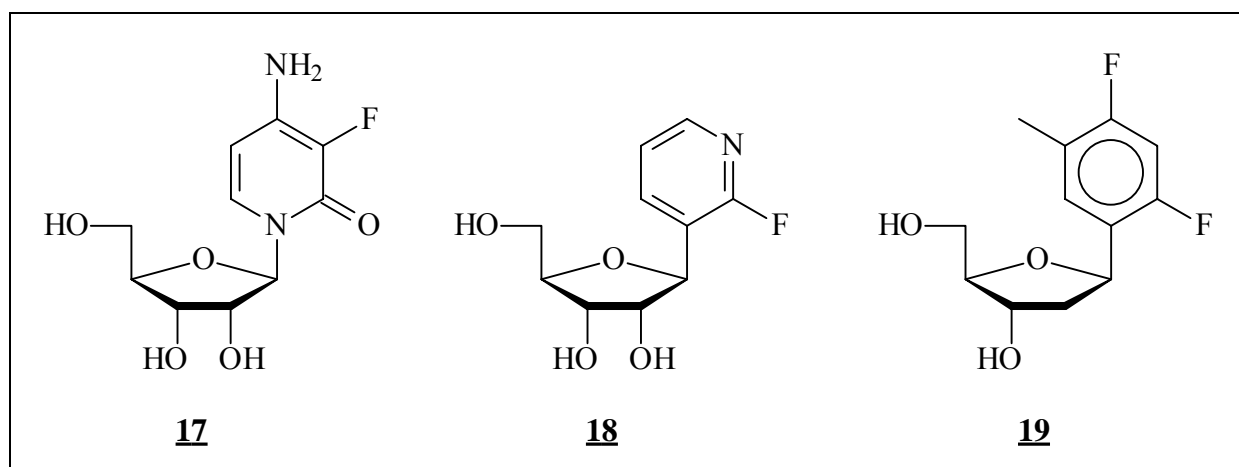


Abb. 3.9: Speziell aufgebaute fluormodifizierte Nucleobasen

Im Gegensatz dazu wurde das Difluortoluol **19** als isostere Nucleobase zum natürlich vorkommenden Thymin synthetisiert (Schweitzer & Kool, 1994). Es wurde zur Untersuchung von Wasserstoffbrücken in Doppelhelices verwendet. Es stellte sich auch heraus, daß das Molekül von DNA Polymerasen wegen seiner strukturellen Verwandtheit zum natürlichen Thymin bevorzugt gegenüber Adenin eingebaut wird (Moran *et al.*, 1997). Näheres hierzu wird in Kapitel 4.1 beschrieben.

3.2 Fluor in Wasserstoffbrücken

In der bioorganischen Chemie wird es immer beliebter Wasserstoffatome, Hydroxylgruppen oder Carbonylsauerstoffe durch Fluoratome zu ersetzen. Dadurch erhält man Enzymsubstrat analoge Verbindungen, die als Substrat oder Inhibitor in einem enzymatischen Prozeß dienen können. Die Idee, die dahinter steckt ist, daß Fluor in seiner Größe zwischen Wasserstoff und Sauerstoff liegt. Während Wasserstoff einen van-der-Waals Radius von 120 pm und Sauerstoff einen von 140 pm aufweist, besitzt Fluor einen van-der-Waals Radius von 135 pm (Rowland & Taylor, 1996). Um ein erfolgreiches Mimik für eine Hydroxylgruppe zu sein, muß Fluor zumindest die Rolle eines Wasserstoffbrücken Akzeptors vom Hydroxylsauerstoff übernehmen, da es die Rolle als Wasserstoffbrücken Donor verständlicherweise nicht übernehmen kann. Es stellt sich nun die Frage, wie gut Fluor als Wasserstoffbrücken Akzeptor fungieren kann. Im Hydrogendifluorid-Ion bildet Fluor die bisher stärkste bekannte Wasserstoffbrücke mit einer Dissoziationsenergie von 40 kcal/mol (Harrell & McDaniel, 1964). Diese Beobachtung entspricht ganz der These von Pauling. Er behauptete, daß nur Atome mit hoher Elektronegativität Wasserstoffbrücken ausbilden können und das die Stärke einer Wasserstoffbrücke direkt mit der Elektronegativität der sie aufbauenden Atome zusammenhängt (Pauling, 1940). Pauling hat bei dieser Behauptung allerdings nur an das Hydrogendifluorid-Ion, Fluorwasserstoff und anorganische Fluorsalze gedacht, nicht aber an kovalent gebundenes Fluor. Dieser Tatsache trägt Pauling in einem zwanzig Jahre später erschienenem Aufsatz Rechnung (Pauling, 1960), indem er sagt, daß es interessant ist, daß gerade an Kohlenstoff gebundenes Fluor keine signifikante Kraft zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken besitzt. Er sagt auch, daß dies durch die große Differenz der Elektronegativität von Fluor und Kohlenstoff bedingt sei.

Theoretische Berechnungen schätzen die Stärke einer $F\cdots H$ Wasserstoffbrückenbindung auf 2 bis 3,2 kcal/mol (Smart, 1994). Verglichen mit einer $O\cdots H$ Wasserstoffbrückenbindung mit einer typischen Stärke von 5 bis 10 kcal/mol (Warshel *et al.*, 1995) ist dies relativ schwach. Mit Hilfe von Kristallstrukturdaten aus der Cambridge Structural Database (CSD) läßt sich ein Überblick über Häufigkeit und Stärke von $F\cdots H$ Wasserstoffbrücken gewinnen (Dunitz & Taylor, 1997; Howard *et al.*, 1996; Shimoni & Glusker, 1994). Hierbei wird der $F\cdots H$ Abstand mit der Summe der van-der-Waals Radien von Fluor und Wasserstoff verglichen. Je kleiner der $F\cdots H$ Abstand ist, desto stärker ist die Fluor-Wasserstoff-Bindung. Allerdings beginnt man erst bei einem Abstand kleiner gleich 255 pm (Summe der van-der-Waals Radien) von einer Wasserstoffbrücke zu sprechen. Es wurden sowohl $F\cdots H-N$, $F\cdots H-O$ als

auch $F\cdots H-C$ Abstände in Kristallen untersucht. Auf der Seite der Fluorverbindungen wurden CF , CF_2 und CF_3 Verbindungen in die Untersuchungen mit einbezogen. Dabei stellte sich heraus, daß sehr viele Verbindungen nur deshalb kurze $F\cdots H$ Abstände aufweisen, weil sie strukturell so gebaut sind, daß durch $N\cdots H$ oder $O\cdots H$ Wasserstoffbrücken der $F\cdots H$ Abstand entsprechend verkürzt wird. Moleküle, die keine solchen $O\cdots H$ oder $N\cdots H$ Wasserstoffbrücken besitzen, weisen nur selten kurze $F\cdots H$ Abstände auf. Es hat sich auch im Falle der $C-H$ Gruppe, die als Wasserstoffdonor fungieren kann gezeigt, daß die Neigung als Wasserstoffdonor zu fungieren auch von der Hybridisierung des Kohlenstoffatoms abhängt. Dabei ergibt sich folgende Reihenfolge: $C_{sp}-H > C_{sp^2}-H > C_{sp^3}-H$ (Bonchev & Cremaschi, 1974). Einen Überblick über $C-F\cdots H-C$ Abstände mit ihren zugehörigen Winkeln gibt Thalladi (Thalladi *et al.*, 1998). Abbildung 3.10 gibt die von ihm in der Cambridge Structural Database gefundenen Verbindungen an. In Abbildung 3.10a sind alle gefundenen Verbindungen mit $C-F\cdots H-C$ Abständen kleiner 300 pm aufgeführt. Dabei spielt die Hybridisierung der Kohlenstoffatome keine Rolle. In Abbildung 3.10b sind dann nur Verbindungen aufgeführt, bei denen beide beteiligten Kohlenstoffe sp^2 -hybridisiert sind.

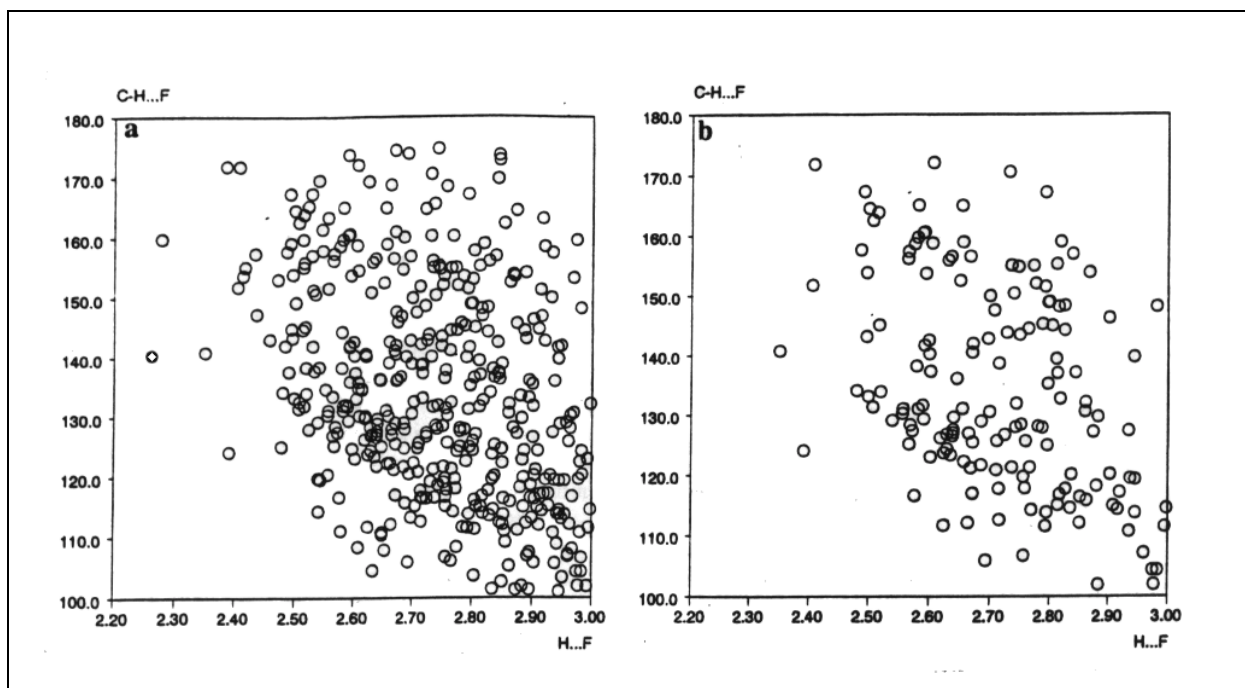


Abb. 3.10: a) $C-H\cdots F-C$ Abstände (433 Einträge); b) $C_{(sp^2)}-H\cdots F-C_{(sp^2)}$ Abstände (155 Einträge) (Thalladi *et al.*, 1998)

Dabei zeigt sich interessanterweise, daß es nur sehr wenige Verbindungen mit kurzen $F\cdots H$ -Abständen und damit mit $F\cdots H$ -Wasserstoffbrücken gibt. $F\cdots H$ -Wasserstoffbrücken sind somit äußerst selten und sehr schwach.

3.2.1 Kristallstrukturen von Fluorbenzolen

Um die Eigenschaften einer C-F...H-C Wasserstoffbrücke genau betrachten zu können, ist es sinnvoll Verbindungen zu untersuchen, die keine weiteren Wasserstoffbrücken außer F...H bilden können. Thalladi untersuchte deshalb die Kristallstrukturen verschiedener Fluorbenzole, da sie weder N-H noch O-H Gruppen enthalten (Thalladi *et al.*, 1998). Alle Fluorbenzole enthalten nur eine Art von Kohlenstoff (sp^2 -hybridisiert). Durch die Präsenz der Fluoratome steigt die Azidität der C-H Gruppen und dadurch ihre Fähigkeit, Wasserstoffbrücken zu bilden.

In den Kristallstrukturen der Fluorbenzole sind keine C...C- (Stapelungs-), C...F- (Dipol-Dipol) oder F...F- (Polarisations-) Wechselwirkungen zu sehen. Es sind nur kurze C-H...F-C Kontakte zu erkennen. Um den Einfluß dieser C-H...F-C Kontakte auf die Kristallpackung zu untersuchen, verglich Thalladi die Kristallpackungen der Fluorbenzole mit denen von Pyridiniumfluorid (Boenigk & Mootz, 1988), Pyridin-*N*-oxid (Ulku *et al.*, 1971) und Benzotrinitril (Fauvet *et al.*, 1978). Diese Strukturen sind maßgeblich durch C-H...F⁻-, C-H...O- und C-H...N- Wechselwirkungen bestimmt. Sie zeigen aber sehr große Ähnlichkeit zu den Kristallpackungen der Fluorbenzole (Abbildung 3.11).

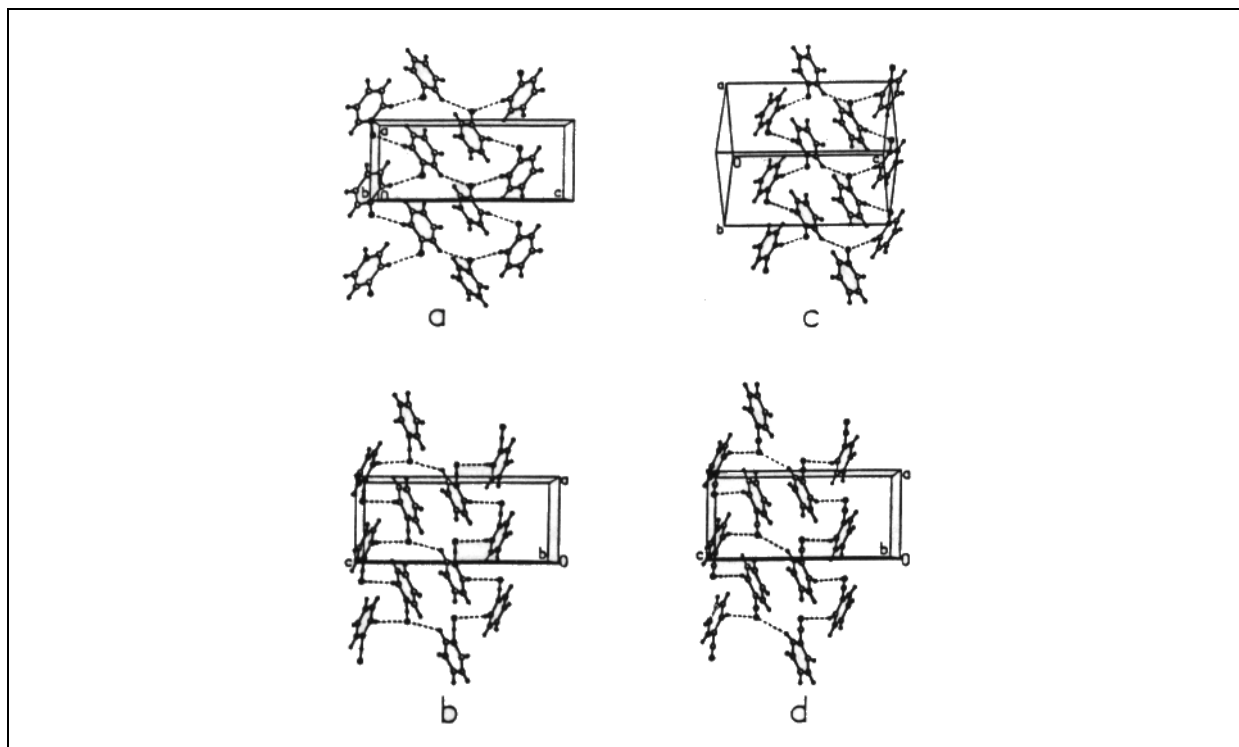


Abb. 3.11: Kristallstrukturen von a) Fluorbenzol, b) Pyridiniumfluorid, c) Pyridin-*N*-oxid und d) Benzotrinitril (Thalladi *et al.*, 1998)

Die ähnliche Struktur der Kristallpackungen induziert, daß die Natur und der Charakter der strukturbestimmenden intermolekularen Wechselwirkungen in diesen vier Kristallstrukturen identisch sein muß.

Die Kristallpackung der Fluorbenzole ist durchsetzt mit schwachen $F\cdots H$ Wechselwirkungen. Sie wird aber durch die stärkeren Wechselwirkungen der aromatischen Benzolkerne in die sogenannte Fischgrätenstruktur gezwungen (Abbildung 3.12). Die resultierende Struktur ist der von Benzol sehr ähnlich.

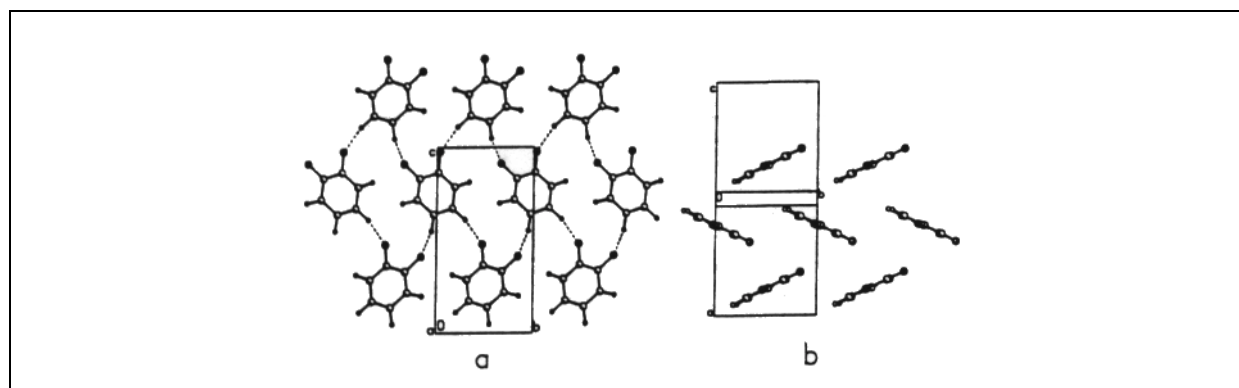


Abb. 3.12: Kristallstruktur von 1,2-Difluorbenzol. a) Aufsicht, b) Drehung um 90° , Fischgrätenstruktur (Thalladi *et al.*, 1998)

Die Untersuchungen der Kristallstrukturen von Fluorbenzolen führten zu dem Ergebnis, daß $C-F\cdots H$ Wasserstoffbrücken genauso wichtig wie $C-H\cdots O$ und $C-H\cdots N$ Wasserstoffbrücken für die Kristallpackung sein können. Es hat sich außerdem gezeigt, daß die Kristallstrukturen der Fluorbenzole nicht mit denen der anderen Halogenbenzole identisch sind. Dies liegt an der Tatsache, daß Fluor eher $F\cdots H$ Wechselwirkungen ausbildet als Halogen-Halogen Wechselwirkungen, wie dies die anderen Halogene bevorzugen. Die $C-H\cdots F-C$ Wasserstoffbrücken in Kristallen von Fluorbenzolen sind zwar sehr schwach, beeinflussen aber dennoch maßgeblich die resultierenden Kristallpackungen. Deshalb ist es gerechtfertigt von schwachen $F\cdots H$ Wasserstoffbrücken zu sprechen (Thalladi *et al.*, 1998).

4 1',2'-Dideoxy-1'-(2,4-difluortoluolyl)- β -D-ribofuranose und universelle Basen

4.1 1',2'-Dideoxy-1'-(2,4-difluortoluolyl)- β -D-ribofuranose 19

Mit 1',2'-Dideoxy-1'-(2,4-difluortoluolyl)- β -D-ribofuranose 19 ist eine Thymidin analoge und denen in dieser Doktorarbeit untersuchten Molekülen nahe verwandte Verbindung literaturbekannt (Schweitzer & Kool, 1994).

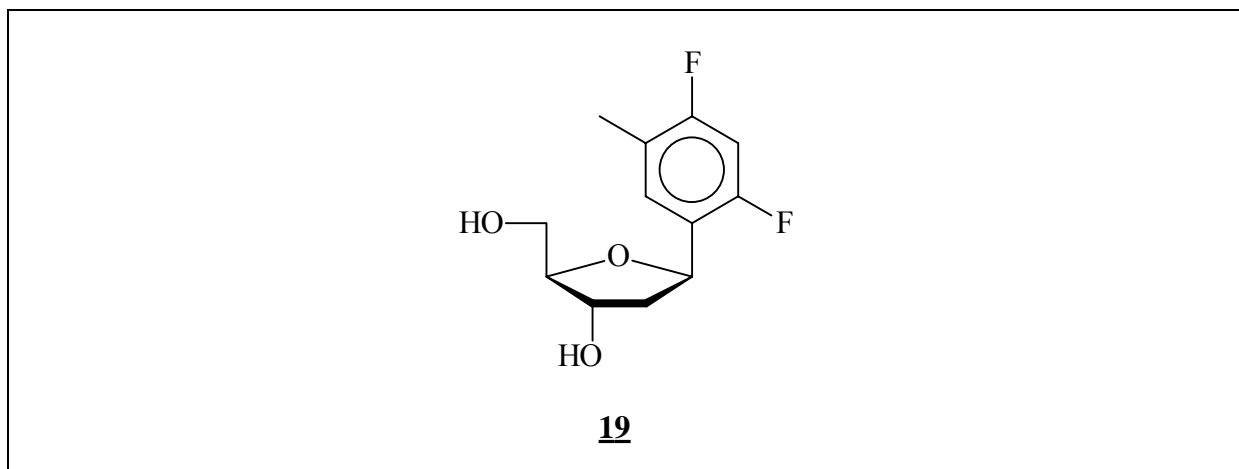


Abb. 4.1: 1',2'-Dideoxy-1'-(2,4-difluortoluolyl)- β -D-ribofuranose 19

1',2'-Dideoxy-1'-(2,4-difluortoluolyl)- β -D-ribofuranose 19 wurde synthetisiert und intensiv wegen seiner strukturellen Verwandtheit zum natürlichen Thymidin als Enzymsubstrat untersucht. Die daraus resultierenden Ergebnisse bildeten eine Grundlage für diese Doktorarbeit und werden deshalb im folgenden vorgestellt.

4.1.1 Chemische Synthese

Eric T. Kool suchte ein Molekül, daß dem natürlichen Thymidin ähnlich, aber nicht in der Lage sein sollte Wasserstoffbrücken zu bilden. Er wollte damit den Einfluß der Struktur in Abwesenheit von Wasserstoffbrücken auf komplexe Biopolymere untersuchen. Es stellte sich die Frage, ob z.B. eine Polymerase dieses Thymidin ähnliche Molekül, ohne Wasserstoffbrücken zu ihm bilden zu können, in eine DNA Doppelhelix einbaut bzw. welche natürliche Base gegenüber diesem modifizierten Baustein eingebaut wird. Um diese Fragen beantworten zu können entschloß sich Kool die Verbindung 1',2'-Dideoxy-1'-(2,4-difluortoluolyl)- β -D-ribofuranose **19** zu synthetisieren (Schweitzer & Kool, 1994).

19 ist das bestmögliche sterische Mimetikum für das natürliche Thymidin. Als Ersatz für die Carbonylsauerstoffe wurden Fluoratome gewählt, da sie sowohl in ihrer Größe als auch in der Elektronegativität dem Sauerstoff am nächsten kommen. Die daraus resultierende C-F Bindung zeigt eine ähnliche polare Verteilung wie die C=O Bindung, allerdings von geringerem Ausmaß. Um zu vermeiden, daß die Stickstoffe des Pyrimidin Grundgerüsts Wasserstoffbrücken bilden, wurden diese durch sp^2 -hybridisierten Kohlenstoff ersetzt. Der Pyrimidin-Grundkörper wurde somit in einen Toluol-Grundkörper umgewandelt.

Diese Ersetzungen nehmen der modifizierten Nukleobase jede Möglichkeit, Wasserstoffbrücken zu einem Enzym auszubilden. Sie machen allerdings das gesamte Molekül hydrophober. Wie gut die sterische Übereinstimmung zwischen 1',2'-Dideoxy-1'-(2,4-difluortoluolyl)- β -D-ribofuranose **19** und Thymidin ist, läßt sich aus dem Vergleich der Kristallstrukturen beider Moleküle ersehen, die in Abbildung 4.2 abgebildet sind. Die Bindungslängen im Zucker unterscheiden sich nur um bis zu 2 pm. Im Bereich der Nukleobase sind die Unterschiede aufgrund der Ersetzungen von Stickstoff durch Kohlenstoff etwas größer. Sie variieren hier um bis zu 7 pm. Den größten Unterschied zeigt die C-F Bindung, die um bis zu 16 pm länger ist als die C=O Bindung. Die Zuckerkonformation ist bei beiden Molekülen *C2'-endo*. Selbst die Diederwinkel unterscheiden sich nur wenig (Tabelle 4.1). Die Kristallpackung zeigt eine in zwei Bereiche aufgeteilte Struktur. Es ist zum einen der hydrophile Zuckerteil des Nukleosids und zum anderen die lipophilen Fluoraromaten, die die Kristallpackung in Schichten unterteilen. Die Fluoraromaten sind zueinander orientiert und bilden kein Fischgrätenmuster.

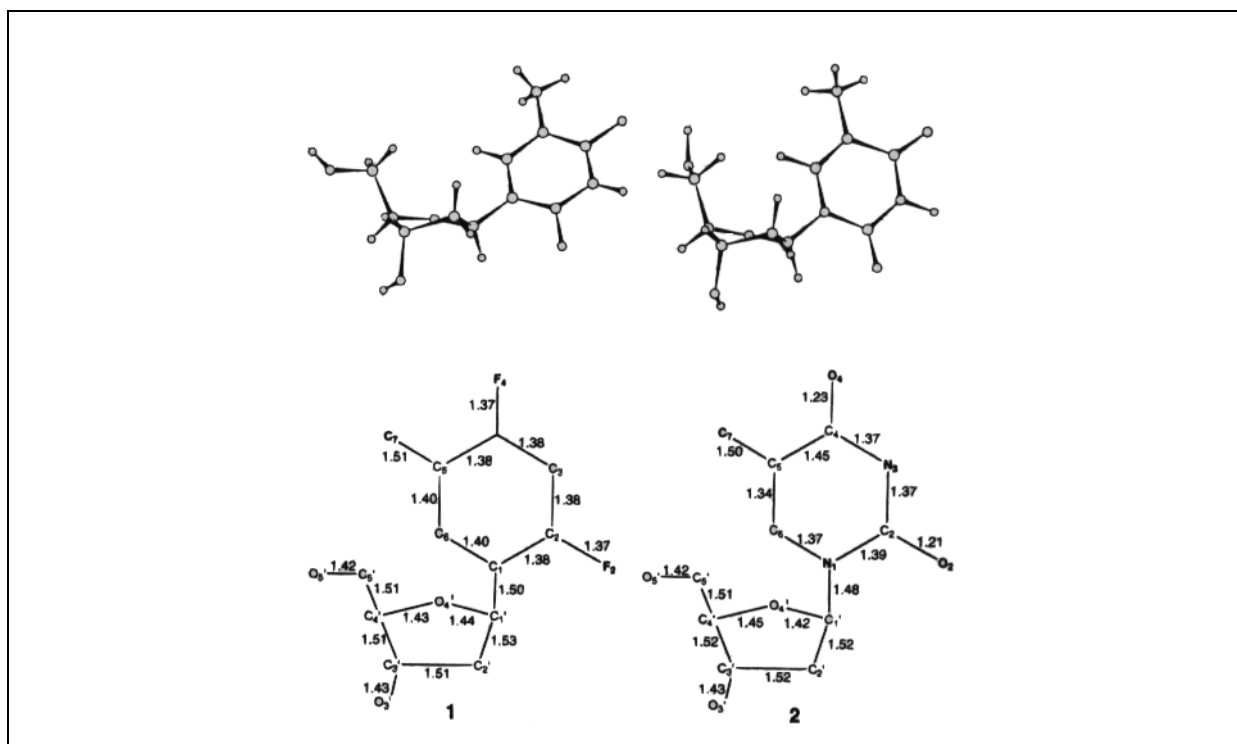


Abb. 4.2: Vergleich der Kristallstrukturen von 1',2'-Dideoxy-1'-(2,4-difluortoluolyl)- β -D-ribofuranose **19** (1) und Thymidin (2); kristallisiert aus Ethanol (Guckian & Kool, 1997)

| Nukleosid | Diederwinkel [°] | | | | | |
|-----------|------------------|----------|---------|----------|-----------|-----------|
| | C6-C2' | O4'-C3' | C1'-C4' | C2'-C5' | C(N)1-C3' | O3'-C1 |
| 19 | -97,6 | +32,2 | -36,7 | -91,5 | -153,2 | -9,0 |
| Thymidin | -79,5 | +28,4 | -37,2 | -87,3 | -147,8 | -16,8 |
| 19 | H1'-H2' | H1'-H2'' | H2'-H3' | H2''-H3' | H3'-H4' | C(N)1-H2' |
| | +157,2 | +35,5 | -73,4 | +84,2 | -93,9 | +34,0 |
| Thymidin | +149,2 | +21,9 | -41,7 | +87,2 | -88,5 | +33,8 |

Tabelle 4.1: Diederwinkel (Guckian & Kool, 1997)

Die Synthese beginnt mit der Bromierung von 2,4-Difluortoluol. Die Bromierung erfolgt ausnahmslos an der 5-Position des Aromaten, wenn die Reaktion unter Eisenkatalyse durchgeführt wird. Die Grignard-Reaktion des Fluoraromaten **20** mit der geschützten α -Chlor-2'-desoxyribose verläuft nur mit schlechten Ausbeuten. Der Grund hierfür ist in der α,β -Eliminierung des Chlors unter basischen Bedingungen aus dem Zucker und dem Entstehen des α -Anomers zu sehen. Versuche zur C-Glykosylierung mit entsprechenden Arylcadmium Verbindungen erhöhten im Falle von 1',2'-Dideoxy-1'-(2,4-difluortoluolyl)- β -

D-ribofuranose **19** lediglich die Ausbeute an α -Isomer (Chaudhuri *et al.*, 1997). Um die Ausbeute des β -Isomeren zu erhöhen, entwickelte Kool eine säurekatalysierte Umwandlung vom α - in das β -Isomer. Durch die Säure wird der Zuckerring geöffnet, wobei ein benzylisches Carbokation entsteht. Durch Angriff der C4'-Hydroxylgruppe kann der Zuckerring wieder geschlossen werden. Dabei wird vermehrt das thermodynamisch stabiler β -Isomer gebildet. Diese Methode steigert die Ausbeute des β -Isomeren auf bis zu 48% (Chaudhuri *et al.*, 1997). Die Entschützung der *p*-Toluolyl-Schutzgruppen erfolgt mit Natriummethanolat in Methanol mit einer Ausbeute von bis zu 92% (Abbildung 4.3).

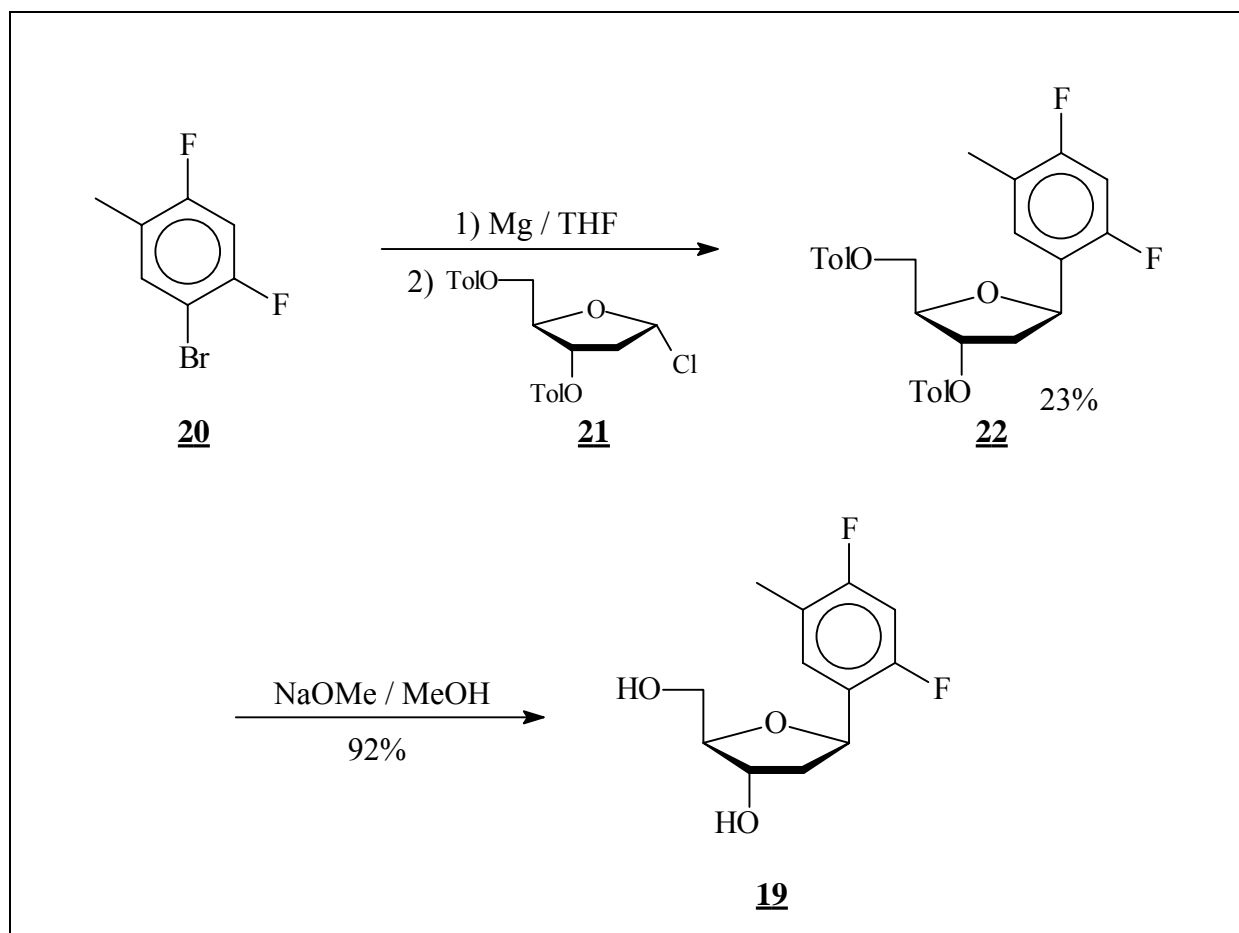


Abb 4.3: Syntheseweg zu 1',2'-Dideoxy-1'-(2,4-difluortoluolyl)- β -D-ribofuranose **19**

Um die enzymatischen Untersuchungen durchführen zu können, mußte 1',2'-Dideoxy-1'-(2,4-difluortoluolyl)- β -D-ribofuranose **19** in das entsprechende Phosphoramidit und das entsprechende Triphosphat überführt werden. Die Synthese zum Phosphoramidit erfolgte nach Standardmethoden für DNA mit 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid in Pyridin (52% Ausbeute) und anschließender Umsetzung zum Amidit mit 2-Cyanethyl-diisopropylchlorophosphoramidit in Methylenchlorid unter Katalyse von Diisopropylethylamin in 72%iger Ausbeute (Schweitzer & Kool, 1995).

Die Umsetzung zum Triphosphat erfolgte nach der Methode von Yoshikawa (Yoshikawa *et al.*, 1967). 1',2'-Dideoxy-1'-(2,4-difluortoluolyl)- β -D-ribofuranose **19** wurde mit Trimethylphosphat, 1,8-Bis-(dimethylamino)-naphthalen und Phosphoroxychlorid in das Monophosphat überführt. Die Umsetzung zum Triphosphat erfolgte mit Tributylammoniumpyrophosphat und Tributylamin (Moran *et al.*, 1997a).

4.1.2 Verhalten in biologischen Systemen

Um die biologische Aktivität einer Verbindung untersuchen zu können, ist es wichtig, erst einmal einige Eigenschaften dieser Verbindung zu kennen. Diese Eigenschaften sind z.B. die Möglichkeit Wasserstoffbrücken zu bilden, die Basenstapelungseigenschaften, die Lipophilie und das Solvationsverhalten. Es stellt sich also zuerst die Frage, ob 1',2'-Dideoxy-1'-(2,4-difluortoluolyl)- β -D-ribofuranose **19** zu natürlichen Nukleobasen Wasserstoffbrücken bilden kann oder nicht. Hierzu wurden die Verteilungskoeffizienten zwischen Octanol und Wasser von Thymidin und **19** gemessen. Während Thymidin einen Verteilungskoeffizienten von $\log P = 0,06$ aufweist (Lien *et al.*, 1991), hat **19** einen Verteilungskoeffizienten von $\log P = 1,39$ (Kool *et al.*, 2000). Der Unterschied zeigt den viel stärker lipophilen Charakter des modifizierten Bausteines. NMR Untersuchungen mit 9-Ethyladenin und Difluortoluol zeigten keine Änderung der chemischen Verschiebung einzelner potentiell in Wasserstoffbrücken gebundener Protonen. Daraus läßt sich der Schluß ziehen, daß 1',2'-Dideoxy-1'-(2,4-difluortoluolyl)- β -D-ribofuranose **19** keine Wasserstoffbrücken des Typs C-H...N oder F...H-N bildet (Schweitzer & Kool, 1995). Der Einbau von **19** in eine 12mer DNA und die resultierenden Stabilitäten der entsprechenden Duplexe sind in Tabelle 4.2 angegeben.

| Basenpaar (X-Y) | T_m [°C] | ΔT_m [°C] | ΔG^0 [kcal/mol] |
|-----------------------|------------|-------------------|-------------------------|
| T-A | 39,4 | - | 12,3 |
| 19 -A | 21,4 | 18,0 | 7,4 |
| 19 -C | 25,0 | 14,4 | 8,2 |
| 19 -G | 23,0 | 16,4 | 8,0 |
| 19 -T | 20,3 | 19,1 | 7,3 |
| 19 - 19 | 28,6 | 10,8 | 8,9 |

Tabelle 4.2: Gemessen in der Sequenz d(CTTTCXTTCTT)·d(AAGAAYGAAAAG) in einem Puffer aus 100 mM NaCl und 10 mM Na-PIPES bei pH 7,0 (Schweitzer & Kool, 1995)

Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Destabilisierung der DNA, wenn ein modifizierter Baustein eingebaut wird. Es zeigt sich aber auch, daß deutliche Stabilitätsunterschiede zwischen den verschiedenen Nucleobasen auftreten, obwohl es keine Wasserstoffbrücken zwischen ihnen gibt. Besonders bemerkenswert ist der Unterschied von über 4,5°C zwischen einem **19**·C und einem **19**·T Basenpaar. Anhand der Ergebnisse zeigt sich die Tatsache, daß Wasserstoffbrücken nicht alleine für die Stabilität einer Doppelhelix verantwortlich sind.

Um den Beitrag der Basenstapelungswechselwirkung von Verbindung **19** zu ermitteln, wurde von Guckian *et al.* ein selbstkomplementäres DNA-Hexamer mit der modifizierten Base als siebtem überhängenden Baustein synthetisiert (Guckian *et al.*, 1996). Die Stabilisierung, die dieser Strang gegenüber einem unmodifizierten DNA-Hexamer aufweist, ist allein auf bessere Basenstapelungswechselwirkungen zurückzuführen. Die Stabilisierung im Falle von **19** beträgt 6,3°C gegenüber einem Thymidin. Es ist dabei allerdings zu beachten, daß der modifizierte Baustein aufgrund der selbstkomplementären Sequenz an beiden Enden der Helix übersteht und deshalb doppelt zu der Erhöhung der Stabilität beiträgt. Das Verhalten von 1',2'-Dideoxy-1'-(2,4-difluortoluolyl)- β -D-ribofuranose **19** ist von der Position des Einbaus in eine Doppelhelix stark abhängig. Während ein Einbau im mittleren Bereich eines Oligonucleotids zu einer Destabilisierung führt, erhöht ein Einbau am Ende eines Oligonucleotids die Stabilität einer Doppelhelix (Schweitzer & Kool, 1995). Dabei ist der Einfluß der Solvation nicht zu unterschätzen. Dies zeigt sich besonders dann, wenn ein Basenpaar aus zwei modifizierten Bausteinen gebildet wird. Der letzte Eintrag in Tabelle 4.2 ist ein solches Beispiel. Die resultierende Doppelhelix ist zwar weniger stabil als eine unmodifizierte, aber deutlich stabiler als ein modifizierter Baustein der mit einer natürlichen Nucleobase gepaart wird. Anhand von Haarnadelschleifen konnte von Ren gezeigt werden, daß, wenn nur stärkere Basenstapelungswechselwirkungen aber keine Solvationseffekte eine Rolle spielen, die Stabilität von Haarnadelschleifen durch Einbau von **19** stark zunehmen kann (Ren *et al.*, 1996).

Ein Frage von großer Wichtigkeit ist auch, ob der Einbau von **19** die Struktur der Doppelhelix verändert oder nicht. Um diese Frage zu beantworten wurden von Guckian 2D-NMR Messungen mit Messungen zur eingeschränkten Moleküldynamik und Energieminimierungsrechnungen durchgeführt (Guckian *et al.*, 1998). Der untersuchte Duplex bestand aus einer Sequenz von zwölf Basenpaaren. Die gewonnenen Daten zeigten überraschenderweise, daß die Struktur dieses Duplex identisch mit derjenigen ist, die man bei einem Duplex mit einem A·T Basenpaar an der gleichen Stelle erwarten würde. Obwohl das A·**19** Basenpaar die

DNA destabilisiert, nimmt es eine Anordnung ein, die sich von der eines A··T Basenpaares nicht unterscheidet (Abbildung 4.4).

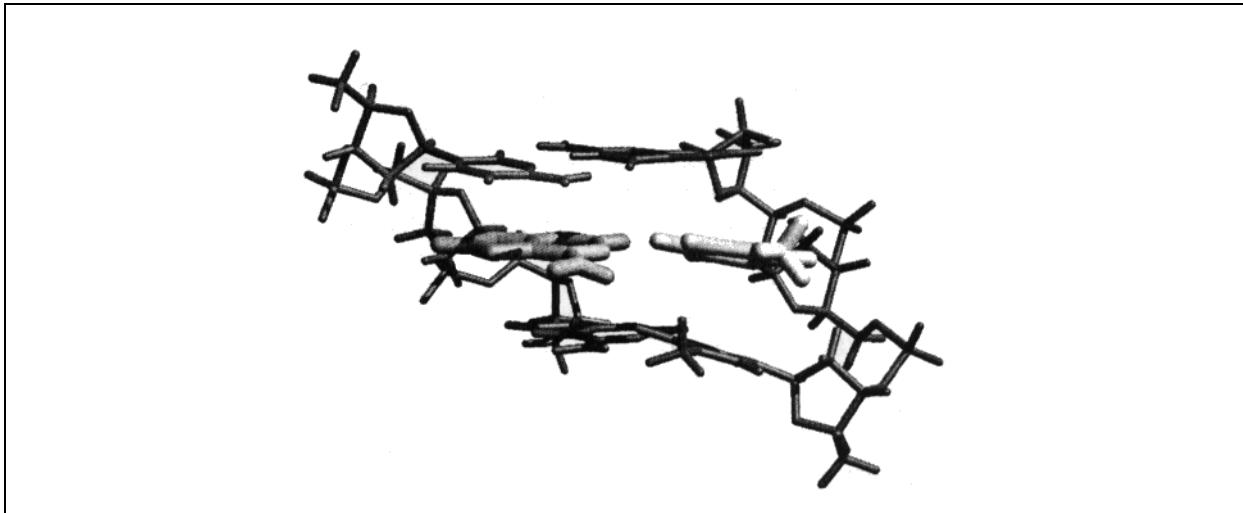


Abb. 4.4: Seitenansicht der drei zentralen Basenpaare eines 12mer DNA Duplex, der im Zentrum ein Adenin··Difluortoluol-Paar enthält (Guckian *et al.*, 1998)

Anschließend wurden Untersuchungen mit der gleichen Basensequenz, die allerdings ein doppelt modifiziertes Basenpaar enthielt, durchgeführt. Als modifizierte Basen wurden **19** und 4-Methyl-benzimidazol als Analoga für das natürliche Adenin verwendet. Auch diese Untersuchungen lieferten nur Hinweise auf kleinere Verzerrungen der DNA Struktur (Guckian *et al.*, 2000).

Das Difluortoluol-Analogon **19** wurde in synthetische DNA Matrizen eingebaut und darauf getestet, ob es von einer Polymerase akzeptiert wird. Die ersten Versuche wurden mit dem Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I (Kool, 1998; Morales & Kool, 1999; Morales & Kool, 2000), einer der am besten untersuchten Polymerasen, ausgeführt. In einem Experiment mit allen vier Nukleotiden verlief die Polymerasereaktion über **19** hinaus ohne sichtbare Verzögerung fort und eines der natürlichen Nucleoside wurde direkt gegenüber von **19** eingebaut (Moran *et al.*, 1997). Durch Zugabe nur einzelner Nucleotide wurde gezeigt, daß an dieser Stelle selektiv nur Adenin eingebaut wird. Eine quantitative Steady-State-Kinetik-Analyse ergab, daß die Effizienz der Synthese dieses Basenpaares nur etwa viermal niedriger ist als bei einem natürlichen Basenpaar (Abbildung 4.5 links). Auch die Selektivität des Adenin-Einbaus ist beinahe so hoch wie bei einem natürlichen Basenpaar. Da bei **19** aber keine Fähigkeit zur Bildung von Wasserstoffbrücken gemessen werden konnte, müssen neben den Wasserstoffbrückenbindungen noch andere Effekte für die Polymeraseaktivität wichtig sein. Es könnte nun der Schluß gezogen werden, daß **19** als schlechter Wasserstoffbrückenbildner hauptsächlich als nichtinstruktive Base wirkt und das Enzym beim

selektiven Einbau einfach der A-Regel, welche besagt, daß gegenüber nichtinstruktiven Stellen 2'-Desoxyadenosin von den meisten Polymerasen eingebaut wird (Schaaper *et al.*, 1983; Lawrence *et al.*, 1990; Paz-Elizur *et al.*, 1997), folgt. Dem widerspricht allerdings die Beobachtung, daß das A··**19** Basenpaar deutlich effizienter prozessiert wird als es nach der A-Regel geschehen sollte und daß es keine größeren Pausen verursacht wie A gegenüber einer abasischen Stelle. Um die Hypothese weiter zu festigen, wurde das Triphosphat von **19** synthetisiert und der Einbau durch eine Polymerase beobachtet (Moran *et al.*, 1997a). Der beobachtete Einbau ist immer noch hoch effizient und die Selektivität so hoch wie beim natürlichen Basenpaar (Abbildung 4.5 rechts).

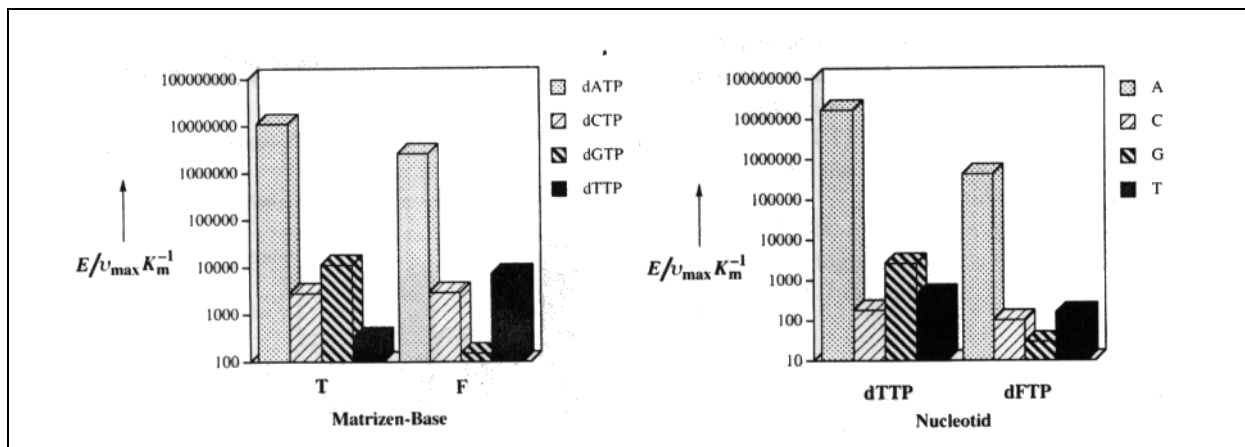


Abb. 4.5: Links: Zuverlässigkeit des Nukleotideinbaus gegenüber von T und F (F = **19**); Rechts: Selektivität des Einbaus von dTTP und dFTP (F = **19**) gegenüber den vier natürlichen Nukleobasen (Kool *et al.*, 2000)

Es konnte ferner gezeigt werden, daß das A··**19** Basenpaar jedes A··T Basenpaar in einem 48mer Duplex ersetzen kann und daß in sechs unterschiedlichen DNA Umgebungen eine zuverlässige Synthese abläuft, obwohl ironischerweise die synthetisierte DNA deutlich weniger stabil ist als die natürliche DNA (Liu *et al.*, 1997). In weiteren Untersuchungen wurde herausgefunden, daß auch *Taq*-Polymerase, T7-DNA-Polymerase und reverse Transkriptase aus HIV das A··**19** Basenpaar qualitativ betrachtet sehr gut umsetzen können (Morales & Kool, 2000a; Morales & Kool, 2000b; Kool 2000a).

Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, daß Wasserstoffbrückenbindungen bei der DNA Synthese nicht so wichtig sind wie bisher allgemein angenommen und daß sterische Effekte eine größere Rolle spielen als vermutet (Kool *et al.*, 2000).

4.2 Universelle Basen

Die Integrität von DNA und RNA Doppelhelices wird hauptsächlich von spezifischen Wasserstoffbrücken zwischen den Nucleobasen zweier Stränge und durch Basenstapelungswechselwirkungen der Nucleobasen eines Stranges bestimmt. Nucleobasen-Analoga, die nicht zwischen den natürlichen Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin bzw. Uracil unterscheiden, werden universelle Basen genannt. Die Eigenschaft als Mimetikum für alle vier natürlichen Basen mit gleichen Effekten zu fungieren, induziert eine beliebige Position im Watson-Crick-Basenpaarungsschema einnehmen zu können, welches wiederum mit noch wichtigeren Fragen wie z.B. der Duplexstabilität oder der Möglichkeit der Replikation verbunden ist.

Idealerweise sollte eine universelle Base folgende Bedingungen erfüllen (Loakes *et al.*, 1997):

- Sie sollte stabil mit allen vier natürlichen Nucleobasen in einer DNA-bzw. RNA-Doppelhelix paaren ohne zwischen ihnen zu unterscheiden.
- Sie sollte mit den natürlichen Nucleobasen einen Duplex bilden, der als Start für eine Polymerase dienen kann.
- Sie sollte bei der Replikation den Einbau aller vier natürlichen Nucleobasen gegenüber sich selbst durch eine Polymerase ohne Unterscheidung zulassen.
- Sie sollte als Triphosphat von einer Polymerase ohne Bevorzugung gegenüber allen vier natürlichen Nucleobasen eingebaut werden können.

Bis zum heutigen Tage konnte noch keine universelle Base gefunden werden, die alle diese Eigenschaften in sich vereinigt. Alle bisher bekannten universellen Basen erfüllen immer nur einen Teil der oben aufgeführten Eigenschaften.

Eine Strategie zur Entwicklung einer idealen universellen Base beruht auf der Verbesserung der Basenstapelungseigenschaften während das charakteristische Muster von Wasserstoffbrückendonor- und Akzeptorstellen der natürlichen Nucleobasen in den Hintergrund rückt. Das Resultat dieses Ansatzes ist eine Serie von Verbindungen, die alle von eher hydrophober Natur sind. Dies sind unter anderem 3-Nitropyrrol **23** (Nichols *et al.*, 1994), 5-Nitroindol **24** (Loakes & Brown, 1995) und 4-Nitrobenzimidazol (Seela *et al.*, 1996) (Abbildung 4.6).

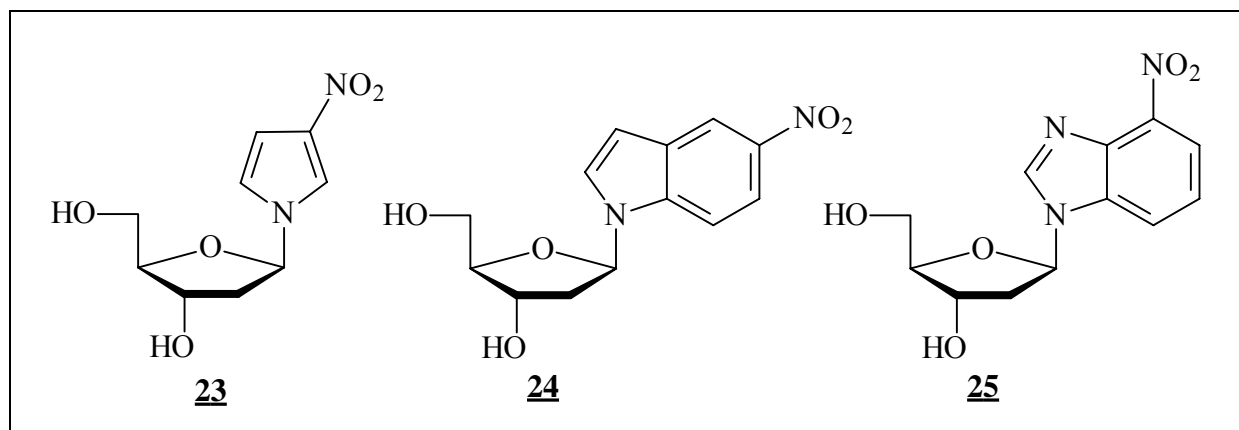


Abb. 4.6: Universelle Basen 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-3-nitropyrrol 23, 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-5-nitroindol 24 und , 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-4-nitrobenzimidazol 25

Oligonukleotid Duplexe, die solche Basen enthalten, zeigen eine ähnliche Stabilität, unabhängig gegenüber welcher natürlicher Nukleobase die universelle Base steht. Andere Nukleosid-Analoga enthalten die mehr hydrophilen Carboxamid-Derivate von Pyrrol oder Imidazol (Bergstrom *et al.*, 1996; Pochet & Dugue, 1995; Sala *et al.*, 1996). Diese sollten allerdings besser als zweideutige Basen beschrieben werden, da sie immer nur mit zwei und nicht mit allen vier der natürlichen Nukleobasen als universelle Basen fungieren. Alle diese Basen stabilisieren eine Doppelhelix durch verbesserte Basenstapelungswechselwirkungen. Dadurch werden sie auch für Untersuchungen zu nicht kovalenten Wechselwirkungen in Duplexen interessant. Einige dieser Basen haben auch ihre Effektivität in molekularbiologischen Anwendungen wie PCR oder der Sequenzierung schon unter Beweis gestellt (Bergstrom *et al.*, 1995; Loakes *et al.*, 1995; Parinov *et al.*, 1996). Andere wiederum wie z.B. 1',2'-Dideoxy-1'-(2,4-difluortoluolyl)- β -D-ribofuranose 19 können zwar als Enzymsubstrate dienen, werden aber von Polymerasen bevorzugt nur gegenüber einer der natürlichen Nukleobasen eingebaut (Moran *et al.*, 1997). Kein Nukleosid-Analogon erfüllt alle Vorgaben für eine universelle Base. Aus diesem Grunde wurden weitere Untersuchungen durchgeführt und die Basen 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-3-methyl-isocarbostyryl 26, 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-5-methyl-isocarbostyryl 27, 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-3-methyl-7-propinyl-isocarbostyryl 28 entwickelt (Abbildung 4.7) (Berger *et al.*, 2000).

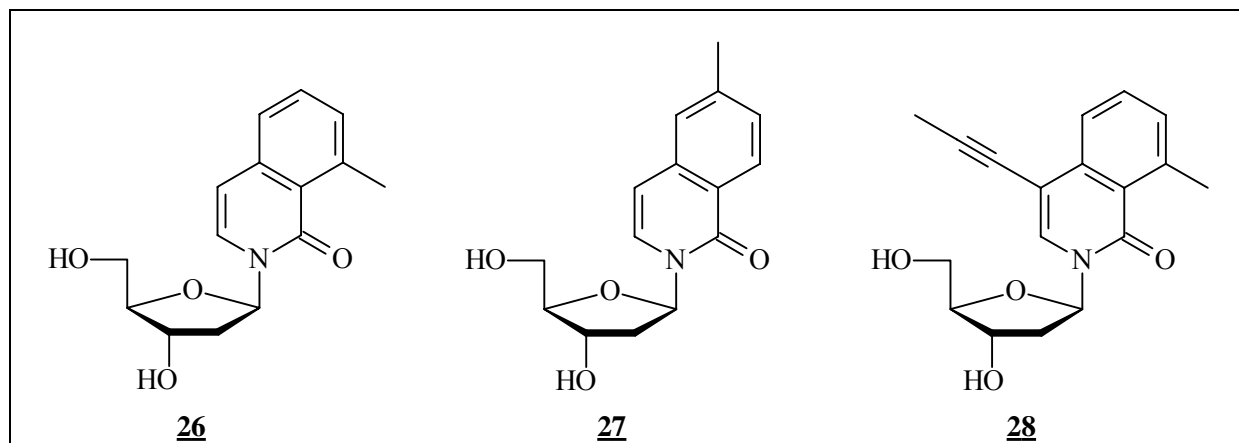


Abb. 4.7: Universelle Basen 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-3-methyl-isocarbostyryl **26**, 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-5-methyl-isocarbostyryl **27**, 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-3-methyl-7-propinyl-isocarbostyryl **28**

1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-3-methyl-isocarbostyryl **26** und 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-5-methyl-isocarbostyryl **27** besitzen eine N-glykosidische Bindung zum Zucker und eine hydrophile Carbonylgruppe, die in Richtung der kleinen Furche zeigt. Der zweite aromatische Ring an der Base erhöht deren Lipophilie und verbessert die Basenstapelungswechselwirkungen. Aus diesen Eigenschaften resultiert eine nur geringe Schwankung der Stabilität des Duplexes bei Einbau dieser Basenanaloga und gleichzeitig nur eine schwache Destabilisierung. Im Fall von 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-3-methyl-isocarbostyryl **26** konnte auch gezeigt werden, daß alle vier natürlichen Nucleobasen mit in etwa gleicher Effektivität gegenüber **26** eingebaut werden. Entsprechende Untersuchungen zu **27** und **28** sowie der Beweis, daß diese Analoga auch von Polymerasen als Substrate akzeptiert und gegenüber allen vier natürlichen Nucleobasen ohne Bevorzugung eingebaut werden, stehen noch aus.

Obwohl eine ideale universelle Base auch heute noch nicht zur Verfügung steht, wurden doch in den letzten Jahren einige Nucleinsäure Analoga entwickelt, die zumindest immer einen Teil der Anforderungen einer idealen universellen Base erfüllen. Die Ausbildung von Basenpaaren mit den natürlichen Nucleobasen bei nur geringer Beeinflussung der Stabilität und geringer Schwankungsbreite wird besonders gut von 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-3-methyl-isocarbostyryl **26**, 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-5-methyl-isocarbostyryl **27** und 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-5-nitroindol **24** erfüllt. Die Voraussetzung, Polymerasen als Substrat zu dienen, erfüllt bisher nur 1',2'-Dideoxy-1'-(2,4-difluortoluolyl)- β -D-ribofuranose **19**.

Tabelle 4.3 vergleicht nochmals die bekanntesten und in ihren Eigenschaften der idealen universellen Base am nächsten kommenden Nukleosid-Analoga.

| universelle Base | Stabilitätserniedrigung pro Einbau [°C] | Schwankungsbreite bei Einbau gegenüber den vier natürlichen Basen [°C] |
|----------------------------------|---|--|
| 4-Nitroindol | 5 – 9 | 4 |
| 5-Nitroindol <u>24</u> | 4 – 7 | 3 |
| 6-Nitroindol | 5 – 8 | 3 |
| 3-Nitropyrrol <u>23</u> | 8 – 11 | 3 |
| 3-Methylisocarbostyryl <u>26</u> | 3 – 5 | 2 |
| 5-Methylisocarbostyryl <u>27</u> | 3 – 4,5 | 1,5 |
| 2,4-Difluortoluol <u>19</u> | 14 – 19 | 5 |

Tabelle 4.3: Destabilisierung eines Duplex bei einfachem Einbau einer universellen Base

5 Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit war die Synthese neuartiger Fluorbenzol- und Fluorbenzimidazol-Nukleoside. Bei den zu synthetisierenden Bausteinen handelt es sich mit 1'-Desoxy-1'-(4-fluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose um einen isosteren Baustein zum natürlichen Inosin und im Falle von 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose um einen isosteren Baustein zum natürlichen Uridin (Abbildung 5.1). Die anderen Fluorbenzol- und Fluorbenzimidazol-Bausteine sollten die Frage nach dem Einfluß der Anzahl und der Position der Fluoratome am Aromaten klären helfen.

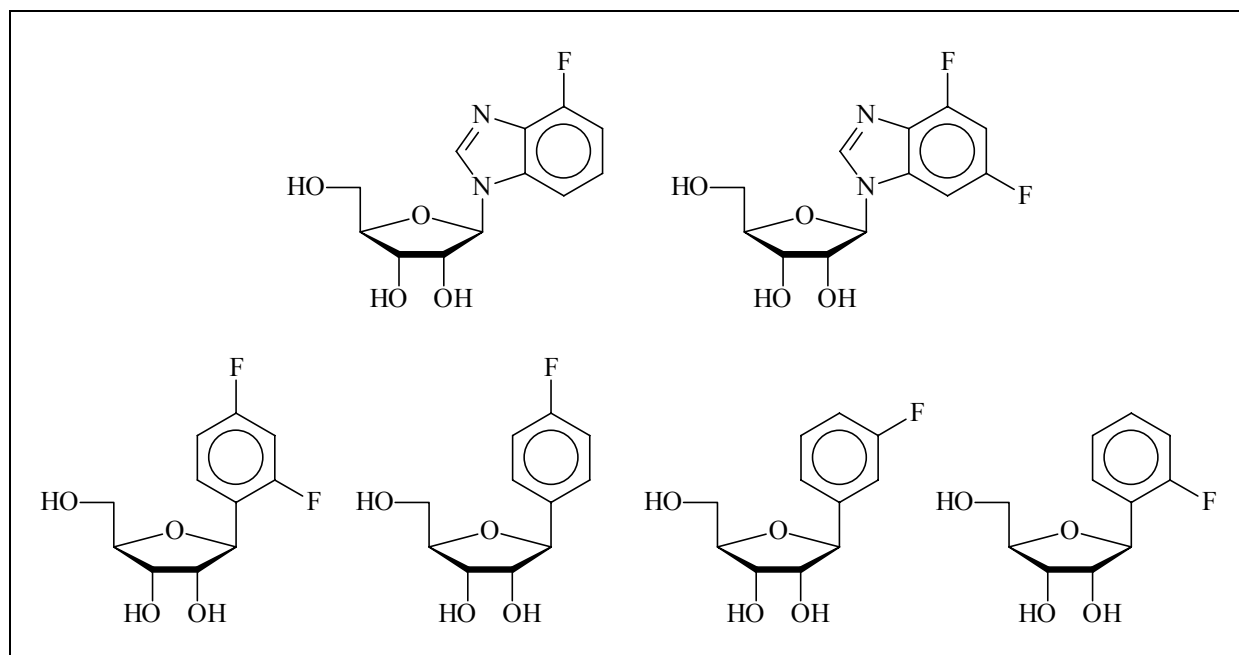


Abb. 5.1: Zu synthetisierende Fluorbenzimidazol- und Fluorbenzol-Nukleoside

Soweit möglich sollten die modifizierten Bausteine kristallisiert werden, um die Bedeutung der Fluoratome auf die Struktur der Nukleoside und auf die Kristallpackung zu untersuchen. Nach erfolgter Synthese der Nukleosid-Analoga sollten diese in ihre Phosphoramiditbausteine überführt und in 12mer RNA-Stränge mittels automatisierter Festphasensynthese eingebaut werden. Diese Oligonukleotide sollten nach erfolgter Aufreinigung und Charakterisierung mittels UV- und CD-Spektroskopie untersucht werden. Dazu sollten RNA Duplexe gebildet und der Einfluß der synthetisierten Bausteine durch Paarung mit natürlichen bzw. mit

modifizierten Nukleotiden auf die Stabilität der Duplexe bestimmt werden. Es sollte ermittelt werden, ob die fluorierten Bausteine Wasserstoffbrücken bilden können und wie groß ihre Basenstapelungs- und Solvatationsbeiträge für die Stabilität des RNA-Duplex sind. Hierzu sollten die thermodynamischen Daten aus den UV-spektroskopischen Untersuchungen ermittelt werden. Mit Hilfe von CD-Messungen sollte der Einfluß der modifizierten Bausteine auf die Struktur der RNA-Doppelhelix untersucht werden.

6 Chemische Synthesen

6.1 Auswahl der modifizierten Bausteine

In dieser Arbeit sollten zu den natürlichen Nucleosiden Uridin und Inosin isostere Nucleoside untersucht werden, die nicht in der Lage sein sollten, Wasserstoffbrücken zu den Nucleosiden Adenosin, Guanosin, Cytidin oder Uridin zu bilden. Hierzu mußten Moleküle gefunden werden, die im Bereich der Nucleobasen keinen Sauerstoff und keinen Stickstoff tragen, da diese Atome entscheidend für die Ausbildung der Watson-Crick Wasserstoffbrücken sind. Die gesuchten Moleküle sollten aber auch zugleich in ihrer Struktur möglichst ähnlich zu den natürlichen Nucleosiden sein, um die Struktur der resultierenden RNA so wenig wie möglich zu verändern. Diese Voraussetzungen schränkten die Auswahl für die gesuchten Moleküle stark ein. Abbildung 6.1 zeigt die ausgewählten isosteren Bausteine.

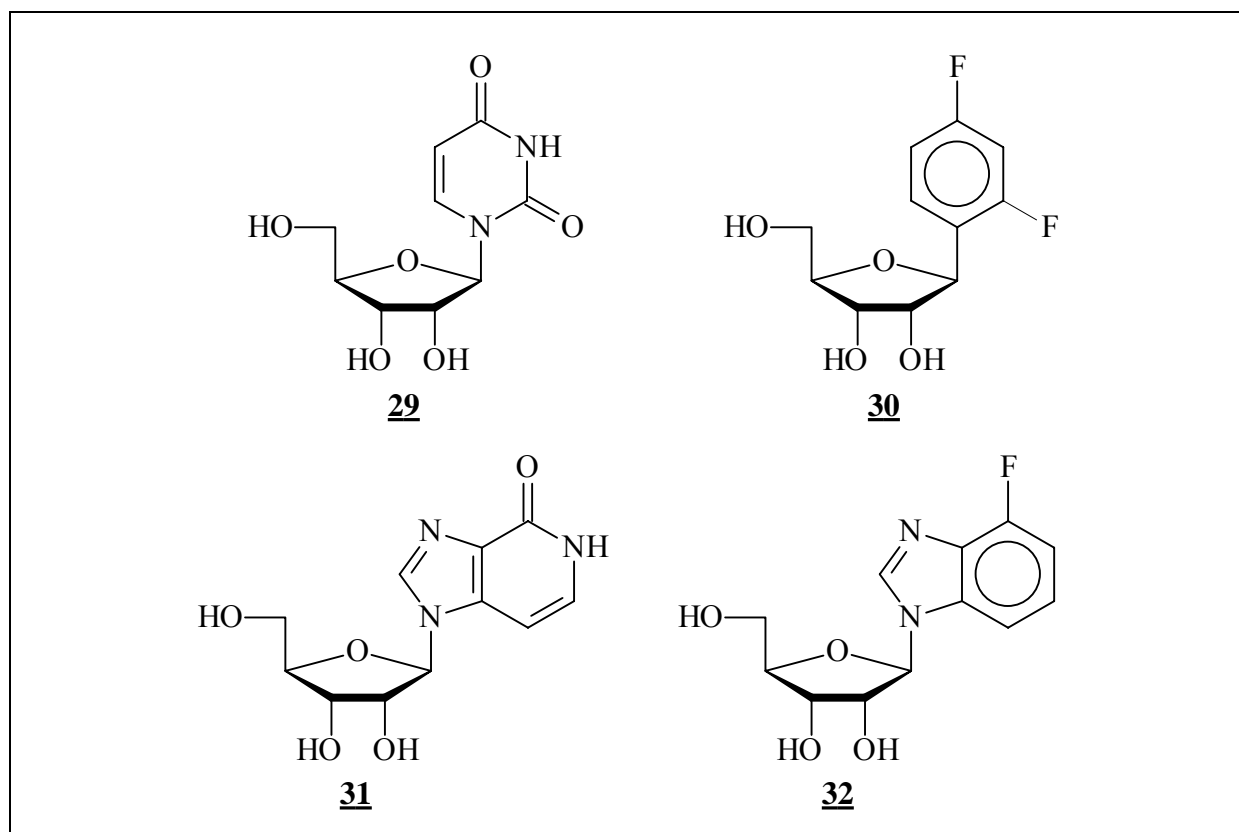


Abb. 6.1: Vergleich der natürlichen Nucleoside mit den isosteren fluormodifizierten Nucleosiden

Der Difluorbenzol Baustein **30** ist isoster zum natürlichen Uridin **29** und der Fluorbenzimidazol Baustein **32** zum natürlichen Inosin **31**. Beide modifizierten Bausteine enthalten keine Sauerstoff- oder Stickstoffatome, die an sogenannten Watson-Crick Wasserstoffbrücken beteiligt sind. Die Carbonylsauerstoffe sind durch Fluoratome ersetzt. Fluor hat sich als das beste Mimetikum für Sauerstoff erwiesen, da es sowohl in der Größe als auch in der Polarität dem Sauerstoff am nächsten kommt (Pankiewicz, 2000). Die Stickstoffe im Sechsring der Nucleobasen sind durch sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffe ersetzt, so daß ein Benzol- bzw. ein Benzimidazol-Derivat resultiert. Beide Ersetzungen sollten die Struktur der modifizierten Nucleoside kaum von der der natürlichen Nucleoside abweichen lassen (Schweitzer & Kool, 1994).

Wie gut die resultierende Struktur von 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **30** mit der des Uridins **29** übereinstimmt, läßt sich aus dem Vergleich der beiden Kristallstrukturen ersehen. Abbildung 6.2 zeigt die Bindungslängen einer der beiden Kristallstrukturen aus der asymmetrischen Elementarzelle von Uridin (Green *et al.*, 1975), sowie die Bindungslängen von 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **30** (Bats, Parsch & Engels, 2000; Parsch & Engels, 1999).

Auffallend ist, daß die Bindungslängen um nicht mehr als 5 pm variieren. Einzige Ausnahme sind die C-F Bindungen. Sie sind bis zu 14 pm länger als die entsprechenden C=O Bindungen. Beide Moleküle kristallisieren in einem monoklinen Kristallsystem und beide Moleküle zeigen eine C2'-*exo*/C3'-*endo* Konformation der Ribose. Da auch die resultierenden Winkel ähnlich sind, kann 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **30** als bestmöglicher isosterer Ersatz von Uridin angesehen werden.

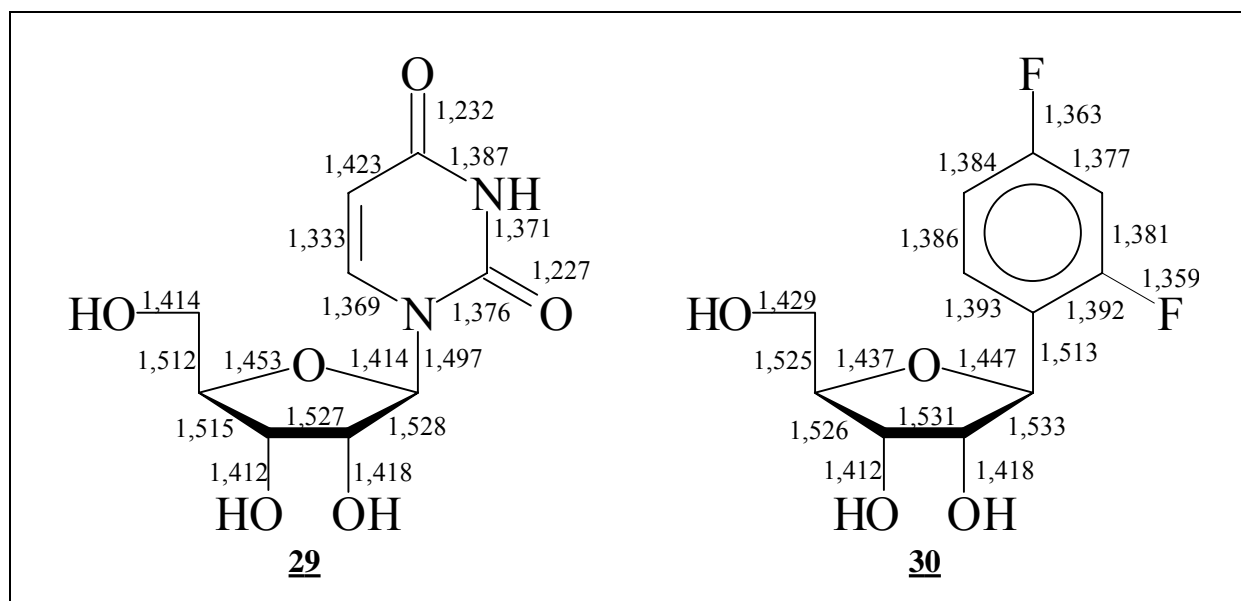


Abb. 6.2: Vergleich der Atomabstände, Abstände in Å

Neben der Voraussetzung, daß die ausgewählten Bausteine keine Watson-Crick Wasserstoffbrücken bilden können, sollte auch der Einfluß der Fluoratome auf die Stabilität einer RNA Doppelhelix untersucht werden. Aus diesem Grunde wurde neben dem zum Inosin isosteren 1'-Desoxy-1'-(4-fluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **32** ein Baustein mit einem weiteren Fluoratom synthetisiert. Für die Position des zweiten Fluoratoms wurde die 6-Position des Benzimidazols ausgewählt, da sie der 2-Position in Purinen entspricht, die z.B. beim Guanosin ebenfalls substituiert ist. Bei dem aus diesen Voraussetzungen resultierenden Baustein handelt es sich um 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **33** (Abbildung 6.3).

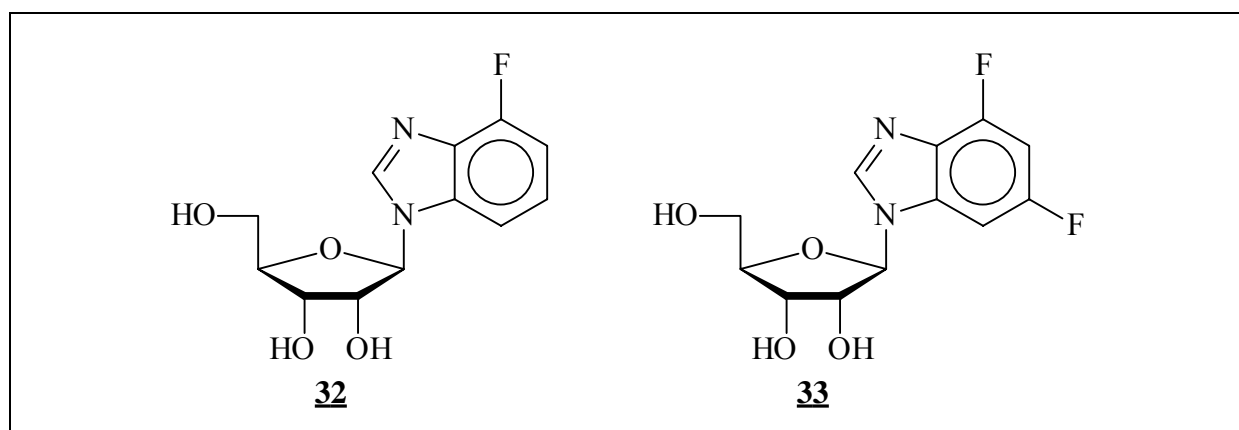


Abb. 6.3: Fluorbenzimidazole

Neben der Wirkung eines weiteren Fluoratoms sollte auch der Einfluß bei Entfernung eines Fluoratoms bei einem Pyrimidin analogen Baustein untersucht werden. Dazu wurden verschiedene Fluorbenzol Derivate synthetisiert, bei denen das Fluoratom jede mögliche Position am Aromaten einnimmt. Somit ist auch eine Untersuchung zur Position der Fluorsubstitution möglich. Bei den synthetisierten Pyrimidin analogen Bausteinen handelt es sich neben 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **30** um die drei einfach fluorierten Bausteine 1'-Desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **34**, 1'-Desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **35** und 1'-Desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **36**.

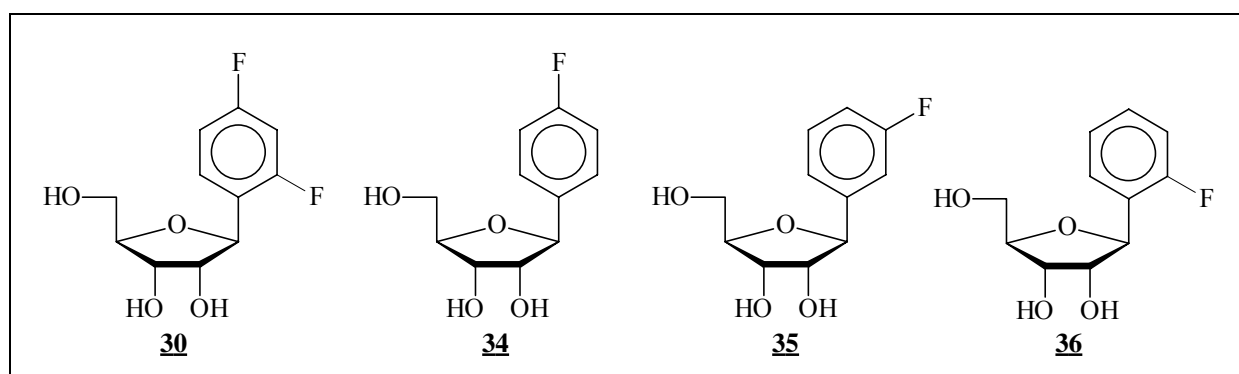


Abb. 6.4: Fluorbenzole

Um den Einfluß von Fluor auf die Stabilität einer RNA-Doppelhelix umfassend untersuchen zu können, ist es wichtig, auch Moleküle zu untersuchen, die baugleich zu den fluorierten Bausteinen sind, aber keine Fluoratome tragen. Aus diesem Grunde wurden die beiden Verbindungen 1'-Desoxy-1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose **37** und 1'-Desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose **38** synthetisiert (Abbildung 6.5). Für Untersuchungen der Basenstapelungswechselwirkungen aller modifizierten Bausteine wurde ein abasischer Baustein (1-Desoxy-D-ribofuranose **39**) synthetisiert.

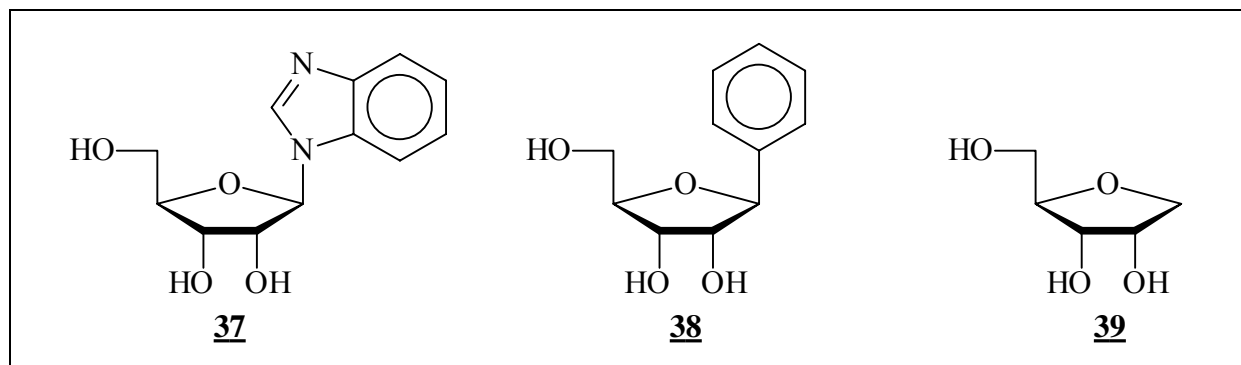


Abb. 6.5: Modifizierte Bausteine ohne Fluor

6.2 Fluorbenzimidazole

Die Synthese der Fluorbenzimidazole beginnt sowohl für 4-Fluorbenzimidazol **50** als auch für 4,6-Difluorbenzimidazol **44** auf der Stufe der entsprechenden Fluoracetanilide. Beide Fluoracetanilide, **45** und **40**, wurden von Lancaster bezogen und eingesetzt wie gekauft.

Die Reaktionsfolge zu den Fluorbenzimidazolen beginnt mit der Nitrierung der Fluoracetanilide. Aufgrund der unterschiedlichen Reaktivität der beiden Fluoracetanilide müssen unterschiedliche Reaktionsbedingungen angewendet werden. Für das reaktivere Difluoracetanilid **40** genügt eine Nitriersäure aus 65 %iger Salpetersäure, konzentrierter Schwefelsäure und Eisessig bei einer Reaktionszeit von 90 Minuten (Finger *et al.*, 1951). Um das weniger reaktive Monofluoracetanilid **45** nitrieren zu können, muß man auf rauchende Salpetersäure, Essigsäureanhydrid und Eisessig als Nitriersäure zurückgreifen. Die Reaktionszeit beträgt dann aber immer noch 48 Stunden und ist somit deutlich länger als beim Difluoracetanilid. Beim Difluoracetanilid **40** verläuft die Reaktion mit über 96 % zum 2,4-Difluor-6-nitro-acetanilid **41**. Die Nitrierung von 2-Fluoracetanilid **45** hingegen liefert ein Isomerengemisch aus 2-Fluor-4-nitro-acetanilid **46** und 2-Fluor-6-nitro-acetanilid **47** in einem beinahe 1:1 Verhältnis (Abbildung 6.6). Eine Trennung der beiden Isomeren ist aufgrund

ihrer Löslichkeit in wäßrig-basischem Alkohol möglich. Die Trennung wird mit einer sogenannten Witt-Utermann Lösung durchgeführt (Witt & Utermann, 1906; Wepster & Verkade, 1949). Diese Lösung besteht aus einem Teil 50 %iger Kalilauge, vier Teilen Wasser und einem Teil Ethanol. Das Isomerengemisch wird durch Zugabe von eiskalter Witt-Utermann Lösung getrennt. Eine Verseifung tritt bei dieser Temperatur und der kurzen Trennzeit nicht auf. Die Lösung vermag sehr gut *o*-Nitroacetanilide zu lösen, während *p*-Nitroacetanilide so gut wie unlöslich sind. Durch Filtration und anschließendem Ausfällen des 2-Fluor-6-nitro-acetanilid **47** durch ansäuern erhält man beide Isomere sauber getrennt.

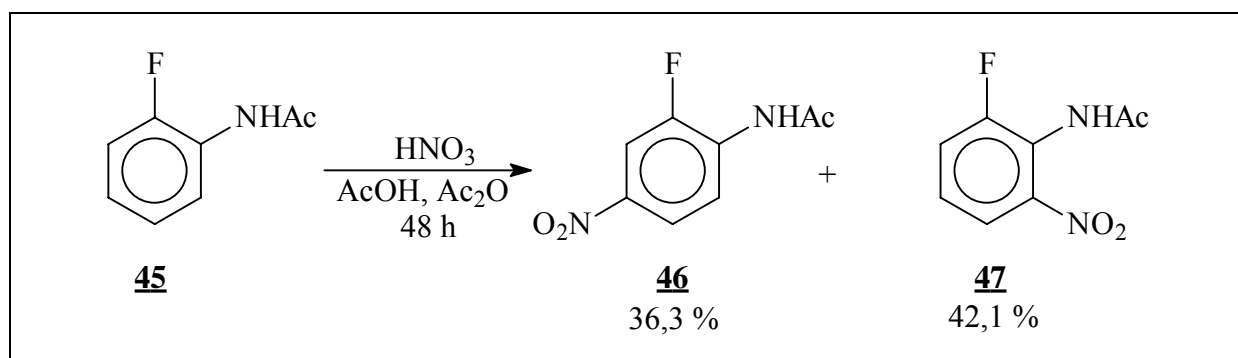


Abb. 6.6: Nitrierung von 2-Fluoracetanilid **45**

Die Entschützung der Aminofunktion erfolgt in beiden Fällen mit Säure. 2-Fluor-6-nitroacetanilid **47** läßt sich mit 2N HCl in drei Stunden mit über 89 % in 2-Fluor-6-nitro-anilin **48** überführen. Aufgrund der erhöhten Löslichkeit von 2,4-Difluor-6-nitro-anilin **42** in Wasser wird 2,4-Difluor-6-nitro-acetanilid **41** nicht in wäßriger Säure, sondern in konzentrierter Schwefelsäure entschützt. Probleme bereitet dann allerdings das Ausfällen von 2,4-Difluor-6-nitro-anilin **42** aus der Schwefelsäure. Um **42** ausfällen und restliche Säure beim Absaugen auswaschen zu können wird eine gewisse Menge an Wasser benötigt. Gleichzeitig ist 2,4-Difluor-6-nitro-anilin **42** aber relativ gut in Wasser löslich, was die Ausbeute an Produkt bei dieser Reaktion stark vermindert (Finger *et al.*, 1951).

Die Reduktion der Nitrogruppe zum Amin wird mittels Metallkatalyse unter Verwendung von Wasserstoff durchgeführt (Montgomery & Hewson, 1965). Hierzu werden die Nitroverbindungen in absolutem Ethanol gelöst und die Lösung durch mehrmaliges kurzes anlegen von Vakuum mit anschließendem Befüllen des Kolbens mit Argon entgast. Anschließend wird der Katalysator zugesetzt und eine Wasserstoffatmosphäre über der Lösung mittels eines Ballons angelegt. Dabei ist darauf zu achten, daß zum einen verbleibendes Argon im Kolben durch gründliches Ausspülen mit Wasserstoff entfernt wird, um die Reaktion nicht zu hemmen und zum anderen, daß keine Katalysatorreste oberhalb der Lösung im Kolben verbleiben, da sie sonst den Wasserstoff in Brand setzen können. Durch

starkes Rühren wird für eine möglichst große Kontaktfläche zwischen Katalysator und Wasserstoff gesorgt. Das Ende der Reaktion läßt sich in diesem Fall mit bloßem Auge erkennen, da nach vollständiger Abreaktion der Nitroverbindung die Gelbfärbung der Lösung verschwindet. Die Reaktion wurde auch mit Palladium auf Kohle (10 %) als Katalysator erfolgreich durchgeführt. Es muß hier allerdings auf stark variierende Reaktionszeiten hingewiesen werden. Die Reaktionszeiten, die im experimentellen Teil (Kapitel 11) angegeben sind, beziehen sich nur auf genau den dort beschriebenen Versuch. Diese Versuche ergaben die größte Ausbeute, nicht aber die kürzeste oder längste Reaktionszeit. Während die Ausbeute mittels Dünnschichtchromatographie immer quantitativ war, variierten die Reaktionszeiten zwischen 2 und 36 Stunden. Da der Katalysatoranteil bei allen Versuchen konstant gehalten wurde, kann die unterschiedliche Reaktionszeit nur mit teilweise vorhanden sein von Spuren von Wasser bzw. unterschiedlicher Beschaffenheit der Katalysatoroberfläche erklärt werden. Nach dem Ende der Reaktion wurde der Katalysator durch Absaugen über Celite Filtergel abgetrennt und die verbleibende Lösung am Rotationsverdampfer eingeeengt. Dabei ist darauf zu achten, daß das Produkt so wenig Kontakt mit Sauerstoff wie möglich erhält. Bei Kontakt mit Luftsauerstoff färbt sich das Produkt und die gesamte Lösung schwarz. Aufgrund der hohen chemischen Reaktivität der beiden Phenylendiamine **43** und **48** wurden diese nicht aufgereinigt, sondern sofort in die Ringschlußreaktion eingesetzt.

Die Umsetzung der Phenylendiamine zu den entsprechenden Fluorbenzimidazolen erfolgt durch Reaktion mit Ameisensäure (Kirk & Cohen, 1969). Hierzu werden **43** bzw. **48** in Ameisensäure gelöst und unter Rückfluß 1,5 bzw. 2 Stunden gekocht. Anschließend wird der verbleibende Überschuß an Ameisensäure abdestilliert und die Produkte getrocknet. Sowohl 4-Fluorbenzimidazol **50** als auch 4,6-Difluorbenzimidazol **44** werden als farbige Feststoffe erhalten. Beide sind DC-rein und zeigen im NMR-Spektrum nur geringe Verunreinigungen. Während 4-Fluorbenzimidazol **50** säulenchromatographisch aufgereinigt werden kann, gelingt dies bei 4,6-Difluorbenzimidazol **44** nur unter größeren Ausbeuteverlusten. Der Grund hierfür liegt in der schlechten Löslichkeit in Elutionsmitteln, die für eine säulenchromatographische Aufreinigung geeignet sind. Bei der Aufreinigung fällt ein großer Teil der Substanz auf der Chromatographiesäule aus und kann nicht mehr zurückgewonnen werden. Versuche zur Glykosylierung, wie sie in Kapitel 6.3.1 beschrieben werden, haben gezeigt, daß das Rohprodukt von Difluorbenzimidazol **44**, wenn es gut getrocknet ist, ohne nennenswerte Ausbeuteverluste eingesetzt werden kann. Für analytische Zwecke wurde ein Teil des Produktes im Vakuum sublimiert. Da sich die Sublimation aber als sehr langwierig erwies

und das Rohprodukt nach NMR eine Reinheit größer 98 % aufwies, wurde auf eine Sublimation der Hauptmenge des Produktes verzichtet und das Rohprodukt ohne eine weitere Aufreinigung in der anschließenden Glykosylierung eingesetzt.

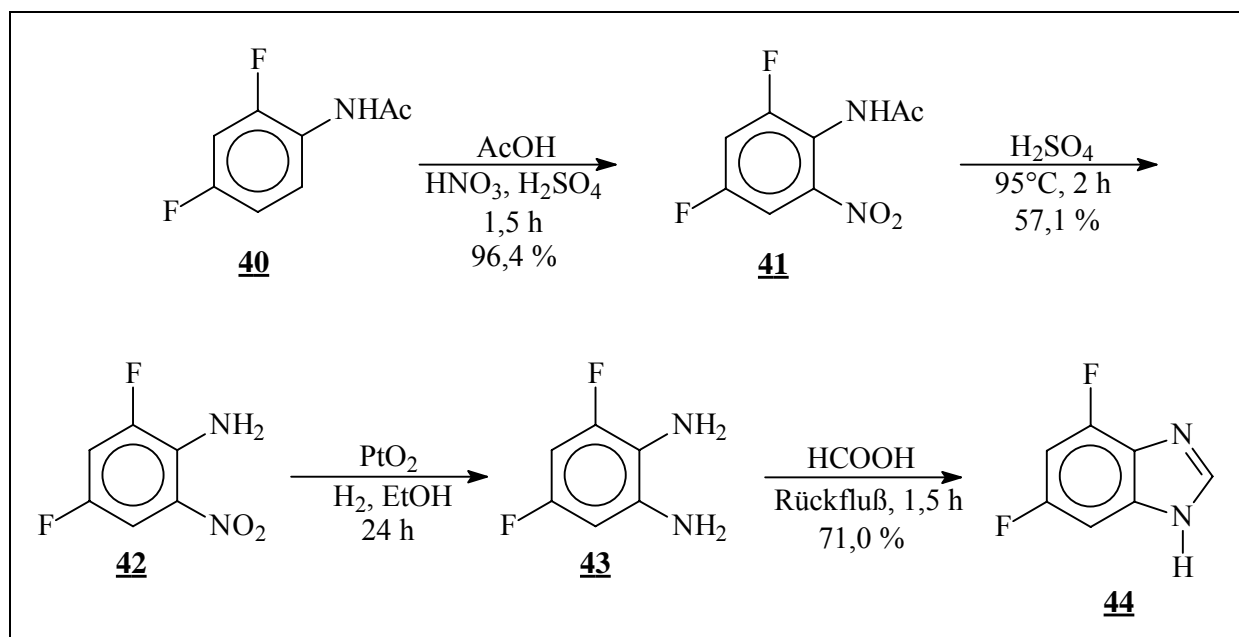


Abb. 6.7: Syntheschema für die Synthese von 4,6-Difluorbenzimidazol

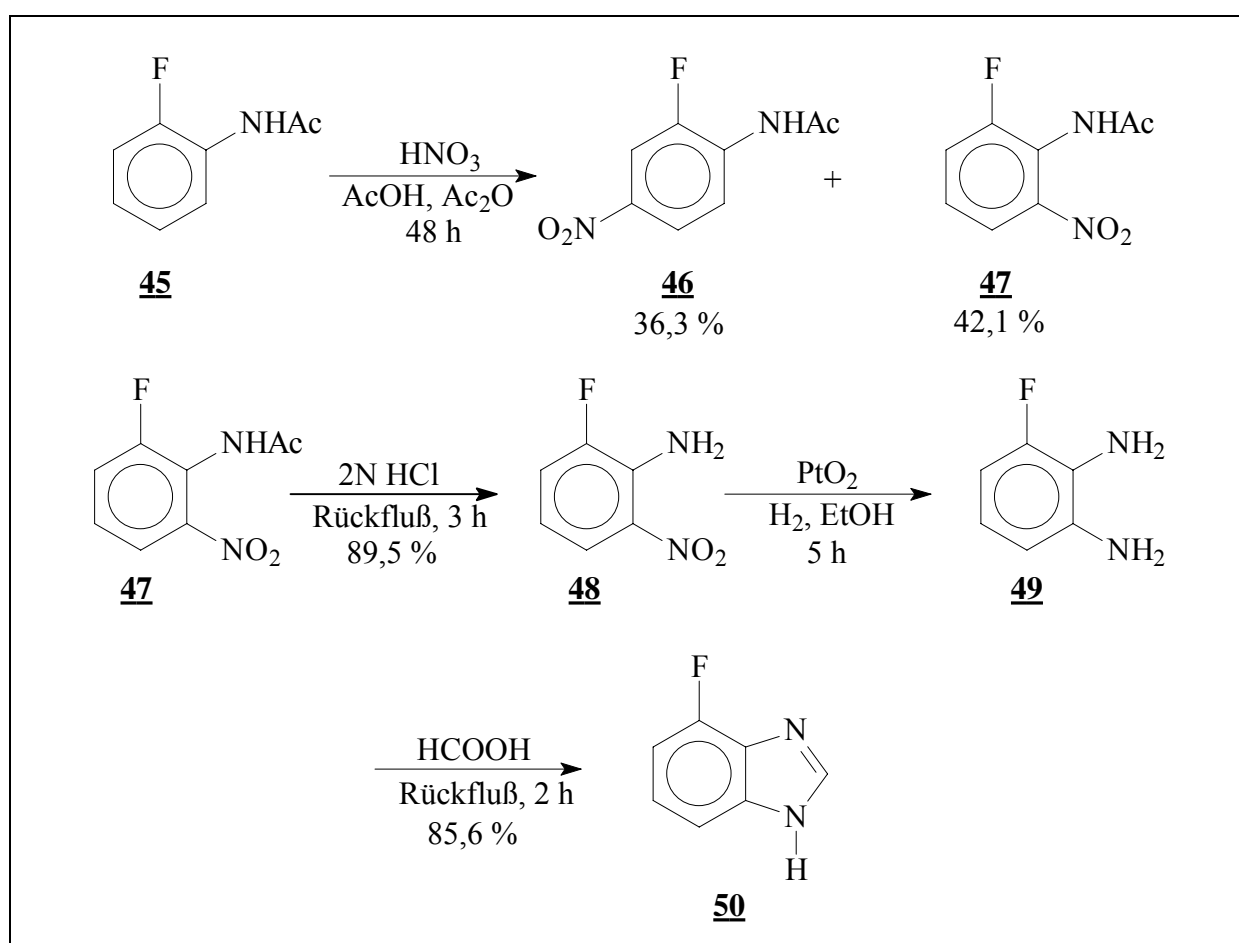


Abb. 6.8: Syntheschema für die Synthese von 4-Fluorbenzimidazol

6.3 Benzimidazol- und Fluorbenzimidazol-Nukleoside

6.3.1 Glykosylierung

Die Glykosylierungen von Benzimidazol und beider Fluorbenzimidazole mit 1,2,3,5-Tetra-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose **54** wurden nach den Vorgaben der Silyl-Hilbert-Johnson-Reaktion durchgeführt (Vorbrüggen *et al.*, 1981; Vorbrüggen & Höfle, 1981a). Sie ist die gängige Reaktion für Glykosylierungen von Nucleobasen und Ribose-Derivaten. Der Mechanismus der Reaktion wird im folgenden am Beispiel der Glykosylierung von 4,6-Difluorbenzimidazol **44** mit 1,2,3,5-Tetra-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose **54** beschrieben. 4,6-Difluorbenzimidazol **44** ist in Lösung keine einheitliche Verbindung. Das N1 Proton kann zum N3 Stickstoff wandern, wodurch Verbindung **51** entsteht. Allerdings liegt das Gleichgewicht dieser Isomerisierung weit auf der Seite des N1 Isomeren **44** (Abbildung 6.9). Das Gleichgewicht wird von der Anzahl der am Aromaten befindlichen Fluoratome und deren Stellung am Ring maßgeblich beeinflusst. Die Silyl-Hilbert-Johnson-Reaktion beginnt mit der Silylierung der N-H Funktion mit *N,O*-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid. Aufgrund der Gleichgewichtseinstellung zwischen den beiden Isomeren **44** und **51** kommt es zur Silylierung beider Isomere wodurch die silylierten Nucleobasen **52** und **53** entstehen.

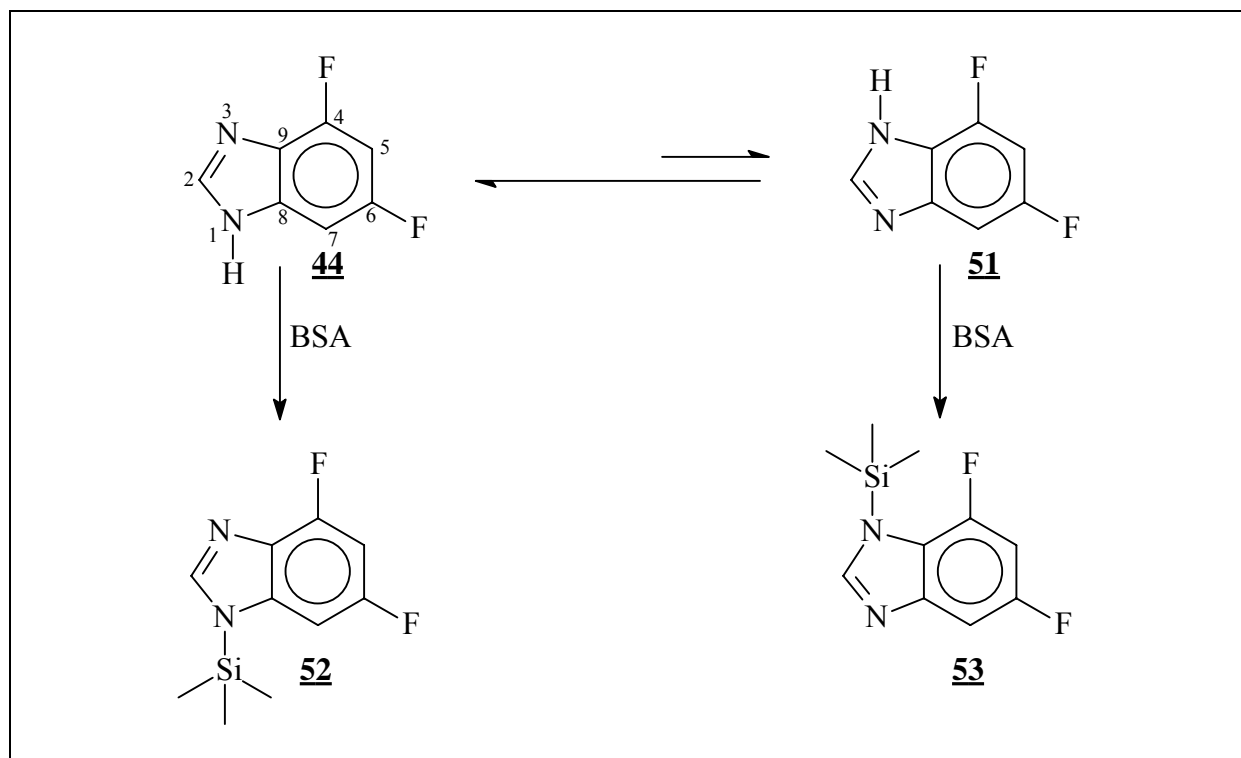


Abb. 6.9: Silylierungsmöglichkeiten von 4,6-Difluorbenzimidazol, BSA = *N,O*-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid

In der Zwischenzeit wird 1,2,3,5-Tetra-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose **54** mit der Lewissäure Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (TMSOTf) umgesetzt. Dabei bildet sich das Zucker-Kation **55** durch einen intramolekularen Angriff der 2-Acetylgruppe auf die C1-Position mit gleichzeitiger Abspaltung der C1-Acetylgruppe (Abbildung 6.10). Die C1-Acetylgruppe verläßt die Reaktion als Trimethylsilylacetester. Der aus dem intramolekularen Angriff der C2-Acetylgruppe resultierende Fünfring steht in α -Stellung am Zuckerring. Gibt man das Zucker-Kation zu der silylierten Base, so greift diese nukleophil das Zucker-Kation an C1 an. Bedingt durch die Konfiguration des Zucker-Kations kann dieser Angriff nur von der β -Seite des Zuckerringes erfolgen. Durch den nukleophilen Angriff wird der Fünfring, der durch die intramolekulare Reaktion der C2-Acetylgruppe gebildet wurde, wieder geöffnet und die Nukleobase kovalent an den Zucker gebunden.

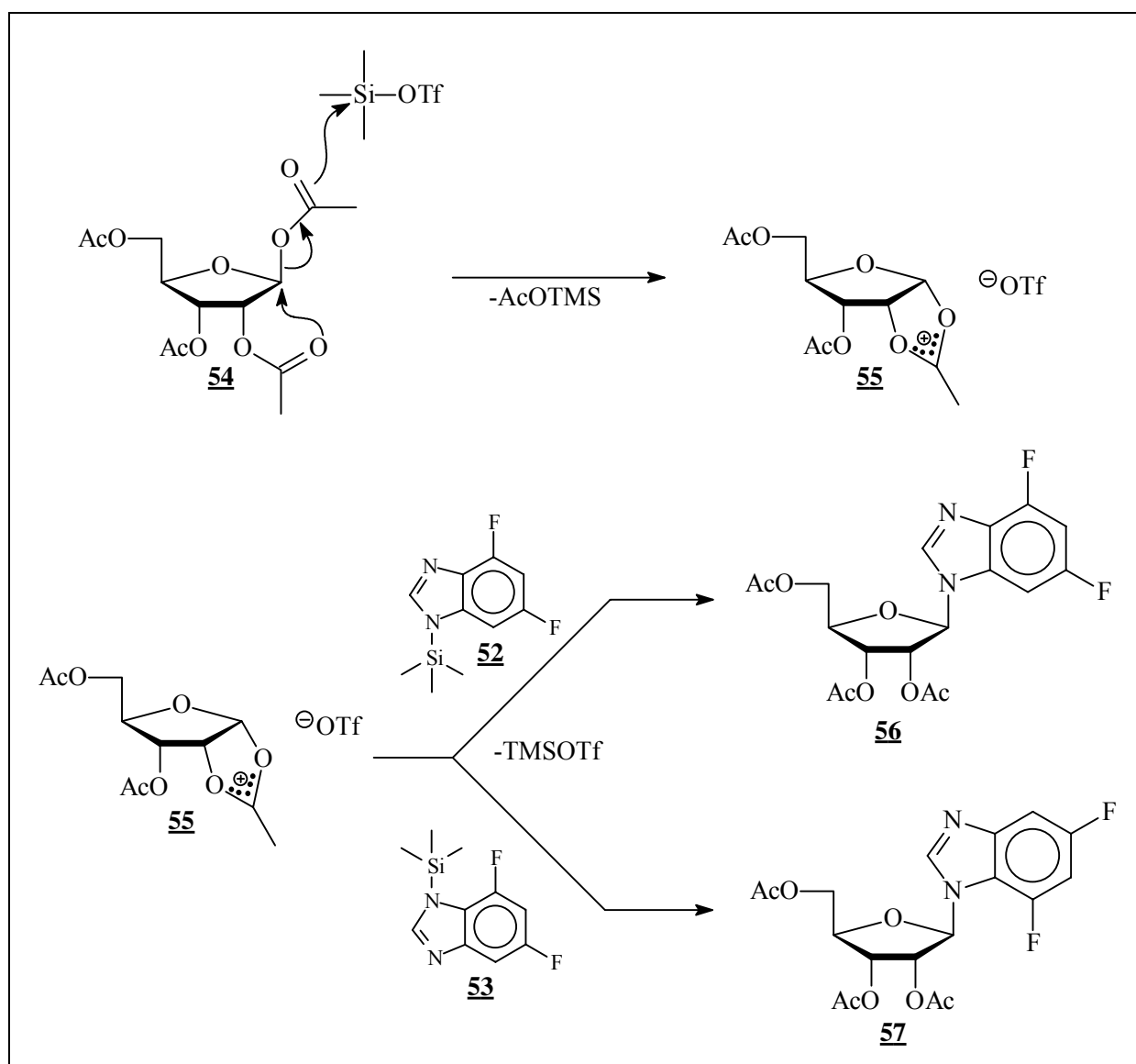


Abb. 6.10: Glykosylierungsreaktion

Ein großer Vorteil dieser Reaktionsführung ist, daß nur β -verknüpfte Nucleoside entstehen können. Durch den Einsatz zweier silylierter Isomere der Nucleobase **44** und **51** kommt es allerdings zur Bildung zweier Regioisomere. Die Reaktion von **44** mit dem Zucker-Kation **55** liefert das *N1*-Isomer 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **56** und die Reaktion von **51** mit **55** das *N3*-Isomer 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-3-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **57**. Das Verhältnis, mit dem beide Isomere entstehen, läßt auf das Gleichgewicht der Verteilung der beiden 4,6-Difluorbenzimidazol-Isomere **44** und **51** in Lösung zurückschließen. Für 4,6-Difluorbenzimidazol liegt das Verhältnis bei ca. 6:1 und für 4-Fluorbenzimidazol bei ca. 8,5:1 jeweils auf der Seite des *N1*-Isomeren.

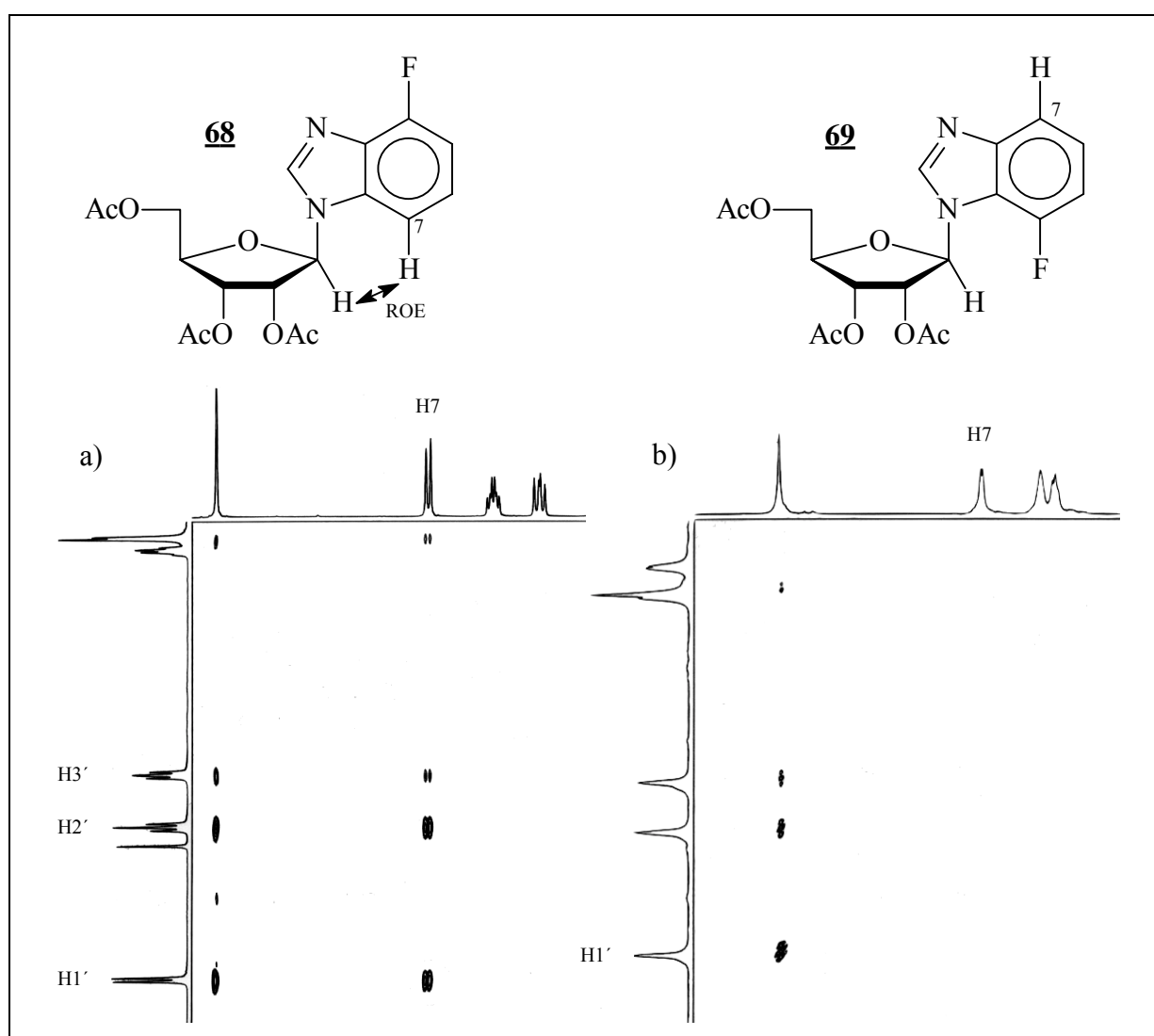


Abb. 6.11: a) Ausschnitt eines 400 MHz ROESY-NMR-Spektrums von 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4-fluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **68**; b) Ausschnitt eines 600 MHz ROESY-NMR-Spektrums von 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4-fluor-3-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **69**

Durch die Reaktionsführung bedingt können keine α -Nucleoside entstehen. Es mußten somit nur die beiden *N1*- und *N3*-Regioisomere getrennt und unterschieden werden. Dazu wurden ROESY-NMR Spektren aufgenommen. Zur Unterscheidung wurde die räumliche Nähe zwischen dem Proton an C1' und dem Proton an C7 im Falle des *N1*-Isomeren herangezogen. Im *N3*-Isomeren befindet sich das Proton an C7 auf der Zucker abgewandten Seite der Nucleobase und es sollten somit keine ROE-Signale zwischen diesen Protonen zu messen sein. Abbildung 6.11 zeigt Ausschnitte aus den ROESY-NMR Spektren von 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4-fluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **68** und 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4-fluor-3-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **69**. In Teil a) ist das ROE Signal zwischen H7 und H1' gut zu erkennen. Es läßt sich auch sehen, daß H7 ROE Signale zu H2' und schwach auch noch zu H3' zeigt. Diese Ergebnisse beweisen eine *N1* Verknüpfung der Nucleobase mit dem Zucker. Das *N3*-Isomere, von dessen ROESY-NMR Spektrum ein Ausschnitt in Abbildung 6.11 b) zu sehen ist, zeigt wie erwartet keine solchen ROE Signale.

Bei der Glykosylierung von Benzimidazol mit 1,2,3,5-Tetra-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose **54** treten keine *N1*- *N3*-Isomere auf, da diese beiden Positionen chemisch nicht zu unterscheiden sind. Wie sich allerdings zeigte, neigt Benzimidazol dazu, zweifach silyliert zu werden (Abbildung 6.12). Neben dem einfach silylierten Produkt **59** entsteht in großem Umfang auch ein doppelt silyliertes Benzimidazolium-Kation **60**. Setzt man diese Mischung in die Silyl-Hilbert-Johnson-Reaktion ein und gibt das Zucker-Kation zu dem silylierten Benzimidazol, so erhält man eine Mischung aus dem gewünschten Produkt 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose **62** und dem Baustein **61**, der aus einem Benzimidazol und zwei Zuckern zusammengesetzt ist. Die doppelte Silylierung ermöglicht dem Benzimidazol eine zweifache Reaktion mit dem Zucker-Kation unter Ausbildung eines Salzes. Das Gegenion dieses Salzes konnte mit Hilfe der Massenspektrometrie als Trifluormethansulfonat-Ion identifiziert werden.

Bei Durchführung dieser Reaktion unter den Standardbedingungen mit einem 1:1 Verhältnis von Zucker-Kation und silylierter Base konnten nur 17,7 % des gewünschten Produktes **62** aber 32,5 % des doppelt glykosylierten Bausteines **61** erhalten werden. Durch verlangsamte Zugabe (über 60 Minuten) des Zucker-Kations zu der silylierten Nucleobase konnte die Ausbeute an **62** auf 36 % gesteigert werden. Eine weitere Steigerung der Ausbeute gelang schließlich durch die Verwendung eines doppelten Überschusses an silylierter Base. Die Ausbeute an 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose **62** stieg bei dieser Reaktionsführung auf 55,7 %.

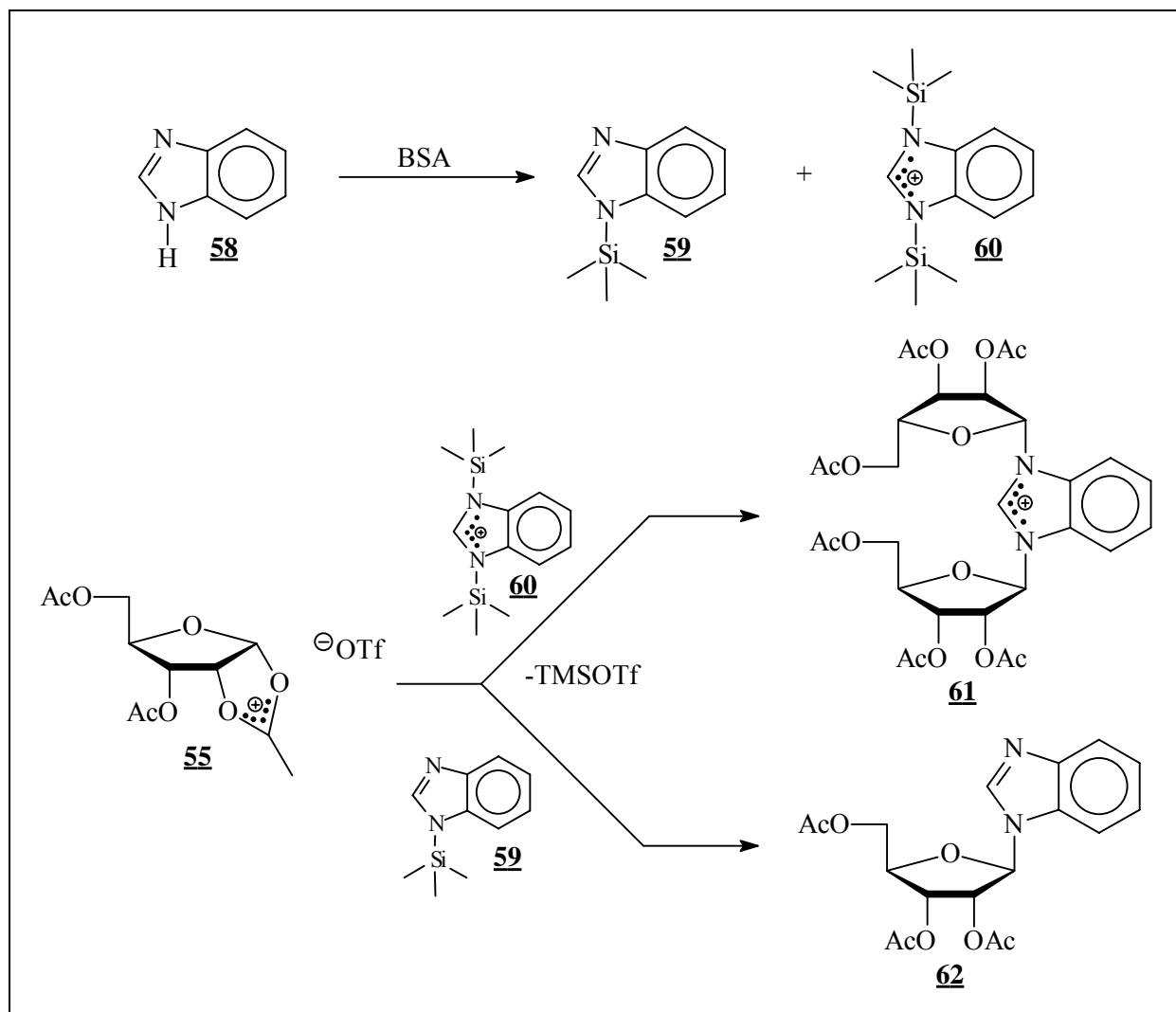


Abb. 6.12: Glykosylierungsreaktion von 1,2,3,5-Tetra-*O*-acetyl-β-D-ribofuranose mit Benzimidazol

Besondere Aufmerksamkeit muß auch den ^{13}C -NMR-Spektren gewidmet werden. Da Fluor NMR-aktiv ist, spalten die Kohlenstoffsignale auf. Es werden Kopplungen um 250 Hz für die Kohlenstoffe, die direkt ein Fluoratom tragen, beobachtet.

6.3.2 Entschützung

Um das freie, ungeschützte Nukleosid zu erhalten, müssen die Acetylgruppen entfernt werden. Als Entschützungsmethode hat sich die relativ milde Abspaltung der Acetylgruppen mit ammoniakalischem Methanol bewährt (Neilson *et al.*, 1971). Um das ammoniakalische Methanol darzustellen, wird Ammoniakgas durch auf minus 20°C gekühltes Methanol geleitet, um es zu sättigen. Dieses Methanol wird dann auf die zu entschützende Verbindung

gegeben und 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dabei ist darauf zu achten, daß nicht zuviel Ammoniak aus dem Methanol ausgast. Zuviel hergestelltes ammoniakalisches Methanol läßt sich problemlos über Monate bei -20°C in einem verschlossenen Gefäß aufbewahren. Ein großer Vorteil dieser Entschützungsverfahren ist die gute Ausbeute bedingt durch die Tatsache, daß es zu keiner Nebenreaktion kommt (Abbildung 6.13). Einziges Nebenprodukt ist Acetamid, welches aus Ammoniak und den abgespalteten Acetylgruppen entsteht.

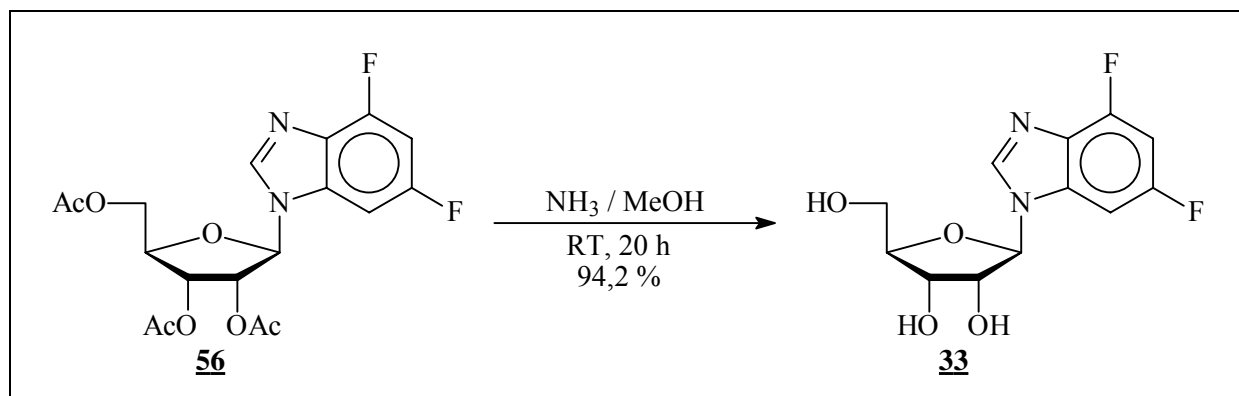


Abb. 6.13: Deacetylierung

Das Acetamid läßt sich allerdings durch Säulenchromatographie nicht vollständig abtrennen. Für analytische Zwecke wurde ein Teil der Ausbeute an der 5'-OH Funktion mit Dimethoxytriphenylmethylchlorid (DMTrCl) geschützt und auf dieser Stufe das Acetamid abgetrennt. Eine anschließende Abspaltung der Dimethoxytriphenylmethylgruppe mit 2%iger Benzolsulfonsäure in Methylenechlorid / Methanol und Aufreinigung führte zu den reinen vollständig entschützten Nucleosiden. Eine Aufreinigung dieser Art wurde für die Hauptmenge an Produkt der Deacetylierungsreaktionen nicht durchgeführt, da daß Acetamid bei der weiteren Umsetzung zum Amidit nicht stört und auf der nächsten Stufe, dem Dimethoxytriphenylmethyl- geschützten Nucleosid, problemlos abgetrennt werden kann.

Die Ausbeuten der Entschützungen wurden aus den NMR-Spektren berechnet, indem der nach der säulenchromatographischen Aufreinigung verbliebene Anteil von Acetamid von der Ausbeute der gewünschten Produkten abgezogen wurde. Aufgrund der milden Reaktionsbedingungen, der einfachen Durchführung der Reaktion, dem nicht Stören des nicht abtrennbaren Anteiles von Acetamid bei der darauf folgenden Reaktion und den guten Ausbeuten von 90,4 % (für 1'-Desoxy-1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose **37**) bis 96,4 % (für 1'-Desoxy-1'-(4-fluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **32**) wurden keine anderen Entschützungsbedingungen untersucht.

6.3.3 Dimethoxytritylierung

Für den Schutz der 5'-OH Funktion in Phosphoramiditen hat sich die Dimethoxytriphenylmethyl-Schutzgruppe (DMTr) durchgesetzt (Smith *et al.*, 1962; Schaller *et al.*, 1963). Triphenylmethyl- (Tr) und Monomethoxytriphenylmethyl- (MMTr) Schutzgruppen werden dagegen für Phosphoramidite kaum noch verwendet. Ein Vorteil der DMTr-Schutzgruppe ist, daß sie mit Trichloressigsäure (TCA) leicht abgespalten werden kann und daß das DMTr-Kation nach der Abspaltung am DNA- / RNA-Synthesizer im sichtbaren Bereich von 498 nm absorbiert, wodurch es möglich wird, die Ausbeute nach jedem Kupplungsschritt direkt spektroskopisch zu bestimmen (Fisher & Caruthers, 1983). Zur Durchführung der Reaktion wird das zu schützende Nucleosid in Pyridin und Triethylamin gelöst. Bei der Reaktion dient Triethylamin als Hilfsbase. Die Dimethoxytriphenylmethyl-Schutzgruppe zeigt eine hohe Selektivität zur primären 5'-OH Funktion. Es ist deshalb nicht nötig die beiden anderen OH-Funktionen zu schützen. Bei einem Einsatz von 1,2 Äquivalenten DMTrCl wird im allgemeinen kein Produkt mit 2'- oder 3'- DMTr-Schätzung beobachtet.

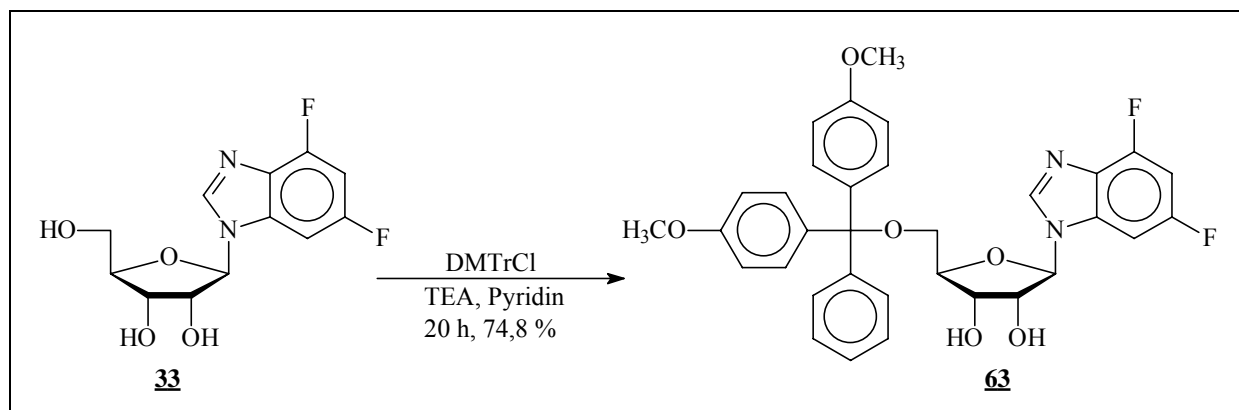


Abb. 6.14: Dimethoxytritylierung

Die Reaktivität des Benzimidazol- und der Fluorbenzimidazolbausteine verhält sich bei dieser Reaktion höchst unterschiedlich. Während 1'-Desoxy-1'-(4-fluor-1-N-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose **37** und 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose **32** in 4 bzw. 6,5 Stunden Reaktionszeit 73,5 bzw. 89,1 % Ausbeute liefern, dauert die Reaktion von 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose **33** mit Dimethoxytriphenylmethylchlorid 20 Stunden mit einer Ausbeute von 74,8 %. Ein Grund für die längere Reaktionszeit könnte das zweite Fluoratom an C6 sein. Bei einer Rotation der Base um die glykosidische Bindung kann es zu einer Wechselwirkung mit der 5'-OH Funktion und daraus folgend zu einer Erniedrigung der Reaktivität der Hydroxylfunktion kommen.

6.3.4 Schützung der 2'-OH Funktion

Für die automatisierte Festphasensynthese von RNA wird eine 2'-OH Schutzgruppe benötigt, die während des Synthesesyklus stabil ist, aber bei der Aufarbeitung der RNA leicht und schonend entfernt werden kann. Eine Reihe von Schutzgruppen sind auf ihre Eignung in Bezug auf die RNA Festphasensynthese untersucht worden (Abbildung 6.15). Eine geeignete Schutzgruppe ist z.B. die 1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-1-yl (Fpmp) Schutzgruppe (Beijer *et al.*, 1990). Die heutzutage gebräuchlichste 2'-Schutzgruppe ist *tert.*-Butyldimethylsilyl (TBDMS) (Ogilvie *et al.*, 1974; Ogilvie *et al.*, 1978). Die Problematik dieses Moleküls zeigt sich in der Bildung von Regioisomeren bei der Einführung (Hakimelaki *et al.*, 1981; Hakimelaki *et al.*, 1982) und durch ihre beobachtete Wanderungstendenz (Jones & Reese, 1979). Verwendet man Silbernitrat bei der Einführung, so kann das Verhältnis des Isomerengemisches zugunsten des 2'-geschützten Isomeren verschoben werden (Hakimelaki *et al.*, 1981; Hakimelaki *et al.*, 1982). Die Abspaltung der Schutzgruppe nach der RNA-Synthese kann mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) in THF (Stawinski *et al.*, 1988) oder mit Triethylamin-Trihydrofluorid (Gasparutto *et al.*, 1992; Westman & Strömberg, 1994) durchgeführt werden.

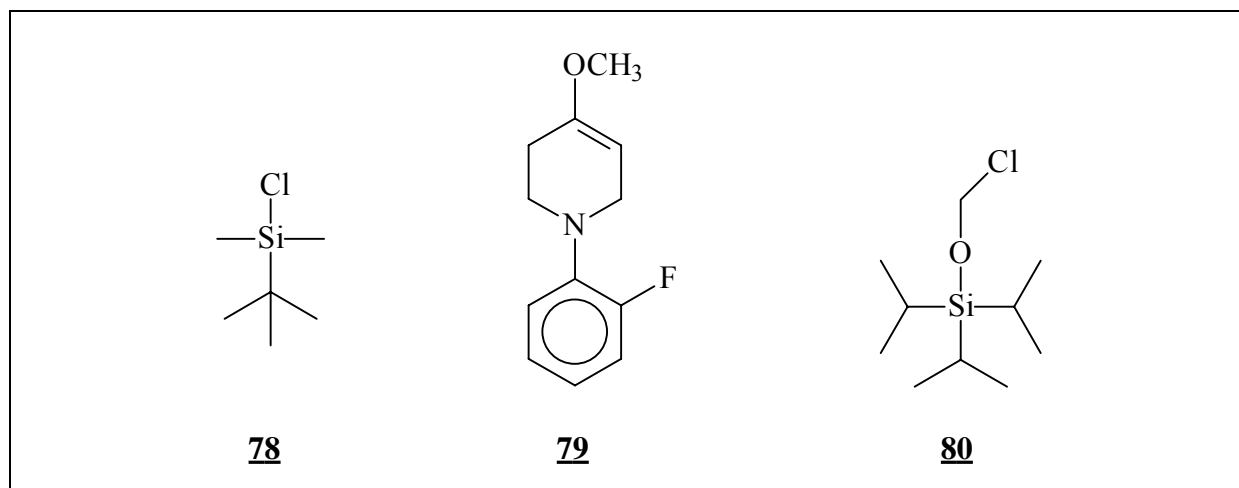


Abb. 6.15: RNA Schutzgruppen-Reagenzien: TBDMSCl **78**, Fpmp **79** und TOMCl **80**

Eine neue, sehr vielversprechende Schutzgruppe ist die Triisopropylsilyloxymethyl (TOM) Schutzgruppe (Pitsch *et al.*, 1999). Sie zeigt nach der Einführung keine Wanderungstendenz und führt zu deutlich verbesserten Kupplungsausbeuten während der Oligonukleotidsynthese. Weitere Einzelheiten über die TOM-Schutzgruppe sind in Kapitel 6.8 aufgeführt.

Die Einführung der TBDMS-Schutzgruppe erfolgt in einem 1:1 Gemisch aus Pyridin und Tetrahydrofuran (Abbildung 6.16). Um die Selektivität zugunsten der 2'-Schützung zu

erhöhen wird Silbernitrat der Reaktionslösung zugesetzt. Die Reaktion selbst verläuft mit einer Reaktionszeit von 20 Stunden.

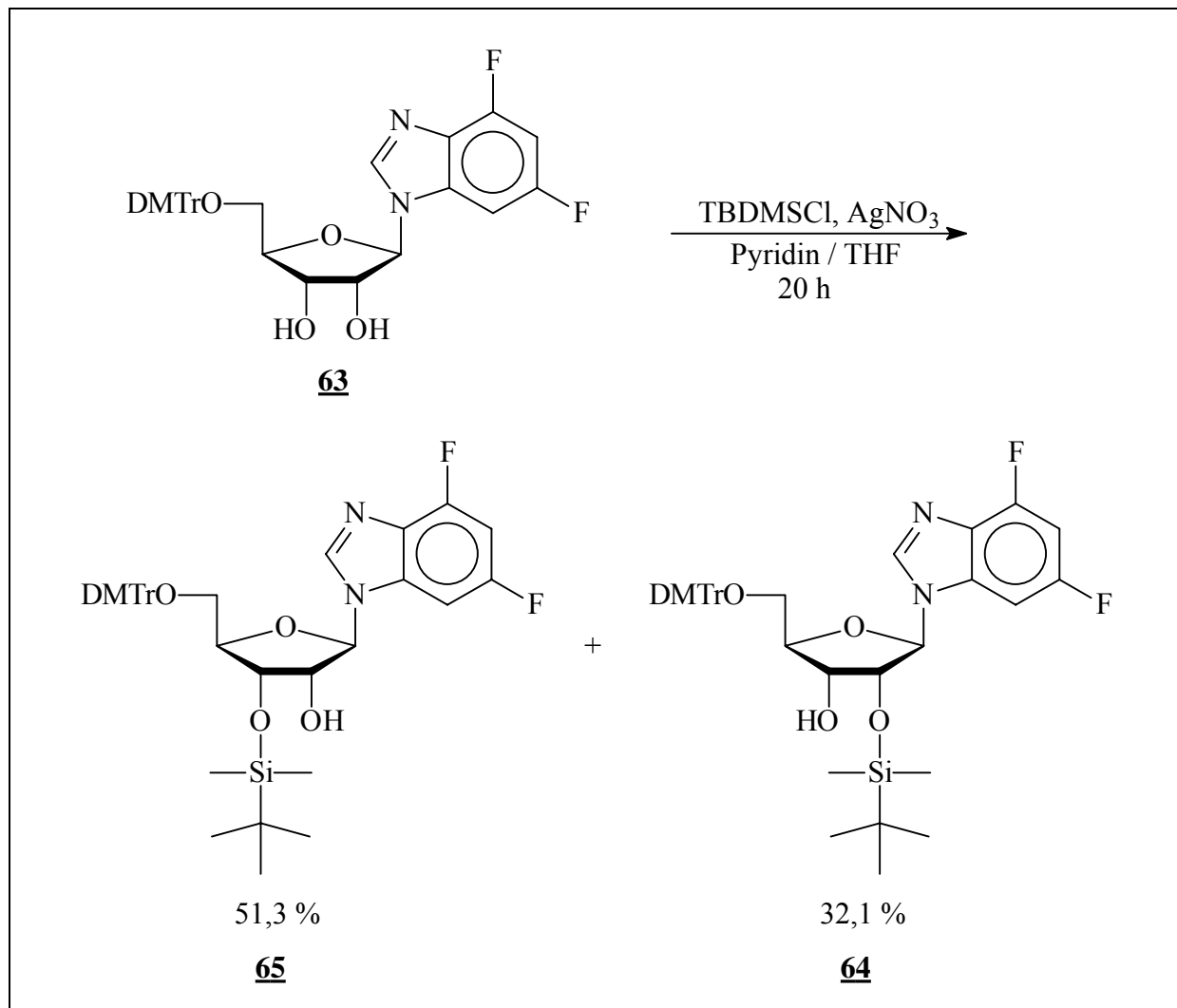


Abb. 6.16: Einführung der TBDMS-Gruppe

Als problematisch hat sich bei allen fluormodifizierten Nucleinsäuren die Wanderungstendenz der TBDMS-Gruppe in Richtung 3'-OH Funktion erwiesen (Abbildung 6.17). Die Wanderungstendenz ist stark von der Nucleobase abhängig und wirkt sich direkt auf die Ausbeute an 2'-geschütztem Produkt der durchgeführten Reaktion aus. Um die Wanderungstendenz so gering wie möglich zu halten, wurden polare Lösungsmittel weitgehend gemieden. Da Methanol die Wanderung stark unterstützt, sollte auf Methanol auf jeden Fall verzichtet werden. Als schwierig stellte sich bei den beiden Fluorbenzimidazolen die Trennung der 2'- bzw. 3'-geschützten Produkte heraus. Sie ließen sich nur über präparative HPLC trennen. Säulenchromatographische Trennungsversuche scheiterten. Die Unterscheidung der beiden Isomere wurde mit Hilfe von H,H-COSY-NMR-Untersuchungen durchgeführt.

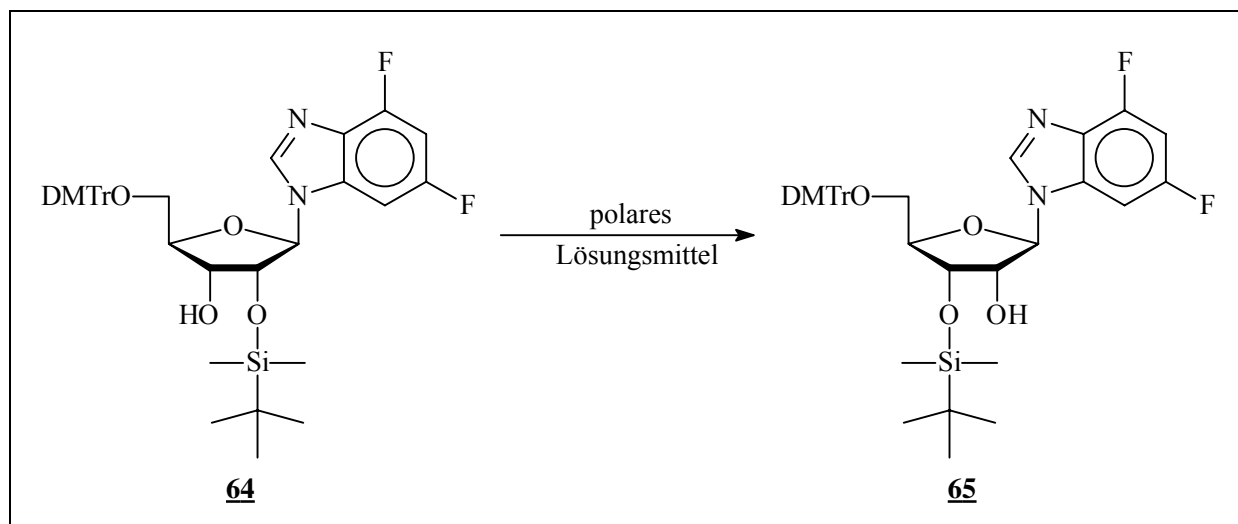


Abb. 6.17: Wanderungstendenz der TBDMS Gruppe in polaren Lösungsmitteln

Aufgrund der Wanderungstendenz konnte immer mehr an 3'-TBDMS geschützter als an 2'-TBDMS geschützter Verbindung isoliert werden. Während das Verhältnis 2'/3'-TBDMS geschützter Produkte bei 1'-Desoxy-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose **74** und bei 1'-Desoxy-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-1'-(4-fluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **70** noch bei 1:1,3 bzw. 1:1,2 liegt, so ist das Verhältnis bei 1'-Desoxy-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **63** mit 1:1,6 besonders weit zu dem nicht gewünschten 3'-TBDMS geschützten Isomer verschoben.

6.3.5 Phosphitylierung

Die Phosphitylierung von Ribonukleosiden wird nach einer im Gegensatz zu DNA-Bausteinen modifizierten Anweisung durchgeführt. Um eine Wanderung der 2'-TBDMS Gruppe bei der Reaktion zu verhindern, wird anstelle von Diisopropylethylamin (DIPEA) *sym.*-Collidin als Base verwendet. Außerdem wird *N*-Methylimidazol als Katalysator zugesetzt.

Bei der Reaktion ist auf strikte Trockenheit aller Reaktanden sowie des Lösungsmittels und auf Ausschluß von Sauerstoff zu achten. Als Lösungsmittel für die Phosphitylierungen wird Acetonitril verwendet. Die Edukte werden in Acetonitril gelöst und *sym.*-Collidin und *N*-Methylimidazol zugesetzt. Anschließend wird die Reaktionslösung auf 0°C abgekühlt, 2-Cyanethyl-diisopropylchlorphosphoramidit **66** zugesetzt und 15 Minuten bei 0°C gerührt.

Nach erwärmen auf Raumtemperatur wird je nach Baustein zwischen 25 und 45 Minuten gerührt (Abbildung 6.18).

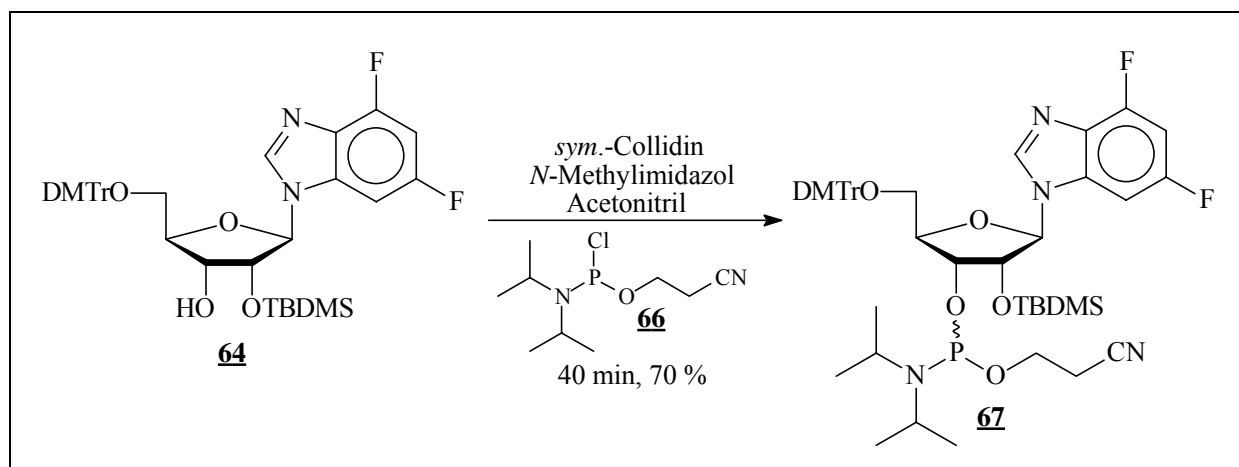


Abb. 6.18: Phosphitylierung

Die Aufreinigung von Phosphoramiditen sollte möglichst sofort nach Aufarbeitung und mit einer kurzen Verweilzeit auf einer Kieselgelsäule bzw. auf einer präparativen Dünnschichtchromatographie-Scheibe durchgeführt werden, da sich sonst verstärkt Zersetzungsprodukte bilden.

Die Phosphoramidite 3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **67**, 3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-(4-fluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **73** und 3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose **77** konnten mit 70,0 %, 52,3 % bzw. 53,8 % erhalten werden. Alle Phosphoramidite wurden als Diastereomerenpaare erhalten.

6.3.6 Syntheseübersichten

Die Abbildungen 6.19, 6.20 und 6.21 zeigen die Syntheseübersichten der Fluorbenzimidazolphosphoramidite **67** und **73** bzw. des Benzimidazolphosphoramidites **77** beginnend mit den Glykosylierungsreaktionen.

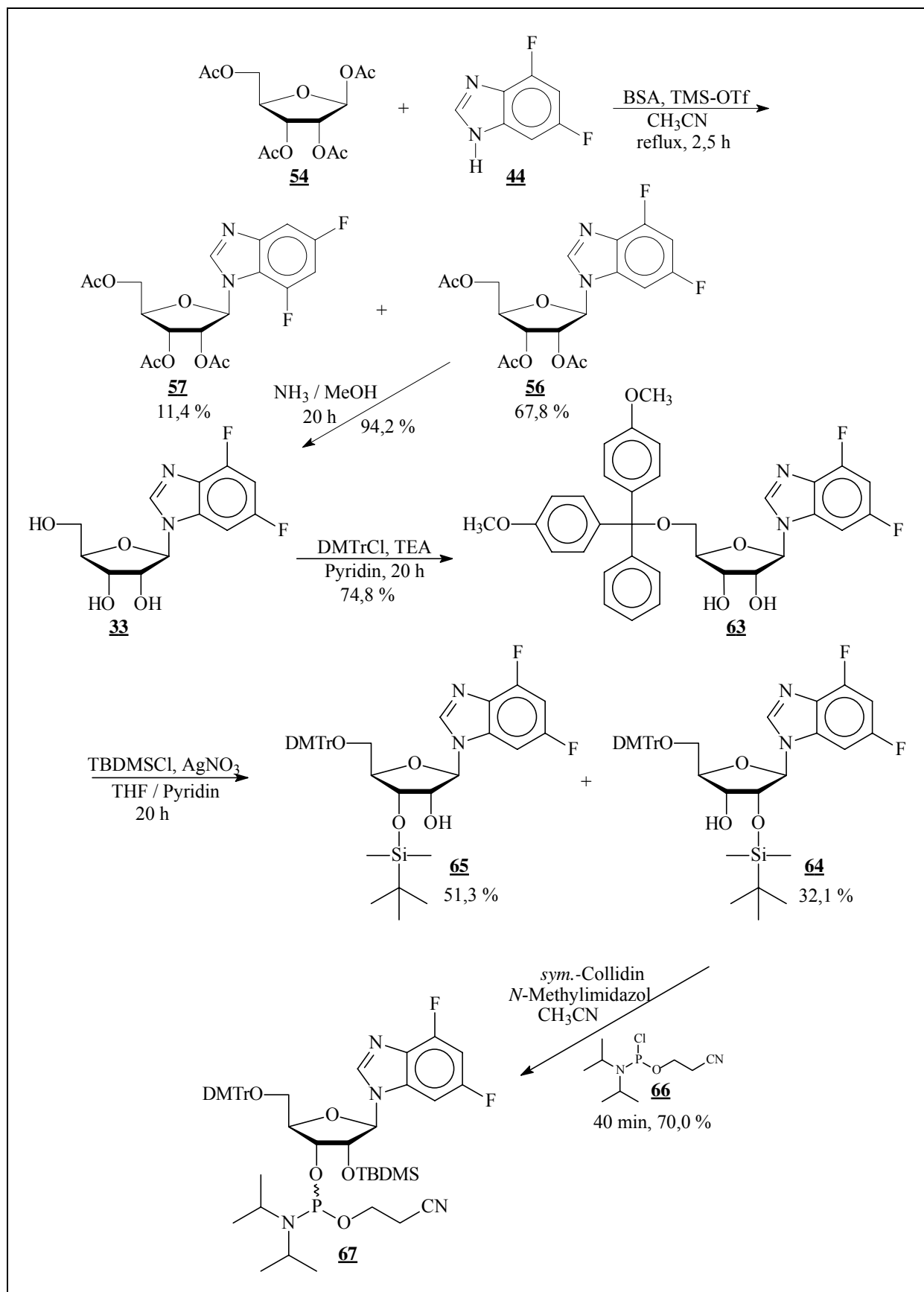


Abb. 6.19: Syntheseübersicht für 3'-*O*-(2-Cyanoethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose **67**

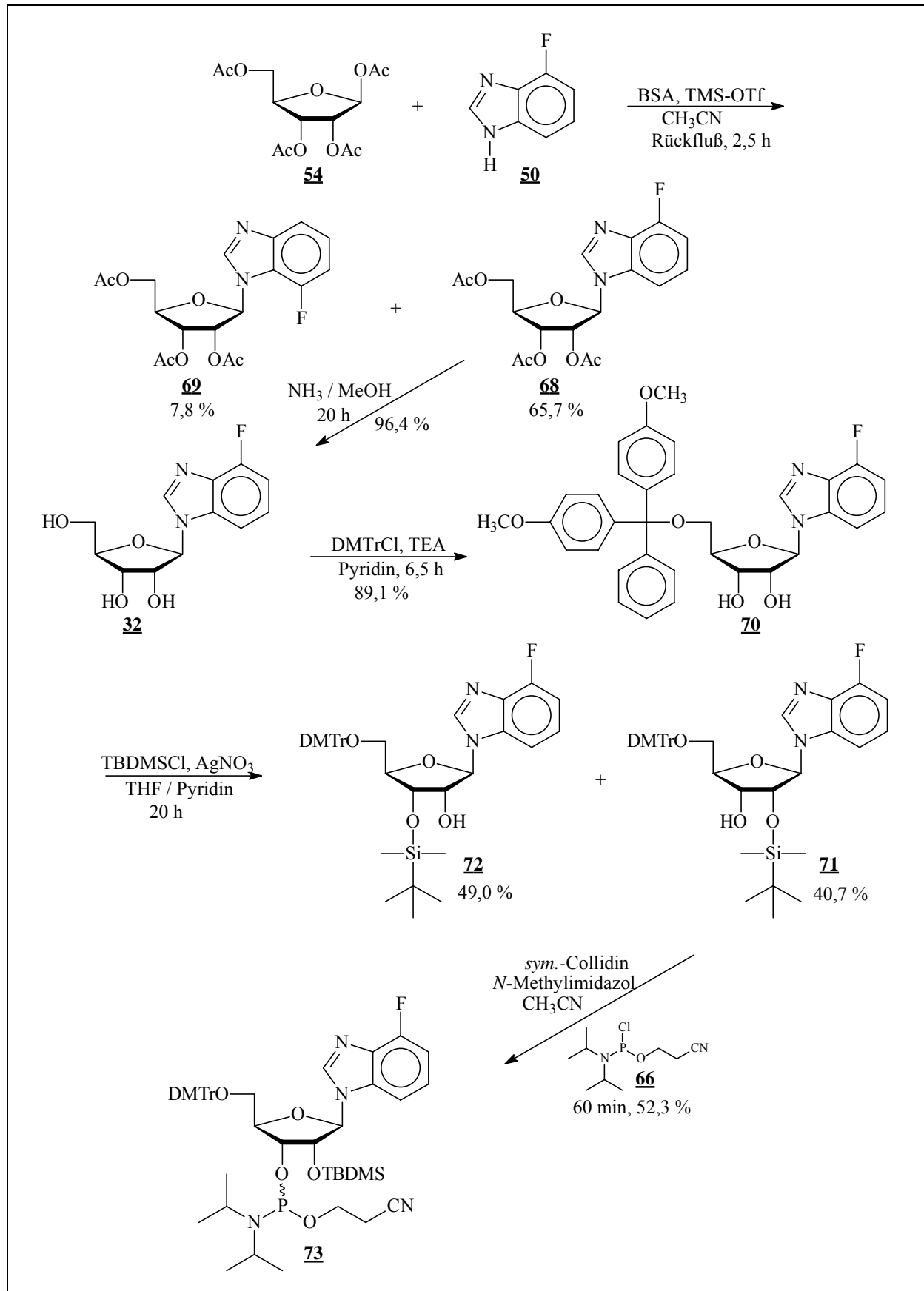


Abb. 6.20: Syntheseübersicht für 3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-(4-fluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **73**

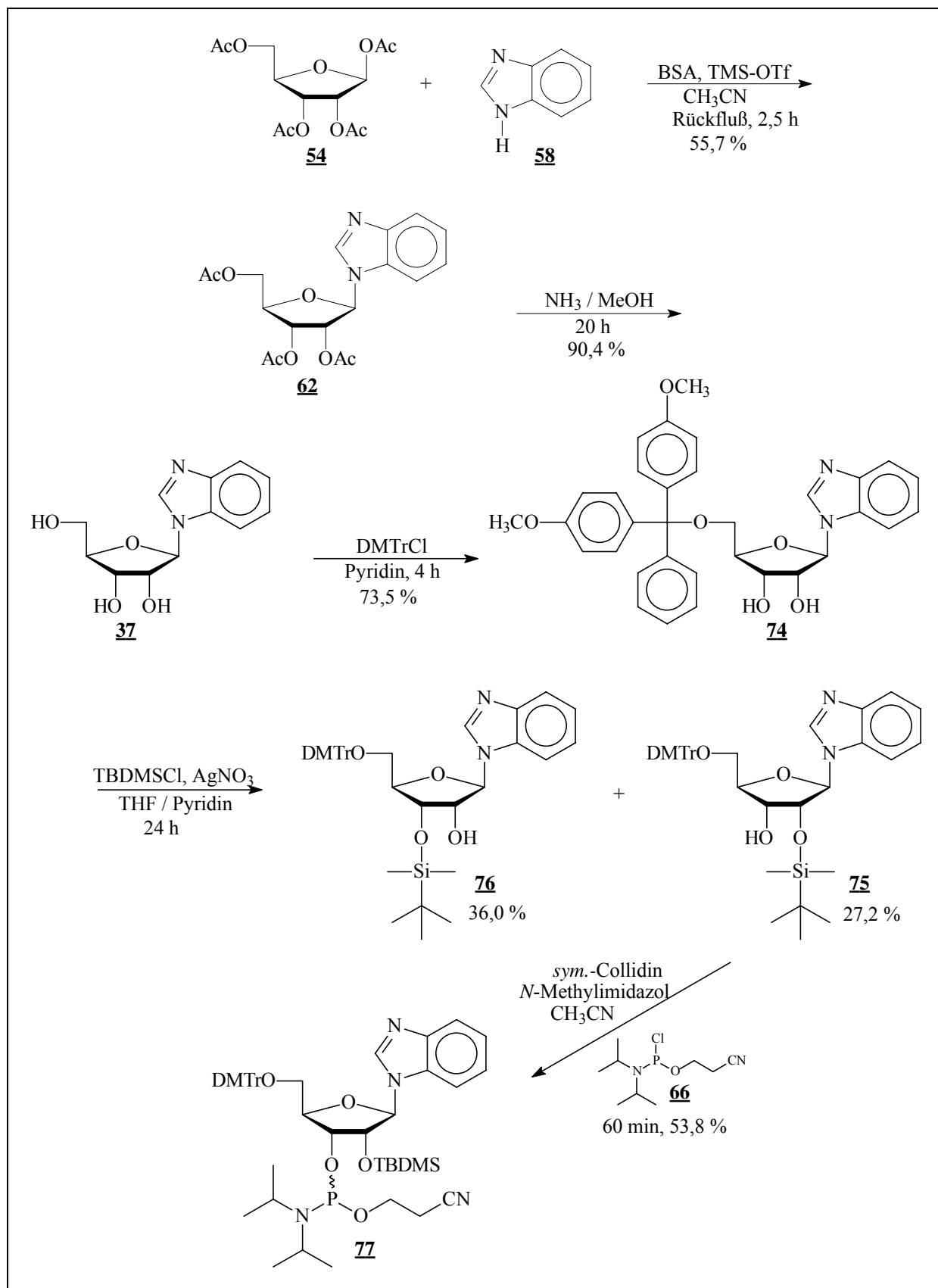


Abb. 6.21: Syntheseübersicht für 3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose **77**

6.4 γ -Lacton

Für die Synthese der C-Nukleoside wird ein entsprechend geschütztes Lacton benötigt. Die Schutzgruppen des Lactons müssen den Bedingungen der C-Glykosylierung und der Dehydroxylierung standhalten. Die dabei verwendeten Reaktionsbedingungen sind sowohl stark basisch (*n*-Butyllithium; C-Glykosylierung) als auch stark sauer (Bortrifluorid-Ethyletherat; Dehydroxylierung). Außerdem muß die Schutzgruppe nach diesen beiden Reaktionen wieder mit hohen Ausbeuten entfernt werden können. Aus diesen Gründen wurde die Benzyl-Schutzgruppe ausgewählt. Sie ist sowohl bei den Bedingungen der C-Glykosylierung als auch bei den Bedingung der Dehydroxylierung stabil und läßt sich hydrogenolytisch mit hohen Ausbeuten wieder entfernen. Für die Synthese des γ -Lactons wurde der in Abbildung 6.22 abgebildete Synthesepfad aufgestellt.

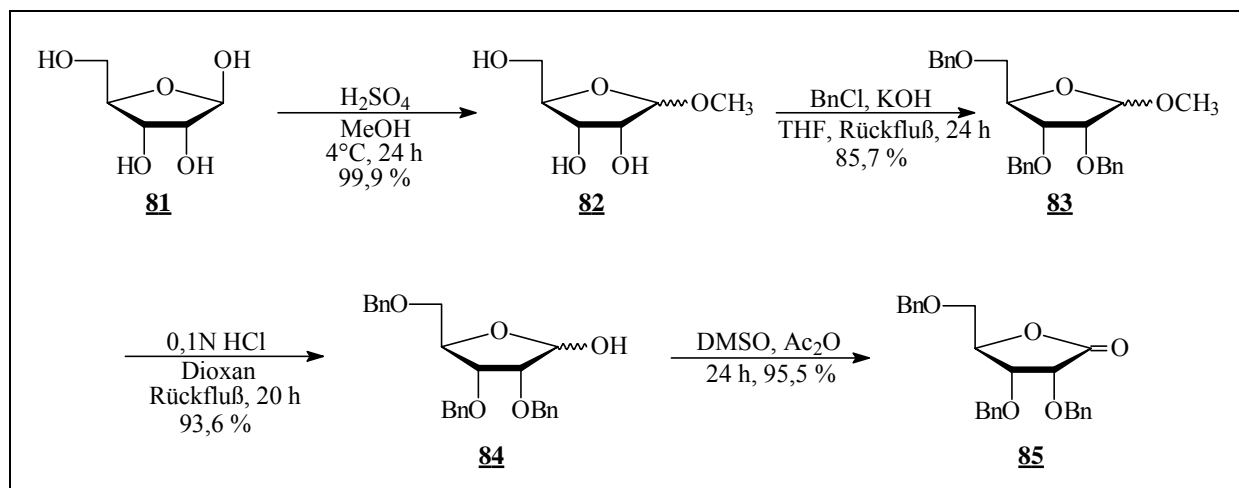


Abb. 6.22: Syntheseübersicht

Die Synthese des γ -Lactons beginnt mit der Methylierung von D-Ribose **81** an der anomeren Hydroxylfunktion. D-Ribose ist als Naturprodukt ein billiges Startmaterial für diese Synthese. Die Methylierung der Hydroxylfunktion am anomeren Zentrum der Ribose wird in Methanol unter Zusatz katalytischer Mengen Schwefelsäure bei 4°C durchgeführt (Heath *et al.*, 1983). Die erniedrigte Reaktionstemperatur ist entscheidend dafür, daß nur die reaktivste Hydroxylfunktion des Zuckers, die anomere Hydroxylfunktion, methyliert wird. Die zugesetzte Schwefelsäure katalysiert nicht nur die Methylierungsreaktion, sie ist auch für das Entstehen der Epimerenmischung von Methyl-D-ribofuranose verantwortlich. Durch die Säure kann während der Reaktion der Furanring der Ribose geöffnet und wieder geschlossen werden, wodurch neben dem Edukt auch das α -Isomer entstehen kann. Die Reaktion verläuft in 24 Stunden quantitativ zur Methyl-D-ribofuranose **82**. Das Verhältnis von β - zu α -Isomer

ist bei allen durchgeführten Methylierungen immer etwa bei 3:1 geblieben. Die beiden Epimere werden nach der Reaktion nicht getrennt, da beide im weiteren Verlauf der Synthese bei gleicher Reaktionsführung zu dem gewünschten Lacton **85** umgesetzt werden können.

Die Benzylierung der beiden Epimere **82** erfolgt mit Benzylchlorid und Kaliumhydroxid in Tetrahydrofuran (Barker & Fletcher, 1961). Das Kaliumhydroxid wird gepulvert in die Reaktion eingesetzt. Hierbei stellte sich als problematisch heraus, daß das Kaliumhydroxid durch Aufnahme von Spuren von Wasser im Lösungsmittel stark verklumpt und die Reaktionslösung deshalb nur noch schwer gerührt werden kann. Das Benzylchlorid wird in dieser Reaktion in großem Überschuß eingesetzt. Bei der Benzylierung der Ribose entsteht pro gebildetem Benzylether ein Wassermolekül, welches zu Nebenreaktionen mit Benzylchlorid führt. Das Wasser kann entweder vom Kaliumhydroxid aufgenommen werden oder es reagiert mit einem Benzylchlorid zum entsprechenden Benzylalkohol. Der entstandene Benzylalkohol kann unter Basenkatalyse mit einem weiteren Benzylchlorid zu Dibenzylether reagieren. Bei dieser Reaktion entstehen somit neben der benzylierten Ribose **83** auch Benzylalkohol und Dibenzylether. Benzylalkohol, Dibenzylether und überschüssiges Benzylchlorid lassen sich nach Ende der Reaktion destillativ abtrennen. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung des Destillationsrückstandes erhält man die beiden benzylierten Epimere **83** in einer Ausbeute von 85,7 %.

In der folgenden Reaktion wird die anomere Hydroxylfunktion wieder entschützt. Dazu wird 1-Methyl-2,3,5-tri-*O*-benzyl-ribofuranose **83** in Dioxan gelöst, mit 0,1N HCl versetzt und unter Rückfluß gekocht. Nach der von Barker und Fletcher (Barker & Fletcher, 1961) angegebenen Reaktionszeit von drei Stunden war erst etwa ein Drittel des Eduktes zum Produkt umgesetzt. Die Reaktionszeit wurde deshalb auf 20 Stunden Kochen unter Rückfluß ausgedehnt. Dies hatte zur Folge, daß sich das Edukt vollständig umsetzte und 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-ribofuranose **84** in 93,6 %iger Ausbeute erhalten werden konnte. Die Verlängerung der Reaktionszeit bewirkte somit eine Ausbeutesteigerung von fast 15 % gegenüber der literaturbekannten Ausbeute.

Der letzte Schritt der Synthese des γ -Lactons ist die Oxidation der beiden Epimere **84** (Timpe *et al.*, 1975) zum einheitlichen Produkt **85**. Die Oxidation erfolgt mit Dimethylsulfoxid (DMSO) und Essigsäureanhydrid. Bei diesen Reaktionsbedingungen handelt es sich um eine Variante der Pfitzner-Moffatt-Oxidation (Pfitzner & Moffatt, 1965), die von Albright und Goldman eingeführt wurde (Albright & Goldman, 1967). 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-ribofuranose **84** wird in Dimethylsulfoxid gelöst und mit Essigsäureanhydrid versetzt. Nach 24 Stunden rühren ist die Reaktion beendet. Die Aufarbeitung mußte von der von Timpe und Mitarbeitern

(Timpe *et al.*, 1975) beschriebenen Methode abweichen, da es nicht gelang, 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-ribo- γ -lacton **85** durch eingießen der Reaktionslösung in Eiswasser auszukristallisieren. Alternativ wurde mit Methylenchlorid ausgeschüttelt, getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Verbliebenes DMSO wurde größtenteils im Ölpumpenvakuum abdestilliert und das Rohprodukt schließlich säulenchromatographisch aufgereinigt. Da bei der Reaktion Dimethylsulfid entsteht, ist auf sauberes Arbeiten zu achten, um Geruchsbelästigungen weitgehend zu vermeiden. Trotz dieses Nachteils wurde aufgrund der guten Ausbeute von über 95 % keine andere Oxidationsmethode verwendet. Oxidationsversuche mit Chromtrioxid, Pyridin und Essigsäureanhydrid (Hansske *et al.*, 1984) erbrachten 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-ribo- γ -lacton **85** nur in einer Ausbeute von 65 %.

6.5 Benzol- und Fluorbenzol-Nukleoside

Dieser Abschnitt beschreibt die chemische Synthese von sechs verschiedenen Benzol- und Fluorbenzol-Nukleosiden. Fünf von ihnen wurden als Amidite dargestellt und in RNA eingebaut. Einzig 1'-Desoxy-1'-(2,4,6-trifluorphenyl)- β -D-ribofuranose **86** wurde nur zur Kristallisation dargestellt und nicht bis zum Amidit synthetisiert.

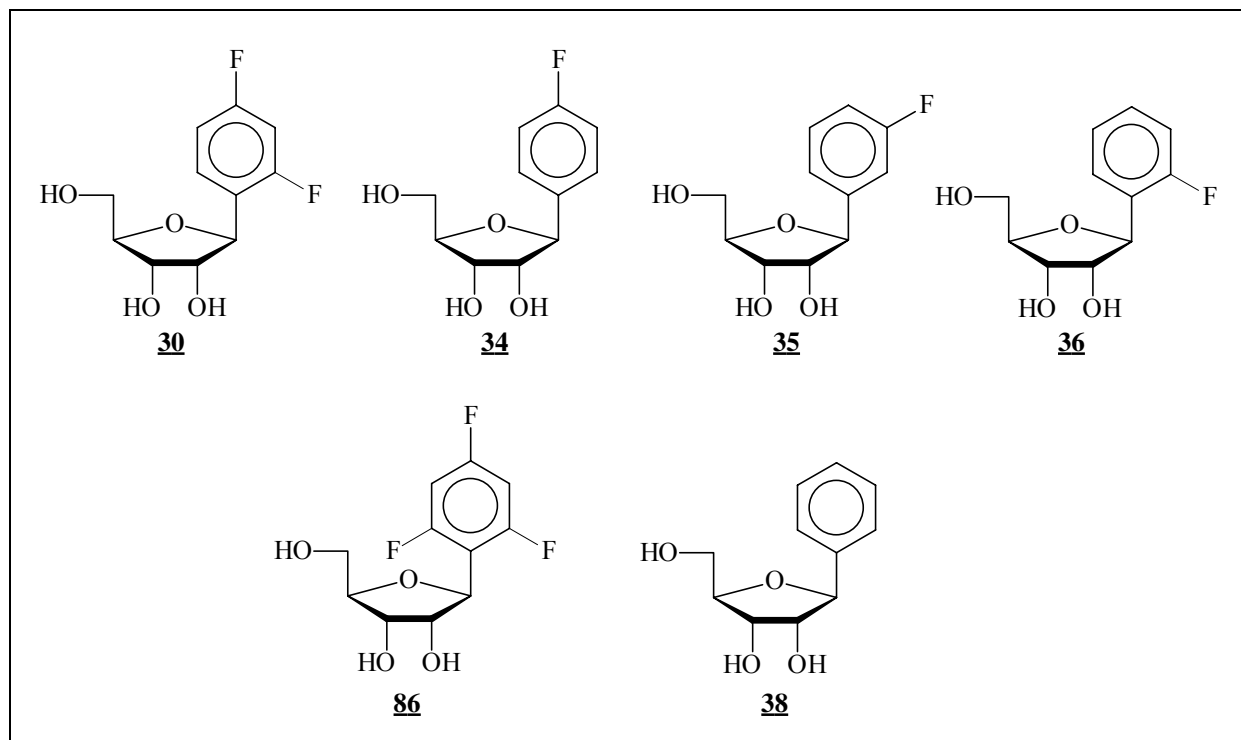


Abb. 6.23: Benzol- und Fluorbenzol-Nukleoside

6.5.1 C-Glykosylierung und Dehydroxylierung

Die Synthese der C-Nucleoside verläuft für alle Bausteine nach dem gleichen Reaktionsmechanismus ab (Krohn *et al.*, 1992). Als Ausgangsprodukte werden das entsprechend bromierte Fluorbenzol bzw. Benzol und 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-ribo- γ -lacton **85** eingesetzt. Die Reaktion wird im folgenden am Beispiel von 2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **89** beschrieben. Zur Durchführung der Reaktion wird 4-Fluorbrombenzol in Tetrahydrofuran gelöst und auf -78°C mit einem Aceton / Stickstoff Kältebad abgekühlt. Anschließend wird *n*-Butyllithium in *n*-Hexan langsam zugegeben. Durch die Zugabe von *n*-Butyllithium kommt es zu einem Austausch des Bromatoms gegen ein Lithiumatom am Fluoraromaten. Anschließend wird das in Tetrahydrofuran gelöste Lacton zugegeben. Der Brom - Lithium Austausch ermöglicht nun dem Fluoraromaten das Lacton **85** nukleophil anzugreifen. Der nukleophile Angriff erfolgt auf die *si*-Seite des Lactons, wodurch der Fluoraromat in β -Stellung zum Zucker verknüpft wird (Abbildung 6.24). Das entstandene Lactol **88** wird aufgearbeitet aber wegen seiner geringen Stabilität nicht aufgereinigt, sondern unverzüglich in die anschließende Dehydroxylierungsreaktion eingesetzt.

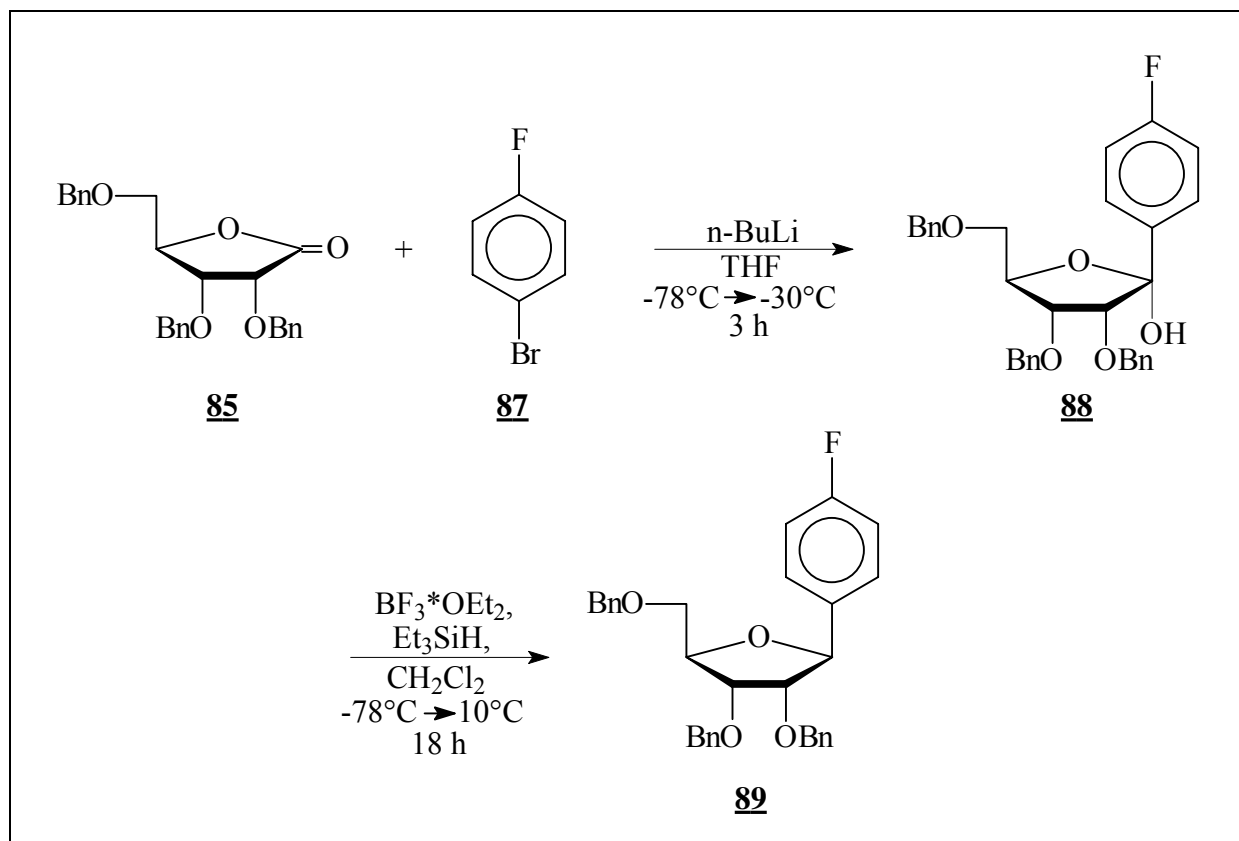


Abb. 6.24: C-Glykosylierung und Dehydroxylierung

Die Dehydroxylierungsreaktion verläuft mit Bortrifluorid-Ethyletherat und Triethylsilan in Methylchlorid bei -78°C ab. Dabei greift das Bortrifluorid die Alkoholgruppe des Lactols **88** elektrophil an und spaltet sie ab. Es entsteht ein Kation **90**, dessen Ladung durch den benachbarten Sauerstoff stabilisiert wird (Brückner *et al.*, 1988). Das eingesetzte Triethylsilan ist ein sogenannter Hydrid Donor. Das Hydrid greift, bedingt durch den anomeren Effekt des Zuckers, selektiv die *re*-Seite des Zuckers an und zwingt den Aromaten in β -Position. Bei der Dehydroxylierung entsteht dadurch nur das β -Nukleosid **89**, obwohl ein planarer Übergangszustand durchlaufen wird (Abbildung 6.25).

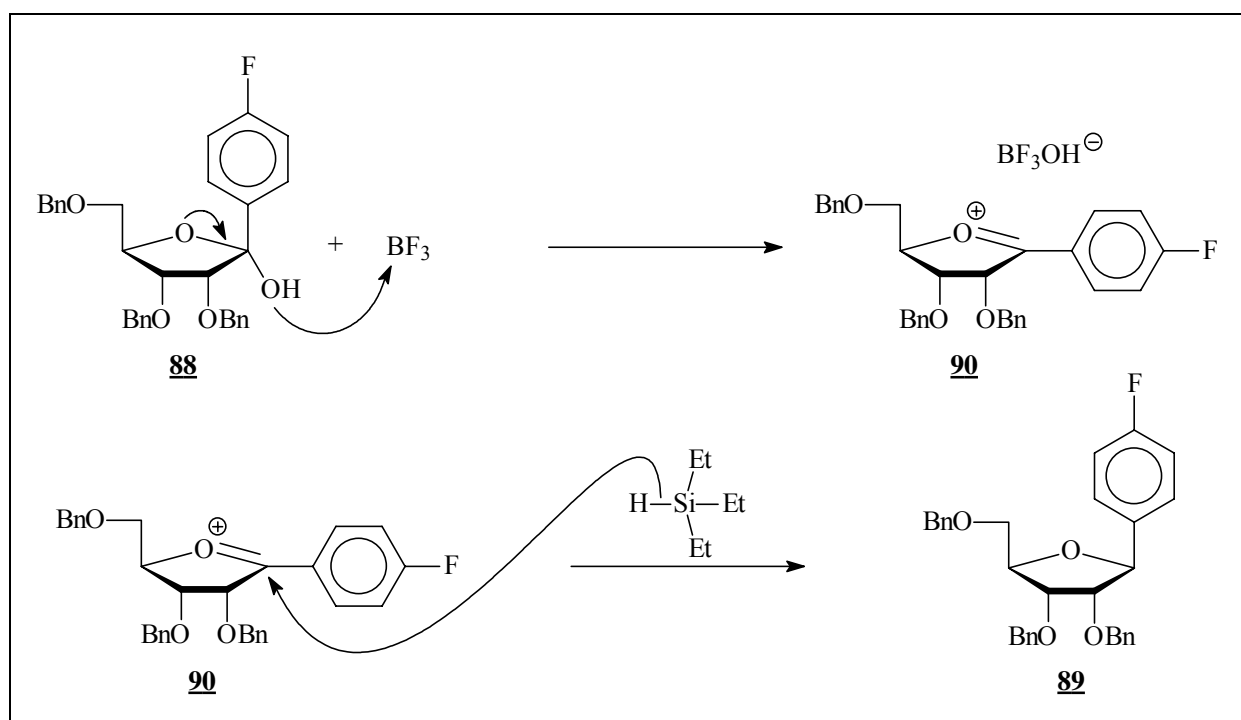


Abb. 6.25: Dehydroxylierung mit Bortrifluorid

Während alle Monofluorbenzole nach der oben beschriebenen Methode mit dem Lösungsmittel Tetrahydrofuran glykosyliert werden konnten, verlief die Glykosylierung von 2,4-Difluorbrombenzol mit 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-ribo- γ -lacton **85** nicht wie vorgesehen und erbrachte ein überraschendes Ergebnis. Wie in Abbildung 6.26 zu sehen wurde anstatt des erwarteten 2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **92** 2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-(2,6-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **93** in einer Ausbeute von 31 % erhalten. Bei der Zugabe von *n*-Butyllithium kam es nicht nur zu einem Brom - Lithium Austausch, sondern auch zu einer Deprotonierung des Fluoraromaten zwischen den beiden Fluoratomen. Von dieser Stelle muß dann der nukleophile Angriff auf das Lacton erfolgt sein, damit es zu der beobachteten Verknüpfung kommen konnte. Das

Bromatom muß während der Reaktion oder bei der Aufarbeitung abgespalten worden sein, da es im Produkt nicht mehr vorhanden war.

Durch den Austausch des Lösungsmittels kann die Wirkung von *n*-Butyllithium wieder geändert werden. Wird anstelle von Tetrahydrofuran Diethylether als Lösungsmittel verwendet, so verschwinden die basischen Eigenschaften von *n*-Butyllithium vollständig und es kommt wieder ausschließlich zu einem Brom - Lithium Austausch und damit zu keiner Deprotonierung. Mit Diethylether als Lösungsmittel, bei sonst nicht veränderter Reaktionsführung, erhält man 2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **92** in einer Ausbeute von 84,6 %.

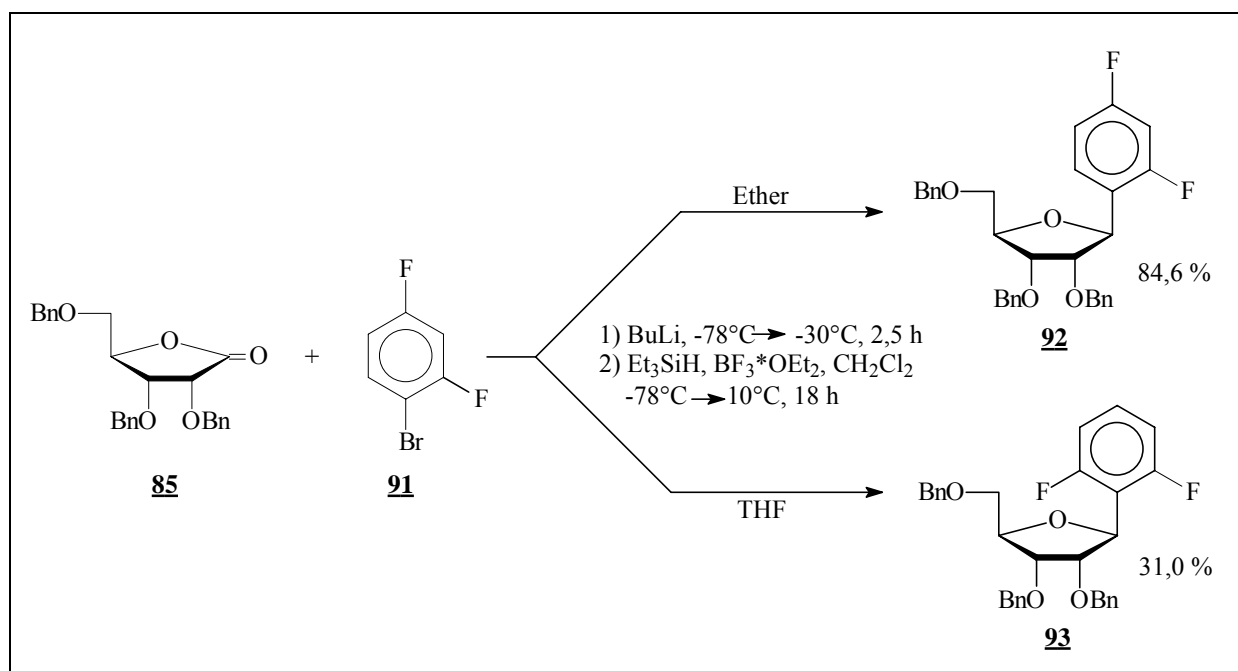


Abb. 6.26: Auswirkung des Lösungsmittels auf das Produkt der C-Glykosylierung von 2,4-Difluorbrombenzol **91** mit 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-ribo- γ -lacton **85**

Abbildung 6.27 zeigt die Reaktionsbedingungen und die dabei beobachteten Reaktionen von *n*-Butyllithium mit 4-Fluorbrombenzol bzw. 2,4-Difluorbrombenzol. Während bei den Monofluorbrombenzolen das Lösungsmittel, egal ob Ether oder Tetrahydrofuran, so gut wie keine Rolle spielt, ist es bei der Reaktion des Difluorbrombenzols von großer Bedeutung. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Coe und Mitarbeitern gemacht, die Fluorbenzole mit Lithiumdiisopropylamid (LDA) und *n*-Butyllithium in Ether oder Tetrahydrofuran versetzten (Coe *et al.*, 1995).

Im Fall des 2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-(2,4,6-trifluorphenyl)- β -D-ribofuranose **104** konnte auch mit Ether als Lösungsmittel kein sauberer Brom - Lithium Austausch erreicht werden. Zu einem kleinen Prozentsatz kam es zu einer Deprotonierung. Diesmal allerdings

wurde das Bromatom weder während der Reaktion noch während der Aufarbeitung abgespalten und das entstandene Nukleosid enthielt noch ein Bromatom zwischen zwei Fluoratomen. Da dieses Produkt von 2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-(2,4,6-trifluorphenyl)- β -D-ribofuranose **104** nicht abgetrennt werden konnte, wurde eine Ausbeute von ca. 3 % an bromhaltigem Nukleosid über NMR Untersuchungen bestimmt. Insgesamt ist die Ausbeute dieser Reaktion deutlich schlechter als bei allen anderen C-Glykosylierungen, was durch die Position der zu verknüpfenden Stelle zwischen zwei Fluoratomen erklärt werden kann.

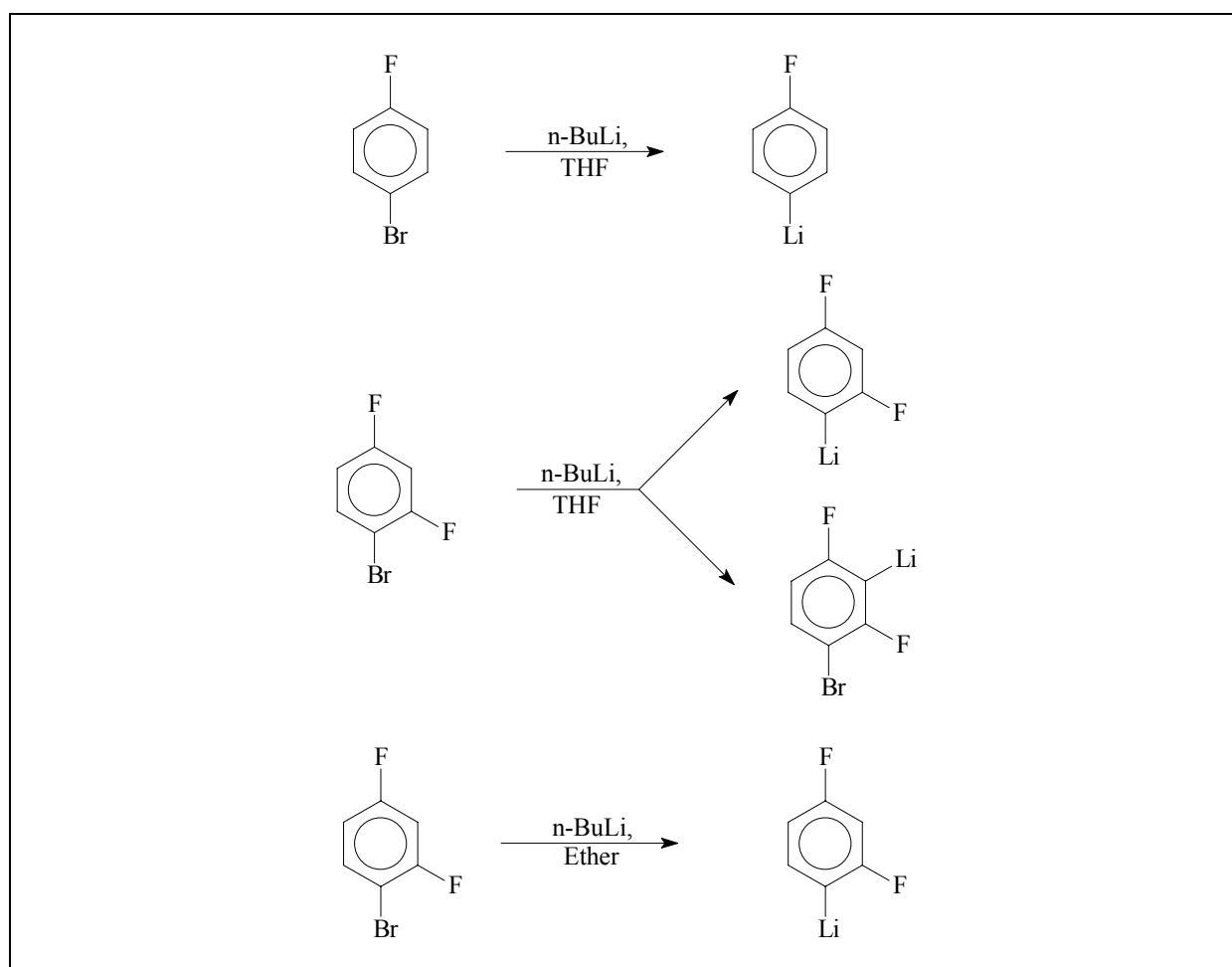


Abb. 6.27: Einfluß des Lösungsmittels auf die Reaktion von n-Butyllithium mit 4-Fluorbrombenzol bzw. 2,4-Difluorbrombenzol

Um einen Überblick über die synthetisierten Benzol- und Fluorbenzol-Nukleoside zu geben, sind in Tabelle 6.1 alle Nukleoside mit ihren Ausbeuten und den dabei verwendeten Lösungsmitteln zusammengefaßt. Die Ausbeuten von C-Glykosylierung und Dehydroxylierung sind als eine Ausbeute über beide Schritte angegeben, da die intermediären Lactole nicht aufgereinigt wurden.

| Aromat | Lösungsmittel bei der C-Glykosylierung | Ausbeute an benzyliertem Nucleosid |
|--------------------------|--|------------------------------------|
| Brombenzol | Tetrahydrofuran | 74,7 % |
| 4-Fluorbrombenzol | Tetrahydrofuran | 75,8 % |
| 3-Fluorbrombenzol | Tetrahydrofuran | 74,8 % |
| 3-Fluorbrombenzol | Diethylether | 69,8 % |
| 2-Fluorbrombenzol | Tetrahydrofuran | 80,0 % |
| 2,4-Difluorbrombenzol | Diethylether | 84,6 % |
| 2,4,6-Trifluorbrombenzol | Diethylether | 32,7 % |

Tabelle 6.1: Vergleich der Ausbeuten der synthetisierten C-Nucleoside

6.5.2 Debenzylierung

Die Debenzylierung der geschützten Nucleoside erfolgte mit Palladiumhydroxid auf Kohle und Cyclohexen (Hanessian *et al.*, 1981). Diese Methode hat sich als milde Entschützungs-möglichkeit mit hohen Ausbeuten herausgestellt. Als Katalysator wird der sogenannte Pearlmans Katalysator, 20 % Palladiumhydroxid auf Kohle, verwendet (Pearlman, 1967). Bei der Reaktion handelt es sich um eine Transfer-Hydrogenolyse, bei der Cyclohexen als Wasserstoff-Donor fungiert.

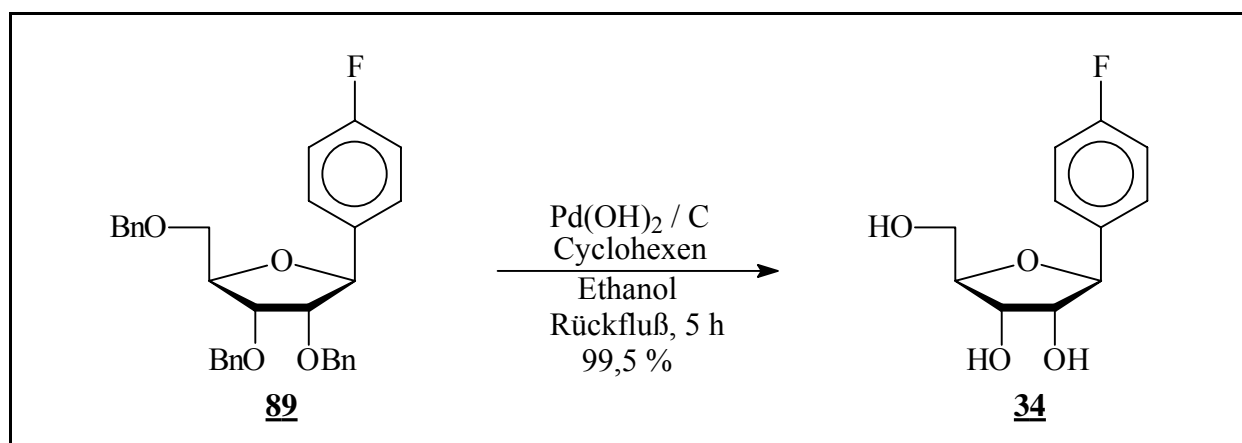


Abb. 6.28: Debenzylierung von 2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **89**

Die Reaktion ließ sich bei allen Fluorbenzol-Nucleosiden sehr erfolgreich anwenden. Alle Ausbeuten liegen über 95 %. Das Benzol-Nucleosid **94** konnte mit dieser Reaktionsführung nicht in der gewünschten Weise entschützt werden. Der entsprechende Versuch lieferte nicht

wie erwartet 1'-Desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose **38**, sondern 1-Desoxy-1-phenyl-D-ribitol **95** in einer Ausbeute von 67,6%. Bei der Debenzylierung kam es zu einer reduktiven Öffnung des Furanringes. Betrachtet man das Ausgangsmolekül dieser Reaktion genauer, so sieht man die Ähnlichkeit einer Benzylgruppe einerseits und dem Aromaten mit dem C1'-Kohlenstoffatom andererseits. Der Benzolring und der C1'-Kohlenstoff bilden sozusagen auch eine Benzylschutzgruppe, die mit dem O4' Sauerstoff des Zuckers verknüpft ist. Es verwundert deshalb nicht, daß die Reaktion 1-Desoxy-1-phenyl-D-ribitol **95** als Produkt lieferte.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde die Debenzylierung von 2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose **89** mit Bortribromid durchgeführt (Krohn *et al.*, 1992). 2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose **89** wurde in Methylenchlorid gelöst, auf -78°C abgekühlt und 1,5 Stunden nach Zugabe von Bortribromid gerührt. Es zeigte sich, daß bei jeder Reaktion etwas Brom freigesetzt wurde, welches die Aufreinigung erschwerte, so daß die Ausbeute mit 69,0 % deutlich unter denen der anderen Fluorbenzol-Nukleoside blieb.

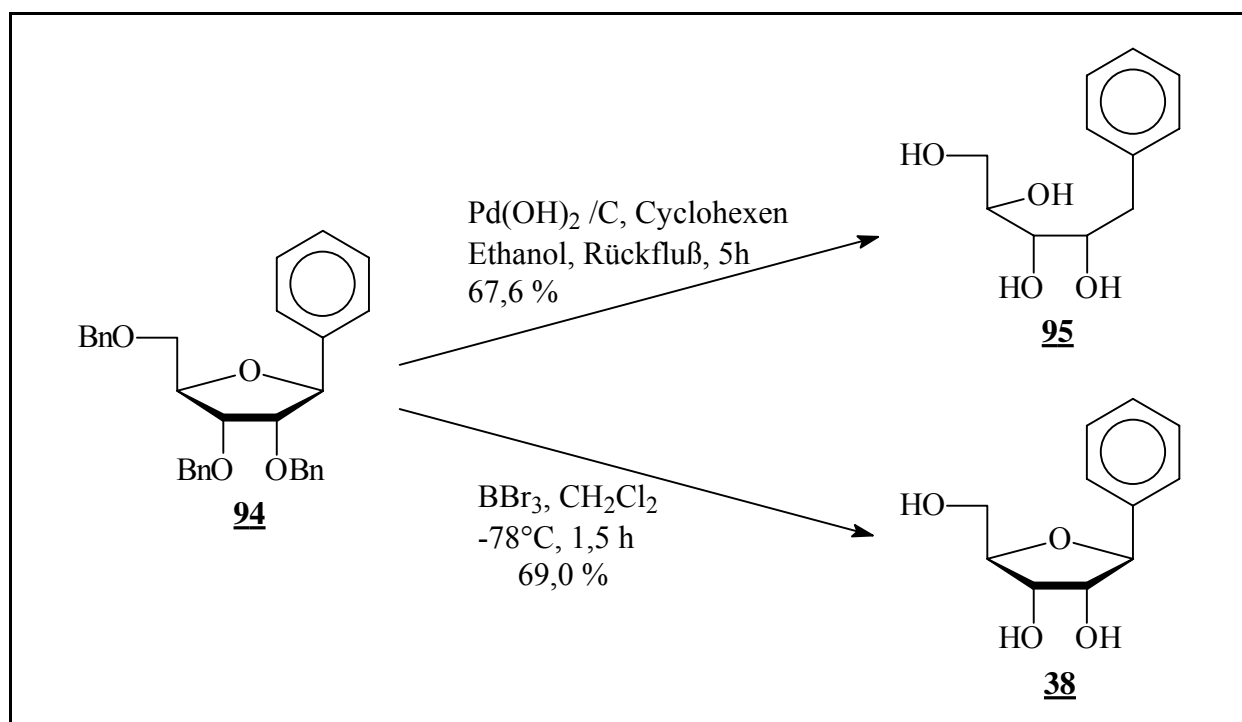


Abb. 6.29: Debenzylierung von 2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose **94**

Der Beweis der Stereochemie an C1' und damit der Kontrolle, ob der neu verknüpfte Aromat sich in α - oder β -Stellung zum Zucker befindet, erfolgte über Röntgenstrukturanalyse. Von allen Fluorbenzol-Nukleosiden konnten Kristalle erhalten und untersucht werden. Abb. 6.30

zeigt beispielhaft die Röntgenstruktur von 1'-Desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **34**. Weitere Informationen zu den Kristallstrukturen der anderen Fluorbenzol-Nukleoside befinden sich in Kapitel 7 und in Kapitel 13 Teil A.

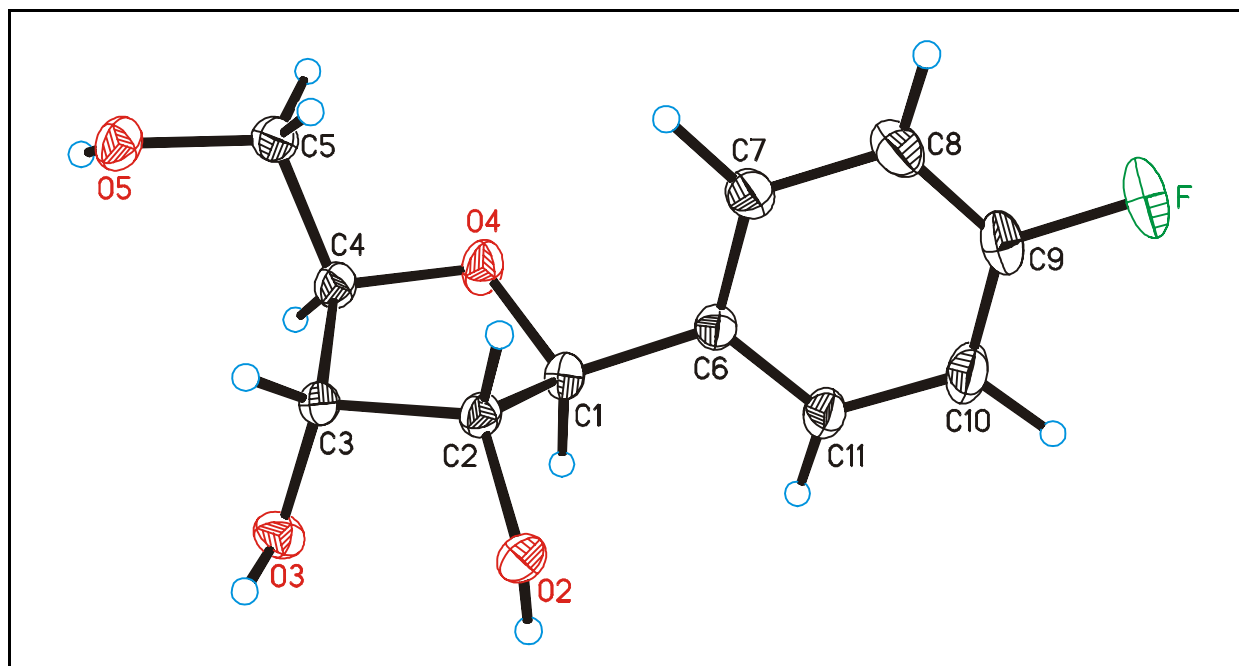


Abb. 6.30: Kristallstruktur von 1'-Desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **34** kristallisiert aus Methanol bei 20°C

6.5.3 Dimethoxytritylierung

Als Schutzgruppe für die 5'-OH Funktion wurde bei den C-Nukleosiden wie schon bei den Fluorbenzimidazolen die Dimethoxytritylmethylgruppe verwendet. Das zu schützende Nukleosid wird in Pyridin und Triethylamin gelöst und mit Dimethoxytritylmethylchlorid (DMTrCl) versetzt. Abbildung 6.31 zeigt beispielhaft die Reaktion von 1'-Desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **34** mit DMTrCl. Die Reaktionsbedingungen sind für alle in diesem Abschnitt besprochenen Bausteine identisch, nur die Reaktionszeiten und die Ausbeuten variieren. Die Reaktionszeiten liegen zwischen 2,5 und 4,5 Stunden. Sie sind damit deutlich kürzer als bei 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **33** mit 20 Stunden. Alle Ausbeuten liegen über 75 %. Besonders herauszuheben ist die hohe Ausbeute von 96,4 % bei der Schützung von 1'-Desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **35**. Alle Produkte werden als Schäume erhalten, die meist aufgrund von Spuren von Triethylamin eine gelbliche Färbung aufweisen.

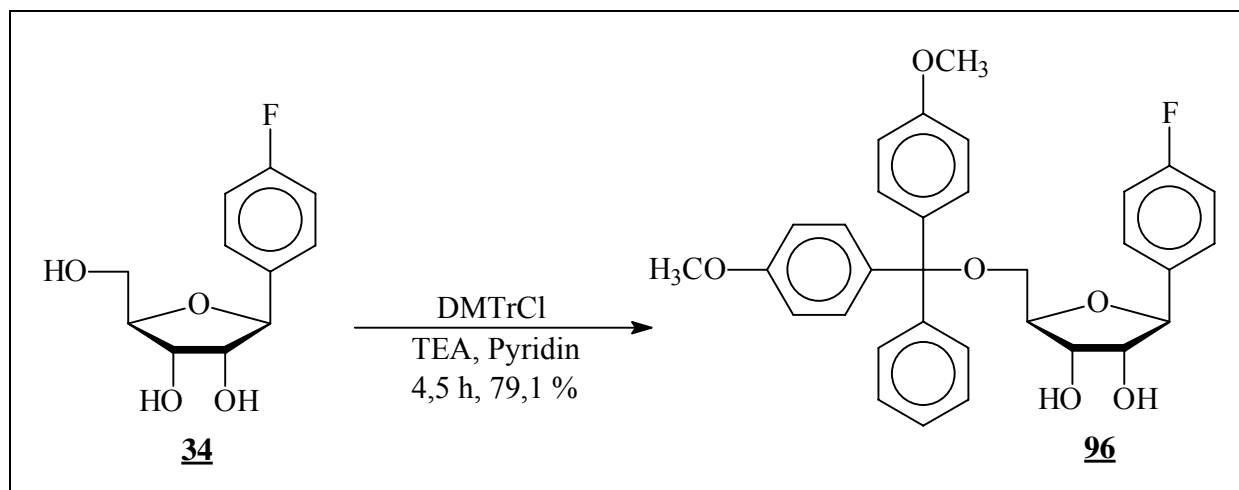


Abb. 6.31: Dimethoxytritylierung von 1'-Desoxy-1'-(4-fluorphenyl)-β-D-ribofuranose **34**

In Tabelle 6.2 sind die Reaktionszeiten und die dabei resultierenden Ausbeuten noch einmal zusammengefasst.

| Nukleobase der Nucleoside (Nr. Nucleosid) | Reaktionszeit in Stunden | Ausbeute in % |
|--|--------------------------|---------------|
| 2,4-Difluorbenzol (30) | 2,5 | 83,4 |
| 4-Fluorbenzol (34) | 4,5 | 79,1 |
| 3-Fluorbenzol (35) | 4 | 96,4 |
| 2-Fluorbenzol (36) | 3 | 90,2 |
| Benzol (38) | 4 | 75,3 |

Tabelle 6.2: Reaktionszeiten und Ausbeuten der Dimethoxytritylierungen

6.5.4 Schützung der 2'-OH Funktion

Für den Schutz der 2'-OH Funktion wurde wieder, wie für RNA Phosphoramidite üblich, die TBDMS Schutzgruppe verwendet. Zur Durchführung der Reaktion werden die Nucleoside in einem 1:1 Gemisch aus Pyridin und Tetrahydrofuran gelöst und mit Silbernitrat und TBDMSCl versetzt (Abb. 6.32). Das Silbernitrat soll, wie schon in Abschnitt 6.3.4 beschrieben, für einen bevorzugten Angriff der TBDMS Gruppe an die 2'-Position des Nucleosides sorgen. Die Reaktionszeiten sind für alle Bausteine identisch. Dadurch lassen sich die Ausbeuten gut miteinander vergleichen. Wie schon im Falle der Benzimidazole besprochen, zeigt die TBDMS-Gruppe auch bei dem Benzol- und den Fluorbenzol-Bausteinen eine Wanderungstendenz in Richtung der 3'-OH Gruppe. Je größer diese

Wanderungstendenz ist, desto weiter verschiebt sich das Isomerenverhältnis in Richtung des 3'-geschützten Nucleosids.

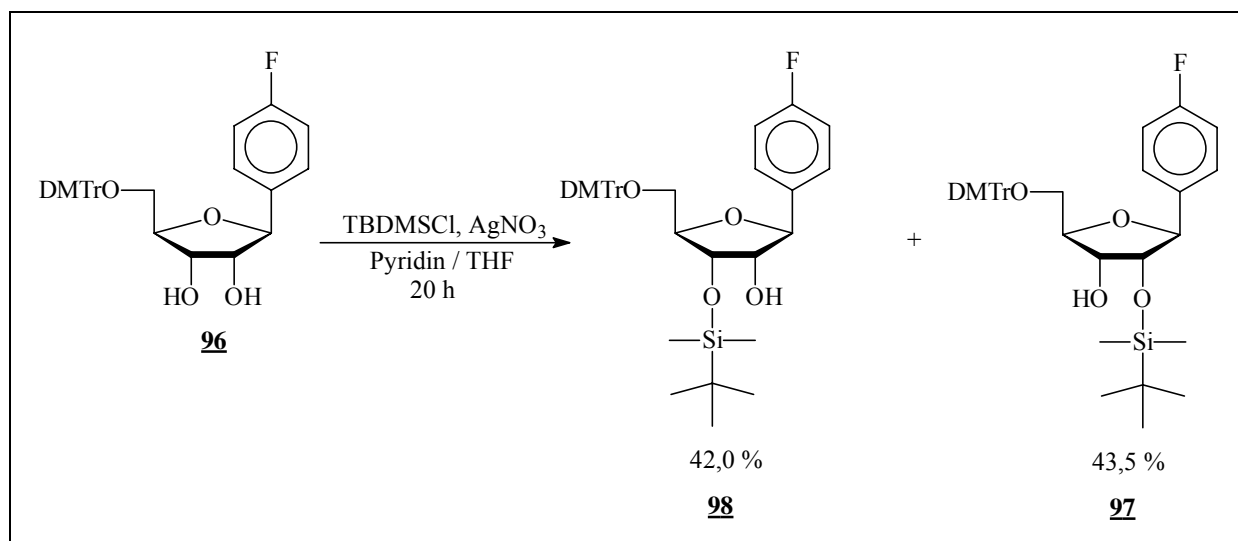


Abb. 6.32: TBDMS-Schätzung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4-fluorphenyl)-β-D-ribofuranose **96**

Tabelle 6.3 zeigt die Ausbeuten an 2'- und 3'- geschützten Nucleosiden. Auffällig ist die Tatsache, daß im Falle von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(3-fluorphenyl)-β-D-ribofuranose **100** und 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-phenyl-β-D-ribofuranose **102** die Ausbeuten an 3'-geschütztem Isomer größer sind als von 2'-geschütztem Isomer. Bei allen anderen Nucleosiden überwiegt, wenn auch nur knapp, die Ausbeute am gewünschten 2'-geschützten Isomer.

| Nucleobase der Nucleoside (Nr. Nucleosid) | Ausbeute an 2'-geschütztem Nucleosid in % | Ausbeute an 3'-geschütztem Nucleosid in % |
|--|--|--|
| 2,4-Difluorbenzol (99) | 35,5 | 31,4 |
| 4-Fluorbenzol (96) | 43,5 | 42,0 |
| 3-Fluorbenzol (100) | 33,1 | 42,5 |
| 2-Fluorbenzol (101) | 31,3 | 29,6 |
| Benzol (102) | 29,3 | 42,1 |

Tabelle 6.3: Ausbeuten an 2'/3'-Isomeren bei der TBDMS-Schätzung

Wie aus Tabelle 6.3 zu entnehmen ist, ist die Stärke der Wanderungstendenz der TBDMS Gruppe nicht von der Anzahl der Fluoratome am Aromaten abhängig. Die Position der Fluor-Substitution am Aromaten spielt eine größere Rolle. Besonders aktivierend für die TBDMS-Gruppe wirkt sich die Substitution in 3-Position aus, während eine Substitution an Position 2

oder 4 bzw. 2 und 4 die Wanderungstendenz der TBDMS Gruppe in Richtung 3'-OH Funktion nur wenig begünstigt.

6.5.5 Phosphitylierung

Auf grundsätzliche Aspekte bei der Phosphitylierung wurde schon im Abschnitt 6.3.5 hingewiesen.

Bei der Reaktion ist auf strikte Trockenheit aller Reaktanden sowie des Lösungsmittels und auf Ausschluß von Sauerstoff zu achten. Als Lösungsmittel für die Phosphitylierungen wurde Acetonitril verwendet. Die Edukte werden in Acetonitril gelöst und *sym.*-Collidin und *N*-Methylimidazol zugesetzt. Anschließend wird die Reaktion auf 0°C abgekühlt, 2-Cyanethyl-diisopropylchlorphosphoramidit **66** zugesetzt und 15 Minuten bei 0°C gerührt. Anschließend wird auf Raumtemperatur erwärmt und je nach Baustein zwischen 15 und 60 Minuten gerührt (Abbildung 6.33).

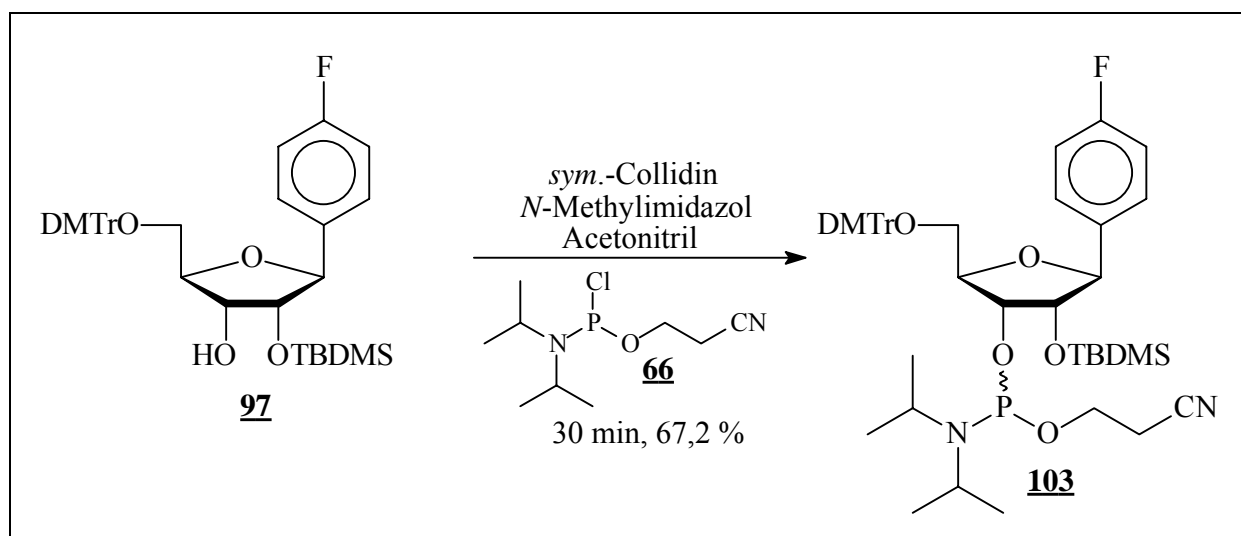


Abb. 6.33: Phosphitylierung von 5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-*tert.*-butyl-dimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **97**

Die Ausbeuten der Phosphoramidite liegen zwischen 57 und 67 %. Die Diastereomere, die bei dieser Reaktion erhalten werden, können bei DC-Untersuchungen zum Teil als zwei einzelne Flecken erkannt werden. Besondere Schwierigkeit bereitet allerdings die Tatsache, daß die Laufunterschiede zwischen Edukt und den beiden diastereomeren Produkten bei DC-Untersuchungen oft sehr gering sind.

Die Synthese von 3'-*O*-(2-Cyanethoxydiisopropyl-phosphin)-5'-*O*-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-2'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose **120** wurden schon im Jahre 1996 von Matulic-Adamic und Mitarbeitern publiziert (Matulic-Adamic *et al.*, 1996; Matulic-Adamic *et al.*, 1996a).

6.5.6 Syntheseübersichten

Abbildung 6.34 zeigt die Syntheseübersicht von 1'-Desoxy-1'-(2,4,6-trifluorphenyl)- β -D-ribofuranose **86**. Baustein **86** wurde nur zu Kristallisationszwecken synthetisiert und deshalb nicht in das Amidit überführt und in RNA eingebaut.

Die Abbildungen 6.35, 6.36, 6.37, 6.38 und 6.39 zeigen die Syntheseübersichten der Fluorbenzolphosphoramidite **106**, **103**, **111** und **116** bzw. des Benzolphosphoramidites **120** beginnend mit den Glykosylierungsreaktionen.

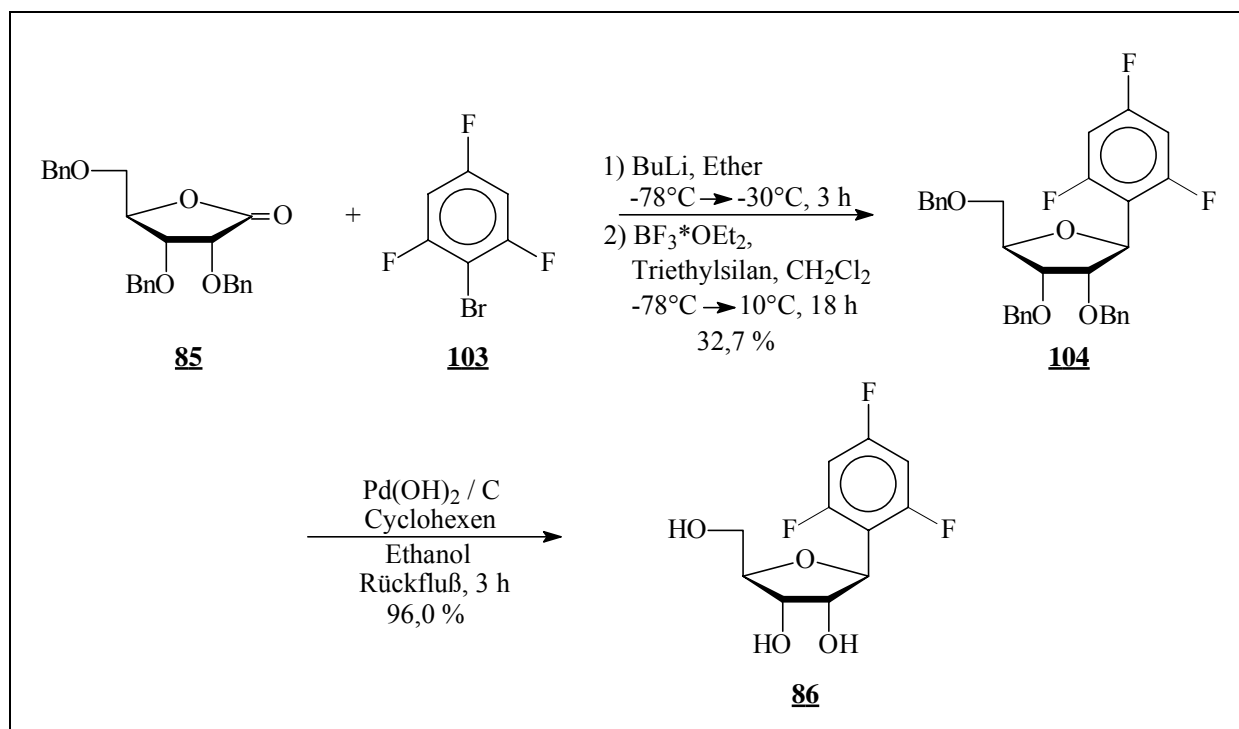


Abb. 6.34: Syntheseübersicht für 1'-Desoxy-1'-(2,4,6-trifluorphenyl)- β -D-ribofuranose **86**

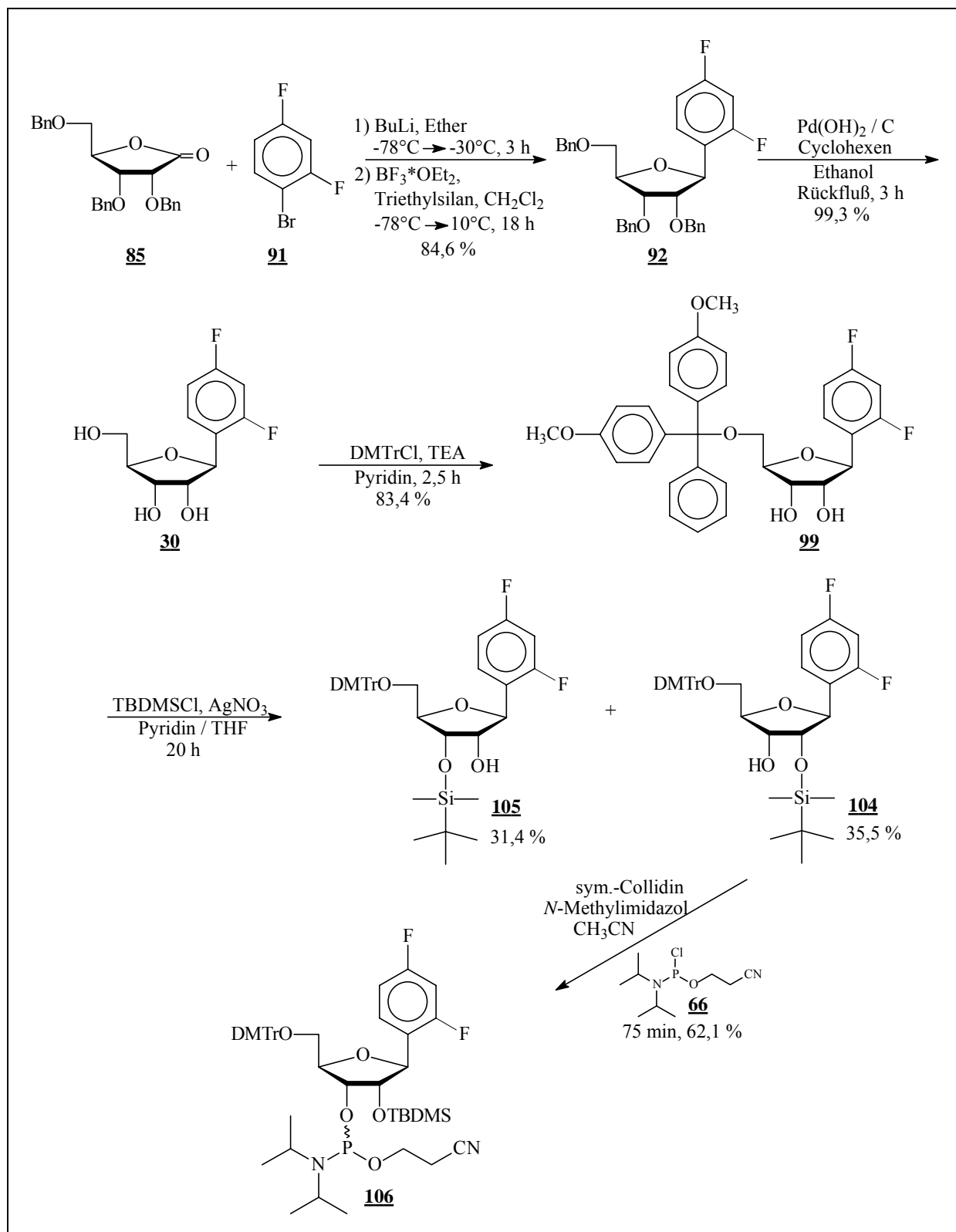


Abb. 6.35: Syntheseübersicht für 3'-O-(2-Cyanoethoxydiisopropylphosphin)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **106**

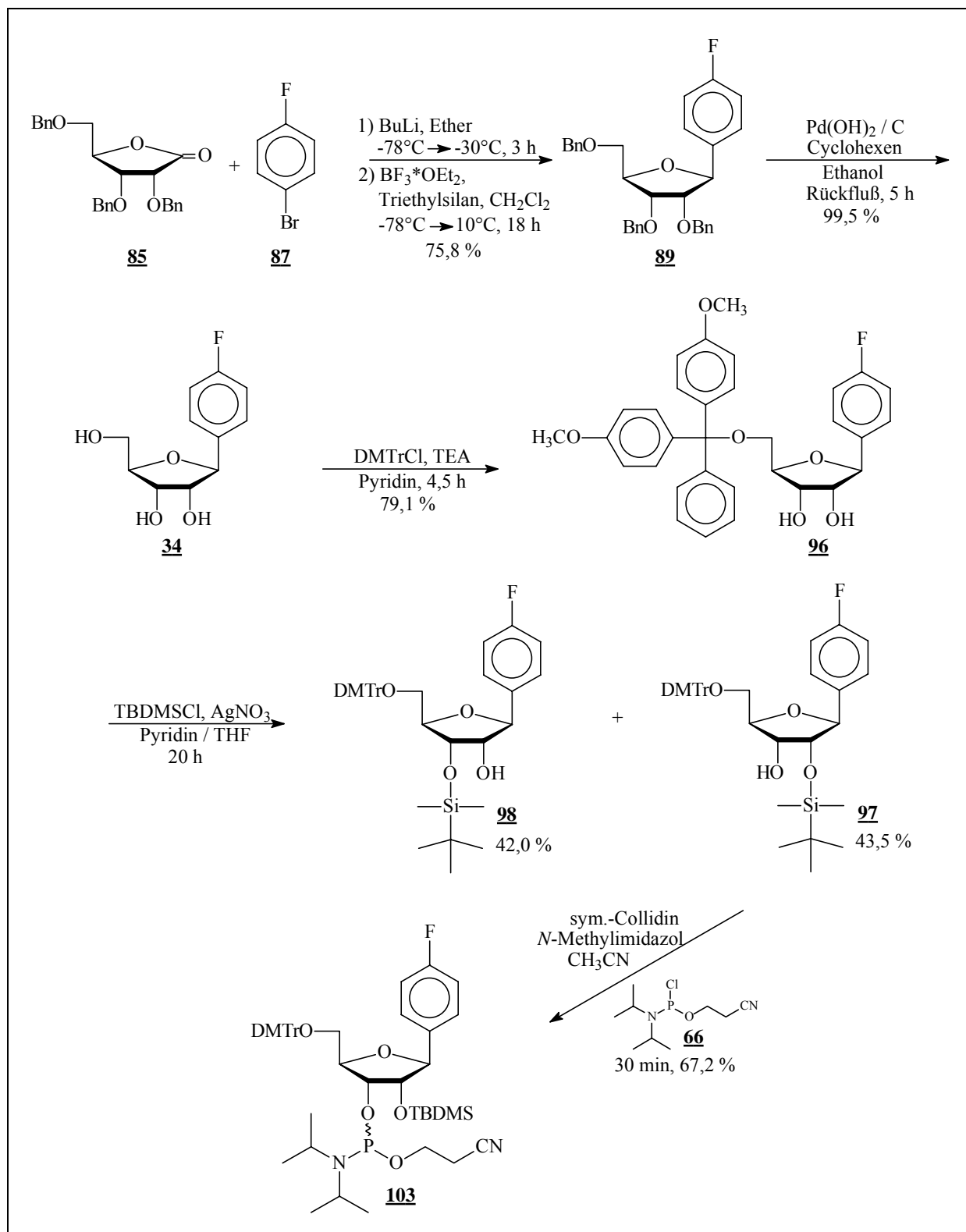


Abb. 6.36: Syntheseübersicht für 3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **103**

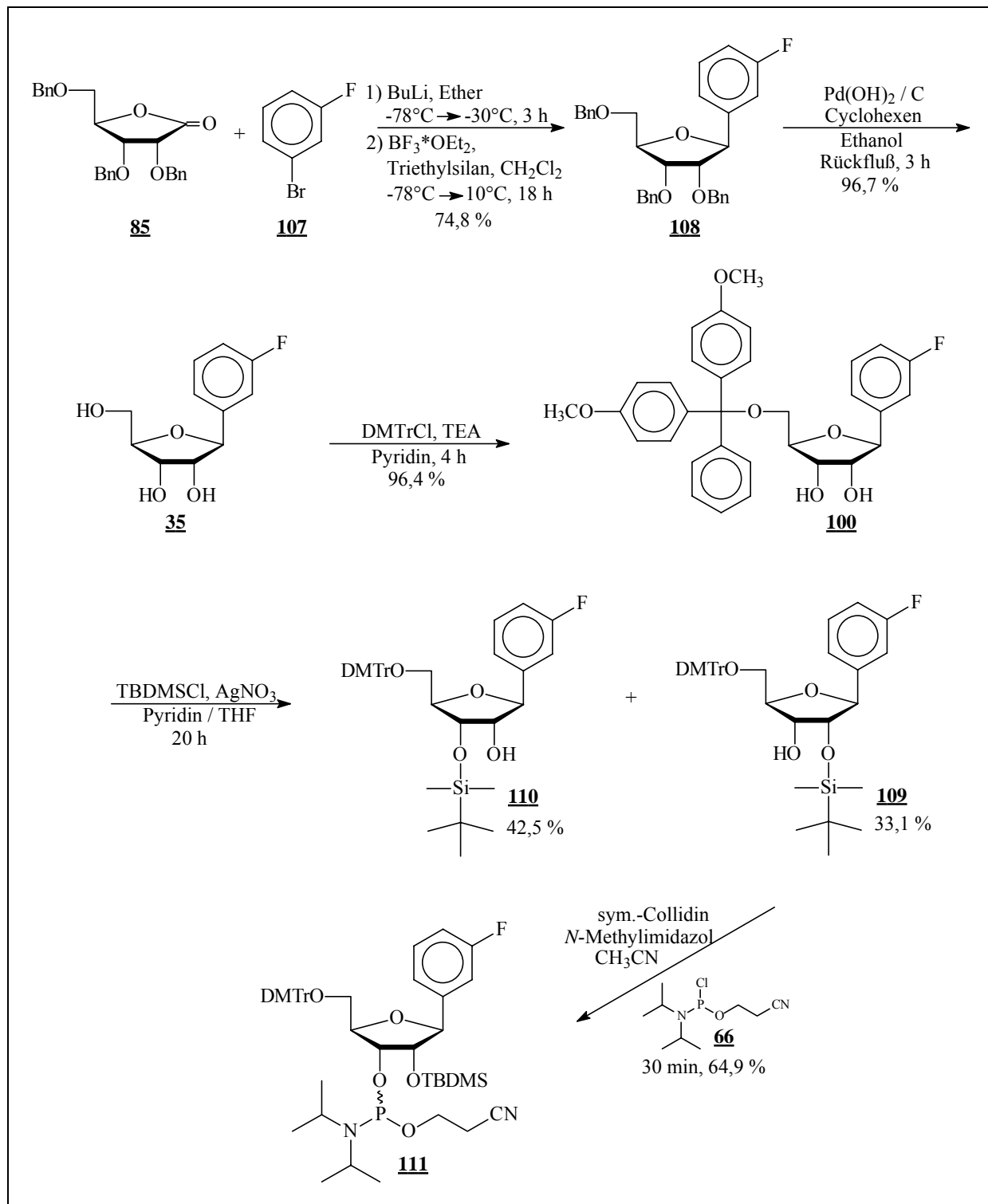


Abb. 6.37: Syntheseübersicht für 3'-O-(2-Cyanoethoxydiisopropylphosphin)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **111**

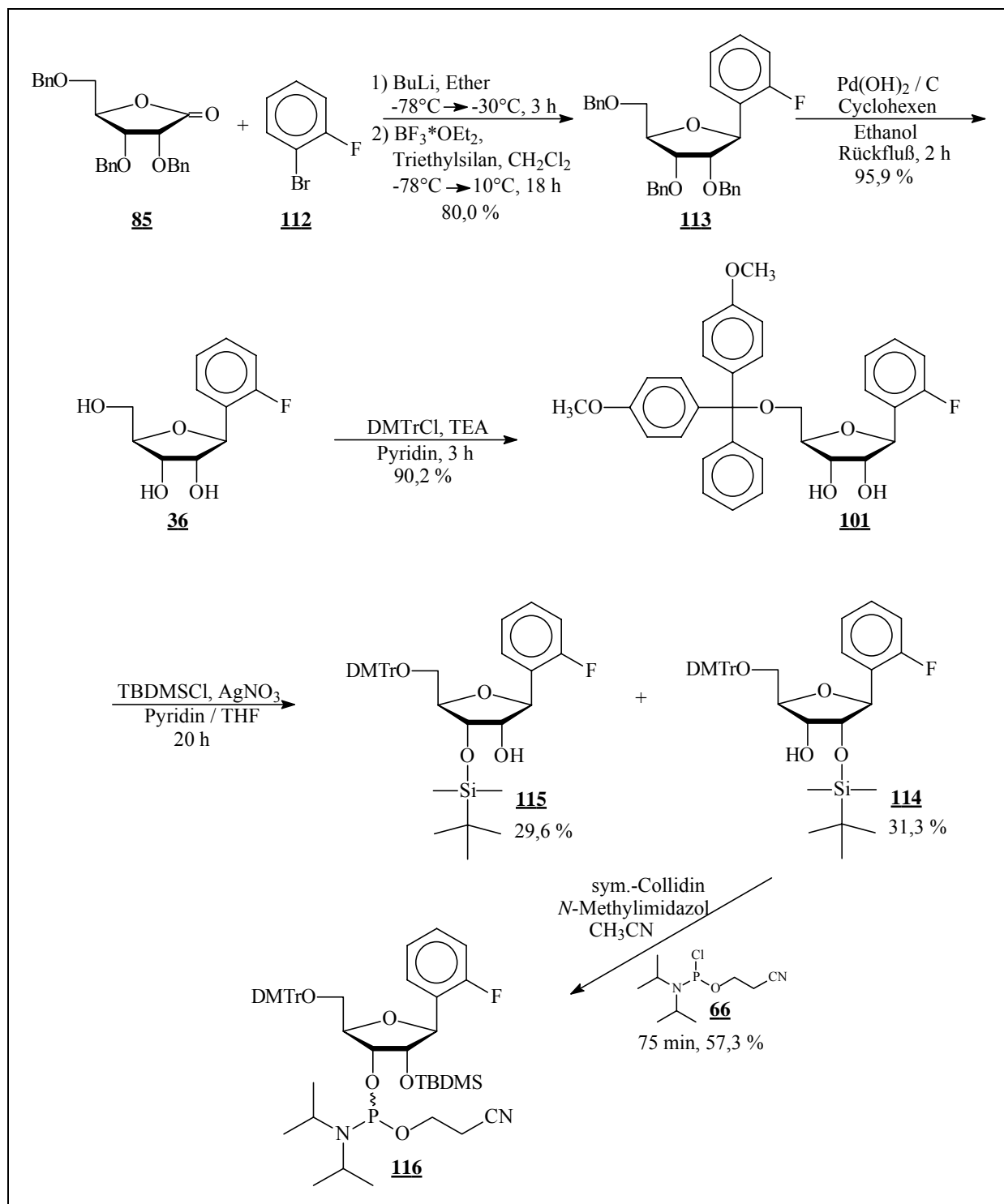


Abb. 6.38: Syntheseübersicht für 3'-O-(2-Cyanoethoxydiisopropylphosphin)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **116**

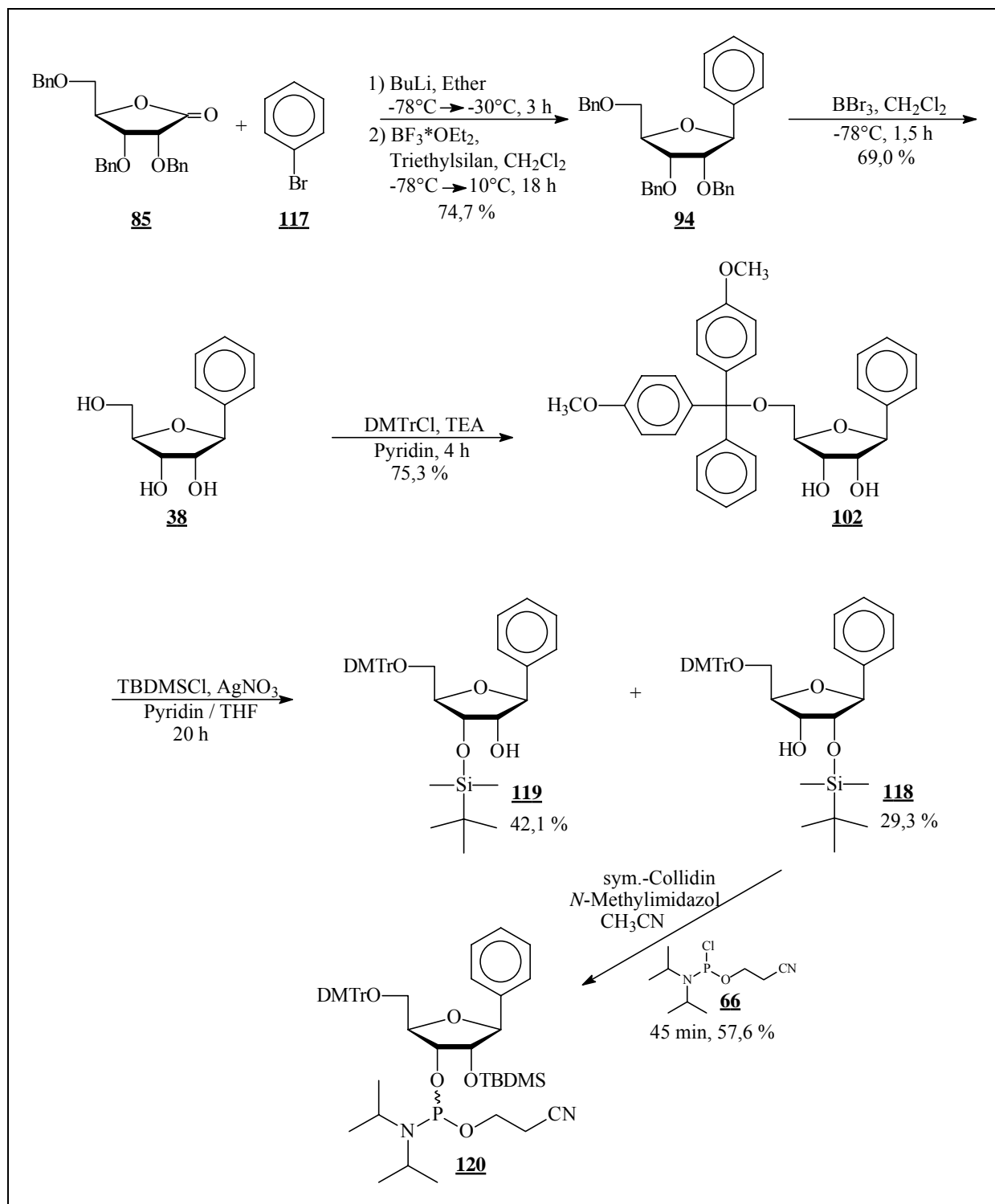


Abb. 6.39: Syntheseübersicht für 3'-O-(2-Cyanoethoxydiisopropylphosphin)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose **120**

6.6 Abasischer Baustein

Für umfassende Untersuchungen zu Basenstapelungswechselwirkungen gehört ein Vergleich der zu untersuchenden Verbindungen mit einem abasischen Baustein. Ein abasischer Baustein trägt keine Nukleobase und kann somit nicht durch Basenstapelungswechselwirkungen zur Stabilität einer Doppelhelix beitragen.

Die Synthese eines solchen abasischen Bausteines **126** für die automatisierte Festphasensynthese nach der Phosphoramiditmethode beginnt mit 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-ribofuranose **84**. 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-ribofuranose **84** selbst wird aus D-Ribose synthetisiert und ist die dritte Stufe in der Synthese von 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-ribo- γ -lacton **85**. Um einen abasischen Baustein zu erhalten, muß die Hydroxylgruppe an C1 entfernt werden. Dazu wird **84** in Acetonitril gelöst und mit Bortrifluorid-Ethyletherat und Triethylsilan versetzt (Purdy *et al.*, 1994). Nach einer Reaktionszeit von 1,5 Stunden ist die Reaktion beendet. Im Gegensatz zu den Dehydroxylierungen der C-Nukleoside wird die Reaktion nicht bei -78°C , sondern bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Aufarbeitung erhält man 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-1-desoxy-D-ribofuranose **121** in 88,4 %iger Ausbeute.

Um den ungeschützten Zucker zu erhalten, müssen die Benzyl-Schutzgruppen entfernt werden. Dazu wird 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-1-desoxy-D-ribofuranose **121** in Ethanol und Cyclohexen gelöst und mit Palladiumhydroxid (20%) auf Kohle versetzt (Hossain *et al.*, 1998). Bei der Reaktion handelt es sich wie bei den C-Nukleosiden um eine Transfer-Hydrogenolyse, bei der Cyclohexen als Wasserstoff-Donor fungiert (Hanessian *et al.*, 1981). Nach vier Stunden sieden unter Rückfluß sind alle drei Benzyl-Schutzgruppen abgespalten und 1-Desoxy-D-ribofuranose **122** wird mit 95,3 %iger Ausbeute als farbloser Feststoff erhalten.

Die folgenden Syntheseschritte zum Amidit sind den der anderen bisher beschriebenen Amiditbausteine ähnlich. Zuerst wird die 5'-Hydroxylfunktion mit Dimethoxytriphenylmethylchlorid in Pyridin und Triethylamin geschützt, wobei 5-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1-desoxy-D-ribofuranose **123** mit einer Ausbeute von 85,9 % als weißer Schaum erhalten wird. Die anschließende Schützung mit TBDMSCl in Pyridin/THF in Gegenwart von Silbernitrat liefert wie erwartet ein Isomerengemisch aus an 2- bzw. 3-Position geschütztem Zucker. Im Gegensatz zu allen anderen bisher beschriebenen Benzol- und Benzimidazol-Nukleosiden zeigen beide TBDMS geschützten Isomere des abasischen Bausteins keine Wanderungstendenz der TBDMS Schutzgruppe. Aus diesem Grund kann anhand der Ausbeuten der Einfluß des Silbernitrates auf die Größenordnung des

Isomerenverhältnisses gezeigt werden. Das für die weitere Synthese benötigte 2-TBDMS geschützte Isomer **124** entsteht 2,2-fach häufiger als das 3-TBDMS geschützte Isomer **125** (60,3 % zu 27,3 %).

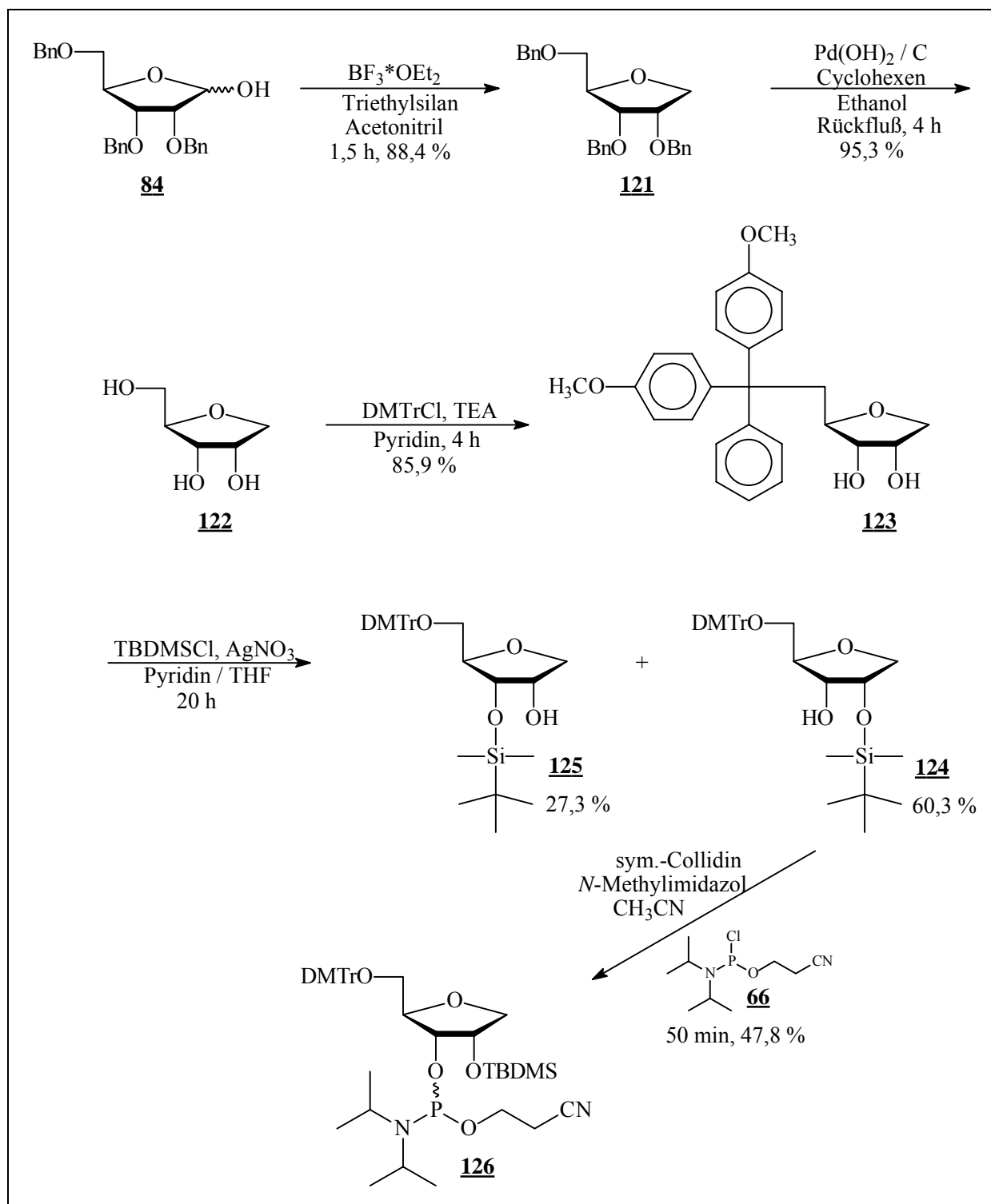


Abb. 6.40: Syntheseübersicht für 3-O-(2-Cyanoethoxydiisopropylphosphin)-5-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1-desoxy-D-ribofuranose **126**

Die Phosphitylierung von 5-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1-desoxy-D-ribofuranose **124** erfolgt mit *sym*-Collidin, *N*-Methylimidazol und 2-Cyanethyldiisopropylchlorphosphoramidit **66** in Acetonitril. Die Reaktion wird 15 Minuten bei 0°C und 35 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach Aufarbeitung und Aufreinigung mittels präparativer Dünnschichtchromatographie wird 3-*O*-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1-desoxy-D-ribofuranose **126** mit einer Ausbeute von 47,8 % erhalten (Abbildung 6.40).

6.7 Inosin

Inosin gehört zu den Ribonukleosiden, die vereinzelt in natürlicher RNA vorkommen. Die Nukleobase des Inosins wird Hypoxanthin genannt. In den folgenden beiden Abschnitten wird die Synthese von zwei Inosinphosphoramiditen, eines ohne und eines mit Basenschutzgruppe, beschrieben.

6.7.1 3'-*O*-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-inosin **130**

Da Inosin ein Nukleosid ist, ist die weitere Synthese zum Phosphoramidit nur dreistufig (Abbildung 6.41). Sie beginnt mit der Dimethoxytritylierung der 5'-Hydroxylfunktion. Wegen seiner geringen Löslichkeit in Pyridin muß die Reaktionsführung gegenüber allen bisher besprochenen Dimethoxytritylierungen geändert werden. Das Inosin wird in einem Gemisch aus Pyridin und DMF gelöst und über 3 Stunden langsam DMTrCl, welches in Pyridin gelöst ist, zugetropft (Wörner, 1997). Nach 21 Stunden ist die Reaktion beendet. Zu der Reaktionslösung wird Imidazol gegeben und das Lösungsmittelgemisch bei einer Temperatur kleiner 40°C im Ölpumpenvakuum abdestilliert (Green *et al.*, 1991). Bei höherer Temperatur wird die DMTr-Gruppe wieder abgespalten. Das zugesetzte Imidazol stabilisiert die DMTr-Gruppe während das Lösungsmittel abgezogen wird. Ohne den Zusatz von Imidazol wird auch schon bei einer Temperatur kleiner 40°C die DMTr-Gruppe von einem Großteil des Produktes während der Entfernung des Lösungsmittels abgespalten. Das Produkt konnte bei der Aufarbeitung ohne Imidazol nur in einer Ausbeute von 25,4 % erhalten werden. Mit Imidazol erhält man das Produkt mit einer Ausbeute von 89,2 %.

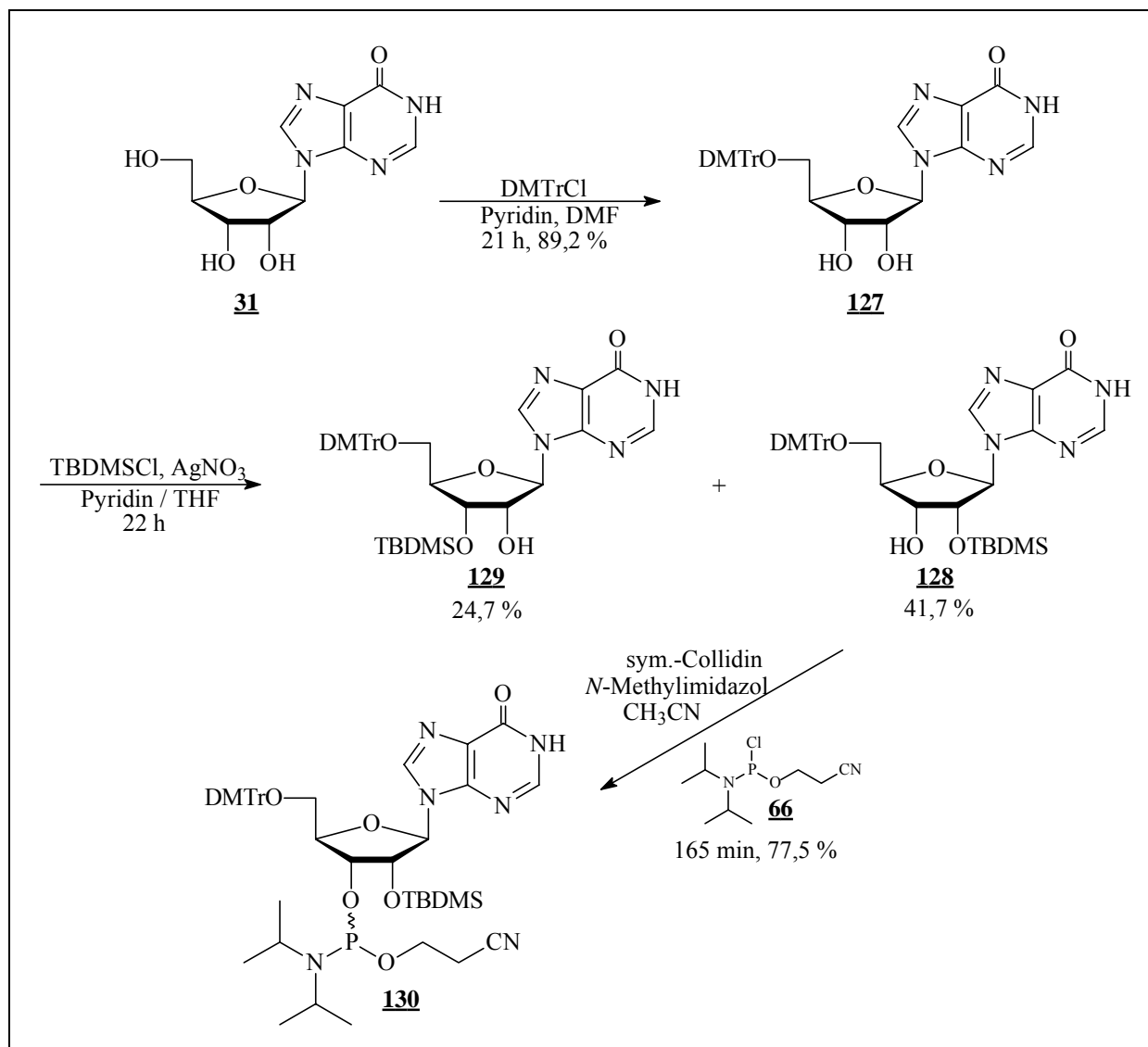


Abb. 6.41: Syntheseübersicht zu 3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-inosin **130**

Die Schützung der 2'-Hydroxylfunktion erfolgt mit der TBDMS-Schutzgruppe unter Katalyse von Silbernitrat. Die Umsetzung erfolgt in einem 1:1 Gemisch aus Pyridin und Tetrahydrofuran bei einer Reaktionszeit von 22 Stunden. Wie bei allen anderen Schützungen der 2'-Hydroxylfunktion erhält man ein Gemisch aus 2'- bzw. 3'-TBDMS geschützten Nucleosiden. Das 2'-TBDMS geschützte Isomer **128** wird in einer Ausbeute von 41,7 % und das 3'-TBDMS geschützte Isomer **129** in einer Ausbeute von 24,7 % erhalten. Man erhält das für die Phosphoramiditsynthese benötigte Isomer **128** in einem Verhältnis von 1,7 zu 1 im Vergleich zum nicht benötigten Isomeren. Untersuchungen zur Wanderungstendenz der TBDMS Gruppe ergaben bei Inosin eine Wanderung in umgekehrter Richtung zu der bei den bisher besprochenen modifizierten Nucleosiden. Löst man 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-inosin **129** in einem Gemisch aus Methanol und

Methylenchlorid und läßt die Lösung 20 Tage bei Raumtemperatur stehen, so wandert bei einem Drittel des eingesetzten Edukts die TBDMS Gruppe von der 3'-OH Funktion zur 2'-OH Funktion. Es läßt sich also 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-inosin **128** aus 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-inosin **129** mit einer Ausbeute von ca. 32 % gewinnen (Abbildung 6.42).

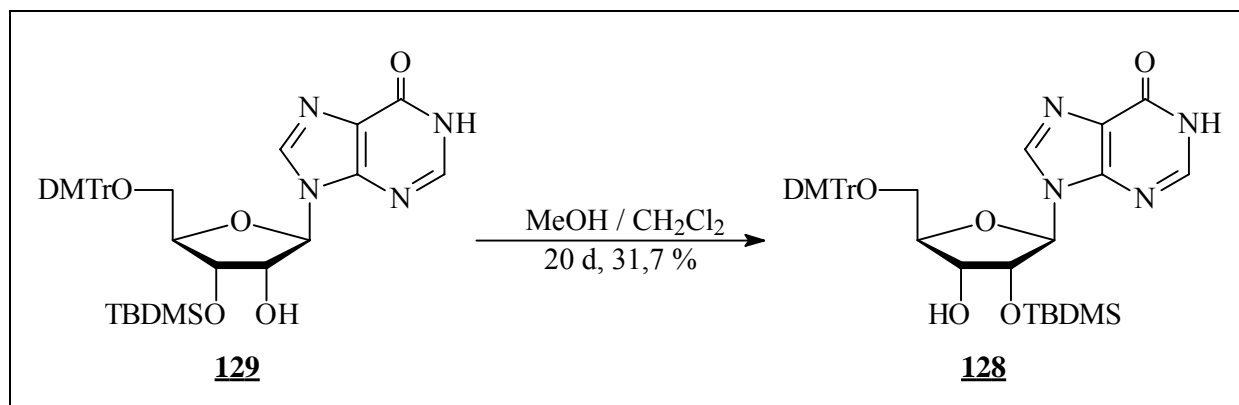


Abb. 6.42: Wanderungstendenz der TBDMS Gruppe bei Inosin

Die Phosphitylierung wird in THF mit *sym*-Collidin, *N*-Methylimidazol und 2-Cyanethyl-diisopropylchlorphosphoramidit **66** durchgeführt. 3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-inosin **130** wird als Mischung zweier Diastereomere mit einer Ausbeute von 77,5 % als weißer Schaum erhalten.

6.7.2 3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropyl-phosphin)-5'-O-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-6-O-(4-nitro-phenylethyl)-inosin **136**

3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-inosin **130** löst sich in Acetonitril nur sehr schlecht. Dadurch kommt es nur zu geringen Kupplungsausbeuten bei der Synthese der Oligomere am Synthesizer. Aus diesem Grund wurde eine Basenschutzgruppe für Inosin gesucht, die das daraus folgende Phosphoramidit in Acetonitril gut löslich macht und damit die Kupplungsausbeuten erhöht.

Die Wahl fiel auf die von Green und Mitarbeitern (Green *et al.*, 1991) schon bei Inosin verwendete Nitrophenylethyl-Schutzgruppe (NPE) (Himmelsbach *et al.*, 1984; Gao *et al.*, 1986; Gaffney & Jones, 1982). Um die NPE-Schutzgruppe an der O6-Position von Inosin anzubringen, müssen die Hydroxylgruppen geschützt werden. Green verwendet hierzu die Trimethylsilyl-Gruppe als temporäre Schutzgruppe für die folgende Mitsunobu Reaktion

(Mitsunobu, 1981), mit der die NPE-Gruppe an die O6-Position des Inosins angebracht wird. Anschließend werden die TMS-Gruppen mit HF/Pyridin wieder entfernt. Bei der Durchführung dieser Reaktionssequenz stellte sich heraus, daß das bei der Mitsunobu-Reaktion entstehende Triphenylphosphinoxid auf der TMS-entschützten Stufe nur unzureichend abgetrennt werden kann und daß bei der TMS-Entschützung die DMTr-Gruppe teilweise mit abgespalten wird. Es konnte somit nur ein verunreinigtes Produkt in schlechter Ausbeute (21 %) erhalten werden. Um die Ausbeute zu steigern und ein sauberes Produkt zu erhalten, wurde die Reaktionsführung geändert. Als Schutzgruppe für die Hydroxylfunktionen wurde die Acetylgruppe ausgewählt. Ihr Vorteil ist, daß sie in hohen Ausbeuten aufgezo-gen und wieder entfernt werden kann, ohne daß die DMTr-Gruppe dadurch beeinflusst wird. Außerdem ist sie so stabil, daß nach der Mitsunobu Reaktion ein Aufreinigungsschritt durchgeführt und entstandenes Triphenylphosphinoxid abgetrennt werden kann.

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-inosin **127** wird in Pyridin und Essigsäureanhydrid gelöst und 19 Stunden gerührt. 2',3'-Di-O-acetyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-inosin **131** wird mit 93,9 % Ausbeute als weißer Schaum erhalten. Die eigentliche Schützungsreaktion der Nucleobase wird mit *p*-Nitrophenylethanol **142**, Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) **138** und Triphenylphosphin **137** durchgeführt (Abbildung 6.43). Triphenylphosphin **137** und Diisopropylazodicarboxylat **138** verbinden sich zu dem geladenen Molekül **139**. Dieses wiederum deprotoniert das Inosin **131** am Stickstoff, wodurch eine Tautomerisierung zum entsprechenden Enolat des Inosins **141** erfolgt. Das *p*-Nitrophenylethanol **142** reagiert mit **140** zu Verbindung **143** unter Freisetzung von **144**. Verbindung **143** wiederum wird vom Enolat des Inosins **141** nukleophil angegriffen, wodurch Triphenylphosphinoxid **145** abgespalten wird. Am angegriffenen Zentrum von Verbindung **143** kommt es zu einer Inversion der Konfiguration.

Das bei dieser Reaktion entstehende Triphenylphosphinoxid wird bei der Aufreinigung entfernt und 2',3'-Di-O-acetyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-6-O-(4-nitrophenylethyl)-inosin **133** mit einer Ausbeute von 78,8 % erhalten. Die anschließende Deacetylierung wird in ammoniakalischem Methanol ausgeführt und liefert nach 25 Stunden Reaktionszeit in 70,5 %iger Ausbeute 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-6-O-(4-nitrophenylethyl)-inosin **134**. Durch die Änderung der Schutzgruppentaktik wurde die Reaktionszeit zwar deutlich auf drei Tage verlängert, die Ausbeute aber auf 52 % gesteigert. Außerdem gelang es das Produkt **134** ohne Verunreinigung durch Triphenylphosphinoxid zu erhalten.

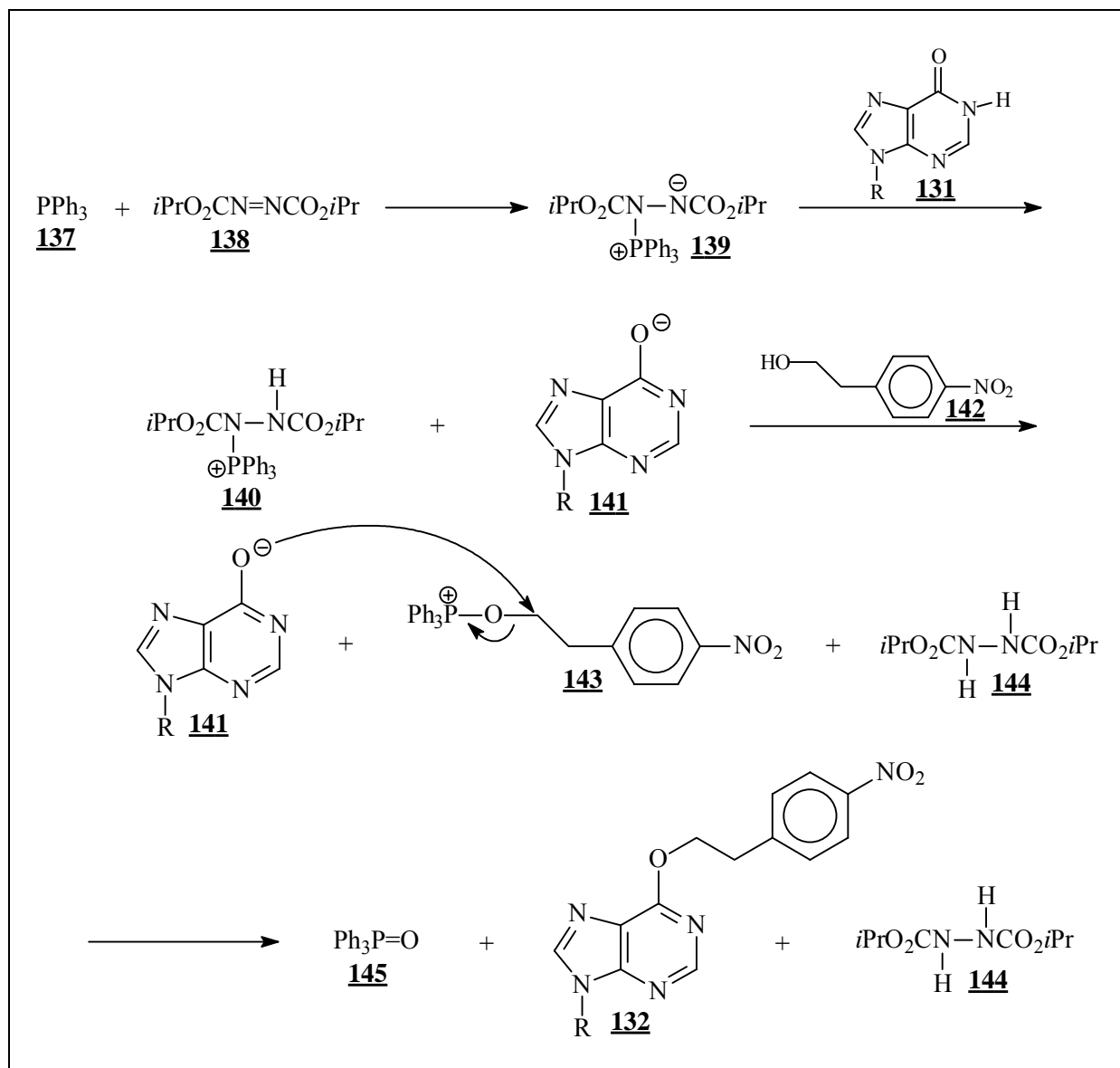


Abb. 6.43: Mechanismus der NPE-Schützung

Die Schützung der 2'-Hydroxylfunktion wird mit TBDMSCl in einem Gemisch aus Tetrahydrofuran und Pyridin in Gegenwart von Silbernitrat durchgeführt. Das Verhältnis von 2'-geschütztem Nucleosid zu 3'-geschütztem Nucleosid beträgt 1,7:1. 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-6-O-(4-nitrophenylethyl)-inosin **134** wird in 53,6 %iger Ausbeute und 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-6-O-(4-nitrophenylethyl)-inosin **135** in 32,2 %iger Ausbeute erhalten.

Die Phosphitylierung wird in Acetonitril mit *sym*-Collidin, *N*-Methylimidazol und 2-Cyanethyl-diisopropylchlorphosphoramidit **66** durchgeführt. 3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-6-O-(4-nitrophenylethyl)-inosin **136** wird als Mischung zweier Diastereomere mit einer Ausbeute von 79,0 % als weißer Schaum erhalten.

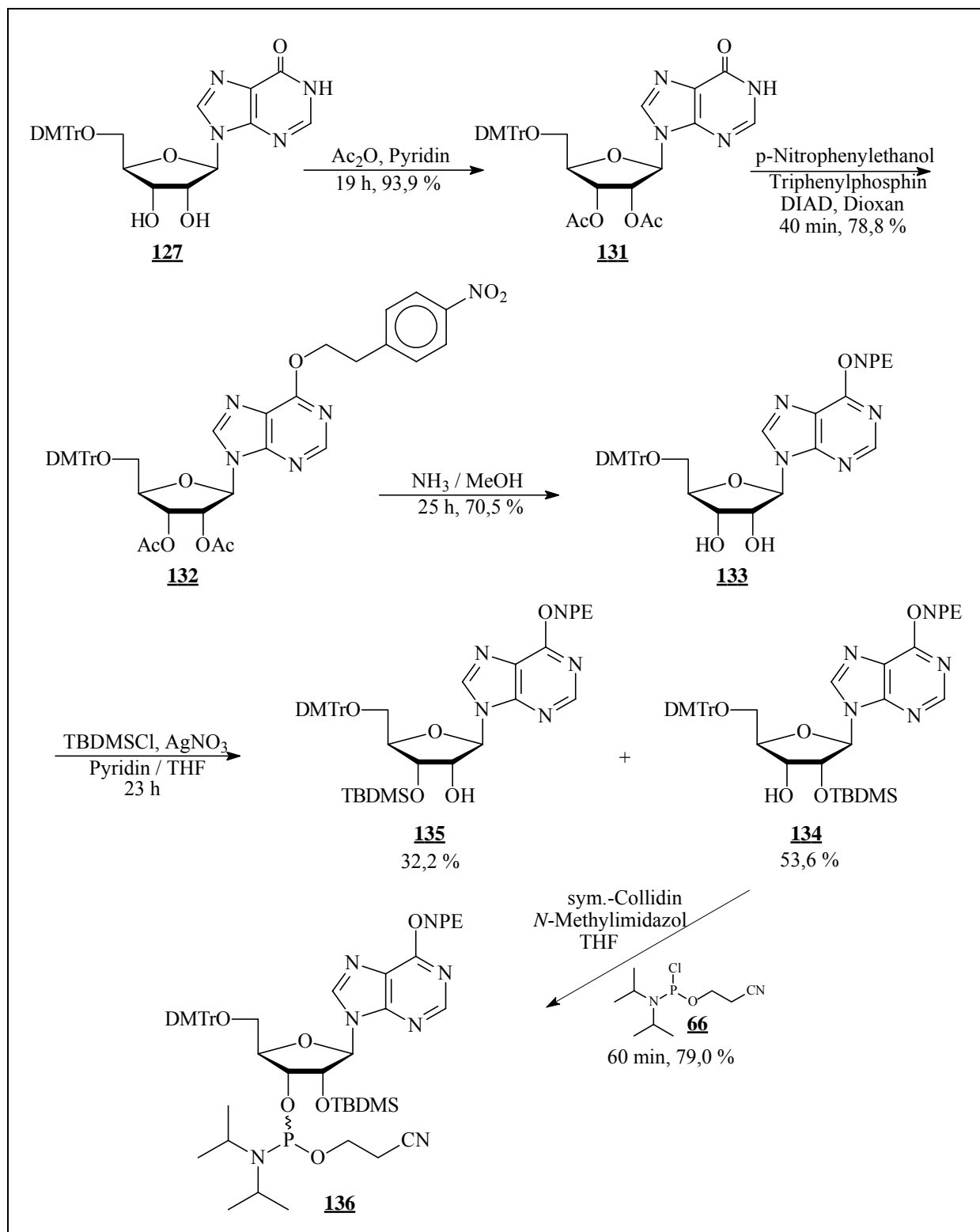


Abb. 6.44: Syntheseübersicht zu 3'-O-(2-Cyanoethoxydiisopropylphosphin)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-6-O-(4-nitrophenylethyl)-inosin **136**

6.8 Die Triisopropylsilyloxymethyl-(TOM)-Schutzgruppe

Bei der Triisopropylsilyloxymethylgruppe (TOM) handelt es sich um eine neuartige Schutzgruppe, die für die Darstellung von RNA Phosphoramiditen verwendet wird (Pitsch *et al.*, 1998). Sie weist mehrere Vorteile gegenüber der für RNA standardmäßig verwendeten TBDMS-Schutzgruppe auf. Durch die acetalische Verknüpfung der Schutzgruppe und der 2'-Hydroxylgruppe des RNA Bausteines kommt es zu keiner Wanderung der Schutzgruppe zur 3'-Hydroxylfunktion. Dieses Hauptproblem der TBDMS Gruppe tritt bei der TOM Gruppe überhaupt nicht auf, was die Ausbeuten vieler 2'-Hydroxy Schützungen von Ribonukleosiden steigert. Durch die Verknüpfung über eine sterisch kleine und flexible Methyleneinheit wird die sterische Abschirmung des 3'-O-Phosphoratoms deutlich reduziert. Dies hat zur Folge, daß bei der Oligonukleotidsynthese am Syntheseautomaten die Kupplungsausbeuten der einzelnen Nukleotide und damit des gesamten Oligonukleotids steigen. Die Kupplungsausbeuten der einzelnen Nukleotide liegen bei einer Kupplungszeit von 2 Minuten bei 99,0 bis 99,9 %. Durch den Einsatz dieser neuen Schutzgruppe werden auch längere RNA Oligonukleotide (80 bis 100 Nukleotide) chemisch synthetisierbar (Pitsch *et al.*, 1998).

Die Synthese von Triisopropylsilyloxymethylchlorid **141** ist in Abbildung 6.45 zu sehen.

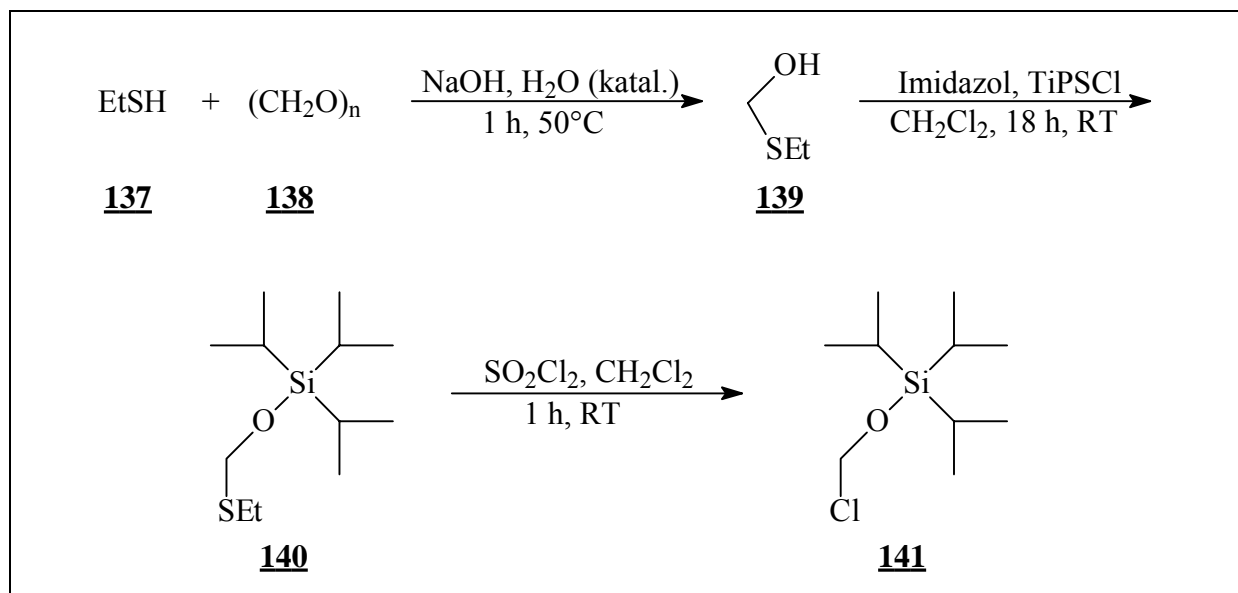


Abb. 6.45: Syntheseübersicht zu Triisopropylsilyloxymethylchlorid **141**

Ethanthiol **137** wird mit Paraformaldehyd **138** in Gegenwart von Natriumhydroxid und katalytischen Mengen Wasser zu Hydroxymethylethylthioether **139** umgesetzt. Die Hydroxylgruppe von **139** wird mit Triisopropylsilylchlorid im Gegenwart von Imidazol geschützt und anschließend durch Chlorierung von **140** mit Sulfurylchlorid

Triisopropylsilyloxymethylchlorid **141** dargestellt. Nach abschließender Destillation im Ölpumpenvakuum erhält man Triisopropylsilyloxymethylchlorid **141** mit 76,3 %iger Ausbeute als farblose Flüssigkeit.

Die Schützung der 2'-Hydroxylfunktion erfolgt durch lösen des zu schützenden Nucleosids **100** in 1,2-Dichlorethan und Zugabe von Diisopropylethylamin und Dibutylzinndichlorid.

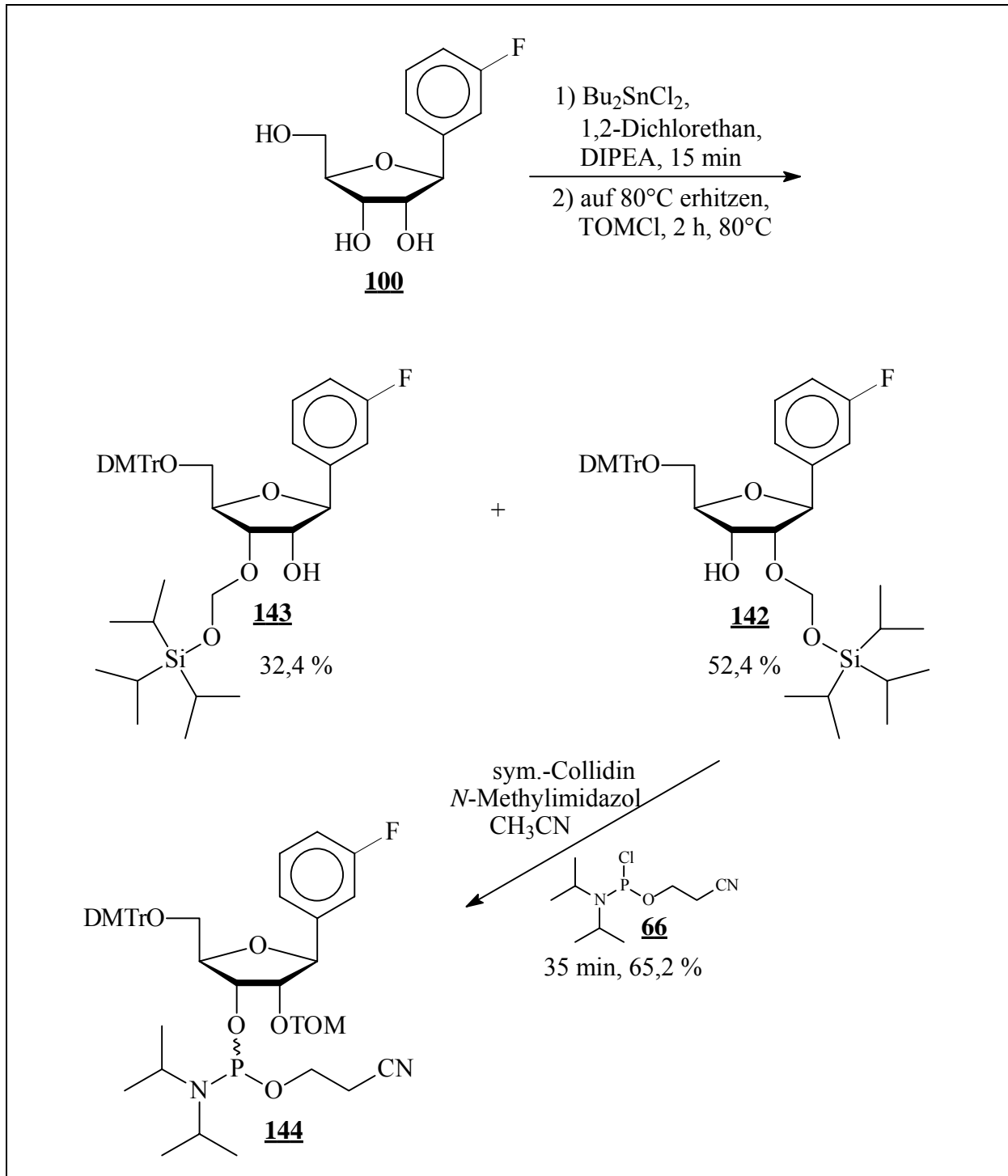


Abb. 6.46: Syntheseübersicht zu 3'-O-(2-Cyanoethoxydiisopropylphosphin)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-triisopropylsilyloxymethylsilyl-β-D-ribofuranose **144**

Anschließend wird auf 80°C erwärmt und TOMCl zugesetzt (Wu & Pitsch, 1998). Nach drei Stunden bei 80°C wird die Reaktion beendet und beide Isomere isoliert. Es wurden 52,4 % des 2'-geschützten Isomeren und 31,4 % des 3'-geschützten Isomeren erhalten (Abbildung 6.46). Zum Vergleich konnten bei der TBDMS Schützung des gleichen Bausteines nur 33,1 % des 2'-geschützten aber 42,5 % des 3'-geschützten Isomeren erhalten werden. Das Verhältnis wurde mehr als umgedreht (2':3'-TOM: 1,7 : 1; 2':3'-TBDMS: 1 : 1,3). Eine Wanderung der TOM-Schutzgruppe konnte wie erwartet nicht beobachtet werden.

Die Phosphitylierung von **142** erfolgte nach der schon beschriebenen Standardmethode und lieferte 3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-triisopropylloxymethylsilyl-1'-desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **144** in einer Ausbeute von 65,2 %.

Durch den Einsatz der Triisopropylsilyloxymethylgruppe können die Probleme, wie sie bei der Verwendung der TBDMS-Gruppe zu beobachten sind, vermieden werden. Sie bietet sich daher für zukünftige Synthesen von Phosphoramiditen der in dieser Arbeit verwendeten modifizierten RNA Bausteine an.

6.9 2-Cyanethyldiisopropylchlorphosphoramidit **66**

2-Cyanethyldiisopropylchlorphosphoramidit **66** (Sinha *et al.*, 1983) ist das Standard-Phosphitylierungsreagenz für DNA und RNA Phosphoramiditbausteine. Aufgrund von Lieferschwierigkeiten verschiedener Chemikalienanbieter konnte 2-Cyanethyldiisopropylchlorphosphoramidit **66** nicht erworben und mußte deshalb synthetisiert werden. Bei der Synthese ist auf Trockenheit aller Lösungsmittel und Reagenzien sowie auf absoluten Ausschluß von Luftfeuchtigkeit zu achten.

Die Synthese startet mit Phosphortrichlorid **145** und 3-Hydroxypropionitril **146** in absolutem Ether. Der Alkohol wird dabei langsam in einen siebenfachen Überschuß von Phosphortrichlorid eingetropt. Der Überschuß an Phosphortrichlorid kann nicht verringert werden, da es sonst zu Zweifach-Substitutionen des Alkohols an Phosphortrichlorid kommt. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wird der Ether bei einer Temperatur kleiner 40°C abdestilliert. Dabei ist es wichtig, daß schnell abdestilliert wird und die Temperatur 40°C nicht übersteigt, da sonst Zersetzungsreaktionen einsetzen. Nach dem vollständigen Entfernen des überschüssigen Phosphortrichlorids wird im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert und 2-

Cyanethoxydichlorphosphin **147** als farbloses Öl mit einer Ausbeute von 63,6 % erhalten (Abbildung 6.47).

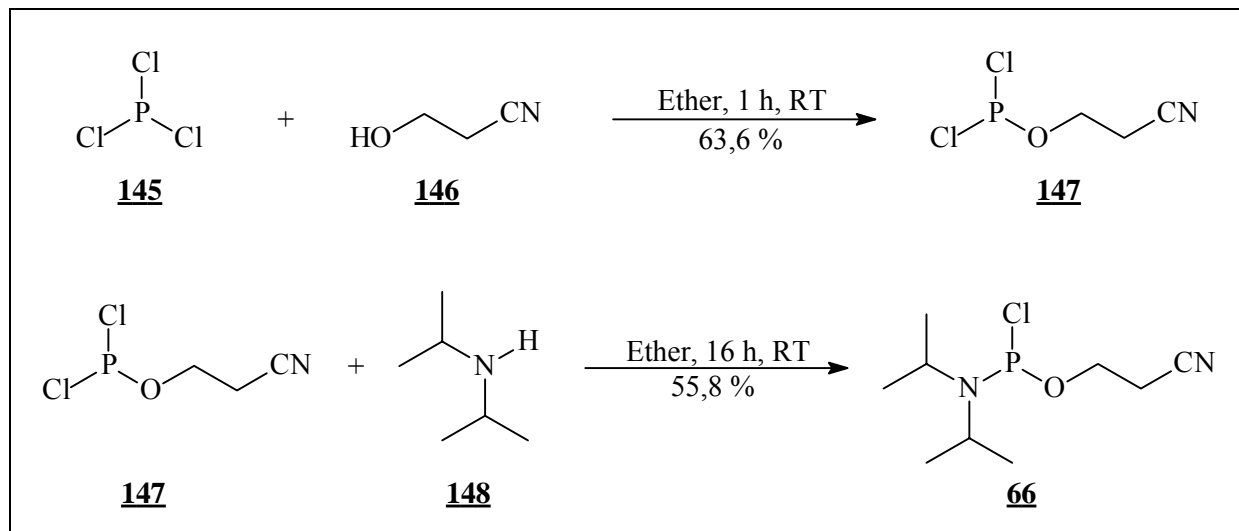


Abb. 6.47: Syntheseübersicht zu 2-Cyanoethyl-diisopropylchlorphosphoramidit **66**

2-Cyanoethoxy-dichlorphosphin **147** wird in absolutem Ether gelöst und langsam eine Mischung aus Diisopropylamin **148** in Ether zugetropft. Es ist darauf zu achten, daß die Temperatur der Reaktionslösung dabei nicht über -30°C steigt. Anschließend wird über Nacht gerührt. Der ausgefallene Niederschlag wird unter Ausschluß von Luft in einer Schlenckfritte abgetrennt und der Ether abdestilliert. Nach fraktionierter Destillation im Ölpumpenvakuum wird 2-Cyanoethyl-diisopropylchlorphosphoramidit **66** als leicht trübes Öl mit einer Ausbeute von 55,8 % erhalten.

6.10 Verteilungskoeffizienten und HPLC-Retentionszeiten

Von allen synthetisierten modifizierten Nucleosiden wurden 1-Octanol / Wasser Verteilungskoeffizienten und die HPLC-Retentionszeiten bestimmt. Dazu wurden immer die voll geschützten Nucleoside verwendet.

6.10.1 Verteilungskoeffizienten

Octanol / Wasser Verteilungskoeffizienten werden als Maß für die Lipophilie und damit für die Membrangängigkeit in biologischen Systemen angesehen (Gombar & Enslein, 1996, Leo *et al.*, 1971). Verteilungskoeffizienten werden mit $\log P$ angegeben. Je größer der Wert von $\log P$ ist, desto lipophiler sind die untersuchten Substanzen. Durch die Möglichkeit der

Betrachtung der Lipophilie eines gesamten Moleküls sind die Verteilungskoeffizienten besonders für pharmakologische Untersuchungen interessant. Aus diesem Grund werden auch verstärkt Computerprogramme entwickelt, die auch Verteilungskoeffizienten von noch nicht synthetisierten Molekülen berechnen können (Brinck *et al.*, 1993).

Für die Messungen wurden die voll entschützten Nukleoside verwendet. Um Stammlösungen zu erhalten werden die Nukleoside in Wasser gelöst. Diese Stammlösungen sollten so konzentriert sein, daß sie eine Extinktion zwischen 0,8 und 1,2 aufweisen. Aus diesen Stammlösungen werden 2 ml entnommen und mit 2 ml 1-Octanol versetzt. Beide Phasen werden anschließend 10 Minuten stark durchmischt. Je lipophiler ein Molekül ist, desto stärker wird es sich in der octanolischen Phase anreichern. Um anschließend eine möglichst komplette Phasentrennung zu erhalten, werden die Proben 10 Minuten bei 10 000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die Phasen werden vorsichtig getrennt und die Extinktion beider Phasen UV spektroskopisch vermessen. Alle Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt, um Fehler wie z.B. durch ungleichmäßige Durchmischung zu minimieren. Aus den gemessenen Extinktionen der wäßrigen und der octanolischen Phasen lassen sich die Verteilungskoeffizienten nach folgender Formel berechnen:

$$\log P = E_{\text{Octanol}} / E_{\text{Wasser}}$$

Dabei ist E_{Octanol} die gemessene Extinktion der octanolischen Phase und E_{Wasser} die Extinktion der wäßrigen Phase. Tabelle 6.4 zeigt die gemessenen Werte der einzelnen Nukleoside.

| Nukleobase der vermessenen Nukleoside (Nr. Nukleosid) | Verteilungskoeffizient $\log P$ |
|--|---------------------------------|
| Uracil (29) | 0,022 ± 0,005 |
| Hypoxanthin (31) | 0,019 ± 0,004 |
| Benzimidazol (37) | 0,152 ± 0,011 |
| 4-Fluorbenzimidazol (32) | 1,781 ± 0,062 |
| 4,6-Difluorbenzimidazol (33) | 4,235 ± 0,074 |
| Benzol (38) | 1,052 ± 0,072 |
| 4-Fluorbenzol (34) | 1,497 ± 0,005 |
| 3-Fluorbenzol (35) | 1,369 ± 0,013 |
| 2-Fluorbenzol (36) | 0,809 ± 0,014 |
| 2,4-Difluorbenzol (30) | 1,683 ± 0,002 |
| 2,4,6-Trifluorbenzol (86) | 1,391 ± 0,022 |

Tabelle 6.4: Verteilungskoeffizienten der voll entschützten Nukleoside.

Die gemessenen Verteilungskoeffizienten $\log P$ bewegen sich zwischen 0,019 für Inosin **31** und 4,235 für 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **33**. Deutlich zu erkennen ist, daß die beiden natürlichen Nucleoside Uridin **29** und Inosin **31** die hydrophilsten Verbindungen sind. Der Einfluß der Fluoratome auf die Lipophilie ist bei den Benzol- und den Benzimidazol-Nucleosiden stark unterschiedlich. Besonders stark nimmt die Lipophilie mit jedem eingeführten Fluoratom bei den Benzimidazolen zu. Während das Benzimidazol-Nucleosid **37** noch relativ hydrophil ist, steigt der Verteilungskoeffizient bei 1'-Desoxy-1'-(4-fluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **32** auf 1,781 und bei 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **33** auf den höchsten gemessenen Wert von 4,235. Der Einfluß der Position der Substitution läßt sich anhand der Fluorbenzole betrachten. Ein Fluoratom an der 4-Position des Aromaten macht das resultierende Nucleosid lipophiler (1,497; **34**) als eine Substitution an der 3-Position (1,369; **35**), die wiederum die Lipophilie des Nucleosids mehr erhöht als eine Substitution an der 2-Position (0,809; **36**). Interessanterweise erhöht sich der Verteilungskoeffizient bei Einführung eines zweiten Fluoratoms am Benzolkern im Vergleich zu den Benzimidazolen nur gering auf 1,683 (**30**) und bei Einführung eines dritten Fluoratoms nimmt er sogar wieder auf 1,391 (**86**) ab. Die Lipophilie kann somit nicht einfach durch die Anzahl der Fluoratome an der Nucleobase vorhergesagt werden, vielmehr spielt die Position der Substitution und die Grundstruktur der Nucleobase eine wichtige Rolle.

6.10.2 HPLC-Retentionszeiten

Eine weitere Methode die Lipophilie einer Substanz zu untersuchen ist die Bestimmung der HPLC-Retentionszeit (Balzarini *et al.*, 1989). Dabei macht man sich die Tatsache zunutze, daß eine Substanz auf einer Umkehrphasen (RP) HPLC Säule um so längere Retentionszeiten aufweist, je lipophiler sie ist (Lien *et al.*, 1991). Hydrophile Substanzen werden sehr schnell von diesen Säulen eluiert.

Wie schon bei den Verteilungskoeffizienten wurden für die Untersuchungen die voll entschützten Nucleoside verwendet. Als HPLC Säule wurde eine RP-18 (5 μ m) Säule der Firma Merck (LiChrospher EcoCART 125-3, Nr. 647318) benutzt. Als Elutionsmittel wurde eine konstante Konzentration von 5% Acetonitril in Wasser verwendet. Die Flußrate des Elutionsmittel betrug 0,6 ml/min. Die Retentionszeiten von Uridin **29** und Inosin **31** konnten bei diesem Elutionsmittel nicht bestimmt werden, da beide zu hydrophil für das eingesetzte

Elutionsmittel sind und nicht auf der Säule binden. Sie werden über die Säule gespült und die erhaltenen Signale entsprechen dem Einspritzsignal. Die für die modifizierten Nucleoside gemessenen Retentionszeiten sind in Tabelle 6.5 aufgeführt.

| Nucleobasen der vermessenen Nucleoside (Nr. Nucleoside) | Retentionszeiten in Minuten |
|--|-----------------------------|
| Benzimidazol (37) | 16,39 |
| 4-Fluorbenzimidazol (32) | 16,82 |
| 4,6-Difluorbenzimidazol (33) | 24,64 |
| Benzol (38) | 10,10 |
| 4-Fluorbenzol (34) | 14,95 |
| 3-Fluorbenzol (35) | 13,65 |
| 2-Fluorbenzol (36) | 12,49 |
| 2,4-Difluorbenzol (30) | 16,45 |
| 2,4,6-Trifluorbenzol (86) | 15,93 |

Tabelle 6.5: HPLC Retentionszeiten der voll geschützten Nucleoside

Die gemessenen Retentionszeiten variieren zwischen 10 und 25 Minuten. Wie schon bei den Verteilungskoeffizienten fällt auf, das 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **33** das mit Abstand lipophilste Nucleosid ist. Der Unterschied zwischen 1'-Desoxy-1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose **37** und 1'-Desoxy-1'-(4-fluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **32** ist bei den Retentionszeiten geringer als dies nach den Ergebnissen der Verteilungskoeffizienten zu erwarten gewesen wäre. Auch 1'-Desoxy-1'-(2,4,6-trifluorphenyl)- β -D-ribofuranose **86** hat eine längere Retentionszeit als erwartet. Sie ist aber kürzer als die von 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **30**. Die Reihenfolge, mit der die Monofluorbenzol-Nucleoside die HPLC Säule verlassen stimmt mit den Ergebnissen der Verteilungskoeffizienten überein. 1'-Desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **34** ist lipophiler als 1'-Desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **35**, welches wiederum lipophiler ist als 1'-Desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **36**.

Die Unterschiede in der Lipophilie der Benzol-Nucleoside lassen sich graphisch gut darstellen. Dazu wurden das Benzol- **38**, das 2-Fluorbenzol- **36**, das 3-Fluorbenzol- **35**, das 4-Fluorbenzol- **34** und das 2,4-Difluorbenzol-Nucleosid **30** in etwa gleichen Konzentrationen auf die HPLC Säule aufgetragen und eluiert. Abbildung 6.48 zeigt das erhaltene Ergebnis. Alle Nucleoside können einzeln getrennt zu den Zeiten aufgefangen werden, die auch schon aus den Einzeluntersuchungen bekannt waren.

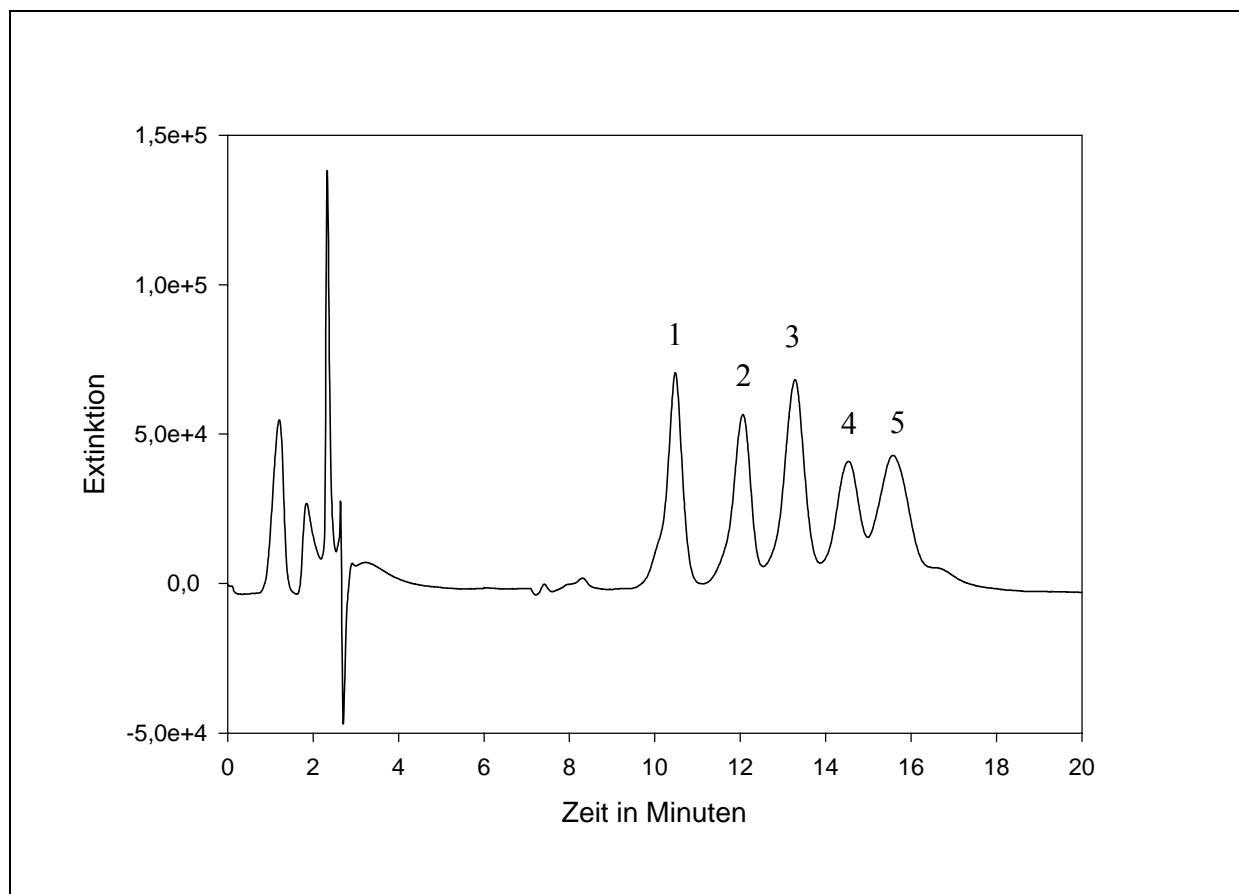


Abb. 6.48: HPLC Retentionszeiten der Benzol-Nukleoside, 1 = Benzol- **38**, 2 = 2-Fluorbenzol- **36**, 3 = 3-Fluorbenzol- **35**, 4 = 4-Fluorbenzol- **34**, 5 = 2,4-Difluorbenzol-Nukleosid **30**

Die Untersuchungen der Verteilungskoeffizienten und der HPLC Retentionszeiten der modifizierten Nukleoside ergaben gute Übereinstimmungen. Die erhaltene Reihenfolge der Stärke der Lipophilie der einzelnen Nukleoside zeigt den Einfluß der Substitutionsstelle und den der Anzahl der eingeführten Fluoratome. Eine direkte Korrelation zwischen der Anzahl der Fluoratome an der Nukleobase und der daraus resultierenden Lipophilie ist nur bedingt möglich.

7 Kristallstrukturanalysen

Die Kristallstrukturanalyse ist eine Mikroskopie mit Röntgenstrahlen (Strähle, 1990). Mit der normalen Spektroskopie lassen sich keine Atome sichtbar machen. Das dafür verwendete sichtbare Licht besitzt eine bis zu vier Zehnerpotenzen zu große Wellenlänge. Aus diesem Grund werden Röntgenstrahlen mit einer Wellenlänge von 10^{-8} cm verwendet. Häufig wird Kupfer- oder Molybdän-Strahlung mit einer Wellenlänge von λ (CuK_α) = $1,5418 \cdot 10^{-8}$ cm und λ (MoK_α) = $0,7107 \cdot 10^{-8}$ cm eingesetzt. Ein entscheidender Unterschied zwischen Röntgenstrukturanalysen und normaler Spektroskopie ist, daß die Röntgenstrahlen nach dem Durchgang durch die Probe nicht mit einer Linse oder vergleichbarer Technik wieder zu einem Bild vereinigt werden können. Die Vereinigung der gebeugten Röntgenstrahlen zum Strukturbild kann bisher nur durch einen aufwendigen Rechenprozeß, einer sogenannte Fouriertransformation, nachvollzogen werden. Die Registrierung der gebeugten Strahlen erfolgt mit Hilfe eines Film oder eines Zählrohrs.

7.1 Theoretische Grundlagen

Wird ein Kristall in einen Röntgenstrahl gebracht, so werden die Strahlen gebeugt. Wegen des geordneten Aufbaus des Kristalls kommt es zu Interferenzen, die bewirken, daß das Beugungsbild diskontinuierlich ist, d.h. daß die Beugung nur unter bestimmten Winkeln erfolgen kann. Die Vermessung des Beugungsbildes und die anschließende Fouriertransformation werden dadurch erheblich vereinfacht.

Für die Kristallstrukturanalyse werden sogenannte Einkristalle verwendet. Sie sind aus identischen kleinen Einheiten, den Elementarzellen, regelmäßig aufgebaut. Die Elementarzelle besteht aus einem bestimmten Atom bzw. einer definierten Gruppe von Atomen, die sich entsprechend der chemischen Formel der Verbindung zusammensetzen. Sie enthält sämtliche Strukturinformationen einschließlich der Symmetrie. Die Elementarzelle ist durch die Vektoren a , b und c charakterisiert. Die Beträge von a , b und c sowie die eingeschlossenen Winkel α , β und γ werden als Gitterkonstanten bezeichnet. Die Vektoren a ,

b und c sind zugleich die Basisvektoren des Kristallgitters. Berücksichtigt man die Symmetrie des jeweiligen Kristallgitters, so kann man sechs verschiedene symmetriebezogene Systeme von Basisvektoren und damit sechs verschiedene Kristallsysteme definieren. Sie heißen triklin, monoklin, orthorhombisch, tetragonal, hexagonal und kubisch (Tabelle 7.1 und Abbildung 7.1).

| Kristallsystem | Symmetriebedingte Bedingungen für die Gitterkonstanten |
|----------------|--|
| triklin | $a \neq b \neq c; \alpha \neq \beta \neq \gamma$ |
| monoklin | $a \neq b \neq c; \alpha \neq \gamma; \beta = 90^\circ$ |
| orthorhombisch | $a \neq b \neq c; \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ |
| tetragonal | $a \equiv b \neq c; \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ |
| hexagonal | $a \equiv b \neq c; \alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$ |
| kubisch | $a \equiv b \equiv c; \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ |

Tabelle 7.1: Kristallsysteme

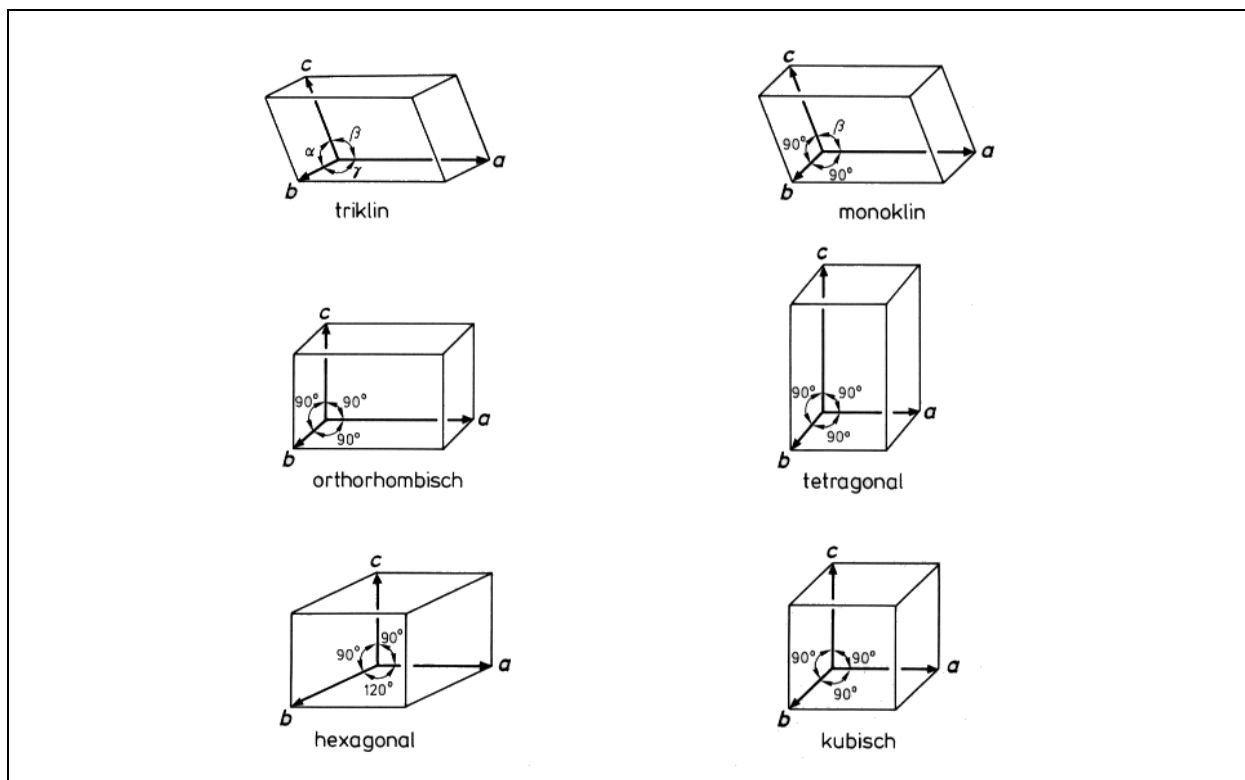


Abbildung 7.1: Kristallsysteme

Betrachtet man die Eckpunkte der Elementarzellen in einem Kristall, so liegen sie jeweils auf einer Schar paralleler Netzebenen, die untereinander den gleichen Netzebenenabstand d aufweisen. Jede Netzebenenschar ist charakterisiert durch den zugehörigen Netzebenenabstand d und durch ihre räumliche Lage, die durch die Millerschen Indices hkl

beschrieben werden. Ein Röntgenstrahl, der einen Kristall durchdringt, tritt mit den Atomen des Kristalls in Wechselwirkung, so daß jedes Atom zum Ausgangspunkt einer Kugelwelle mit unveränderter Wellenlänge wird. Die einzelnen Kugelwellen können sich überlagern oder auslöschen. Eine Auslöschung tritt auf, wenn sie nicht in Phase sind, d.h. sie einen Gangunterschied von einem ganzzahligen Vielfachen der Wellenlänge λ aufweisen. Aus diesen Überlegungen resultiert die von W.H. und W.L. Bragg 1913 aufgestellte Braggsche Gleichung (Bragg & Bragg, 1913):

$$[7-1] \quad 2 d \sin \vartheta = n \cdot \lambda$$

ϑ ist dabei der Einstrahlwinkel. (Abbildung 7.2)

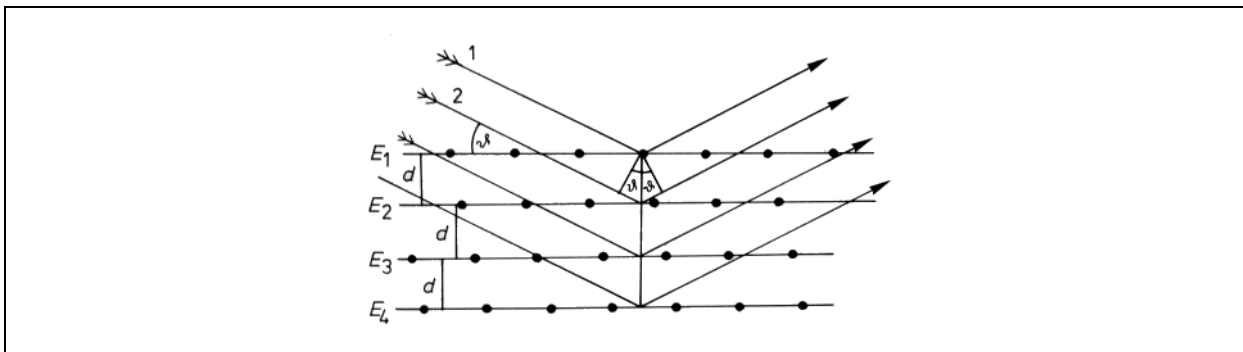


Abbildung 7.2: Braggsche Reflexionsbedingung

Um Informationen über die Orientierung der verschiedenen gebeugten Röntgenstrahlen zueinander zu erhalten, muß man berücksichtigen, daß die Netzebenenabstände d Vektoren in einem dreidimensionalen Kristallgitter sind, die durch die Basisvektoren a , b und c beschrieben werden können. Unter Berücksichtigung der Braggschen Gleichung kann der Vektor s , dessen Betrag $s = 1/d$ ist, durch folgende Vektorgleichung dargestellt werden:

$$[7-2] \quad s = h \cdot (b \times c)/V + k \cdot (c \times a)/V + l \cdot (a \times b)/V$$

hkl sind die Millerschen Indices und V das Volumen der Elementarzelle. Die Vektorprodukte $(b \times c)/V$, $(c \times a)/V$ und $(a \times b)/V$ können durch die neuen Vektoren a^* , b^* und c^* ersetzt werden. So erhält man die neue Vektorgleichung

$$[7-3] \quad s = h \cdot a^* + k \cdot b^* + l \cdot c^*$$

Die Vektoren a^* , b^* und c^* sind somit Basisvektoren, die das sogenannte reziproke Gitter aufspannen. Ihre Beträge a^* , b^* und c^* sowie die eingeschlossenen Winkel α^* , β^* und γ^* werden als Gitterkonstanten des reziproken Gitters bezeichnet.

Das reziproke Gitter stellt das Beugungsbild eines Kristalls dar. Es ist ein Punktgitter, bei dem jeder Punkt das Abbild eines an einer Netzebene eines Kristalls gebeugten Röntgenstrahls ist. Da die Netzebenen unterschiedlich mit Atomen besetzt sind, variieren die Intensitäten der einzelnen Reflexe. Das Beugungsbild eines Kristalls liefert deshalb drei fundamentale

Informationen, die getrennt voneinander ausgewertet werden können. Dies sind die Symmetrie des Beugungsbildes, die Lage der Reflexe und die Intensität der Reflexe.

Anhand der Symmetrie des Beugungsbildes kann das Kristallsystem, in dem die Verbindung kristallisiert, bestimmt werden. Bei Mitberücksichtigung der Reflexintensitäten kann zusätzlich die Raumgruppe festgelegt werden. Aus der Lage der Reflexe können die Beugungswinkel ϑ und die Gitterkonstanten des reziproken Gitters sowie mittelbar auch die Gitterkonstanten des Kristallgitters erhalten werden. Aus der Intensität der Reflexe folgt der Inhalt der Elementarzelle und damit die Struktur der Verbindung.

Um die Struktur der Verbindung erhalten zu können, muß das Beugungsbild mittels einer Fouriertransformation in das Strukturbild überführt werden. In Gleichung [7-4] ist die der Fouriertransformation zugrundeliegende Gleichung angegeben.

$$[7-4] \quad \rho_{(x,y,z)} = 1/V \cdot \sum_h \sum_k \sum_l F_{(hkl)} e^{-2\pi i \cdot (hx + ky + lz)}$$

Die Funktion ρ ist das Ergebnis der Fouriertransformation, die die Elektronendichte an allen Koordinatenpunkten xyz innerhalb der Elementarzelle angibt. F_{hkl} wird als Strukturfaktor der gebeugten Welle bezeichnet, der im Allgemeinen eine komplexe Größe ist, die durch ihren Betrag und den Phasenwinkel dargestellt werden kann. Der Betrag des Strukturfaktors kann leicht aus den Reflexintensitäten abgeleitet werden. Für die Phasenwinkel hingegen gibt es keine Meßmethode. Somit fehlt für die Durchführung der Fouriertransformation die Hälfte der erforderlichen Daten. Diese Schwierigkeit wird als Phasenproblem bezeichnet.

Zur Bestimmung der Phasen und damit der Lösung des Phasenproblems stehen zwei Lösungsansätze zur Verfügung. Dies sind die Pattersonsynthese und die sogenannten direkten Methoden.

Bei der Pattersonsynthese führt man eine Fouriertransformation durch, bei der statt der Strukturfaktoren nur deren Beträge verarbeitet werden. Als Ergebnis erhält man alle interatomaren Vektoren der Struktur. Das Bild ist deshalb meist schlecht aufgelöst und eine Chance die richtige Struktur daraus abzuleiten hat man in der Regel nur, wenn das Molekül nur sehr wenige Atome oder ein Schweratom besitzt. Kann man die Lage des Schweratoms lokalisieren, so kann man bei einer weiteren Fouriertransformation weitere Atome erkennen und so das Strukturbild schrittweise vervollständigen. Die Methode der Pattersonsynthese wird aus den genannten Gründen vor allem bei anorganischen Komplexverbindungen angewandt, da diese ein Schweratom als Zentralatom besitzen.

Bei den direkten Methoden macht man sich die Tatsache zu nutze, daß die Beträge der Strukturfaktoren und deren Phasenwinkel, sowie die Phasenwinkel untereinander nicht völlig

unabhängig sind. Mit Hilfe von Wahrscheinlichkeitsbeziehungen können Aussagen über einen Teil der Phasenwinkel gemacht werden. In den meisten Fällen bekommt man so einen ausreichenden Satz von Phasenwinkeln, mit dem dann eine Fouriertransformation durchgeführt und das Strukturbild erhalten werden kann. Die einzige Voraussetzung für die direkten Methoden ist die Annahme, daß die Elektronendichte niemals negativ sein kann und daß die Elektronendichte auf kugelförmige Atome konzentriert ist, deren Anzahl und Art pro Elementarzelle bekannt ist.

7.2 Kristallstrukturanalysen der Fluorbenzol-Nukleoside

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen von allen Fluorbenzol-Nukleosiden Einkristalle und daraus Kristallstrukturen zu erhalten. Die Kristallstruktur des Benzol-Nukleosids 1'-Desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose **38** ist bereits von Matulic-Adamic und Mitarbeitern veröffentlicht worden (Matulic-Adamic *et al.*, 1996). Die Kristalle wurden aus Wasser oder aus Methanol bei Raumtemperatur erhalten. Ein Kristall bildet die Ausnahme, er wurde bei 4°C aus Methanol gezüchtet. Die vollständigen Datensätze der Röntgenstrukturanalysen befinden sich in Kapitel 13 Teil A.

In Tabelle 7.2 sind die Kristalldaten der C-Nukleoside einschließlich des von Matulic-Adamic und Mitarbeitern kristallisierten 1'-Desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose **38** zusammengefaßt. Alle erhaltenen Kristalle sind entweder in einem orthorhombischen oder in einem monoklinen Kristallsystem kristallisiert. Die Kristalle weisen immer eine hydrophile Schicht aus durch Wasserstoffbrücken verbundenen Zuckern und eine lipophile Schicht aus den Fluoraromaten auf. Von 1'-Desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **34** konnten drei verschiedene Kristalle erhalten werden. Die Kristallform und der daraus resultierenden F...H Abstand sind vom Lösungsmittel und der Temperatur während der Kristallisation abhängig. Der aus Wasser erhaltene Kristall enthält pro Nukleosid ein halbes Wassermolekül. Es handelt sich somit um ein Hemihydrat. Die F...H Abstände zwischen dem Fluoratom und einem Wasserstoffatom, welches sich in *ortho*-Position zu einem Fluoratom eines im Kristall gegenüberliegenden Moleküls befindet, variiert zwischen 230 pm bei dem Kristall aus Methanol bei 20°C und 242 pm bei dem Kristall aus Methanol bei 4°C. Aufgrund der veränderten Zuckerkonformation kommt es zu einer Aufweitung des F...H Abstandes. Auch der Einbau eines Wassermoleküls in die Kristallstruktur, wie es bei dem Hemihydrat der Fall ist, weitet den F...H Abstand auf 238 pm auf. Die gemessenen F...H Abstände sind deutlich kürzer als die Summe der van-der-

Waals Radien von Fluor und Wasserstoff mit 255 pm. Somit kann von F...H Wasserstoffbrücken gesprochen werden. Bedingt durch die F...H Wasserstoffbrücke wird die Orientierung der Nucleoside zueinander verändert.

| Nukleobase der Nucleoside (Nr. Nucleosid) | kristallisiert aus | Temperatur | Kristallsystem | Raumgruppe | Zuckerkonformation |
|---|----------------------|------------|----------------|--|--|
| Benzol (38) | Toluol / Ethylacetat | -18°C | monoklin | P 2 ₁ | C2'endo |
| 4-Fluorbenzol (34) | Methanol | 20°C | orthorhombisch | P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ | C1'exo C2'endo |
| 4-Fluorbenzol (34) | Methanol | 4°C | orthorhombisch | P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ | zwischen C2'endo und C2'endo C3'exo |
| 4-Fluorbenzol (34) | Wasser | 20°C | monoklin | C 2 | zwischen C2'endo und C1'exo C2'endo |
| 3-Fluorbenzol (35) | Methanol | 20°C | monoklin | P 2 ₁ | C2'endo C3'exo |
| 2-Fluorbenzol (36) | Methanol | 20°C | monoklin | C 2 | C2'endo |
| 2,4-Difluorbenzol (30) | Wasser | 20°C | monoklin | C 2 | C2'exo C3'endo |
| 2,4,6-Trifluorbenzol (86) | Wasser | 20°C | orthorhombisch | P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ | C2'endo |

Tabelle 7.2: Kristalldaten der C-Nucleoside

Kristallpackungen von aromatischen Systemen sollten eine Fischgräten-Struktur aufweisen, wie dies bei 1'-Desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose **38** der Fall ist (Abbildung 7.3 a). Die Kristallpackungen von 1'-Desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **34** weisen alle keine Fischgräten-Struktur auf. Durch die F...H Wasserstoffbrücke kommt es zu einer gegenüberliegenden Orientierung der Nucleoside (Abbildung 7.3 b). Die F...H Wasserstoffbrücken ziehen sich wie ein Netz durch den Kristall. Dies ist in Abbildung 7.4 verdeutlicht. Die gestrichelten Linien sollen dabei die Wasserstoffbrücken symbolisieren.

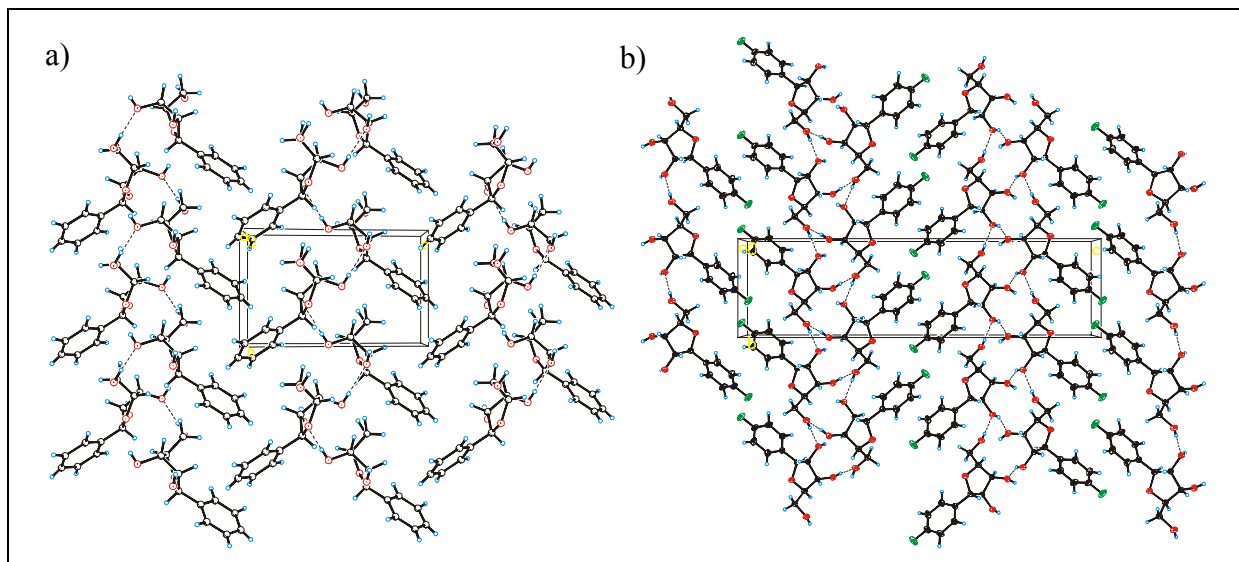


Abbildung 7.3: a) Kristallpackung von 1'-Desoxy-1'-phenyl-β-D-ribofuranose **38**, b) Kristallpackung von 1'-Desoxy-1'-(4-fluorphenyl)-β-D-ribofuranose **34** kristallisiert aus Methanol bei 20°C

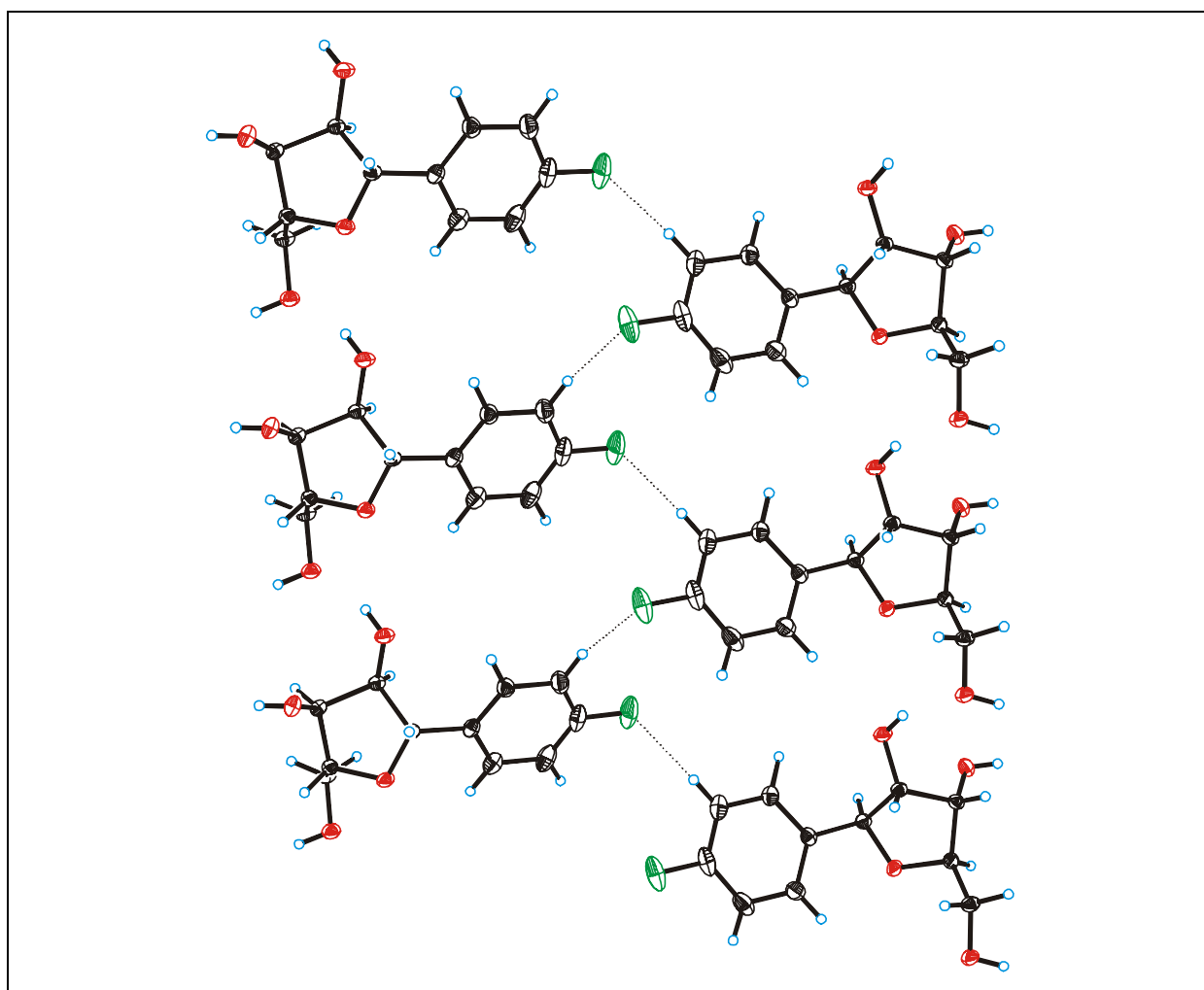


Abb. 7.4: F...H Wasserstoffbrücken im Kristall von 1'-Desoxy-1'-(4-fluorphenyl)-β-D-ribofuranose **34** kristallisiert aus Methanol bei 20°C

Diese Orientierung der Moleküle zueinander kann nicht nur in den Kristallen von 1'-Desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **34** beobachtet werden. Auch in den Kristallpackungen von 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **30** (Abbildung 7.5 a) und 1'-Desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **36** (Abbildung 7.5 b) ist dieses Orientierungsmuster zu erkennen.

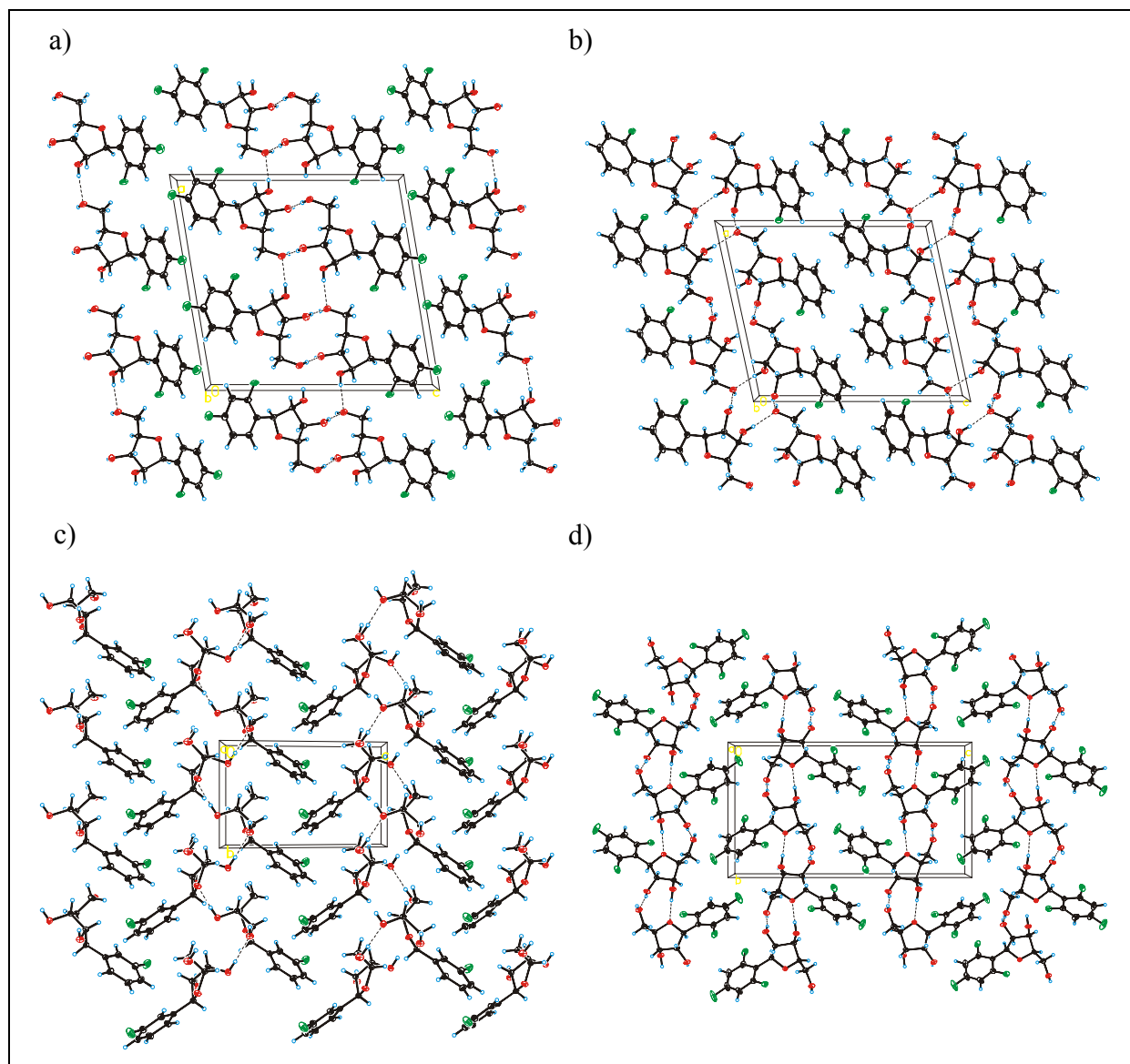


Abbildung 7.5: Kristallpackungen von a) 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **30**, b) 1'-Desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **36**, c) 1'-Desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **35** und d) 1'-Desoxy-1'-(2,4,6-trifluorphenyl)- β -D-ribofuranose **86**

Zu der oben beschriebenen F \cdots H Wasserstoffbrücke kommt beim Difluorbenzol-Nukleosid **30** noch eine schwache F \cdots H Wechselwirkung zwischen dem Fluor am C2 Kohlenstoff der Nucleobase und einem Wasserstoff an C5' hinzu, die die Orientierung der Moleküle

zueinander weiter stabilisiert. Im Fall von 1'-Desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **36** reicht diese Wechselwirkung allein sogar aus, um diese Orientierung der Moleküle zueinander zu stabilisieren und es nicht zu einer Ausbildung einer Fischgräten-Struktur kommen zu lassen.

Die Kristallpackung von 1'-Desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **35** (Abbildung 7.5 c) weist hingegen eine Fischgräten Struktur auf, da das Fluor am C3 Kohlenstoff der Nukleobase keine Wechselwirkungen mit Wasserstoffatomen gegenüberliegender Moleküle oder Wasserstoffatomen des Zuckers ausbilden kann.

Die Kristallpackung von 1'-Desoxy-1'-(2,4,6-trifluorphenyl)- β -D-ribofuranose **86** weist eine gänzlich andere Struktur auf (Abbildung 7.5 d). Bei allen anderen Kristallpackungen bestehen sowohl die hydrophile als auch die lipophile Schicht aus jeweils zwei Untereinheiten. Das bedeutet, daß immer zwei Zucker-Untereinheiten bzw. zwei aromatische Nukleobasen eine Schicht bilden. Bei 1'-Desoxy-1'-(2,4,6-trifluorphenyl)- β -D-ribofuranose **86** besteht jede dieser Schichten nur aus einer Untereinheit. Die hydrophile Schicht besteht nur aus einer Zucker-Untereinheit, die lipophile Schicht nur aus einer aromatischen Nukleobase. Die Orientierung der Nukleobasen zueinander ist aufgehoben. Statt dessen nehmen die Nukleobasen eine Orientierung ein, wie sie von Molekülen mit starken Basenstapelungswechselwirkungen bekannt ist. Es ist davon auszugehen, daß die Einführung eines dritten Fluoratoms an den aromatischen Ring die Möglichkeit stabile Basenstapelungswechselwirkungen auszubilden so weit erhöht, daß diese strukturbestimmenden Kräfte über etwaige strukturbestimmende F...H Wasserstoffbrücken dominieren.

Zusammenfassend läßt sich über die erhaltenen Kristallstrukturen sagen, daß die Grundstruktur durch O...H Wasserstoffbrücken und den hydrophilen – lipophilen Aufbau der Nukleoside dominiert wird. Wenn Fluor durch seine Position an der aromatischen Nukleobase aber in der Lage ist F...H Wasserstoffbrücken auszubilden, so sind diese doch stark genug, um die resultierende Kristallpackung fundamental zu verändern. Immer wenn Fluor eine Wasserstoffbrücke eingeht kommt es nicht zu der erwarteten Fischgräten-Struktur, sondern zu einer Orientierung der Nukleobasen zueinander. Die gemessenen F...H Wasserstoffbrücken gehören zu den stärksten ihrer Art, d.h. sie weisen mit die kürzesten bekannten F...H Abstände auf. In Abbildung 7.6 ist das von Thalladi und Mitarbeitern (Thalladi *et al.*, 1998) gefundene Ergebnis einer Suche in der Cambridge Structural Database für F...H Abstände und Winkel von Wasserstoffbrücken des Typs $C_{sp^2}\text{-F}\cdots\text{H-C}_{sp^2}$ zu sehen. Die in dieser Arbeit untersuchten Moleküle sind als rote Kreise in der Abbildung hinzugefügt.

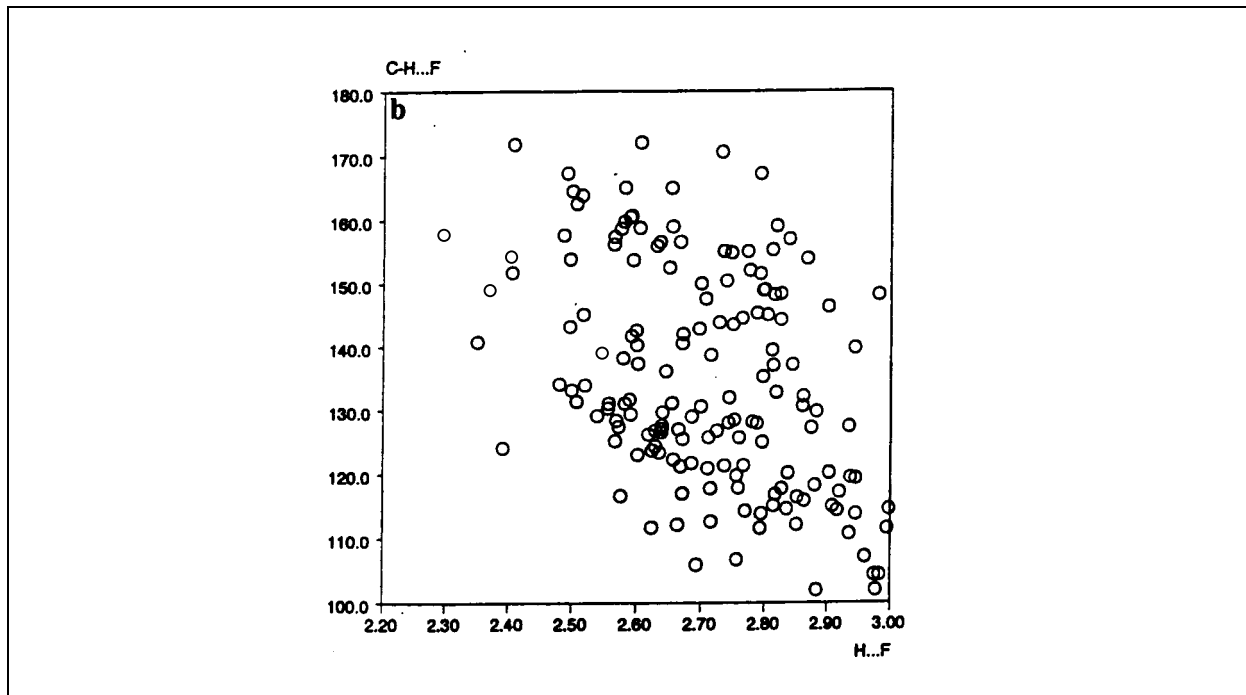


Abb. 7.6: F...H Abstände und Winkel von Wasserstoffbrücken des Typs $C_{sp^2}\text{-F}\cdots\text{H-C}_{sp^2}$ (Thalladi *et al.*, 1998) ergänzt mit den in dieser Arbeit gefunden Werten (rote Kreise)

Mit 230 pm ist der F...H Abstand bei 1'-Desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **34**, kristallisiert aus Methanol bei 20°C, sogar der kürzeste bisher in der Literatur bekannte F...H Abstand des Typs $C_{sp^2}\text{-F}\cdots\text{H-C}_{sp^2}$.

8 Oligonukleotide

8.1 Synthese von Oligonukleotiden

Oligonukleotide sind langkettige Moleküle, die aus einer beliebigen Abfolge von Nukleotiden aufgebaut sind. Der chemische Aufbau von Oligonukleotiden erfolgt durch sich wiederholende Kondensation einzelner Nukleotide, bis die gewünschte Länge und Sequenz des zu synthetisierenden Oligonukleotidstranges erreicht ist. Es spielt dabei keine Rolle, ob DNA- oder RNA- Oligonukleotide aufgebaut werden sollen. Die Reaktionsbedingungen unterscheiden sich lediglich in der Reaktionszeit der Kupplungsreaktion und in den eingesetzten Nukleotiden. Die Verknüpfung der einzelnen Monomerbausteine erfolgt in 3'→5'-Richtung.

In den siebziger Jahren entwickelte Letsinger die Festphasensynthese von Oligonukleotiden (Letsinger *et al.*, 1975; Letsinger *et al.*, 1976). Er konnte dabei auf die Ergebnisse von Merrifield (Merrifield, 1963), der die Festphasensynthese für Polypeptide entwickelte, zurückgreifen. Die Festphasensynthese von Oligonukleotiden bietet im Vergleich zur Synthese in Lösung eine Reihe von Vorteilen. Ein Oligonukleotid kann in deutlich kürzerer Zeit aufgebaut werden, da erst nach Abschluß der Synthese und nicht nach jedem Syntheseschritt aufgereinigt werden muß. Die Ausbeuten der einzelnen Reaktionen können durch Verwendung großer Reagenzienüberschüsse gesteigert und die Reagenzien nach jeder Reaktion durch einfache Waschschrte entfernt werden. Schließlich ist der Syntheseprozess automatisierbar und die gleichzeitige Synthese von mehreren Oligonukleotiden an einem Syntheseautomaten durchführbar.

Die für die Festphasensynthese eingesetzten Nukleotide müssen bei den verwendeten Reaktionsbedingungen entsprechend an der Nukleobase und an den Hydroxylgruppen, die bei der aktuellen Reaktion nicht benötigt werden, geschützt sein, um Nebenreaktionen zu vermeiden. Als Methode für die automatisierten Festphasensynthese hat sich heutzutage die Phosphoramidit-Methode durchgesetzt (Beaucage & Caruthers, 1981; Sinha *et al.*, 1983; Eckstein, 1991). Dennoch werden anschließend auch die anderen noch vereinzelt verwendeten Methoden vorgestellt.

8.1.1 Phosphordiester-Methode

Die Phosphordiester-Methode wurde von Khorana und Mitarbeitern in den sechziger und siebziger Jahren entwickelt (Abbildung 8.1). Dabei werden 5'-geschützte Nucleotide mit 3'-geschützten 5'-Phosphormonoestern in Gegenwart des Kupplungsreagenzes Triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid gekuppelt. Das Kupplungsreagenz aktiviert den Phosphorsäuremonoester über einen komplexen Reaktionsmechanismus und macht daraus ein sehr reaktives Phosphorylierungsreagenz. Durch die Kupplung der beiden Bausteine entsteht eine Phosphordiesterbindung. Ein großer Nachteil dieser Reaktion ist, daß die resultierende Phosphordiesterbindung von einem weiteren aktivierten Monomer angegriffen werden kann und vernetzte Oligonukleotide entstehen. Dadurch werden die Ausbeuten an linearen Oligonukleotiden merklich reduziert und die Aufreinigung des Produktes erheblich erschwert. Aus diesem Grund besitzt diese Methode heutzutage keine Bedeutung mehr für die Oligonukleotid-Synthese.

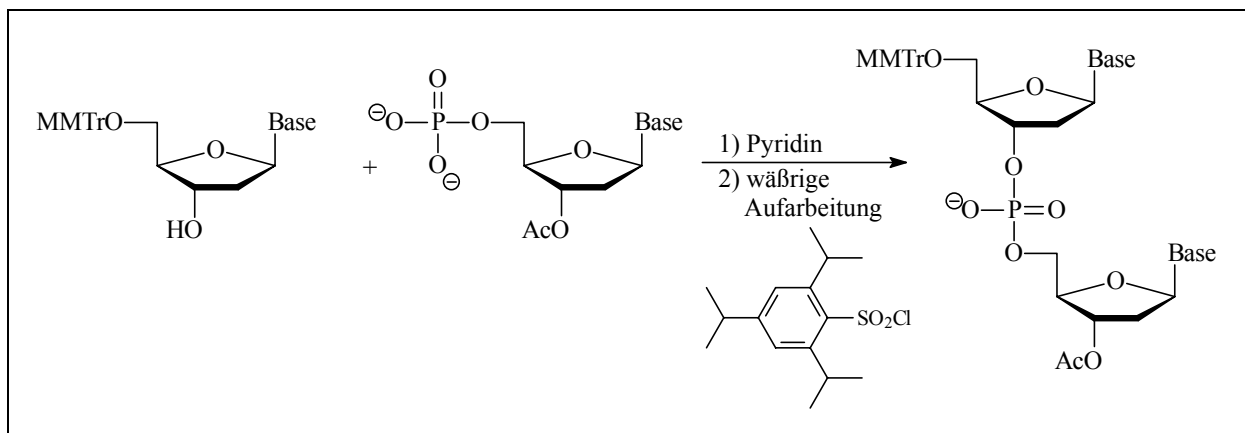


Abb. 8.1: Phosphordiester-Methode

8.1.2 Phosphortriester-Methode

Anfang der achtziger Jahre wurde die Phosphortriester-Methode (Abbildung 8.2), eine Weiterentwicklung der Phosphordiester-Methode, nicht nur in Lösung, sondern auch an fester Phase eingesetzt (Narang *et al.*, 1980). Die am Phosphor eingeführte Chlorphenyl-Schutzgruppe verhindert nach der Bildung des Phosphortriesters eine weitere Reaktion eines aktivierten Monomers mit dem Phosphortriester. Dadurch werden Nebenreaktionen stark reduziert und die Ausbeuten an linearem Oligonukleotid deutlich erhöht. Das Monophosphat wird durch Mesitylsulphonyl-3-nitro-1,2,4-triazol aktiviert. Durch den Aktivator kann es

allerdings auch zur Sulfonierung der 5'-Hydroxylgruppe kommen. Dadurch werden die Kupplungsausbeuten auf 97-98% reduziert. Auch eine Phosphorylierung an O6 des Guanins kann beobachtet werden. Durch diese Phosphorylierung treten wie bei der Phosphordiester-Methode Kettenverzweigungen als Nebenprodukte auf.

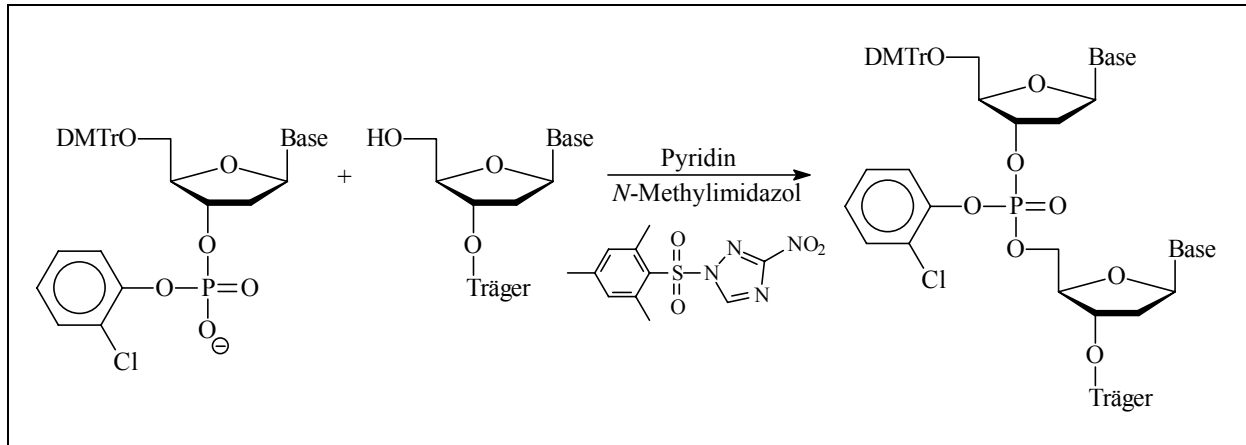


Abb. 8.2: Phosphortriester-Methode

8.1.3 H-Phosphonat-Methode

Bei der H-Phosphonat-Methode (Garegg *et al.*, 1986) erfolgt die Kupplung eines 3'-Monophosphates mit der 5'-Hydroxylgruppe eines an fester Phase hängenden Nucleotides (Abbildung 8.3).

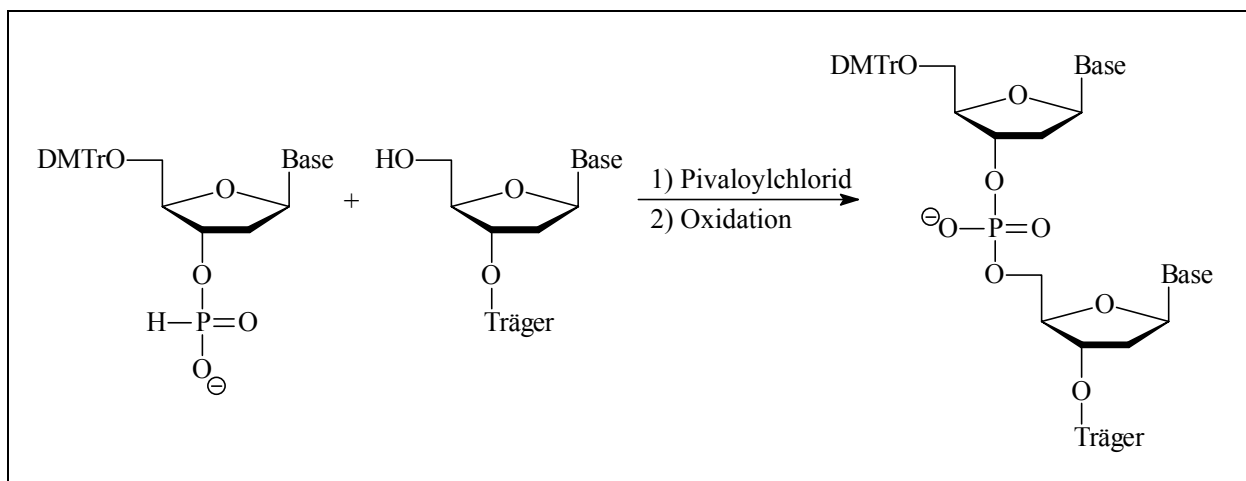


Abb. 8.3: H-Phosphonat-Methode

Die Aktivierung des Monophosphates erfolgt mit Pivaloylchlorid. Der resultierende H-Phosphonatediester ist relativ inert gegen weitere Phosphorylierungen. Dadurch ist es nicht nötig nach jedem Kupplungsschritt zu oxidieren. Die Oxidation kann am Ende der Reaktion

für alle Phosphorzentren gleichzeitig durchgeführt werden. Durch die Verwendung anderer Oxidationsmittel als Iodwasser ist es sogar möglich z.B. mit Schwefel Thioate zu erzeugen. Die Kupplungsausbeuten der H-Phosponat-Methode sind allerdings schlechter als bei der Phosphoramidit-Methode.

8.1.4 Phosphoramidit-Methode

Die wichtigste Methode zur Herstellung von Oligonukleotiden durch automatisierte Festphasensynthese ist heute die Phosphoramiditmethode (Phosphit-Triester-Methode) (Beaucage & Caruthers, 1981; Sinha *et al.*, 1983; McBride & Caruthers, 1983; Gait, 1984; Caruthers, 1985; Caruthers *et al.*, 1987; Eckstein, 1991; Beaucage & Iyer, 1992; Beaucage & Iyer, 1993). Dabei wird ein entsprechend geschütztes Nucleosidphosphoramidit in Gegenwart eines Aktivators (meist 1H-Tetrazol) mit der 5'-Hydroxylfunktion eines trägergebundenen Nucleosids zu einem Phosphitriester umgesetzt. Die nach jedem Kupplungsschritt durchgeführte Oxidation liefert den Phosphatriester (Abbildung 8.4). Durch die Aktivierung mit Tetrazol wird der Amiditbaustein zu einer sehr reaktiven Spezies, die zu so gut wie keinen Nebenreaktionen neigt.

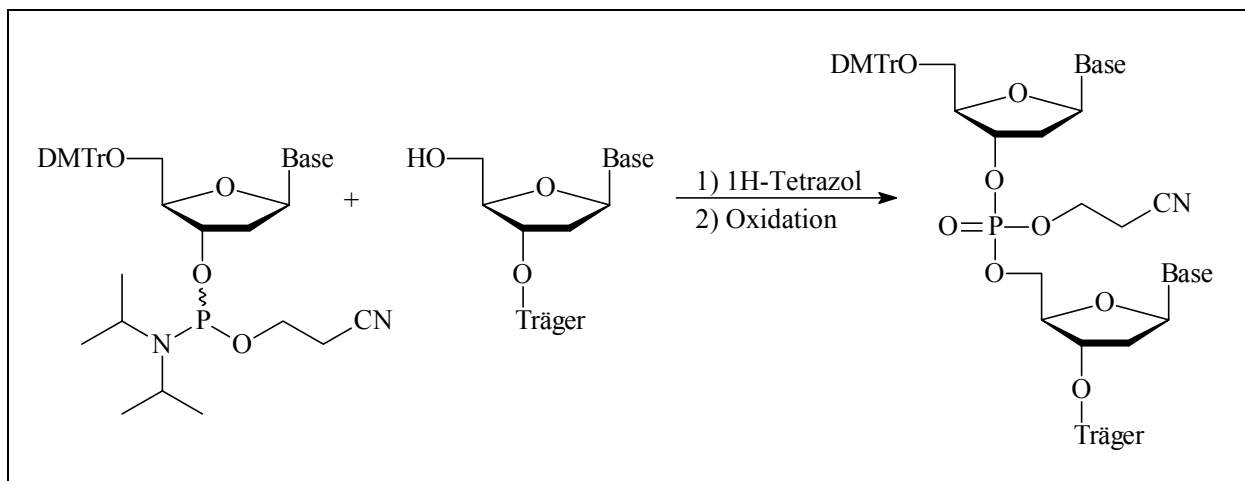


Abb. 8.4: Phosphoramidit-Methode

Der Synthesekreis der Phosphoramidit-Festphasenmethode ist in Abb. 8.5 am Beispiel einer RNA-Synthese dargestellt. Als Startnucleosid kann ein beliebiges 5'-Dimethoxytrityl-geschütztes Nucleosid, das über seine 3'-Hydroxylfunktion mittels eines Spacers (meist ein Succinyllinker) an einen festen Träger gebunden ist, verwendet werden. In den meisten Fällen handelt es sich bei dem festen Träger um Glaskügelchen definierter Porengröße, das

sogenannte controlled-pore-glass (CPG). Die polymere Matrix ist im verwendeten Lösungsmittel unlöslich und inert.

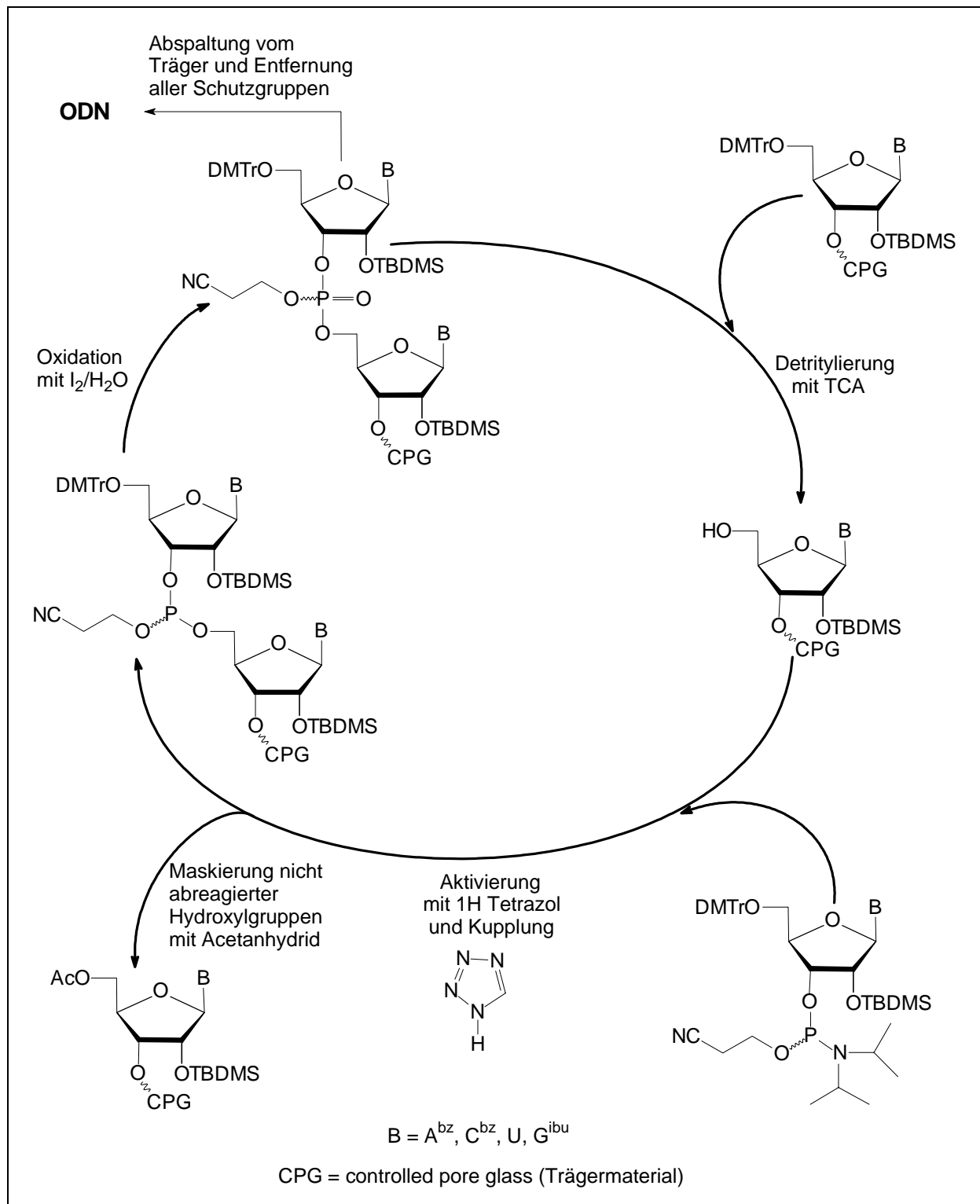


Abb. 8.5: Synthesesyklus der Phosphoramidit-Methode

Funktionelle Gruppen (Aminofunktionen) am polymeren Träger ermöglichen die kovalente Anknüpfung des Startnucleosids. Die wesentlichen Schritte des Synthesesyklus sind:

- Abspaltung der 5'-Dimethoxytritylgruppe mit 3 %iger Trichloressigsäure in Methylenchlorid
- Aktivierung des zu kuppelnden Amidits mit 1H-Tetrazol in Acetonitril
- Kupplung
- Maskierung der nicht abreagierten 5'-OH-Funktionen mit Acetanhydrid/2,6-Lutidin/THF und 1-Methylimidazol in THF, das sogenannte „capping“
- Oxidation des Phosphits zum Phosphat mit Iod in Wasser/Pyridin/THF
- Beginn eines neuen Zyklus

Nach der kompletten Synthese erfolgt die Abspaltung des Oligonukleotides vom Träger und die Entfernung der Schutzgruppen mit konz. Ammoniaklösung.

Zwischen jedem Schritt des Synthesesyklus wird ein Waschschriff mit Acetonitril durchgeführt. Die exozyklischen Aminofunktionen der Nucleobasen sind standardmäßig mit Acylschutzgruppen wie Benzoyl (für A und C) bzw. Isobutyryl (für G) geschützt. Seit geraumer Zeit wird auch die *tac*-Schutzgruppe (*tac* = *tert.*-Butylphenoxyacetyl) verwendet. Sie bietet den Vorteil, daß sie deutlich schneller abgespalten werden kann (ca. 3 Stunden). Diese Gruppen werden postsynthetisch, zusammen mit der β -Cyanethylschutzgruppe am Phosphor, durch Behandlung mit Ammoniaklösung bei 55°C über Nacht abgespalten.

Der Mechanismus der 1H-Tetrazol-katalysierten Phosphoramiditkupplung ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird angenommen, daß das Tetrazol zunächst als Säure wirkt und das Nucleosid am Phosphor oder am Stickstoff protoniert. Das resultierende Kation reagiert mit einem zweiten Tetrazol-Molekül zum Tetrazolid. Das ist die reaktive Spezies, die mit der primären 5'-OH-Gruppe des trägergebundenen Bausteins reagiert. Nach diesem von Dahl und Mitarbeitern (Dahl *et al.*, 1987) postulierten Mechanismus ist das Tetrazol sowohl ein saurer- als auch ein nucleophiler Katalysator. ³¹P-NMR Untersuchungen von Berner (Berner *et al.*, 1989) bestätigen diesen Mechanismus.

8.2 Synthetisierte Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit synthetisierten Oligonukleotide wurden nach der Phosphoramidit-Methode im 1 μ mol Maßstab an Syntheseautomaten der Firmen Eppendorf Biotronik (Modell D300+) bzw. PerSeptive Biosystems (Modell Expedite 8905) hergestellt. Es wurden vorgefertigte Säulen von PerSeptive Biosystems mit CPG-Trägermaterial, die das erste Nucleosid tragen, eingesetzt. Die Standardnucleosidphosphoramidite und die übrigen

Synthesechemikalien sind kommerziell erhältlich (siehe Chemikalienliste, Kapitel 11.1.6). Die Standardkupplungszeit von 10 Minuten für RNA-Bausteine wurde für alle modifizierten Nukleotide übernommen. Bei allen Oligonukleotiden wurde bei der Synthese die finale Dimethoxytriphenylmethylgruppe abgespalten. Für die beiden Syntheser wurden die modellspezifischen Syntheseprotokolle übernommen. Die Kupplungsausbeuten der modifizierten Nukleoside waren mit Ausnahme von 3'-*O*-(2-Cyanoethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose **77**, daß deutlich schlechter kuppelte, mit denen der Standardamidite vergleichbar. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die modifizierten Nukleoside, die alle in RNA eingebaut wurden, mit den in Abbildung 8.6 aufgeführten Abkürzungen versehen. Es handelt sich dabei um Einbuchstaben Abkürzungen, die das jeweilige Nukleotid in einem RNA Strang symbolisieren.

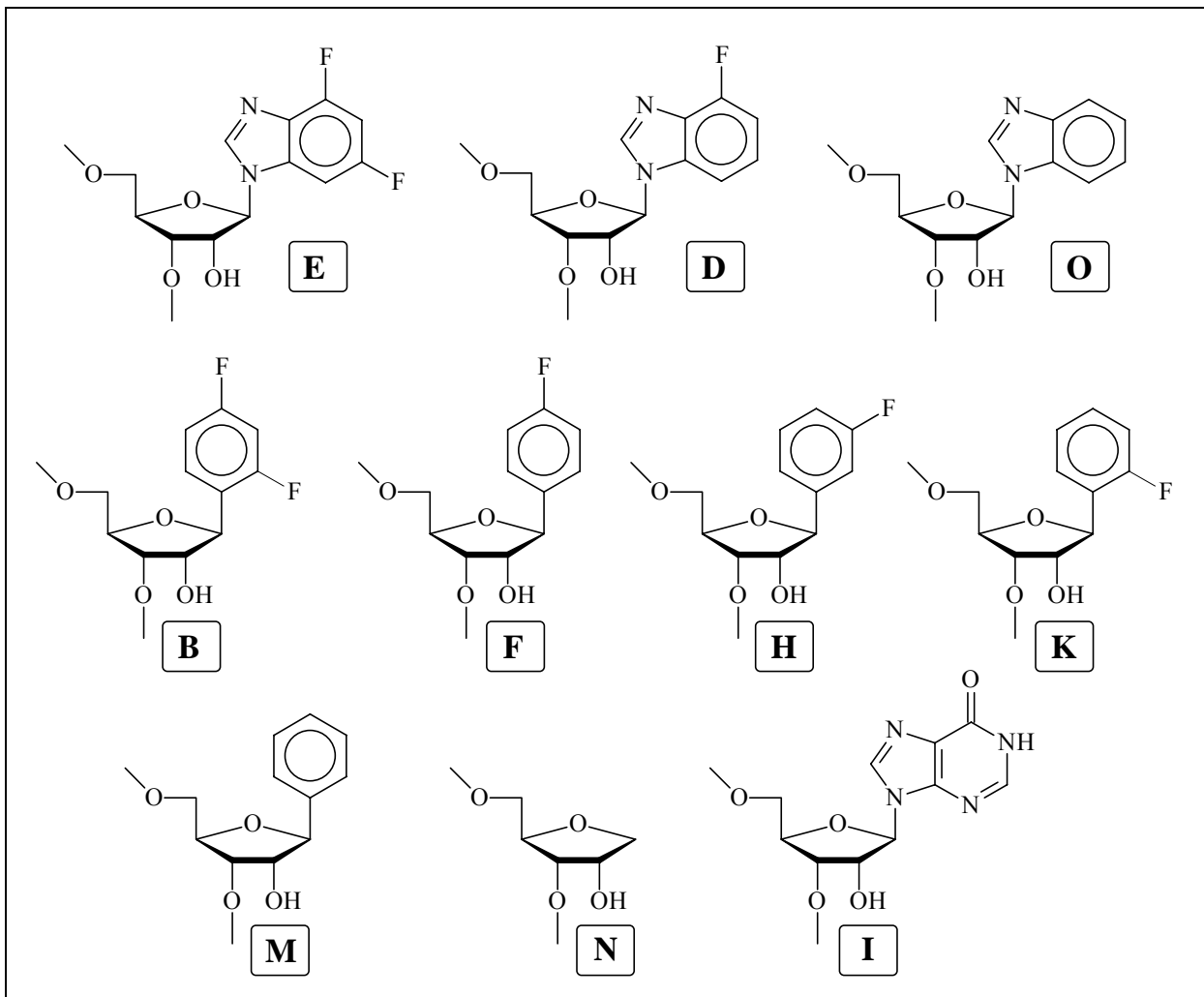


Abb. 8.6: Verwendete Abkürzungen für die in RNA eingebauten modifizierten Nukleotide

In dieser Arbeit wurden nur RNA Oligonukleotide untersucht, die Duplexe bilden können. Es wurden ein Adenosin-reicher Strang und ein Uridin-reicher Gegenstrang synthetisiert. Alle

anderen Stränge gleichen diesen beiden in ihrer Sequenz mit Ausnahme der in der Mitte der Stränge befindlichen Stelle für den Einbau der modifizierten Nukleotide (**S 1** bis **S 20**; Tabelle 8.1). Schließlich wurden noch sechs Stränge mit jeweils 3 modifizierten Nukleotiden in zusammenhängender (**S 21**, **S 23** und **S 24**) bzw. alternierender Anordnung (**S22**, **S25** und **S 26**; Tabelle 8.2) und zwei 13mer Oligonukleotide (**S 27** & **S 28**) für Untersuchungen der Basenstapelungswechselwirkungen (Tabelle 8.3) synthetisiert.

| Uridin reiche Stränge | | Adenosin reiche Stränge | |
|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|
| S 1 | 5'-CUU UUC UUU CUU-3' | S 12 | 5'-AAG AAA GAA AAG-3' |
| S 2 | 5'-CUU UUC IUU CUU-3' | S 13 | 5'-AAG AAC GAA AAG-3' |
| S 3 | 5'-CUU UUC BUU CUU-3' | S 14 | 5'-AAG AAG GAA AAG-3' |
| S 4 | 5'-CUU UUC DUU CUU-3' | S 15 | 5'-AAG AAU GAA AAG-3' |
| S 5 | 5'-CUU UUC EUU CUU-3' | S 16 | 5'-AAG AAB GAA AAG-3' |
| S 6 | 5'-CUU UUC FUU CUU-3' | S 17 | 5'-AAG AAD GAA AAG-3' |
| S 7 | 5'-CUU UUC HUU CUU-3' | S 18 | 5'-AAG AAE GAA AAG-3' |
| S 8 | 5'-CUU UUC KUU CUU-3' | S 19 | 5'-AAG AAO GAA AAG-3' |
| S 9 | 5'-CUU UUC MUU CUU-3' | S 20 | 5'-AAG AAN GAA AAG-3' |
| S 10 | 5'-CUU UUC NUU CUU-3' | | |
| S 11 | 5'-CUU UUC OUU CUU-3' | | |

Tabelle 8.1: Oligonukleotide ohne oder mit einfachem Einbau modifizierter Nukleotide

| Uridin reiche Stränge | | Adenosin reiche Stränge | |
|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|
| S 21 | 5'-CUU UUC BBB CUU-3' | S 23 | 5'-AAG DDD GAA AAG-3' |
| S 22 | 5'-CUU UBC BUB CUU-3' | S 24 | 5'-AAG EEE GAA AAG-3' |
| | | S 25 | 5'-AAG DAD GDA AAG-3' |
| | | S 26 | 5'-AAG EAE GEA AAG-3' |

Tabelle 8.2: Oligonukleotide mit dreifachem Einbau modifizierter Nukleotide

| 13 mer Oligonukleotide | | | |
|------------------------|-------------------------|-------------|-------------------------|
| S 27 | 5'-D AAG AAA GAA AAG-3' | S 28 | 5'-E AAG AAA GAA AAG-3' |

Tabelle 8.3: Oligonukleotide zur Untersuchung von Basenstapelungswechselwirkungen

8.3 Aufreinigung von Oligonukleotiden

Die Aufreinigung der Oligonukleotide erfolgte über Anionenaustausch-HPLC. Diese Methode ist geeignet, um Oligonukleotide in höchster Reinheit zu erhalten. Die Anionenaustausch-HPLC ist die Standardmethode zur Aufreinigung kurzer RNA-Stränge.

Die Anionenaustausch-HPLC trennt nach Ladungsunterschieden. Das Prinzip dieser sehr effektiven Methode beruht auf der Wechselwirkung des negativ geladenen Rückgrats eines Oligonukleotids mit auf der stationären Phase immobilisierten kationischen Gruppen. Die gebundenen Oligonukleotide werden dann mit einem Gradienten von steigender Ionenstärke (Salzgehalt) von der Säule eluiert, wobei das gewünschte Oligonukleotid stets zuletzt freigesetzt wird. Dieses ist, bedingt durch die Methode, stets mit großen Mengen an Salz verunreinigt und muß vor der Verwendung entsalzt werden. Dafür stehen die Methoden der Gelfiltration und der Dialyse zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde die Gelfiltration verwendet. Deren Trennprinzip beruht auf der größenabhängigen Diffusion der Probenmoleküle in Poren der stationären Phase. Die polymeren Trennmaterialien, wie z.B. Sephadex G25, besitzen mikroskopische Poren, in welche die kleinen Salzteilchen hinein diffundieren, während die großen Oligonukleotid-Moleküle ausgeschlossen bleiben und somit rasch eluiert werden. Für die Entsatzung wurden in dieser Arbeit fertig gepackte Sephadex-Säulen mit G25-Material, die kommerziell erhältlich sind, eingesetzt.

Abbildung 8.7 zeigt beispielhaft das HPLC Diagramm von Strang **S 20**. Es ist deutlich das Hauptsignal des sauberen 12mer Oligonukleotides bei 20,4 Minuten zu erkennen. Die Signale vorher stammen von kürzeren Oligonukleotiden, wie sie bei Abbruch der Synthese entstehen. Details zur HPLC Aufreinigung sind in Kapitel 11.5.1 beschrieben.

Nach erfolgter Aufreinigung und Entsatzung wurden die Mengen des erhaltenen Oligonukleotides durch UV-Spektroskopie quantifiziert. Dazu wird die Extinktion der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Der so erhaltene, auch als optische Dichte OD_{260} (engl.: optical density) bezeichnete Wert, liefert bei bekanntem Extinktionskoeffizienten nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die Konzentration der Probe (siehe Kapitel 11.5.2). Die Berechnung der Extinktionskoeffizienten ist in Kapitel 11.5.3 erläutert. Die für die hergestellten Oligonukleotide berechneten Extinktionskoeffizienten sind in Tabelle 8.4 aufgeführt

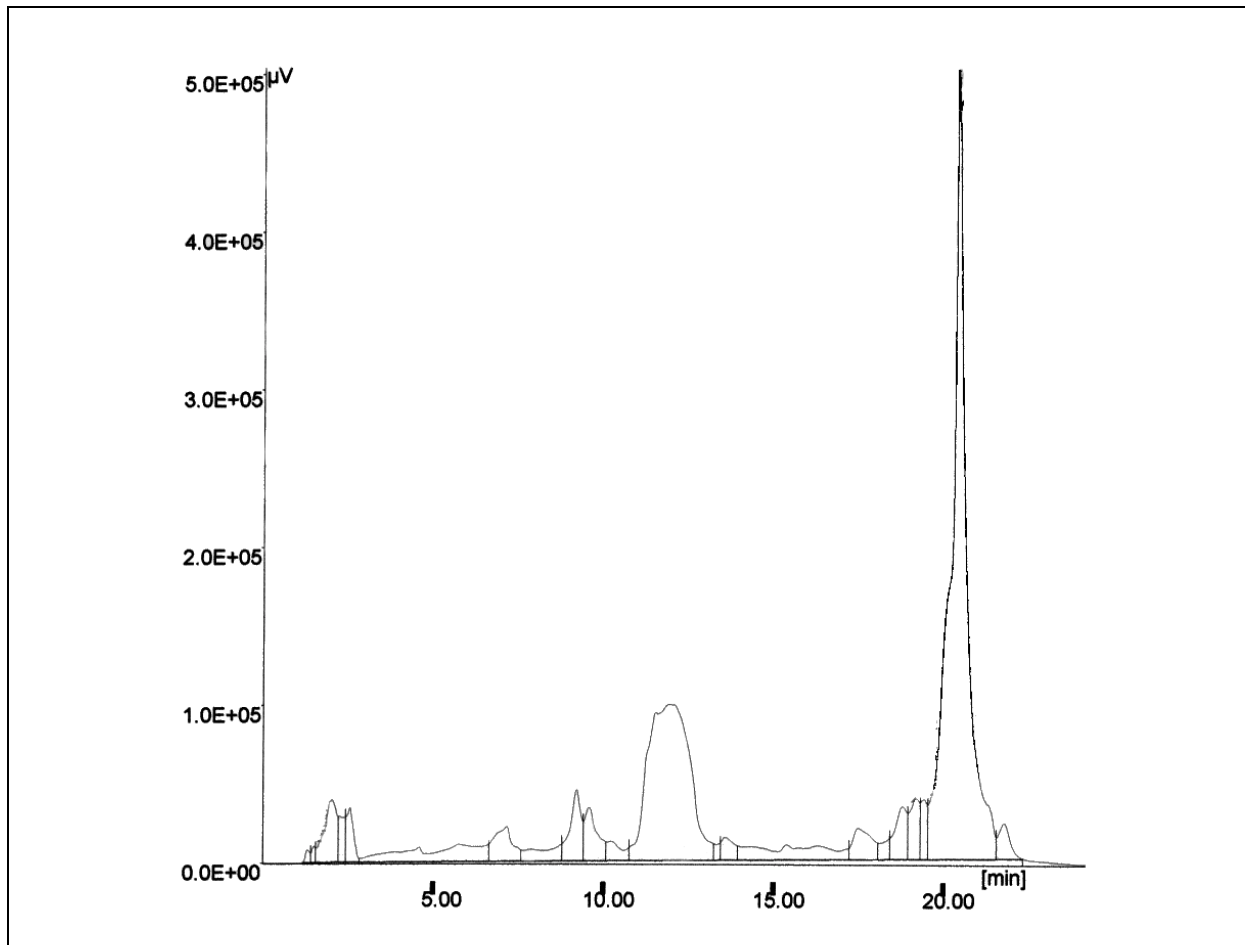


Abb. 8.7: HPLC Spektrum von Strang S 20

8.4 Charakterisierung von Oligonukleotiden

Die durchgeführten Oligonukleotid-Synthesen können durch Messung der Molekülmassen der erhaltenen Oligonukleotide auf ihren Erfolg hin kontrolliert werden. Die Retentionszeiten der HPLC Aufreinigung geben allerdings schon einen Hinweis aber noch nicht den endgültigen Beweis über die richtige Länge des Oligonukleotides. Außerdem läßt sich mittels Massenspektrometrie feststellen, ob alle Schutzgruppen der Nukleotide vollständig abgespalten wurden. Für massenspektrometrische Untersuchungen standen zwei verschiedene Methoden zur Verfügung. Dies waren die Electrospray-Ionisation- (ESI) und die matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation (matrix-assisted laser desorption/ionisation, MALDI) Massenspektrometrie. Beide Methoden ermöglichen die unfragmentierte Analyse von Oligonukleotiden mit hoher Empfindlichkeit. Alle Oligonukleotide, die in dieser Arbeit synthetisiert wurden, wurden mittels MALDI-Massenspektrometrie untersucht. Da bei der

chemischen Synthese der Phosphoramidite auch die ESI-Massenspektrometrie zum Einsatz gekommen ist, wird auch diese Methode hier kurz vorgestellt.

- Electrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS):

Die Electrospray-Methode ist eine spezielle Form der Ionisation unter Atmosphärendruck. Die gelöste Probe wird durch eine Stahlkapillare, die unter elektrischer Spannung steht, geleitet und an deren Spitze, aufgrund des dort befindlichen starken elektrischen Feldes, zerstäubt. Ein Gasstrom bewirkt den Verlust anhaftender Lösungsmittelmoleküle. Während dieser Desolvatation werden die Ionen aus dem Bereich der Atmosphärendruckionenquelle in das Hochvakuum des Massenspektrometers extrahiert. Ein Problem bei der Massenspektrometrie von Oligonukleotiden ist die Anwesenheit von Salzen, speziell Natrium. Diese bilden Addukte mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat und stören allgemein den Ionisationsprozess. Eine Möglichkeit diese Problematik zu umgehen bietet der Austausch von Natrium- gegen Ammonium-Ionen, wie er durch Ammoniumacetat-Präzipitation erreicht wird (Stults & Marsters, 1991). Ammonium dissoziiert im Vakuum in H^+ und Ammoniak und tritt deshalb nicht als Addukt in Erscheinung.

- Matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation-Massenspektrometrie (MALDI-MS):

MALDI wurde fast gleichzeitig von Karas und Hillenkamp (Karas & Hillenkamp, 1988) sowie Tanaka (Tanaka *et al.*, 1988) eingeführt. Im Gegensatz zur einfachen Laserdesorption/Ionisation (LDI), die durch einen hohen Fragmentierungsgrad der untersuchten Moleküle charakterisiert ist, erlaubt MALDI als weiche Desorptions-/Ionisationsmethode den Nachweis nichtflüchtiger, fragiler Moleküle mit Molekulargewichten bis zu mehreren hundert Kilodalton. Der Analyt wird dabei mit einer Matrix im Überschuss kokristallisiert und anschließend mit einem IR- oder UV-Laserpuls im Hochvakuum des Spektrometers beschossen. Gebräuchliche Matrixsubstanzen für Stickstofflaser mit einer Wellenlänge von 337 nm sind 2,4,6-Trihydroxyacetophenon oder 3-Hydroxypicolinsäure. Die durch die Laserenergie angeregten Matrixmoleküle unterstützen durch Übertragung der absorbierten Lichtenergie die Verdampfung und Ionisation der Analytmoleküle. Als gepulste Desorptions-/Ionisationsmethode wird MALDI gewöhnlich mit einem Flugzeit- (engl.: time of flight, TOF) Massenspektrometer kombiniert, in dem alle Ionen in einem elektrischen Feld mit der gleichen Energie beschleunigt und dann gemäß ihres Masse-/Ladungsverhältnisses zeitlich aufgetrennt werden. Die Durchführung einer Analyse ist sowohl im linearen als auch im Reflektron-Modus, der aufgrund der längeren Flugstrecke eine bessere Massenauflösung bietet, möglich. Die Technik der MALDI-Massenspektrometrie ist eine leistungsfähige Methode zur Analytik der Masse (Bahr *et al.*, 1994; Kirpekar *et al.*, 1994; Fitzgerald & Smith,

1995) und sogar der Sequenz von Oligonukleotiden (Pieles *et al.*, 1993). Die MALDI-Analyse ist im Vergleich zur ESI-Massenspektrometrie weniger empfindlich gegenüber Kontamination der Probe mit Salzen, was durch Fällung mit Ammoniumacetat während der Probenvorbereitung noch unterstützt werden kann. RNA-Oligomere zeigen bei MALDI-Untersuchungen eine höhere Stabilität als DNA-Oligomere, da die zusätzliche OH-Gruppe an der 2'-Position offenbar die glykosidische Bindung stabilisiert (Lehmann, 1996).

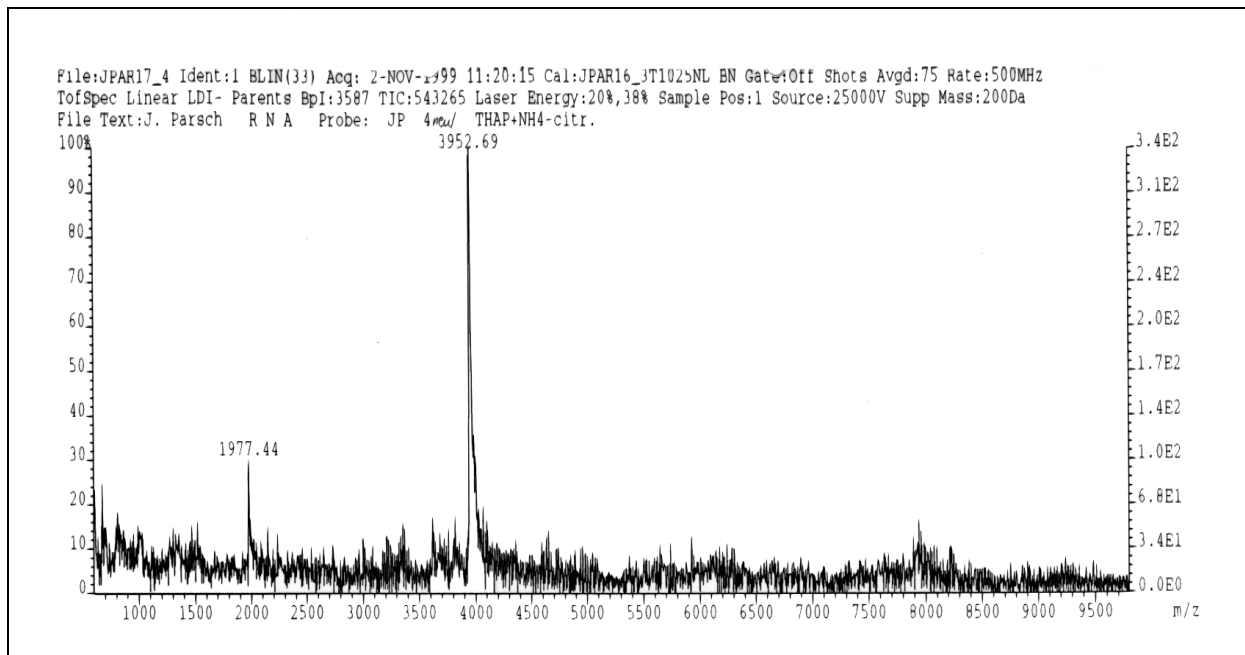


Abb. 8.8: MALDI-Spektrum des unmodifizierten Stranges **S 14** (berechnete Masse: 3952,55 Dalton, gefundene Masse: 3952,69 Dalton)

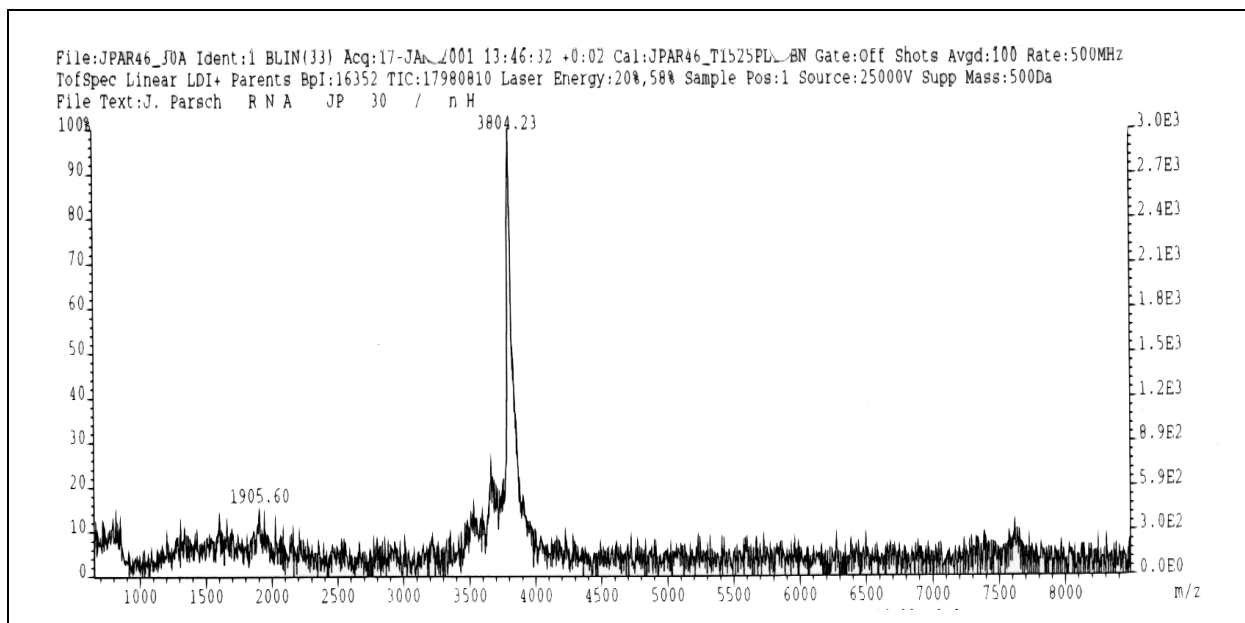


Abb. 8.9: MALDI-Spektrum des modifizierten Stranges **S 20** (berechnete Masse: 3803,41 Dalton, gefundene Masse: 3804,23 Dalton)

Abbildung 8.8 zeigt das MALDI-Spektrum des unmodifizierten Stranges **S 14** und Abbildung 8.9 das MALDI-Spektrum des modifizierten Stranges **S 20**. In beiden Spektren ist neben dem Molpeak des untersuchten Oligonukleotides nur noch das Signal der doppelt geladenen Spezies zu erkennen. Die Synthese und die Aufreinigung waren somit erfolgreich.

In Tabelle 8.4 sind die für die synthetisierten Oligonukleotide berechneten und tatsächlich gefundenen Massen angegeben. Zusätzlich sind in der Tabelle auch die berechneten Extinktionskoeffizienten der einzelnen Oligonukleotide enthalten. Einzelheiten über die Berechnung der Extinktionskoeffizienten sind in Kapitel 11.5.3 beschrieben.

| Strang | Sequenz | Berechnete Masse [Da] | Gefundene Masse [Da] | Extinktionskoeffizient [260 nm] |
|-------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|---------------------------------|
| S 1 | 5'-CUU UUC UUU CUU-3' | 3609,07 | 3647,06 | 110,26 |
| S 2 | 5'-CUU UUC IUU CUU-3' | 3633,09 | 3656,57 | 112,05 |
| S 3 | 5'-CUU UUC BUU CUU-3' | 3611,07 | 3634,40 | 110,26 |
| S 4 | 5'-CUU UUC DUU CUU-3' | 3633,11 | 3656,07 | 112,05 |
| S 5 | 5'-CUU UUC EUU CUU-3' | 3651,11 | 3650,93 | 112,05 |
| S 6 | 5'-CUU UUC FUU CUU-3' | 3593,07 | 3614,56 | 110,26 |
| S 7 | 5'-CUU UUC HUU CUU-3' | 3593,07 | 3595,78 | 110,26 |
| S 8 | 5'-CUU UUC KUU CUU-3' | 3593,07 | 3590,77 | 110,26 |
| S 9 | 5'-CUU UUC MUU CUU-3' | 3575,08 | 3595,46 | 110,26 |
| S 10 | 5'-CUU UUC NUU CUU-3' | 3499,00 | 3514,24 | 100,25 |
| S 11 | 5'-CUU UUC OUU CUU-3' | 3615,11 | 3616,27 | 112,05 |
| S 12 | 5'-AAG AAA GAA AAG-3' | 3936,52 | 3964,32 | 145,18 |
| S 13 | 5'-AAG AAC GAA AAG-3' | 3912,50 | 3911,45 | 140,16 |
| S 14 | 5'-AAG AAG GAA AAG-3' | 3952,55 | 3952,69 | 143,92 |
| S 15 | 5'-AAG AAU GAA AAG-3' | 3913,51 | 3959,28 | 142,51 |
| S 16 | 5'-AAG AAB GAA AAG-3' | 3915,51 | 3936,78 | 142,51 |
| S 17 | 5'-AAG AAD GAA AAG-3' | 3937,52 | 3954,62 | 145,18 |
| S 18 | 5'-AAG AAE GAA AAG-3' | 3955,52 | 3978,79 | 145,18 |
| S 19 | 5'-AAG AAO GAA AAG-3' | 3919,54 | 3919,43 | 143,92 |
| S 20 | 5'-AAG AAN GAA AAG-3' | 3803,41 | 3804,23 | 133,22 |
| S 21 | 5'-CUU UUC BBB CUU-3' | 3614,75 | 3654,18 | 110,26 |
| S 22 | 5'-CUU UBC BUB CUU-3' | 3614,75 | 3616,27 | 110,26 |

| | | | | |
|-------------|-------------------------|---------|---------|--------|
| S 23 | 5'-AAG DDD GAA AAG-3' | 3939,50 | 3938,15 | 140,14 |
| S 24 | 5'-AAG EEE GAA AAG-3' | 3993,47 | 4010,81 | 140,14 |
| S 25 | 5'-AAG DAD GDA AAG-3' | 3939,50 | 3939,22 | 140,14 |
| S 26 | 5'-AAG EAE GEA AAG-3' | 3993,47 | 4037,39 | 140,14 |
| S 27 | 5'-D AAG AAA GAA AAG-3' | 4266,72 | 4287,23 | 155,68 |
| S 28 | 5'-E AAG AAA GAA AAG-3' | 4284,71 | 4290,89 | 155,68 |

Tabelle 8.4: Übersicht über die synthetisierten Oligonukleotide, deren berechnete und gefundene Massen sowie deren errechneten Extinktionskoeffizienten

Betrachtet man die berechneten und die gefundenen Massen, so stellt man fest, dass bei etwa der Hälfte der Oligonukleotide die gefundenen Massen Natrium- oder Ammoniumaddukten entsprechen. Es gelang nicht von diesen Oligonukleotiden den Molpeak zu erhalten. Da die erhaltenen Massen aber relativ genau den Addukten entsprechen, kann davon ausgegangen werden, dass die Oligonukleotide in der gewünschten Sequenz vorliegen.

9 Spektroskopische Untersuchungen der Oligonukleotide

9.1 UV-spektroskopische Untersuchungen

Mit Hilfe der UV-Spektroskopie will man den sogenannten Schmelzpunkt eines Nukleinsäure-Duplex bestimmen. Unter dem Schmelzpunkt eines Duplex versteht man die Temperatur, bei der genau die Hälfte der Moleküle in einer Probe noch als Duplex vorliegt. Die andere Hälfte der Duplexe ist bei dieser Temperatur schon aufgeschmolzen und liegt als Einzelstränge vor. Bei den UV-spektroskopischen Untersuchungen macht man sich zunutze, daß sich die Extinktion beim Übergang von geordneter zur ungeordneten Struktur bei Nukleinsäuren ändert.

Die Änderung der Extinktion ist die Grundlage der temperaturabhängigen UV-Spektroskopie. Durch Erhöhung der Temperatur wird der Duplex aufgeschmolzen und dabei durch Änderung der Basenstaplungswechselwirkungen der Heterozyklen der Nukleotide die Extinktion verändert. Bei einem Übergang von der geordneten Struktur (Duplex) in eine ungeordnete Struktur (Knäuel-Struktur) nimmt die Extinktion zu. In diesem Fall spricht man von Hyperchromizität. Aus der Kurve, die durch die Zunahme der Hyperchromizität bei Temperaturerhöhung resultiert, kann der Schmelzpunkt eines Duplexes bestimmt werden. Der Schmelzpunkt ist allerdings nicht nur von der Länge und Sequenz des Duplexes abhängig, sondern auch von der Salzkonzentration und dem pH-Wert der Lösung, in der die Probe vermessen wird. Durch Erhöhung der Salzkonzentration steigt auch der Schmelzpunkt an (Puglisi & Tinoco, 1989). Abbildung 9.1 zeigt die Schmelzkurve des Duplexes aus den beiden unmodifizierten Strängen **S 1** und **S 12**. Bei beiden Strängen handelt es sich um 12mer RNA-Stränge, die in einem Phosphatpuffer mit 140 mM Natriumchlorid bei pH 7,0 vermessen wurden. Zu erkennen ist der typische sigmoidale Verlauf der Schmelzkurve. Der Schmelzpunkt dieses Überganges wurde mit 37,8°C bestimmt.

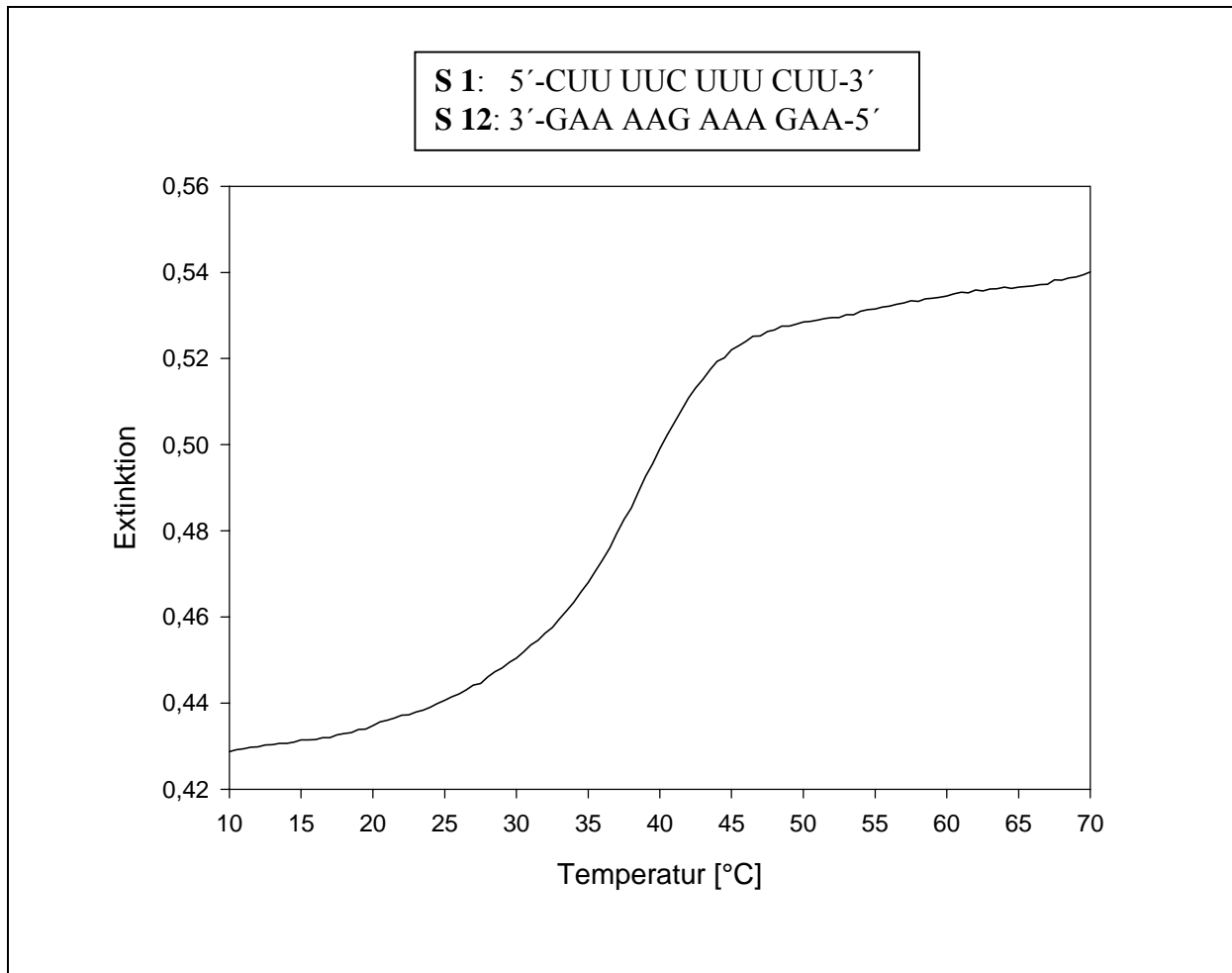


Abb. 9.1: UV-Schmelzkurve des Duplexes aus **S 1** und **S 12**

Das Ausmaß der Änderung der Extinktion ist wellenlängenabhängig. Das Hypochromizitätsmaximum liegt für AT-Basenpaare bei 260 nm und für GC-Basenpaare bei 276 nm (Abbildung 9.2). Die für die Messung eines gemischten Oligonukleotids liegt die optimale Wellenlänge zwischen diesen Werten. Routinemäßig wird meist bei 260 und 274 nm gemessen. Charakteristisch für das Schmelzen von Nucleinsäurestrukturen ist die Kooperativität des Prozesses (Saenger, 1984), d.h. das ein Nucleosid einen Einfluß auf die Konformation seines Nachbarn ausübt. Wird ein Basenpaar getrennt, so lösen sich auch die Wasserstoffbrücken des benachbarten Basenpaares schnell auf. Die Struktur der Doppelhelix verschwindet und es entstehen ungepaarte Einzelstränge. Die Aufspaltung der Struktur beginnt meist an einem Ende der Doppelhelix und bewegt sich schnell vergleichbar einem Reißverschluß durch die Helix. Eine Folge der Kooperativität des Schmelzvorganges ist die Tatsache, daß kurze Oligonukleotid-Komplexe nur nativ (geordnet) oder denaturiert (ungeordnet) vorliegen, Zwischenstufen jedoch nicht anzutreffen sind (Alles-oder-Nichts-Modell).

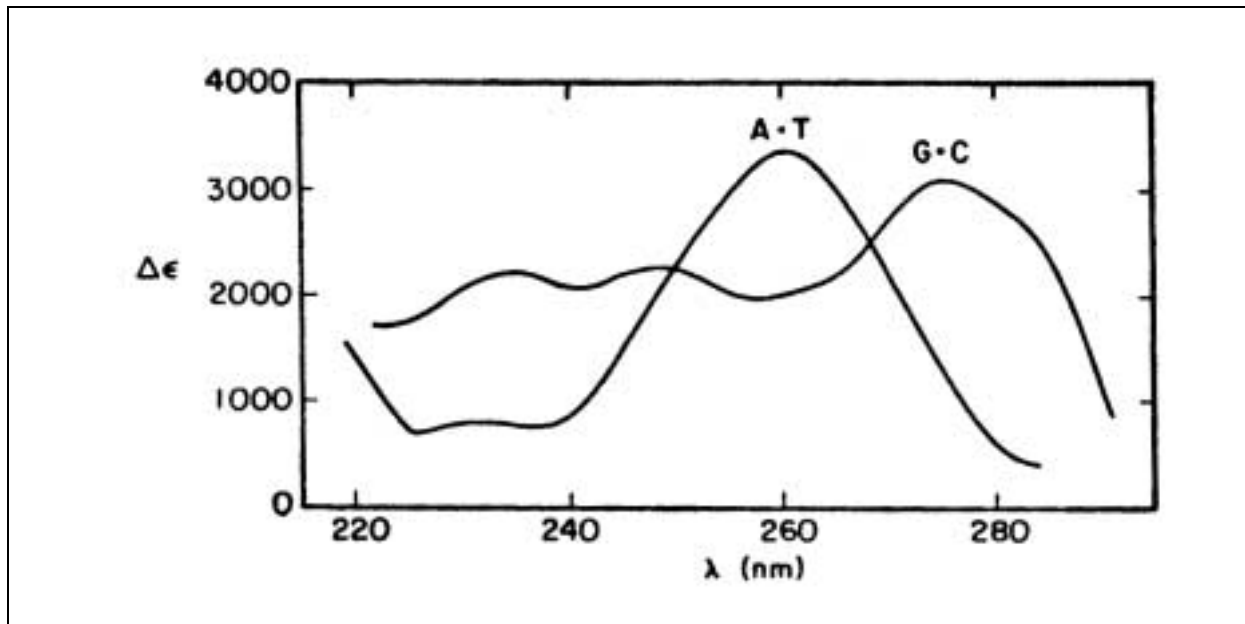


Abb. 9.2: Wellenlängenabhängige Veränderung der Extinktionskoeffizienten ($\Delta\epsilon$) von GC- und AT-Basenpaaren in DNA (Felsenfeld & Hirschman, 1965)

Aufgrund ihrer leichten Durchführbarkeit, der hohen Empfindlichkeit und der geringen benötigten Substanzmengen ist die UV-Spektroskopie die Methode der Wahl zur Bestimmung von Schmelzkurven von Oligonukleotiden. Neben der UV-Spektroskopie stehen allerdings auch noch andere Methoden wie z.B. die CD-Spektroskopie zur Verfügung.

Allgemein gilt, je höher der Schmelzpunkt, desto stabiler ist die untersuchte Struktur. Neben der Bestimmung des Schmelzpunktes können aus Schmelzkurven auch die thermodynamischen Größen ΔH^0 , ΔS^0 und ΔG^0 gewonnen werden. Es ist dabei zu beachten, daß diese Daten nur aussagekräftig sind, wenn das Alles-oder-Nichts-Modell uneingeschränkt gilt und die Messung im thermodynamischen Gleichgewicht durchgeführt wurde.

Durch Messung der Schmelzkurven bei unterschiedlichen Heizraten und anschließendem Vergleich der Kurven kann festgestellt werden, ob die Messungen im thermodynamischen Gleichgewicht stattgefunden haben oder nicht. Abbildung 9.3 zeigt die Schmelzkurven des Duplex aus Strang S 3 und S 12, die bei Heizraten von 0,5 bzw. 0,2°C pro Minute in einem Phosphatpuffer (140 mM Natriumchlorid) bei pH 7,0 aufgenommen wurden. Beide Kurven lassen sich gut überlagern und die Schmelzpunkte liegen bei beiden Kurven bei 27,4°C. Die Messung mit einer Heizrate von 0,5°C pro Minute erfolgte somit auch im thermodynamischen Gleichgewicht. Dieses Resultat wird auch durch andere Untersuchungen bestätigt (Wang *et al.*, 1995).

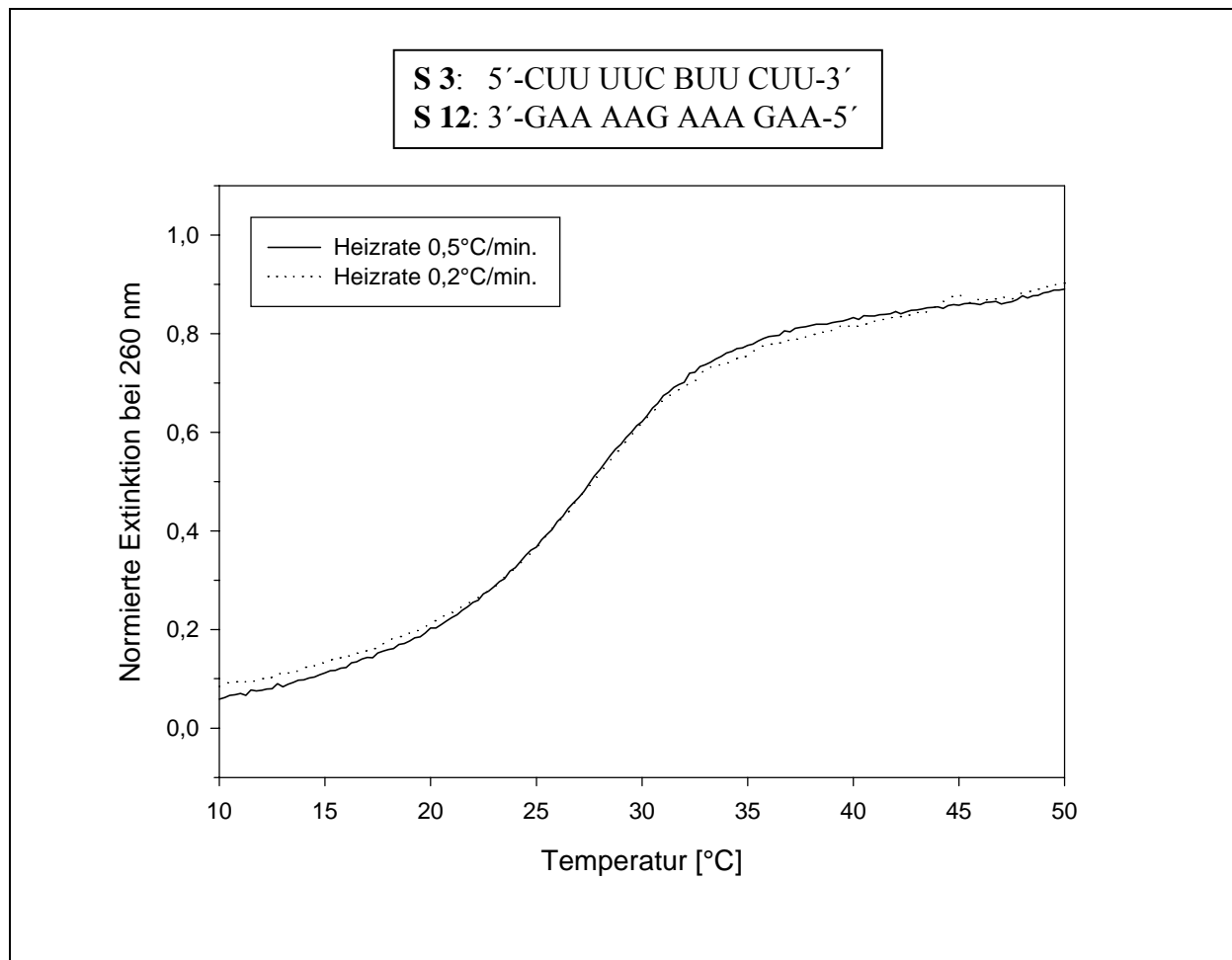


Abb. 9.3: Vergleich der Schmelzkurven des Duplexes aus den Strängen S 3 und S 12 bei unterschiedlichen Heizraten.

9.1.1 Auswertung der UV-Schmelzkurven

9.1.1.1 Bestimmung des Schmelzpunktes

Die UV-Schmelzkurven wurden in einem Zweistrahl UV-/VIS-Spektralphotometer Cary 1 der Firma Varian gemessen. Als Puffer diente ein Phosphat-Puffer der Zusammensetzung 140 mM Natriumchlorid, 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat und 10 mM Natriumdihydrogenphosphat mit einem pH-Wert von 7,0.

Zur Messung wurde die Probenküvette mit Puffer befüllt und beide zu untersuchenden Stränge in einer Konzentration von je 2 μM einpipettiert. Die Aufnahme der Schmelzkurven erfolgte bei 260 und 274 nm (Nullabgleich bei 350 nm) mit einer Heizrate von 0,5°C/min. Details zur Durchführung der UV-Schmelzexperimente können in Kapitel 11.6 nachgelesen werden.

Zur Auswertung der Schmelzkurven muß man sich zuerst Klarheit über die Molekularität des untersuchten Überganges und die Beschaffenheit der eingesetzten Sequenzen schaffen (selbstkomplementär oder nicht selbstkomplementär). Alle in dieser Arbeit untersuchten Sequenzen waren nicht selbstkomplementär und der untersuchte Übergang Duplex \rightarrow Einzelstränge ist jeweils bimolekularer Natur. Die Molekularität des Übergangs läßt sich leicht aus dessen Konzentrationsabhängigkeit ermitteln. Während der T_m unimolekularer Reaktionen (z.B. Haarnadelschleife \rightarrow Knäuel) konzentrationsunabhängig ist, ist er bei bi- oder höhermolekularen Reaktionen stets von der Konzentration abhängig.

Für die thermodynamische Analyse muß die Schmelzkurve eines Duplexes (Extinktion als Funktion der Temperatur) (Abb. 9.4a) in eine Darstellung des Bruchteils des geordneten Zustandes (α) als Funktion der Temperatur überführt werden (Abb. 9.4d) (Marky & Breslauer, 1987). Zu diesem Zweck betrachtet man den Schmelzvorgang unter Annahme eines Zwei-Zustands-Modells (Alles-oder-Nichts-Modell). Dieses Modell geht davon aus, daß die native Struktur mit der denaturierten in einem Gleichgewicht ohne populierte Zwischenstufen steht. Für die Transformation von $OD = f(T)$ in $\alpha = f(T)$ ist eine Anpassung von Basislinien an den oberen und unteren linearen Bereich der Schmelzkurve notwendig (Abb. 9.4c). Dies berücksichtigt die Temperaturabhängigkeit der Extinktion. Die Basislinienanpassung erfolgt unter Annahme eines linearen Verhaltens und läßt sich wie folgt ausdrücken:

$$[9-1] \quad OD_u = m_u \cdot T + b_u$$

$$[9-2] \quad OD_o = m_o \cdot T + b_o$$

(OD = Extinktion (engl.: absorbance), m = Steigung, T = Temperatur, b = Ordinaten-schnittpunkt, u = untere Basislinie, o = obere Basislinie)

Wenn der untere oder obere Bereich der Schmelzkurve nur wenig ausgebildet ist, so ist eine korrekte Basislinienanpassung erschwert. In einem solchen Fall ist die Bestimmung thermodynamischer Parameter über die Analyse der Kurvenform (Kapitel 9.3) nicht möglich, da eine schlechte Anpassung der Basislinien die größte Fehlerquelle bei dieser Art der Auswertung darstellt (Puglisi & Tinoco, 1989).

Da die gemessene Extinktion ein direktes Maß für die Anzahl der gestapelten Basen ist, läßt sich die $OD = f(T)$ Kurve in eine $\alpha = f(T)$ Kurve umwandeln, wobei α den Bruchteil des

geordneten Zustandes angibt. Die Schmelztemperatur T_m ist als der Wert definiert, an dem gerade die Hälfte der Moleküle denaturiert ist, wo also $\alpha(T)$ gerade 0,5 beträgt.

$$[9-3] \quad \alpha = [\text{Oligonukleotide im geordneten Zustand}] / [\text{Gesamtmenge an Oligonukleotid}]$$

$$[9-4] \quad \alpha = \frac{\{[\text{OD}_0] - [\text{OD}(T)]\}}{\{[\text{OD}_0] - [\text{OD}_\infty]\}}$$

Für die Assoziation eines nicht selbstkomplementären dritten Stranges an eine Doppelhelix gilt:



und

$$[9-6] \quad K = [D] / [S]^2$$

Die Gleichgewichtskonstante K dieses Vorgangs läßt sich unter der Voraussetzung, daß alle Stränge in gleicher Konzentration vorliegen, in Werten von α ausdrücken:

$$[9-7] \quad \{(1-\alpha) \cdot c_t/n\} \cdot \{(1-\alpha) \cdot c_t/n\} \rightleftharpoons \alpha \cdot c_t/n$$

und

$$[9-8] \quad K = \{\alpha \cdot c_t/n\} / \{\{(1-\alpha) \cdot c_t/n\} \cdot \{(1-\alpha) \cdot c_t/n\}\}$$

Eine Vereinfachung von Gl. [9-8] und Anwendung auf eine beliebige Molekularität liefert:

$$[9-9] \quad K = \{\alpha \cdot c_t/n\} / \{(1-\alpha) \cdot (c_t/n)\}^n$$

mit c_t = totale Strangkonzentration = [Strang 1] + [Strang 2] und n = Molekularität des Übergangs; Umformen von Gl. [9-9] liefert:

$$[9-10] \quad K = \alpha / \{(1-\alpha)^n \cdot (c_t/n)^{(n-1)}\}$$

Für die Gleichgewichtskonstante gilt demnach am Punkt $T = T_m$ mit $\alpha = 0,5$:

$$[9-11] \quad K_{T=T_m} = 0,5 / \{(0,5)^n \cdot (c_t/n)^{(n-1)}\} = 1 / (c_t/2n)^{(n-1)}$$

Gleichung [9-11] ermöglicht die Berechnung der Gleichgewichtskonstanten am Schmelzpunkt für eine Assoziationsreaktion jeglicher Molekularität zwischen nicht selbstkomplementären Sequenzen. Im Falle einer bimolekularen Assoziation beträgt n zwei und Gl. [9-11] vereinfacht sich zu:

[9-12]

$$K_{T=T_m} = 1 / (c_t/4) = 4 / c_t$$

Das bedeutet, daß die Gleichgewichtskonstante K bei bimolekularen Reaktionen am T_m alleine eine Funktion der totalen Strangkonzentration c_t ist.

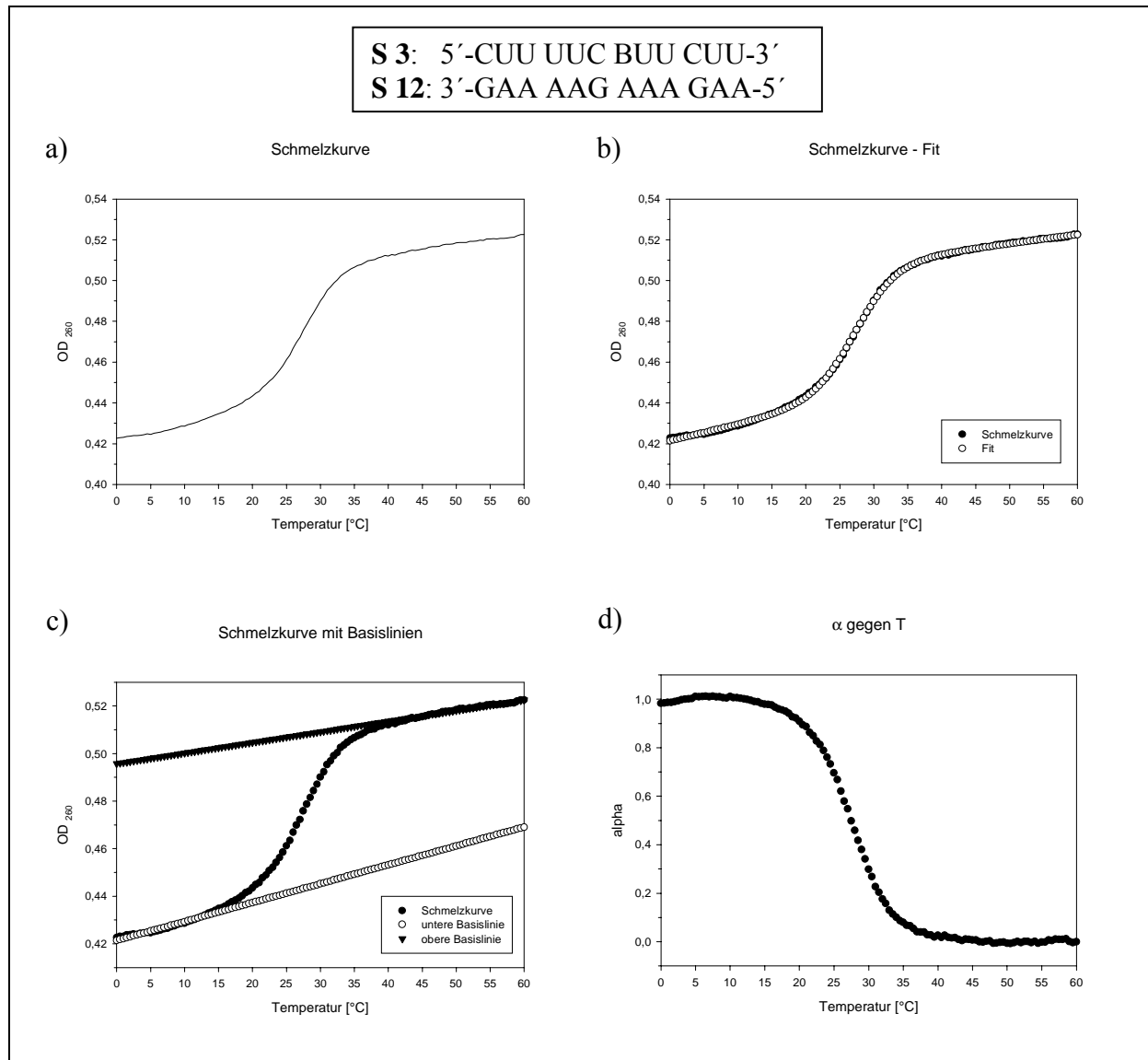


Abb. 9.4: a) UV-Schmelzkurve des Duplexes aus den Strängen S 3 und S 12, b) Überlagerung Schmelzkurve und Fit, c) Schmelzkurve mit unterer und oberer Basislinie, d) Transformierte Kurve $\alpha = f(T)$

9.1.1.2 Bestimmung der thermodynamischen Daten

In diesem Abschnitt werden die gängigsten Methoden zur Bestimmung der thermodynamischen Daten aus spektroskopischen Untersuchungen erklärt und in ihren Vor-

und Nachteilen gegeneinander abgewogen. Die ihnen zugrundeliegenden mathematischen Gleichungen werden hergeleitet.

Sobald die Molekularität des untersuchten Überganges bekannt ist, können thermodynamische Parameter auf verschiedene Arten berechnet werden. Die erste Methode ist die sogenannte van't Hoff Auftragung von $R \ln K$ als Funktion von $1/T$. Eine zweite Möglichkeit besteht in der numerischen Differentiation von α nach T am Punkt $T = T_m$. Werden konzentrationsabhängige Messungen durchgeführt, bietet sich die Auftragung von $1/T_m$ gegen $\ln c_t$ an. Eine vierte Variante ist eine computergestützte Anpassung einer Kurve an die Meßwerte mit Hilfe eines geeigneten Algorithmus.

- Methode 1: Auftragung von $R \ln K$ gegen $1/T$, der van't Hoff Plot

Werte für die Gleichgewichtskonstante K können für jede Temperatur mit Hilfe von Gl. [9-10] und Einsetzen von zwei für die Molekularität n berechnet werden. Dabei werden im van't Hoff Plot nur Punkte mit $0,15 \leq \alpha \leq 0,85$ verwendet, da die Werte für K in diesem Bereich am präzisesten sind. Gleichung [9-13] gibt die Beziehung zwischen ΔG^0 und K an:

$$[9-13] \quad \Delta G^0 = -RT \ln K$$

Die Umformung der Basisgleichung

$$[9-14] \quad \Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

zu

$$[9-15] \quad \Delta S^0 = (\Delta H^0 - \Delta G^0) / T$$

und Einsetzen in Gl. [9-13] liefert:

$$[9-16] \quad \Delta S^0 = (\Delta H^0 + RT \ln K) / T$$

Eine einfache Umformung führt zu Gleichung

$$[9-17] \quad R \ln K = -\Delta H^0 \cdot 1/T + \Delta S^0$$

Eine Auftragung von $R \ln K$ gegen $1/T$ liefert als Steigung $-\Delta H^0$ und als Ordinaten-schnittpunkt ΔS^0 . Ein Beispiel findet sich in Abb. 9.5b. Wenn ΔH^0 temperaturunabhängig ist, sollte die Auftragung eine Gerade liefern. Eine nichtlineare van't Hoff Auftragung kann

mehrere Ursachen haben: Die Temperaturabhängigkeit von ΔH^0 , eine schlechte Anpassung der Basislinien oder ein Übergang, der nicht dem Alles-oder-Nichts-Modell folgt.

- Methode 2: Numerische Differentiation von α nach T am Punkt $T = T_m$

Einsetzen von Gl. [9-9] in die van't Hoffsche Reaktionsisobare [9-18] ergibt nach Differentiation Gl. [9-19]:

$$[9-18] \quad \Delta H^0 = RT^2 (\partial \ln K / \partial T)$$

$$[9-19] \quad \Delta H^0 = RT^2 (1/\alpha + n/(n-\alpha)) (\partial \alpha / \partial T)$$

Am Punkt $T = T_m$ ist $\alpha = 0,5$:

$$[9-20] \quad \Delta H^0 = R(T_m)^2 (2 + 2n) (\partial \alpha / \partial T)_{T=T_m}$$

Im Falle eines bimolekularen Übergangs mit $n = 2$ folgt:

$$[9-21] \quad \Delta H^0 = 6R(T_m)^2 (\partial \alpha / \partial T)_{T=T_m}$$

Dies ist identisch mit

$$[9-22] \quad \Delta H^0 = -6R (\partial \alpha / \partial (1/T))_{T=T_m}$$

Die numerische Differentiation von α nach T am Punkt $T = T_m$ liefert ΔH^0 . Ein Nachteil dieser Methode ist, daß die Bestimmung nur an einem einzelnen Punkt stattfindet.

- Methode 3: Auftragung von $1/T_m$ gegen $\ln c_t$

Dies ist eine sehr nützliche Bestimmungsmethode für thermodynamische Daten. Da sie auf konzentrationsabhängigen Messungen beruht, ist klar, daß sie nicht für unimolekulare Reaktionen angewendet werden kann. Der wesentliche Vorteil dieser Methode ist, daß ΔH^0 und ΔS^0 lediglich von der Bestimmung von c_t und T_m abhängen und somit die Anpassung der Basislinien eine sekundäre Rolle spielt. Andererseits müssen für jeden Wert mindestens acht bis zehn Experimente mit Konzentrationen vom mikro- bis millimolaren Bereich durchgeführt werden. Dadurch entsteht ein großer experimenteller Aufwand.

Gleichsetzen der Gleichungen [9-13] und [9-14] führt zu

$$[9-23] \quad -RT \ln K = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

Wenn wir Gl. [9-11], die einen Ausdruck für K am T_m gibt, in Gl. [9-23] einsetzen, so erhalten wir:

$$[9-24] \quad RT_m \ln (c_t/2n)^{(n-1)} = \Delta H^0 - T_m\Delta S^0$$

Umformung ergibt:

$$[9-25] \quad (n-1) RT_m \ln c_t - (n-1) RT_m \ln (2n) = \Delta H^0 - T_m\Delta S^0$$

Division durch $T_m\Delta H^0$ und Umstellung liefert eine universelle Gleichung für die Konzentrationsabhängigkeit des T_m von nicht selbstkomplementären Sequenzen:

$$[9-26] \quad 1/T_m = \{(n-1) R / \Delta H^0\} \cdot \ln c_t + \{\Delta S^0 - [(n-1) R \ln (2n)]\} / \Delta H^0$$

Für bimolekulare Übergänge ($n = 2$) folgt:

$$[9-27] \quad 1/T_m = (R / \Delta H^0) \cdot \ln c_t + (\Delta S^0 - R \ln 4) / \Delta H^0$$

Eine Auftragung von $1/T_m$ gegen $\ln c_t$ liefert folglich aus der Steigung ΔH^0 und aus dem Ordinatenschnittpunkt ΔS^0 . Eine nichtlineare Auftragung deutet auf einen Übergang hin, der nicht dem Zwei-Zustands-Modell folgt.

- Methode 4: Kurvenanpassung an die Meßwerte mit Hilfe eines geeigneten Algorithmus

Die experimentell ermittelte Kurve wird direkt mit Hilfe von sechs Parametern gefittet. Dabei handelt es sich um den T_m , ΔH^0 sowie die vier Parameter, die Steigung und Ordinatenschnittpunkt der unteren und oberen Basislinie definieren. Das in dieser Arbeit verwendete Kalkulationsprogramm SigmaPlot[®] 5.0 (Jandel Corporation, 1999) verwendet dazu eine nichtlineare Regression auf Grundlage des Marquardt-Levenberg Algorithmus. Dieser Algorithmus sucht Werte für die Parameter, die die Summe der Fehlerquadrate im Vergleich gemessener und berechneter Werte minimieren. Der Prozeß ist iterativ. Es gilt das Konvergenzkriterium. Die sechs Parameter fitten die experimentelle Kurve recht gut, die thermodynamischen Daten solcher Berechnungen sollten allerdings nicht verwendet werden (Puglisi & Tinoco, 1989). Ein Beispiel findet sich in Abb. 9.5a.

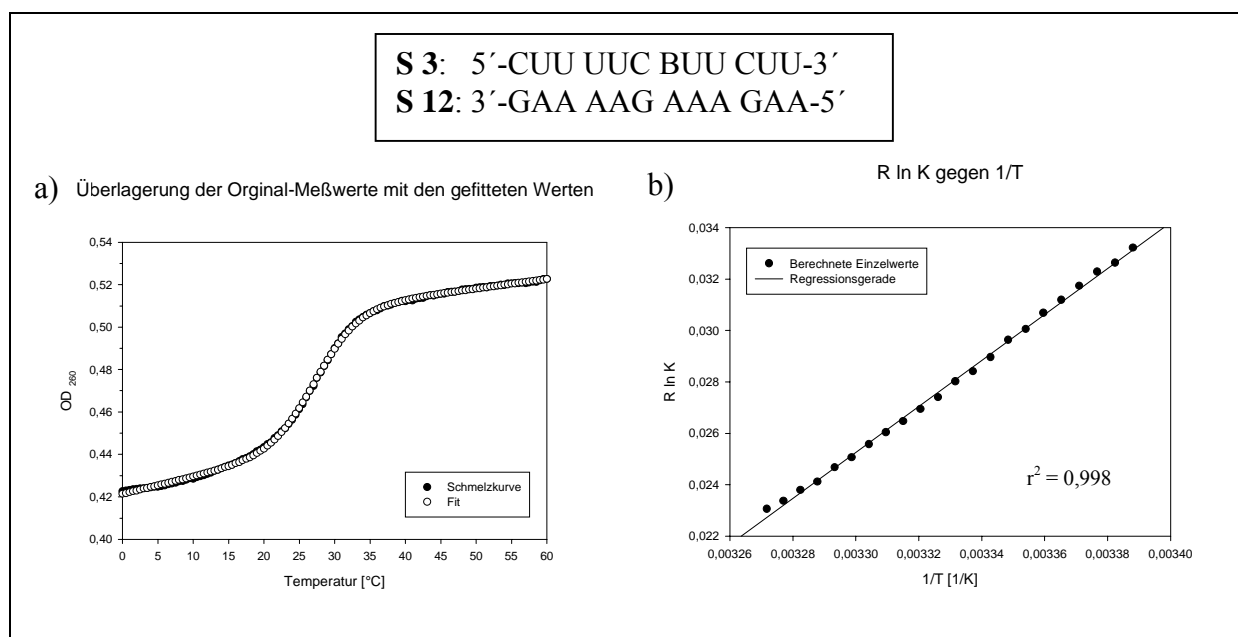


Abb. 9.5: a) Überlagerung einer Kurve aus Original-Meßwerten mit einer gefitteten Kurve (Methode 4). b) van't Hoff Auftragung von $R \ln K$ gegen $1/T$ (Methode 1). Beides am Beispiel des Duplexes aus **S 3** und **S12**

Die angegebenen Gleichungen gelten für Assoziationsreaktionen. Dieselben Ausdrücke mit umgekehrten Vorzeichen für Enthalpie und Entropie gelten für Dissoziationsreaktionen. Während Methode 3 prinzipiell die genauesten Ergebnisse liefert, hat sie den Nachteil des extrem hohen experimentellen Aufwandes. Aus diesem Grund erscheint Methode 1 der beste Kompromiß bezüglich vertretbarem Arbeitsaufwand und aussagefähiger thermodynamischer Daten. Ein Vergleich der Ergebnisse, die mit den Methoden 1 und 2 erhalten wurden, zeigen sehr gute Übereinstimmungen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden im Kapitel 9.1.2 nur die thermodynamischen Daten, welche nach Methode 1 errechnet wurden aufgeführt. Methode 4 sollte nicht für die Bestimmung thermodynamischer Daten eingesetzt werden, was in dieser Arbeit auch nicht geschah. Besondere Beachtung muß bei Berechnungen nach Methode 4 der zugrundeliegenden Gleichung geschenkt werden. Es sei darauf hingewiesen, daß die in unserer Arbeitsgruppe vorliegende Gleichung nur für unimolekulare Übergänge Gültigkeit besitzt. Zwar läßt sich der Kurvenverlauf und die Basislinienanpassung auch für höhermolekulare Übergänge verwenden, der Parameter „ ΔH “ ist jedoch in diesem Fall nicht mit der Enthalpie des Überganges gleichzusetzen. Die Herleitung der Formel für unimolekulare Übergänge findet sich bei Schweitzer (Schweitzer, 1998).

Grundsätzlich sollte man die Annahmen, die bei der Bestimmung thermodynamischer Daten aus Schmelzkurven gemacht werden, stets im Auge behalten. Zum einen werden die

Aktivitäten durch molare Konzentrationen ersetzt, zum anderen wird die Gültigkeit des Zwei-Zustands-Modells (Alles-oder-Nichts-Modell) vorausgesetzt. Die erhaltenen Werte sind nur für das untersuchte Puffersystem gültig. Andere Salzkonzentrationen können die Werte verändern. Schließlich wird angenommen, daß ΔH^0 und ΔS^0 unabhängig von der Temperatur sind. Alle diese Voraussetzungen zeigen, daß die erhaltenen Daten kritisch bewertet werden müssen. Dennoch hat sich gezeigt, daß die quantitative Auswertung von Schmelzkurven durchaus aussagefähige thermodynamische Daten liefern kann. Übersichten über die Auswertung von UV-Schmelzkurven geben Marky & Breslauer (Marky & Breslauer, 1987), und Puglisi & Tinoco (Puglisi & Tinoco, 1989).

9.1.2 Ergebnisse der UV-Schmelzkurven

Es wurden die Schmelzpunkte der RNA Duplexe gemessen und nach den Methoden 1 und 2 (siehe Kapitel 9.1.1) ausgewertet. Die errechneten Werte gelten für die Dissoziationsreaktion. Bei den RNA Duplexen handelte es sich immer um 12mer Oligonukleotide, einzig die beiden Stränge zur Kontrolle der Basenstapelungswechselwirkung sind 13mere. Die Position der Modifikation sowie die restliche Basensequenz wurden nicht verändert. Die Ausnahme hierbei bilden die Stränge mit drei Modifikationen, die allerdings auch sequenzgleich zu den einfach modifizierten Strängen mit Ausnahme der Modifikationsstellen sind.

Im Folgenden wird immer von Basenpaaren und den daraus resultierenden Schmelzpunkten gesprochen. Gemeint sind dabei die 12mer RNA Duplexe mit einem entsprechenden Basenpaar an der Modifikationsstelle und nicht wie vielleicht anzunehmen ein Basenpaar für sich alleine. Die in dieser Arbeit synthetisierten Nukleoside werden mit den in Kapitel 8.2 eingeführten Abkürzungen benannt. Zur besseren Übersichtlichkeit sind diese nochmals in Abbildung 9.6 aufgeführt.

Die ersten Messungen wurden an unmodifizierten Strängen durchgeführt (Tabelle 9.1). Bei den zu vermessenden Basenpaaren handelte es sich um Uracil gepaart mit allen natürlichen Nukleobasen. Das natürliche Basenpaar Uracil-Adenin bildete überraschend nicht den stabilsten Duplex, sondern das Basenpaar Uracil-Guanin. Bei dem Basenpaar Uracil-Guanin handelt es sich um ein sogenanntes Wobble Basenpaar (siehe Kapitel 2.4.1). Bei Wobble-Basenpaaren sind die Basen leicht gegeneinander verschoben, so daß das Wasserstoffbrückendonator-/Akzeptor-Verteilungsmuster der Nukleobasen wieder zueinander paßt und zwei Wasserstoffbrücken ausgebildet werden können. Die Verschiebung der beiden

Nukleobasen zu einem Wobble-Basenpaar und die daraus resultierenden Wasserstoffbrücken sind in Abbildung 9.7 zu erkennen.

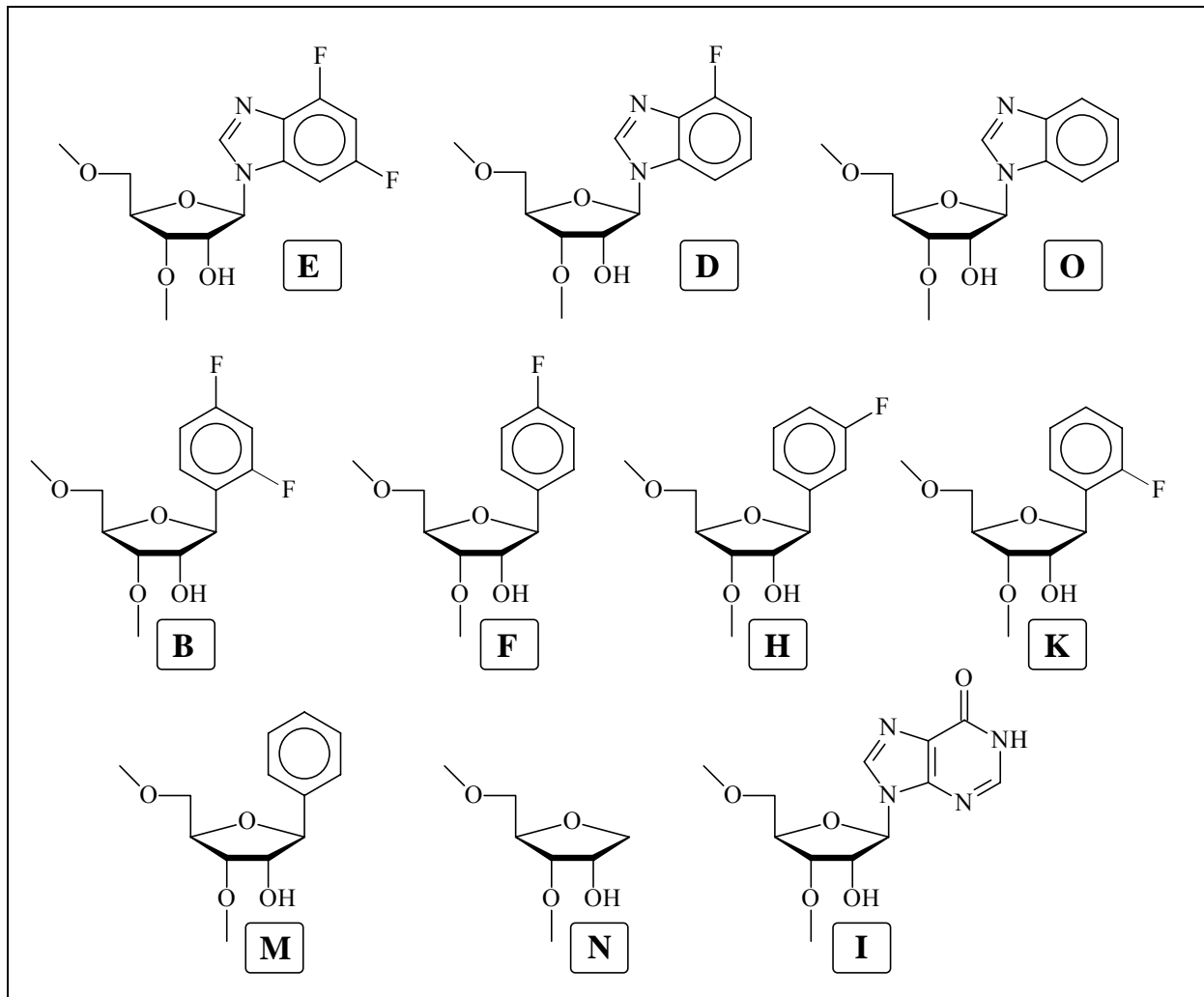


Abb. 9.6: Verwendete Abkürzungen für die in RNA eingebauten modifizierten Nucleoside

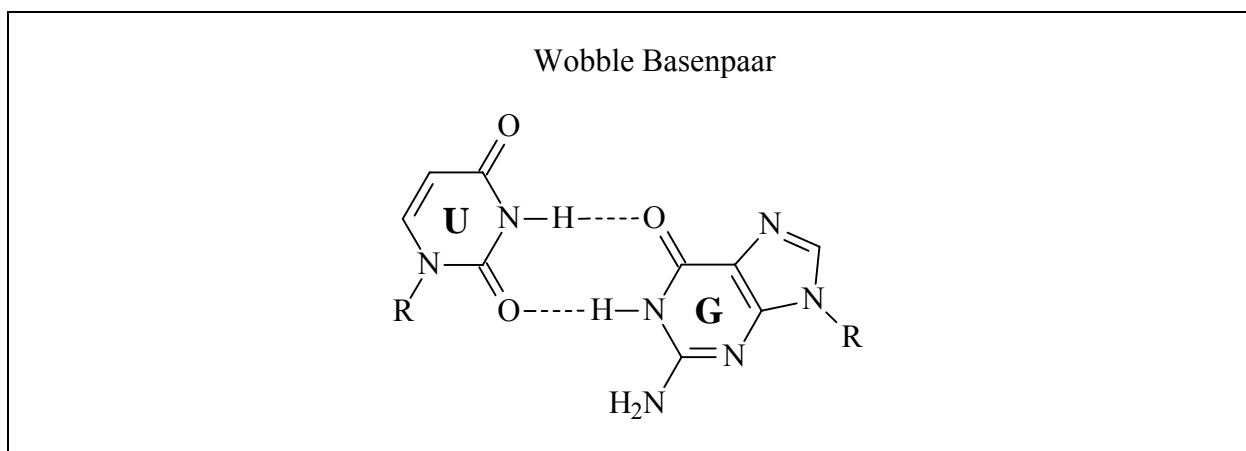


Abb. 9.7: Uracil-Guanin Basenpaar

Die beiden anderen Duplexe mit den Basenpaaren Uracil-Cytosin und Uracil-Uracil sind dagegen deutlich instabiler. In beiden Basenpaaren sind die Nucleobasen bedingt durch die

Struktur der Doppelhelix zu weit voneinander entfernt, um Wasserstoffbrücken ausbilden zu können. Das Fehlen der zwei Wasserstoffbrücken destabilisiert den Duplex um ca. 7,5°C oder 2,1 kcal/mol (Tabelle 9.1).

| Basenpaar 1. Base | Basenpaar 2. Base | T_m [°C] | ΔH^0 [kcal/mol] | $T\Delta S^0$ [kcal/mol] (T=298 K) | ΔG^0 [kcal/mol] (T=298 K) |
|----------------------|----------------------|-------------------|----------------------------|--|---|
| U | A | 37,8 ± 0,1 | 87,8 ± 1,7 | 75,9 ± 1,6 | 11,9 ± 0,1 |
| | C | 30,4 ± 0,1 | 84,5 ± 1,3 | 74,8 ± 1,3 | 9,8 ± 0,1 |
| | G | 38,6 ± 0,2 | 83,0 ± 2,5 | 71,1 ± 2,4 | 11,9 ± 0,2 |
| | U | 30,1 ± 0,1 | 89,5 ± 1,6 | 79,8 ± 1,6 | 9,7 ± 0,1 |
| B | A | 27,4 ± 0,1 | 88,6 ± 0,8 | 79,6 ± 0,8 | 9,0 ± 0,1 |
| | C | 27,3 ± 0,1 | 84,8 ± 1,2 | 75,9 ± 1,2 | 8,9 ± 0,1 |
| | G | 27,6 ± 0,1 | 83,6 ± 0,7 | 74,6 ± 0,7 | 9,0 ± 0,1 |
| | U | 27,9 ± 0,1 | 91,2 ± 0,9 | 82,1 ± 0,9 | 9,1 ± 0,1 |
| F | A | 23,8 ± 0,1 | 81,6 ± 2,5 | 73,7 ± 2,5 | 7,9 ± 0,1 |
| | C | 24,1 ± 0,1 | 83,0 ± 0,9 | 75,0 ± 0,9 | 8,0 ± 0,1 |
| | G | 24,2 ± 0,2 | 80,2 ± 3,7 | 72,2 ± 3,7 | 8,0 ± 0,1 |
| | U | 25,6 ± 0,3 | 85,8 ± 1,6 | 77,4 ± 1,6 | 8,4 ± 0,1 |
| H | A | 24,7 ± 0,1 | 79,3 ± 1,1 | 71,1 ± 1,1 | 8,2 ± 0,1 |
| | C | 25,0 ± 0,1 | 82,6 ± 1,0 | 74,4 ± 1,0 | 8,2 ± 0,1 |
| | G | 25,0 ± 0,1 | 80,0 ± 0,8 | 71,8 ± 0,8 | 8,2 ± 0,1 |
| | U | 25,7 ± 0,1 | 84,1 ± 2,5 | 75,7 ± 2,5 | 8,4 ± 0,1 |
| K | A | 27,3 ± 0,1 | 89,9 ± 0,9 | 81,0 ± 0,9 | 8,9 ± 0,1 |
| | C | 25,1 ± 0,1 | 83,3 ± 1,6 | 75,0 ± 1,7 | 8,3 ± 0,1 |
| | G | 27,4 ± 0,2 | 91,2 ± 2,8 | 82,2 ± 2,8 | 9,0 ± 0,1 |
| | U | 26,5 ± 0,1 | 87,1 ± 1,9 | 78,4 ± 1,9 | 8,7 ± 0,1 |
| M | A | 23,0 ± 0,1 | 80,5 ± 3,5 | 72,8 ± 3,5 | 7,7 ± 0,1 |
| | C | 22,6 ± 0,1 | 84,4 ± 3,8 | 76,8 ± 3,9 | 7,6 ± 0,1 |
| | G | 23,5 ± 0,1 | 69,8 ± 1,8 | 61,9 ± 1,8 | 7,9 ± 0,1 |
| | U | 23,1 ± 0,1 | 73,3 ± 3,4 | 70,6 ± 3,4 | 7,7 ± 0,1 |

Tabelle 9.1: Schmelzpunkte und thermodynamische Daten von Basenpaaren aus Pyrimidinanalogen Nucleosiden und natürlichen Nucleobasen

Weitere Messungen wurden mit den Fluorbenzol-Nukleosiden und dem Benzol-Nukleosid durchgeführt. Dazu wurden diese mit allen vier natürlichen Basen gepaart und die resultierenden Schmelzpunkte der Duplexe gemessen. Alle erhaltenen Schmelzpunkte liegen unter denen der Duplexe mit nur natürlichen Basenpaaren. Es kommt somit zu einer Destabilisierung der Doppelhelix bei Einbau eines modifizierten Bausteines. Die einzelnen Bausteine wirken sich unterschiedlich auf die Stabilität der RNA aus. Der Benzol-Baustein **M** destabilisiert die RNA am meisten. Durch den Einbau von **M** gegenüber Adenosin wird der Schmelzpunkt um 14,8°C im Vergleich zu einem Uridin erniedrigt. Dies kann durch das Fehlen der Wasserstoffbrücken und eine geringere Solvataion erklärt werden. Bei dem 3-Fluorbenzol- (**H**) und dem 4-Fluorbenzol-Nukleosid (**F**) fällt die Destabilisierung um ein bis zwei Grad Celsius geringer aus. Den größten Einfluß hat Fluor an der 2-Position des Aromaten. Die Destabilisierung im Vergleich zu einem Uracil-Adenin Basenpaar ist beim 2-Fluorbenzol- (**K**) und beim 2,4-Difluorbenzol-Nukleosid (**B**) nur 10,5°C. Diese Untersuchungen verdeutlichen den Einfluß der Position des Fluoratoms auf die Stabilität der Doppelhelix. Der für die Stabilität schlechteste Baustein ist das Benzol-Nukleosid **M**. Die Einführung eines Fluors an der 3- oder 4-Position des Benzols führt zu einer Stabilisierung der Doppelhelix um ein bis zwei Grad verglichen mit **M**. Wird dagegen die 2-Position des Benzols mit einem Fluoratom substituiert, so wird die Doppelhelix um weitere ca. drei Grad stabilisiert. In den Kristallstrukturen von 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **30** und 1'-Desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **36** treten schwache Wasserstoffbrücken zwischen diesem Fluor und einem H5'-Wasserstoff auf (vgl. Kap. 7). Es ist deshalb denkbar, daß auch in der Doppelhelix solche Wechselwirkungen die Stabilität erhöhen.

Alle Fluorbenzol-Nukleoside wie auch das Benzol-Nukleosid unterscheiden kaum zwischen den natürlichen Nukleobasen. Das heißt, die resultierenden Schmelzpunkte unterscheiden sich nur wenig, egal mit welcher natürlichen Nukleobase die modifizierten Basen gepaart werden. Mit einer Differenz von 0,6°C ist das Difluorbenzol-Nukleosid **B** der Baustein mit der geringsten Schwankungsbreite. **B** kann somit einen wichtigen Teilaspekt für eine ideale universelle Base erfüllen (siehe auch Kapitel 4.2). Auch **M** kann mit einer Schwankungsbreite von 0,9°C als eine solche universelle Base angesehen werden. Der Vorteil von **B** gegenüber **M** ist allerdings die deutlich geringere Destabilisierung der RNA Doppelhelix von über 4°C bei einem einfachen Einbau in der Mitte des Oligonukleotides. Abbildung 9.8 zeigt die normierten Schmelzkurven von RNA Duplexen mit Basenpaaren aus **B** und den natürlichen Nukleobasen. Es ist deutlich die geringe Schwankung der Schmelzpunkte zu erkennen. Die Tatsache, daß die Schmelzpunkte alle nahezu identisch sind zeigt, daß zwischen den

natürlichen Nucleobasen und den fluormodifizierten Nucleobasen keine Wasserstoffbrücken vorkommen können. Bei der Paarung von **B** mit einem Pyrimidin resultiert der gleiche Schmelzpunkt wie bei der Paarung mit einem Purin, obwohl bei einem Basenpaar **B**-Pyrimidin aufgrund des Abstandes der Nucleobasen keine Wasserstoffbrücken ausgebildet werden können. Deshalb können auch keine Wasserstoffbrücken zwischen **B** und den Purinen vorliegen, da sonst der erhaltene Schmelzpunkt um einige Grad Celsius höher sein müßte.

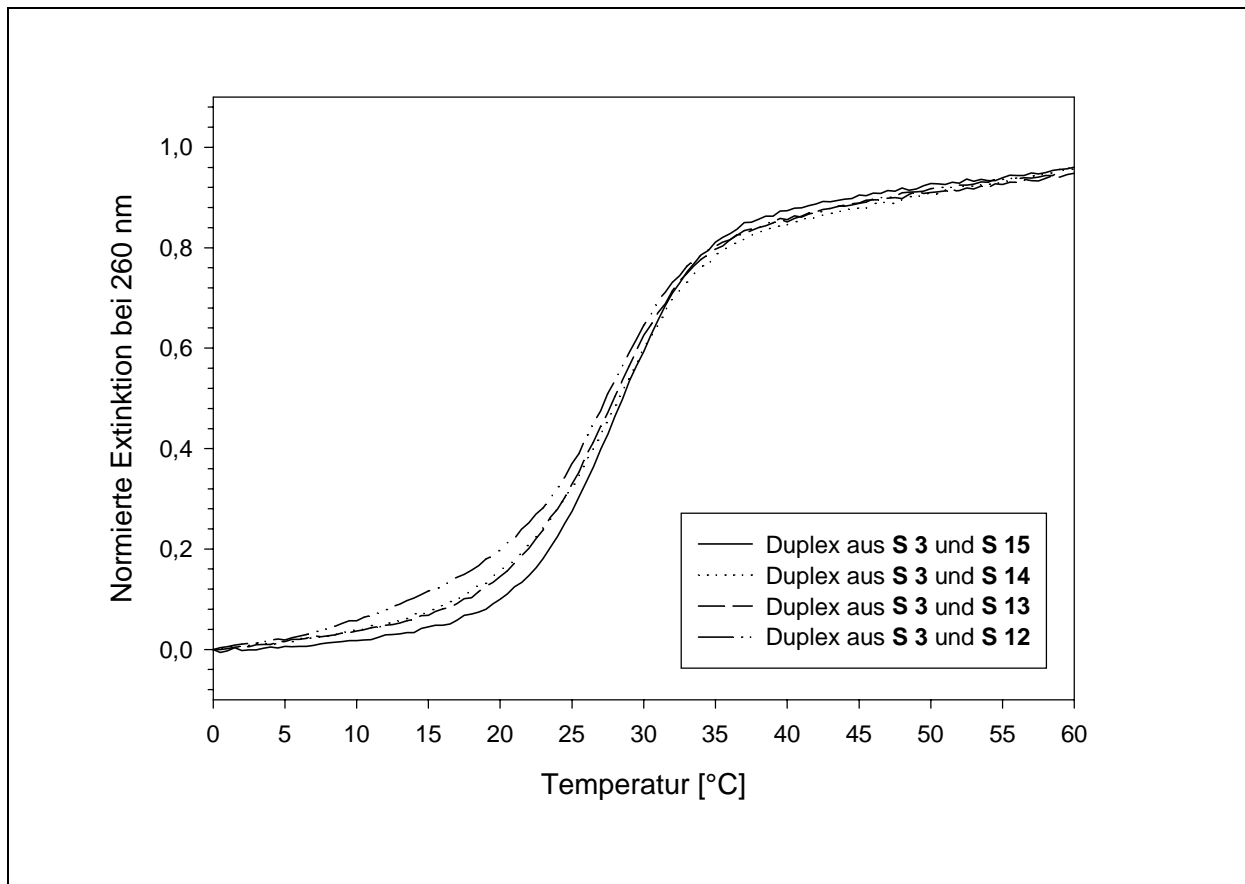


Abb. 9.8: Schmelzkurven von RNA Duplexen mit Basenpaaren von **B** und den natürlichen Nucleobasen

Nach den Fluorbenzol-Nucleosiden wurden die Fluorbenzimidazol-Nucleoside und der abasische Baustein **N** untersucht (Tabelle 9.2). Der Einbau von **D**, **E** oder **O** in eine Doppelhelix führt wie bei den Fluorbenzolen zu einer Destabilisierung des Duplex. Die Destabilisierung fällt jedoch ca. ein Grad geringer aus als bei **B**, dem Baustein mit der geringsten Destabilisierung bei den Fluorbenzol-Nucleosiden. Während die Stabilitäten der Doppelhelices mit **O** und den natürlichen Basen um 4°C schwanken, weisen die mit **D** und **E** eine deutlich geringere Schwankungsbreite auf. Die Schmelzpunkte liegen aber immer noch deutlich unter denen des Inosins. Die Fluorsubstitution wirkt sich bei den Benzimidazolen nicht so stark aus wie bei den Benzolen. Die Einführung eines Fluors führt zu keiner

Stabilisierung der Doppelhelix. Einzig die Schwankung der Stabilitäten bei Paarung mit den vier natürlichen Nukleobasen wird geringer. Führt man hingegen ein weiteres Fluoratom wie bei **E** ein, so wird die resultierende Doppelhelix zwischen 0,5 und 1°C stabiler. Dies ist auf verstärkte Basenstapelungswechselwirkungen zurückzuführen. Der Einbau des abasischen Bausteines **N** führt zu noch instabileren RNA Duplexen. Die gemessenen Schmelzpunkte liegen bei Paarung mit Adenin und Guanin bei 20,6 bzw. 20,9°C.

| Basenpaar 1. Base | Basenpaar 2. Base | T_m [°C] | ΔH^0 [kcal/mol] | $T\Delta S^0$ [kcal/mol] (T=298 K) | ΔG^0 [kcal/mol] (T=298 K) |
|----------------------|----------------------|-------------------|----------------------------|--|---|
| I | A | 31,2 ± 0,1 | 91,8 ± 2,2 | 81,7 ± 2,1 | 10,1 ± 0,1 |
| | C | 41,7 ± 0,2 | 97,9 ± 1,0 | 84,5 ± 1,0 | 13,4 ± 0,1 |
| | G | 31,7 ± 0,1 | 89,7 ± 0,9 | 79,5 ± 0,9 | 10,2 ± 0,1 |
| | U | 34,2 ± 0,1 | 91,1 ± 1,2 | 80,1 ± 1,2 | 11,0 ± 0,1 |
| D | A | 28,0 ± 0,1 | 86,7 ± 2,0 | 77,6 ± 2,0 | 9,1 ± 0,1 |
| | C | 27,5 ± 0,1 | 81,8 ± 1,2 | 72,9 ± 1,1 | 8,9 ± 0,1 |
| | G | 28,7 ± 0,1 | 84,1 ± 1,1 | 74,8 ± 1,0 | 9,3 ± 0,1 |
| | U | 28,5 ± 0,1 | 85,8 ± 1,4 | 76,6 ± 1,4 | 9,2 ± 0,1 |
| E | A | 28,4 ± 0,1 | 81,4 ± 1,1 | 72,2 ± 1,0 | 9,2 ± 0,1 |
| | C | 28,7 ± 0,1 | 81,5 ± 1,7 | 72,3 ± 1,7 | 9,2 ± 0,1 |
| | G | 29,4 ± 0,1 | 84,8 ± 1,0 | 75,3 ± 1,0 | 9,5 ± 0,1 |
| | U | 29,3 ± 0,1 | 85,3 ± 0,4 | 75,8 ± 0,4 | 9,5 ± 0,1 |
| O | A | 28,7 ± 0,2 | 81,0 ± 3,6 | 71,8 ± 3,6 | 9,2 ± 0,1 |
| | C | 25,6 ± 0,1 | 82,3 ± 0,9 | 73,8 ± 0,9 | 8,5 ± 0,1 |
| | G | 28,9 ± 0,2 | 97,4 ± 4,8 | 88,0 ± 4,9 | 9,4 ± 0,1 |
| | U | 29,4 ± 0,3 | 73,1 ± 4,7 | 63,8 ± 4,7 | 9,3 ± 0,1 |
| N | A | 20,6 ± 0,2 | 67,2 ± 1,2 | 60,0 ± 1,3 | 7,2 ± 0,1 |
| | C | 18,6 ± 0,2 | 51,3 ± 2,2 | 44,6 ± 2,2 | 6,7 ± 0,1 |
| | G | 20,9 ± 0,1 | 65,1 ± 0,4 | 57,8 ± 0,4 | 7,3 ± 0,1 |
| | U | 18,2 ± 0,2 | 58,9 ± 1,1 | 52,3 ± 1,1 | 6,6 ± 0,1 |

Tabelle 9.2: Schmelzpunkte und thermodynamische Daten von Basenpaaren aus Purin-analogen Nukleosiden und natürlichen Nukleobasen

Bei Paarung mit den Pyrimidinen Cytosin oder Uracil liegen die gemessenen Schmelzpunkte bei 18,6 bzw. 18,2°C (Tabelle 9.2). Diese drastischen Stabilitätsverluste sind in dem Verlust der Wasserstoffbrücken zwischen den Nucleobasen (der abasische Baustein besitzt keine Nucleobase und kann somit keine Wasserstoffbrücken bilden) und der Unterbrechung der Basenstapelungswechselwirkungen in der Mitte der Oligonukleotide zu sehen. Beide Wechselwirkungen zählen zu den wichtigsten Kräften, die für die Stabilität einer Doppelhelix verantwortlich sind. Die Schwankungsbreite bei Paarung von **D** und **E** mit den natürlichen Nucleobasen liegt bei maximal einem Grad Celsius. Sowohl **D** als auch **E** können deshalb ähnlich wie **B** als universelle Basen angesehen werden. Abbildung 9.9 zeigt die Schwankungsbreiten von **E**, **B** und **M** bei der Paarung mit natürlichen Nucleobasen. Dabei ist zu erkennen, daß **M** bedingt durch seine große Destabilisierung der Doppelhelix das schlechteste Beispiel für eine universelle Base ist.

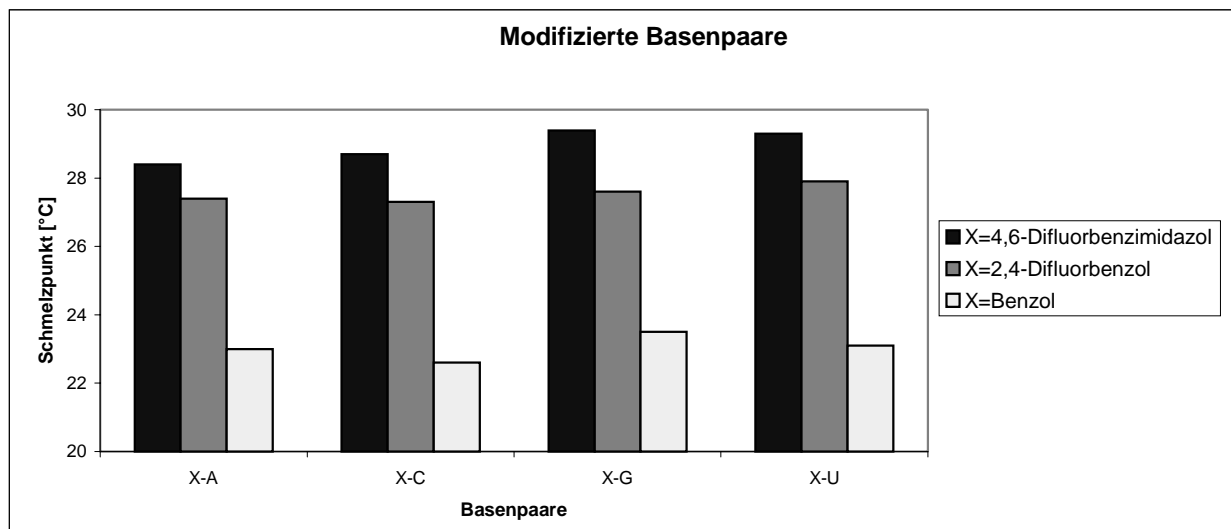


Abb. 9.9: Schwankungen der Schmelzpunkte der universellen Basen **B** (2,4-Difluorbenzol), **E** (4,6-Difluorbenzimidazol) und **M** (Benzol) bei Paarung mit den natürlichen Nucleobasen

Basenpaare aus modifizierten Nucleobasen weisen einen niedrigeren Schmelzpunkt auf als unmodifizierte Basenpaare, aber einen höheren als Basenpaare mit nur einer modifizierten Nucleobase (Tabelle 9.3). Durch den Austausch der ersten natürlichen Nucleobase durch eine modifizierte kommt es zu Stabilitätsverlusten durch Solvatationseffekte sowie durch das nicht vorhanden sein von Wasserstoffbrücken und zu einem Stabilitätsgewinn durch verstärkte Basenstapelungswechselwirkungen. Da die negativen Effekte überwiegen, nimmt der Schmelzpunkt der Doppelhelix ab. Wird die zweite natürliche Nucleobase durch eine weitere modifizierte ersetzt, so treten neue Stabilitätsverluste weder durch Solvatationseffekte noch

durch nicht vorhandene Wasserstoffbrücken auf (Abbildung 9.10). Durch verstärkte Basenstapelungswechselwirkungen der zweiten modifizierten Nucleobase nimmt der Schmelzpunkt der Doppelhelix sogar zu.

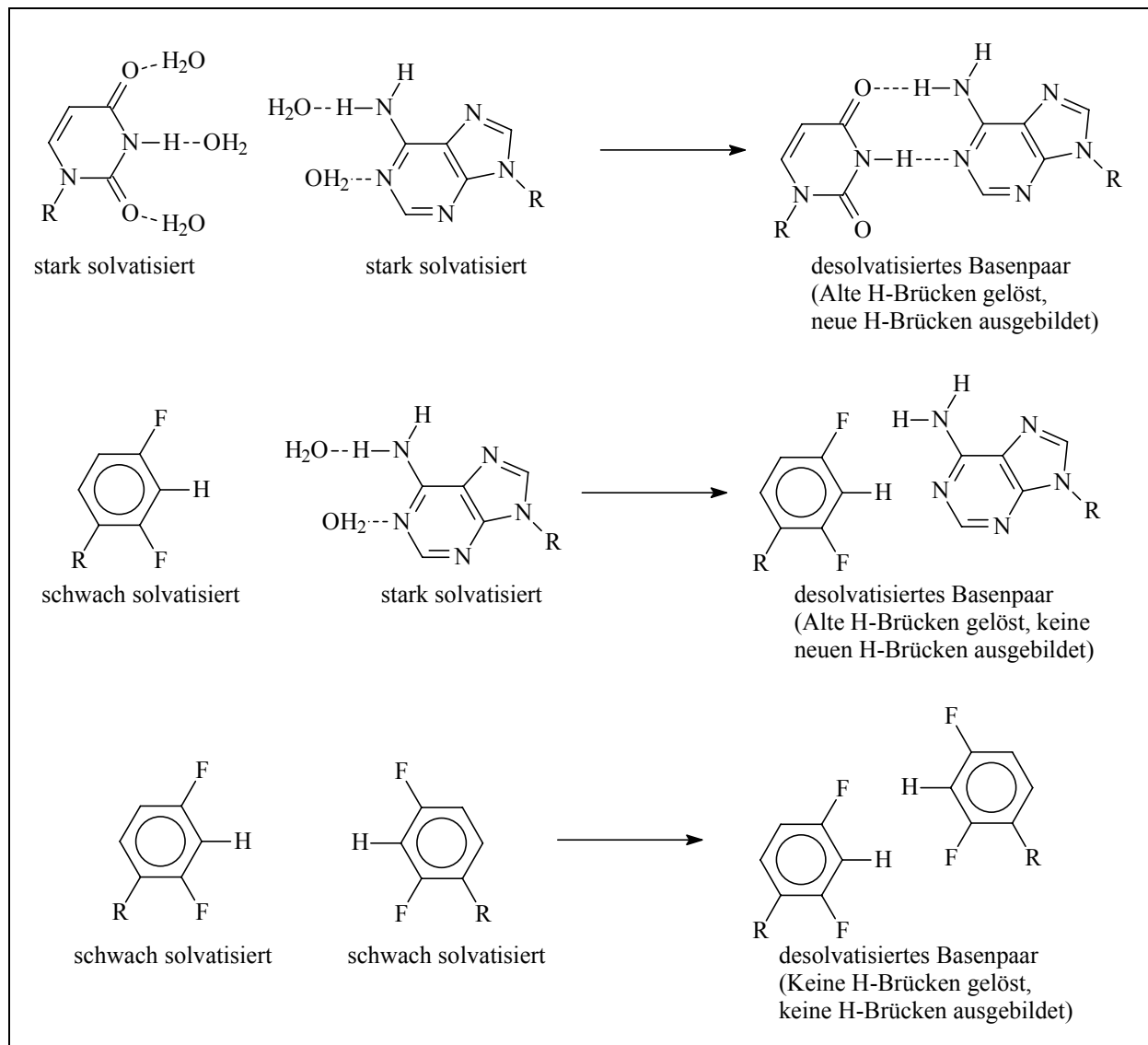


Abb. 9.10: Solvatation von Basenpaaren

In einer unmodifizierten RNA sind die Nucleobasen im Einzelstrang von Wassermolekülen umgeben, die Wasserstoffbrücken zu den Nucleobasen ausbilden. Kommt es zur Ausbildung der Doppelhelix, werden diese Wasserstoffbrücken gelöst und neue zu der gegenüberliegenden Nucleobase des zweiten RNA Stranges ausgebildet. In der Summe betrachtet wird eine Art von Wasserstoffbrücken durch eine andere ersetzt. Bei einem Basenpaar aus einer natürlichen Nucleobase und einer fluormodifizierten Base ist dies anders. Im Einzelstrang ist die modifizierte Nucleobase gar nicht oder nur schwach solvatisiert und die natürliche Nucleobase stark solvatisiert. Bei der Ausbildung des Basenpaares werden die Wasserstoffbrücken an der natürlichen Nucleobase gelöst, aber keine neuen

Wasserstoffbrücken zwischen den Nucleobasen des Basenpaares gebildet. In der Summe betrachtet werden Wasserstoffbrücken gelöst ohne neue auszubilden, was einen negativen Einfluß auf die Stabilität der resultierenden Doppelhelix hervorruft. Bei einem Basenpaar aus zwei fluormodifizierten Nucleobasen sind beide Basen im Einzelstrang gar nicht oder nur schwach solvatisiert. Bei der Ausbildung des Basenpaares werden keine Wasserstoffbrücken gelöst und keine neuen zwischen zwei Fluorbenzol-Nucleosiden ausgebildet. In der Summe betrachtet kommt es zu keinen weiteren destabilisierenden Einflüssen der Solvation auf die Stabilität der Doppelhelix (Schweitzer & Kool, 1995).

| Basenpaar 1. Base | Basenpaar 2. Base | T_m [°C] | ΔH^0 [kcal/mol] | $T\Delta S^0$ [kcal/mol] (T=298 K) | ΔG^0 [kcal/mol] (T=298 K) |
|----------------------|----------------------|-------------------|----------------------------|--|---|
| B | B | 32,5 ± 0,1 | 82,4 ± 1,4 | 72,2 ± 1,4 | 10,2 ± 0,1 |
| | F | 29,9 ± 0,1 | 84,1 ± 0,4 | 74,5 ± 0,4 | 9,6 ± 0,1 |
| | H | 31,3 ± 0,2 | 77,5 ± 4,2 | 67,7 ± 4,2 | 9,8 ± 0,1 |
| | K | 31,9 ± 0,1 | 83,5 ± 0,8 | 73,4 ± 0,7 | 10,1 ± 0,1 |
| D | B | 33,5 ± 0,2 | 88,1 ± 0,5 | 77,4 ± 0,5 | 10,7 ± 0,1 |
| | F | 30,6 ± 0,2 | 82,2 ± 2,0 | 72,4 ± 2,0 | 9,8 ± 0,1 |
| | H | 30,3 ± 0,1 | 76,8 ± 3,0 | 67,2 ± 3,0 | 9,6 ± 0,1 |
| | K | 32,8 ± 0,1 | 86,9 ± 1,0 | 76,4 ± 1,0 | 10,5 ± 0,1 |
| E | B | 34,6 ± 0,1 | 94,4 ± 1,6 | 83,2 ± 1,5 | 11,2 ± 0,1 |
| | F | 31,3 ± 0,3 | 85,0 ± 2,4 | 75,0 ± 2,4 | 10,0 ± 0,1 |
| | H | 31,4 ± 0,3 | 81,8 ± 3,5 | 71,8 ± 3,5 | 10,0 ± 0,1 |
| | K | 33,6 ± 0,1 | 87,6 ± 1,8 | 76,9 ± 1,8 | 10,7 ± 0,1 |
| N | D | 25,3 ± 0,4 | 58,1 ± 2,5 | 49,8 ± 2,5 | 8,3 ± 0,1 |
| | E | 26,3 ± 0,2 | 55,1 ± 2,0 | 44,6 ± 2,0 | 8,5 ± 0,1 |
| | O | 26,2 ± 0,2 | 130,9 ± 8,2 | 122,4 ± 8,3 | 8,5 ± 0,1 |
| | B | 22,6 ± 0,4 | 59,7 ± 1,8 | 52,0 ± 1,8 | 7,7 ± 0,1 |
| | F | 20,9 ± 0,3 | 81,9 ± 3,1 | 74,8 ± 3,0 | 7,1 ± 0,1 |
| | H | 21,0 ± 0,1 | 71,8 ± 1,7 | 64,6 ± 1,8 | 7,2 ± 0,1 |
| | K | 21,3 ± 0,1 | 75,8 ± 1,1 | 68,5 ± 1,1 | 7,3 ± 0,1 |
| | M | 19,5 ± 0,2 | 78,3 ± 3,1 | 72,0 ± 3,1 | 6,8 ± 0,1 |
| 4 O | M | 28,9 ± 0,1 | 67,1 ± 1,3 | 58,0 ± 1,4 | 9,1 ± 0,1 |

Tabelle 9.3: Schmelzpunkte und thermodynamische Daten von Basenpaaren aus modifizierten Nucleobasen

Wie schon bei den Ergebnissen aus Tabelle 9.1 beobachtet liefern die Fluorbenzol-Nukleoside mit einem Fluoratom an der 2-Position des Aromaten einen höheren Schmelzpunkt als die anderen. Außerdem sind die Schmelzpunkte mit **E** als zweiter Base immer ca. 1°C höher als mit **D**. Der Schmelzpunkt des Basenpaares aus **O** und **M**, welche keine Fluoratome enthalten, liegt deutlich unter denen der fluormodifizierten Basenpaare. Die Basenpaare mit dem abasischen Baustein **N** zeigen sehr niedrige Schmelzpunkte. Mit Hilfe dieser Werte lassen sich die Beiträge der Basenstapelungswechselwirkungen zur Stabilität der Doppelhelix berechnen (siehe Tabelle 9.6).

Abbildung 9.11 zeigt die Schmelzkurve der Doppelhelix aus Strang **S 3** und Strang **S 18**. Die Doppelhelix enthält ein **B-E** Basenpaar. Deutlich ist der sigmoidale Verlauf der Kurve zu erkennen. Die Zunahme der Extinktion beim Aufschmelzen der Doppelhelix entspricht in etwa den Werten, wie sie bei unmodifizierten Doppelhelices gemessen wurde.

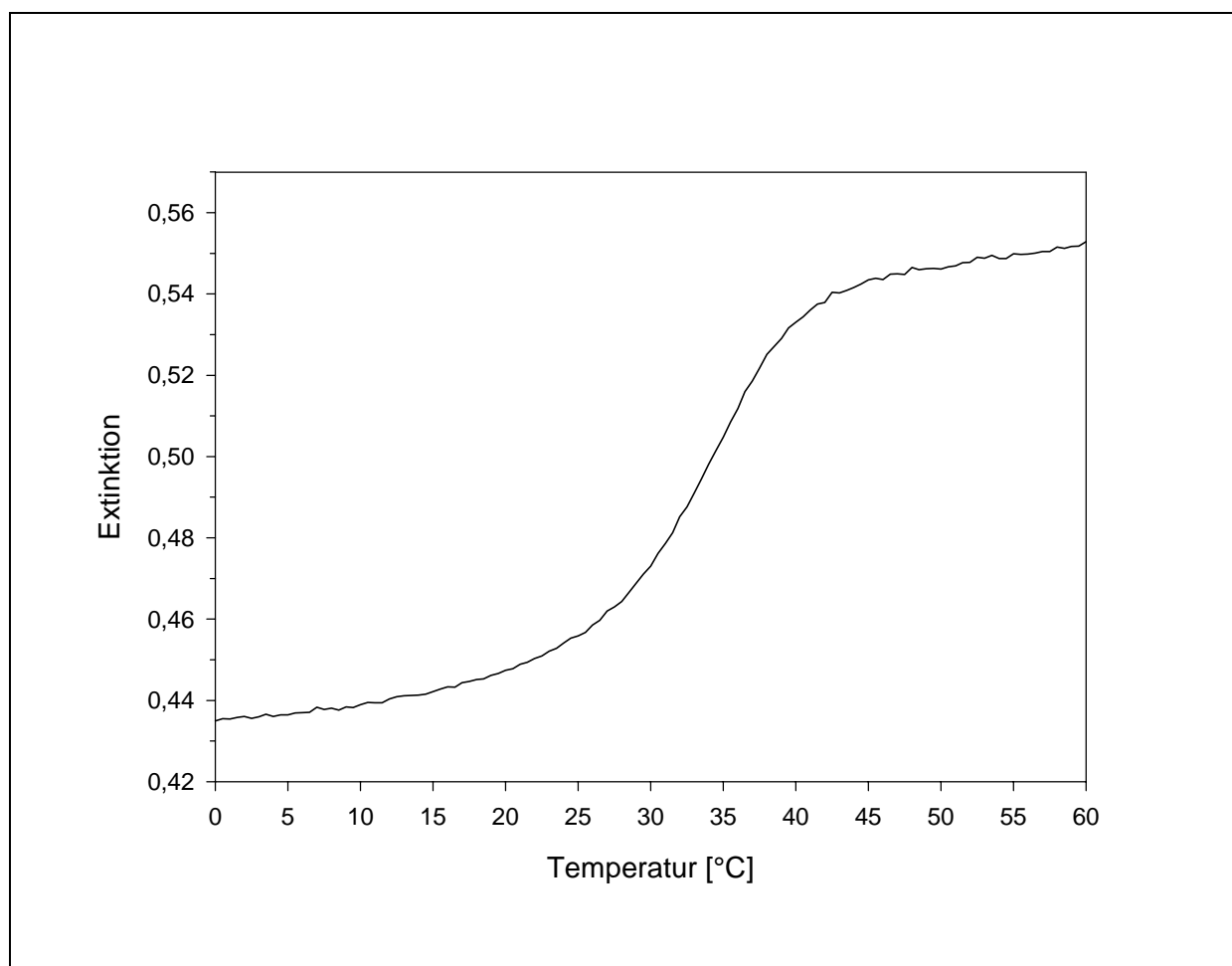


Abb. 9.11: UV-Schmelzkurve des Duplexes aus **S 3** und **S 18** (**B – E** Basenpaar)

Aus den gemessenen Schmelzpunkten der einzelnen Basenpaare lassen sich die Beiträge von Solvation und Basenstapelungswechselwirkungen der einzelnen fluormodifizierten Nukleoside berechnen. Die Berechnung wird im Folgenden anhand von **B** beschrieben. Die

einzelnen Beiträge der anderen modifizierten Nucleobasen lassen sich auf dem gleichen Weg wie für **B** beschrieben mit den entsprechenden Schmelzpunkten errechnen. Für die Berechnung der Beiträge der Solvation und der Basenstapelungswechselwirkung werden die in Tabelle 9.4 aufgeführten Schmelzpunkte benötigt.

| | Basenpaar | T_m [°C] | ΔG^0 [kcal/mol] |
|----|--------------|------------|-------------------------|
| 1) | N – U | 18,2 | 6,6 |
| 2) | U – U | 30,1 | 9,7 |
| 3) | U – B | 27,9 | 9,1 |
| 4) | B – B | 32,5 | 10,2 |
| 5) | B – N | 22,6 | 7,7 |

Tabelle 9.4: Benötigte Daten zur Berechnung der Solvations- und Basenstapelungsbeiträge von **B**.

Für die Berechnung werden das Basenpaar aus dem abasischen Baustein **N** und einem Uracil (1), ein Basenpaar aus zwei Uracilen (2), ein Basenpaar aus einem Uracil und **B** (3), ein **B-B** Basenpaar (4) und ein Basenpaar aus **B** und einem abasischen Baustein **N** (5) betrachtet. Der Beitrag durch veränderte Basenstapelungswechselwirkungen von **B** zur Stabilität der Doppelhelix im Vergleich zu einem Uracil läßt sich aus den Schmelzpunkten von (1) und (5) aus Tabelle 9.4 berechnen. Durch den Austausch von Uracil gegen **B** nimmt der Schmelzpunkt um 4,4°C zu. Dies entspricht einer Zunahme der Stabilität der Doppelhelix um 1,1 kcal/mol. Solvationseffekte brauchen bei diesem Austausch nicht beachtet zu werden, da es sich bei dem zweiten Nucleosid des Basenpaares um den abasischen Baustein handelt, der keine Nucleobase trägt und damit auch nicht an der Nucleobase solvatisiert sein kann. Es werden somit bei der Ausbildung der Doppelhelix keine Wasserstoffbrücken gelöst und damit treten auch keine negativen Einflüsse durch Solvationseffekte auf die Stabilität der Doppelhelix auf.

Den Einfluß der Solvation auf die Stabilität der Doppelhelix durch Einführung eines Difluorbenzol-Nucleosids **B** läßt sich durch Vergleich der Einträge (3) und (2) in Tabelle 9.4 berechnen. Tauscht man in einen Basenpaar aus zwei Uracilen ein Uracil gegen **B** aus, so nimmt der Schmelzpunkt um 2,2°C ab. Wie vorher berechnet nimmt der Schmelzpunkt einer Doppelhelix aber um 4,4°C durch verstärkte Basenstapelungswechselwirkungen zu, wenn ein Uridin durch **B** ersetzt wird. Der destabilisierende Einfluß von **B** auf die Stabilität einer Doppelhelix durch Solvationseffekte beträgt somit 2,2°C + 4,4°C und damit gleich 6,6°C. Dies entspricht 1,7 kcal/mol.

Die errechneten Werte können durch Vergleich der Einträge (3) und (4) in Tabelle 9.4 kontrolliert werden. Wird das zweite Uridin durch **B** in einem Basenpaar ersetzt, so sollten wie schon auf den Seiten 149-150 beschrieben, keine weiteren destabilisierenden Einflüsse durch Solvatationseffekte auf die Doppelhelix auftreten. Durch verstärkte Basenstapelungswechselwirkungen sollte der Schmelzpunkt des **B-B** Basenpaares um 4,4°C (1,1 kcal/mol) höher als der Schmelzpunkt eines **B-U** Basenpaares liegen. Der erwartete Schmelzpunkt liegt somit bei 32,3°C und die freie Enthalpie ΔG^0 bei 10,2 kcal/mol. Die gemessenen Werte liegen bei 32,5°C und 10,2 kcal/mol. Die Abweichung des Schmelzpunktes von dem berechneten Wert von 0,2°C liegt im Fehlerbereich der Messung der Schmelzpunkte, während der Wert der freien Enthalpie ΔG^0 genau vorhergesagt werden konnte.

Tabelle 9.5 zeigt die Beiträge von Solvatation und Basenstapelungswechselwirkungen auf die Stabilität einer Doppelhelix bei Einbau der in dieser Arbeit synthetisierten modifizierten Nucleoside. Die Beiträge der Benzol-Nucleoside beziehen sich auf einen Vergleich gegenüber Uridin und die der Benzimidazol-Nucleoside gegenüber Guanosin.

| Nucleosid | Stabilitätserhöhung durch verstärkte Basenstapelungswechselwirkungen | Stabilitätsverlust durch geringere Solvatation |
|------------|--|--|
| 5 B | 4,4°C; 1,1 kcal/mol | -6,6°C; -1,7 kcal/mol |
| F | 2,7°C; 0,5 kcal/mol | -7,2°C; -1,8 kcal/mol |
| H | 2,8°C; 0,6 kcal/mol | -7,2°C; -1,9 kcal/mol |
| K | 3,1°C; 0,7 kcal/mol | -6,7°C; -1,7 kcal/mol |
| M | 1,3°C; 0,2 kcal/mol | -8,3°C; -2,2 kcal/mol |
| D | 4,4°C; 1,0 kcal/mol | -6,3°C; -1,6 kcal/mol |
| E | 5,4°C; 1,2 kcal/mol | -6,5°C; -1,5 kcal/mol |
| O | 5,3°C; 1,2 kcal/mol | -6,3°C; -1,7 kcal/mol |

Tabelle 9.5: Beiträge von Solvatation und Basenstapelungswechselwirkungen der modifizierten Nucleoside bei einfachem Einbau in eine RNA-Doppelhelix

Es zeigt sich, daß alle modifizierten Nucleoside die Stabilität einer Doppelhelix durch verstärkte Basenstapelungswechselwirkungen erhöhen, durch geringere Solvatation die Stabilität aber erniedrigen. Die destabilisierenden Solvatationseffekte sind dabei immer größer als die stabilisierenden Basenstapelungswechselwirkungen. Die Solvatationseffekte sind bei allen modifizierten Nucleosiden in einer ähnlichen Größenordnung. Einzig das Benzol-Nucleosid **M** zeigt mit 8,3°C eine deutlich höhere Destabilisierung als die anderen Bausteine. Die Anzahl der Fluoratome und der Ort der Fluorsubstitution zeigen nur einen

geringen Einfluß. Im Gegensatz dazu spielt die Anzahl und der Ort der Fluorsubstitution für die Basenstapelungswechselwirkungen einen großen Einfluß. Während das nicht fluoridierte **M** die Stabilität einer Doppelhelix durch verstärkte Basenstapelungswechselwirkungen um 1,3°C erhöht, erhöhen die monofluorierten Nucleoside **F**, **H** und **K** die Stabilität um 2,7 bis 3,1°C und das doppelt fluoridierte Nucleosid **B** die Stabilität sogar um 4,4°C. Im Falle der Benzimidazole ist zwischen dem nicht fluoridierten Benzimidazol (**O**) und einfach fluoridiertem Benzimidazol (**D**) kein Unterschied zu erkennen. Die Einführung eines zweiten Fluoratoms (**E**) erhöht die Basenstapelungswechselwirkungen um ein weiteres Grad Celsius.

Durch Kenntnis dieser Werte lassen sich die Schmelzpunkte von Basenpaaren aus zwei modifizierten Nucleosiden berechnen. Ein Basenpaar aus **G** und **M** hat einen Schmelzpunkt von 23,5°C und eine freie Enthalpie ΔG^0 von 7,9 kcal/mol. Ersetzt man **G** durch das Benzimidazol-Nucleosid **O** so sollte der Schmelzpunkt um 5,3°C bzw. 1,2 kcal/mol zunehmen. Der gemessene Schmelzpunkt liegt 0,1°C höher als berechnet und die freie Enthalpie ΔG^0 stimmt mit der berechneten überein. Somit gibt es in diesem Basenpaar keine weiteren stabilisierenden Wechselwirkungen.

| | Basenpaar | T_m [°C] | ΔG^0 [kcal/mol] |
|----|--------------|------------|-------------------------|
| 1) | G – M | 23,5 | 7,9 |
| 2) | O – M | 28,9 | 9,1 |
| 3) | U – D | 28,5 | 9,2 |
| 4) | B – D | 33,5 | 10,7 |
| 5) | U – E | 29,3 | 9,5 |
| 6) | B – E | 34,6 | 11,2 |

Tabelle 9.6: Gemessene Schmelzpunkte und daraus ermittelte freie Enthalpien (ΔG^0)

Ein Basenpaar aus **U** und **D** hat einen Schmelzpunkt von 28,5°C und eine freie Enthalpie ΔG^0 von 9,2 kcal/mol. Ersetzt man **U** durch **B** so sollte der Schmelzpunkt um 4,4°C bzw. 1,1 kcal/mol zunehmen. Der Schmelzpunkt sollte bei 32,9°C und die freie Enthalpie ΔG^0 bei 10,3 kcal/mol liegen. Gemessen wurde aber ein T_m -Wert von 33,5°C und eine freie Enthalpie ΔG^0 von 10,7 kcal/mol. Der gemessene Schmelzpunkt liegt 0,6°C und die freie Enthalpie ΔG^0 0,4 kcal/mol höher als der berechnete. Führt man diese Berechnungen analog für ein Basenpaar aus **B** und **E** durch, so stellt man fest, daß der gemessene Schmelzpunkt 0,9°C und die freie Enthalpie ΔG^0 0,6 kcal/mol größer sind als berechnet. In beiden Basenpaaren (**B-D** und **B-E**) gibt es weitere stabilisierende Wechselwirkungen. Da sich die Nucleoside von denen, bei denen die Berechnungen zu den gemessenen Schmelzpunkten und errechneten freien

Enthalpien ΔG^0 Übereinstimmung lieferten, nur durch das Vorhandensein von Fluor unterscheiden, müssen diese Wechselwirkungen durch die Fluoratome bedingt sein. Bei diesen Wechselwirkungen könnte es sich um C-F...H-C Wasserstoffbrücken handeln, wie sie auch schon in den Kristallstrukturen (siehe Kapitel 7.2) der Fluorbenzol-Nukleoside gefunden wurden.

Die Stabilisierung von 0,4 kcal/mol im **B-D** Basenpaar spricht für eine C-F...H-C Wasserstoffbrücke und die Stabilisierung von 0,6 kcal/mol im **B-E** Basenpaar für zwei C-F...H-C Wasserstoffbrücken. Eine mögliche räumliche Anordnung der Basenpaare ist in Abbildung 9.12 dargestellt. Es ist davon auszugehen, daß die Nukleobase des Difluorbenzol-Nukleosids eine *syn*-Konformation über die glykosidische Bindung einnimmt. Dafür spricht die Tatsache, daß die Schmelzpunkte immer höher sind, wenn Fluor an der 2-Position des Aromaten vorkommt und daß dieses Fluor in Kristallen Wechselwirkungen zu H5'-Wasserstoffen zeigt. Durch eine leichte Verschiebung der Nukleobasen gegeneinander, wie sie auch in der natürlich vorkommenden Wobble-Basenpaarung zu beobachten ist, kann es zur Ausbildung von einer bzw. zwei C-F...H-C Wasserstoffbrücken kommen.

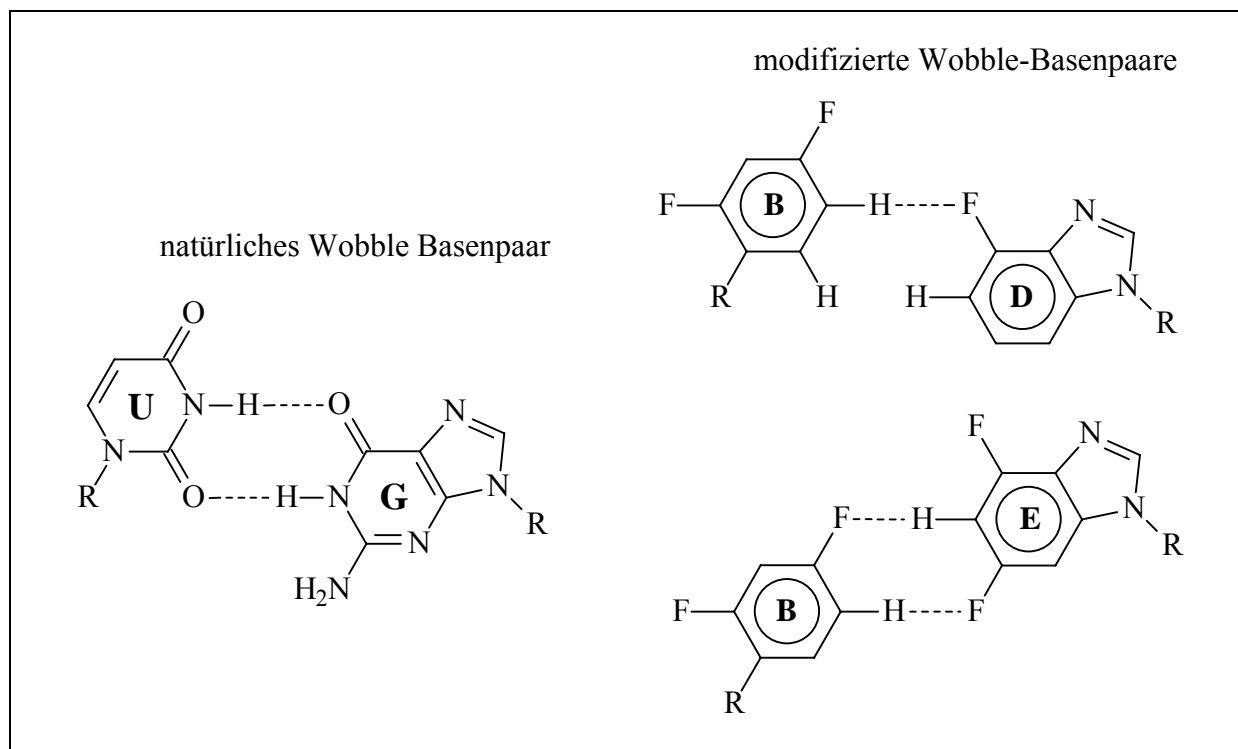


Abbildung 9.12: **B-D** und **B-E** Basenpaare

Zur Kontrolle der Richtigkeit der erhaltenen Ergebnisse der Basenstapelungswechselwirkungen wurden zwei 13mer RNA-Stränge synthetisiert. Diese Stränge enthalten sogenannte überhängende Enden (engl.: „dangling ends“). Bei der Bildung des Duplex mit einem 12mer RNA Strang bleibt die letzte Base ohne Paarungspartner. Sie bewirkt eine

Stabilisierung der Doppelhelix durch Basenstapelungswechselwirkungen. Andere Effekte treten nicht auf, so daß aus dem erhaltenen Schmelzpunkt sofort der Beitrag der Basenstapelungswechselwirkung bestimmt werden kann. Die beiden synthetisierten 13mer RNA Stränge enthielten die Fluorbenzimidazole **D** und **E** als überhängende Base. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 9.7 zusammengefaßt.

| Überhängende Base | T_m [°C] | ΔH^0 [kcal/mol] | $T\Delta S^0$ [kcal/mol] (T=298 K) | ΔG^0 [kcal/mol] (T=298 K) |
|-------------------|-------------------|-------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| D | 42,3 ± 0,2 | 95,1 ± 2,0 | 81,6 ± 1,9 | 13,5 ± 0,1 |
| E | 43,3 ± 0,1 | 92,7 ± 4,9 | 79,1 ± 4,7 | 13,6 ± 0,2 |

Tabelle 9.7: **S 27** und **S 28**

Aus den Schmelzkurven der beiden Duplexe ergeben sich stabilisierende Basenstapelungswechselwirkungen für **D** von 4,5°C bzw. 1,6 kcal/mol und für **E** von 5,5°C bzw. 1,7 kcal/mol. Diese Ergebnisse stimmen unter Beachtung der Fehlergrenzen mit den vorher ermittelten Ergebnissen überein.

Alle bisher erhaltenen Ergebnisse beziehen sich nur auf einen einfachen Einbau der modifizierten Nukleoside in der Mitte eines RNA Stranges. Um zu überprüfen, ob sich die Ergebnisse auf RNA Duplexe mit mehrfachem Einbau dieser modifizierten Nukleoside übertragen lassen, wurden Stränge synthetisiert, die jeweils drei **B-D** bzw. **B-E** Basenpaare enthalten.

| RNA Duplexe | Stränge | T_m [°C] | ΔH^0 [kcal/mol] | $T\Delta S^0$ [kcal/mol] (T=298 K) | ΔG^0 [kcal/mol] (T=298 K) |
|--|------------------------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| 5'-AAG DDD GAA AAG-3' 3'-UUC BBB CUU UUC-5' | S 23 6 S 21 | 9,0 ± 0,3 | 57,7 ± 0,7 | 52,0 ± 0,7 | 5,7 ± 0,1 |
| 5'-AAG EEE GAA AAG-3' 3'-UUC BBB CUU UUC-5' | S 24 S 21 | 13,6 ± 0,1 | 60,1 ± 0,6 | 54,2 ± 0,6 | 5,9 ± 0,1 |
| 5'-AAG DAD GDA AAG-3' 3'-UUC BUB CBU AAC-5' | S 25 S 22 | n. b. (s Abb. 9.14) | n. b. | n. b. | n. b. |
| 5'-AAG EAE GEA AAG-3' 3'-UUC BUB CBU AAC-5' | S 26 S 22 | 7,2 ± 0,5 | 66,3 ± 2,8 | 61,5 ± 3,1 | 4,8 ± 0,2 |

Tabelle 9.8: Ergebnisse der UV-Schmelzexperimente mit dreifach modifizierten RNA Duplexen

Diese drei Basenpaare wurden zusammenhängend oder alternierend in den Strang eingefügt. Dabei wurde die Sequenz des Stranges im Vergleich zu allen vorhergehenden Untersuchungen nur so weit verändert, das **U-A** Basenpaare durch die modifizierten Basenpaare ersetzt wurden. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigt Tabelle 9.8.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Schmelzpunkte der dreifach modifizierten Duplexe deutlich niedriger liegen als dies aus den vorher ermittelten Daten zu erwarten gewesen wäre. Beim Einbau von drei modifizierten Nucleosiden in eine Doppelhelix kommen das Fehlen der natürlichen Wasserstoffbrücken und Solvatationseffekte stärker zum Tragen als dies bei einem einfachen Einbau zu beobachten ist. Beim dreifachen zusammenhängenden Einbau kommt es innerhalb dieser drei modifizierten Basenpaare nur zu den schwachen C-F...H-C Wasserstoffbrücken. Der Gegenstrang kann in diesem Bereich deutlich leichter abgespalten werden als dies bei nur einer Modifikation der Fall ist. Dadurch wird die Stabilität des gesamten Stranges deutlich herabgesetzt.

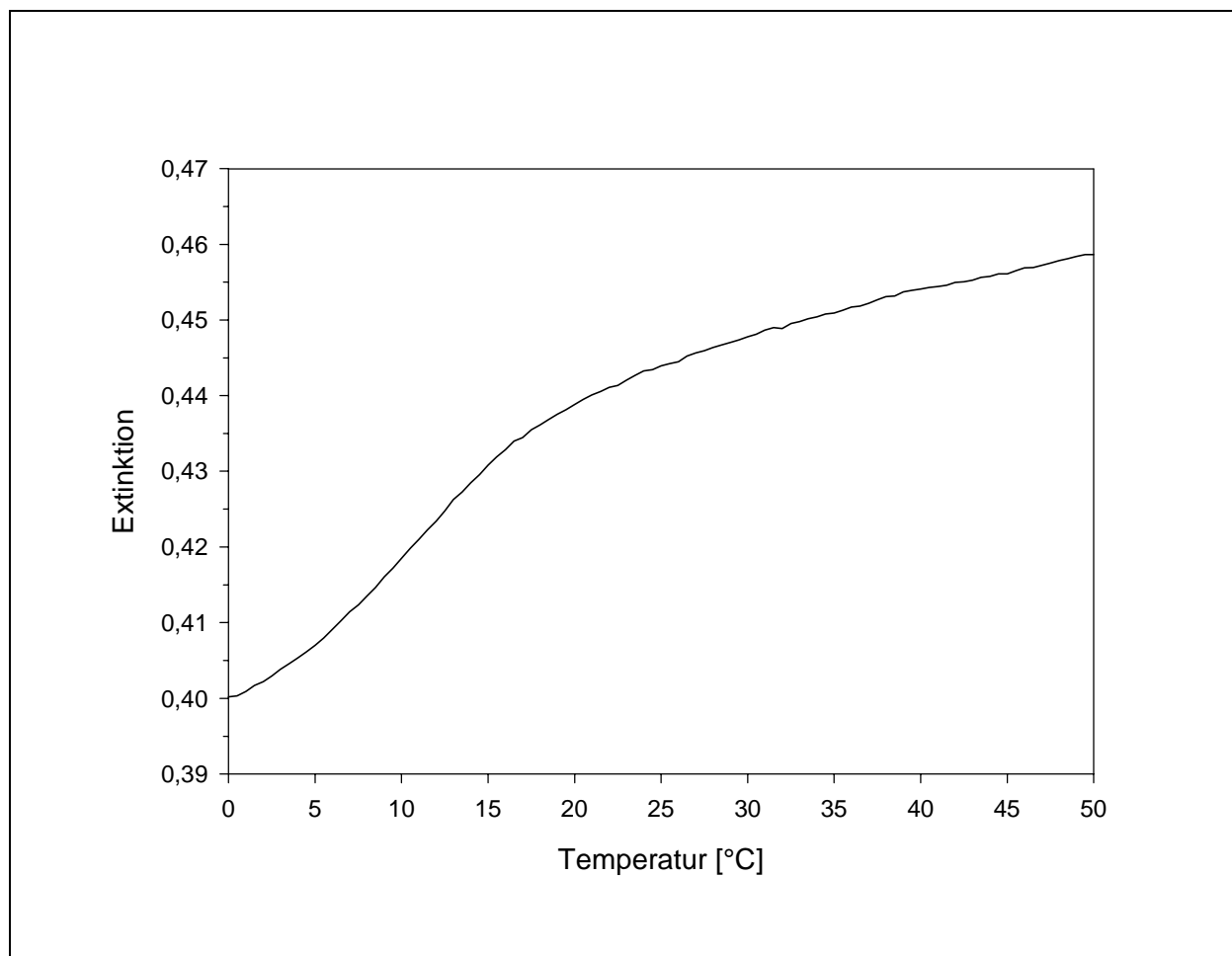


Abb. 9.13: UV-Schmelzkurve des Duplexes aus **S 21** und **S 23** (mit drei nebeneinander liegenden **B – D** Basenpaaren)

Beim dreifach alternierenden Einbau kommt es dagegen zu stärkeren Solvatationseffekten. Die lipophilen Fluoraromaten beeinflussen auch die Solvatation der Nukleobasen in ihrer direkten Nachbarschaft. Durch den alternierenden Einbau der modifizierten Nukleobasen wird direkt die Solvatation von 7 der 12 Basenpaare beeinflusst und dadurch die Stabilität der Doppelhelix noch weiter erniedrigt.

Es zeigt sich, daß die Duplexe mit **D-E** Basenpaaren stabiler sind als solche mit **B-D** Basenpaaren, unabhängig ob der Einbau zusammenhängend oder alternierend erfolgt. Dies entspricht den bei vorhergehenden Versuchen ermittelten Ergebnissen. Abbildungen 9.13 und 9.14 zeigen die Schmelzkurven der Duplexe mit drei nebeneinander liegenden **B-D** Basenpaaren und drei mit natürlichen Basenpaaren alternierenden **B-D** Basenpaaren. Aus der in Abbildung 9.14 zu sehenden Schmelzkurve konnte der Schmelzpunkt nicht bestimmt werden. Die Bestimmung der thermodynamischen Daten war in diesem Fall nicht möglich.

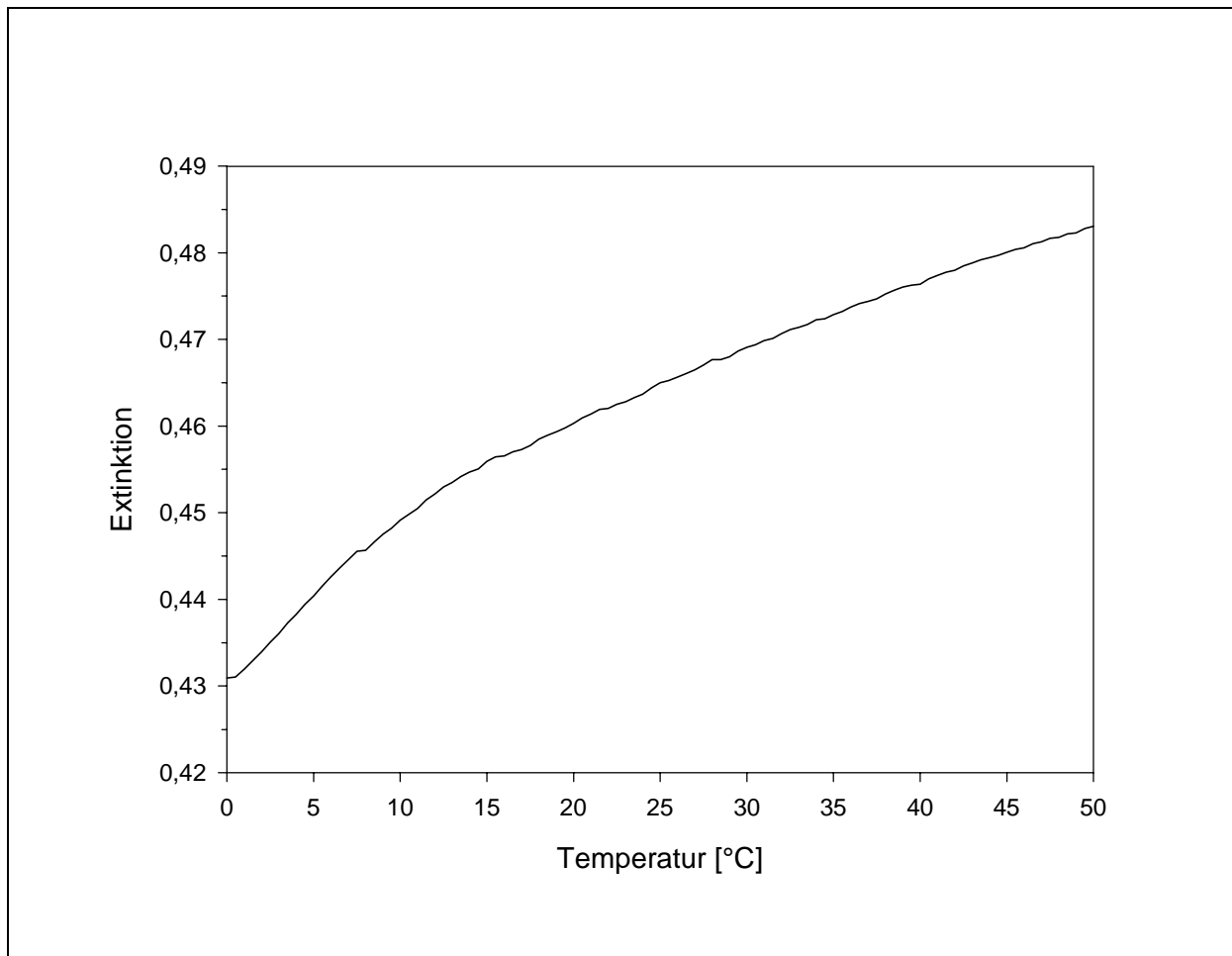


Abb. 9.14: UV-Schmelzkurve des Duplexes aus **S 22** und **S 25** (mit drei alternierend eingebauten **B – D** Basenpaaren)

Die Ergebnisse aus dem einfachen Einbau der modifizierten Nukleotide lassen sich nicht ohne weiteres auf Fälle mit mehrfachem Einbau übertragen. Der Trend zur Destabilisierung der

RNA-Doppelhelix stimmt bei mehrfachem Einbau weiterhin. Der Effekt ist allerdings nicht linear, sondern kooperativ.

9.1.3 Enthalpie – Entropie Kompensation

Enthalpie-Entropie-Kompensationen sind ein weit verbreitetes Phänomen in der molekularen Erkennung (Searle & Williams, 1993; Gallicchio *et al.*, 1998). Ihr Vorkommen ist von zentraler Bedeutung für sehr viele Vorgänge des Lebens, da diese reversibel sein müssen. Reversibilität bedeutet für diese Vorgänge, daß sie trotz großer Enthalpie- und Entropie-Werte eine niedrige freie Enthalpie aufweisen. Bei Nukleinsäuren tritt dies im Wechselspiel zwischen einerseits ausreichender Stabilität der Doppelhelix zur Erhaltung der Struktur und Basenabfolge und andererseits zur lokalen Öffnung der Doppelhelix aus Gründen der Replikation auf. Die Gründe, wieso die Enthalpie-Entropie-Kompensation überhaupt auftritt sind bis zum heutigen Tage nicht abschließend erforscht. Molekulare Assoziationen sind einerseits mit großen Exothermizitäten und andererseits mit einem starken Verlust an Entropie verbunden. Diese beiden sich kompensierenden Faktoren wurden in einer Studie genauer auf ihre einzelnen Bestandteile hin untersucht (Searle & Williams, 1993). Dabei wurden eine Reihe von Gleichungen zur Beschreibung der einzelnen Beiträge der Enthalpie, Entropie und Freien Enthalpie aufgestellt:

$$[9-28] \quad \Delta G_{\text{Helix}} = \Delta G_r + \Delta G_h + \Delta G_s + \Delta G_{\text{hb}}$$

$$[9-29] \quad \Delta H_{\text{Helix}} = \Delta H_r + \Delta H_h + \Delta H_s + \Delta H_{\text{hb}}$$

$$[9-30] \quad \Delta S_{\text{Helix}} = \Delta S_r + \Delta S_h + \Delta S_s + \Delta S_{\text{hb}}$$

(r = interne Rotoren, h = hydrophobe Wechselwirkungen, s = Basenstapelungswechselwirkungen, hb = Wasserstoffbrückenbindungen)

Durch die Einschränkung der freien Rotationen werden fast ausschließlich entropische Beiträge der freien Enthalpie erniedrigt, während die Enthalpie dieses Prozesses ungefähr Null bleibt. Der hydrophobe Effekt ist ebenfalls Entropie getrieben. Im Gegensatz dazu spielt die Enthalpie dabei fast keine Rolle. Umgekehrt ist die Ausbildung von Basenstapelungswechselwirkungen und Wasserstoffbrücken mit großen enthalpischen Anteilen verbunden, während hierbei entropische Anteile unbedeutend sind. Die

enthalpischen Anteile beruhen in der Hauptsache auf elektrostatischen Faktoren, während die entropischen Anteile im wesentlichen auf dynamische Phänomene zurückgeführt werden können.

Beispiele nichtkompensierender Messungen zeigen, daß Enthalpie-Entropie-Kompensationen thermodynamisch nicht erforderlich sind (Gallicchio *et al.*, 1998). Vielmehr beruhen Enthalpie-Entropie-Kompensationen auf einem bestimmten Muster molekularer Wechselwirkungen.

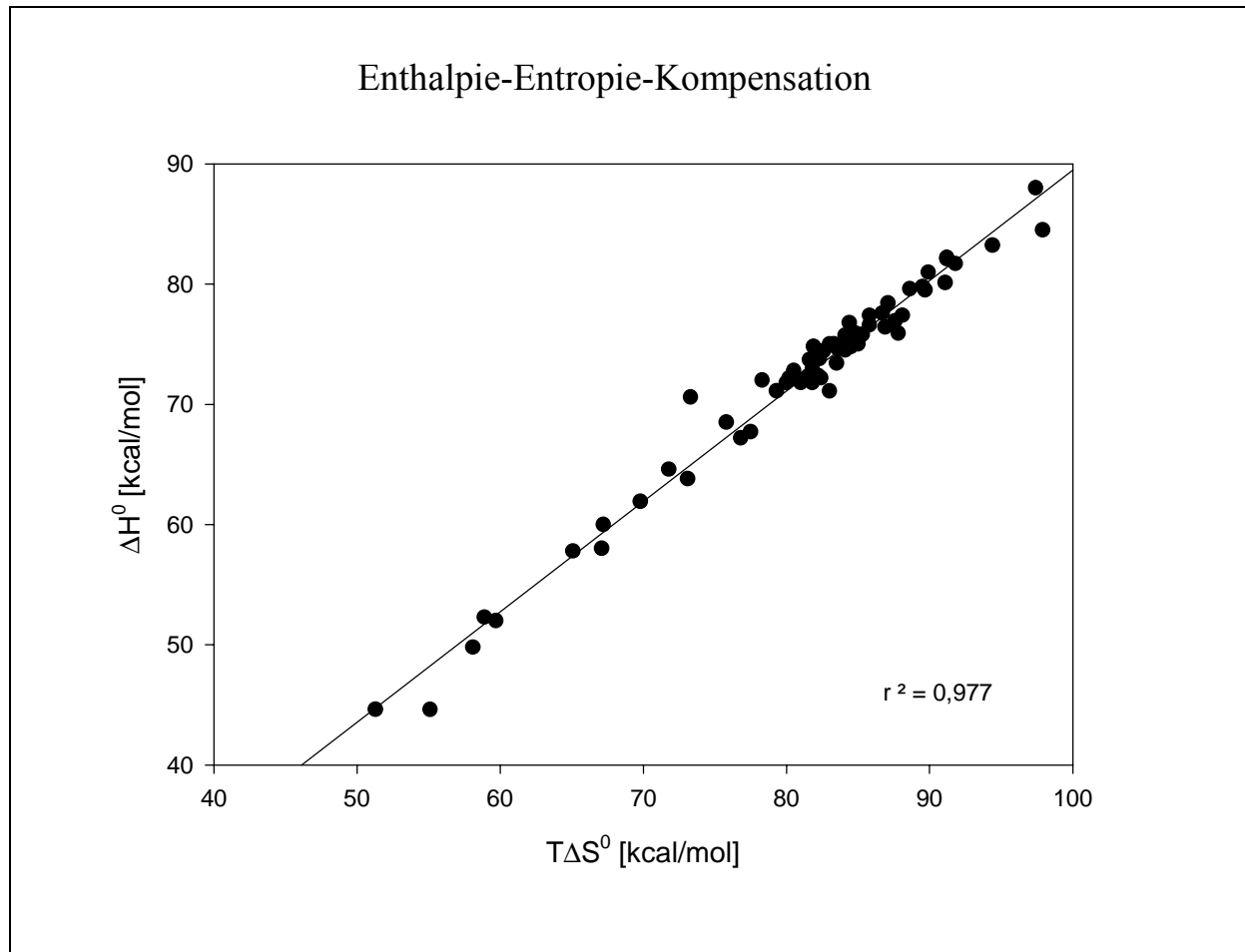


Abb. 9.15: Enthalpie-Entropie-Kompensation von allen vermessenen einfach modifizierten RNA Duplexen

Bei allen im Rahmen dieser Arbeit vermessenen RNA Duplexen wurde ebenfalls eine Enthalpie-Entropie-Kompensation festgestellt. Abbildung 9.15 zeigt dieses Ergebnis. Die Regressionsgerade weist mit $r^2 = 0,977$ einen fast idealen Wert auf. Die Abweichungen der einzelnen Werte von der idealen Ausgleichgeraden liegen im Bereich der Fehler der UV-Messungen.

9.2 CD-spektroskopische Untersuchungen

9.2.1 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie (Circular Dichroismus-Spektroskopie) ist eine chiroptische Meßmethode, die die Chiralität von Molekülen ausnutzt. Voraussetzung für die CD-Spektroskopie ist das Vorhandensein von optischer Aktivität, d.h. von unterschiedlicher Wechselwirkung mit links und rechts zirkular polarisiertem Licht.

Linear polarisiertes Licht besteht aus einem Vektor E , der nur in einer Ebene schwingt. Dieser Vektor kann in zwei Komponenten zerlegt werden. Dabei handelt es sich um die Feldvektoren E_L und E_R , die gegenläufig zirkular um die Ausbreitungsrichtung des Vektors E rotieren. E_L rotiert mit der gleichen Drehfrequenz links um den Vektor E wie E_R rechts herum. Zirkular polarisiertes Licht besteht aus Lichtwellen, deren Feldvektor sich mit seiner Spitze bei konstanter Drehgeschwindigkeit auf einem Kreis oder einer Ellipse senkrecht zur Ausbreitungsrichtung bewegt. Es entsteht, wenn zwei linear polarisierte Lichtwellen (E_1 , E_2) gleicher Frequenz mit senkrecht aufeinander stehenden Schwingungsebenen mit gleicher Amplitude aber verschobener Phase zur Überlagerung kommen (Abbildung 9.16).

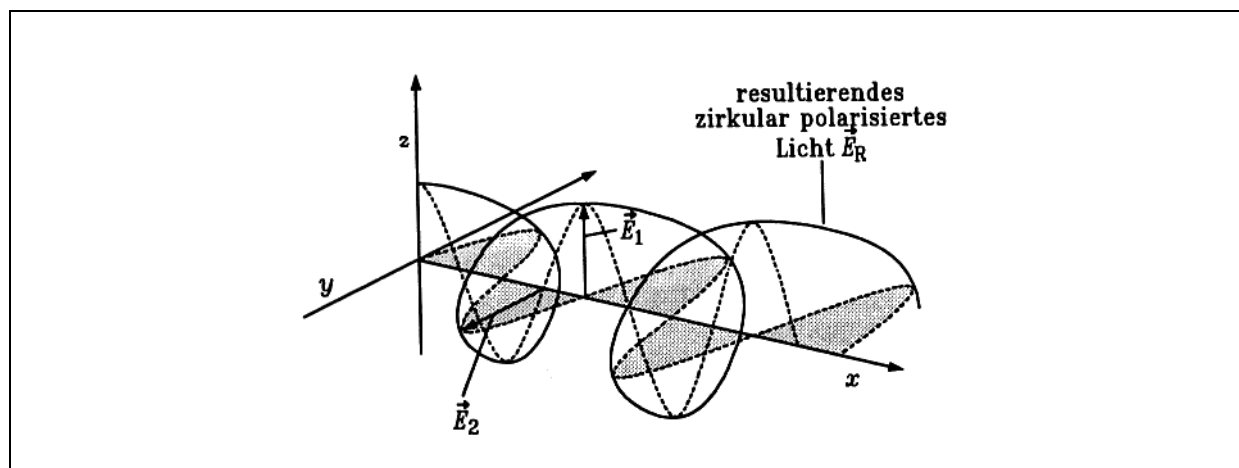


Abb. 9.16: Zirkular polarisiertes Licht (Winter & Noll, 1998)

Die CD-Spektroskopie beruht auf der Tatsache, daß einige optisch aktive Substanzen links und rechts polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbieren, d.h. daß sie unterschiedliche Extinktionskoeffizienten ϵ_L und ϵ_R für links und rechts polarisiertes Licht aufweisen. Der Unterschied der Absorption der beiden Extinktionskoeffizienten $\Delta\epsilon$ kann positiv oder negativ sein, je nachdem welches polarisierte Licht stärker absorbiert wird.

$$[9-31] \quad \Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$$

In der CD-Spektroskopie wird allerdings nicht der Unterschied der Extinktionskoeffizienten, sondern die Elliptizität Θ_λ gemessen.

$$[9-32] \quad \tan \Theta_\lambda = (I_R - I_L) / (I_R + I_L)$$

I_R und I_L sind die Intensitäten des rechts bzw. links polarisierten Lichts nach dem Absorptionsvorgang. Die Elliptizität selbst ist wellenlängenabhängig. Die Extinktionskoeffizienten und die Lichtintensitäten sind über das Lambert-Beer'sche Gesetz miteinander verknüpft. Setzt man [9-32] in das Lambert-Beer'sche Gesetz ein, so erhält man

$$[9-33] \quad \Theta_\lambda = \ln 10 \cdot (180^\circ / 4\pi) \cdot (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \cdot c_m \cdot d$$

Durch Normierung wird die spezifische Elliptizität $[\Theta]_\lambda$ erhalten.

$$[9-34] \quad [\Theta]_\lambda = \Theta_\lambda / c_m \cdot d$$

Die spezifische Elliptizität $[\Theta]_\lambda$ besitzt aus historischen Gründen die Einheit $\text{Grad} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ ($c_m = \text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$, $d = \text{dm}$). Die molare Elliptizität wiederum ist

$$[9-35] \quad [\Theta_M]_\lambda = [\Theta]_\lambda \cdot M / 100$$

M ist die Molmasse in g/mol . Zur schnelleren Berechnung der Differenz der Extinktionskoeffizienten aus den molaren Elliptizitäten lassen sich die Konstanten zusammenfassen und man erhält

$$[9-36] \quad [\Theta_M]_\lambda = 3298 \cdot \Delta\varepsilon$$

In einem CD-Spektrum wird standardmäßig die Elliptizität als Funktion der Wellenlänge aufgetragen. Bei CD-Messungen werden positive und negative Werte erhalten. Bei positiven Werten spricht man von einem positiven Cotton-Effekt und bei negativen Werten von einem negativen Cotton-Effekt. Typische Werte für die Elliptizität liegen bei $10^5 \text{ Grad} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$, welches einer Differenz der Extinktionskoeffizienten von weniger als $100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ entspricht. Erlaubte Übergänge können aber Extinktionskoeffizienten bis zu $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ besitzen, woraus deutlich wird, daß der Effekt des Circular Dichroismus sehr klein ist.

Die CD-Spektroskopie eignet sich sehr gut für Untersuchungen von Biomakromolekülen. Sie wird deshalb häufig zur Untersuchung der Struktur von Nucleinsäuren eingesetzt. Bei den Nucleinsäuren sind die Zucker die Träger der für die CD-Spektroskopie wichtigen Chiralität. Sie induzieren den zirkularen Dichroismus in den Absorptionsbanden der chromophoren Nucleobasen. Ein CD-Spektrum liefert allerdings keine genau Strukturinformation, sondern nur ein strukturabhängiges Gesamtbild. Die Intensität und die Lage einzelner Banden kann nur im Vergleich mit Spektren bekannter Strukturen interpretiert werden. CD-Spektren sind allerdings nicht nur von der Struktur, sondern auch von der Sequenz des untersuchten Oligonucleotids abhängig. Es ist deshalb besondere Vorsicht beim Vergleich zweier CD-Spektren von Oligonucleotiden verschiedener Sequenz geboten. Trotzdem bietet die CD-Spektroskopie eine Reihe von Vorteilen. Dies sind ihre Empfindlichkeit gegenüber Veränderungen in der Struktur der zu untersuchenden Moleküle, ihre nicht destruktive Natur, die einfache Durchführbarkeit der Messung und die geringe erforderliche Probenmenge (Gray *et al.*, 1992).

Die ersten CD Untersuchungen von Nucleinsäuren wurden 1963 von Brahm durchgeführt (Brahm, 1963). Die Unterschiede zwischen den CD-Spektren von DNA und RNA wurden in den folgenden Jahren intensiv untersucht und beschrieben (Brahm, 1964; Brahm, 1965; Brahm & Mommaerts, 1964; Bush & Brahm, 1967; Brahm *et al.*, 1967). Abbildung 9.17 zeigt jeweils ein Spektrum einer A-DNA und einer B-DNA. Die Änderung der Struktur der Helix führt zu deutlichen Veränderungen im CD-Spektrum.

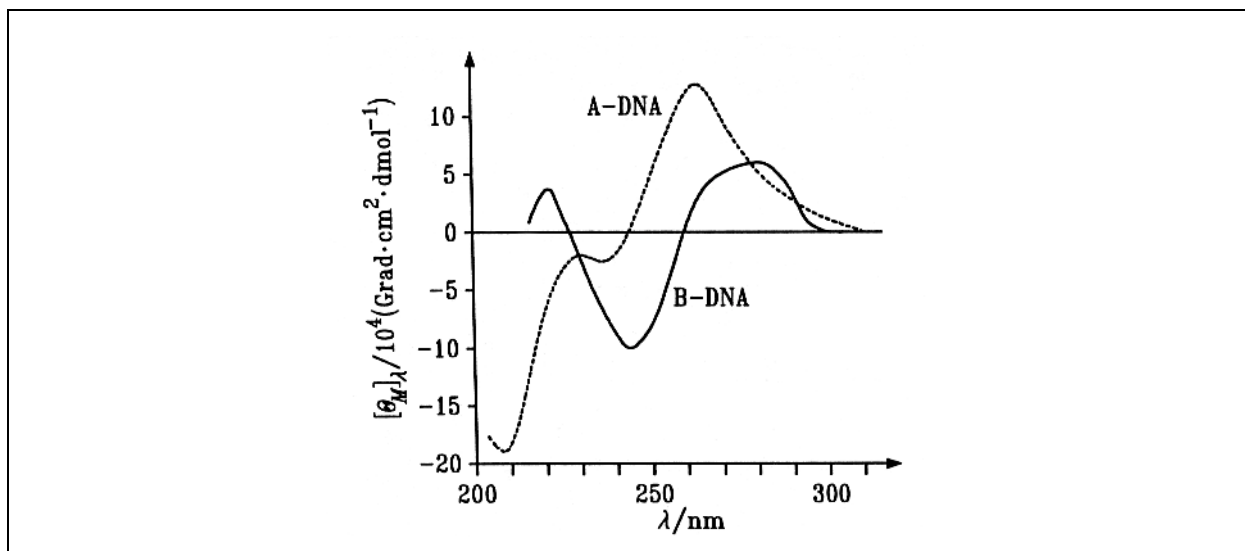


Abb. 9.17: CD-Spektrum einer A-DNA und einer B-DNA (Winter & Noll, 1998)

Das CD-Spektrum der B-DNA zeigt ein Maximum bei ca. 282 nm und ein Minimum bei ca. 245 nm. Ein weiteres Maximum liegt bei ca. 220 nm. Bei ca. 258 nm wechselt die Elliptizität

von positiv nach negativ und bei ca. 228 nm wieder in den positiven Bereich. Im Gegensatz dazu zeigt das Spektrum einer A-DNA nur einen Durchgang durch die Nulllinie bei ca. 242 nm. Ein Maximum im positiven Bereich liegt bei ca. 260 nm und ein Maximum im negativen Bereich bei ca. 228 nm. Die beiden Minima liegen bei ca. 237 nm und bei ca. 208 nm.

Während sich die Form der Spektren der A-DNA oder der B-DNA nicht verändert, ist eine Verschiebung der Lage der Maxima und der Minima von wenigen Nanometern bedingt durch die Sequenzabhängigkeit möglich. Der Vergleich von Spektren von Oligonukleotiden gleicher Sequenz erlaubt dagegen auch die vorsichtige Interpretation von Verschiebungen der Maxima und Minima um wenige Nanometer auf die Struktur der Doppelhelix.

Die in Rahmen dieser Arbeit durchgeführten CD-Messungen wurden an einem JASCO J-710 Spektrometer mit einem thermostatisierten Küvettenhalter ausgeführt. Für die Messungen wurden die gleichen Proben wie für die UV-Spektroskopie verwendet. Einzelheiten zur Durchführung der CD-Experimente befinden sich in Kapitel 11.7.

9.2.2 Ergebnisse der CD-Spektroskopie

CD-Spektroskopische Untersuchungen wurden an RNA Einzelsträngen und an RNA Duplexen durchgeführt. Die Untersuchungen an RNA Duplexen wurden bei verschiedenen Temperaturen ausgeführt. Dabei wurden die Temperaturen so gewählt, daß immer mindestens zwei Spektren bei Temperaturen unterhalb und zwei Spektren oberhalb des Schmelzpunktes aufgenommen wurden. Eine Messung von temperaturabhängigen CD-Spektren war wegen eines Defekts am Thermostat des Spektrometers nicht möglich.

Zuerst wurden einige RNA Einzelstränge vermessen. Die erhaltenen CD-Spektren sind in Abbildung 9.18 zu sehen. Aus den Spektren läßt sich erkennen, daß die Einzelstränge schon eine gewisse strukturelle Vororientierung zeigen. Diese Vororientierung entspricht allerdings nicht der Struktur des Typs einer A-, B- oder Z-DNA. Die größte Übereinstimmung dieser Spektren liegt mit dem Spektrum einer A-DNA vor. Es sind positive Maxima im Bereich von ca. 270 nm zu erkennen. Anschließend wird die Nulllinie bei ca. 255 nm durchbrochen. Soweit ist die Übereinstimmung mit einer A-DNA gegeben. In den Spektren der Einzelstränge ist im Bereich kleiner 255 nm keine definierte Struktur mehr ersichtlich, wodurch sich die Spektren deutlich von denen einer A-DNA unterscheiden. Es läßt sich somit festhalten, daß eine Vororientierung vorliegt, die eine gewisse Ähnlichkeit mit der einer A-DNA aufweist, ohne jedoch die exakte Struktur nachzuahmen.

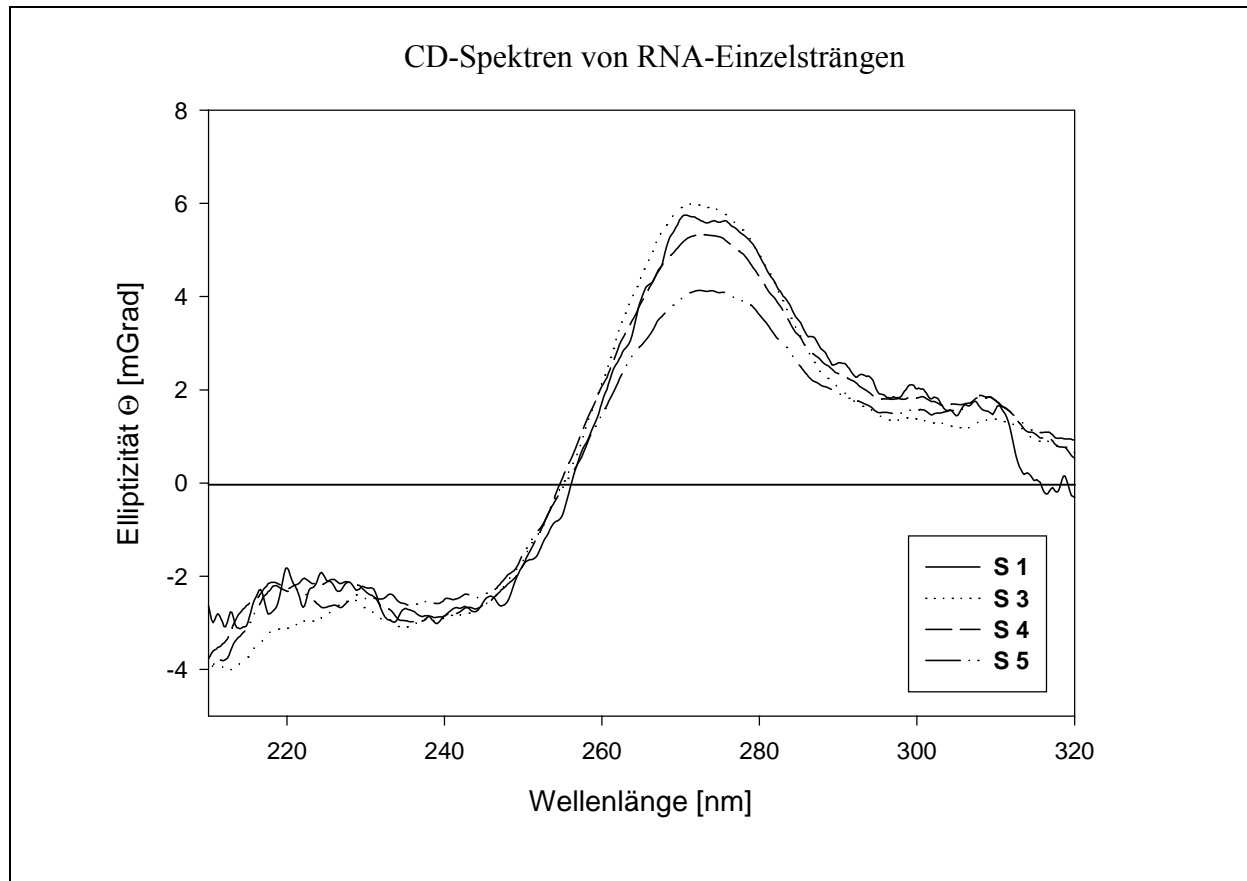


Abb. 9.18: CD-Spektren von RNA-Einzelsträngen mit und ohne modifizierte Nucleoside vermessen bei 10°C

Die Untersuchungen der RNA Duplexe wurden bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Bei 10°C als niedrigster Temperatur wurde das erste Spektrum aufgenommen. Alle weiteren 10°C wurde ein Spektrum gemessen und so eine Reihe von Spektren über einen Bereich von 40-50°C erhalten. In den Abbildungen 9.19 – 9.22 sind solche Spektren von unmodifizierten und von einfach modifizierten Duplexen abgebildet. Mit einfach modifizierten Duplexen sind solche Duplexe gemeint, die ein modifiziertes Nucleosid enthalten. Der entsprechende Gegenstrang ist in diesen Fällen unmodifiziert. Alle in den Abbildungen 9.19 – 9.22 gezeigten Duplexe zeigen eine A-DNA Struktur. Mit zunehmender Temperatur beginnt die Struktur, wie zu erwarten, aufzubrechen. Dies kann deutlich im Bereich von ca. 270 und ca. 210 nm beobachtet werden. In beiden Bereichen nimmt mit steigender Temperatur die Intensität deutlich ab. Der größte Abfall der Intensität in diesen Bereichen ist im Vergleich der beiden Spektren zu beobachten, die direkt unterhalb bzw. direkt oberhalb des Schmelzpunktes des Duplexes gemessen wurden. Ein Unterschied in diesem Verhalten zwischen den unmodifizierten Strängen und den einfach modifizierten Strängen kann nicht festgestellt werden.

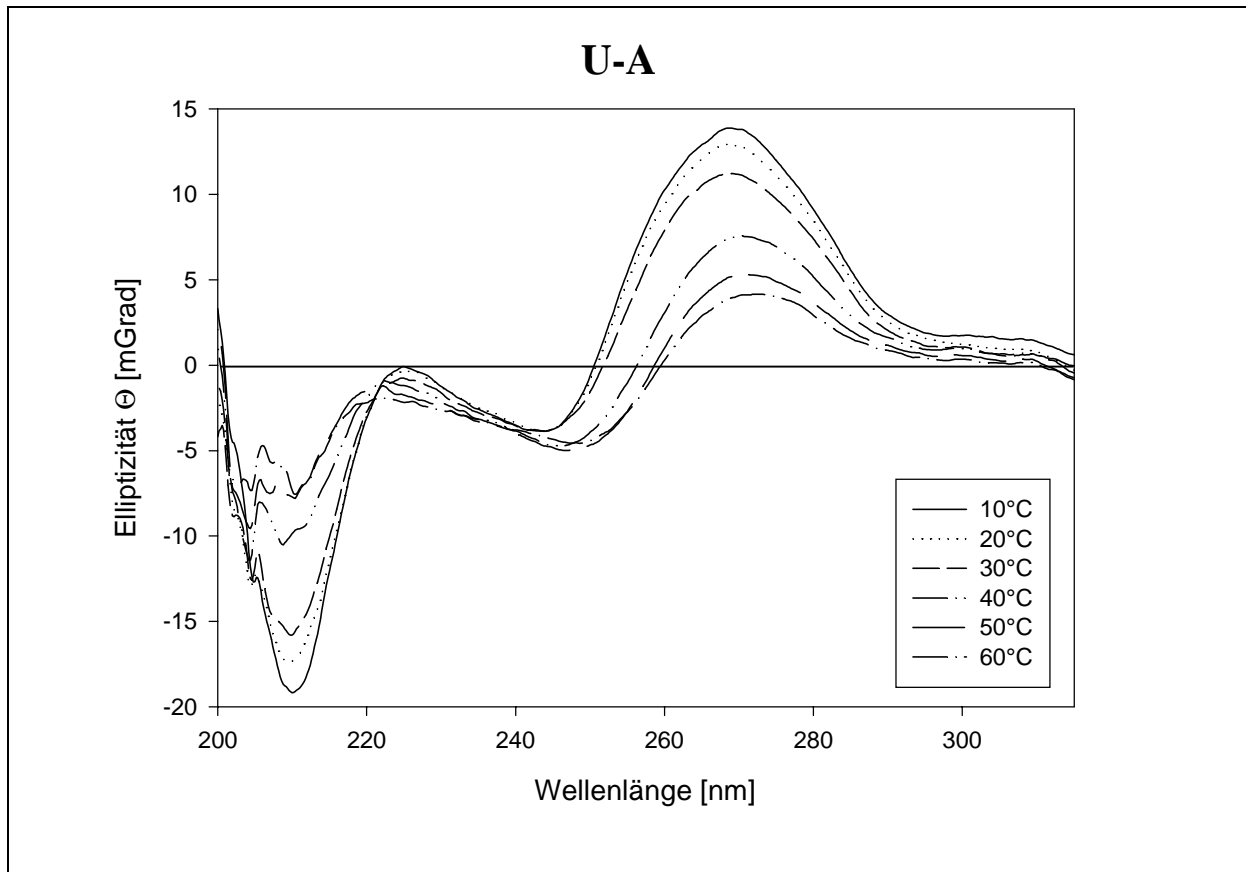


Abb. 9.19: CD-Spektren des RNA Duplex aus S 1 und S 12 bei verschiedenen Temperaturen

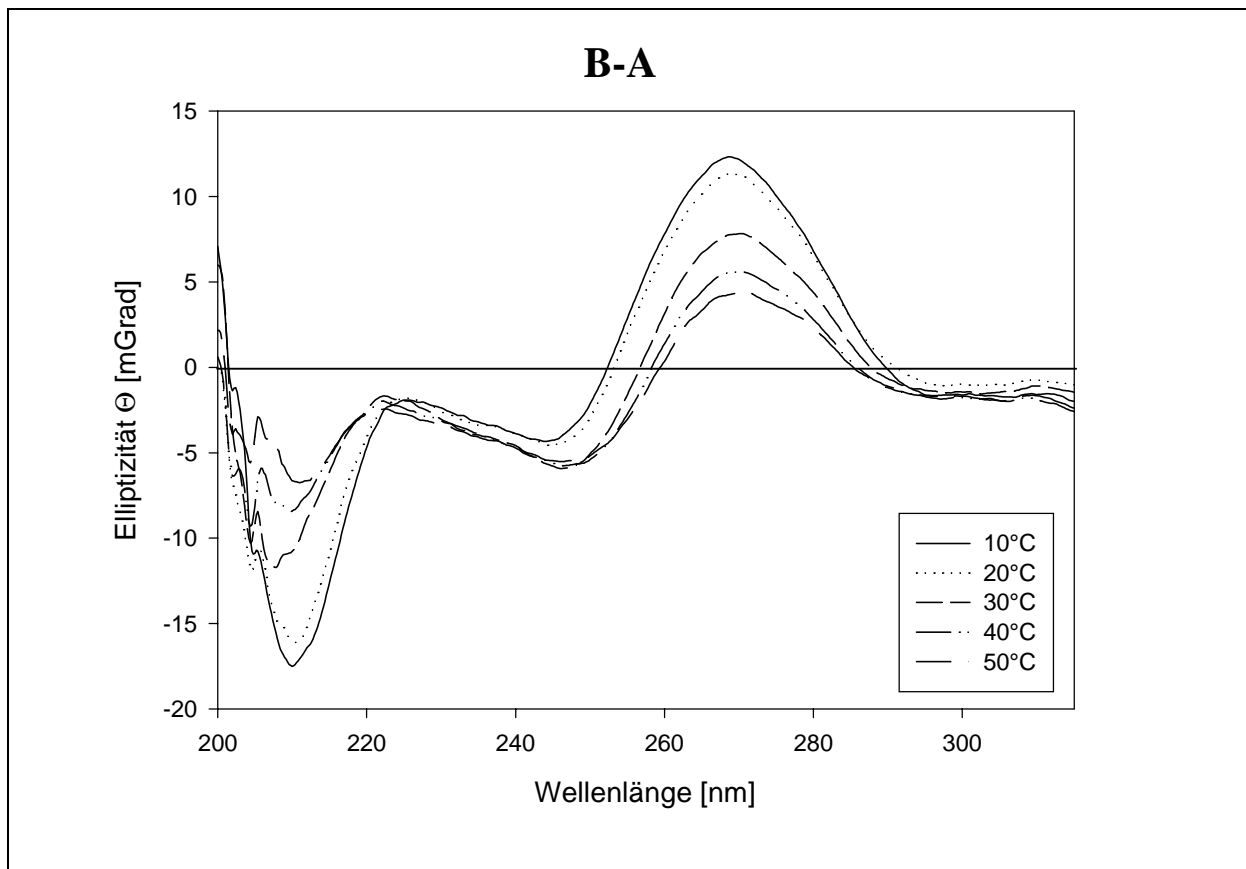
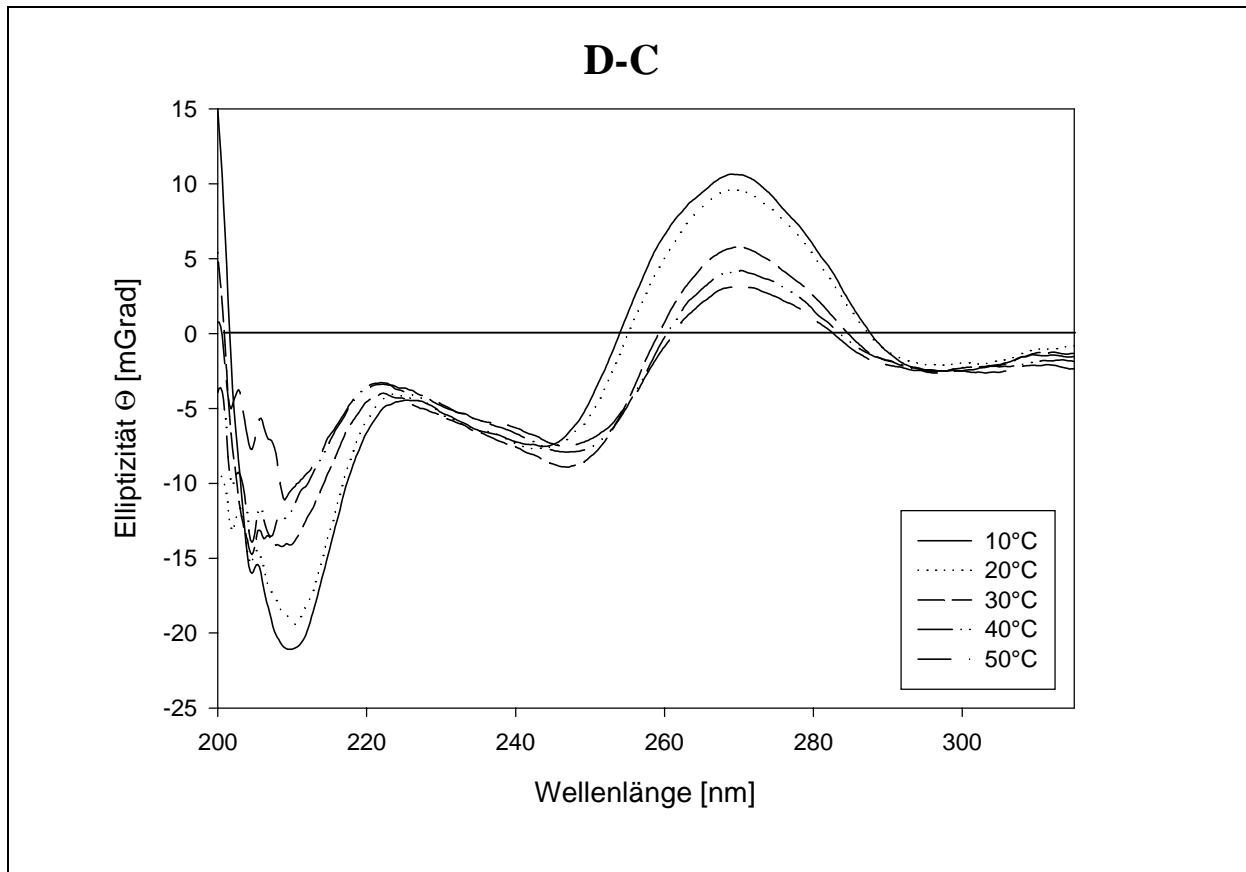
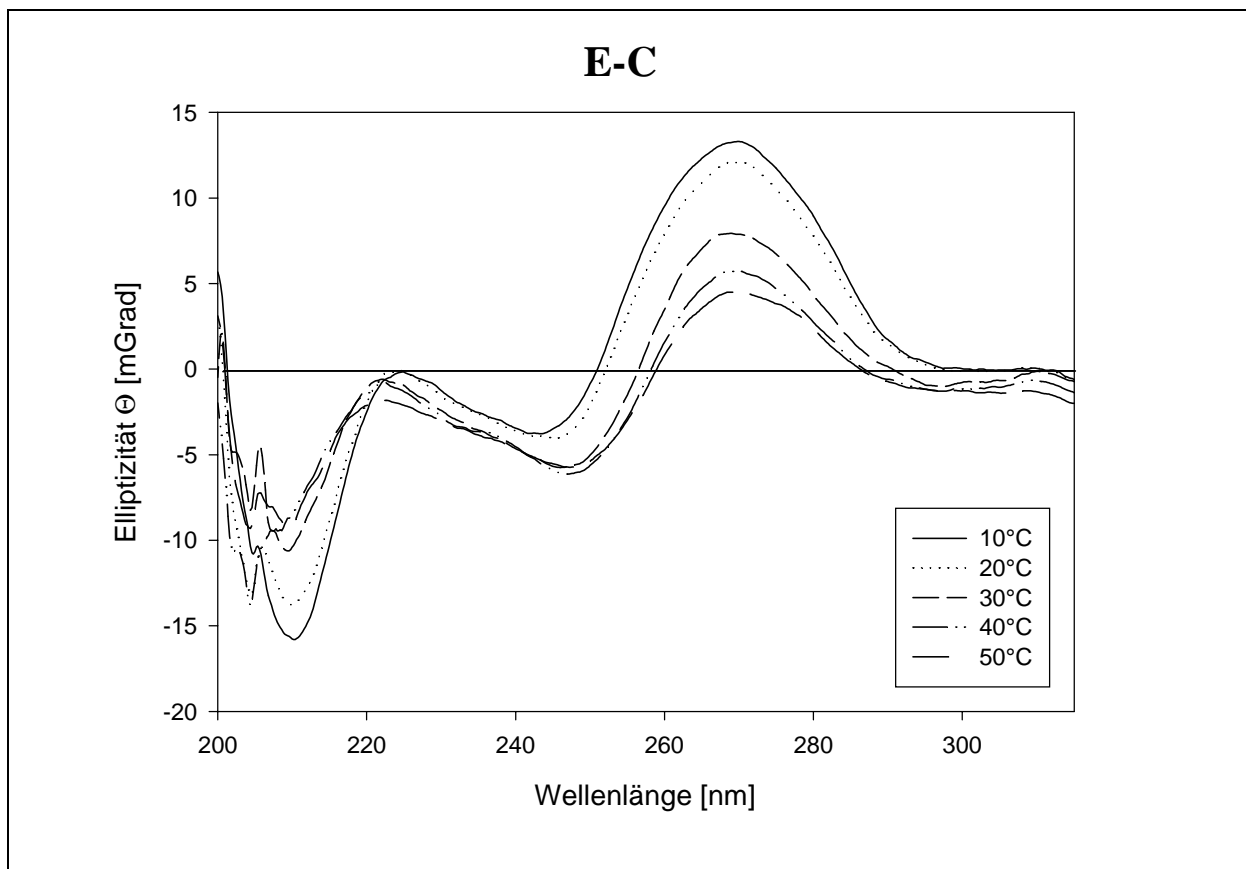


Abb. 9.20: CD-Spektren des RNA Duplex aus S 3 und S 12 bei verschiedenen Temperaturen

Abb. 9.21: CD-Spektren des RNA Duplex aus **S 4** und **S 13** bei verschiedenen TemperaturenAbb. 9.22: CD-Spektren des RNA Duplex aus **S 5** und **S 13** bei verschiedenen Temperaturen

UV-spektroskopische Untersuchungen von einfach modifizierten RNA Duplexen mit dem Difluorbenzol-Nukleosid **B** haben ergeben, daß **B** als universelle Base fungieren kann. Es stellte sich die Frage, ob sich die Strukturen der Duplexe mit Basenpaaren aus **B** und den natürlichen Nucleobasen unterscheiden oder nicht. Dazu wurden die in Abbildung 9.23 zu sehenden Spektren aufgenommen. Sie zeigen, daß es keine Unterschiede in den Strukturen gibt. Sowohl die Intensitäten der Maxima als auch die Wellenlängen, bei denen die Nulllinie passiert wird, unterscheiden sich nur minimal. Anhand dieser geringen Unterschiede lassen sich keine Veränderungen der Struktur aufgrund des Einbaus des modifizierten Nucleosids aus dem Spektrum ablesen. Die Struktur wird somit durch den Einbau des Difluorbenzol-Nucleosids **B** nicht beeinträchtigt.

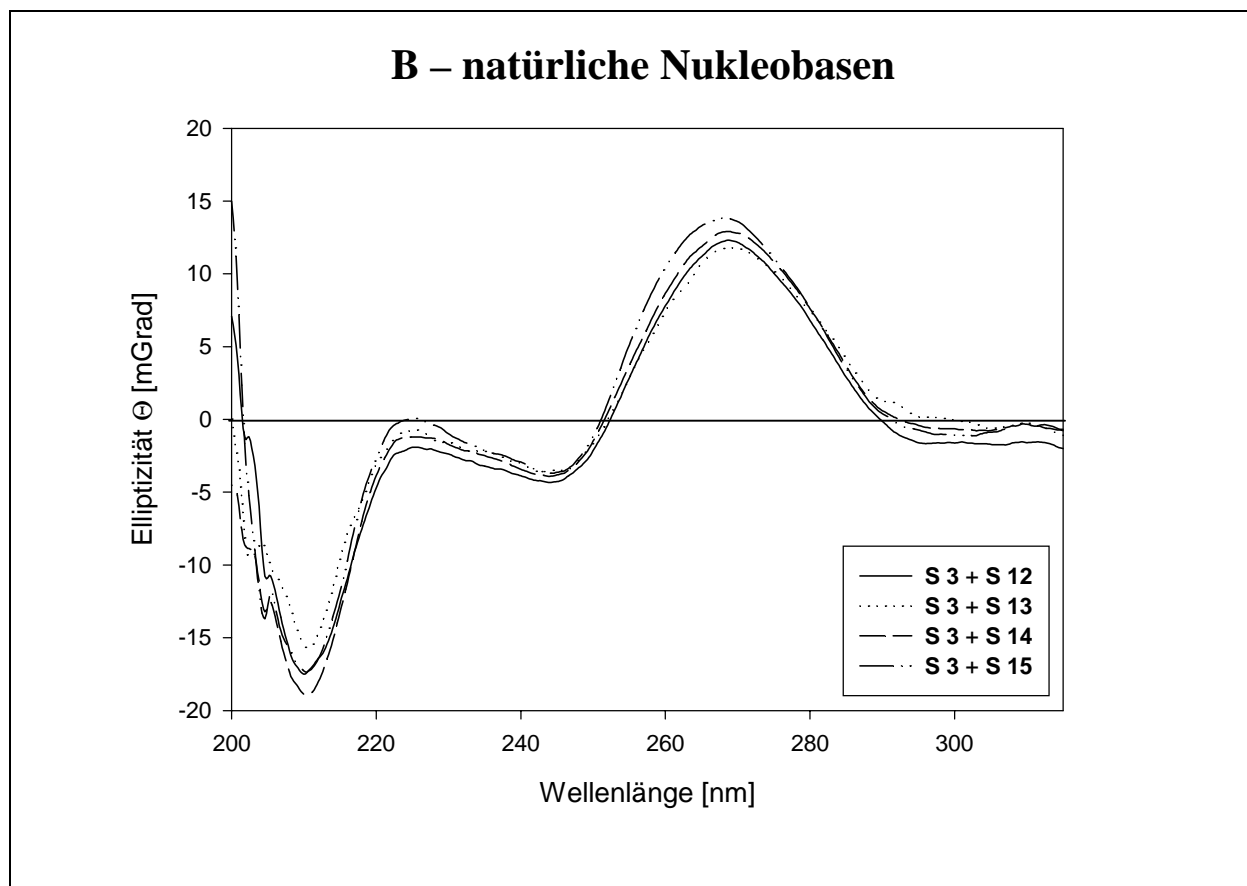


Abb. 9.23: CD-Spektren der RNA Duplexe mit Basenpaaren aus **B** und den natürlichen Nucleobasen bei 10°C

Nachdem gezeigt werden konnte, daß sich die Duplexe bei denen eine modifizierte Nucleobase mit je einer der vier natürlichen Nucleobasen gepaart ist nicht unterscheiden, wurde untersucht, in wie weit sich Duplexe mit z.B. einem Inosin bzw. den Fluorbenzimidazolen unterscheiden. Die gemessenen Spektren sind in Abbildung 9.24 zu sehen. Es zeigt sich, daß sich die Spektren mit einem Inosin (**S 2**) bzw. mit einem Difluor-

benzimidazol **E** (**S 5**) so gut wie nicht unterscheiden. Bei einem Einbau des Fluorbenzimidazols **D** (**S 4**) resultiert ein geringfügig verändertes CD-Spektrum. Nur im negativen Bereich des Spektrum kommt es zu etwas stärkeren Intensitäten, aber zu keiner relevanten Verschiebung der Maxima oder Minima.

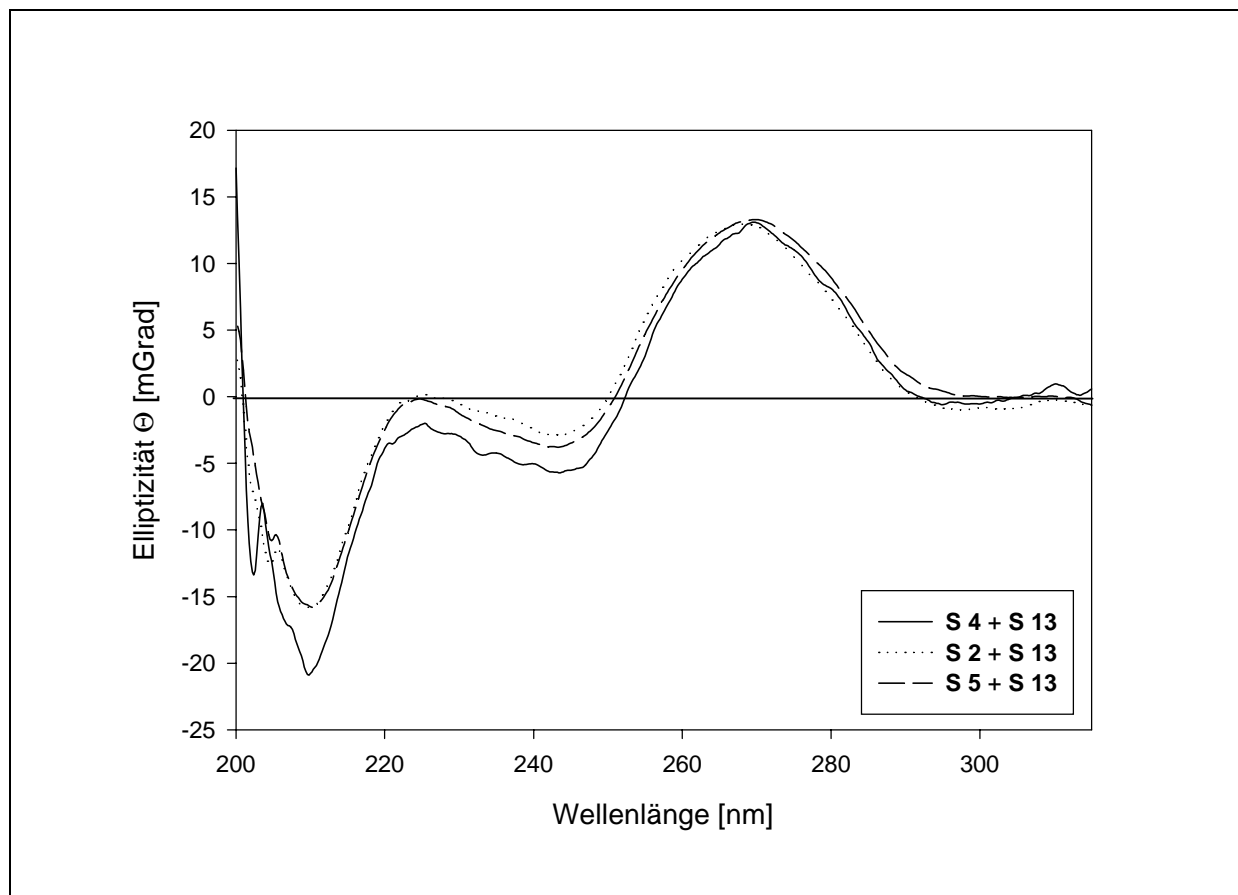


Abb. 9.24: CD-Spektren der RNA Duplexe mit Basenpaaren aus Inosin bzw. den Fluorbenzimidazolen **D** und **E** und Cytosin bei 10°C

Die gleichen Messungen wurden auch mit den Fluorbenzolen durchgeführt. Die erhaltenen Spektren wurden mit dem Spektrum des Duplexes verglichen, der ein Uracil-Adenin Basenpaar an der Modifikationsstelle hat (Abbildung 9.25). Alle diese Spektren wurden bei 10°C aufgenommen, um zu garantieren, daß die vermessenen Stränge als Duplexe vorliegen. Das Ergebnis ist dem der Fluorbenzimidazole ähnlich. Alle Spektren ähneln sich sehr, nur das Spektrum mit dem Benzol-Nukleosid **M** (**S 9**) zeigt im Bereich kleiner 250 nm im Gegensatz zu den anderen deutlich niedrigere Intensitäten.

Dadurch, daß sich die CD-Spektren von unmodifizierten und modifizierten Duplexen kaum unterscheiden, kann geschlossen werden, daß der Einbau eines in dieser Arbeit synthetisierten modifizierten Nukleosids so gut wie keinen Einfluß auf die Struktur der resultierenden Doppelhelix hat.

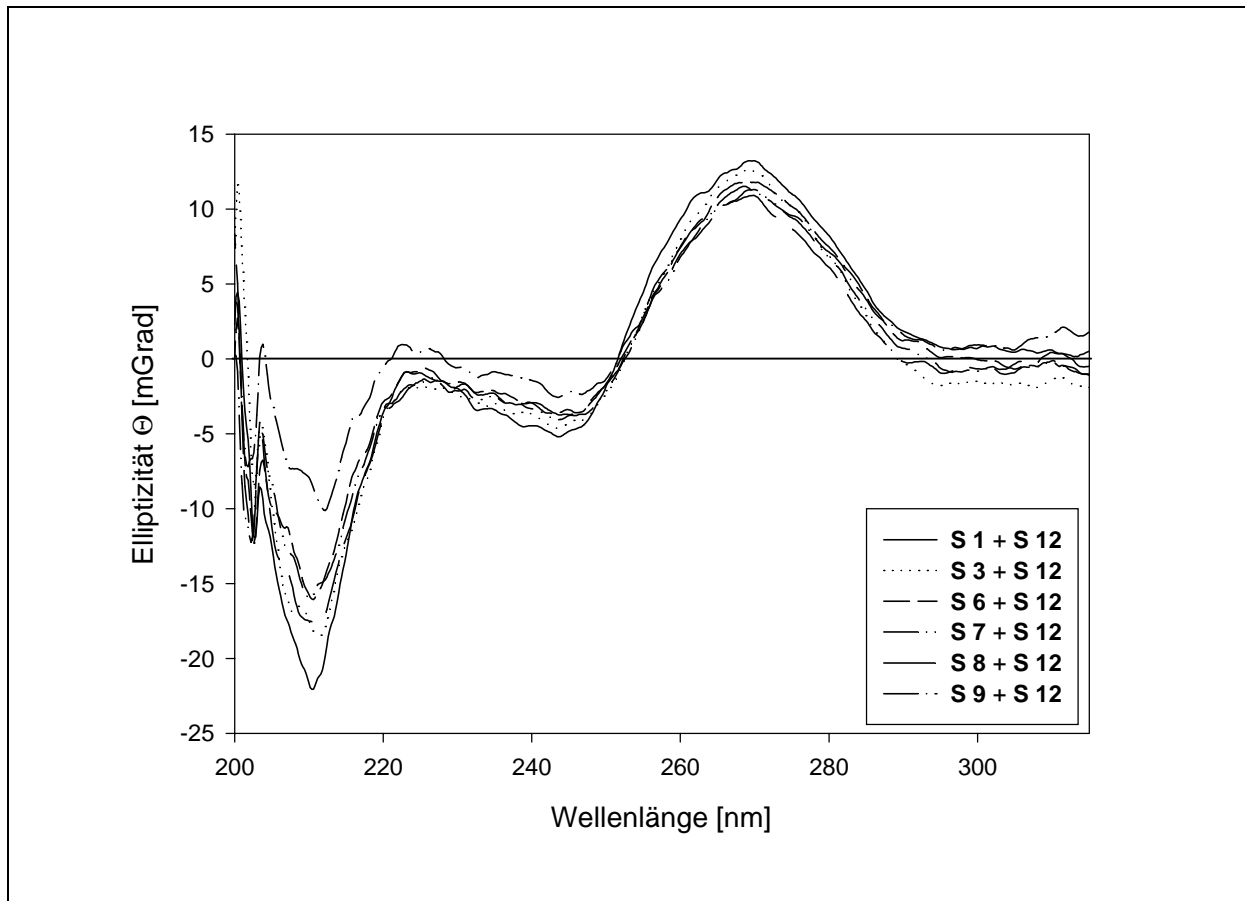


Abb. 9.25: CD-Spektren der RNA Duplexe mit Basenpaaren aus Uracil bzw. den Fluorbenzolen **B**, **F**, **H**, **K** bzw. dem Benzol **M** und Adenin bei 10°C

Schließlich wurden noch Duplexe mit einem Basenpaar aus zwei modifizierten Nucleosiden betrachtet (Abbildung 9.26). Dort werden Spektren von Duplexen mit einem **U-A** Basenpaar mit solchen mit einem **B-D**-, **B-E**- bzw. **M-O** Basenpaar verglichen. In Abbildung 9.26 lassen sich deutliche Unterschiede erkennen. Im Bereich des Maximums bei 269 nm kommt es zu starken Unterschieden in der Intensität. Die beiden Spektren der Duplexe mit einem **B-D** (**S 3 + S 17**) bzw. einem **B-E** (**S 3 + S 18**) Basenpaar zeigen höhere Intensität als der unmodifizierte Duplex (**S 1 + S 12**). Dies ist auf die verstärkten Basenstapelungswechselwirkungen der fluorierten Nucleobasen zurückzuführen (Wörner *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu zeigen die nicht fluorierten Nucleobasen **M** und **O** (**S 9 + S 19**) schwächere Basenstapelungswechselwirkungen als unmodifizierten Nucleobasen, was auch durch die geringere Intensität bei 269 nm im CD-Spektrum zum Ausdruck kommt. Bei den anderen Maxima und Minima zeigt der Duplex mit den nicht fluorierten Nucleobasen Verschiebungen um bis zu 5 nm. Diese Verschiebungen können mit einer leichten Aufweitung der Doppelhelix an der Stelle des modifizierten Basenpaares erklärt werden. Da in diesem

Basenpaar keine Wasserstoffbrücken zum gegenüberliegenden Strang vorhanden sind, kann es leicht zu einer geringfügigen Aufweitung kommen.

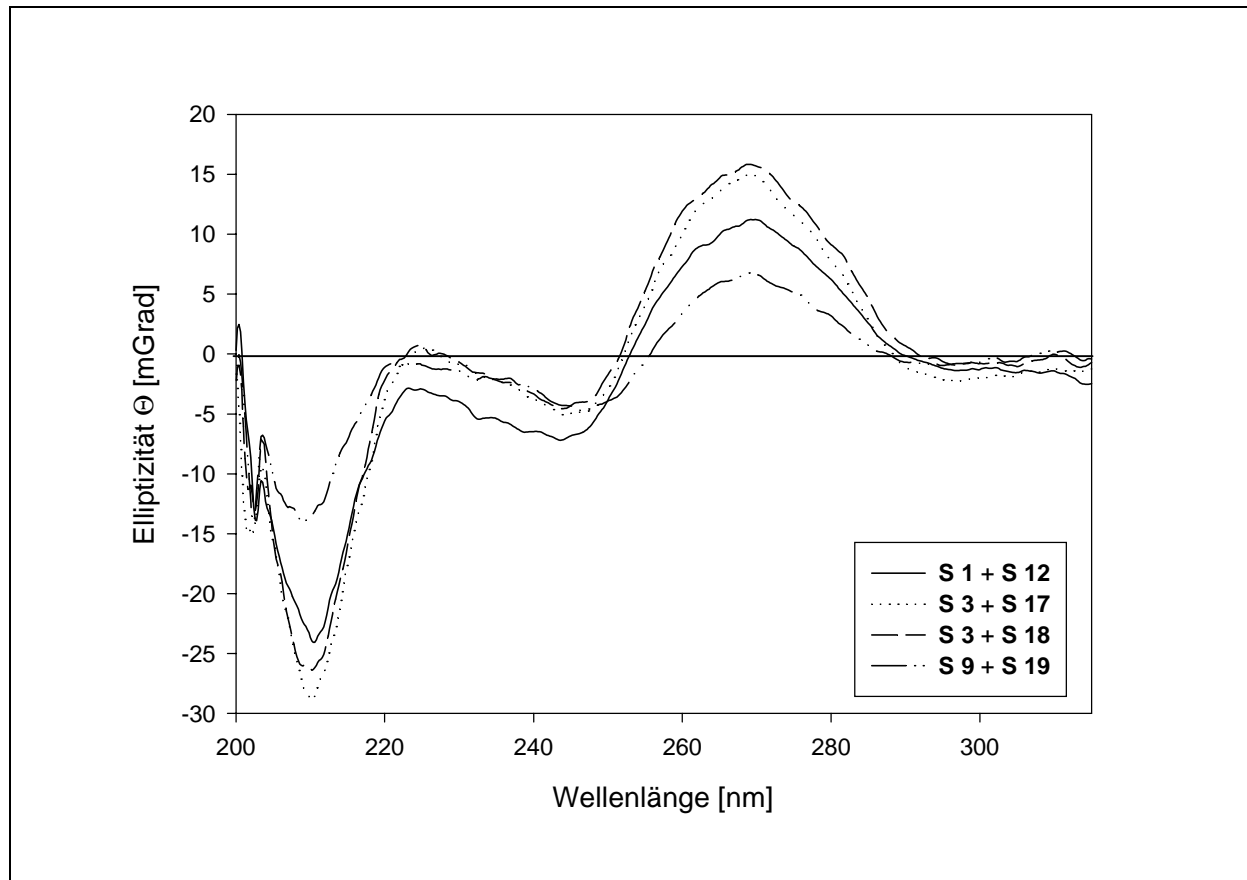


Abb. 9.26: CD-Spektren der RNA Duplexe mit Basenpaaren aus modifizierten Nucleosiden bei 10°C

Die Duplexe mit den fluormodifizierten Basenpaaren zeigen außer den Unterschieden durch verstärkte Basenstapelungswechselwirkungen kaum Unterschiede in Bezug auf Verschiebungen von Maxima oder Minima zu dem unmodifizierten Duplex. Dies läßt darauf schließen, daß diese modifizierten Bausteine die Struktur eines natürlichen RNA Duplex so gut wie nicht verändern.

Betrachtet man die CD-Spektren der Duplexe mit dreifachem Einbau der modifizierten Nucleoside, so stellt man fest, daß der vermehrte Einbau zu Veränderungen der Struktur der Doppelhelix führt. Die in Abbildung 9.27 zu sehenden Spektren wurden bei 0°C aufgenommen. Trotzdem erkennt man im Falle der alternierend eingebauten modifizierten Bausteine, daß die Struktur kaum noch der einer A-DNA entspricht. Dies ist natürlich auch darauf zurückzuführen, daß diese Duplexe einen sehr niedrigen Schmelzpunkt aufweisen und bei 0°C schon ein bedeutender Anteil der Probe aus Einzelsträngen besteht, die wie am Anfang dieses Kapitels gezeigt, keine einwandfreie A-DNA Struktur aufweisen. Die

Verschiebung der Maxima und Minima in den Spektren der Duplexe mit dreifach zusammenhängendem Einbau der modifizierten Nucleoside deutet wiederum auf eine geringe Aufweitung der Doppelhelix hin. Außerdem ist zu erkennen, daß die Intensitäten trotz verstärkter Basenstapelungswechslwirkungen abnehmen.

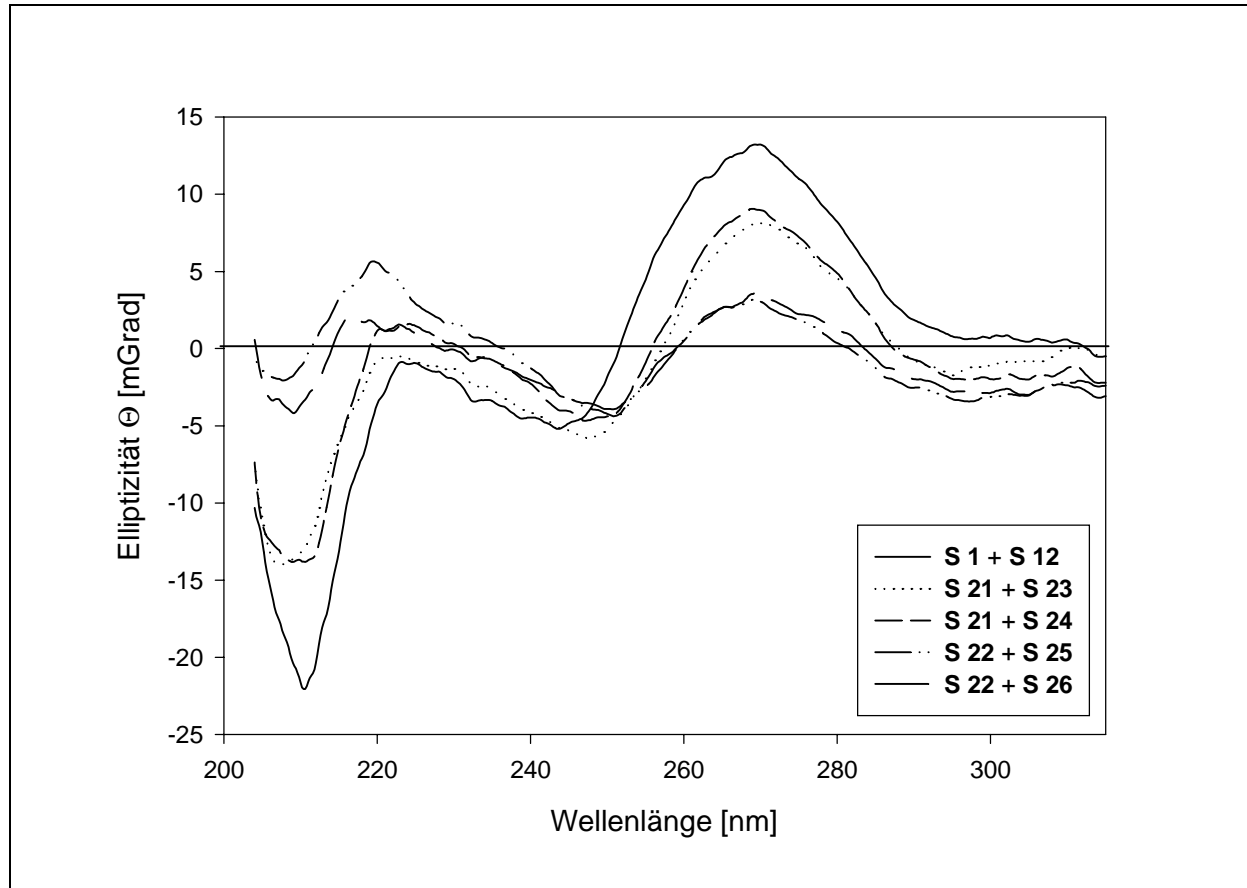


Abb. 9.27: CD-Spektren der RNA Duplexe mit drei modifizierten Basenpaaren bei 0°C

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß ein einfacher Einbau eines fluormodifizierten Basenpaares in eine Doppelhelix deren Struktur so gut wie nicht beeinflusst. Kommt es allerdings zu einem mehrfachen Einbau dieser Nucleoside, so wird die Struktur der resultierenden Doppelhelix doch verändert, was zu einer Destabilisierung führt.

10 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Fluorbenzol- und Fluorbenzimidazol-Nukleoside synthetisiert. Mit 1'-Desoxy-1'-(4-fluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **32** handelt es sich um einen zum natürlichen Inosin isosteren Baustein. Die Carbonylsauerstoffe wurden durch Fluoratome und die Stickstoffatome des Sechsrings durch sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffatome ersetzt. Mit den Bausteinen 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **33** und 1'-Desoxy-1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose **37** wurden zwei weitere Benzimidazol-Nukleoside mit zwei Fluoratomen bzw. ohne Fluor synthetisiert. Als isosteren Baustein für das natürliche Uridin wurde 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **30** synthetisiert. Auch hier wurden die Carbonylsauerstoffe durch Fluoratome und die Stickstoffatome durch sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffatome ersetzt. Um den Einfluß der Fluorsubstitution untersuchen zu können, wurden noch 1'-Desoxy-1'-(2,4,6-trifluorphenyl)- β -D-ribofuranose **86**, 1'-Desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **34**, 1'-Desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **35**, 1'-Desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **36** und 1'-Desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose **38** synthetisiert. Die einfach fluorierten Bausteine wurden so ausgewählt, daß das Fluoratom an jeder möglichen Position des Aromaten einmal vorkommt. Schließlich wurden noch Inosin **31** und 1-Desoxy-D-ribofuranose **39** als abasischer Baustein synthetisiert.

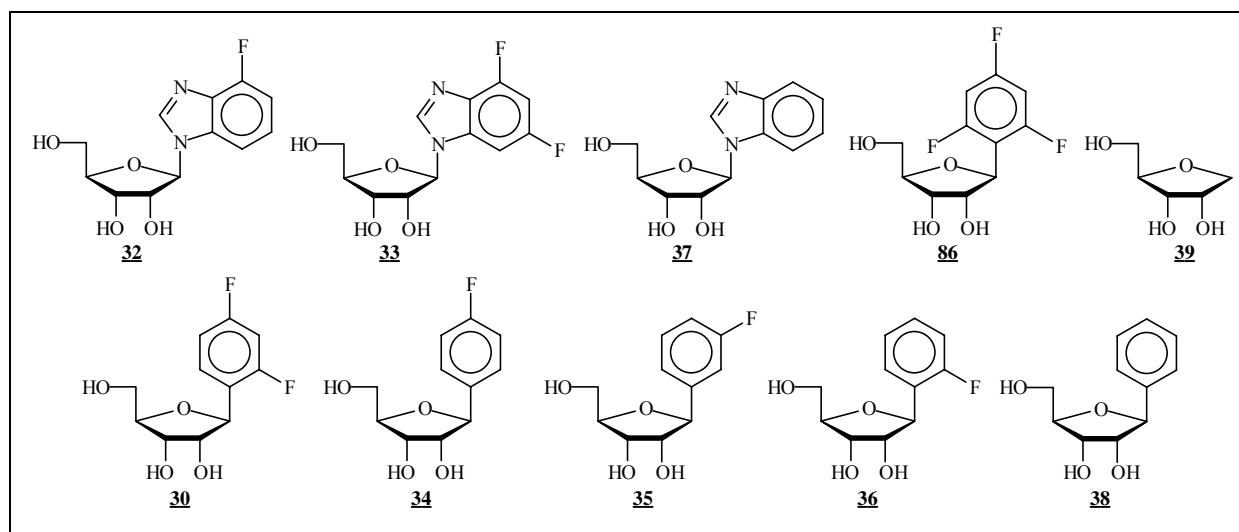


Abb. 10.1: Synthetisierte Nukleoside

Die Fluorbenzimidazole wurden ausgehend von den entsprechenden Fluoracetaniliden dargestellt. Die Glykosylierung erfolgte nach der Silyl-Hilbert-Johnson Reaktion mit anschließender Deacetylierung der Hydroxylfunktionen mit ammoniakalischem Methanol. Für die C-Glykosylierung der C-Nukleoside wurde 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-ribo- γ -lacton **85** benötigt. Dies wurde über vier Stufen aus D-Ribose dargestellt. Nach der C-Glykosylierung mit dem entsprechenden Fluorbrombenzol wurde den Nukleosiden die entstandene C1'-Hydroxylfunktion entfernt. Anschließend wurden die C-Nukleoside mit Palladiumhydroxid auf Kohle und Cyclohexen in einer Transfer-Katalyse entschützt. Die Ausnahme bildete 1'-Desoxy-1'-(phenyl)- β -D-ribofuranose **38**, das mit Bortribromid entschützt wurde. Der abasische Baustein **39** wurde aus 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-ribofuranose **84** durch Dehydroxylierung und anschließender Entschützung gewonnen.

Von allen Fluorbenzol-Nukleosiden gelang es Kristalle aus Wasser oder Methanol zu erhalten und röntgenkristallographisch zu untersuchen. Die Kristallpackungen zeigten eine sehr interessante Anordnung der Moleküle. Alle Fluorbenzol-Nukleoside mit Ausnahme von 1'-Desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **35** zeigten nicht die für aromatische Systeme normale Fischgräten-Struktur, sondern eine Anordnung, in der sich die Moleküle gegenüberliegen. Die Kristallpackung besteht abwechselnd aus hydrophilen und lipophilen Schichten. Die hydrophilen Schichten bestehen aus den Zuckeruntereinheiten und die lipophilen aus den Fluoraromaten. Die Zucker sind durch Wasserstoffbrücken miteinander verbunden. Für die Orientierung der Moleküle zueinander sind aber die Fluoratome verantwortlich. In der Kristallpackung von 1'-Desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **34** kann ein Fluor-Wasserstoff-Abstand von nur 230 pm detektiert werden. Dies ist deutlich kürzer als die Summe der van-der-Waals Radien von Fluor und Wasserstoff von 255 pm. Der Abstand wird zwischen dem Fluor des einen Nukleosids und einem Wasserstoff eines gegenüberliegenden Nukleosids gemessen. Der Abstand von 230 pm ist einer der kürzesten jemals in Kristallen gemessenen F-H Abstände des Typs $C_{sp^2}-F\cdots H-C_{sp^2}$. Bedingt durch diesen kurzen Abstand kann von einer $F\cdots H$ Wasserstoffbrücke gesprochen werden. Auch in den Kristallstrukturen von 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **30** und 1'-Desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **36** werden Fluor-Wasserstoff-Abstände von 255 pm und damit genau der Summe der van-der-Waals Radien gefunden. Nur die Kristallstruktur von 1'-Desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **35** zeigt keine $F\cdots H$ Wasserstoffbrücken. Diese Struktur weist auch als einzige eine Fischgräten-Struktur auf.

Die Nukleoside wurden auf ihre Lipophilie hin untersucht. Zu diesem Zweck wurden Octanol-Wasser Verteilungskoeffizienten und HPLC-Retentionszeiten der einzelnen

Nukleoside gemessen. Die fluorinierten Nukleoside zeigten im Gegensatz zu den nichtfluorinierten Nukleosiden eine deutlich größere Lipophilie.

Die entschützten Nukleoside wurden nach Standardmethoden für RNA Bausteine in ihre Phosphoramidite überführt. Dabei stellte sich heraus, daß durch eine starke Wanderungstendenz der TBDMS-Gruppe in Richtung 3'-Hydroxylfunktion bei allen fluormodifizierten Nukleosiden das gewünschte 2'-geschützte Isomer nur in niedrigen Ausbeuten erhalten werden konnte. Es konnte gezeigt werden, daß bei Verwendung der neuen TOM-Schutzgruppe dieses Problem gelöst werden kann.

Die erhaltenen Phosphoramiditbausteine wurden mittels der Phosphoramiditmethode an einem Synthesautomaten in Ribonukleinsäure (RNA) eingebaut. Dazu wurden RNA Stränge aus zwölf Nukleotiden mit einer Modifikation in der Mitte synthetisiert und aufgereinigt. Um festzustellen, ob die modifizierten Bausteine Wasserstoffbrücken zu den natürlichen Nucleobasen ausbilden oder nicht, wurden sie mit allen vier natürlichen Basen gepaart und die erhaltenen 12mer RNA Duplexe mittels UV- und CD-Spektroskopie untersucht. Aus den erhaltenen Schmelzkurven wurden die Schmelzpunkte bestimmt und die thermodynamischen Daten errechnet. Dabei stellte sich heraus, daß mehrere der modifizierten Nucleoside kaum zwischen den natürlichen Nucleosiden differenzieren, d.h. das die erhaltenen Schmelzpunkte der RNA Duplexe sich kaum unterscheiden egal mit welcher natürlichen Base die modifizierten Basen gepaart sind. Als beste universelle Basen mit der geringsten Differenzierung und den geringsten Stabilitätsverlusten des resultierenden RNA Duplex haben sich 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose (**B**) und 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose (**E**) herausgestellt.

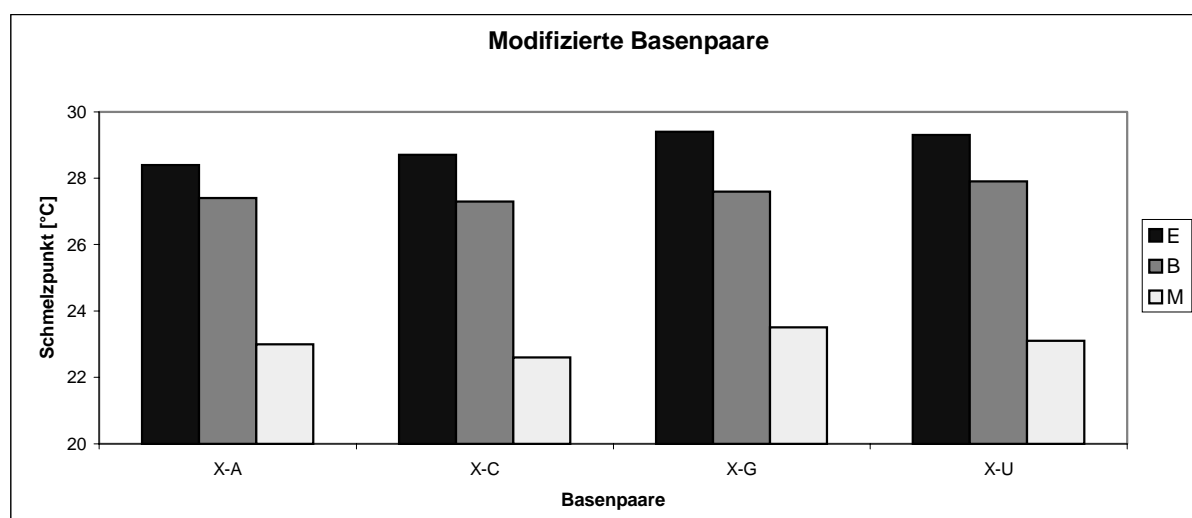


Abb. 10.2: Schwankungsbreite der Schmelzpunkte der universellen Basen

Für weitere Untersuchungen wurden die modifizierten Nucleoside gegeneinander und mit dem abasischen Baustein gepaart. Aus den erhaltenen Daten wurden die Beiträge der Solvation und der Basenstapelungswechselwirkung aller modifizierten Nucleoside bestimmt. Es konnte gezeigt werden, daß ein Einbau einer modifizierten Nucleobase die RNA-Doppelhelix durch fehlende Wasserstoffbrücken zu den natürlichen Nucleobasen und durch geringere Solvation destabilisiert. In Gegenzug wird die RNA-Doppelhelix durch verstärkte Basenstapelungswechselwirkungen der modifizierten Nucleobasen stabilisiert. Über alle Effekte betrachtet wird die Doppelhelix durch den Einbau einer der untersuchten Nucleoside destabilisiert.

Letztendlich wurden Basenpaare aus zwei modifizierten Nucleotiden gebildet, und zwar immer aus einer Purin analogen und einer Pyrimidin analogen Nucleobase (z.B. 4-Fluorbenzimidazol (**D**) und 2,4-Difluorbenzol (**B**)). Aus den berechneten Beiträgen für Solvation und Basenstapelungswechselwirkungen konnten die erwartenden Schmelzpunkte und freien Enthalpien (ΔG^0) für diese Basenpaare errechnet werden. Im Falle des Benzimidazol (**O**)-Benzol (**M**) Basenpaares war dieser Wert mit dem gemessenen fast identisch ($\pm 0,1^\circ\text{C}$). Für das 4-Fluorbenzimidazol-(**D**)-2,4-Difluorbenzol-(**B**) und das 4,6-Difluorbenzimidazol-(**E**)-2,4-Difluorbenzol-(**B**) Basenpaar sind die gemessenen Werte allerdings um $0,6^\circ\text{C}$ ($0,4\text{ kcal/mol}$) bzw. $0,9^\circ\text{C}$ ($0,6\text{ kcal/mol}$) höher als die errechneten. Da sich diese Basenpaare von dem Benzimidazol-(**O**)-Benzol-(**M**) Basenpaar nur durch die Fluoratome unterscheiden, muß diese Stabilisierung der RNA Duplexe durch Wechselwirkungen des Fluors zustande kommen. Bei dieser Wechselwirkung zwischen zwei modifizierten Nucleobasen könnte es sich um F...H-Wasserstoffbrücken handeln, wie sie auch schon in den Kristallen von 1'-Desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **34** und 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **30** nachgewiesen werden konnten.

Als Ausblick für zukünftige Arbeiten auf diesem Gebiet ausgehend von den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse werden folgende Untersuchungen angeregt:

- Messung von Fluor-NMR-Spektren zur Untersuchung, ob es sich bei den ermittelten Duplex stabilisierenden Kräften um F...H Wasserstoffbrücken handelt.
- Verifizierung der ermittelten Beiträge der Solvation und der Basenstapelungswechselwirkungen durch Einbau der modifizierten Nucleoside in RNA einer anderen Sequenz.
- Synthese der Triphosphate der fluormodifizierten Nucleoside mit enzymatischen Einbauversuchen.
- Einbau der als universellen Basen erkannten Nucleoside in Ribozyme mit Test der Enzymselektivität und Enzymaktivität.

11 Experimenteller Teil

11.1 Allgemeines

11.1.1 Chromatographie

Für die Chromatographie (DC, pDC und FC) wurden folgende Lösungsmittel eingesetzt:

- Acetonitril; p.a.
- Ethylacetat; technische Qualität, wurde über Calciumchlorid getrocknet und destilliert
- *n*-Hexan; technische Qualität, wurde bei Normaldruck destilliert
- Isopropanol; technische Qualität, wurde bei Normaldruck destilliert
- Methanol; technische Qualität, wurde bei Normaldruck destilliert
- Methylenchlorid; techn. Qualität, wurde über Calciumchlorid getrocknet und destilliert
- Wasser; reinst

Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die analytische Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel 60 beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator verwendet (Merck Nr. 5554; 0,2 mm Schichtdicke), die auf eine Größe von 2 - 5 × 10 cm zugeschnitten wurden. Die Laufstrecke betrug 8 - 9 cm. Alle R_f -Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt. UV-aktive Substanzen wurden mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert. Dünnschichtchromatogramme mit UV-inaktiven Zuckern wurden mit einem Reagenz aus 10% konz. Essigsäure, 5% Anisaldehyd und 5% konz. Schwefelsäure in 75 %igem wässr. Ethanol bestrichen und mit einem Heißluftfön auf etwa 300°C erhitzt. Dabei färbten sich die Verbindungen schwarz.

Die Dimethoxytritylgruppe konnte durch Überleiten von Salzsäuredämpfen detektiert werden. Es erfolgte eine Orangefärbung.

Präparative Dünnschichtchromatographie (pDC)

Für die präparative Dünnschichtchromatographie wurde ein Chromatotron der Firma Harrison Research (Modell 7924 T) verwendet. Als Trennmateriale diente hierbei gipshaltiges Kieselgel (Merck 60 PF₂₅₄, Nr. 7749), das in Schichtdicken von 1, 2 bzw. 4 mm auf entsprechende Glasplatten (Durchmesser 20 cm) aufgetragen wurde. Die Detektion der UV-aktiven Substanzen erfolgte bei einer Wellenlänge von 254 nm.

Präparative Säulenchromatographie (Flash-Chromatographie, FC)

Die Flash-Säulenchromatographie (Still *et al.*, 1978) wurde mit Kieselgel 60 (Korngröße 40-63 µm, Merck Nr. 9385) als Trennmateriale durchgeführt. Es standen Säulen verschiedener Durchmesser zur Verfügung. Die Trennungen wurden, wie bei den Einzelverbindungen in Kapitel 11.3 beschrieben, entweder isokratisch oder mit Stufengradienten durchgeführt.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC Aufreinigungen der Oligonukleotide wurden auf Anlagen von JASCO durchgeführt. Details sind in Kapitel 11.5.1 beschrieben. Die Retentionszeiten der ungeschützten Nucleoside wurden ebenfalls auf der Anlage von JASCO bestimmt. Details sind in Kapitel 11.9 beschrieben.

11.1.2 Spektroskopie

NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden auf den Geräten AM 250, WH 270, AMX 400 und AMX 600 der Firma Bruker aufgenommen. Die chemische Verschiebung δ (ppm) wurde auf das jeweilige Lösungsmittelsignal geeicht. Als Lösungsmittel wurden DMSO-d₆ mit $\delta = 2,49$ ppm und CDCl₃ mit $\delta = 7,27$ ppm für die ¹H-NMR-Spektren sowie DMSO-d₆ mit $\delta = 39,5$ ppm und CDCl₃ mit $\delta = 77,0$ ppm für die ¹³C-NMR-Spektren verwendet. Für die ¹⁹F-NMR-Spektren in DMSO-d₆ wurde CCl₃F als Standard verwendet und auf $-162,9$ ppm geeicht. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 300 K aufgenommen.

UV/VIS-Spektroskopie

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

IR-Spektroskopie

Die IR-Spektren wurden an einem IR-Spektrometer der Firma Perkin Elmer (1600 Series FTIR) gemessen.

11.1.3 Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden auf Geräten der Firmen VG Analytical und VG Biotec (heute: Micromass) aufgenommen. Für die Electrospray-Ionisation (ESI) stand eine VG Platform II mit Quadrupol Analysator zur Verfügung. Spektren mit matrixunterstützter Laserdesorption/Ionisation (MALDI) wurden auf einem Flugzeitmassenspektrometer (VG Tofspec) entweder im linearen oder im Reflectronmodus gemessen.

11.1.4 Elementaranalyse

Die Elementaranalysen wurden an einem Gerät der Firma Foss-Heraeus (CHN-O-Rapid) durchgeführt.

11.1.5 Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden an einer Schmelzpunktbestimmungsapparatur nach Tottoli der Firma Büchi (Modell Büchi 510) gemessen. Die Werte wurden nicht korrigiert.

11.1.6 Verwendete Chemikalien

Acetonitril; C₂H₃N [41,05]; Roth Nr. 8825.2, 99,5 %, für die HPLC, Sdp. 81-82°C, d = 0,78

Acetonitril; C₂H₃N [41,05]; Fluka Nr. 00695, puriss., ≥ 99,5 %, absolut, über Molekularsieb,

H₂O ≤ 0,01 %, Sdp. 82°C, d = 0,782

Acetonitril; C₂H₃N [41,05]; Fluka Nr. 00709, puriss., ≥ 99,5 %, absolut, über Molekularsieb,

H₂O ≤ 0,001 %, Sdp. 82°C, d = 0,782 (für die Synthese der Phosphoramidite verwendet)

Amberlite IRA 93; Fluka Nr. 06441, freie Base

Ameisensäure; CH₂O₂ [46,03]; Merck Nr. 2541884, 98-100 %, d = 1,22

Ammoniak; NH₃ (g) [17,03]; Linde, eingesetzt wie gekauft

Ammoniaklösung; NH₄OH [35,05]; Merck Nr. 1.05426, 32 % reinst, d = 0,88

- Ammoniumchlorid; NH_4Cl [53,49]; Fluka Nr. 09702, purum p.a., $\geq 99\%$
- Argon; Qualität 4.8, Linde, eingesetzt wie gekauft
- Benzimidazol; $\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_2$ [118,14]; Fluka Nr. 12250, purum, $\geq 98\%$, Smp. 171-173°C
- Benzol; C_6H_6 [78,12]; Fluka Nr. 12552, puriss. p.a., Sdp. 80°C, $d = 0,879$
- Benzolsulfonsäure; $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3\text{S}$ [158,18]; Fluka Nr. 12635, purum, $\geq 98\%$
- Benzylchlorid; $\text{C}_7\text{H}_7\text{Cl}$ [126,59]; Fluka Nr. 13280, purum, $\geq 99\%$, $d = 1,10$
- N,O*-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid; $\text{C}_8\text{H}_{21}\text{NOSi}_2$ [203,43]; Fluka Nr. 15241, Sdp.^(35 mm) 71-73°C, $d = 0,832$
- Bortribromid; 1 M Lsg. in Methylenchlorid; BBr_3 [250,54]; Fluka Nr. 15692; purum, $d = 1,46$
- Bortrifluorid-Ethyletherat; $\text{BF}_3 \cdot \text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ [141,93]; Fluka Nr. 15719, purum, säurefrei, Sdp. 128°C, $d = 1,13$
- Brombenzol; $\text{C}_6\text{H}_5\text{Br}$ [157,02]; Fluka Nr. 16350, puriss., $\geq 99,5\%$, Sdp. 154-155°C, $d = 1,494$
- 1-Brom-2,4-difluorbenzol; $\text{C}_6\text{H}_3\text{BrF}_2$ [192,99]; Lancaster Nr. 0930, $\geq 98\%$, Sdp.^(20 mm) 53-54°C, $d = 1,708$
- 1-Brom-2-fluorbenzol; $\text{C}_6\text{H}_4\text{BrF}$ [175,01]; Lancaster Nr. 2374, 99%, Sdp. 155-157°C, $d = 1,611$
- 1-Brom-3-fluorbenzol; $\text{C}_6\text{H}_4\text{BrF}$ [175,01]; Lancaster Nr. 6478, 99%, Sdp.^(80 mm) 77-79°C, $d = 1,594$
- 1-Brom-4-fluorbenzol; $\text{C}_6\text{H}_4\text{BrF}$ [175,01]; Lancaster Nr. 3391, 99%, Sdp. 152-155°C, $d = 1,604$
- 1-Brom-2,4,6-trifluorbenzol; $\text{C}_6\text{H}_2\text{BrF}_3$ [210,98]; Lancaster Nr. 2134, 98%, Sdp. 140-141°C, $d = 1,790$
- 1-Butanol; $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ [74,12]; Fluka Nr. 19430, purum, $\geq 98\%$, Sdp. 116-118°C, $d = 0,81$
- tert.*-Butyldimethylchlorsilan (TBDMSCl); 1 M Lsg. in THF; $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{ClSi}$ [150,73]; Fluka Nr. 19904, purum, $d = 0,886$
- n*-Butyllithium; 1,6 M Lsg. in *n*-Hexan; $\text{C}_4\text{H}_9\text{Li}$ [64,09]; Aldrich Nr. 18,617-1, $d = 0,68$
- Celite-Filtergel; Fluka Nr. 22139, Filterhilfsmittel, leicht gegläht
- Chloroform- d_1 ; CDCl_3 [120,37]; Deutero GmbH, 99,8 Atom % D, stabilisiert mit Silber
- Chromtrioxid; CrO_3 [99,99]; Fluka Nr. 27083, purum p.a.
- sym.*-Collidin = 2,4,6-Trimethylpyridin; $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}$ [121,18]; Fluka Nr. 27690, puriss. p.a., $\geq 99\%$, Sdp. 170-172°C, $d = 0,914$
- Cyclohexen; C_6H_{10} [82,15]; Fluka Nr. 29240, purum, $\geq 99\%$, stabilisiert mit $\sim 0,01\%$ 2,6-Di-*tert.*-butyl-*p*-kresol, Sdp. 81-84°C, $d = 0,81$

- Deuteriumoxid; D_2O ; Deutero GmbH, 99,9 Atom % D
- Dibutylzinndichlorid; $C_8H_{18}Cl_2Sn$ [303,83]; Fluka Nr. 34920, pract. $\approx 97\%$
- 1,2-Dichlorethan = Ethylenchlorid; $C_2H_4Cl_2$ [98,96]; Fluka Nr. 03527, puriss., absolut, über Molekularsieb, $\geq 99,5\%$, $H_2O < 0,005\%$, Sdp. $84^\circ C$, $d = 1,253$
- Diethylether; $C_4H_{10}O$ [74,12]; Fluka Nr. 31685, puriss., $\geq 99,5\%$, über Molekularsieb, stabilisiert mit 2,6-Di-*tert.*-butyl-*p*-kresol, Sdp. $35-36^\circ C$, $d = 0,713$
- Diethylpyrocarbonat (DEPC); $C_6H_{10}O_5$ [162,14]; Fluka Nr. 32490, purum, $\geq 97\%$, Sdp. $160-163^\circ C$, $d = 1,12$
- 2,4-Difluoracetanilid; $C_8H_7F_2NO$ [171,15]; Lancaster Nr. 14152, Smp. $122-124^\circ C$
- Diisopropylazodicarboxilat = Azodicarbonsäure-diisopropylester (DIAD); $C_8H_{14}N_2O_4$ [202,21]; Fluka Nr. 11626, pract. $\approx 95\%$, Sdp.^(0,25 mm) $75-77^\circ C$, $d = 1,044$
- Diisopropylamin; $C_6H_{15}N$ [101,19]; Aldrich Nr. 47,122-4, $\geq 99,5\%$, $d = 0,722$
- Diisopropylethylamin (Hünigs Base, DIPEA); $C_8H_{19}N$ [129,25]; Aldrich Nr. D12,580-6, 99% , Sdp. $127^\circ C$, $d = 0,742$
- 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid = 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (DMTrCl); $C_{21}H_{19}ClO_2$ [338,83]; Merck Nr. 818616, $> 99\%$, Smp. $120-123^\circ C$
- N,N*-Dimethylformamid (DMF); C_3H_7NO [73,10]; Fluka Nr. 40248, puriss., $> 99,5\%$, aminfrei, über Molekularsieb, $H_2O \leq 0,01\%$, Sdp. $153-155^\circ C$, $d = 0,948$
- Dimethylsulfoxid (DMSO); C_2H_6OS [78,13]; Fluka Nr. 41648, puriss., absolut, über Molekularsieb, $H_2O \leq 0,01\%$, Sdp. $190-192^\circ C$, $d = 1,100$
- Dimethylsulfoxid- d_6 (DMSO- d_6); C_2D_6OS [84,13]; Groupe C. E Saclay, 99,8 Atom % D
- Dinatriumhydrogenphosphat Dodecahydrat; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ [358,14]; Fluka Nr. 71650, puriss. p.a., kristallisiert
- Dioxan; $C_4H_8O_2$ [88,11]; Riedel-de Haën Nr. 33147, für Analyse, $\geq 99,5\%$
- Dioxan; $C_4H_8O_2$ [88,11]; Fluka Nr. 42510, puriss., absolut, über Molekularsieb, $\geq 99,5\%$, Sdp. $100-102^\circ C$, $d = 1,034$
- Essigsäure; $C_2H_4O_2$ [60,05]; Riedel-de Haën Nr. 33209, $\geq 99,8\%$, Sdp. $117-118^\circ C$, $d = 1,049$
- Essigsäureanhydrid; $C_4H_6O_3$ [102,09]; Fluka Nr. 45830, puriss. p.a., Sdp. $138-140^\circ C$, $d = 1,08$
- Ethanol; C_2H_6O [46,07]; Riedel-de Haën Nr. 32205, für Analyse
- Ethanthiol = Ethylmercaptan; C_2H_6S [62,13]; Fluka Nr. 04290, purum, $\geq 97\%$, Sdp. $34-37^\circ C$, $d = 0,84$
- 2-Fluoracetanilid; C_8H_8FNO [153,16]; Lancaster Nr. 1201, $\geq 98\%$, Smp. $75-77^\circ C$

- p*-Formaldehyd; $(\text{CH}_2\text{O})_x$ [30,03]_x; Riedel-de Haën Nr. 16005, puriss., 95-100 %
- n*-Hexan; C_6H_{14} [86,17]; Fluka Nr. 52766, puriss., absolut, über Molekularsieb, $\text{H}_2\text{O} \leq 0,01$ %, Sdp. 69°C , $d = 0,659$
- 3-Hydroxypropionitril = 2-Cyanethanol; $\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$ [71,08]; Fluka Nr. 56270, puriss., ≥ 99 %, Sdp. $106-108^\circ\text{C}$, $d = 1,045$
- Imidazol; $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}_2$ [68,08]; Fluka Nr. 56760, puriss. p.a., $\geq 99,5$ %
- Inosin = Hypoxanthin-9- β -D-ribofuranosid; $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_5$ [268,23]; Fluka Nr. 57470, > 99 %, Smp. $215-220^\circ\text{C}$
- Kaliumhydroxid; KOH [56,11]; Fluka Nr. 60370, puriss. p.a., Plätzchen, ≥ 86 %
- Kaliumhydroxid; KOH [56,11]; Fluka Nr. 60380, purum, Pulver, ≥ 85 %
- Lithiumchlorid; LiCl [42,39]; Fluka Nr. 62480, purum p.a.
- Magnesiumsulfat; MgSO_4 [120,37]; Riedel-de Haën Nr. 13143, reinst, getrocknet
- Methanol; CH_4O [32,04]; Riedel-de Haën Nr. 32213, $> 99,8$ %, max. 0,05 % H_2O , Sdp. $64-65^\circ\text{C}$, $d = 0,792$
- Methanol; CH_4O [32,04]; Fluka Nr. 65542, puriss., $> 99,5$ %, über Molekularsieb, $\text{H}_2\text{O} \leq 100$ ppm, Sdp. $64-65^\circ\text{C}$, $d = 0,79$
- Methylenchlorid = Dichlormethan; CH_2Cl_2 [84,93]; Fluka Nr. 66749; puriss., $> 99,5$ %, über Molekularsieb, $\text{H}_2\text{O} \leq 50$ ppm, Sdp. 40°C , $d = 1,325$
- 1-Methylimidazol; $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2$ [82,11]; Fluka Nr. 67560, puriss., ≥ 99 %, Sdp. $195-197^\circ\text{C}$, $d = 1,033$
- 1-Methyl-2-pyrrolidinon; $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}$ [99,13]; Aldrich Nr. 27,045-8, > 99 %, für die HPLC, Sdp.^(10 mm) $81-82^\circ\text{C}$, $d = 1,028$
- Molekularsieb 3 Å; Fluka Nr. 69831
- Natriumcarbonat; Na_2CO_3 [105,99]; Merck Nr. 106395, mind. 99,5 %, wasserfrei
- Natriumchlorid; NaCl [58,44]; Merck Nr. 1540, $> 99,5$ %
- Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [156,01]; Fluka Nr. 71500, purum p.a., kristallisiert
- Natriumhydrogencarbonat; NaHCO_3 [84,01]; Fluka Nr. 71630, purum, > 98 %
- Natriumhydroxid; NaOH [40,00]; Grüssing Nr. 12155, 99 %
- p*-Nitrophenylethanol; $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_3$ [167,16]; Aldrich Nr. 18,346-6, 99 %, Smp. $62-64^\circ\text{C}$
- 1-Octanol; $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}$ [130,23]; Fluka Nr. 74848, für die UV-Spektroskopie, $\geq 99,5$ %, $d = 0,82$
- Palladium auf Kohle; Pd/C; ABCR Nr. PD-7150, ≈ 10 % Palladium
- Palladiumhydroxid auf Kohle (Pearlman's Katalysator); Fluka Nr. 76063, puriss., ≈ 20 % Palladium

- Phosphorpentoxid; P_2O_5 [141,94]; Riedel-de Haën Nr. 04113, 98,5 %
- Phosphortrichlorid; PCl_3 [137,33]; Riedel-de Haën Nr. 04603, ≥ 99 %, $d = 1,57$
- Platindioxid; PtO_2 [227,09]; ABCR Nr. PT-5227, 99,9 %, 82 % Platin
- Pyridin; C_5H_5N [79,10]; Grüssing Nr. 13057, $> 99,5$ %, Sdp. $115^\circ C$, $d = 0,978$, wurde mind. 2h über CaH_2 Rückfluß gekocht und abdestilliert
- Pyridin; C_5H_5N [79,10]; Fluka Nr. 82704, puriss., $> 99,8$ %, $H_2O < 50$ ppm, über Molekularsieb, Sdp. $116^\circ C$, $d = 0,983$
- β -D-Ribofuranose; $C_5H_{10}O_5$ [150,13]; Aldrich Nr. R175-7, 98 %
- Salpetersäure; HNO_3 [63,01]; Merck Nr. 1.00456; p.a., 65 %, $d = 1,40$
- Salpetersäure, rauchend; HNO_3 [63,01]; Merck Nr. 1.00455; p.a., 100 %, $d = 1,52$
- Salzsäure; HCl [36,46]; Riedel-de Haën Nr. 30721, p.a., mind. 37 %
- Schwefelsäure; H_2SO_4 [98,07]; Merck Nr. 100731, 95-97 %, Sdp. $330^\circ C$, $d = 1,84$
- Silbernitrat; $AgNO_3$ [169,88]; Fluka Nr. 85228, puriss. p.a., $\geq 99,5$ %
- Stickstoff; N_2 [28,01]; Qualität 99,9 %, Linde, eingesetzt wie gekauft
- Sulfurylchlorid; SO_2Cl_2 [134,97]; Aldrich Nr. 15,776-7, 97 %, Sdp. $68-70^\circ C$, $d = 1,680$
- Tetrahydrofuran; C_4H_8O [72,11]; Fluka Nr. 87371, puriss., absolut, über Molekularsieb, $\geq 99,5$ %
- 1,2,3,5 Tetra-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose = β -D-Ribofuranose-1,2,3,5-tetraacetat; $C_{13}H_{18}O_9$ [318,28]; Aldrich Nr. 15,902-6, 98 %, Smp. $81-83^\circ C$
- Toluol; C_7H_8 [92,14]; Fluka Nr. 89682, purum, ≥ 99 %, Sdp. $110-112^\circ C$, $d = 0,866$
- p*-Toluolsulfonsäure Monohydrat; $C_7H_8O_3S \cdot H_2O$ [190,22]; Fluka Nr. 89760, puriss., ≈ 99 %
- Triethylamin (TEA); $C_6H_{15}N$ [101,19]; Fluka Nr. 90340, puriss. p.a., $> 99,5$ %, Sdp. $88-89^\circ C$, $d = 0,726$
- Triethylamin Trihydrofluorid; $C_6H_{15}N \cdot 3HF$ [161,21]; Aldrich Nr. 34,464-8, 98 %, $d = 0,989$
- Triethylsilan; $C_6H_{16}Si$ [116,28]; Fluka Nr. 90550, purum, > 97 %, Sdp. $105-110^\circ C$, $d = 0,732$
- Triisopropylchlorsilan; $C_9H_{21}ClSi$ [192,81]; Aldrich Nr. 24,172-5, 97 %, Sdp.^(739 mm) $198^\circ C$, $d = 0,901$
- Trifluormethansulfonsäuretrimethylsilylester (Trimethylsilyltrifluormethansulfonat, TMSTf) $C_4H_9F_3O_3SSi$ [222,26]; Fluka Nr. 91741, purum, ≥ 98 %, Sdp.^(11 mm) $39-40^\circ C$, $d = 1,225$
- Triphenylphosphin; $C_{18}H_{15}P$ [262,30]; Fluka Nr. 93092, purum, ≈ 97 %
- Wasserstoff; H_2 [2,01]; Linde, eingesetzt wie gekauft

Die für die Abspaltung der Acetylschutzgruppen benötigte gesättigte ammoniakalische Methanollösung wurde durch Einleiten von NH_3 (g) in Methanol (p.a.) bei -78°C für 30 Minuten hergestellt. Die Lösung wurde bei -20°C aufbewahrt.

Für die Oligonucleotidsynthesen:

Acetonitril; for DNA-synthesis, PerSeptive Biosystems

Acetonitril; amidite diluent, PerSeptive Biosystems

Capping Reagenz, PerSeptive Biosystems

Säulen mit CPG-Trägermaterial, PerSeptive Biosystems

Deblock-Mix, PerSeptive Biosystems

Oxidizer, PerSeptive Biosystems

Phosphoramidite, PerSeptive Biosystems

Sephadex PD10 Säulen mit G25 Material, Amersham Pharmacia Biotech

11.1.7 Eingesetzte Pufferlösungen

a) *Für die Anionenaustausch-HPLC:*

Puffer A: DEPC-Wasser mit LiOH auf pH 8,0 eingestellt

Puffer B: Ansatz wie Puffer A und 42,39 g (1 mol) Lithiumchlorid

b) *Für die Aufnahme der UV-Schmelzkurven und CD-Spektren:*

Für die Aufnahme der UV-Schmelzkurven und die CD-spektroskopischen Untersuchungen der Oligonukleotide wurde folgendes Puffersystem eingesetzt: 140 mM Natriumchlorid (2,04 g NaCl), 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat Dodecahydrat (895 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) und 10 mM Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat (390 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Nach Auffüllen mit Wasser auf 250 ml wurde die angesetzte Lösung durch Zugabe von Salzsäure (0,1 N) auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Das verwendete Wasser war mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) vorbehandelt. Dazu wurde eine 0,1 %ige Lösung angesetzt, über Nacht bei RT stehen gelassen und anschließend 30 Minuten autoklaviert.

11.2 Liste der synthetisierten Verbindungen

- 2,4-Difluor-6-nitroacetanilid **41**
2,4-Difluor-6-nitroanilin **42**
4,6-Difluorbenzimidazol **44**
2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **56**
2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-3-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **57**
1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **33**
1'-Desoxy-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **63**
1'-Desoxy-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **64**
1'-Desoxy-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-3'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **65**
3'-*O*-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **67**
- 2-Fluor-6-nitroacetanilid **47**
2-Fluor-4-nitroacetanilid **46**
2-Fluor-6-nitroanilin **48**
4-Fluorbenzimidazol **50**
2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4-fluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **68**
2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4-fluor-3-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **69**
1'-Desoxy-1'-(4-fluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **32**
1'-Desoxy-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-1'-(4-fluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **70**
1'-Desoxy-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-(4-fluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **71**
1'-Desoxy-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-3'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-(4-fluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **72**
3'-*O*-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-(4-fluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **73**

- 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose **62**
- 1'-Desoxy-1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose **37**
- 1'-Desoxy-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose **74**
- 1'-Desoxy-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose **75**
- 1'-Desoxy-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-3'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose **76**
- 3'-*O*-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose **77**
- 1-Methyl-ribofuranose **82**
- 1-Methyl-2,3,5-tri-*O*-benzyl-ribofuranose **83**
- 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-ribofuranose **84**
- 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-ribo- γ -lacton **85**
- 2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **92**
- 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **30**
- 5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **99**
- 5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **104**
- 5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **105**
- 3'-*O*-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **106**
- 2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **89**
- 1'-Desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **34**
- 5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **96**
- 5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **97**
- 5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **98**

3'-*O*-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **103**

2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **108**

1'-Desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **35**

5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **100**

5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **109**

5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **110**

3'-*O*-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **111**

2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **113**

1'-Desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **36**

5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **101**

5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **114**

5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **115**

3'-*O*-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **116**

2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose **94**

1'-Desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose **38**

5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose **102**

5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose **118**

5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose **119**

3'-*O*-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose **120**

2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-(2,4,6-trifluorphenyl)- β -D-ribofuranose **104**

1'-Desoxy-1'-(2,4,6-trifluorphenyl)- β -D-ribofuranose **86**

2,3,5-Tri-*O*-benzyl-1-desoxy-D-ribofuranose **121**

1-Desoxy-D-ribofuranose **39**

5-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1-desoxy-D-ribofuranose **123**

5-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1-desoxy-D-ribofuranose **124**

5-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1-desoxy-D-ribofuranose **125**

3-*O*-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1-desoxy-D-ribofuranose **126**

2-Cyanethoxydichlorphosphin **147**

2-Cyanethyldiisopropylchlorphosphoramidit **66**

Triisopropylsilyloxymethylchlorid **141**

5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-triisopropylsilyloxymethyl-1'-desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **142**

5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-*O*-triisopropylsilyloxymethyl-1'-desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **143**

3'-*O*-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-triisopropylsilyloxymethyl-1'-desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **144**

1-Desoxy-1-phenyl-D-ribitol **95**

5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-inosin **127**

5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-inosin **128**

5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-inosin **129**

3'-*O*-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-inosin **130**

2',3'-Di-*O*-acetyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-inosin **131**

2',3'-Di-*O*-acetyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-6-*O*-(4-nitrophenylethyl)-inosin **132**

5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-6-*O*-(4-nitrophenylethyl)-inosin **133**

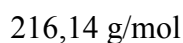
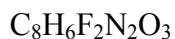
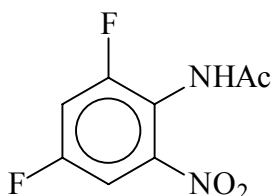
5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-6-*O*-(4-nitrophenylethyl)-inosin **134**

5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-6-*O*-(4-nitrophenylethyl)-inosin **135**

3'-*O*-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-6-*O*-(4-nitro-phenylethyl)-inosin **136**

11.3 Darstellung und Eigenschaften der Einzelverbindungen

2,4-Difluor-6-nitroacetanilid 41



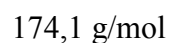
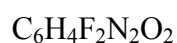
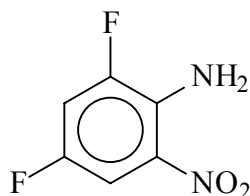
7,8 g (39,4 mmol) 2,4-Difluoracetanilid wurden in 9 ml konz. Schwefelsäure und 3,1 ml Eisessig gelöst. Hierzu wurde langsam eine Mischung aus 3,1 ml konz. Schwefelsäure und 3,1 ml konz. Salpetersäure zugetropft, wobei die Temperatur 40°C nicht überschritt. Anschließend wurde für 90 Minuten bei 45°C gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf 25 ml Eiswasser gegossen und 30 Minuten im Eisbad gekühlt, um die Auskristallisation des Produktes zu vervollständigen. Der entstandene gelbe Niederschlag wurde abgesaugt, mit Eiswasser gewaschen und getrocknet. Das Produkt wurde als gelber Niederschlag erhalten.

Ausbeute: 9,55 g (96,4 %)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (270 MHz, DMSO- d_6)
10.20 (s, 1H, NH); 7.85 (m, 2H, 3H, 5H); 2.05 (s, 3H, CH₃)

IR (KBr): 1119,8 cm^{-1} C-F
1547,7 cm^{-1} NO₂
1676,6 cm^{-1} C=O
3237,4 cm^{-1} ; 3181,8 cm^{-1} N-H

Schmelzpkt.: 135°C

2,4-Difluor-6-nitroanilin 42

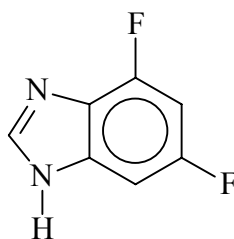
9,5 g (44 mmol) 2,4-Difluor-6-nitroacetanilid **41** wurden in 9 ml konz. Schwefelsäure gelöst und 2 Stunden bei 95°C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf Eis gegossen und 30 Minuten im Eisbad gekühlt, um die Auskristallisation des Produktes zu vervollständigen. Der entstandene gelbe Niederschlag wurde abgesaugt, mit Eiswasser gewaschen und getrocknet. Das Rohprodukt wurde in Ethanol umkristallisiert. Das Produkt wurde als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 4,37 g (57,1 %)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (270 MHz, DMSO- d_6)
7.65 (m, 2H, 3H, 5H); 7.20 (s br, 2H, NH_2)

IR (KBr): 1127,6 cm^{-1} C-F
1531,7 cm^{-1} NO_2
3495,0 cm^{-1} ; 3376,5 cm^{-1} N-H

Schmelzpkt.: 85 - 86°C

4,6-Difluorbenzimidazol 44

154,11 g/mol

13 g (74,7 mmol) 2,4-Difluor-6-nitroanilin 42 wurden in 200 ml abs. Ethanol (entgast) gelöst und mit 700 mg (3,1 mmol) Platindioxid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 24 Stunden (Reaktionszeit sehr variabel, siehe S. 56) in einer Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Der Katalysator wurde durch absaugen der Reaktionssuspension über Celite entfernt und die verbleibende Reaktionslösung am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das erhaltene dunkle Öl wurde sofort in 200 ml Ameisensäure gelöst und 1,5 Stunden unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde die überschüssige Ameisensäure am Rotationsverdampfer entfernt und der erhaltene Rückstand getrocknet. Aufgrund seiner Reinheit (> 98%) und seiner schlechten Löslichkeit wurde auf eine weitere Aufreinigung verzichtet. Das Produkt wurde als dunkler Feststoff erhalten. Für analytische Zwecke wurde ein Teil des Produktes sublimiert und als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 8,17 g (71,0 %)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO- d_6)

12.87 (s, 1H, NH); 8.28 (s, 1H, 2H); 7.25 (dd, $J = 1.9$ Hz, $J = 8.8$ Hz, 1H, 7H);

7.03 (dt, $J = 2.1$ Hz, $J = 10.6$ Hz, 1H, 5H)

IR (KBr): 1115,7 cm^{-1} C-F

3073,6 cm^{-1} N-H

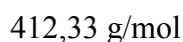
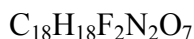
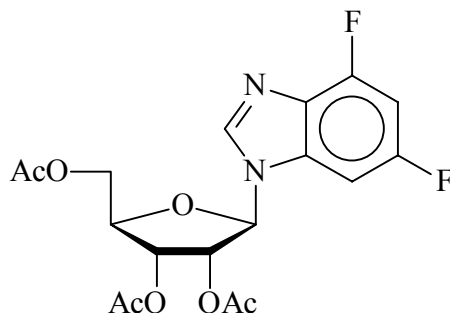
Schmelzpkt.: 233 – 234 °C

ESI(+): m/z 154,8 (M+H) $^+$

El.-Analyse: Berechnet: C: 54,55 % H: 2,62 % N: 18,18 %

Gefunden: C: 54,30 % H: 2,90 % N: 17,98 %

2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose 56



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

3,1 g (20 mmol) 4,6-Difluorbenzimidazol 44 wurden in 80 ml abs. Acetonitril suspendiert und mit 7,4 ml (30 mmol) *N,O*-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 15 Minuten unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 6,4 g (20 mmol) 1,2,3,5-Tetra-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose 54 in 35 ml abs. Acetonitril und 4,5 ml (25 mmol) Trimethylsilyltrifluorsulfonat (TMSOTf) zugesetzt. Es wurde 2,5 Stunden unter Rückfluß gekocht und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml wäßriger NaHCO_3 -Lösung gequench und dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 98:2. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 5,6 g (67,8 %)

DC: $R_f = 0,49$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d_6)

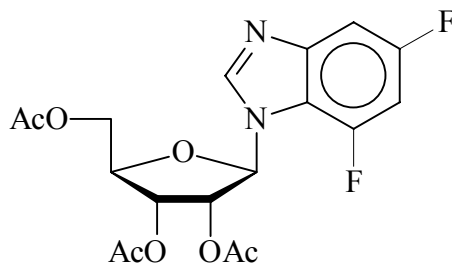
8.56 (s, 1H, 2H); 7.57 (dd, $J = 9.0$ Hz, $J = 2.1$ Hz, 1H, 7H); 7.19 (dt, $J = 10.5$ Hz, $J = 2.0$ Hz, 1H, 5H); 6.33 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H, 1'H); 5.64 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H,

2'H); 5.43 (dd, $J = 6.3$ Hz, $J = 4.3$ Hz, 1H, 3'H); 4.40 (m, 3H, 4'H, 5'H); 2.14 (s, 3H, CH₃-acetyl); 2.08 (s, 3H, CH₃-acetyl); 2.04 (s, 3H, CH₃-acetyl)

¹³C-NMR: δ [ppm] (63,9 MHz, DMSO-d₆)
 170.00 (C=O); 169.52 (C=O); 169.26 (C=O); 158.48 (dd, $J = 11.2$ Hz, $J = 238.9$ Hz, C4); 152.67 (dd, $J = 15.1$ Hz, $J = 253.2$ Hz, C6); 143.67 (C2); 134.67 (dd, $J = 5.5$ Hz, $J = 16.5$ Hz, C9); 128.94 (d, $J = 18.1$ Hz, C8); 98.32 (dd, $J = 7.5$ Hz, $J = 22.5$ Hz, C5); 95.09 (dd, $J = 4.4$ Hz, $J = 28.4$ Hz, C7); 86.43 (C1'); 79.57 (C4'); 71.69 (C3'); 69.43 (C2'); 62.95 (C5'); 20.48 (CH₃-acetyl); 20.38 (CH₃-acetyl); 20.18 (CH₃-acetyl)

ESI(+): m/z 413,0 (M+H)⁺

2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-3-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose 57



C₁₈H₁₈F₂N₂O₇

412,33 g/mol

2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-3-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose 57 entstand als Nebenprodukt bei der Darstellung von 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose 56.

Ausbeute: 0,94 g (11,4 %)

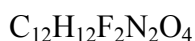
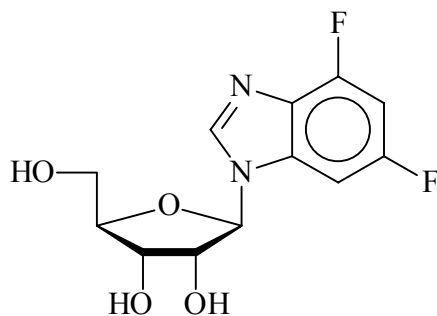
DC: R_f = 0,42 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO- d_6)
 8.63 (s, 1H, 2H); 7.45 (dd, $J = 9.1$ Hz, $J = 2.1$ Hz, 1H, 7H); 7.30 (dt, $J = 10.8$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1H, 5H); 6.28 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H, 1'H); 5.63 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H, 2'H); 5.39 (Ψ t, $J = 5.1$ Hz, 1H, 3'H); 4.40 (m, 2H, 5'H); 4.24 (m, 1H, 4'H); 2.11 (s, 3H, CH₃-acetyl); 2.05 (s, 3H, CH₃-acetyl); 2.03 (s, 3H, CH₃-acetyl)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (63,9 MHz, DMSO- d_6)
 170.41 (C=O); 169.82 (C=O); 169.57 (C=O); 158.35 (dd, $J = 11.2$ Hz, $J = 238.1$ Hz, C4); 147.89 (dd, $J = 15.8$ Hz, $J = 248.0$ Hz, C6); 146.99 (dd, $J = 5.2$ Hz, $J = 14.2$ Hz, C9); 145.56 (C2); 117.66 (d, $J = 12.2$ Hz, C8); 102.63 (dd, $J = 4.7$ Hz, $J = 24.1$ Hz, C5); 100.25 (dd, $J = 7.1$ Hz, $J = 30.5$ Hz, C7); 87.81 (C1'); 79.57 (C4'); 73.57 (C3'); 69.62 (C2'); 63.00 (C5'); 20.83 (CH₃-acetyl); 20.71 (CH₃-acetyl); 20.51 (CH₃-acetyl)

ESI(+): m/z 413,0 (M+H)⁺

1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose 33



286,23 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

5,59 g (13,5 mmol) 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose 56 wurden in 150 ml NH₃-gesättigtem Methanol gelöst und 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer

zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 4:1. Das Produkt wurde als gelbliches Öl erhalten.

Ausbeute: 3,66 g (94,2 %)

DC: $R_f = 0,64$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 4:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d_6)

8.52 (s, 1H, 2H); 7.65 (dd, $J = 9.1$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1H, 7H); 7.13 (dt, $J = 2.2$ Hz, $J = 10.5$ Hz, 1H, 5H); 5.87 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, 1'H); 5.51 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, 2'-OH); 5.25 (d, $J = 4.6$ Hz, 3'-OH); 5.22 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H, 5'-OH); 4.34 (q, $J = 6.3$ Hz, 1H, 2'H); 4.12 (m, 1H, 3'H); 4.00 (q, $J = 3.1$ Hz, 1H, 4'H); 3.66 (m, 2H, 5'H)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (63,9 MHz, DMSO-d_6)

158.13 (dd, $J = 238.3$ Hz, $J = 11.3$ Hz, C4); 152.53 (dd, $J = 252.7$ Hz, $J = 15.2$ Hz, C6); 143.70 (C2); 134.95 (dd, $J = 10.7$ Hz, $J = 5.4$ Hz, C9); 129.01 (d, $J = 17.7$ Hz, C8); 97.66 (dd, $J = 22.1$ Hz, $J = 7.5$ Hz, C5); 95.43 (d, $J = 28.4$ Hz, C7); 89.07 (C1'); 85.83 (C4'); 73.63 (C2'); 70.04 (C3'); 61.08 (C5')

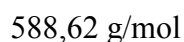
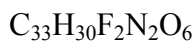
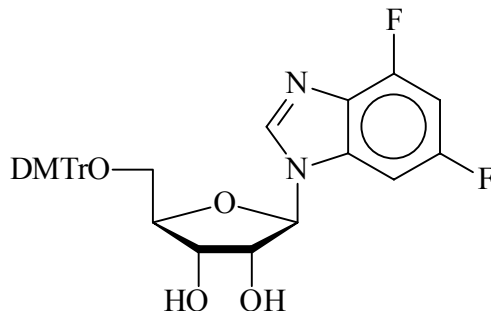
$^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (254,2 MHz, DMSO-d_6)

-116.40 (m, 1F, 6F); -125.25 (m, 1F, 4F)

ESI(-): m/z 285,1 (M-H)⁻

UV: λ_{max} (Methanol): 244,5 nm; 274,5 nm

1'-Desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose 63



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

640 mg (2,2 mmol) 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluorbenzimidazolyl)- β -D-ribofuranose 33 wurden in 10 ml abs. Pyridin gelöst und mit 0,47 ml (3,3 mmol) Triethylamin und 0,91 g (2,6 mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml Methanol gequenchet und mit gesättigter wäßriger NaHCO_3 -Lösung versetzt. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 95:5. Das Produkt wurde als gelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 980 mg (74,8 %)

DC: $R_f = 0,52$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

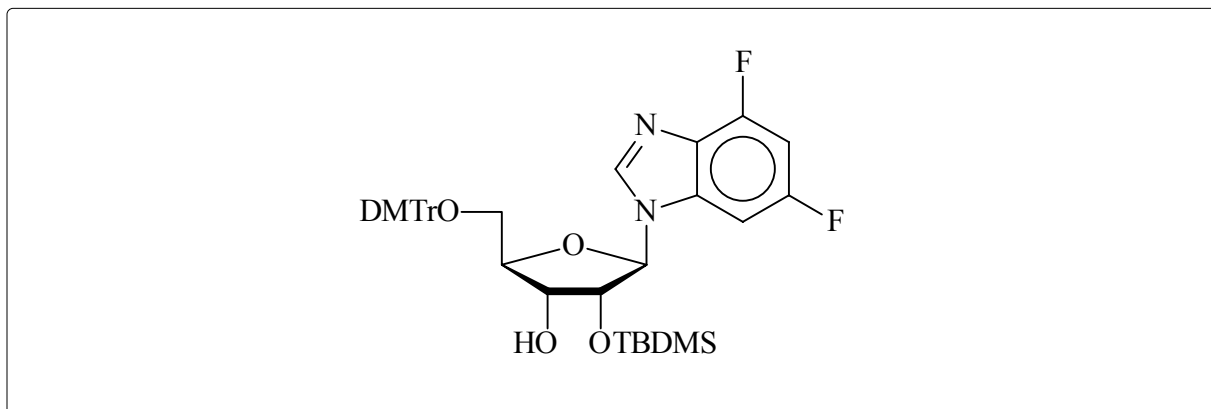
$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (270 MHz, DMSO-d_6)

8.43 (s, 1H, 2H); 7.47 (dd, $J = 8.8 \text{ Hz}$, $J = 1.9 \text{ Hz}$, 1H, 7H); 7.35 – 6.81 (m, 14H, H_{ar} , 5H); 5.93 (d, $J = 5.1 \text{ Hz}$, 1H, 1'H); 5.69 (d, $J = 5.9 \text{ Hz}$, 1H, 2'-OH); 5.30 (d, $J = 5.5 \text{ Hz}$, 1H, 3'-OH); 4.49 (q, $J = 5.5 \text{ Hz}$, 1H, 2'H); 4.21 (q, $J = 5.2 \text{ Hz}$, 1H, 3'H); 4.12 (m, 1H, 4'H); 3.72 (s, 6H, OCH_3); 3.23 (m, 2H, 5'H)

^{13}C -NMR: δ [ppm] (67,9 MHz, DMSO- d_6)
 158.22 (dd, $J = 239.2$ Hz, $J = 11.3$ Hz, C4); 158.04 (DMTr); 152.57 (dd, $J = 253.3$ Hz, $J = 15.3$ Hz, C6); 146.82 (C2); 144.69 (DMTr); 135.36 (DMTr); 135.31 (DMTr); 135.13 (dd, $J = 10.8$ Hz, $J = 5.3$ Hz, C9); 129.05 (DMTr); 128.94 (d, $J = 15.5$ Hz, C8); 127.75 (DMTr); 127.59 (DMTr); 126.66 (DMTr); 113.11 (DMTr); 97.83 (dd, $J = 22.1$ Hz, $J = 7.3$ Hz, C5); 95.17 (d, $J = 28.1$ Hz, C7); 89.09 (C1'); 85.62 (DMTr); 83.50 (C4'); 73.26 (C2'); 69.90 (C3'); 63.40 (C5'); 54.95 (OCH₃)

ESI(-): m/z 587,4 (M-H)⁻

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose 64



$\text{C}_{39}\text{H}_{44}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_6\text{Si}$

702,84 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

2,53 g (4,3 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'- β -D-(4,6-difluor-benzimidazolyl)-ribofuranose 63 wurden in 40 ml eines 1:1 Gemisches aus THF/Pyridin gelöst und mit 900 mg (5,3 mmol) Silbernitrat und 6,2 ml (6,2 mmol) einer 1 M *tert.*-Butyldimethylsilylchlorid-Lösung in THF versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml einer gesättigten wäßrigen NaHCO₃-Lösung gequenchet. Das entstandene

Silberchlorid wurde über Celite abgetrennt und das Filtrat dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte über präp. HPLC (*MN Nucleoprep 100-20* von *Macherey-Nagel*, *n*-Hexan/Isopropylacetat 3:2). Das Produkt (*slow-Isomer*) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 970 mg (32,1 %)

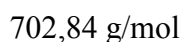
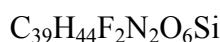
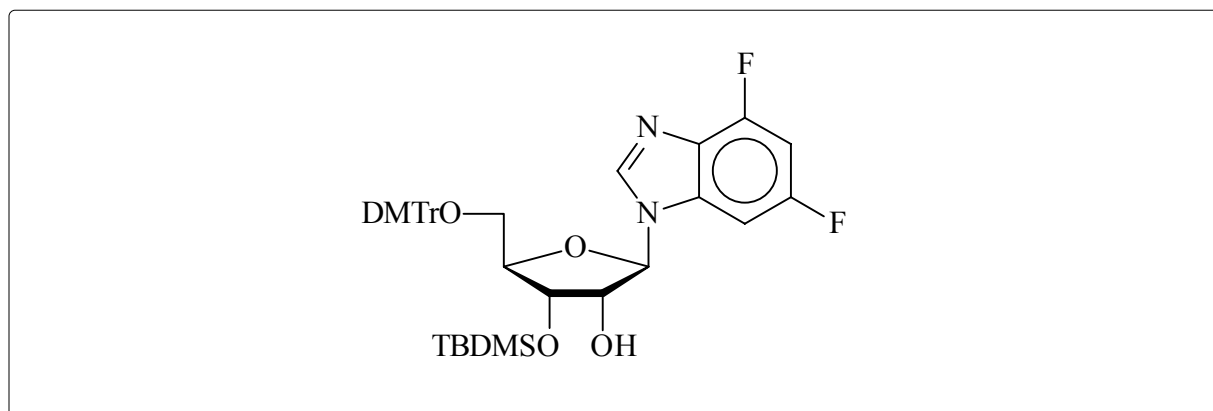
DC: R_f = 0,55 (CH₂Cl₂/MeOH 99:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆)
8.47 (s, 1H, 2H); 7.47 (dd, J = 8.9 Hz, J = 2.0 Hz, 1H, 7H); 7.39 – 6.84 (m, 13H, H_{ar}); 7.12 (dt, J = 8.5 Hz, J = 2.0 Hz, 1H, 5H); 5.97 (d, J = 6.3 Hz, 1H, 1'H); 5.24 (d, J = 5.5 Hz, 1H, 3'-OH); 4.59 (t, J = 5.8 Hz, 1H, 2'H); 4.19 (m, 1H, 3'H); 4.14 (m, 1H, 4'H); 3.73 (s, 6H, OCH₃); 3.31 (m, 2H, 5'H); 0.72 (s, 9H, C(CH₃)₃); -0.08 (s, 3H, SiCH₃); -0.24 (s, 3H, SiCH₃)

¹³C-NMR: δ [ppm] (100,6 MHz, DMSO-d₆)
158.08 (dd, J = 250.9 Hz, J = 11.5 Hz, C4); 158.02 (DMTr); 152.58 (dd, J = 252.4 Hz, J = 15.4 Hz, C6); 144.63 (DMTr); 143.52 (C2); 135.10 (DMTr); 135.05 (DMTr); 134.45 (d, J = 10.2 Hz, C9); 129.64 (DMTr); 128.95 (d, J = 16.7 Hz, C8); 127.67 (DMTr); 127.43 (DMTr); 126.64 (DMTr); 113.07 (DMTr); 97.91 (C5); 95.31 (d, J = 32.6 Hz, C7); 88.56 (C1'); 85.72 (DMTr); 84.23 (C4'); 74.59 (C2'); 69.67 (C3'); 63.28 (C5'); 54.88 (OCH₃); 25.31 (SiC(CH₃)₃); 17.61 (SiC(CH₃)₃); -5.16 (SiCH₃); -5.76 (SiCH₃)

ESI(-): m/z 701,5 (M-H)⁻

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose 65



5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluorbenzimidazolyl)- β -D-ribofuranose 65 entstand als Nebenprodukt (*fast-Isomer*) bei der Darstellung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluorbenzimidazolyl)- β -D-ribofuranose 64.

Ausbeute: 1,55 g (51,3 %)

DC: $R_f = 0,55$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1)

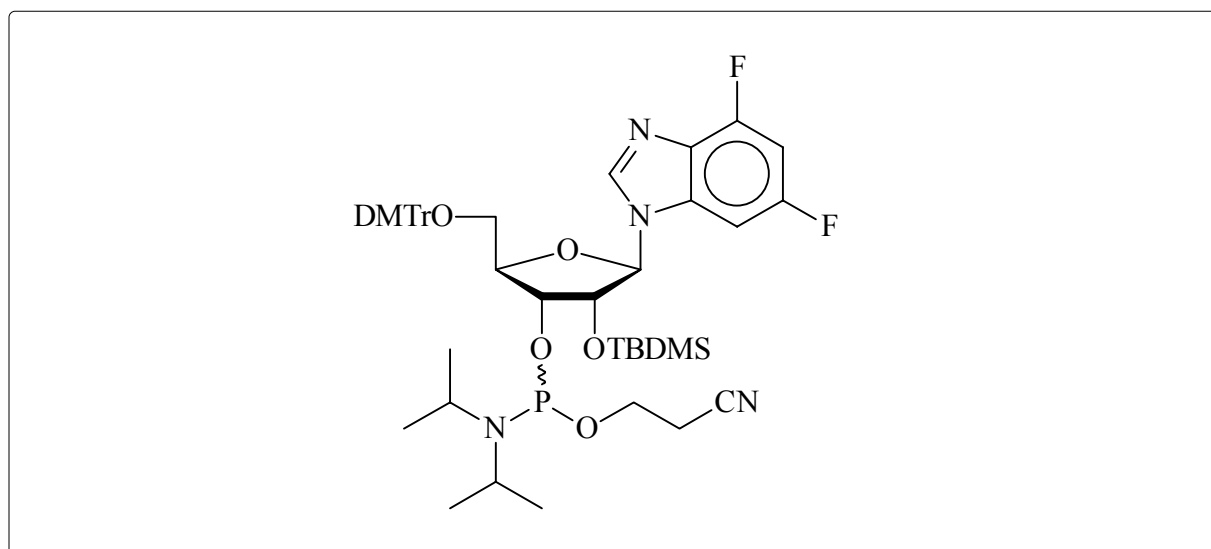
$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6)
 8.47 (s, 1H, 2H); 7.48 (dd, $J = 8.7 \text{ Hz}$, $J = 2.0 \text{ Hz}$, 1H, 7H); 7.36 – 6.82 (m, 14H, 5H, H_{ar}); 5.90 (d, $J = 5.6 \text{ Hz}$, 1H, 1'H); 5.53 (d, $J = 6.4 \text{ Hz}$, 1H, 2'-OH); 4.50 (q, $J = 5.8 \text{ Hz}$, 1H, 2'H); 4.32 (t, $J = 4.7 \text{ Hz}$, 1H, 3'H); 4.07 (q, $J = 4.0 \text{ Hz}$, 1H, 4'H); 3.72 (s, 6H, OCH_3); 3.26 (m, 2H, 5'H); 0.81 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 0.06 (SiCH_3); -0.01 (SiCH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (100,6 MHz, DMSO-d_6)
 158.20 (dd, $J = 239.5 \text{ Hz}$, $J = 11.5 \text{ Hz}$, C4); 158.11 (DMTr); 152.59 (dd, $J = 272.9 \text{ Hz}$, $J = 15.0 \text{ Hz}$, C6); 144.55 (DMTr); 143.32 (C2); 135.22 (DMTr); 135.19 (DMTr); 134.86 (d, $J = 10.7 \text{ Hz}$, C9); 129.64 (DMTr); 129.04 (d, $J = 16.8 \text{ Hz}$, C8); 127.77 (DMTr); 127.57 (DMTr); 126.72 (DMTr); 113.13 (DMTr); 97.87 (dd, $J = 20.6 \text{ Hz}$, $J = 7.4 \text{ Hz}$, C5); 95.40 (d, $J = 27.9 \text{ Hz}$, C7);

89.11 (C1'); 85.86 (DMTr); 84.00 (C4'); 72.71 (C2'); 71.65 (C3'); 62.87 (C5'); 54.97 (OCH₃); 25.69 (SiC(CH₃)₃); 17.93 (SiC(CH₃)₃); -4.53 (SiCH₃); -5.19 (SiCH₃)

ESI(-): m/z 701,5 (M-H)⁻

3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(*tert.*-butyldimethylsilyl)-β-D-ribofuranose 67



C₄₈H₆₁F₂N₄O₇PSi

903,04 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

200 mg (0,29 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluorbenzimidazolyl)-β-D-ribofuranose 64 wurden in 10 ml abs. Acetonitril gelöst und mit 380 µl (2,9 mmol) *sym.* Collidin und 12 µl (0,15 mmol) 1-Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und 96 µl (0,43 mmol) 2-Cyanethoxydiisopropylchlorphosphoramidit 66 zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde 15 Minuten bei 0°C und 25 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml gesättigter wäßriger NaHCO₃-Lösung gequenchet. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über

MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch pDC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 99:1. Das Produkt (ein Gemisch zweier Diastereomere) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 180 mg (70,0 %)

DC: R_f = 0,65 (CH₂Cl₂/MeOH 98:2)

¹H-NMR: δ [ppm] (270 MHz, DMSO-d₆)

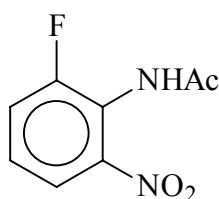
8.12, 8.11 (s, 2H, 2H); 7.46 – 6.73 (m, 30 H, H_{ar}, 5H, 7H); 5.85, 5.78 (d, J = 7.6 Hz, J = 7.2 Hz, 2H, 1'H); 4.67 (m, 2H, 2'H); 4.41 (m, 2H, 3'H); 4.32 (m, 2H, 4'H); 3.79, 3.78 (s, 12H, OCH₃); 3.52 (m, 8H, 5'H, CH₂CN); 2.67 (m, 4H, OCH₂); 1.19 (m, 12H, CH(CH₃)₂); 0.82, 0.76 (s, 18H, SiC(CH₃)₃); -0.09, -0.10, -0.32, -0.34 (s, 12H, SiCH₃)

³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃)

152.62 und 149.33 (Verhältnis 1 : 2,75)

ESI(+): m/z 903,6 (M+H)⁺

2-Fluor-6-nitroacetanilid **47**



C₈H₇FN₂O₃

198,15 g/mol

20,8 g (135,8 mmol) 2-Fluoracetanilid **45** wurden in 18,4 ml (166 mmol) Essigsäureanhydrid und 13,8 ml (219 mmol) Eisessig gelöst. Die Reaktionslösung wurde auf -5°C abgekühlt und innerhalb von 10 Minuten mit einer Mischung aus 7,4 ml rauchender Salpetersäure und 11,5 ml (182 mmol) Eisessig versetzt. Beim erwärmen über 2 Stunden auf Raumtemperatur fiel ein

gelber Niederschlag aus. Der Ansatz wurde 2 Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es wurde mit 200 ml Wasser versetzt und 2 Stunden im Eisbad die Kristallisation vervollständigt. Der gelbe Niederschlag wurde abgesaugt, mit Eiswasser gewaschen und getrocknet. Das Rohprodukt wurde mit 90 ml eiskalter Witt-Utermann-Lösung versetzt und 3 Minuten gerührt. Anschließend wurde abfiltriert und zweimal mit 30 ml Witt-Utermann-Lösung und einmal mit 60 ml Eiswasser gewaschen. Das Filtrat wurde mit Essigsäure neutralisiert, 2 Stunden im Eisbad auskristallisiert, abgesaugt und getrocknet. Das Produkt wurde in Ethanol umkristallisiert und als cremefarbener Feststoff erhalten.

Ausbeute: 11,34 g (42,1 %)

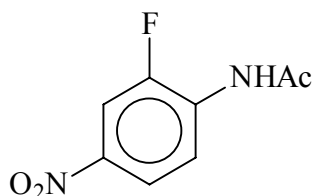
$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO- d_6)
7.79 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, 5H); 7.69 (dt, $J = 1.3$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 1H, 4H); 7.48 (m, 1H, 3H); 2.08 (s, 3H, CH_3)

IR (KBr): 1184,5 cm^{-1} C-F
1539,1 cm^{-1} NO_2
1674,7 cm^{-1} C=O
3285,0 cm^{-1} N-H

Schmelzpkt.: 171 - 174°C

| | | | | |
|--------------|------------|------------|-----------|------------|
| El.-Analyse: | Berechnet: | C: 48,49 % | H: 3,56 % | N: 14,14 % |
| | Gefunden: | C: 48,38 % | H: 3,68 % | N: 13,96 % |

2-Fluor-4-nitroacetanilid 46



$\text{C}_8\text{H}_7\text{FN}_2\text{O}_3$

198,15 g/mol

2-Fluor-4-nitroacetanild **46** entstand als Nebenprodukt bei der Darstellung von 2-Fluor-6-nitroacetanild **47**. Bei der Isomerentrennung mit Witt-Utermann-Lösung löste sich 2-Fluor-4-nitroacetanild nicht und verblieb beim Absaugen im Filter. Nach dem Trocknen wurde es in Ethanol umkristallisiert. Das Produkt wurde als cremefarbener Feststoff erhalten.

Ausbeute: 9,77 g (36,3 %)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO- d_6)

8.41 (dd, $J = 9.1$ Hz, $J = 7.8$ Hz, 1H, 3H); 8.12 (m, 2H, 5H, 6H); 2.19 (s, 3H, CH_3)

IR (KBr): 1162,3 cm^{-1} C-F

1559,9 cm^{-1} NO_2

1688,3 cm^{-1} C=O

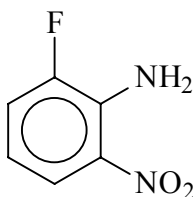
3266,1 cm^{-1} ; 3218,5 cm^{-1} N-H

Schmelzpkt.: 204°C

El.-Analyse: Berechnet: C: 48,49 % H: 3,56 % N: 14,14 %

Gefunden: C: 48,61 % H: 3,31 % N: 14,07 %

2-Fluor-6-nitroanilin **48**



156,11 g/mol

12 g (60,5 mmol) 2-Fluor-6-nitroacetanilid **47** wurden in 60 ml einer 2 N Salzsäure gelöst und 3 Stunden unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde mit gesättigter wäßriger NaHCO_3 -Lösung neutralisiert und 30 Minuten im Eisbad gekühlt, um die Auskristallisation des Produktes (ein Teil fiel als dunkle Brocken aus) zu vervollständigen.

Der entstandene gelbe bis schwärzliche Niederschlag wurde abgesaugt, mit Eiswasser gewaschen und getrocknet. Das Produkt wurde als gelber bis schwärzlicher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 8,46 g (89,5 %)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (270 MHz, DMSO- d_6)

7.83 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, 5H); 7.44 (dt, $J = 1.0$ Hz, $J = 7.9$ Hz, 1H, 4H); 7.24 (s br, 2H, NH_2); 6.62 (m, 1H, 3H)

IR (KBr): $1164,3\text{ cm}^{-1}$ C-F

$1532,9\text{ cm}^{-1}$ NO_2

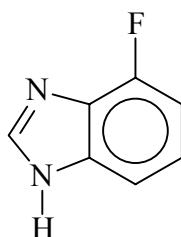
$3490,7\text{ cm}^{-1}$; $3368,7\text{ cm}^{-1}$ N-H

Schmelzpkt.: $75 - 76^\circ\text{C}$

El.-Analyse: Berechnet: C: 46,16 % H: 3,23 % N: 17,95 %

Gefunden: C: 46,14 % H: 3,04 % N: 18,02 %

4-Fluorbenzimidazol 50



136,12 g/mol

4,59 g (29,4 mmol) 2-Fluor-6-nitroanilin 48 wurden in 100 ml abs. Ethanol (entgast) gelöst und mit 300 mg (1,3 mmol) Platindioxid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 5 Stunden (Reaktionszeit sehr variabel, siehe S. 56) in einer Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Der Katalysator wurde durch absaugen der Reaktionssuspension über Celite entfernt und die verbleibende Reaktionslösung am Rotationsverdampfer eingengt. Das erhaltene dunkle Öl wurde sofort in 100 ml Ameisensäure gelöst und 2 Stunden unter Rückfluß

gekocht. Anschließend wurde die überschüssige Ameisensäure am Rotationsverdampfer entfernt und der erhaltene Rückstand getrocknet. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 9:1. Das Produkt wurde als dunkler Feststoff erhalten.

Ausbeute: 3,43 g (85,6 %)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (270 MHz, DMSO- d_6)

12.86 (s, 1H, NH); 8.29 (s, 1H, 2H); 7.40 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, 7H); 7.16 (m, 1H, 6H); 6.98 (m, 1H, 5H)

IR (KBr): 1169,0 cm^{-1} C-F

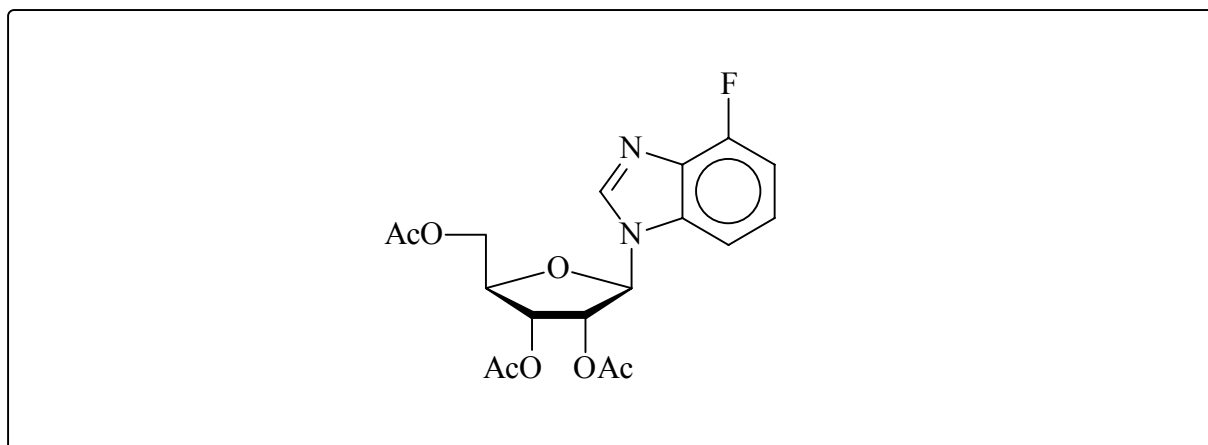
3200 - 3000 cm^{-1} N-H

Schmelzpkt.: 185 - 187°C

El.-Analyse: Berechnet: C: 61,76 % H: 3,67 % N: 20,58 %

Gefunden: C: 61,69 % H: 3,92 % N: 20,50 %

2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4-fluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose 68



$\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{FN}_2\text{O}_7$

394,34 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

3,2 g (23,5 mmol) 4-Fluorbenzimidazol **50** wurden in 80 ml abs. Acetonitril suspendiert und mit 8,8 ml (36 mmol) *N,O*-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 15 Minuten unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 7,6 g (23,9 mmol) 1,2,3,5-Tetra-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose **54** in 35 ml abs. Acetonitril und 5,4 ml (29,8 mmol) Trimethylsilyltrifluorsulfonat (TMSOTf) zugesetzt. Es wurde 2,5 Stunden unter Rückfluß gekocht und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml gesättigter wäßriger NaHCO₃-Lösung gequenchet und dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 98:2. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 6,2 g (65,7 %)

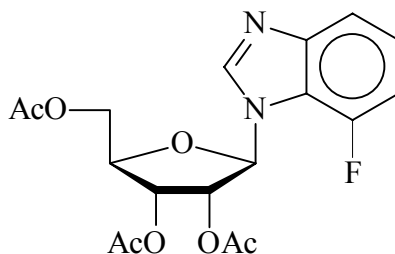
DC: R_f = 0,41 (CH₂Cl₂/MeOH 98:2)

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d₆)
8.54 (s, 1H, 2H); 7.60 (d, J = 7.8 Hz, 1H, 7H); 7.30 (dt, J = 4.9 Hz, J = 8.1 Hz, 1H, 6H); 7.10 (dd, J = 7.8 Hz, J = 11.0 Hz, 1H, 5H); 6.34 (d, J = 6.2 Hz, 1H, 1'H); 5.66 (t, J = 6.3 Hz, 1H, 2'H); 5.43 (dd, J = 4.6 Hz, J = 6.3 Hz, 1H, 3'H); 4.42 (m, 1H, 4'H); 4.37 (m, 2H, 5'H); 2.13 (s, 3H, CH₃-acetyl); 2.07 (s, 3H, CH₃-acetyl); 2.03 (s, 3H, CH₃-acetyl)

¹³C-NMR: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO-d₆)
170.01 (C=O acetyl); 169.52 (C=O acetyl); 169.22 (C=O acetyl); 143.04 (C2); 135.37 (d, J = 8.7 Hz, C6); 132.24 (d, J = 14.3 Hz, C5); 123.94 (d, J = 7.2 Hz, C8); 108.02 (d, J = 18.8 Hz, C9); 107.87 (C7); 86.47 (C1'); 79.47 (C4'); 71.75 (C2'); 69.53 (C3'); 62.94 (C5'); 20.50 (CH₃-acetyl); 20.36 (CH₃-acetyl); 20.15 (CH₃-acetyl)

ESI(+): m/z 395,1 (M+H)⁺

2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4-fluor-3-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose 69



$C_{18}H_{19}FN_2O_7$

394,34 g/mol

2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4-fluor-3-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **69** entstand als Nebenprodukt bei der Darstellung von 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4-fluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **68**.

Ausbeute: 0,73 g (7,8 %)

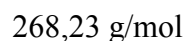
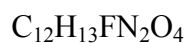
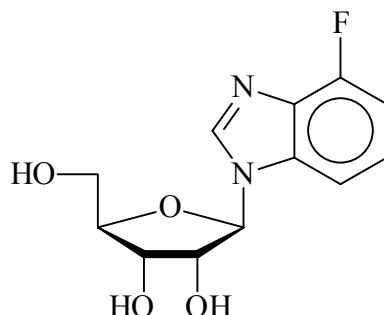
DC: $R_f = 0,35$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 98:2)

1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, $DMSO-d_6$)
 8.58 (s, 1H, 2H); 7.56 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, 7H); 7.26 (m, 1H, 6H); 7.19 (m, 1H, 5H); 6.31 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H, 1'H); 5.66 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H, 2'H); 5.40 (m, 1H, 3'H); 4.38 (m, 2H, 4'H, 5'H); 4.26 (m, 1H, 5'H); 2.12 (s, 3H, CH_3 -acetyl); 2.05 (s, 3H, CH_3 -acetyl); 2.03 (s, 3H, CH_3 -acetyl)

^{13}C -NMR: δ [ppm] (62,9 MHz, $DMSO-d_6$)
 170.01 (C=O acetyl); 169.43 (C=O acetyl); 169.17 (C=O acetyl); 148.24 (d, $J = 245.5$ Hz, C4); 147.17 (d, $J = 3.6$ Hz, C8); 143.58 (C2); 123.07 (d, $J = 6.9$ Hz, C6); 120.24 (d, $J = 10.3$ Hz, C9); 116.33 (d, $J = 3.6$ Hz, C7); 109.55 (d, $J = 18.4$ Hz, C5); 87.34 (d, $J = 3.1$ Hz, C1'); 79.10 (C4'); 72.61 (d, $J = 2.9$ Hz, C2'); 69.27 (C3'); 62.64 (C5'); 20.41 (CH_3 -acetyl); 20.29 (CH_3 -acetyl); 20.08 (CH_3 -acetyl)

ESI(+): m/z 395,1 (M+H)⁺

1'-Desoxy-1'-(4-fluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose 32



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

5,46 g (13,8 mmol) 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4-fluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose 68 wurden in 150 ml NH_3 -gesättigtem Methanol gelöst und 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 4:1. Das Produkt wurde als gelbliches Öl erhalten.

Ausbeute: 3,58 g (96,4 %)

DC: $R_f = 0,42$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 4:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d_6)

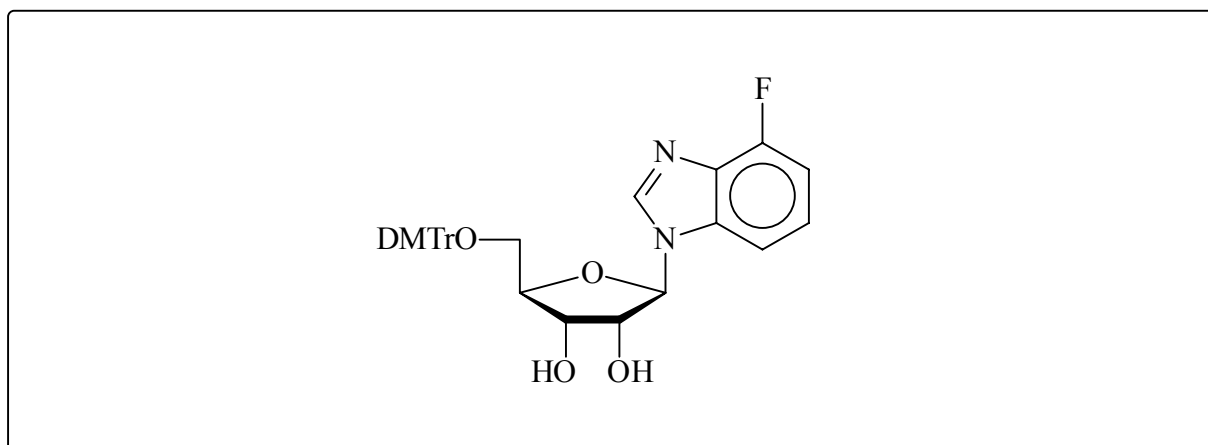
8.51 (s, 1H, 2H); 7.60 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, 7H); 7.26 (dt, $J = 5.0$ Hz, $J = 8.0$ Hz, 1H, 6H); 7.06 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 11.0$ Hz, 1H, 5H); 5.89 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H 1'H); 5.51 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, 2'-OH); 5.23 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, 3'-OH); 5.14 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H, 5'-OH); 4.36 (q, $J = 5.9$ Hz, 1H, 2'H); 4.13 (m, 1H, 3'H); 3.99 (q, $J = 3.4$ Hz, 1H, 4'H); 3.64 (m, 2H, 5'H)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (67,9 MHz, DMSO-d_6)

142.81 (C2); 136.04 (d, $J = 10.1$ Hz, C6); 132.46 (d, $J = 16.8$ Hz, C5); 123.28 (d, $J = 7.3$ Hz, C8); 108.05 (C7); 107.37 (d, $J = 17.5$ Hz, C9); 88.89 (C1'); 85.62 (C4'); 73.77 (C2'); 70.04 (C3'); 61.13 (C5')

^{19}F -NMR: δ [ppm] (254,2 MHz, DMSO- d_6)
-128.92 (m, 1F, 4F)
ESI(-): m/z 267,1 (M-H)⁻
UV: λ_{max} (Methanol): 245,0 nm; 277,0 nm

1'-Desoxy -5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-1'-(4-fluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose 70



$\text{C}_{33}\text{H}_{31}\text{FN}_2\text{O}_6$

570,59 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

1,08 g (4 mmol) 1'-Desoxy-1'-(4-fluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **32** wurden in 20 ml abs. Pyridin gelöst und mit 0,74 ml (6 mmol) Triethylamin und 1,44 g (4,3 mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 6,5 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml Methanol gequenchet und mit gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung versetzt. Es wurde dreimal mit Methylenechlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenechlorid/Methanol 95:5. Das Produkt wurde als gelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 2,04 g (89,1 %)

DC: $R_f = 0,40$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d_6)

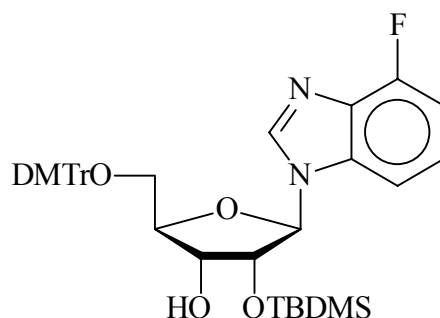
8.42 (s, 1H, 2H); 7.54 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, 7H); 7.39 – 6.81 (m, 13H, H_{ar}); 7.07 (m, 2H, 5H, 6H); 5.94 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, 1'H); 5.66 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, 2'-OH); 5.30 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H, 3'-OH); 4.52 (q, $J = 5.6$ Hz, 1H, 2'H); 4.23 (q, $J = 5.1$ Hz, 1H, 3'H); 4.13 (m, 1H, 4'H); 3.71 (s, 6H, OCH_3); 3.24 (m, 2H, 5'H)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (67,9 MHz, DMSO-d_6)

158.12 (DMTr); 153.34 (d, $J = 250.2$ Hz, C4); 144.76 (DMTr); 142.65 (C2); 135.88 (d, $J = 8.6$ Hz, C6); 135.42 (DMTr); 135.30 (DMTr); 132.29 (d, $J = 16.8$ Hz, C5); 129.75 (DMTr); 127.86 (DMTr); 127.73 (DMTr); 126.75 (DMTr); 123.33 (d, $J = 7.3$ Hz, C8); 113.20 (DMTr); 108.38 (C7); 107.62 (d, $J = 17.5$ Hz, C9); 89.18 (C1'); 85.72 (DMTr); 83.53 (C4'); 73.25 (C2'); 70.10 (C3'); 63.59 (C5'); 55.05 (OCH_3)

ESI(-): m/z 569,4 (M-H^-)

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4-fluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose 71



$\text{C}_{39}\text{H}_{45}\text{FN}_2\text{O}_6\text{Si}$

684,85 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

2,52 g (4,4 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4-fluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **70** wurden in 40 ml eines 1:1 Gemisches aus THF/Pyridin gelöst und mit 900 mg (5,3 mmol) Silbernitrat und 6,2 ml (6,2 mmol) einer 1 M *tert.*-Butyldimethylsilylchlorid-Lösung in THF versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml einer gesättigten wäßrigen NaHCO₃-Lösung gequenchet. Das entstandene Silberchlorid wurde über Celite abgetrennt und das Filtrat dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte über präp. HPLC (MN Nucleoprep 100-20 von Macherey-Nagel, *n*-Hexan/Dioxan 5:2). Das Produkt (*fast-Isomer*) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 1,23 g (40,7 %)

DC: R_f = 0,26 (*n*-Hexan/Ethylacetat 4:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (270 MHz, DMSO-d₆)

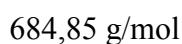
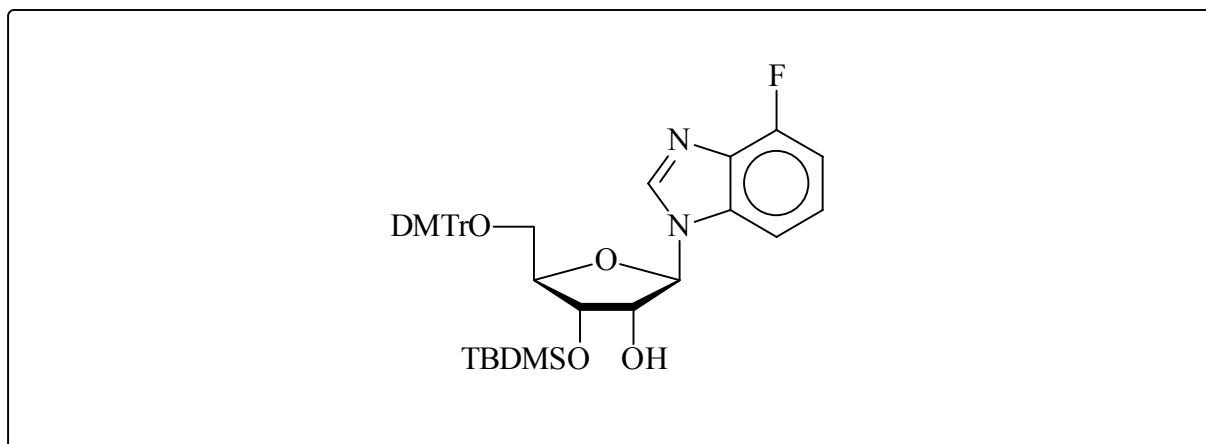
8.45 (s, 1H, 2H); 7.57 (d, J = 7.6 Hz, 1H, 7H); 7.41 – 6.83 (m, 13H, H_{ar}); 6.98 (m, 2H, 5H, 6H); 5.97 (d, J = 6.3 Hz, 1H, 1'H); 5.26 (d, J = 5.3 Hz, 1H, 3'-OH); 4.60 (q, J = 6.0 Hz, 1H, 2'H); 4.35 (m, 1H, 3'H); 4.09 (m, 1H, 4'H); 3.72 (s, 6H, OCH₃); 3.30 (m, 2H, 5'H); 0.82 (s, 9H, SiC(CH₃)₃); 0.07 (s, 3H, SiCH₃); 0.02 (s, 3H, SiCH₃)

¹³C-NMR: δ [ppm] (67,9 MHz, DMSO-d₆)

158.10 (DMTr); 153.27 (d, J = 250.9 Hz, C4); 144.47 (DMTr); 142.78 (C2); 135.63 (d, J = 8.4 Hz, C6); 135.21 (DMTr); 135.14 (DMTr); 132.28 (d, J = 17.3 Hz, C5); 129.62 (DMTr); 127.74 (DMTr); 127.60 (DMTr); 126.69 (DMTr); 123.15 (d, J = 7.1 Hz, C8); 113.13 (DMTr); 108.36 (C7); 107.52 (d, J = 17.3 Hz, C9); 89.07 (C1'); 85.85 (DMTr); 83.95 (C4'); 72.64 (C2'); 71.81 (C3'); 62.99 (C5'); 54.98 (OCH₃); 25.67 (SiC(CH₃)₃); 17.90 (Si(CH₃)₃); -4.56 (SiCH₃); -5.19 (SiCH₃)

ESI(+): m/z 685,5 (M+H)⁺

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4-fluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose 72



5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4-fluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D ribofuranose 72 entstand als Nebenprodukt (*slow-Isomer*) bei der Darstellung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4-fluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose 71.

Ausbeute: 1,48 g (49,0 %)

DC: $R_f = 0,26$ (*n*-Hexan/Ethylacetat 4:1)

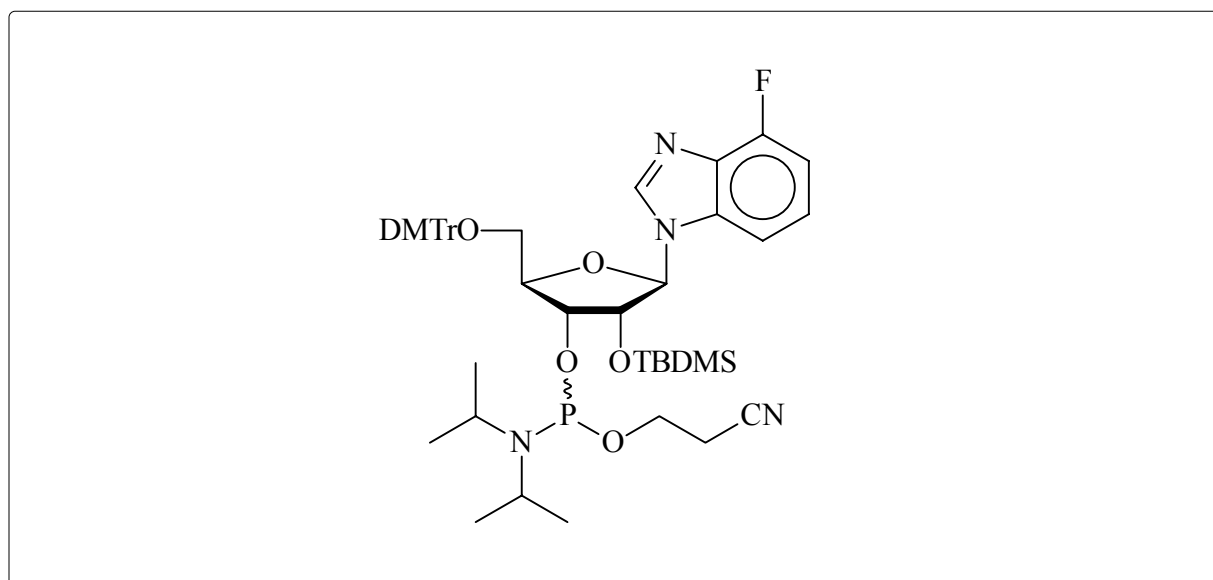
$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (270 MHz, DMSO- d_6)
 8.46 (s, 1H, 2H); 7.56 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, 7H); 7.38 – 6.82 (m, 13H, H_{ar}); 7.07 (m, 2H, 5H, 6H); 5.92 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H, 1'H); 5.53 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, 2'-OH); 4.51 (q, $J = 6.0$ Hz, 1H, 2'H); 4.35 (m, 1H, 3'H); 4.09 (m, 1H, 4'H); 3.72 (s, 6H, OCH₃); 3.30 (m, 2H, 5'H); 0.82 (s, 9H, SiC(CH₃)₃); 0.07 (s, 3H, SiCH₃); 0.02 (s, 3H, SiCH₃)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (67,9 MHz, DMSO- d_6)
 158.10 (DMTr); 153.27 (d, $J = 250.9$ Hz, C4); 144.47 (DMTr); 142.78 (C2); 135.63 (d, $J = 8.4$ Hz, C6); 135.21 (DMTr); 135.14 (DMTr); 132.28 (d, $J = 17.3$ Hz, C5); 129.62 (DMTr); 127.74 (DMTr); 127.60 (DMTr); 126.69 (DMTr); 123.15 (d, $J = 7.1$ Hz, C8); 113.13 (DMTr); 108.36 (C7); 107.52 (d, $J = 17.3$ Hz, C9); 89.07 (C1'); 85.85 (DMTr); 83.95 (C4'); 72.64 (C2'); 71.81

(C3'); 62.99 (C5'); 54.98 (OCH₃); 25.67 (SiC(CH₃)₃); 17.90 (SiC(CH₃)₃);
 -4.56 (SiCH₃); -5.19 (SiCH₃)

ESI(+): m/z 685,5 (M+H)⁺

3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-1'-(4-fluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-β-D-ribofuranose 73



C₄₈H₆₂FN₄O₇PSi

885,05 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

200 mg (0,29 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4-fluor-1-N-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose 71 wurden in 10 ml abs. Acetonitril gelöst und mit 380 µl (2,9 mmol) *sym.* Collidin und 12 µl (0,15 mmol) 1-Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und 96 µl (0,43 mmol) 2-Cyanethyldiisopropylchlorphosphoramidit 66 zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde 15 Minuten bei 0°C und 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml gesättigter wässriger NaHCO₃-

Lösung gequenchet. Es wurde dreimal mit Methylchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylchlorid/Methanol 99:1. Das Produkt (ein Gemisch zweier Diastereomere) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 135 mg (52,3 %)

DC: $R_f = 0,33; 0,41$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)

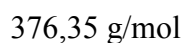
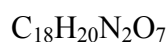
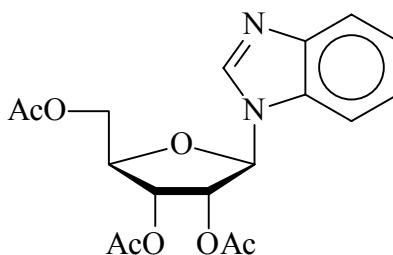
8.12, 8.08 (s, 2H, 2H); 7.49 – 6.81 (m, 32H, H_{ar} , 5H, 6H, 7H); 5.92, 5.84 (d, $J = 7.7$ Hz, $J = 5.8$ Hz, 2H, 1'H); 4.75 (m, 2H, 2'H); 4.40 (m, 2H, 3'H); 4.32 (m, 2H, 4'H); 3.80, 3.79 (s, 12H, OCH_3); 3.48 (m, 4H, 5'H); 2.66 (m, 4H, OCH_2), 1.20 (m, 12H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 0.75 (s, 18H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); -0.12 (s, 6H, SiCH_3); -0.38 (s, 6H, SiCH_3)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)

152.49 und 149.32 (Verhältnis 1 : 2,7)

ESI(+): m/z 885,6 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose 62



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

5,2 g (44,0 mmol) Benzimidazol **58** wurden in 80 ml abs. Acetonitril suspendiert und mit 10,75 ml (44 mmol) *N,O*-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 15 Minuten unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 7,0 g (22 mmol) 1,2,3,5-Tetra-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose **54** in 80 ml abs. Acetonitril und 5,0 ml (27,6 mmol) Trimethylsilyltrifluorsulfonat (TMSOTf) zugesetzt. Es wurden 2,5 Stunden unter Rückfluß gekocht und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml gesättigter wäßriger NaHCO₃-Lösung gequenchet und dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 98:2. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 4,61 g (55,7 %)

DC: R_f = 0,43 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5)

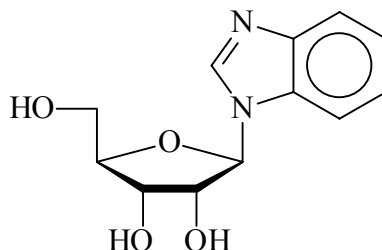
¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆)

8.49 (s, 1H, 2H); 7.73 (m, 2H, H_{ar}); 7.29 (m, 2H, H_{ar}); 6.32 (d, J = 6.4 Hz, 1H, 1'H); 5.68 (t, J = 6.3 Hz, 1H, 2'H); 5.43 (dd, J = 4.6 Hz, 1H, 3'H); 4.41 (m, 1H, 4'H); 4.37 (m, 2H, 5'H); 2.13 (s, 3H, CH₃-acetyl); 2.08 (s, 3H, CH₃-acetyl); 2.03 (s, 3H, CH₃-acetyl)

¹³C-NMR: δ [ppm] (100,6 MHz, DMSO-d₆)

169.55 (C=O); 169.06 (C=O); 168.76 (C=O); 143.36 (C2); 142.36 (C_{ar}); 131.93 (C_{ar}); 122.65 (C_{ar}); 119.06 (C_{ar}); 110.85 (C_{ar}); 85.76 (C1'); 78.11 (C4'); 71.10 (C2'); 69.09 (C3'); 62.53 (C5'); 20.04 (CH₃-acetyl); 19.90 (CH₃-acetyl); 19.69 (CH₃-acetyl)

ESI(+): m/z 377,2 (M+H)⁺

1'-Desoxy-1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose 37

250,24 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

2,98 g (7,9 mmol) 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose **62** wurden in 175 ml NH_3 -gesättigtem Methanol gelöst und 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 4:1. Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1,79 g (90,4 %)

DC: $R_f = 0,53$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 4:1)

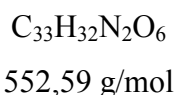
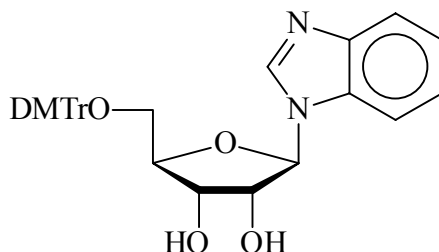
$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d_6)
 8.45 (s, 1H, 2H); 7.70 (m, 2H, H_{ar}); 7.24 (m, 2H, H_{ar}); 5.86 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H, 1'H); 5.46 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, 2'-OH); 5.21 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, 3'-OH); 5.10 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H, 5'-OH); 4.36 (q, $J = 5.3$ Hz, 1H, 2'H); 4.12 (m, 1H, 3'H); 3.96 (q, $J = 3.4$ Hz, 1H, 4'H); 3.63 (m, 2H, 5'H)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO-d_6)
 143.82 (C_2); 142.42 (C_{ar}); 132.98 (C_{ar}); 122.62 (C_{ar}); 122.02 (C_{ar}); 119.54 (C_{ar}); 111.54 (C_{ar}); 88.64 ($\text{C}1'$); 85.43 ($\text{C}4'$); 73.58 ($\text{C}2'$); 70.13 ($\text{C}3'$); 61.26 ($\text{C}5'$)

ESI(+): m/z 251,1 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

UV: λ_{max} (Methanol): 280,0 nm; 273,0 nm; 246,0 nm

1'-Desoxy -5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl) -1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose 74



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

2,73 g (10,9 mmol) 1'-Desoxy-1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose **37** wurden in 100 ml abs. Pyridin gelöst und mit 5,17 g (15,4 mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 4 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml Methanol gequencht und mit gesättigter wäßriger NaHCO₃-Lösung versetzt. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 95:5. Das Produkt wurde als gelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 4,43 g (73,5 %)

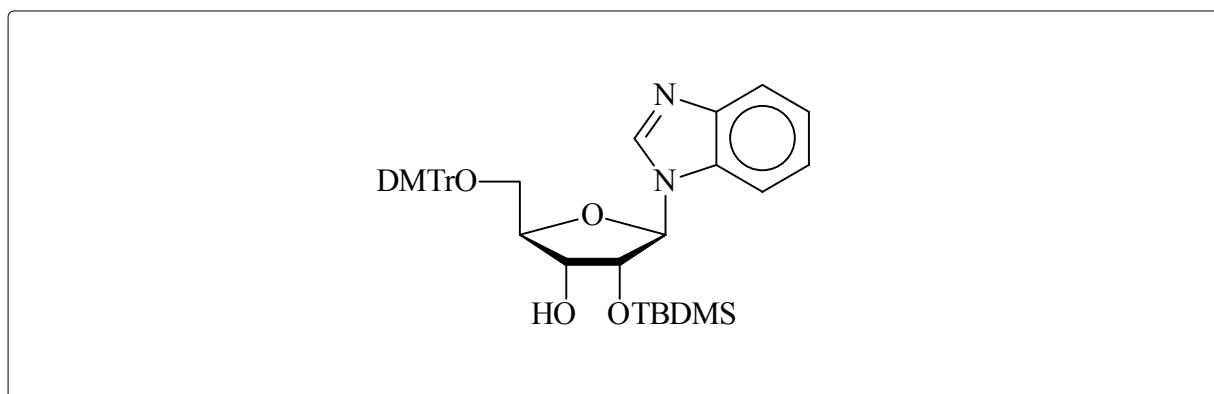
DC: R_f = 0,68 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d₆)

8.35 (s, 1H, 2H); 7.68 (m, 2H, H_{ar}); 7.38 – 6.81 (m, 15H, H_{ar}); 5.91 (d, J = 5.5 Hz, 1H, 1'H); 5.59 (d, J = 6.1 Hz, 1H, 2'-OH); 5.27 (d, J = 5.4 Hz, 1H, 3'-OH); 4.36 (q, J = 5.7 Hz, 1H, 2'H); 4.19 (q, J = 5.2 Hz, 1H, 3'H); 4.10 (q, J = 5.2 Hz, 1H, 4'H); 3.73 (s, 6H, OCH₃); 3.23 (m, 2H, 5'H)

^{13}C -NMR: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO- d_6)
158.08 (DMTr); 144.78 (DMTr); 143.94 (C₂); 142.24 (C_{ar}); 135.42 (DMTr);
135.33 (DMTr); 132.84 (C_{ar}); 129.77 (DMTr); 127.84 (DMTr); 127.71
(DMTr); 126.71 (DMTr); 122.57 (C_{ar}); 122.13 (C_{ar}); 119.65 (C_{ar}); 113.19
(DMTr); 111.75 (C_{ar}); 88.95 (C1'); 85.68 (DMTr); 83.33 (C4'); 73.07 (C2');
70.12 (C3'); 63.70 (C5'); 55.02 (OCH₃)
ESI(+): m/z 553,2 (M+H)⁺

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-
desoxy-1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose 75**



C₃₉H₄₆N₂O₆Si
666,85 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

0,95 g (1,7 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose 74 wurden in 20 ml eines 1:1 Gemisches aus THF/Pyridin gelöst und mit 380 mg (2,2 mmol) Silbernitrat und 2,2 ml (2,2 mmol) einer 1 M *tert.*-Butyldimethylsilylchlorid-Lösung in THF versetzt. Die Reaktionslösung wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml einer gesättigten wässrigen NaHCO₃-Lösung gequenchet. Das entstandene Silberchlorid wurde über Celite abgetrennt und das Filtrat dreimal mit Methylchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Die

Aufreinigung erfolgte über FC mit dem Laufmittel Methylenchlorid/Isopropanol 98:2. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 310 mg (27,2 %)

DC: $R_f = 0,35$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/i\text{PrOH}$ 98:2)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d_6)

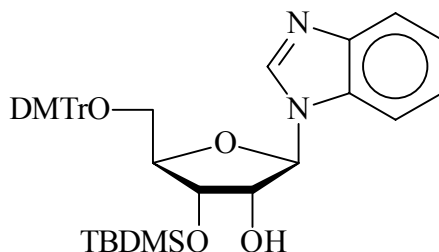
8.35 (s, 1H, 2H); 7.66 (m, 2H, H_{ar}); 7.41 – 6.82 (m, 15H, H_{ar}); 5.92 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, 1'H); 5.19 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H, 3'-OH); 4.58 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, 2'H); 4.18 (m, 1H, 3'H); 4.13 (m, 1H, 4'H); 3.71 (s, 6H, OCH_3); 3.29 (m, 2H, 5'H); 0.68 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); -0.15 (SiCH_3); -0.31 (SiCH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (100,6 MHz, DMSO-d_6)

158.10 (DMTr); 144.72 (DMTr); 143.95 (C_2); 142.59 (C_{ar}); 135.21 (DMTr); 135.11 (DMTr); 132.40 (C_{ar}); 129.78 (DMTr); 129.72 (DMTr); 127.79 (DMTr); 127.61 (DMTr); 126.73 (DMTr); 122.37 (C_{ar}); 122.12 (C_{ar}); 119.65 (C_{ar}); 113.16 (DMTr); 111.92 (C_{ar}); 88.61 ($\text{C}1'$); 85.82 (DMTr); 83.99 ($\text{C}4'$); 74.51 ($\text{C}2'$); 69.94 ($\text{C}3'$); 63.50 ($\text{C}5'$); 55.00 (OCH_3); 25.43 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 17.69 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); -5.12 (SiCH_3); -5.61 (SiCH_3)

ESI(+): m/z 667,6 ($\text{M}+\text{H}^+$)

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-tert.-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose 76



$\text{C}_{39}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_6\text{Si}$

666,85 g/mol

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose **76** entstand als Nebenprodukt bei der Darstellung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose **75**.

Ausbeute: 410 mg (36,0 %)

DC: $R_f = 0,32$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/i\text{PrOH}$ 98:2)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d_6)

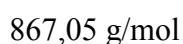
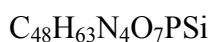
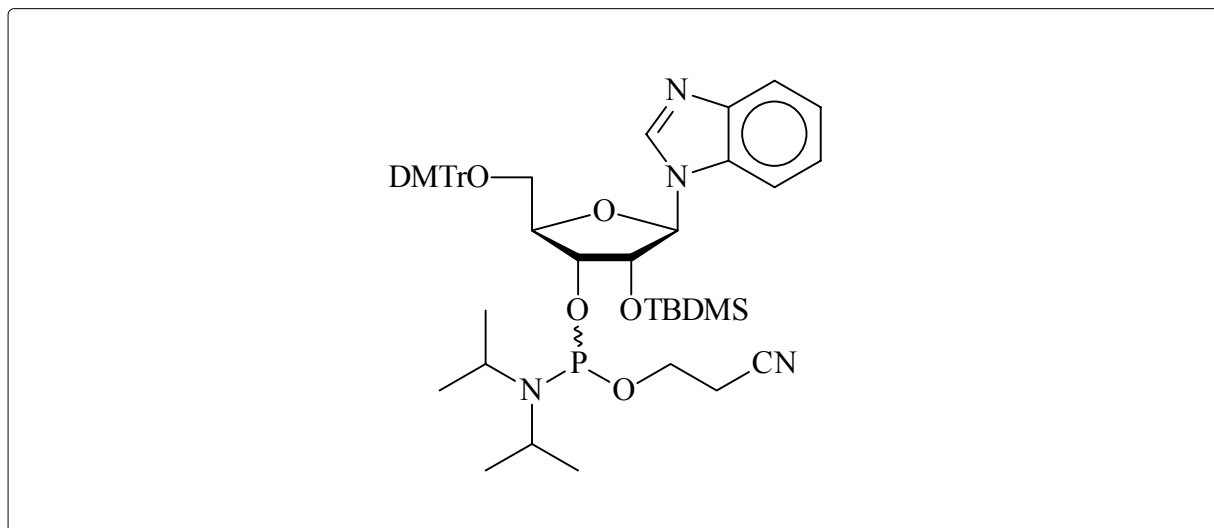
8.40 (s, 1H, 2H); 7.69 (m, 2H, H_{ar}); 7.40 – 6.82 (m, 15H, H_{ar}); 5.90 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H, 1'H); 5.50 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, 2'-OH); 4.52 (q, $J = 5.8$ Hz, 1H, 2'H); 4.35 (m, 1H, 3'H); 4.07 (m, 1H, 4'H); 3.72 (s, 6H, OCH_3); 3.24 (m, 2H, 5'H); 0.82 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 0.07 (SiCH_3); 0.02 (SiCH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (100,6 MHz, DMSO-d_6)

158.11 (DMTr); 144.58 (DMTr); 143.99 (C_2); 142.52 (C_{ar}); 135.26 (DMTr); 135.17 (DMTr); 132.64 (C_{ar}); 129.69 (DMTr); 127.81 (DMTr); 127.63 (DMTr); 126.74 (DMTr); 122.47 (C_{ar}); 122.11 (C_{ar}); 119.64 (C_{ar}); 113.16 (DMTr); 111.85 (C_{ar}); 88.87 ($\text{C}1'$); 85.87 (DMTr); 83.82 ($\text{C}4'$); 72.47 ($\text{C}2'$); 71.92 ($\text{C}3'$); 63.14 ($\text{C}5'$); 55.03 (OCH_3); 25.73 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 17.99 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); -4.50 (SiCH_3); -5.14 (SiCH_3)

ESI(+): m/z 667,5 ($\text{M}+\text{H}^+$)

3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-1'-benzimidazolyl-2'-O-(*tert.*-butyldimethylsilyl)- β -D-ribofuranose 77



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

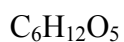
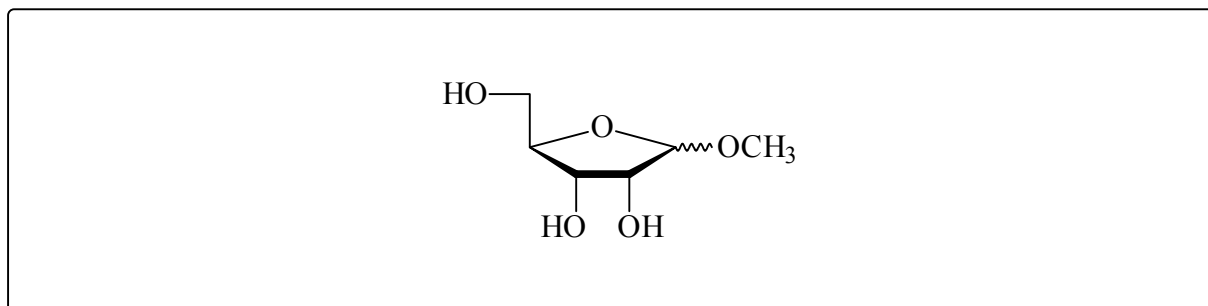
150 mg (0,22 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose 75 wurden in 8 ml abs. Acetonitril gelöst und mit 285 μl (2,2 mmol) *sym.* Collidin und 9 μl (0,11 mmol) 1-Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und 72 μl (0,32 mmol) 2-Cyanethyldiisopropylchlorphosphoramidit 66 zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde 15 Minuten bei 0°C und 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml gesättigter wäßriger NaHCO₃-Lösung gequencht. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 99:1. Das Produkt (ein Gemisch zweier Diastereomere) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 105 mg (53,8 %)

DC: R_f = 0,09 (*n*-Hexan:Ethylacetat 4:1)

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
8.12, 8.08 (s, 2H, 2H); 7.79 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H_{ar}); 7.63 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H_{ar}); 7.48 – 6.80 (m, 30H, H_{ar}); 5.92, 5.86 (d, $J = 7.5$ Hz, $J = 7.0$ Hz, 2H, 1'H); 4.76 (m, 2H, 2'H); 4.31 (m, 2H, 3'H); 3.95 (m, 2H, 4'H); 3.79, 3.78 (s, 12H, OCH_3); 3.56 (m, 8H, 5'H, CH_2CN); 2.68 (m, 4H, OCH_2), 1.20 (m, 12H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 0.81, 0.74 (s, 18H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); -0.14, -0.37, -0.40, -0.49 (s, 12H, SiCH_3)
- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
150.58 und 149.99 (Verhältnis 1 : 1,6)
- ESI(+): m/z 867,7 ($\text{M}+\text{H}^+$)

1-Methyl-ribofuranose **82**



164,16 g/mol

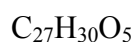
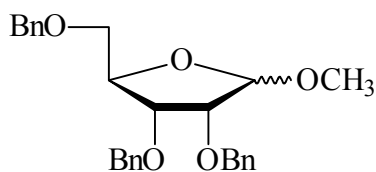
10 g (66,6 mmol) β -D-Ribofuranose **81** wurden in 140 ml abs. Methanol gelöst und auf 0°C abgekühlt. Anschließend wurden 0,6 ml konz. Schwefelsäure zugesetzt und 24 Stunden bei 4°C gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Amberlite IRA-93 neutralisiert, abgesaugt und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Produkt wurde als leicht gelbliches Öl erhalten, welches beide C(1)-Epimere enthielt und beim Stehen zu einem leicht gelblichen Feststoff kristallisierte.

Ausbeute: 10,92 g (99,9 %)

DC: $R_f = 0,52$ (β); 0,45 (α) (Acetonitril/Wasser 4:1)

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, D_2O)
 5.03 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H, 1H (α)); 4.93 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H, 1H (β)); 4.21 – 3.49 (m, 16H, 2H, 3H, 4H, 5H, 2-OH, 3-OH, 5-OH ($\alpha+\beta$)); 3.47 (s, 3H, OCH_3 (α)), 3.44 (s, 3H, OCH_3 (β))
- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (62,9 MHz, D_2O)
 107.80 (C1(β)); 103.04 (C1(α)); 84.36 (C4(α)); 82.68 (C4(β)); 74.05 (C2(β)); 70.95 (C2(α)); 70.63 (C3(β)); 69.55 (C3(α)); 62.61 (C5(β)); 61.38 (C5(α)); 55.28 (OCH_3 (α)); 55.00 (OCH_3 (β))
- ESI(-): m/z 163,0 (M-H)⁻

1-Methyl-2,3,5-tri-*O*-benzyl-ribofuranose **83**



434,5 g/mol

10,9 g (66,4 mmol) 1-Methyl-ribofuranose **82** wurden in 100 ml THF gelöst und mit 50 g (891 mmol) gepulvertem KOH und 70 ml (607 mmol) Benzylchlorid versetzt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung 24 Stunden unter Rückfluß gekocht. Die festen Bestandteile wurden abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Entstandene Nebenprodukte wurden größtenteils durch Destillation bis zu einer Ölbadtemperatur von 170°C entfernt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylchlorid/Methanol 98:2. Das Produkt wurde als gelbliches Öl erhalten, welches beide C(1)-Epimere enthält.

Ausbeute: 24,7 g (85,7 %)

DC: $R_f = 0,55$ (□); $0,49$ (□) ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, CDCl_3)

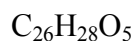
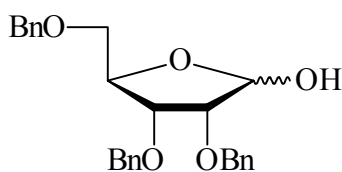
7.38 – 7.24 (m, 30 H, $\text{H}_{\text{ar}}(\alpha+\beta)$); 4.91 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H, 1H(β)); 4.87 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, 1H(α)); 4.64 – 4.42 (m, 12H, CH_2 -benzyl ($\alpha+\beta$)); 4.34 (m, 1H, 4H(β)); 4.24 (m, 1H, 4H(α)); 4.01 (dd, $J = 4.7$ Hz, $J = 7.0$ Hz, 1H, 3H(β)); 3.83 (dd, $J = 1.0$ Hz, $J = 4.7$ Hz, 1H, 2H(β)); 3.77 (m, 2H, 2H(α), 3H(α)); 3.55 (m, 2H, 5H(β)); 3.46 (s, 3H, $\text{OCH}_3(\alpha)$); 3.37 (m, 2H, 5H(α)); 3.30 (s, 3H, $\text{OCH}_3(\beta)$)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (62,9 MHz, CDCl_3)

138.21 (C_{ar}); 137.73 (C_{ar}); 128.25 (C_{ar}); 128.21 (C_{ar}); 128.16 (C_{ar}); 127.80 (C_{ar}); 127.73 (C_{ar}); 127.65 (C_{ar}); 127.63 (C_{ar}); 127.62 (C_{ar}); 127.48 (C_{ar}); 127.43 (C_{ar}); 127.35 (C_{ar}); 106.25 (C_1); 80.35 (C_4); 79.62 (CH_2 -benzyl); 78.29 (CH_2 -benzyl); 73.03 (CH_2 -benzyl); 72.29 (C_3); 72.17 (C_2); 71.21 (C_5); 54.91 (OCH_3)

ESI(+): m/z 452,1 ($\text{M}+\text{NH}_4$)⁺

2,3,5-Tri-*O*-benzyl-ribofuranose **84**



420,48 g/mol

19,9 g (45,8 mmol) 1-Methyl-2,3,5-tri-*O*-benzyl-ribofuranose **83** wurden in 350 ml Dioxan und 150 ml einer 0,1 N HCl Lösung gelöst. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden unter Rückfluß gekocht und anschließend mit 15 ml einer 1 N wäßrigen NaOH-Lösung neutralisiert und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das verbleibende Öl wurde mit Wasser

versetzt und dreimal mit Methylchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylchlorid/Methanol 98:2. Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten, welches beide C(1)-Epimere enthielt.

Ausbeute: 18,02 g (93,6 %)

DC: $R_f = 0,32$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, CDCl_3)

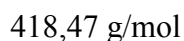
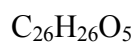
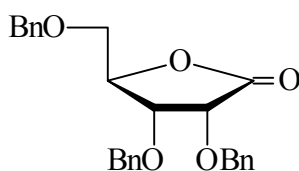
7.36 – 7.19 (m, 15H, H_{ar}); 5.28 (m, 1H, 1H); 4.70 – 4.26 (m, 7H, CH_2 -benzyl, 1-OH); 4.19 (m, 1H, 4H); 3.96 (m, 1H, 3H); 3.73 (m, 1H, 2H); 3.44 (m, 2H, 5H)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (62,9 MHz, CDCl_3)

137.75 (C_{ar}); 137.68 (C_{ar}); 137.61 (C_{ar}); 137.34 (C_{ar}); 137.24 (C_{ar}); 128.33 (C_{ar}); 128.30 (C_{ar}); 128.26 (C_{ar}); 127.68 (C_{ar}); 127.79 (C_{ar}); 127.71 (C_{ar}); 127.64 (C_{ar}); 127.57 (C_{ar}); 127.43 (C_{ar}); 100.21, 96.09 (C1); 80.90, 80.67 (C4); 77.64 (CH_2 -benzyl); 77.58 (CH_2 -benzyl); 77.16 (CH_2 -benzyl); 73.35, 72.67 (C3); 72.32, 72.15 (C2); 69.88, 69.42 (C5)

ESI(+): m/z 438,3 ($\text{M}+\text{NH}_4^+$)⁺

2,3,5-Tri-*O*-benzyl-ribo- γ -lacton 85



17,71 g (42,1 mmol) 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-ribofuranose **84** wurden in 60 ml DMSO gelöst und mit 42 ml Acetanhydrid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in Eiswasser eingegossen. Es wurde mit einer 5 %igen wäßrigen NaHCO₃-Lösung versetzt und dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Verbliebenes DMSO wurde im Ölpumpenvakuum abdestilliert. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 99:1. Das Produkt wurde als gelbliches Öl erhalten, welches beim Stehen zu einem leicht gelblichen Feststoff kristallisierte.

Ausbeute: 16,84 g (95,5 %)

DC: R_f = 0,70 (CH₂Cl₂/MeOH 98:2)

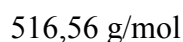
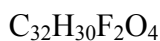
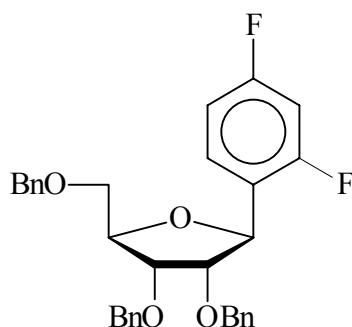
¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, CDCl₃)

7.29 – 7.07 (m, 15H, H_{ar}); 4.87 und 4.66 (AB, J_{a,b} = 12.0 Hz, 2H, CH₂-benzyl)
4.61 und 4.48 (AB, J_{a,b} = 9.0 Hz, 2H, CH₂-benzyl); 4.47 – 4.31 (m, 4H, 2H,
4H, CH₂-benzyl); 4.02 (dd, J = 2.1 Hz, J = 5.6 Hz, 1H, 3H); 3.50 (ψdq, J = 2.8
Hz, J = 11.0 Hz, J = 14.5 Hz, 2H, 5H)

¹³C-NMR: δ [ppm] (62,9 MHz, CDCl₃)

173.52 (C1); 137.12 (C_{ar}); 137.00 (C_{ar}); 136.83 (C_{ar}); 128.39 (C_{ar}); 128.35
(C_{ar}); 128.34 (C_{ar}); 128.25 (C_{ar}); 128.10 (C_{ar}); 127.95 (C_{ar}); 127.90 (C_{ar});
127.83 (C_{ar}); 127.63 (C_{ar}); 127.45 (C_{ar}); 81.64 (C4); 75.26 (C3); 73.61 (C2);
73.50 (CH₂-benzyl); 72.58 (CH₂-benzyl); 72.25 (CH₂-benzyl); 68.62 (C5)

ESI(+): m/z 436,4 (M+NH₄)⁺

2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose 92

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

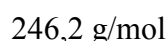
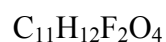
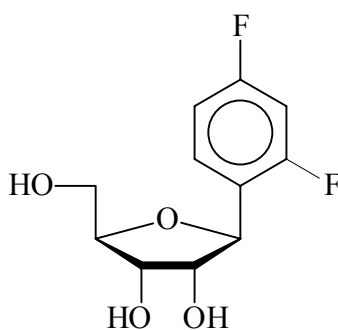
Eine Lösung aus 150 μl (1,3 mmol) 1-Brom-2,4-difluorbenzol in 10 ml abs. Diethylether wurde bei -78°C unter Argon innerhalb von 10 Minuten mit 2,4 ml einer 1,6 M Lösung von *n*-Butyllithium in *n*-Hexan versetzt. Nach 20 Minuten bei -78°C wurde eine Lösung von 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-ribo- γ -lacton **85** (1,0 g, 2,4 mmol) in 5 ml abs. Diethylether über 30 Minuten zugegeben und eine Stunde bei -78°C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung innerhalb von 2 Stunden auf -30°C erwärmt. Durch Zugabe von 5 ml Wasser wurde die Reaktion gequencht und dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das erhaltene bräunliche Öl wurde in 10 ml Methylenchlorid gelöst, auf -78°C abgekühlt und mit 600 μl (4,8 mmol) Bortrifluorid Ethyletherat und 760 μl (4,8 mmol) Triethylsilan versetzt. Die Reaktionslösung wurde eine Stunde bei -78°C gerührt und anschließend über Nacht auf 10°C erwärmt. Durch Zugabe von 10 ml gesättigter wäßriger NaHCO_3 Lösung wurde die Reaktion gequencht und dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan/Ethylacetat 4:1. Das Produkt wurde als leicht orangener Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1,04 g (84,6 %)

DC: $R_f = 0,35$ (*n*-Hexan/Ethylacetat 4:1)

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (270 MHz, DMSO- d_6)
 7.59 (Ψ_q , $J = 6.9$ Hz, 1H, 6H); 7.29 (m, 16H, H_{ar} , 3H); 6.93 (dt, $J = 8.4$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1H, 5H); 5.17 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H, 1'H); 4.55 (m, 6H, CH_2 -benzyl); 4.22 (q, $J = 3.9$ Hz, 1H, 4'H); 4.05 (m, 2H, 2'H, 3'H); 3.67 (m, 2H, 5'H)
- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (67,9 MHz, DMSO- d_6)
 162.51 (dd, $J = 141.7$ Hz, $J = 12.6$ Hz, C4); 158.87 (dd, $J = 143.7$ Hz, $J = 12.4$ Hz, C2); 138.18 (C_{ar}); 138.10 (C_{ar}); 137.96 (C_{ar}); 129.36 (C6); 128.22 (C_{ar}); 128.09 (C_{ar}); 127.70 (C_{ar}); 127.50 (C_{ar}); 127.42 (C_{ar}); 127.11 (C_{ar}); 123.61 (C1); 111.30 (d, $J = 20.8$ Hz, C5); 103.62 (t, $J = 25.7$ Hz, C3); 82.10 (C1'); 80.72 (C4'); 76.84 (C2'); 75.96 (C3'); 72.40 (CH_2 -benzyl); 71.04 (CH_2 -benzyl); 69.73 (C5')
- ESI(+): m/z 534,4 ($M+\text{NH}_4$) $^+$

1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose 30



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

6,5 g (12,6 mmol) 2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose 92 wurden in 100 ml abs. Ethanol gelöst und mit 50 ml Cyclohexen und 1 g Palladiumhydroxid (20%) auf Kohle versetzt. Die Reaktionslösung wurde 3 Stunden unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde der Palladium-Katalysator über Celite abfiltriert und das Filtrat

am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 9:1. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 3,08 g (99,3 %)

DC: $R_f = 0,42$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (270 MHz, DMSO-d_6)

7.65 (Ψq , $J = 6.9$ Hz, 1H, 6H); 7.18 (m, 1H, 3H); 7.07 (dt, $J = 8.6$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1H, 5H); 5.04 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, 2'-OH); 4.91 (d, $J = 5.0$ Hz, 3'-OH); 4.84 (m, 2H, 1'H, 5'-OH); 3.85 (m, 3H, 2'H, 3'H, 4'H); 3.57 (m, 2H, 5'H)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (67,9 MHz, DMSO-d_6)

162.58 (dd, $J = 109.2$ Hz, $J = 12.1$ Hz, C4); 158.94 (dd, $J = 111.7$ Hz, $J = 12.1$ Hz, C2); 129.67 (C6); 124.40 (dd, $J = 13.1$ Hz, $J = 3.5$ Hz, C1); 114.74 (dd, $J = 20.9$ Hz, $J = 3.5$ Hz, C5); 103.42 (t, $J = 25.9$ Hz, C3); 84.59 (C1'); 77.08 (C4'); 76.65 (C2'); 70.94 (C3'); 61.59 (C5')

$^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (254,2 MHz, DMSO-d_6)

-112.0 (qt, $J = 7.6$ Hz, 1F, 4F); -114.74 (q, $J = 8.9$ Hz, 1F, 2F)

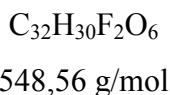
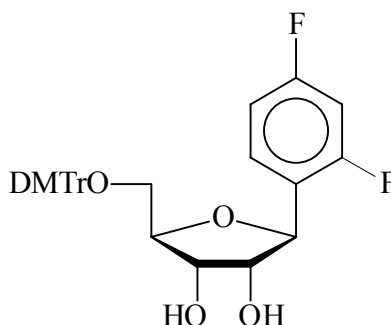
ESI(-): m/z 245,0 (M-H)⁻

El.-Analyse: Berechnet: C: 53,66 % H: 4,91 %

Gefunden: C: 53,65 % H: 4,94 %

UV: λ_{max} (Methanol): 264,0 nm; 269,0 nm

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose 99



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

1,0 g (4 mmol) 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **30** wurden in 25 ml abs. Pyridin gelöst und mit 0,84 ml (6 mmol) Triethylamin und 1,63 g (4,8 mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 2,5 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml Methanol gequenchet und mit gesättigter wäßriger NaHCO₃-Lösung versetzt. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 98:2. Das Produkt wurde als gelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 1,86 g (83,4 %)

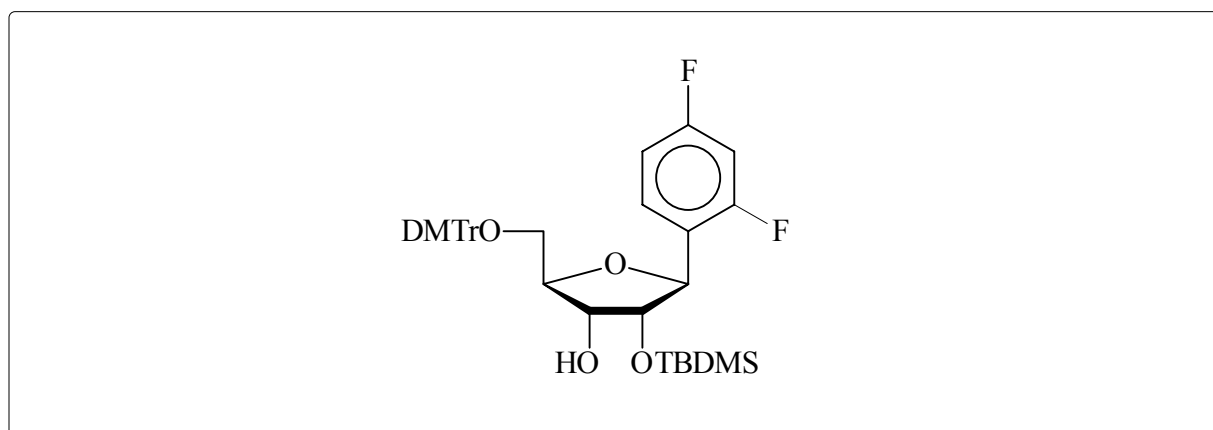
DC: R_f = 0,48 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5)

¹H-NMR: δ [ppm] (270 MHz, DMSO-d₆)

7.56 (Ψ q, J = 6.8 Hz, 1H, 6H); 7.45 – 6.86 (m, 15H, H_{ar}, 3H, 5H); 5.19 (d, J = 5.4 Hz, 1H, 2'-OH); 4.98 (d, J = 5.2 Hz, 1H, 3'-OH); 4.92 (d, J = 4.3 Hz, 1H, 1'H); 3.98 (q, J = 5.2 Hz, 1H, 2'H); 3.90 (m, 2H, 3'H, 4'H); 3.74 (s, 6H, OCH₃); 3.20 (m, 2H, 5'H)

^{13}C -NMR: δ [ppm] (67,9 MHz, DMSO- d_6)
 161.71 (d, $J = 246.1$ Hz, C4); 161.53 (d, $J = 246.4$ Hz, C2); 158.04 (DMTr);
 144.87 (DMTr); 135.63 (DMTr); 135.54 (DMTr); 129.71 (DMTr); 129.11 (dd,
 $J = 9.8$ Hz, $J = 6.1$ Hz, C6); 127.76 (DMTr); 127.72 (DMTr); 126.63 (DMTr);
 124.28 (dd, $J = 13.1$ Hz, $J = 3.2$ Hz, C1); 113.13 (DMTr); 111.12 (dd, $J = 20.8$
 Hz, $J = 3.2$ Hz, C5); 103.69 (t, $J = 25.9$ Hz, C3); 85.40 (DMTr); 82.25 (C1');
 78.10 (C4'); 76.36 (C2'); 70.93 (C3'); 63.77 (C5'); 54.98 (OCH $_3$)
 ESI(-): m/z 547,2 (M-H)⁻

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-
 desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose 104**



$\text{C}_{38}\text{H}_{44}\text{F}_2\text{O}_6\text{Si}$

662,81 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

2,35 g (4,3 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **99** wurden in 40 ml eines 1:1 Gemisches aus THF/Pyridin gelöst und mit 870 mg (5,2 mmol) Silbernitrat und 6,0 ml (6 mmol) einer 1 M *tert.*-Butyldimethylsilylchlorid-Lösung in THF versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml einer gesättigten wäßrigen NaHCO $_3$ -Lösung gequenchet. Das entstandene Silberchlorid wurde über Celite abgetrennt und das Filtrat dreimal mit Methylenchlorid

extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit Methylenchlorid als Elutionsmittel. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 1,01 g (35,5 %)

DC: $R_f = 0,18$ (CH_2Cl_2)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (270 MHz, DMSO-d_6)

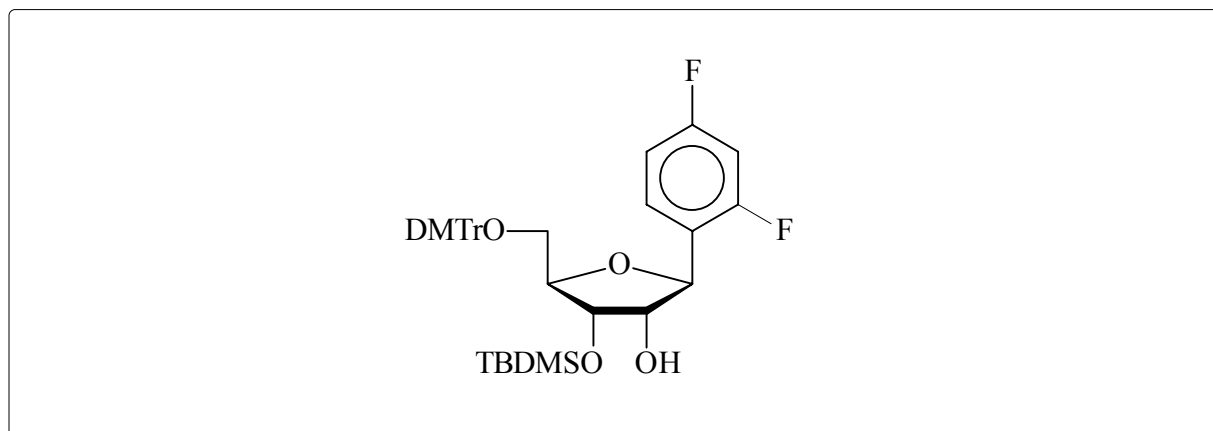
7.59 (q, $J = 6.7$ Hz, 1H, 6H); 7.45 – 6.82 (m, 15H, H_{ar} , 3H, 5H); 4.96 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H, 3'-OH); 4.84 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H 1'H); 4.02 (m, 2H, 3'H, 4'H); 3.93 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H, 2'H); 3.74 (s, 6H, OCH_3); 3.21 (m, 2H, 5'H); 0.79 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); -0.05 (SiCH_3); -0.11 (SiCH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (67,9 MHz, DMSO-d_6)

161.69 (d, $J = 246.3$ Hz, C2); 161.51 (d, $J = 246.5$ Hz, C4); 158.04 (DMTr); 144.87 (DMTr); 135.46 (DMTr); 135.41 (DMTr); 129.71 (DMTr); 129.68 (DMTr); 129.07 (dd, $J = 11.6$ Hz, $J = 7.8$ Hz, C6); 127.73 (DMTr); 127.62 (DMTr); 123.85 (dd, $J = 15.7$ Hz, $J = 3.4$ Hz, C1); 113.12 (DMTr); 111.12 (dd, $J = 20.8$ Hz, $J = 3.4$ Hz, C5); 103.61 (t, $J = 26.1$ Hz, C3); 85.45 (DMTr); 82.94 (C1'); 78.79 (C4'); 77.20 (C2'); 70.20 (C3'); 63.51 (C5'); 54.97 (OCH_3); 25.50 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 17.78 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); -4.93 (SiCH_3); -5.47 (SiCH_3)

ESI(-): m/z 661,4 (M-H)⁻

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose 105



$C_{38}H_{44}F_2O_6Si$

662,81 g/mol

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-*O-tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **105** entstand als Nebenprodukt bei der Darstellung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O-tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **104**.

Ausbeute: 890 mg (31,4 %)

DC: $R_f = 0,21$ (CH_2Cl_2)

1H -NMR: δ [ppm] (270 MHz, DMSO- d_6)

7.61 (q, $J = 8.2$ Hz, 1H, 6H); 7.45 – 6.84 (m, 15H, H_{ar} , 3H, 5H); 4.96 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H, 2'OH); 4.83 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H, 1'H); 4.02 (m, 1H, 3'H); 3.94 (m, 1H, 2'H); 3.73 (s, 6H, OCH₃); 3.29 (m, 1H, 4'H); 3.15 (m, 2H, 5'H); 0.76 (SiC(CH₃)₃); -0.01 (SiCH₃); -0.08 (SiCH₃)

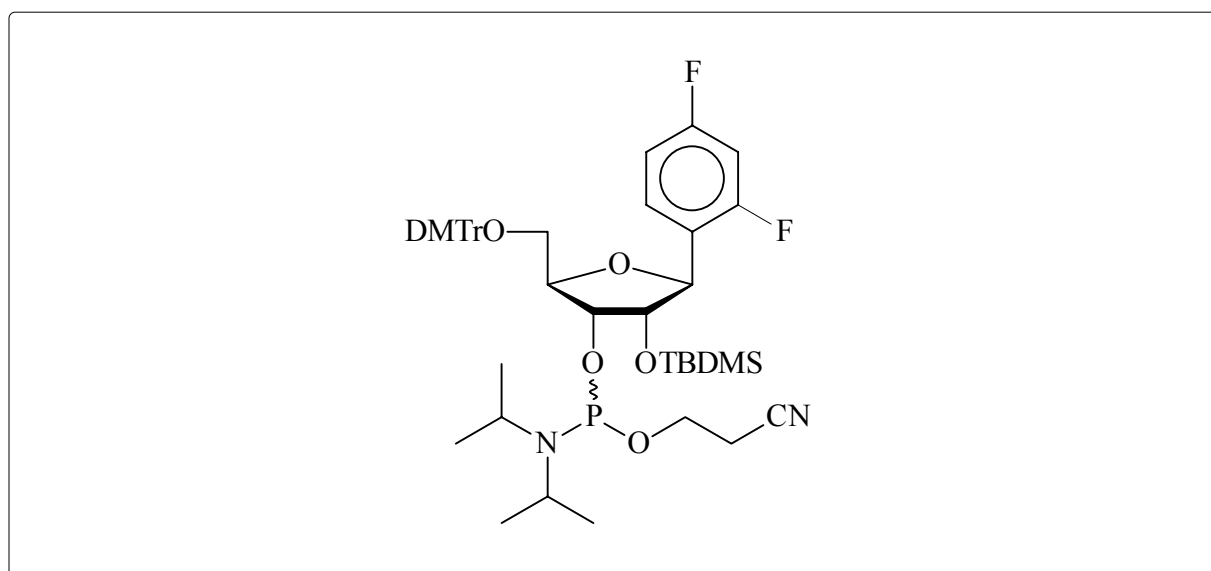
^{13}C -NMR: δ [ppm] (67,9 MHz, DMSO- d_6)

161.65 (d, $J = 246.1$ Hz, C2); 161.49 (d, $J = 246.3$ Hz, C4); 158.05 (DMTr); 144.67 (DMTr); 135.46 (DMTr); 135.42 (DMTr); 129.67 (DMTr); 129.13 (dd, $J = 11.9$ Hz, $J = 8.0$ Hz, C6); 127.71 (DMTr); 127.63 (DMTr); 126.63 (DMTr); 123.82 (dd, $J = 12.4$ Hz, $J = 3.9$ Hz, C1); 113.11 (DMTr); 111.30 (dd, $J = 24.6$ Hz, $J = 3.7$ Hz, C5); 103.59 (t, $J = 26.7$ Hz, C3); 85.46 (DMTr); 82.52 (C1')

78.29 (C4'); 75.94 (C2'); 72.63 (C3'); 63.21 (C5'); 54.97 (OCH₃); 25.64 (SiC(CH₃)₃); 17.82 (SiC(CH₃)₃); -4.59 (SiCH₃); -5.21 (SiCH₃)

ESI(-): m/z 661,4 (M-H)⁻

3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-1'-(2,4-difluorphenyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-β-D-ribofuranose 106



C₄₇H₆₁F₂N₂O₇PSi

863,01 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

250 mg (0,38 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)-β-D-ribofuranose 104 wurden in 12 ml abs. Acetonitril gelöst und mit 500 µl (3,8 mmol) *sym.* Collidin und 15 µl (0,19 mmol) 1-Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und 128 µl (0,57 mmol) 2-Cyanethyldiisopropylchlorphosphoramidit 66 zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde 15 Minuten bei 0°C und 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml gesättigter wäßriger NaHCO₃-Lösung gequencht. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über

MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch pDC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan/Ethylacetat 4:1. Das Produkt (ein Gemisch zweier Diastereomere) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 202 mg (62,1 %)

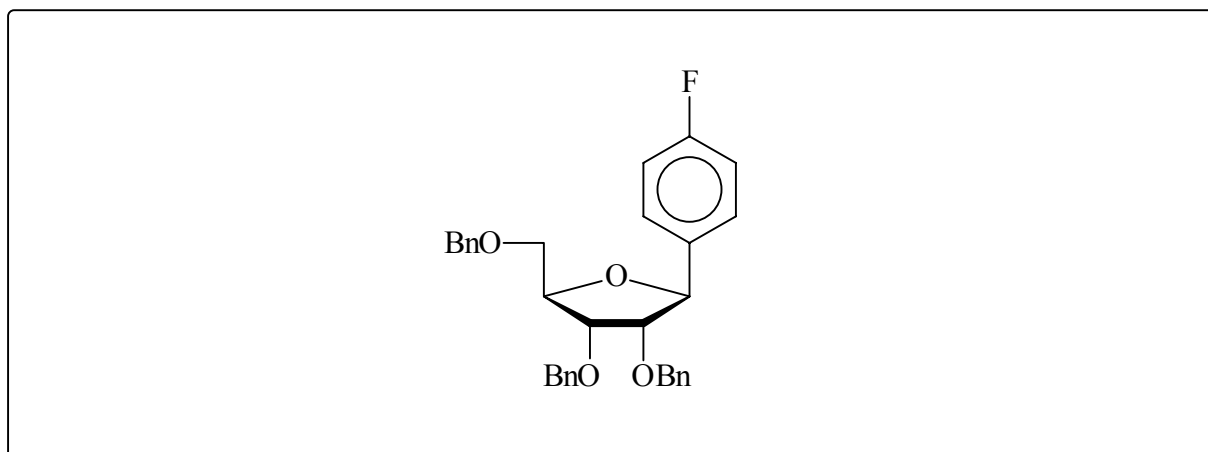
DC: R_f = 0,34; 0,36 (*n*-Hexan/Ethylacetat 4:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (270 MHz, DMSO-d₆)
 7.67 (m, 2H, 6H); 7.53 – 6.77 (m, 30H, H_{ar}, 3H, 5H); 5.14, 5.12 (d, J = 7.7 Hz, J = 6.8 Hz, 2H, 1'H); 4.23 (m, 6H, 2'H, 3'H, 4'H); 3.80, 3.79 (s, 12H, OCH₃); 3.54 (m, 4H, 5'H); 1.17 (m, 12H, CH(CH₃)₂); 0.82 (s, 18H, SiC(CH₃)₃); -0.05 (s, 6H, SiCH₃); -0.17 (s, 6H, SiCH₃)

³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃)
 150.70 und 148.85 (Verhältnis 1 : 3,8)

ESI(+): m/z 863,6 (M+H)⁺

2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-(4-fluorphenyl)-β-D-ribofuranose 89



C₃₂H₃₁FO₄
 498,57 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

Eine Lösung aus 2,73 ml (25 mmol) 1-Brom-4-fluorbenzol in 80 ml abs. THF wurde bei -78°C unter Argon innerhalb von 10 Minuten mit 15,6 ml einer 1,6 M Lösung von *n*-

Butyllithium in *n*-Hexan versetzt. Nach 20 Minuten bei -78°C wurde eine Lösung von 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-ribo- γ -lacton **85** (7,0 g, 16,7 mmol) in 50 ml abs. THF über 30 Minuten zugegeben und eine Stunde bei -78°C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung innerhalb von 2 Stunden auf -30°C erwärmt. Durch Zugabe von 5 ml Wasser wurde die Reaktion gequencht und dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das erhaltene bräunliche Öl wurde in 100 ml Methylenchlorid gelöst, auf -78°C abgekühlt und mit 4,2 ml (33,4 mmol) Bortrifluorid Ethyletherat und 5,3 ml (33,4 mmol) Triethylsilan versetzt. Die Reaktionslösung wurde eine Stunde bei -78°C gerührt und anschließend über Nacht auf 10°C erwärmt. Durch Zugabe von 10 ml gesättigter wäßriger NaHCO_3 -Lösung wurde die Reaktion gequencht und dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan/Ethylacetat 4:1. Das Produkt wurde als leicht orangener Feststoff erhalten.

Ausbeute: 6,31 g (75,8 %)

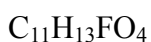
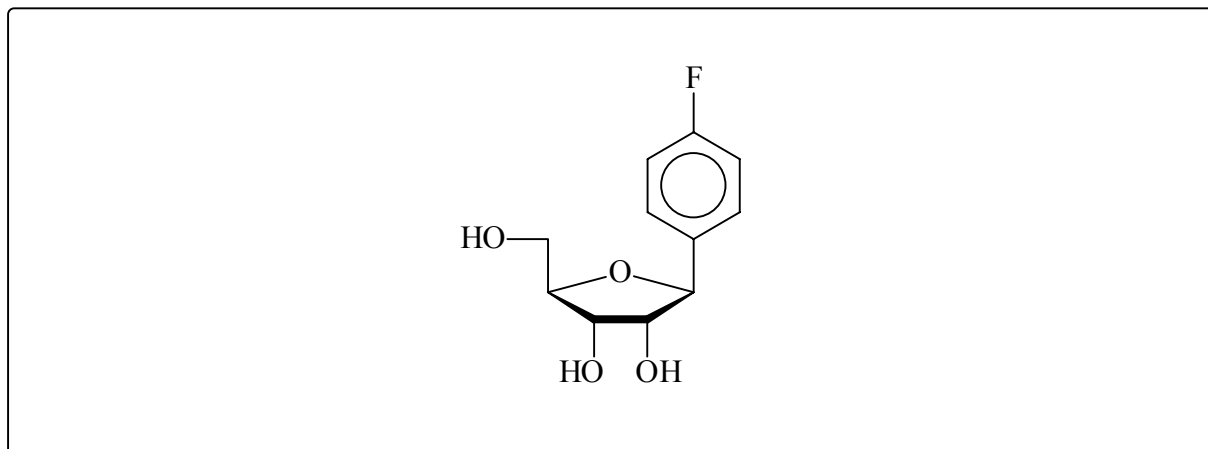
DC: $R_f = 0,35$ (*n*-Hexan/Ethylacetat 4:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d_6)
7.44 – 7.08 (m, 19H, H_{ar}); 4.87 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, 1'H); 4.61 – 4.42 (m, 6H, CH_2 -benzyl); 4.24 (q, $J = 3.8$ Hz, 1H, 4'H); 4.07 (dd, $J = 4.8$ Hz, 3.8 Hz, 1H, 3'H); 3.87 (dd, $J = 5.0$ Hz, $J = 6.8$ Hz, 1H, 2'H); 3.64 (m, 2H, 5'H)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (67,9 MHz, DMSO-d_6)
138.19 (C_{ar}); 137.95 (C_{ar}); 136.63 (C1); 128.18 (C_{ar}); 128.11 (C_{ar}); 128.05 (C_{ar}); 127.74 (C_{ar}); 127.43 (C_{ar}); 127.36 (C_{ar}); 123.99 (C5); 114.95 (C2); 114.64 (C6); 83.41 ($\text{C1}'$); 81.23 ($\text{C4}'$); 81.08 ($\text{C2}'$); 77.27 ($\text{C3}'$); 72.41 (CH_2 -benzyl); 71.10 (CH_2 -benzyl); 70.96 (CH_2 -benzyl); 70.27 ($\text{C5}'$)

ESI(+): m/z 516,2 ($\text{M}+\text{H}^+$)

1'-Desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **34**



228,21 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

3 g (6 mmol) 2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **89** wurden in 60 ml abs. Ethanol gelöst und mit 30 ml Cyclohexen und 600 mg Palladiumhydroxid (20%) auf Kohle versetzt. Die Reaktionslösung wurde 5 Stunden unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde der Palladium-Katalysator über Celite abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 9:1. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1,36 g (99,5 %)

DC: $R_f = 0,39$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d_6)

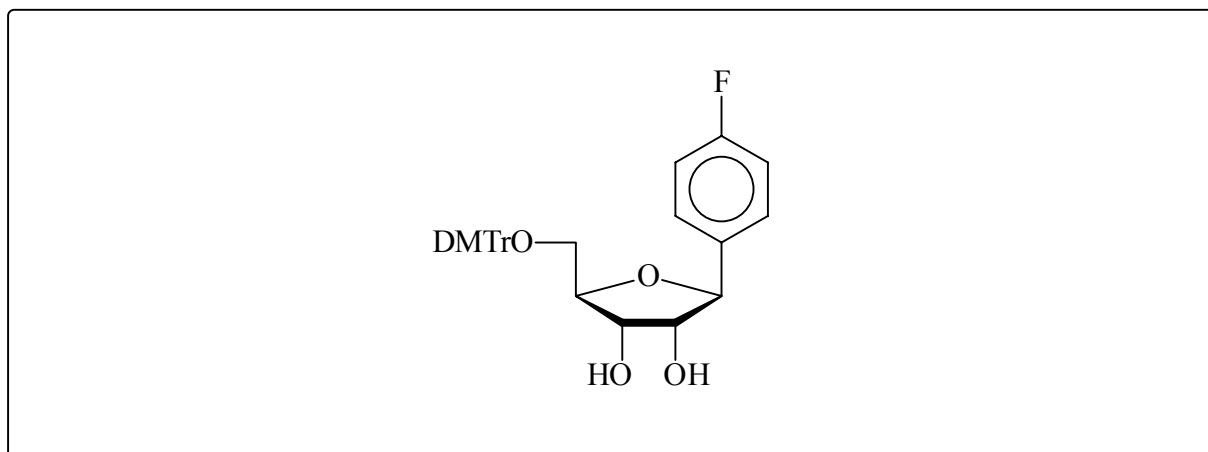
7.42 (m, 2H, H_{ar}); 7.14 (m, 2H, H_{ar}); 4.97 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, 1'H); 4.91 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, 3'-OH); 4.82 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, 5'-OH); 4.56 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, 2'-OH); 3.89 (m, 1H, 3'H); 3.81 (m, 1H, 4'H); 3.66 (m, 1H, 2'H); 3.54 (m, 2H, 5'H)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (67,9 MHz, DMSO-d_6)

137.72 (C1); 128.06 (d, $J = 11.5$ Hz, C3); 114.79 (C2); 114.47 (C6); 85.18 (C1'); 82.21 (C4'); 77.55 (C2'); 71.35 (C3'); 61.97 (C5')

^{19}F -NMR: δ [ppm] (254,2 MHz, DMSO- d_6)
-115.87 (sep, $J = 5.1$ Hz, 1F, 4F)
ESI(-): m/z 227,0 (M-H) $^-$
El.-Analyse: Berechnet: C: 57,89 % H: 4,74 %
Gefunden: C: 57,88 % H: 4,84 %
UV: λ_{max} (Methanol): 265,0 nm; 271,0 nm

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 1'-desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose 96



$\text{C}_{32}\text{H}_{31}\text{FO}_6$
530,57 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

1,37 g (6 mmol) 1'-Desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **34** wurden in 30 ml abs. Pyridin gelöst und mit 1,25 ml (9 mmol) Triethylamin und 2,44 g (7,2 mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 4,5 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml Methanol gequenchet und mit gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung versetzt. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem

Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 98:2. Das Produkt wurde als gelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 2,52 g (79,1 %)

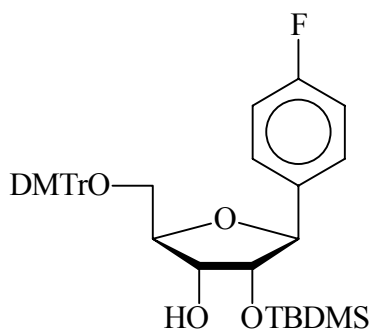
DC: $R_f = 0,37$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d_6)
 7.48 – 6.87 (m, 17H, H_{ar}); 5.13 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H, 1'H); 5.01 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, 3'-OH); 4.66 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H, 2'-OH); 3.98 (m, 1H, 4'H); 3.89 (q, $J = 4.9$ Hz, 1H, 3'H); 3.74 (s, 7H, 2'H, OCH_3); 3.18 m, 2H, 5'H)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO-d_6)
 158.07 (DMTr); 149.63 (C4); 144.95 (DMTr); 137.44 (C1); 135.63 (DMTr); 129.76 (DMTr); 127.84 (DMTr); 127.78 (DMTr); 126.68 (DMTr); 123.91 (C5); 115.03 (C2); 114.70 (C6); 113.18 (DMTr); 85.40 (DMTr); 83.19 (C1'); 82.69 (C4'); 77.60 (C2'); 71.42 (C3'), 64.14 (C5'); 55.03 (OCH_3)

ESI(-): m/z 529,2 (M-H^-)

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose 97



$\text{C}_{38}\text{H}_{45}\text{FO}_6\text{Si}$

644,82 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

530 mg (1 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **96** wurden in 10 ml eines 1:1 Gemisches aus THF/Pyridin gelöst und mit 204 mg (1,2 mmol) Silbernitrat und 1,4 ml (1,4 mmol) einer 1 M *tert.*-Butyldimethylsilylchlorid-Lösung in THF versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml einer gesättigten wässrigen NaHCO₃-Lösung gequenchet. Das entstandene Silberchlorid wurde über Celite abgetrennt und das Filtrat dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit Methylenchlorid als Elutionsmittel. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 280 mg (43,5 %)

DC: R_f = 0,22 (CH₂Cl₂)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆)

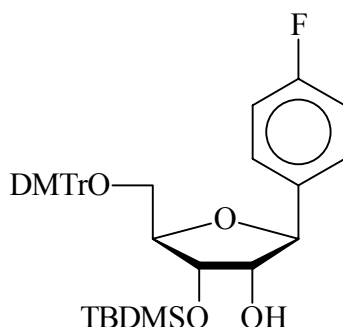
7.49 – 6.83 (m, 17H, H_{ar}); 4.77 (d, J = 4.4 Hz, 1H, 3'-OH); 4.67 (d, J = 6.4 Hz, 1H, 1'H); 4.00 (m, 1H, 4'H); 3.93 (m, 2H, 2'H, 4'H); 3.73 (s, 6H, OCH₃); 3.28 (m, 1H, 5'H); 3.15 (m, 1H, 5''H); 0.78 (s, 9H, SiC(CH₃)₃); -0.11 (s, 3H, SiCH₃); -0.17 (s, 3H, SiCH₃)

¹³C-NMR: δ [ppm] (100,6 MHz, DMSO-d₆)

158.07 (DMTr); 144.96 (C4); 144.75 (DMTr); 137.22 (C1); 135.52 (DMTr); 135.44 (DMTr); 129.74 (DMTr); 129.71 (DMTr); 129.66 (DMTr); 128.88 (DMTr); 128.19 (DMTr); 127.89 (DMTr); 127.61 (DMTr); 126.67 (C3); 114.94 (C2); 114.73 (C6); 113.14 (DMTr); 85.57 (DMTr); 83.50 (C1'); 82.68 (C4'); 79.59 (C2'); 71.56 (C3'); 63.83 (C5'); 55.00 (OCH₃); 25.57 (SiC(CH₃)₃); 17.85 (SiC(CH₃)₃); -5.07 (SiCH₃); -5.30 (SiCH₃)

ESI(-): m/z 643,0 (M-H)⁻

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose 98



$C_{38}H_{45}FO_6Si$

644,82 g/mol

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose 98 entstand als Nebenprodukt bei der Darstellung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose 97.

Ausbeute: 270 mg (42,0 %)

DC: $R_f = 0,42$ (CH_2Cl_2)

1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6)

7.49 – 6.87 (m, 17H, H_{ar}); 4.89 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, 2'-OH); 4.66 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H, 1'H); 4.01 (m, 1H, 3'H); 3.94 (m, 1H, 4'H); 3.75 (m, 1H, 2'H); 3.73 (s, 6H, OCH₃); 3.29 (m, 1H, 5'H); 3.09 (m, 1H, 5''H); 0.79 (s, 9H, SiC(CH₃)₃); 0.01 (s, 3H, SiCH₃); -0.05 (s, 3H, SiCH₃)

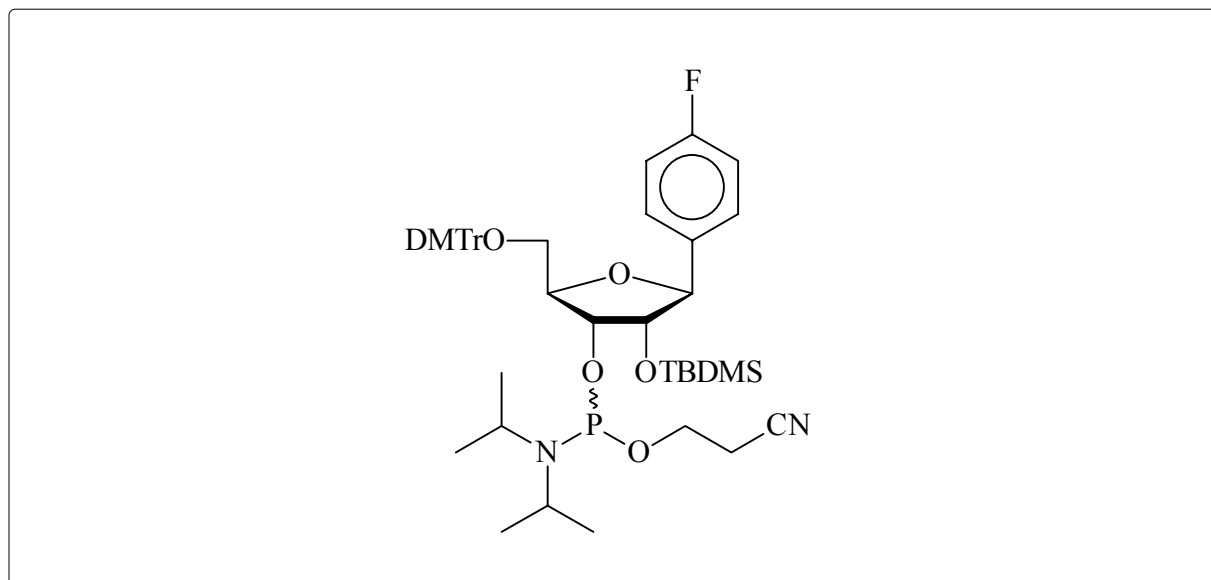
^{13}C -NMR: δ [ppm] (100,6 MHz, DMSO- d_6)

158.07 (DMTr); 144.96 (C4); 144.75 (DMTr); 137.21 (C1); 135.51 (DMTr); 135.44 (DMTr); 129.74 (DMTr); 129.70 (DMTr); 129.66 (DMTr); 128.19 (DMTr); 127.77 (DMTr); 127.66 (DMTr); 126.67 (C3); 114.94 (C2); 114.73 (C6); 113.14 (DMTr); 85.46 (DMTr); 83.93 (C1'); 82.27 (C4'); 77.27 (C2');

73.29 (C3'); 63.49 (C5'); 54.99 (OCH₃); 25.74 (SiC(CH₃)₃); 17.95 (SiC(CH₃)₃); -4.51 (SiCH₃); -5.09 (SiCH₃)

ESI(-): m/z 643,4 (M-H)⁻

3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-1'-(4-fluorphenyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-β-D-ribofuranose 103



C₄₇H₆₂FN₂O₇PSi

845,02 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

200 mg (0,31 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4-fluorphenyl)-β-D-ribofuranose 97 wurden in 10 ml abs. Acetonitril gelöst und mit 440 µl (3,1 mmol) *sym.* Collidin und 14 µl (0,18 mmol) 1-Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und 112 µl (0,5 mmol) 2-Cyanethyldiisopropylchlorphosphoramidit 66 zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde 15 Minuten bei 0°C und 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml gesättigter wäßriger NaHCO₃-Lösung gequencht. Es wurde dreimal mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄

getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch pDC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan/Ethylacetat 4:1. Das Produkt (ein Gemisch zweier Diastereomere) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 176 mg (67,2 %)

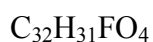
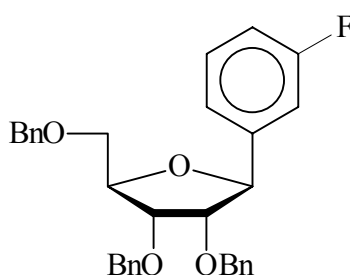
DC: $R_f = 0,42$ (*n*-Hexan/Ethylacetat 4:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (270 MHz, DMSO- d_6)
 7.51 – 6.81 (m, 34H, H_{ar}); 4.75, 4.70 (d, $J = 8.2$ Hz, $J = 8.1$ Hz, 2H, 1'H); 4.17 (m, 2H, 3'H); 4.12 (m, 2H, 2'H); 3.98 (m, 2H, 4'H); 3.79, 3.78 (s, 12H, OCH₃); 3.54 (m, 6H, 5'H, CH₂CN); 3.19 (m, 2H, 5'H); 2.66 (m, 4H, OCH₂); 1.17 (m, 12H, CH(CH₃)₂); 0.80, 0.79 (m, 18H, SiC(CH₃)₃); -0.10, -0.12, -0.20, -0.28 (s, 12H, SiCH₃)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃)
 151.37 und 148.68 (Verhältnis 1 : 3,25)

ESI(+): m/z 845,6 (M+H)⁺

2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose 108



498,57 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

Eine Lösung aus 395 μl (3,6 mmol) 1-Brom-3-fluorbenzol in 12 ml abs. THF wurde bei -78°C unter Argon innerhalb von 10 Minuten mit 2,25 ml einer 1,6 M Lösung von *n*-

Butyllithium in *n*-Hexan versetzt. Nach 20 Minuten bei -78°C wurde eine Lösung von 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-ribo- γ -lacton **85** (1,0 g, 2,4 mmol) in 8 ml abs. THF über 30 Minuten zugegeben und eine Stunde bei -78°C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung innerhalb von 2 Stunden auf -30°C erwärmt. Durch Zugabe von 5 ml Wasser wurde die Reaktion gequencht und dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das erhaltene bräunliche Öl wurde in 15 ml Methylenchlorid gelöst, auf -78°C abgekühlt und mit 600 μl (4,8 mmol) Bortrifluorid Ethyletherat und 730 μl (4,8 mmol) Triethylsilan versetzt. Die Reaktionslösung wurde eine Stunde bei -78°C gerührt und anschließend über Nacht auf 10°C erwärmt. Durch Zugabe von 10 ml gesättigter wäßriger NaHCO_3 -Lösung wurde die Reaktion gequencht und dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan/Ethylacetat 4:1. Das Produkt wurde als leicht orangener Feststoff erhalten.

Ausbeute: 890 mg (74,8 %)

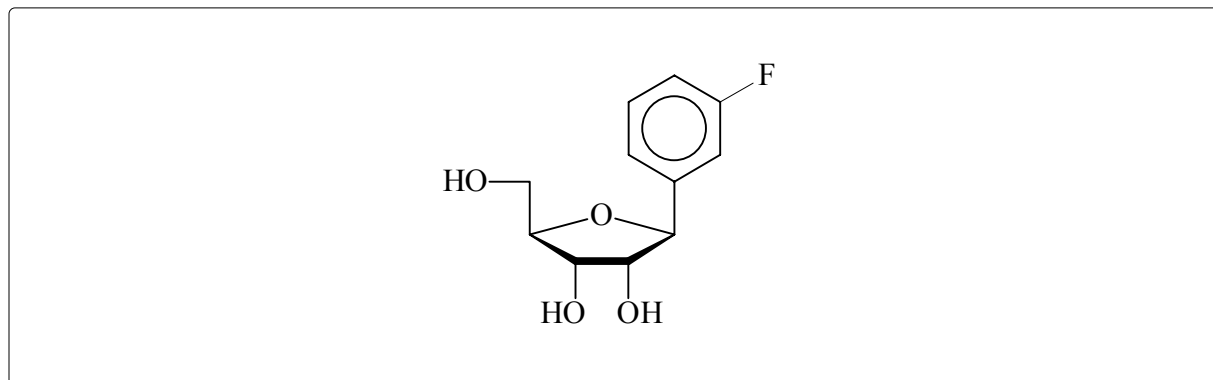
DC: $R_f = 0,26$ (*n*-Hexan/Ethylacetat 4:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (270 MHz, DMSO-d_6)
7.38 – 7.05 (m, 19H, H_{ar} , 2H, 4H, 5H, 6H); 4.92 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, 1'H); 4.50 (m, 6H, CH_2 -benzyl); 4.26 (q, $J = 3.9$ Hz, 1H, 4'H); 4.08 (t, $J = 4.5$ Hz, 1H, 3'H); 3.91 (m, 1H, 2'H); 3.65 (m, 2H, 5'H)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (67,9 MHz, DMSO-d_6)
162.14 (d, $J = 243.3$ Hz, C3); 143.71 (d, $J = 7.0$ Hz, C1); 138.21 (C_{ar}), 138.15 (C_{ar}); 137.97 (C_{ar}); 130.08 (d, $J = 8.4$ Hz, C5); 128.22 (C_{ar}), 128.18 (C_{ar}); 128.13 (C_{ar}); 127.80 (C_{ar}); 127.53 (C_{ar}); 127.41 (C_{ar}); 127.34 (C_{ar}); 122.26 (d, $J = 2.6$ Hz, C6); 114.30 (d, $J = 20.9$ Hz, C2); 112.74 (d, $J = 22.2$ Hz, C4); 83.37 (C1'); 81.22 (C4'); 81.17 (C2'); 77.17 (C3'); 72.42 (CH_2 -benzyl); 71.13 (CH_2 -benzyl); 70.99 (CH_2 -benzyl); 70.14 (C5')

ESI(+): m/z 516,5 ($\text{M}+\text{NH}_4$)⁺

1'-Desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose 35



228,21 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

0,86 g (1,7 mmol) 2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **108** wurden in 20 ml abs. Ethanol gelöst und mit 10 ml Cyclohexen und 200 mg Palladiumhydroxid (20%) auf Kohle versetzt. Die Reaktionslösung wurde 3 Stunden unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde der Palladium-Katalysator über Celite abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 9:1. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0,38 g (96,7 %)

DC: $R_f = 0,32$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (270 MHz, DMSO-d_6)

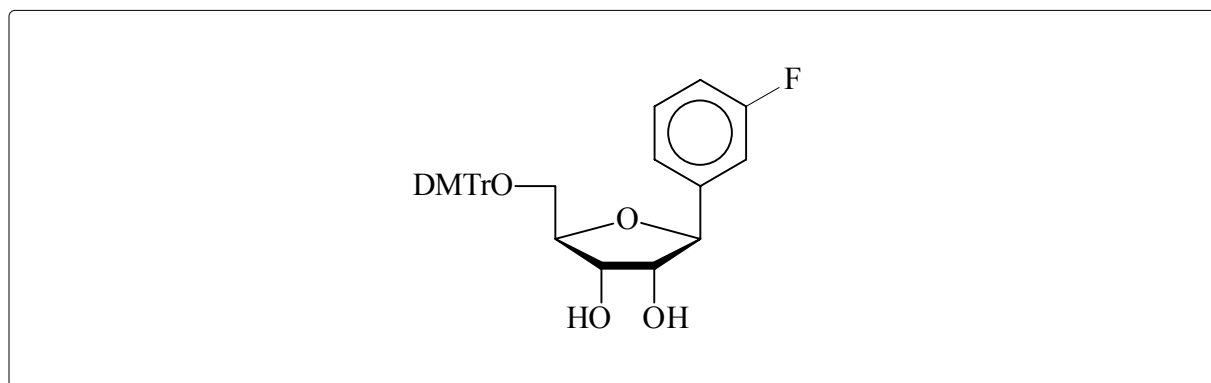
7.36 (m, 1H, H_{ar}); 7.23 (m, 2H, H_{ar}); 7.07 (m, 1H, H_{ar}); 5.03 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, 3'-OH); 4.94 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, 1'H); 4.85 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, 5'-OH); 4.58 (d, $J = 7.2$ Hz, 2'-OH); 3.90 (m, 1H, 3'H); 3.82 (q, $J = 3.5$ Hz, 1H, 4'H); 3.65 (m, 1H, 2'H); 3.54 (m, 2H, 5'H)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (67,9 MHz, DMSO-d_6)

162.11 (d, $J = 242.8$ Hz, C3); 144.60 (d, $J = 7.1$ Hz, C1); 129.84 (d, $J = 8.0$ Hz, C5); 122.12 (d, $J = 2.2$ Hz, C6); 113.83 (d, $J = 20.9$ Hz, C2); 112.57 (d, $J = 22.0$ Hz, C4); 85.22 (C1'), 82.16 (C4'); 77.66 (C2'); 71.33 (C3'); 61.85 (C5')

^{19}F -NMR: δ [ppm] (254,2 MHz, DMSO- d_6)
-113.87 (m, 1F, 3F)
ESI(-): m/z 227,1 (M-H)⁻
El.-Analyse: Berechnet: C: 57,89 % H: 5,74 %
Gefunden: C: 57,94 % H: 5,81 %
UV: λ_{max} (Methanol): 263,0 nm; 269,0 nm

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose 100



$\text{C}_{32}\text{H}_{31}\text{FO}_6$
530,57 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 600 mg (2,6 mmol) 1'-Desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **35** wurden in 20 ml abs. Pyridin gelöst und mit 0,56 ml (4 mmol) Triethylamin und 1,06 g (3,1 mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 4 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml Methanol gequenchet und mit gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung versetzt. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 98:2. Das Produkt wurde als gelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 1,34 g (96,4 %)

DC: $R_f = 0,24$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d_6)

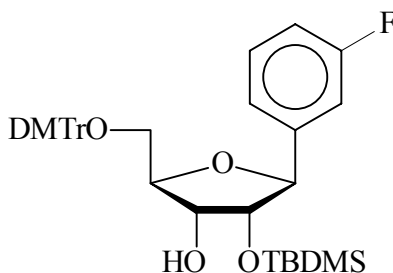
7.45 – 6.87 (m, 19H, H_{ar} , 2H, 4H, 5H, 6H); 5.17 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H, 3'-OH);
5.00 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, 1'H); 4.70 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H 2'-OH); 4.01 (m, 1H,
4'H); 3.89 (q, $J = 4.7$ Hz, 1H, 3'H); 3.79 (m, 1H, 2'H); 3.74 (s, 6H, OCH_3);
3.19 (m, 2H, 5'H)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO-d_6)

158.26 (d, $J = 248.8$ Hz, C3); 158.03 (DMTr); 144.91 (DMTr); 144.38 (d, $J =$
7.0 Hz, C1); 135.61 (DMTr); 135.55 (DMTr); 129.93 (d, $J = 19.7$ Hz, C5);
129.70 (DMTr); 127.75 (DMTr); 127.68 (DMTr); 126.62 (DMTr); 123.85
(C6); 113.88 (d, $J = 13.0$ Hz, C2); 113.13 (DMTr); 112.32 (d, $J = 21.8$ Hz, C4);
85.37 (DMTr); 83.17 (C1'); 82.63 (C4'); 77.57 (C2'); 71.36 (C3'); 64.10
(C5'); 54.97 (OCH_3)

ESI(-): m/z 529,4 (M-H^-)

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-
desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose 109**



$\text{C}_{38}\text{H}_{45}\text{FO}_6\text{Si}$

644,82 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

1,32 g (2,5 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **100** wurden in 20 ml eines 1:1 Gemisches aus THF/Pyridin gelöst und mit 508 mg (3 mmol) Silbernitrat und 3,5 ml (3,5 mmol) einer 1 M *tert.*-Butyldimethylsilylchlorid-Lösung in THF versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml einer gesättigten wässrigen NaHCO₃ Lösung gequenchet. Das entstandene Silberchlorid wurde über Celite abgetrennt und das Filtrat dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit Methylenchlorid als Elutionsmittel. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 530 mg (33,1 %)

DC: R_f = 0,36 (CH₂Cl₂)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d₆)

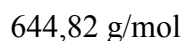
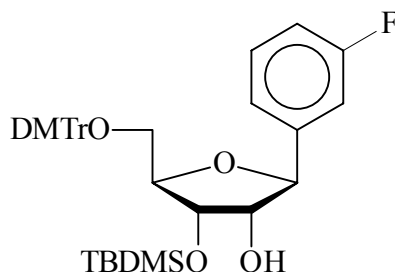
7.45 – 6.82 (m, 17H, H_{ar}); 4.85 (d, J = 5.2 Hz, 1H, 3'-OH); 4.70 (d, J = 6.8 Hz, 1H, 1'H); 4.00 (m, 1H, 4'H); 3.92 (m, 2H, 2'H, 3'H); 3.73 (s, 6H, OCH₃); 3.22 (m, 2H, 5'H); 0.78 (s, 9H, SiC(CH₃)₃); -0.10 (s, 3H, SiCH₃); -0.16 (s, 3H, SiCH₃)

¹³C-NMR: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO-d₆)

163.50 (d, J = 257.7 Hz, C3); 158.10 (DMTr); 145.05 (DMTr); 144.83 (C1); 135.51 (DMTr); 135.41 (DMTr); 130.10 (d, J = 9.0 Hz, C5); 129.77 (DMTr); 127.81 (DMTr); 127.62 (DMTr); 126.73 (C6); 113.77 (C2); 113.17 (DMTr); 112.54 (C4); 85.51 (DMTr); 84.08 (C1'); 82.27 (C4'); 79.68 (C2'); 71.65 (C3'); 64.11 (C5'); 55.02 (OCH₃); 25.63 (SiC(CH₃)₃); 17.91 (SiC(CH₃)₃); -4.94 (SiCH₃); -5.31 (SiCH₃)

ESI(-): m/z 643,4 (M-H)⁻

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose 110



5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl- 1'-desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose 110 entstand als Nebenprodukt bei der Darstellung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose 109.

Ausbeute: 680 mg (42,5 %)

DC: $R_f = 0,48$ (CH_2Cl_2)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6)

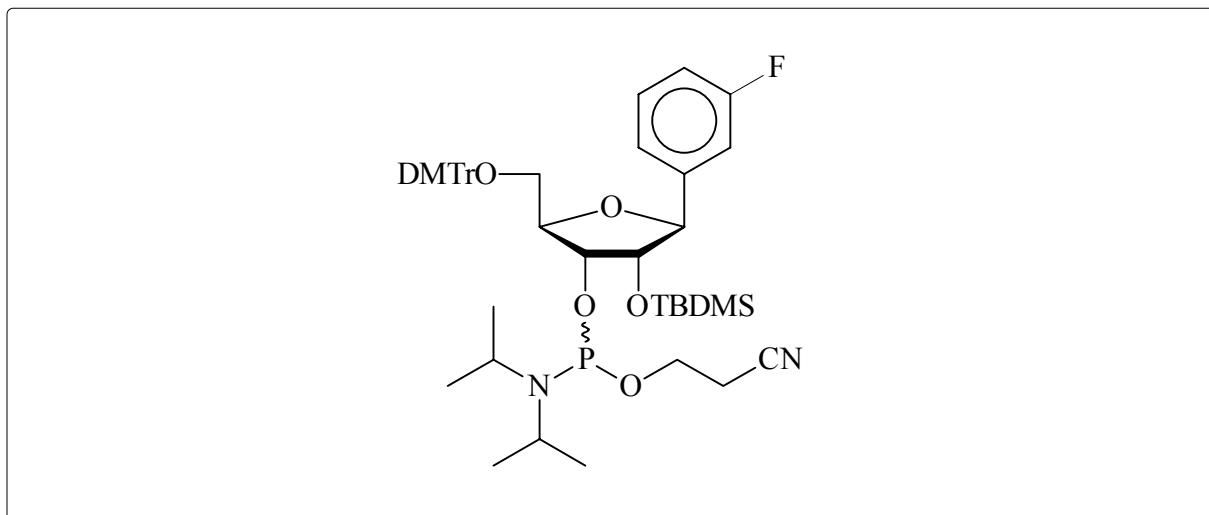
7.43 – 6.85 (m, 17H, H_{ar}), 5.00 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, 2'-OH); 4.68 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, 1'H); 3.97 (m, 2H, 3'H, 4'H); 3.77 (m, 1H, 2'H); 3.73 (s, 6H, OCH_3); 3.18 (m, 2H, 5'H); 0.78 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); -0.01 (s, 3H, SiCH_3); -0.06 (SiCH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO-d_6)

162.22 (d, $J = 243.0$ Hz, C3); 158.11 (DMTr); 144.83 (DMTr); 144.60 (d, $J = 7.0$ Hz, C1); 135.55 (DMTr); 135.44 (DMTr); 130.09 (d, $J = 8.1$ Hz, C5); 129.70 (DMTr); 127.95 (DMTr); 127.67 (DMTr); 126.70 (DMTr); 121.94 (C6); 114.05 (d, $J = 19.7$ Hz, C2); 113.16 (DMTr); 112.43 (d, $J = 18.0$ Hz, C4); 85.61 (DMTr); 83.57 (C1'); 82.74 (C4'); 77.39 (C2'); 73.39 (C3'); 63.50 (C5'); 55.00 (OCH_3); 25.75 ($\text{SiC}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 17.99 ($\text{Si}\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$); -4.51 (SiCH_3); -5.10 (SiCH_3)

ESI(-): m/z 643,4 (M-H^-)

3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-1'-(3-fluorphenyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl- β -D-ribofuranose 111



$C_{47}H_{62}FN_2O_7PSi$

845,02 g/mol

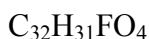
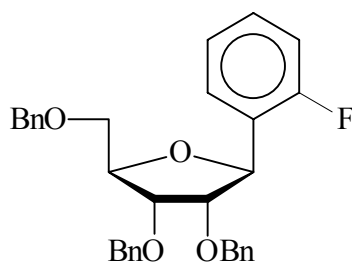
Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 200 mg (0,31 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose 109 wurden in 10 ml abs. Acetonitril gelöst und mit 440 μ l (3,1 mmol) *sym.* Collidin und 14 μ l (0,18 mmol) 1-Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und 112 μ l (0,5 mmol) 2-Cyanethyldiisopropylchlorphosphoramidit 66 zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde 15 Minuten bei 0°C und 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml gesättigter wäßriger NaHCO₃-Lösung gequencht. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch pDC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan/Ethylacetat 4:1. Das Produkt (ein Gemisch zweier Diastereomere) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 170 mg (64,9 %)

DC: $R_f = 0,31$ (*n*-Hexan/Ethylacetat 4:1)

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
 7.52 – 6.81 (m, 34H, H_{ar}); 4.77, 4.73 (d, $J = 8.4$ Hz, $J = 7.2$ Hz, 2H, 1'H); 4.20 (m, 2H, 3'H); 4.14 (m, 2H, 2'H); 4.01 (m, 2H, 4'H); 3.79, 3.78 (s, 12H, OCH_3); 3.52 (m, 6H, 5'H, CH_2CN); 3.25 (m, 2H, 5''H); 2.64 (m, 4H, OCH_2); 1.17 (m, 12H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 0.87, 0.81 (m, 18H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); -0.09, -0.11, -0.17, -0.27 (s, 12H, SiCH_3)
- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
 151.47 und 148.69 (Verhältnis 1 : 3,7)
- ESI(+): m/z 845,6 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose 113



498,57 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

Eine Lösung aus 1,95 ml (18 mmol) 1-Brom-2-fluorbenzol in 50 ml abs. THF wurde bei -78°C unter Argon innerhalb von 10 Minuten mit 11,3 ml einer 1,6 M Lösung von *n*-Butyllithium in *n*-Hexan versetzt. Nach 20 Minuten bei -78°C wurde eine Lösung von 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-ribo- γ -lacton **85** (5,0 g, 12 mmol) in 25 ml abs. THF über 30 Minuten zugegeben und eine Stunde bei -78°C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung innerhalb von 2 Stunden auf -30°C erwärmt. Durch Zugabe von 5 ml Wasser wurde die Reaktion gequencht und dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt.

Das erhaltene bräunliche Öl wurde in 50 ml Methylenchlorid gelöst, auf -78°C abgekühlt und mit 3 ml (24 mmol) Bortrifluorid Ethyletherat und 3,8 ml (24 mmol) Triethylsilan versetzt. Die Reaktionslösung wurde eine Stunde bei -78°C gerührt und anschließend über Nacht auf 10°C erwärmt. Durch Zugabe von 10 ml gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung wurde die Reaktion gequencht und dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan/Ethylacetat 4:1. Das Produkt wurde als leicht orangener Feststoff erhalten.

Ausbeute: 4,76 g (80,0 %)

DC: $R_f = 0,35$ (*n*-Hexan/Ethylacetat 4:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (270 MHz, DMSO-d_6)

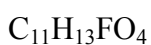
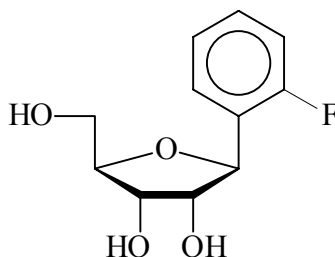
7.57 (dt, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.5$ Hz, 1H, 5H); 7.39 – 7.26 (m, 16H; H_{ar} , 3H); 7.19 (m, 1H, 6H); 7.08 (dt, $J = 7.5$ Hz, $J = 0.8$ Hz, 1H, 4H); 5.23 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, 1'H); 4.55 (m, 6H, CH_2 -benzyl); 4.23 (q, $J = 4.0$ Hz, 1H, 4'H); 4.06 (m, 2H, 2'H, 3'H); 3.69 (m, 2H, 5'H)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (67,9 MHz, DMSO-d_6)

159.55 (d, $J = 245.3$ Hz, C2); 138.21 (C_{ar}); 138.09 (C_{ar}); 129.55 (d, $J = 8.5$ Hz, C6); 128.12 (C4); 128.08 (C_{ar}); 127.86 (C_{ar}); 127.66 (C_{ar}); 127.66 (C_{ar}); 127.48 (C_{ar}); 127.41 (C_{ar}); 127.23 (d, $J = 12.8$ Hz, C1); 124.26 (d, $J = 3.0$ Hz, C5); 115.05 (d, $J = 21.3$ Hz, C3); 82.13 (C1'); 80.52 (C4'); 76.88 (C2'); 76.43 (C3'); 72.37 (CH_2 -benzyl); 71.02 (CH_2 -benzyl); 69.76 (C5')

ESI(+): m/z 516,5 ($\text{M}+\text{NH}_4$)⁺

1'-Desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **36**



228,21 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

4,76 g (9,5 mmol) 2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **113** wurden in 80 ml abs. Ethanol gelöst und mit 40 ml Cyclohexen und 900 mg Palladiumhydroxid (20%) auf Kohle versetzt. Die Reaktionslösung wurde 2 Stunden unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde der Palladium-Katalysator über Celite abfiltriert und das Filtrat zur Trockne am Rotationsverdampfer eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 9:1. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 2,09 g (95,9 %)

DC: $R_f = 0,41$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d_6)

7.60 (dt, $J = 6.0$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 1H, 5H); 7.31 (m, 1H, 3H); 7.15 (m, 2H, 4H, 6H); 5.02 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H, 1'H); 4.88 (m, 2H, 2'-OH, 3'-OH); 4.82 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, 5'-OH); 3.85 (m, 3H, 2'H, 3'H, 4'H); 3.58 (m, 2H, 5'H)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO-d_6)

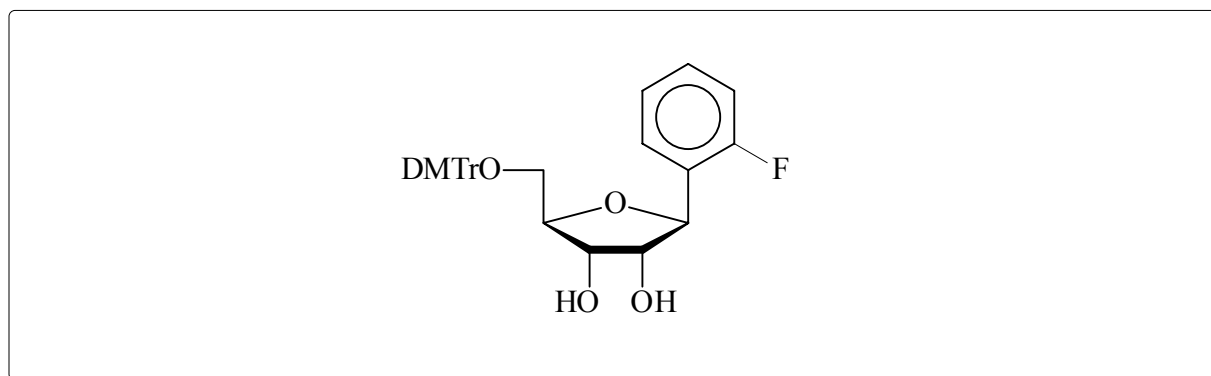
159.97 (d, $J = 245.2$ Hz, C2); 129.23 (d, $J = 8.2$ Hz, C6); 128.44 (d, $J = 4.3$ Hz, C4); 128.04 (d, $J = 12.9$ Hz, C1); 124.27 (d, $J = 3.3$ Hz, C5); 115.00 (d, $J = 21.5$ Hz, C3); 84.44 (C1'); 77.58 (C4'); 76.72 (C2'); 71.00 (C3'); 61.69 (C5')

$^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (235,3 MHz, DMSO-d_6)

-119.03 (m, 1F, 2F)

ESI(-): m/z 227,0 (M-H)⁻
El.-Analyse: Berechnet: C: 57,89 % H: 5,74 %
Gefunden: C: 57,61 % H: 5,58 %
UV: λ_{\max} (Methanol): 263,0 nm; 269,0 nm

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose 101



$C_{32}H_{31}FO_6$
530,57 g/mol

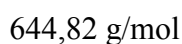
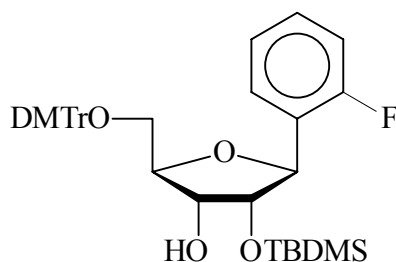
Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

1,81 g (7,9 mmol) 1'-Desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **36** wurden in 50 ml abs. Pyridin gelöst und mit 1,2 ml (12 mmol) Triethylamin und 3,22 g (9,5 mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 3 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml Methanol gequencht und mit gesättigter wäßriger $NaHCO_3$ -Lösung versetzt. Es wurde dreimal mit Methylenechlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenechlorid/Methanol 98:2. Das Produkt wurde als gelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 4,11 g (90,2 %)

- DC: $R_f = 0,37$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)
- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d_6)
 7.57 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H, 5H); 7.46 – 6.85 (m, 16H, H_{ar} , 3H, 4H, 6H); 5.18 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, 1'H); 4.97 (m, 2H, 2'-OH, 3'-OH); 3.98 (q, $J = 2.9$ Hz, 1H, 4'H); 3.90 (m, 2H, 2'H, 3'H); 3,74 (s, 6H, OCH_3); 3.22 (m, 2H, 5'H)
- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO-d_6)
 159.74 (d, $J = 245.4$ Hz, C2); 158.08 (DMTr); 144.96 (DMTr); 135.67 (DMTr); 135.60 (DMTr); 129.76 (DMTr); 129.32 (d, $J = 8.2$ Hz, C6); 128.87 (DMTr); 128.14 (d, $J = 4.6$ Hz, C4); 127.90 (DMTr); 127.76 (DMTr); 126.64 (DMTr); 125.29 (C1); 124.14 (C5); 115.13 (d, $J = 21.3$ Hz, C3); 113.14 (DMTr); 85.40 (DMTr); 81.97 (C1'); 78.61 (C4'); 76.55 (C2'); 70.93 (C3'); 63.82 (C5'); 55.00 (OCH_3)
- ESI(-): m/z 529,0 (M-H^-)

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose 114



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

3,5 g (6,6 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose 101 wurden in 50 ml eines 1:1 Gemisches aus THF/Pyridin gelöst und mit 1,35 g (7,9 mmol) Silbernitrat und 9,2 ml (9,2 mmol) einer 1 M *tert.*-Butyldimethylsilylchlorid

Lösung in THF versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml einer gesättigten wäßrigen NaHCO₃-Lösung gequenchet. Das entstandene Silberchlorid wurde über Celite abgetrennt und das Filtrat dreimal mit Methylchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte über prep. HPLC (*MN Nucleoprep 100-20 von Macherey-Nagel, n-Hexan / Ethylacetat / Methylchlorid 47:3:50*). Das Produkt (*slow-Isomer*) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 1,33 g (31,3 %)

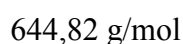
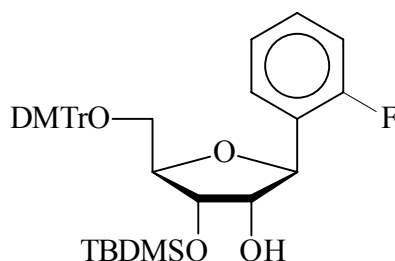
DC: R_f = 0,30 (CH₂Cl₂)

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d₆)
7.62 (t, J = 6.3 Hz, 1H, 5H); 7.47 – 6.87 (m, 16H, H_{ar}, 3H, 4H, 6H); 5.01 (d, J = 5.3 Hz, 1H, 1'H); 4.84 (d, J = 5.7 Hz, 1H, 3'-OH); 4.03 (m, 2H, 2'H, 4'H); 3.90 (m, 1H, 3'H); 3.74 (s, 6H; OCH₃); 3.23 (m, 2H, 5'H); 0.80 (s, 9H, SiC(CH₃)₃); -0.06 (s, 3H, SiCH₃); -0.11 (s, 3H, SiCH₃)

¹³C-NMR: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO-d₆)
159.70 (d, J = 245.1 Hz, C2); 158.08 (DMTr); 144.96 (DMTr); 135.51 (DMTr); 129.76 (DMTr); 129.30 (d, J = 8.1 Hz, C6); 128.14 (d, J = 4.6 Hz, C4); 127.76 (DMTr); 127.67 (DMTr); 126.65 (DMTr); 125.27 (C1); 124.15 (C5); 115.15 (d, J = 21.4 Hz, C3); 113.13 (DMTr); 85.45 (DMTr); 82.61 (C1'); 79.00 (C4'); 77.76 (C2'); 70.76 (C3'); 63.85 (C5'); 54.99 (OCH₃); 25.56 (SiC(CH₃)₃); 17.85 (SiC(CH₃)₃); -4.89 (SiCH₃); -5.42 (SiCH₃)

ESI(-): m/z 643,6 (M-H)⁻

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose 115



5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl- 1'-desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose 115 entstand als Nebenprodukt (*fast*-Isomer) bei der Darstellung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl- 1'-desoxy- 1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose 114.

Ausbeute: 1,26 mg (29,6 %)

DC: $R_f = 0,30$ (CH_2Cl_2)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d_6)

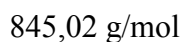
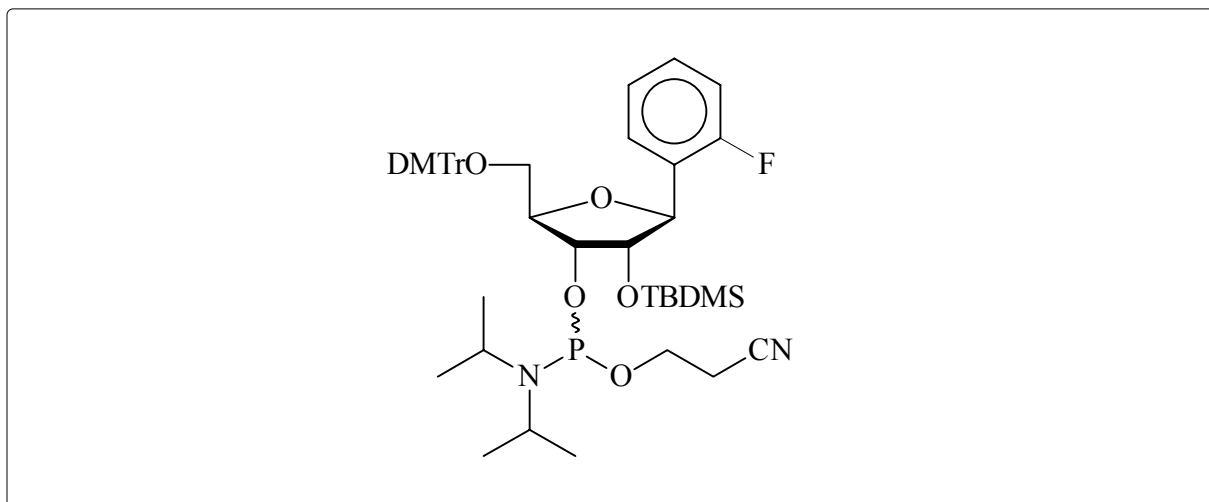
7.63 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H, 5H); 7.45 – 6.85 (m, 16H, H_{ar} , 3H, 4H, 6H); 4.98 (m, 2H, 1'H, 2'-OH); 4.05 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H, 3'H); 3.93 (m, 2H, 2'H, 4'H); 3.73 (s, 6H, OCH_3); 3.19 (m, 2H, 5'H); 0.75 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); -0.02 (s, 3H, SiCH_3); -0.10 (s, 3H, SiCH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO-d_6)

159.72 (d, $J = 245.2$ Hz, C2); 158.10 (DMTr); 144.86 (DMTr); 135.49 (DMTr); 129.31 (d, $J = 8.2$ Hz, C6); 128.15 (d, $J = 4.7$ Hz, C4); 127.92 (DMTr); 127.75 (DMTr); 126.69 (DMTr); 125.29 (C1); 124.19 (C5); 115.19 (d, $J = 20.9$ Hz, C3); 113.13 (DMTr); 85.57 (DMTr); 82.18 (C1'); 78.89 (C4'); 76.15 (C2'); 72.54 (C3'); 63.20 (C5'); 54.99 (OCH_3); 25.67 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 17.86 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); -4.56 (SiCH_3); -5.19 (SiCH_3)

ESI(-): m/z 643,4 (M-H) $^-$

3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-1'-(2-fluorphenyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl- β -D-ribofuranose 116



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

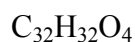
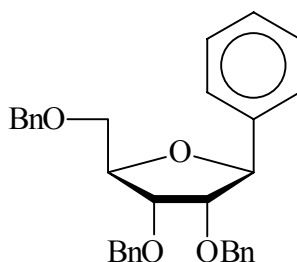
200 mg (0,31 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose 114 wurden in 10 ml abs. Acetonitril gelöst und mit 440 μl (3,1 mmol) *sym.* Collidin und 14 μl (0,18 mmol) 1-Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und 112 μl (0,5 mmol) 2-Cyanethyldiisopropylchlorphosphoramidit 66 zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde 15 Minuten bei 0°C und 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml gesättigter wäßriger NaHCO₃-Lösung gequencht. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch pDC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan/Ethylacetat 4:1. Das Produkt (ein Gemisch zweier Diastereomere) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 150 mg (57,3 %)

DC: $R_f = 0,29$ (*n*-Hexan/Ethylacetat 4:1)

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (270 MHz, DMSO- d_6)
 7.73 – 6.79 (m, 34H, H_{ar}); 5.19, 5.17 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, 1'H); 4.25 (m, 2H, 3'H); 4.16 (m, 2H, 2'H); 3.96 (m, 2H, 4'H); 3.79, 3.78 (s, 12H, OCH_3); 3.65 (m, 6H, 5'H, CH_2CN); 3.22 (m, 2H, 5''H); 2.66 (m, 4H, OCH_2); 1.14 (m, 12H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 0.81, 0.80 (m, 18H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); -0.05 , -0.09 , -0.15 , -0.19 (s, 12H, SiCH_3)
- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
 150.47 und 148.83 (Verhältnis 1 : 2,7)
- ESI(+): m/z 845,6 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose 94



480,57 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

Eine Lösung aus 0,76 ml (7,1 mmol) Brombenzol in 20 ml abs. THF wurde bei -78°C unter Argon innerhalb von 10 Minuten mit 4,5 ml einer 1,6 M Lösung von *n*-Butyllithium in *n*-Hexan versetzt. Nach 20 Minuten bei -78°C wurde eine Lösung von 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-ribo- γ -lacton **85** (2,0 g, 4,8 mmol) in 20 ml abs. THF über 30 Minuten zugegeben und eine Stunde bei -78°C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung innerhalb von 2 Stunden auf -30°C erwärmt. Durch Zugabe von 5 ml Wasser wurde die Reaktion gequench und dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das erhaltene bräunliche Öl

wurde in 20 ml Methylenchlorid gelöst, auf -78°C abgekühlt und mit 1,2 ml (9,5 mmol) Bortrifluorid Ethyletherat und 1,5 ml (9,5 mmol) Triethylsilan versetzt. Die Reaktionslösung wurde eine Stunde bei -78°C gerührt und anschließend über Nacht auf 10°C erwärmt. Durch Zugabe von 10 ml gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung wurde die Reaktion gequencht und dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan/Ethylacetat 4:1. Das Produkt wurde als leicht orangener Feststoff erhalten.

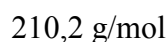
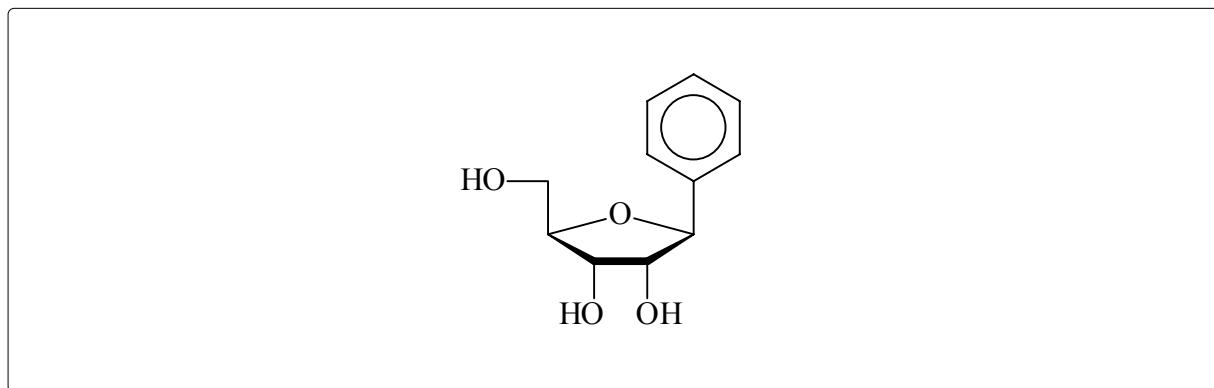
Ausbeute: 1,71 g (74,7 %)

DC: $R_f = 0,45$ (*n*-Hexan/Ethylacetat 4:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d_6)
7.40 – 7.19 (m, 20H, H_{ar}); 4.88 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, 1'H); 4.61 – 4.43 (m, 6H, CH_2 -benzyl); 4.24 (q, $J = 4.0$ Hz, 1H, 4'H); 4.06 (t, $J = 4.4$ Hz, 1H, 3'H); 3.90 (m, 1H, 2'H); 3.64 (m, 2H, 5'H)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO-d_6)
140.60 (C_{ar}); 138.30 (C_{ar}); 138.20 (C_{ar}); 138.07 (C_{ar}); 128.26 (C_{ar}); 128.21 (C_{ar}); 128.15 (C_{ar}); 127.84 (C_{ar}); 127.56 (C_{ar}); 127.50 (C_{ar}); 127.40 (C_{ar}); 126.25 (C_{ar}); 83.42 ($\text{C1}'$); 81.90 ($\text{C4}'$); 81.07 ($\text{C2}'$); 77.28 ($\text{C3}'$); 72.42 (CH_2 -benzyl); 71.07 (CH_2 -benzyl); 70.98 (CH_2 -benzyl); 70.32 ($\text{C5}'$)

ESI(+): m/z 498,4 ($\text{M}+\text{NH}_3$)⁺

1'-Desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose 38

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

0,2 g (0,42 mmol) 2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose **94** wurden in 8 ml abs. Methylenchlorid gelöst und auf -78°C abgekühlt. Die Reaktionslösung wurde mit 1 ml Bortribromid (ca. 1 M in Methylenchlorid) versetzt und 1,5 Stunden bei -78°C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 ml Methylenchlorid/Methanol 1:1 gequencht und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Das verbleibende braune Öl wurde zweimal durch FC mit dem Laufmittel Methylenchlorid/Methanol 9:1 aufgereinigt. Das Produkt wurde als leicht gelblicher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 60 mg (69,0 %)

DC: $R_f = 0,24$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d_6)

7.41 – 7.22 (m, 5H, H_{ar}); 4.93 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, 1'H); 4.86 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, 3'-OH); 4.77 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, 5'-OH); 4.54 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, 2'-OH); 3.88 (m, 1H, 4'H); 3.80 (m, 1H, 3'H); 3.68 (q, $J = 5.6$ Hz, 1H, 2'H); 3.53 (m, 2H, 5'H)

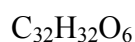
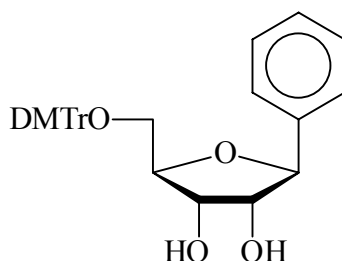
$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO-d_6)

141.42 (C_{ar}); 127.96 (C_{ar}); 127.23 (C_{ar}); 126.24 (C_{ar}); 85.06 ($\text{C1}'$); 82.99 ($\text{C4}'$); 77.63 ($\text{C2}'$); 71.44 ($\text{C3}'$); 62.06 ($\text{C5}'$)

UV: λ_{max} (Methanol): 258,0 nm

ESI(-): m/z 209,0 (M-H^-)

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 1'-desoxy-1'-phenyl- β -D-
ribofuranose 102**



512,56 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

1,0 g (4,75 mmol) 1'-Desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose **38** wurde in 25 ml abs. Pyridin gelöst und mit 1,0 ml (7,2 mmol) Triethylamin und 1,93 g (5,7 mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 4 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml Methanol gequencht und mit gesättigter wäßriger NaHCO_3 -Lösung versetzt. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 98:2. Das Produkt wurde als gelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 1,83 g (75,3 %)

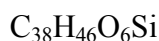
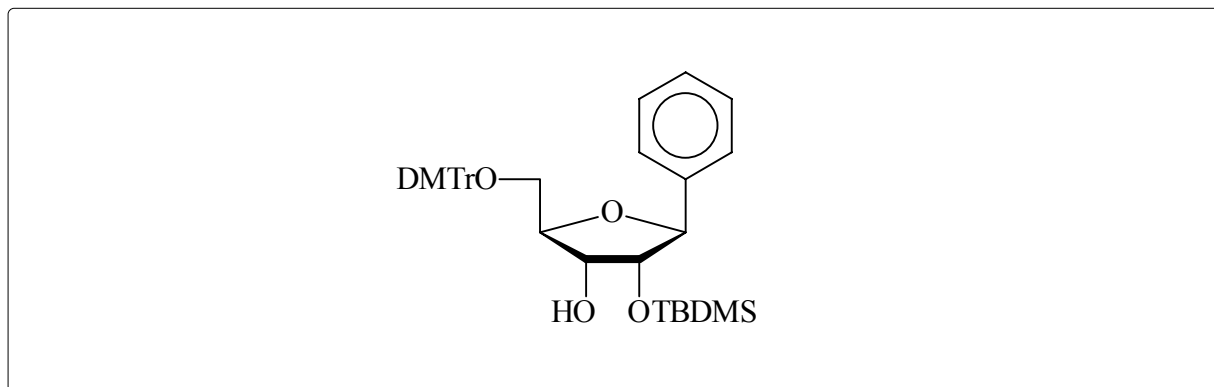
DC: $R_f = 0,23$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d_6)

7.47 – 6.86 (m, 18H, H_{ar}); 5.07 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, 1'H); 4.93 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, 3'-OH); 4.66 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H, 2'-OH); 3.99 (m, 1H, 4'H); 3.88 (q, $J = 4.9$ Hz, 1H, 3'H); 3.74 (m, 1H, 2'H); 3.73 (s, 6H, OCH_3); 3.18 (m, 2H, 5'H)

^{13}C -NMR: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO- d_6)
 158.08 (DMTr); 149.62 (C_{ar}); 144.98 (DMTr); 141.29 (C_{ar}); 136.11 (C_{ar});
 135.69 (DMTr); 129.77 (DMTr); 128.06 (DMTr); 127.79 (DMTr); 127.29
 (C_{ar}); 126.66 (C_{ar}); 125.96 (C_{ar}); 123.89 (C_{ar}); 113.17 (DMTr); 85.40 (DMTr);
 83.56 ($\text{C}1'$); 82.99 ($\text{C}4'$); 77.60 ($\text{C}2'$); 71.41 ($\text{C}3'$); 64.18 ($\text{C}5'$); 55.03 (OCH_3)
 ESI(-): m/z 511,4 (M-H^-)

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-
 desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose 118**



626,82 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

1,09 g (2,1 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose 102 wurden in 20 ml eines 1:1 Gemisches aus THF/Pyridin gelöst und mit 430 mg (2,5 mmol) Silbernitrat und 2,5 ml (2,5 mmol) einer 1 M *tert.*-Butyldimethylsilylchlorid-Lösung in THF versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml einer gesättigten wässrigen NaHCO_3 -Lösung gequenchet. Das entstandene Silberchlorid wurde über Celite abgetrennt und das Filtrat dreimal mit Methylchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Die

Aufreinigung erfolgte durch FC mit Methylenchlorid → Methylenchlorid/Isopropanol 95:5 als Elutionsmittel. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 390 mg (29,3 %)

DC: $R_f = 0,24$ (CH_2Cl_2)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d_6)

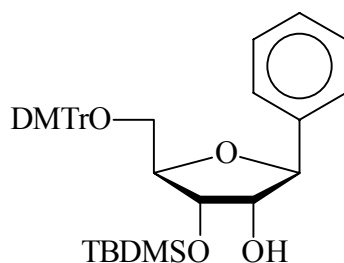
7.46 – 6.82 (m, 18H, H_{ar}); 4.74 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, 3'-OH); 4.67 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, 1'H); 3.95 (m, 3H, 2'H, 3'H, 4'H); 3.73 (s, 6H, OCH_3); 3.23 (m, 2H, 5'H); 0.78 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); -0.12 (SiCH_3); -0.17 (SiCH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (100,6 MHz, DMSO-d_6)

158.06 (DMTr); 145.02 (DMTr); 140.54 (C_{ar}); 140.21 (C_{ar}); 135.54 (DMTr); 135.47 (DMTr); 129.75 (DMTr); 128.88 (C_{ar}); 128.17 (C_{ar}); 128.03 (DMTr); 127.76 (DMTr); 127.37 (C_{ar}); 126.65 (C_{ar}); 126.22 (DMTr); 113.13 (DMTr); 85.43 (DMTr); 83.66 ($\text{C}1'$); 83.13 ($\text{C}4'$); 79.66 ($\text{C}2'$); 71.55 ($\text{C}3'$); 63.88 ($\text{C}5'$); 55.01 (OCH_3); 25.63 ($\text{SiC}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 17.89 ($\text{Si}\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$); -4.98 (SiCH_3); -5.28 (SiCH_3)

ESI(-): m/z 625,6 (M-H^-)

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-tert.-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose 119



$\text{C}_{38}\text{H}_{46}\text{O}_6\text{Si}$

626,82 g/mol

5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose **119** entstand als Nebenprodukt bei der Darstellung von 5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose **118**.

Ausbeute: 560 mg (42,1 %)

DC: $R_f = 0,27$ (CH_2Cl_2)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d_6)

7.42 – 6.82 (m, 18H, H_{ar}); 4.89 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, 2'-OH); 4.67 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, 1'H); 4.01 (m, 1H, 3'H); 3.94 (m, 1H, 2'H); 3.74 (m, 1H, 4'H); 3.72 (s, 6H, OCH_3); 3.22 (m, 2H, 5'H); 0.78 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); -0.01 (SiCH_3); -0.06 (SiCH_3)

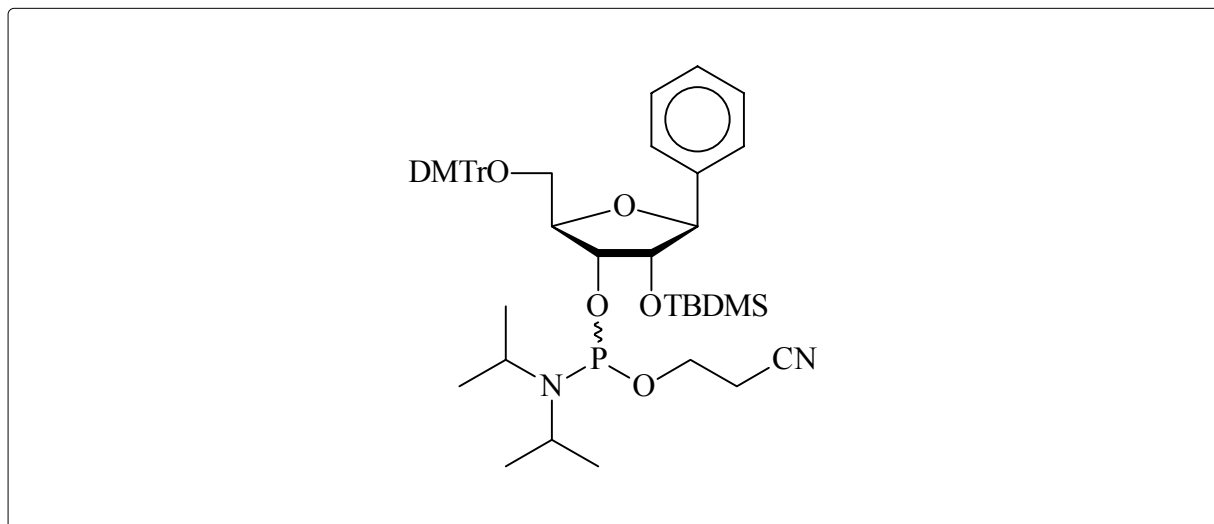
$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO-d_6)

157.78 (DMTr); 145.01 (DMTr); 140.54 (C_{ar}); 140.22 (C_{ar}); 135.44 (DMTr); 135.48 (DMTr); 129.75 (DMTr); 128.89 (C_{ar}); 128.04 (C_{ar}); 127.75 (DMTr); 127.64 (DMTr); 127.37 (C_{ar}); 126.39 (C_{ar}); 126.22 (DMTr); 112.73 (DMTr); 85.43 (DMTr); 83.72 ($\text{C}1'$); 83.38 ($\text{C}4'$); 79.88 ($\text{C}2'$); 71.63 ($\text{C}3'$); 63.84 ($\text{C}5'$); 54.98 (OCH_3); 25.73 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 17.88 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); -5.01 (SiCH_3); -5.25 (SiCH_3)

ESI(-): m/z 625,5 (M-H^-)

3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropyl-phosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-1'-phenyl-2'-O-tert.-butyldimethylsilyl-β-D-ribofuranose

120



$C_{47}H_{63}N_2O_7PSi$

827,02 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 200 mg (0,32 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-tert.-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-phenyl-β-D-ribofuranose **118** wurden in 10 ml abs. Acetonitril gelöst und mit 430 μl (3 mmol) *sym.* Collidin und 13 μl (0,17 mmol) 1-Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und 110 μl (0,5 mmol) 2-Cyanethyldiisopropylchlorphosphoramidit **66** zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde 15 Minuten bei 0°C und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml gesättigter wäßriger NaHCO₃-Lösung gequenchet. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch pDC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan/Ethylacetat 4:1. Das Produkt (ein Gemisch zweier Diastereomere) wurde als weißer Schaum erhalten.

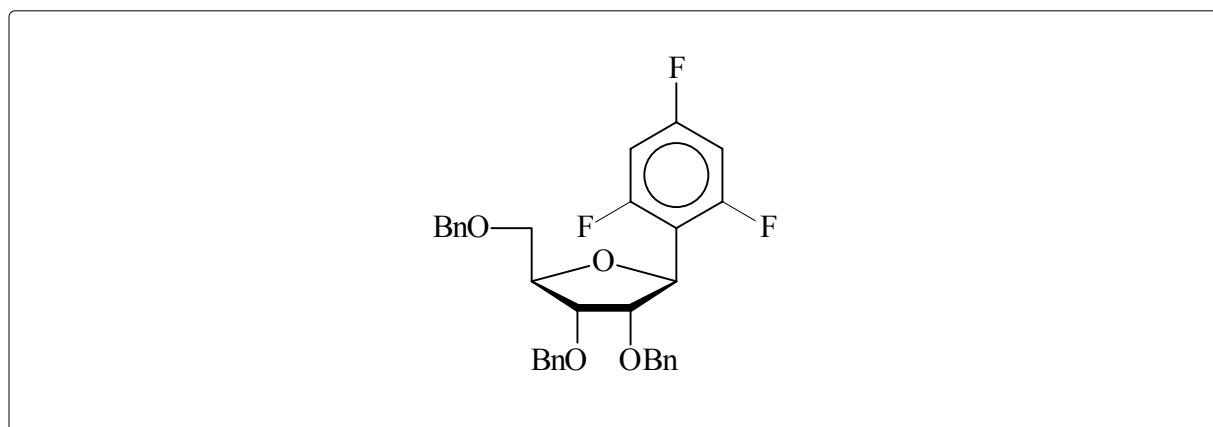
Ausbeute: 152 mg (57,6 %)

DC: R_f = 0,39 (*n*-Hexan/Ethylacetat 4:1)

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6)
 7.56 – 6.83 (m, 36H, H_{ar}); 4.77 (m, 2H, 1'H); 4.16 (m, 4H, 2'H, 3'H); 3.95 (m, 2H, 4'H); 3.79, 3.78 (s, 12H, OCH_3); 3.55 (m, 8H, 5'H, CH_2CN); 2.66 (m, 4H, OCH_2); 1.16 (m, 12H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 0.80, 0.79 (s, 18H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); -0.13, -0.15, -0.29, -0.30 (SiCH_3)
- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
 151.88 und 149.35 (Verhältnis 1 : 4,5)
- ESI(+): m/z 827,6 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-(2,4,6-trifluorphenyl)- β -D-ribo-furanose

104



$\text{C}_{32}\text{H}_{29}\text{F}_3\text{O}_4$

534,54 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

Eine Lösung aus 1,0 g (4,74 mmol) 1-Brom-2,4,6-trifluorbenzol in 16 ml abs. Diethylether wurde bei -78°C unter Argon innerhalb von 10 Minuten mit 3 ml einer 1,6 M Lösung von *n*-Butyllithium in Hexan versetzt. Nach 20 Minuten bei -78°C wurde eine Lösung von 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-ribo- γ -lacton **85** (1,32 g, 3,2 mmol) in 8 ml abs. Diethylether über 30 Minuten zugegeben und eine Stunde bei -78°C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung innerhalb von 2 Stunden auf -30°C erwärmt. Durch Zugabe von 5 ml Wasser wurde die Reaktion gequencht und dreimal mit Diethylether extrahiert. Die

vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das erhaltene bräunliche Öl wurde in 20 ml Methylenchlorid gelöst, auf -78°C abgekühlt und mit 790 μl (6,3 mmol) Bortrifluorid Ethyletherat und 1 ml (6,3 mmol) Triethylsilan versetzt. Die Reaktionslösung wurde eine Stunde bei -78°C gerührt und anschließend über Nacht auf 10°C erwärmt. Durch Zugabe von 10 ml gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung wurde die Reaktion gequencht und dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan/Ethylacetat 4:1. Das Produkt wurde als leicht gelblicher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 550 mg (32,7 %)

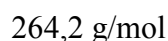
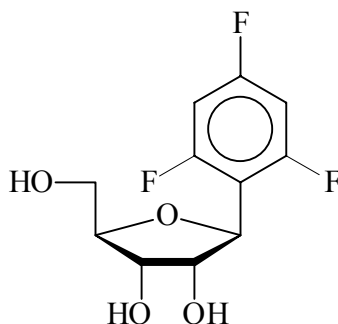
DC: $R_f = 0,42$ (*n*-Hexan/Ethylacetat 4:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (270 MHz, DMSO-d_6)
7.36 – 7.13 (m, 17H, H_{ar} , 3H, 5H); 5.05 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, 1'H); 4.62 – 4.38 (m, 6H, CH_2 -benzyl); 4.30 (m, 1H, 4'H); 4.15 (m, 1H, 3'H); 4.09 (m, 1H, 2'H); 3.53 (m, 2H, 5'H)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (67,9 MHz, DMSO-d_6)
163.32 (C_4); 159.35 (C_2); 159.26 (C_6); 138.25 (C_{ar}); 138.14 (C_{ar}); 137.82 (C_{ar}); 128.23 (C_{ar}); 128.13 (C_{ar}); 127.90 (C_{ar}); 127.61 (C_{ar}); 127.56 (C_{ar}); 127.48 (C_{ar}); 127.42 (C_{ar}); 127.38 (C_{ar}); 111.15 (m, C_1); 101.11 (t, $J = 28.5$ Hz, C_3 , C_5); 81.74 (C_1'); 79.65 (C_4'); 77.19 (C_2'); 73.26 (C_3'); 72.32 (C_5'); 71.31 (CH_2 -benzyl); 71.17 (CH_2 -benzyl); 70.07 (CH_2 -benzyl)

ESI(+): m/z 552,4 ($\text{M}+\text{NH}_4$)⁺

1'-Desoxy-1'-(2,4,6-trifluorphenyl)- β -D-ribofuranose **86**



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

500 mg (0,94 mmol) 2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-(2,4,6-trifluorphenyl)- β -D-ribofuranose **104** wurden in 12 ml abs. Ethanol gelöst und mit 6 ml Cyclohexen und 100 mg Palladiumhydroxid (20%) auf Kohle versetzt. Die Reaktionslösung wurde 3 Stunden unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde der Palladium-Katalysator über Celite abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 9:1. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 237 mg (96,0 %)

DC: $R_f = 0,45$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (270 MHz, DMSO-d_6)

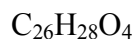
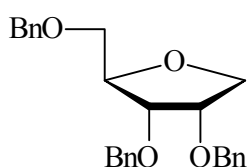
7.18 (t, $J = 9.1$ Hz, 2H, 3H, 5H); 5.06 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, 1'H); 4.95 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, 3'-OH); 4.83 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, 2'-OH); 4.70 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, 5'-OH); 4.17 (q, $J = 6.5$ Hz, 1H, 2'H); 3.89 (q, $J = 5.1$ Hz, 1H, 3'H); 3.73 (q, $J = 5.4$ Hz, 1H, 4'H); 3.46 (m, 2H, 5'H)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (67,9 MHz, DMSO-d_6)

163.39 (m, C4); 159.69 (m, C2, C6); 112.03 (C1); 102.20 (t, $J = 29.0$ Hz, C3); 99.65 (t, $J = 26.6$ Hz, C5); 86.54 (C1'); 75.67 (C4'); 73.48 (C3'); 72.35 (C3'); 62.01 (C5')

^{19}F -NMR: δ [ppm] (235,3 MHz, DMSO- d_6)
 -108.53 (m, 1F, 4F); -110.72 (m, 2F, 2F,6F)
 ESI(-): m/z 263,1 (M-H)⁻
 UV: λ_{max} (Methanol): 255,5 nm

2,3,5-Tri-*O*-benzyl-1-desoxy-D-ribofuranose 121



404,48 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

1,0 g (2,4 mmol) 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-ribofuranose **84** wurden in 10 ml abs. Acetonitril gelöst und mit 0,6 ml (9,6 mmol) Triethylsilan und 0,6 ml (4,8 mmol) $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ versetzt. Die Reaktionslösung wurde 1,5 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung gequenchet. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan/Ethylacetat 4:1. Das Produkt wurde als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 850 mg (88,4 %)

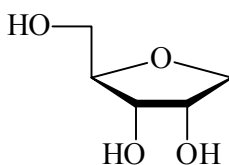
DC: $R_f = 0,49$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1)

^1H -NMR: δ [ppm] (270 MHz, DMSO- d_6)
 7.29 – 7.17 (m, 15H, H_{ar}); 4.58 – 4.41 (m, 6H, CH_2 -benzyl); 4.09 (m, 1H, 4H);
 3.89 (m, 4H, 1H, 2H, 3H); 3.50 (m, 2H, 5H)

^{13}C -NMR: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO- d_6)
 138.05 (C_{ar}); 137.88 (C_{ar}); 137.80 (C_{ar}); 128.25 (C_{ar}); 128.21 (C_{ar}); 128.18 (C_{ar}); 127.80 (C_{ar}); 127.72 (C_{ar}); 127.61 (C_{ar}); 127.49 (C_{ar}); 127.42 (C_{ar}); 80.35 (C_4); 78.18 (C_1); 76.42 (C_2); 73.28 (CH_2 -benzyl), 72.05 (CH_2 -benzyl), 71.66 (CH_2 -benzyl); 70.45 (C_3); 69.93 (C_5).

ESI(+): m/z 422,2 ($\text{M}+\text{NH}_4$) $^+$

1-Desoxy-D-ribofuranose 39



134,13 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

3,9 g (9,6 mmol) 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-1-desoxy-D-ribofuranose **121** wurden in 70 ml abs. Ethanol gelöst und mit 35 ml Cyclohexen und 800 mg Palladiumhydroxid (20%) auf Kohle versetzt. Die Reaktionslösung wurde 4 Stunden unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde der Palladium-Katalysator über Celite abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylchlorid/Methanol 9:1. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1,23 g (95,3 %)

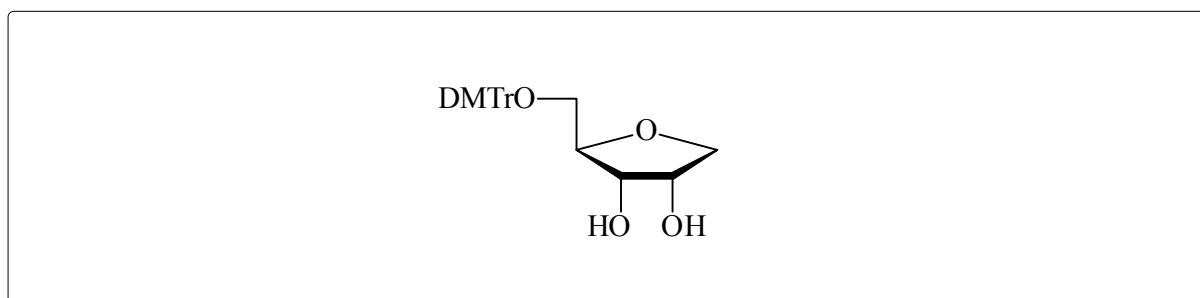
DC: $R_f = 0,22$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1)

^1H -NMR: δ [ppm] (250 MHz, DMSO- d_6)

4.69 (m, 2H, 2-OH, 3-OH); 4.57 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, 5-OH); 3.96 (m, 1H, 4H); 3.83 (m, 1H, 2H); 3.74 (q, $J = 5.5$ Hz, 1H, 3H); 3.52 (m, 3H, 1H, 5H); 3.35 (m, 1H, 5H)

^{13}C -NMR: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO- d_6)
 83.20 (C4), 71.99 (C1); 71.55 (C2); 70.41 (C3); 61.76 (C5)
 ESI(-): m/z 133,0 (M-H)⁻

5-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1-desoxy-D-ribofuranose 123



$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_6$

436,49 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

1,22 g (9,1 mmol) 1-Desoxy-D-ribofuranose **39** wurden in 40 ml abs. Pyridin gelöst und mit 1,9 ml (19 mmol) Triethylamin und 3,7 g (10,9 mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 4 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml Methanol gequenchet und mit gesättigter wäßriger NaHCO_3 -Lösung versetzt. Es wurde dreimal mit Methylchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylchlorid/Methanol 98:2. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 3,41 g (85,9 %)

DC: $R_f = 0,13$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2)

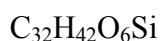
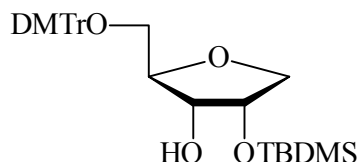
^1H -NMR: δ [ppm] (250 MHz, DMSO- d_6)

7.42-6.86 (m, 13H, H_{ar}); 4.77 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H, 2-OH); 4.73 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H, 3-OH); 4.01 (m, 1H, 2H); 3.94 (m, 1H, 1H); 3.77 (m, 2H, 3H, 4H); 3.73 (s, 6H, OCH_3); 3.60 (dd, $J = 8.9$ Hz, $J = 3.1$ Hz, 1H, 1H); 3.02 (m, 2H, 5H)

^{13}C -NMR: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO- d_6)
 158.02 (DMTr); 145.06 (DMTr); 135.79 (DMTr); 129.70 (DMTr); 127.74 (DMTr); 126.58 (DMTr); 113.14 (DMTr); 85.15 (DMTr); 80.97 (C4); 72.50 (C1); 72.24 (C2); 70.30 (C3); 64.45 (C5); 55.01 (OCH₃)

ESI(-): m/z 435,2 (M-H)⁻

5-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1-desoxy-D-ribofuranose 124



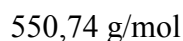
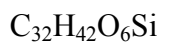
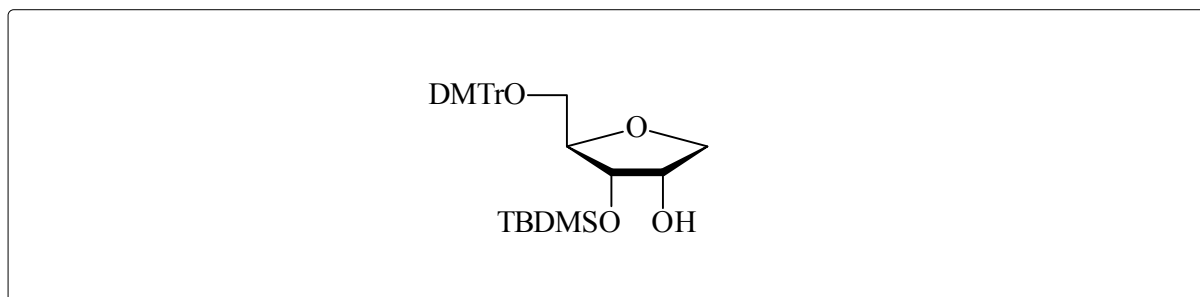
550,74 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

3,2 g (7,3 mmol) 5-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1-desoxy-D-ribofuranose **123** wurden in 60 ml eines 1:1 Gemisches aus THF/Pyridin gelöst und mit 1,5 g (13,3 mmol) Silbernitrat und 10,2 ml (10,2 mmol) einer 1 M *tert.*-Butyldimethylsilylchlorid-Lösung in THF versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml einer gesättigten wäßrigen NaHCO₃-Lösung gequenchet. Das entstandene Silberchlorid wurde über Celite abgetrennt und das Filtrat dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit Methylenchlorid als Elutionsmittel. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

- Ausbeute: 2,43 g (60,3 %)
- DC: $R_f = 0,43$ (CH_2Cl_2)
- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d_6)
7.40 - 6.83 (m, 13H, H_{ar}); 4.49 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, 3-OH); 4.19 (m, 1H, 2H);
3.96 (m, 1H, 1H); 3.77 (m, 2H, 3H, 4H); 3.73 (s, 6H, OCH_3); 3.58 (m, 1H,
1H); 3.00 (m, 2H, 5H); 0.88 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 0.07 (s, 3H, SiCH_3); 0.06 (s,
3H, SiCH_3)
- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (100,6 MHz, DMSO-d_6)
158.05 (DMTr); 145.09 (DMTr); 135.75 (DMTr); 129.73 (DMTr); 127.78
(DMTr); 127.73 (DMTr); 127.42 (DMTr); 126.51 (DMTr); 113.16 (DMTr);
85.17 (DMTr); 80.92 (C4); 73.56 (C1); 72.57 (C2); 70.24 (C3); 64.33 (C5);
55.05 (OCH_3); 25.88 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 18.11 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); -4.54 (SiCH_3); -4.87
(SiCH_3)
- ESI(-): m/z 549,4 (M-H)⁻

**5-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1-desoxy-
D-ribofuranose 125**



5-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1-desoxy-D-ribofuranose 125 entstand als Nebenprodukt bei der Darstellung von 5-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1-desoxy-D-ribofuranose 124.

Ausbeute: 1,1 g (27,3 %)

DC: $R_f = 0,64$ (CH_2Cl_2)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d_6)

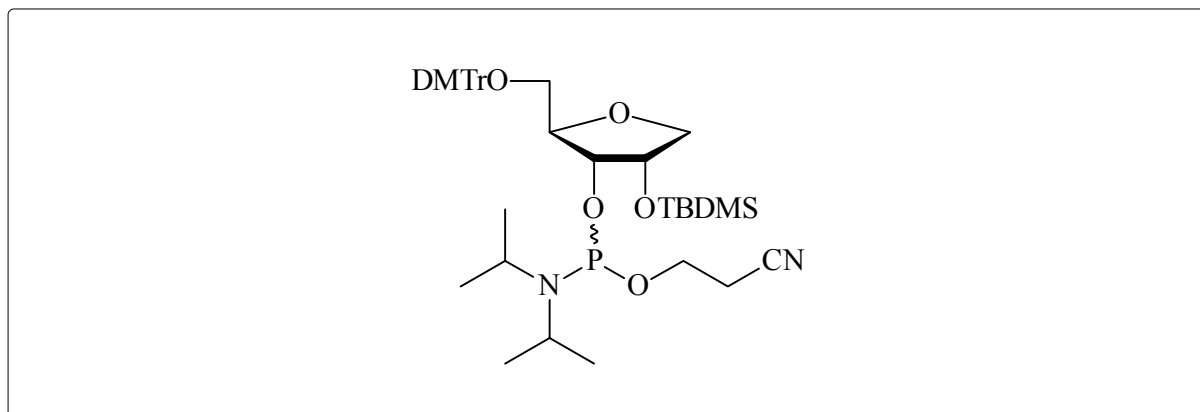
7.42 - 6.82 (m, 13H, H_{ar}); 4.53 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, 2-OH); 4.17 (q, $J = 4.4$ Hz, 1H, 2H); 3.95 (m, 1H, 1H); 3.89 (m, 1H, 3H); 3.79 (m, 1H, 4H); 3.72 (s, 6H, OCH_3); 3.57 (m, 1H, 1H); 3.02 (m, 2H, 5H); 0.72 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); -0.04 (s, 3H, SiCH_3); -0.15 (s, 3H, SiCH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO-d_6)

158.07 (DMTr); 144.94 (DMTr); 135.56 (DMTr); 129.68 (DMTr); 127.76 (DMTr); 127.65 (DMTr); 126.61 (DMTr); 113.82 (DMTr); 85.33 (DMTr); 81.42 (C4); 73.36 (C1); 72.13 (C2); 71.77 (C3); 63.85 (C5); 54.99 (OCH_3); 25.61 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 17.65 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); -4.71 (SiCH_3); -5.29 (SiCH_3)

ESI(-): m/z 549,3 (M-H^-)

3-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1-desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-2-O-tert.-butyldimethylsilyl-D-ribofuranose 126



$\text{C}_{41}\text{H}_{59}\text{N}_2\text{O}_7\text{PSi}$

750,94 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

200 mg (0,36 mmol) 5-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2-O-tert.-butyldimethylsilyl-1-desoxy-D-ribofuranose 124 wurden in 11 ml abs. Acetonitril gelöst und mit 480 μl (3,7

mmol) *sym.* Collidin und 15 μl (0,19 mmol) 1-Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und 122 μl (0,54 mmol) 2-Cyanethyl-diisopropylchlorphosphoramidit **66** zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde 15 Minuten bei 0°C und 35 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml gesättigter wäßriger NaHCO_3 -Lösung gequenchet. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch pDC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 99:1. Das Produkt (ein Gemisch zweier Diastereomere) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 130 mg (47,8 %)

DC: $R_f = 0,49; 0,55$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)

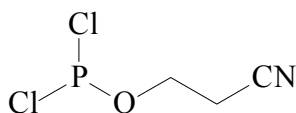
7.40 – 6.72 (m, 34H, H_{ar}); 4.36, 4.30 (q, $J = 4.9$ Hz, $J = 5.3$ Hz, 2H, 2H); 4.07 (m, 2H, 1H); 4.00 (m, 4H, 3H, 4H); 3.72, 3.71 (s, 12H, OCH_3); 3.46 (m, 6H, 1H, CH_2CN); 3.28 (m, 4H, 5H); 2.53 (m, 4H, OCH_2); 1.05 (m, 12H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 0.85, 0.83 (m, 18H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 0.05, 0.04, 0.02, 0.01 (s, 12H, SiCH_3)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)

149.67 und 149.15 (Verhältnis 1 : 1,3)

ESI(+): m/z 751,1 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

2-Cyanethoxy-dichlorphosphin **148**



$\text{C}_3\text{H}_4\text{Cl}_2\text{NOP}$

171,95 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

175 ml (2 mol) Phosphortrichlorid wurden mit 100 ml abs. Diethylether in einem Kolben vorgelegt und über 20 Minuten eine Mischung aus 19,5 ml (285 mmol) 3-Hydroxypropionitril und 120 ml abs. Diethylether zugetropft. Anschließend wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Der Ether wurde bei weniger als 40°C abdestilliert und das verbliebene Öl im Hochvakuum fraktioniert destilliert. Das Produkt konnte als farblose Flüssigkeit bei 68 – 70 °C (ca. $4 \cdot 10^{-5}$ mbar) erhalten werden.

Ausbeute: 31,3 g (63,6 %)

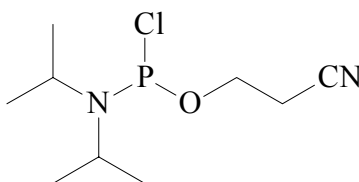
$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, CDCl_3)

4.36 (q, $J = 7.7$ Hz, 2H, CH_2CN); 2.73 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, OCH_2)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (101,2 MHz, CDCl_3)

175.02

2-Cyanethyldiisopropylchlorphosphoramidit **66**



$\text{C}_9\text{H}_{18}\text{ClN}_2\text{OP}$

236,68 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

29,7 g (173 mmol) 2-Cyanoethoxydichlorphosphin **148** wurden in 150 ml abs. Diethylether in einem Kolben vorgelegt und eine Mischung aus 47,2 ml (336 mmol) Diisopropylamin in 70 ml abs. Diethylether langsam über 90 Minuten bei -30°C zugetropft. Anschließend wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene weiße Feststoff wurde über eine Schlenckfritte abgetrennt und der Ether abdestilliert. Das verbliebene Öl wurde im

Hochvakuum fraktioniert destilliert. Das Produkt wurde als leicht trübes Öl bei 78 – 80°C ($1 \cdot 10^{-5}$ mbar) erhalten.

Ausbeute: 22,66 g (55,8 %)

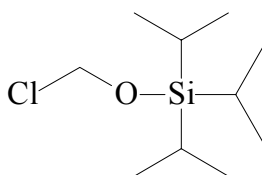
$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, CDCl_3)

4.05 (qt, $J = 6.9$ Hz, 2H, CH_2CN); 3.80 (m, 2H, CH_2 isopropyl); 2.74 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H, OCH_2); 1.25 (m, 12H, CH_3 isopropyl)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)

181.22

Triisopropylsilyloxymethylchlorid 142



$\text{C}_{10}\text{H}_{23}\text{ClOSi}$

222,8 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

Eine Suspension von 1,5 g (50 mmol) p-Formaldehyd in 3,7 ml (50 mmol) Ethanthiol wurde mit einem Tropfen einer 10 N NaOH-Lösung versetzt und bei Raumtemperatur gerührt bis eine klare Lösung entstand (ca. 5 – 10 Minuten). Nach einer Stunde bei 50°C wurden 25 ml Methylenchlorid und 6,8 g (100 mmol) Imidazol gefolgt von 9,53 ml (45 mmol) Triisopropylchlorsilan zugegeben. Die entstandene Suspension wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 200 ml *n*-Hexan verdünnt und mit 125 ml einer 2 M NaH_2PO_4 -Lösung versetzt. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das verbliebene farblose Öl wurde in 125 ml Methylenchlorid gelöst und mit 3,65 ml (45 mmol) Sulfurylchlorid versetzt, wobei eine Gelbfärbung der Lösung zu

beobachten war. Nach einer Stunde rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel abdestilliert. Das verbliebene Öl wurde im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert. Das Produkt siedete bei 65°C (ca. 0,5 mbar) und wurde als farbloses Öl erhalten.

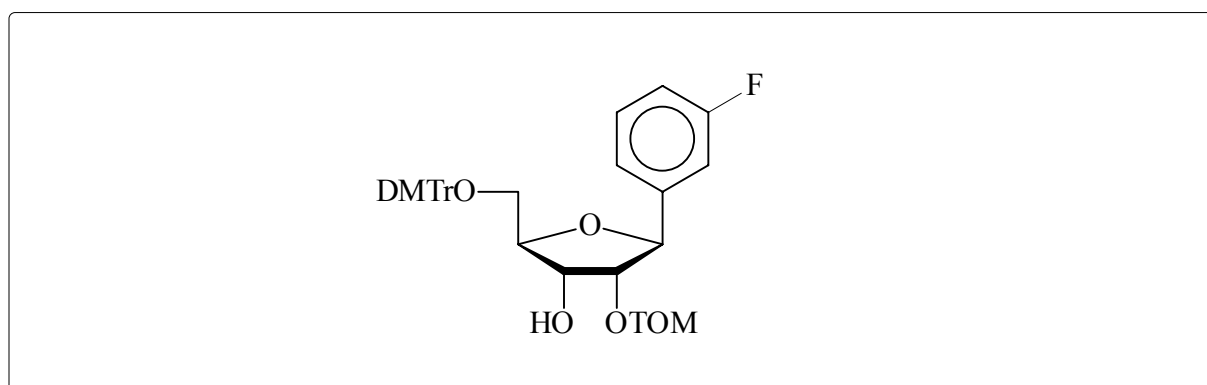
Ausbeute: 7,65 g (76,3 %)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, CDCl_3)
5.67 (s, 2H, CH_2); 1.09 (m, 21H, CH, CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (62,9 MHz, CDCl_3)
17.51 (CH_2); 13.49 (CH_3); 11.65 (CH)

n_D^{20} : 1,46368

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-triisopropylsilyloxymethyl-1'-desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose 143



$\text{C}_{42}\text{H}_{53}\text{FO}_7\text{Si}$

716,9 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

265 mg (0,5 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose 100 wurden in 5 ml 1,2-Dichlorethan gelöst und mit 856 μl (5 mmol) Diisopropylethylamin (DIPEA) und 334 mg (1,1 mmol) Dibutylzinndichlorid versetzt. Es wurde auf 80°C erhitzt und 290 mg (1,3 mmol) Triisopropylsilyloxymethylchlorid 142 zugesetzt. Anschließend wurde 3 Stunden bei 80°C gerührt. Nach Abkühlen der Reaktion wurde mit Methylchlorid und gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung versetzt. Es wurde

dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit Methylenchlorid als Elutionsmittel. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 187 mg (52,4 %)

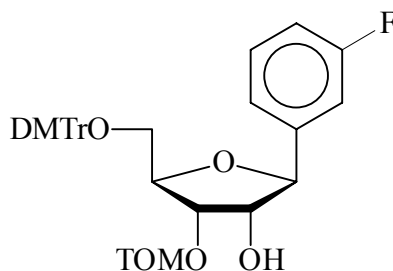
DC: $R_f = 0,56$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d_6)
7.44 – 6.85 (m, 17H, H_{ar}); 4.90 (m, 4H, OCH_2O , 1'H, 3'-OH); 4.03 (m, 3H, 2'H, 3'H, 4'H); 3.73 (s, 6H, OCH_3); 3.21 (m, 2H, 5'H); 0.93 (m, 21H, isopropyl)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO-d_6)
162.18 (d, $J = 240.1$ Hz, C3); 158.04 (DMTr); 143.60 (d, $J = 7.0$ Hz, C1); 135.62 (DMTr); 135.52 (DMTr); 130.01 (d, $J = 8.0$ Hz, C5); 129.70 (DMTr); 127.76 (DMTr); 127.69 (DMTr); 122.17 (C6); 114.08 (C2); 113.11 (DMTr); 112.63 (d, $J = 13.3$ Hz, C4); 88.42 (C1'); 85.48 (DMTr); 83.65 (C4'); 81.71 (C2'); 80.96 (C3'); 69.91 (C5'); 54.97 (OCH_3); 17.57 (OCH_2O); 11.27 (CH_3 -isopropyl, CH-isopropyl)

ESI(-): m/z 761,5 ($\text{M-H}+2\text{Na}^-$)

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-triisopropylsilyloxymethyl-1'-desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose 144



$\text{C}_{42}\text{H}_{53}\text{FO}_7\text{Si}$

716,9 g/mol

5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-*O*-triisopropylsilyloxymethyl-1'-desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **144** entstand als Nebenprodukt bei der Darstellung von 5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-triisopropylsilyloxymethyl-1'-desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **143**.

Ausbeute: 112 mg (31,4 %)

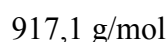
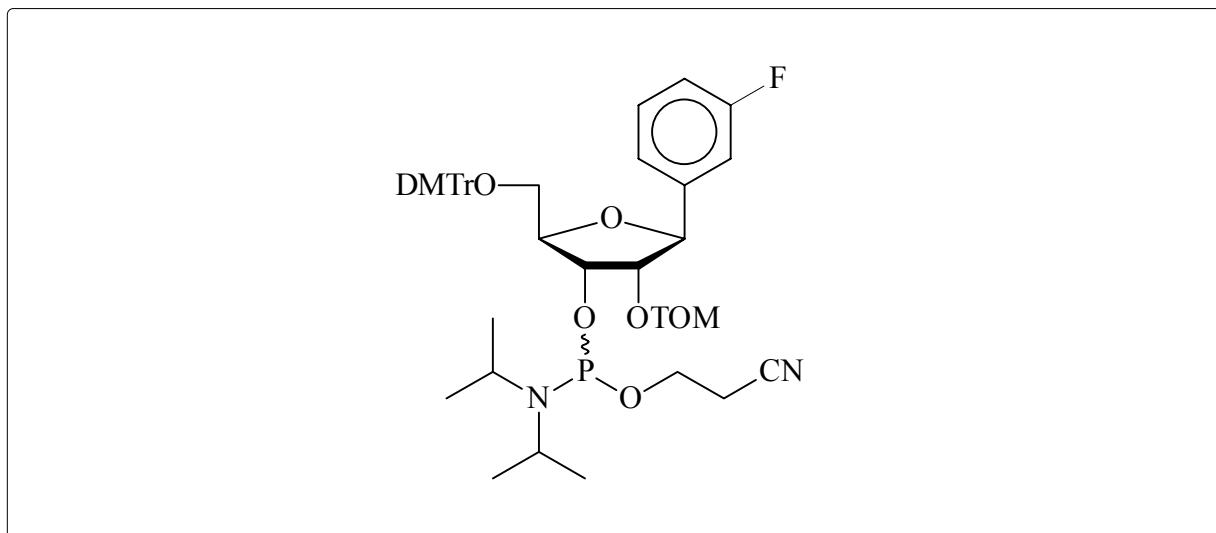
DC: $R_f = 0,59$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d_6)
7.44 – 6.84 (m, 17H, H_{ar}); 5.25 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, 1'H); 4.94 (2d, $J = 5.1$ Hz, 2H, OCH_2O); 4.69 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, 2'-OH); 4.17 (m, 1H, 4'H); 4.05 (t, $J = 4.5$ Hz, 1H, 3'H); 3.94 (m, 1H, 2'H); 3.73 (s, 6H, OCH_3); 3.21 (m, 2H, 5'H); 0.96 (m, 21H, isopropyl)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO-d_6)
162.24 (d, $J = 238.5$ Hz, C3); 158.07 (DMTr); 144.90 (DMTr); 143.84 (d, $J = 7.5$ Hz, C1); 135.52 (DMTr); 135.43 (DMTr); 130.07 (d, $J = 8.3$ Hz, C5); 129.11 (DMTr); 127.72 (DMTr); 127.64 (DMTr); 126.64 (DMTr); 122.02 (C6); 114.16 (d, $J = 20.5$ Hz, C2); 113.07 (DMTr); 112.42 (d, $J = 18.2$ Hz, C4); 88.75 (C1'); 85.43 (DMTr); 81.98 (C4'); 77.03 (C2'); 76.30 (C3'); 63.92 (C5'); 54.95 (OCH_3); 17.60 (OCH_2O); 12.05 (CH_3 -isopropyl); 11.28 (CH-isopropyl)

ESI(-): m/z 761,6 ($\text{M-H}+2\text{Na}^-$)

3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-1'-(3-fluorphenyl)-2'-O-triisopropylsilyloxymethyl- β -D-ribofuranose 145



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

90 mg (0,13 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-triisopropylsilyloxymethyl-1'-desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose 143 wurden in 5 ml abs. Acetonitril gelöst und mit 165 μl (1,2 mmol) *sym.* Collidin und 5 μl (0,07 mmol) 1-Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und 42 μl (0,19 mmol) 2-Cyanethyldiisopropylchlorphosphoramidit 66 zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde 15 Minuten bei 0°C und 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml gesättigter wäßriger NaHCO₃-Lösung gequencht. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan/Ethylacetat 4:1. Das Produkt (ein Gemisch zweier Diastereomere) wurde als gelbliches Öl erhalten.

Ausbeute: 75 mg (65,2 %)

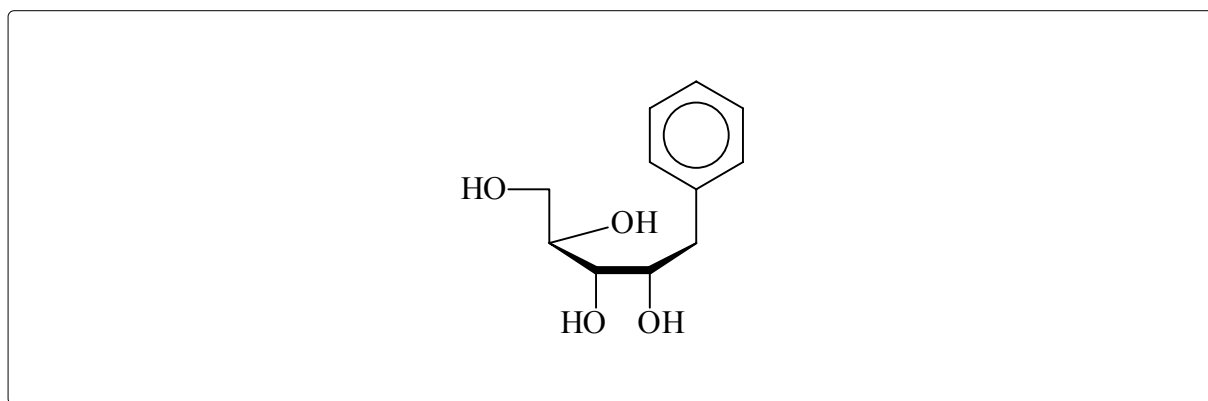
DC: R_f = 0,28; 0,31 (*n*-Hexan/Ethylacetat 4:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (270 MHz, DMSO- d_6)
 7.50 – 6.78 (m, 34H, H_{ar}); 4.90 (m, 6H, 1'H, OCH₂O); 4.30 (m, 4H, 2'H, 3'H);
 4.18 (m, 2H, 4'H); 3.79, 3.78 (s, 12H, OCH₃); 3.42 (m, 8H, 5'H, CH₂CN); 2.64
 (m, 4H, OCH₂); 1.15 (m, 12H, CH(CH₃)₂); 0.96 (m, 42H, isopropyl)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃)
 150.61 und 150.28 (Verhältnis 1 : 1,4)

ESI(+): m/z 917,7 (M+H)⁺

1-Desoxy-1-phenyl-D-ribitol 95



212,2 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

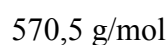
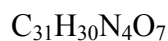
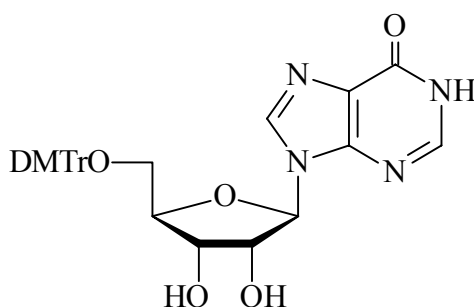
1,5 g (3,1 mmol) 2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose **94** wurden in 25 ml abs. Ethanol gelöst und mit 12,5 ml Cyclohexen und 300 mg Palladiumhydroxid (20%) auf Kohle versetzt. Die Reaktionslösung wurde 5 Stunden unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde der Palladium-Katalysator über Celite abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenechlorid/Methanol 9:1. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0,44 g (67,6 %)

DC: $R_f = 0,21$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1)

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO- d_6)
7.12 (m, 5H, H_{ar}); 4.63 (m, 2H, 3'-OH, 4'-OH); 4.48 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H, 2'-OH); 4.38 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H, 5'-OH); 3.75 (m, 1H, 2'H); 3.57 (m, 2H, 4'H, 5'H); 3.37 (m, 2H, 3'H, 5'H); 2.90 (m, 1H, 1'H); 2.53 (m, 1H, 1'H)
- $^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO- d_6)
140.46 (C_{ar}); 129.47 (C_{ar}); 127.71 (C_{ar}); 125.35 (C_{ar}); 74.49 ($C3'$); 72.99 ($C2'$); 72.84 ($C4'$); 63.26 ($C5'$); 38.19 ($C1'$)
- ESI(-): m/z 211,1 ($M-H$)⁻

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-inosin 128



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

2,68 g (10 mmol) Inosin 127 wurden in 100 ml abs. DMF und 20 ml abs. Pyridin gelöst. Hierzu wurden über 3 Stunden 4,4 g (13 mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid in 20 ml abs. Pyridin zugetropft und 21 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurden 1,4 g (20,5 mmol) Imidazol zugesetzt und das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum bei kleiner 40°C abdestilliert. Das verbleibende gelbe Öl wurde mit 5 %iger wäßriger NaHCO_3 -Lösung versetzt und dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Die

Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 9:1. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 5,09 g (89,2 %)

DC: $R_f = 0,22$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d_6)

12.38 (s, 1H, N-H); 8.20 (s, 1H, 8H); 8.00 (s, 1H, 2H); 7.38 – 6.81 (m, 13H, H_{ar}); 5.91 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H, 1'H); 5.57 (s br, 1H, 2'-OH); 5.21 (s br, 1H, 3'-OH); 4.58 (t, $J = 4.9$ Hz, 1H, 2'H); 4.23 (t, $J = 5.1$ Hz, 1H, 3'H); 4.06 (m, 1H, 4'H); 3.73 (s, 6H, OCH_3); 3.20 (m, 2H, 5'H)

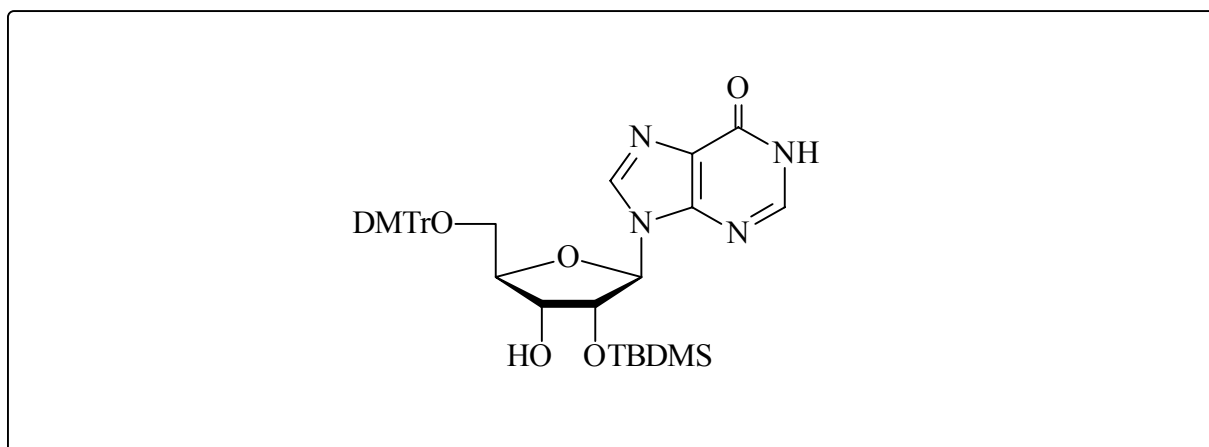
$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (67,9 MHz, DMSO-d_6)

158.00 (DMTr); 156.48 (C6); 148.10 (C4); 145.65 (C2); 144.75 (DMTr); 138.71 (C8); 135.49 (DMTr); 135.46 (DMTr); 129.62 (DMTr); 127.67 (DMTr); 126.57 (DMTr); 124.55 (C-5); 113.06 (DMTr); 87.94 (C1'); 85.45 (DMTr); 83.17 (C4'); 73.32 (C2'); 70.23 (C3'); 63.70 (C5'); 54.95 (OCH_3)

ESI(-): m/z 569,4 (M-H)⁻

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-tert.-butyldimethylsilyl-inosin

129



$\text{C}_{37}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}_7\text{Si}$

684,86 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

4,82 g (8,44 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-inosin **128** wurden in 50 ml eines 1:1 Gemisches aus THF/Pyridin gelöst und mit 1,78 g (10,4 mmol) Silbernitrat und 12,2 ml (12,2 mmol) einer 1 M *tert.*-Butyldimethylsilylchlorid-Lösung in THF versetzt. Die Reaktionslösung wurde 22 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml einer gesättigten wässrigen NaHCO₃-Lösung gequenchet. Das entstandene Silberchlorid wurde über Celite abgetrennt und das Filtrat dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit Methylenchlorid/Isopropanol 95:5 als Elutionsmittel. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

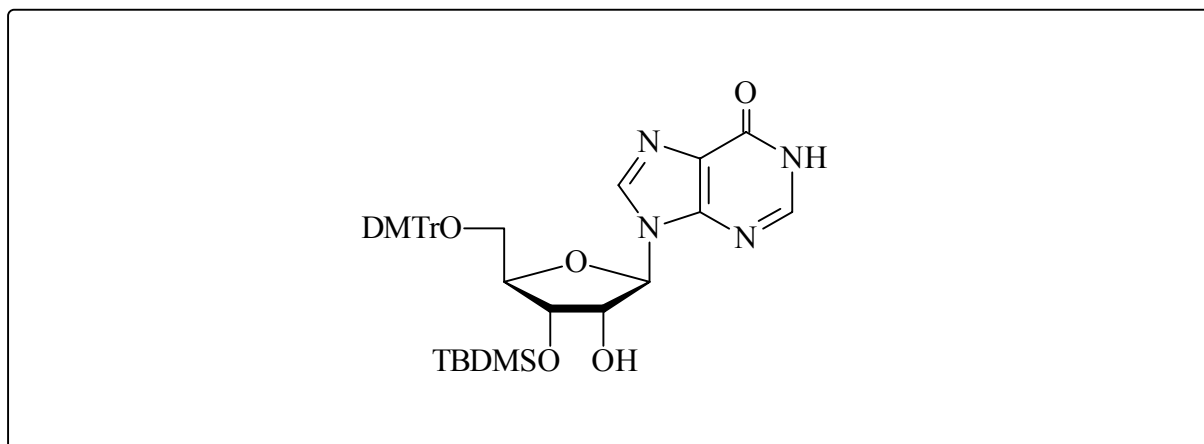
Ausbeute: 2,4 g (41,7 %)

DC: R_f = 0,41 (CH₂Cl₂/*i*PrOH 95:5)

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d₆)
12.38 (s, 1H, N-H); 8.21 (s, 1H, 8H); 7.99 (s, 1H, 2H); 7.41 – 6.84 (m, 13H, H_{ar}); 5.96 (d, J = 5.0 Hz, 1H, 1'H); 5.14 (d, J = 5.7 Hz, 1H, 3'-OH); 4.70 (t, J = 4.9 Hz, 1H, 2'H); 4.19 (m, 1H, 3'H); 4.13 (m, 1H, 4'H); 3.73 (s, 6H, OCH₃); 3.28 (m, 2H, 5'H); 0.76 (s, 9H, SiC(CH₃)₃); -0.02 (s, 3H, SiCH₃); -0.11 (s, 3H, SiCH₃)

¹³C-NMR: δ [ppm] (67,9 MHz, DMSO-d₆)
158.12 (DMTr); 156.54 (C6); 148.14 (C4); 145.75 (C2); 144.87 (DMTr); 138.67 (C8); 135.52 (DMTr); 135.42 (DMTr); 129.75 (DMTr); 128.31 (DMTr); 127.80 (DMTr); 127.70 (DMTr); 126.71 (DMTr); 124.65 (C5); 113.17 (DMTr); 87.90 (C1'); 85.61 (DMTr); 83.67 (C4'); 75.49 (C2'); 70.23 (C3'); 63.54 (C5'); 55.03 (OCH₃); 25.55 (SiC(CH₃)₃); 17.82 (SiC(CH₃)₃); -4.85 (SiCH₃); -5.32 (SiCH₃)

ESI(-): m/z 683,5 (M-H)⁻

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-inosin**130**C₃₇H₄₄N₄O₇Si

684,86 g/mol

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-inosin **130** entstand als Nebenprodukt bei der Darstellung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-inosin **129**.

Ausbeute: 1,43 g (24,7 %)

DC: R_f = 0,25 (CH₂Cl₂/*i*PrOH 95:5)

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d₆)

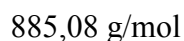
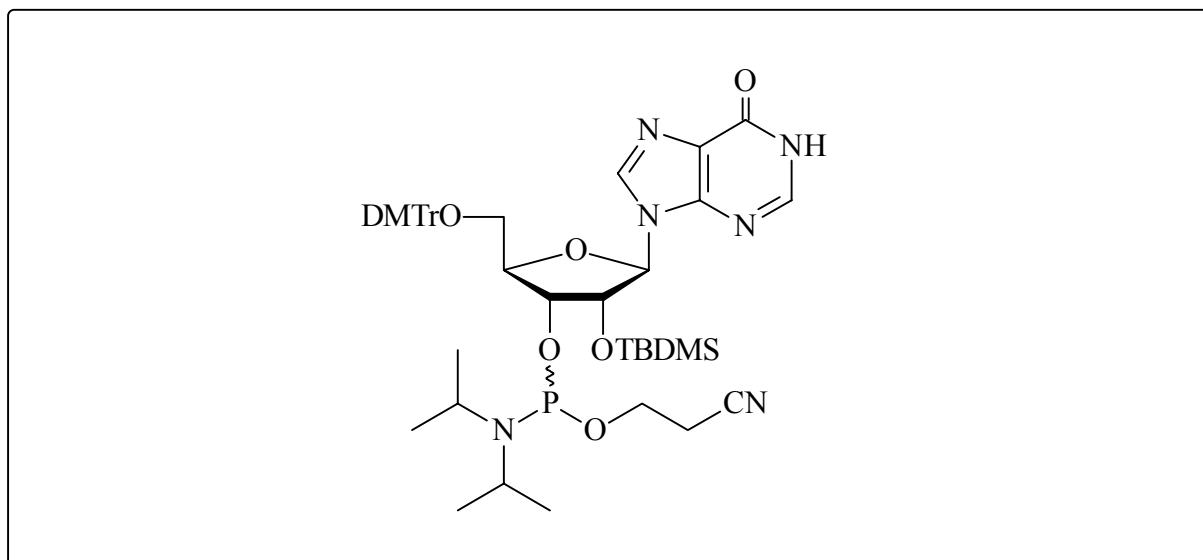
12.39 (s, 1H, N-H); 8.26 (s, 1H, 8H); 7.98 (s, 1H, 2H); 7.37 – 6.81 (m, 13H, H_{ar}); 5.89 (d, J = 5.3 Hz, 1H, 1'H); 5.42 (d, J = 6.1 Hz, 1H, 2'-OH); 4.69 (t, J = 5.3 Hz, 1H, 2'H); 4.40 (t, J = 4.6 Hz, 1H, 3'H); 4.02 (q, J = 5.9 Hz, 1H, 4'H); 3.73 (s, 6H, OCH₃); 3.33 (m, 2H, 5'H); 0.84 (s, 9H, SiC(CH₃)₃); 0.07 (s, 3H, SiCH₃); 0.02 (s, 3H, SiCH₃)

¹³C-NMR: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO-d₆)

158.13 (DMTr); 156.57 (C6); 148.18 (C4); 145.62 (C2); 144.74 (DMTr); 139.26 (C8); 135.50 (DMTr); 135.46 (DMTr); 129.70 (DMTr); 127.75 (DMTr); 127.69 (DMTr); 126.70 (DMTr); 124.76 (C5); 113.13 (DMTr); 87.93 (C1'); 85.71 (DMTr); 83.62 (C4'); 72.64 (C2'); 72.17 (C3'); 63.18 (C5'); 55.03 (OCH₃); 25.75 (SiC(CH₃)₃); 17.96 (SiC(CH₃)₃); -4.49 (SiCH₃); -5.11 (SiCH₃)

ESI(-): m/z 683,6 (M-H)⁻

3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropyl-phosphin)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-inosin 131



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

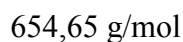
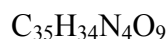
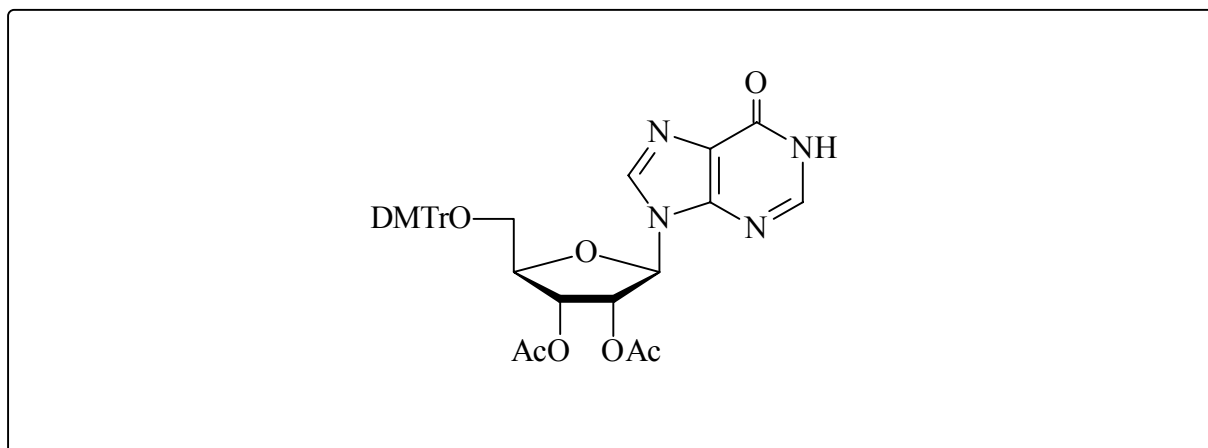
100 mg (0,15 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-inosin **129** wurden in 3 ml abs. THF gelöst und mit 900 µl (6,3 mmol) *sym.* Collidin und 7 µl (0,08 mmol) 1-Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und 84 µl (0,375 mmol) 2-Cyanethyldiisopropylchlorphosphoramidit **66** zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde 15 Minuten bei 0°C und 2,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml gesättigter wäßriger NaHCO₃-Lösung gequencht. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch pDC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 95:5. Das Produkt (ein Gemisch zweier Diastereomere) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 100 mg (77,5 %)

DC: R_f = 0,50 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5)

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
 12.68 (s, 2H, N-H); 8.06, 8.03 (s, 2H, 8H); 7.96, 7.95 (s, 2H, 2H); 7.48 – 6.78 (m, 26H, H_{ar}); 5.99, 5.96 (d, $J = 6.6$ Hz, $J = 6.4$ Hz, 2H, 1'H); 4.92 (m, 2H, 2'H); 4.36 (m, 4H, 3'H, 4'H); 3.78 (s, 12H, OCH_3); 3.45 (m, 8H, 5'H, CH_2CN); 2.65 (m, 4H, OCH_2); 1.12 (m, 12H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_3$); 0.78 (s, 18H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); -0.01, -0.02, -0.18 (SiCH_3)
- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
 151.78 und 149.57 (Verhältnis 1 : 3,2)
- ESI(+): m/z 885,6 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

2',3'-Di-*O*-acetyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-inosin 132



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

100 mg (0,18 mmol) 5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-inosin 128 wurden in 2 ml abs. Pyridin gelöst und mit 52 μl (0,55 mmol) Essigsäureanhydrid versetzt. Nach 19 Stunden rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung gequenchet. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol coevaporiert und durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 9:1 aufgereinigt. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 108 mg (93,9 %)

DC: $R_f = 0,49$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d_6)

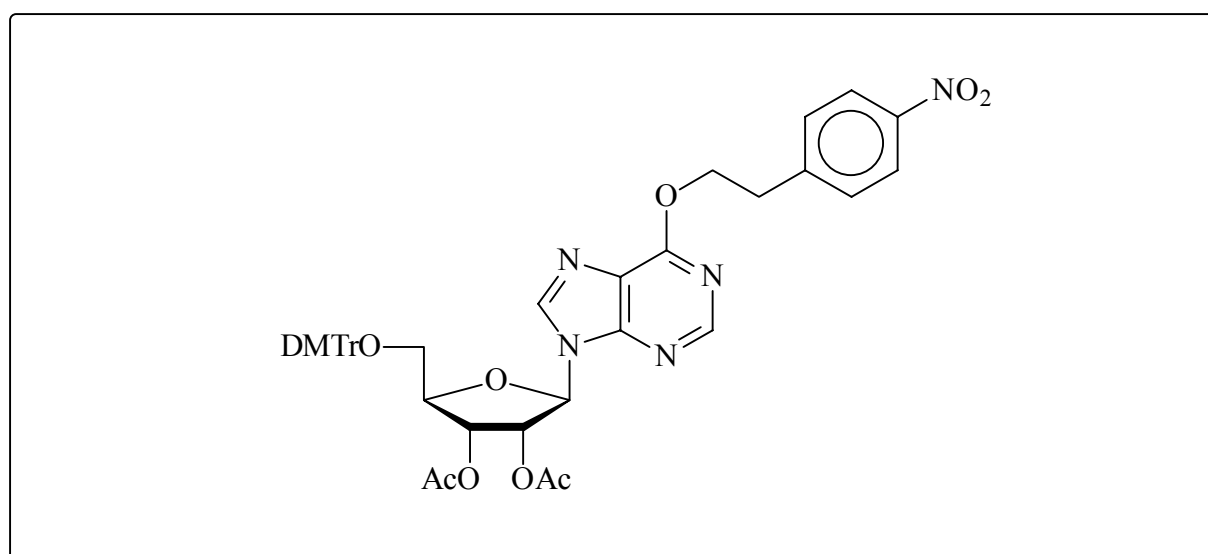
12.44 (s, 1H, N-H); 8.23 (s, 1H, 8H); 7.94 (s, 1H, 2H); 7.38 – 6.81 (m, 13H, H_{ar}); 6.20 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H, 1'H); 6.04 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, 2'H); 5.63 (dd, $J = 5.5$ Hz, $J = 5.0$ Hz, 1H, 3'H); 4.28 (m, 1H, 4'H); 3.73 (s, 6H, OCH_3); 3.31 (m, 2H, 5'H); 2.08 (s, 3H, CH_3); 2.04 (s, 3H, CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO-d_6)

169.32 (C=O acetyl); 169.27 (C=O acetyl); 158.09 (DMTr); 156.37 (C6); 147.90 (C4); 145.98 (C2); 144.53 (DMTr); 139.28 (C8); 135.23 (DMTr); 129.66 (DMTr); 129.62 (DMTr); 127.74 (DMTr); 127.62 (DMTr); 126.70 (DMTr); 124.85 (C5); 113.10 (DMTr); 85.78 (C1'); 85.64 (DMTr); 81.06 (C4'); 72.18 (C2'); 70.23 (C3'); 62.76 (C5'); 54.98 (OCH_3); 20.29 (CH_3 acetyl); 20.15 (CH_3 acetyl)

ESI(+): m/z 655,3 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

2',3'-Di-O-acetyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-6-O-(4-nitrophenylethyl)-inosin 133



$\text{C}_{43}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_{11}$

803,8 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

4,4 g (6,7 mmol) 2',3'-Di-*O*-acetyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-inosin **132** wurden in 35 ml abs. Dioxan gelöst und mit 1,69 g (6,6 mmol) *p*-Nitrophenylethanol, 2,65 g (10,1 mmol) Triphenylphosphin und 1,96 ml (6,6 mmol) Diisopropylazodicarboxylat versetzt. Nach 40 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 ml gesättigter wäßriger NaHCO₃-Lösung gequenchet. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 98:2. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 4,23 g (78,8 %)

DC: R_f = 0,68 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5)

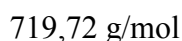
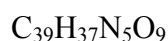
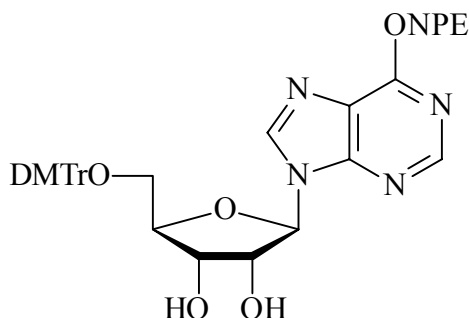
¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d₆)

8.50 (s, 1H, 8H); 8.42 (s, 1H, 2H); 8.18 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H_{ar}); 7.64 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H_{ar}); 7.35 – 6.78 (m, 13H, H_{ar}), 6.30 (d, J = 5.3 Hz, 1H, 1'H); 6.15 (t, J = 5.5 Hz, 1H, 2'H); 5.70 (t, J = 5.2 Hz, 1H, 3'H); 4.84 (m, 4H, CH₂); 4.31 (m, 1H, 4'H); 3.72 (s, 6H, OCH₃); 3.31 (m, 2H, 5'H); 2.09 (s, 3H, CH₃); 2.03 (s, 3H, CH₃)

¹³C-NMR: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO-d₆)

169.38 (C=O acetyl); 169.37 (C=O acetyl); 159.93 (C_{ar}); 158.09 (DMTr); 151.76 (C6); 151.53 (C_{ar}); 146.58 (C4); 146.29 (C2); 144.62 (DMTr); 143.10 (C8); 135.28 (DMTr); 135.20 (DMTr); 130.25 (C_{ar}); 129.72 (DMTr); 129.62 (DMTr); 127.76 (DMTr); 127.60 (DMTr); 123.44 (C5); 121.25 (C_{ar}); 113.10 (DMTr); 86.02 (C1'); 85.73 (DMTr); 81.10 (C4'); 71.93 (C2'); 70.31 (C3'); 67.82 (CH₂ npe); 66.35 (C5'); 54.99 (OCH₃); 34.20 (CH₂ npe); 20.36 (CH₃ acetyl); 20.20 (CH₃ acetyl)

ESI(+): m/z 804,5 (M+H)⁺

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-6-O-(4-nitrophenylethyl)-inosin 134

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

4,2 g (5,2 mmol) 2',3'-Di-*O*-acetyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-6-*O*-(4-nitrophenylethyl)-inosin **133** wurden in 100 ml NH₃-gesättigtem Methanol gelöst und 25 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 98:2. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 2,63 g (70,5 %)

DC: R_f = 0,31 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5)

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d₆)

8.49 (s, 1H, 8H); 8.48 (s, 1H, 2H); 8.17 (d, J = 8.0 Hz, 2H, H_{ar}); 7.63 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H_{ar}); 7.35 – 6.78 (m, 13H, H_{ar}), 6.01 (d, J = 4.4 Hz, 1H, 1'H); 5.55 (d, J = 5.4 Hz, 1H, 2'-OH); 5.23 (d, J = 5.5 Hz, 1H, 3'-OH); 4.84 (m, 4H, CH₂); 4.72 (q, J = 5.0 Hz, 1H, 2'H); 4.31 (q, J = 5.3 Hz, 1H, 3'H); 4.09 (m, 1H, 4'H); 3.72 (s, 6H, OCH₃); 3.30 (m, 2H, CH₂); 3.22 (m, 2H, 5'H)

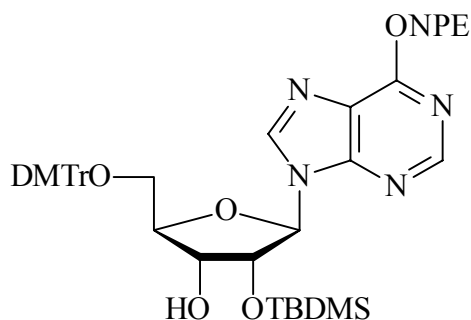
¹³C-NMR: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO-d₆)

159.75 (C_{ar}); 157.95 (DMTr); 151.79 (C6); 151.47 (C_{ar}); 146.46 (C4); 146.23 (C2); 144.73 (DMTr); 142.57 (C8); 135.45 (DMTr); 130.13 (C_{ar}); 129.57 (DMTr); 129.54 (DMTr); 127.60 (DMTr); 126.50 (DMTr); 123.40 (C5);

121.06 (C_{ar}); 113.00 (DMTr); 88.26 (C1'); 85.39 (DMTr); 83.19 (C4'); 72.89 (C2'); 70.23 (C3'); 66.15 (CH₂ npe); 63.54 (C5'); 54.90 (OCH₃); 34.17 (CH₂ npe)

ESI(-): m/z 764,4 (M-H+2 Na)⁻

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-6-O-(4-nitrophenylethyl)-inosin 135



C₄₅H₅₁N₅O₉Si

833,98 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

375 mg (0,52 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-6-O-(4-nitrophenylethyl)-inosin **134** wurden in 4 ml eines 1:1 Gemisches aus THF/Pyridin gelöst und mit 110 mg (0,65 mmol) Silbernitrat und 0,73 ml (0,73 mmol) einer 1 M *tert.*-Butyldimethylsilylchlorid-Lösung in THF versetzt. Die Reaktionslösung wurde 23 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml einer gesättigten wässrigen NaHCO₃-Lösung gequencht. Das entstandene Silberchlorid wurde über Celite abgetrennt und das Filtrat dreimal mit Methylenechlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenechlorid/Isopropanol 99:1. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 233 mg (53,6 %)

DC: $R_f = 0,44$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6)

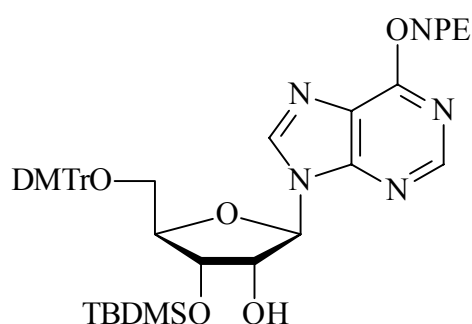
8.50 (s, 1H, 8H); 8.45 (s, 1H, 2H); 8.16 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_{ar}); 7.62 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_{ar}); 7.39 – 6.82 (m, 13H, H_{ar}); 6.03 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, 1'H); 5.17 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H, 3'-OH); 4.84 (m, 3H, 2'H, CH_2 npe); 4.25 (q, $J = 5.1$ Hz, 1H, 3'H); 4.12 (q, $J = 4.5$ Hz, 1H, 4'H); 3.72 (s, 6H, OCH_3); 3.29 (m, 4H, 5'H, CH_2 npe); 0.73 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); -0.06 (s, 3H, SiCH_3); -0.17 (s, 3H, SiCH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (100,6 MHz, DMSO-d_6)

159.80 (C_{ar}); 158.01 (DMTr); 151.71 (C6); 151.54 (C_{ar}); 146.51 (C4); 146.23 (C2); 144.82 (DMTr); 142.51 (C8); 135.44 (DMTr); 135.38 (DMTr); 130.21 (C_{ar}); 129.66 (DMTr); 127.71 (DMTr); 127.60 (DMTr); 126.61 (DMTr); 123.35 (C5); 121.08 (C_{ar}); 113.08 (DMTr); 88.20 ($\text{C1}'$); 85.57 (DMTr); 83.57 ($\text{C4}'$); 74.82 ($\text{C2}'$); 70.14 ($\text{C3}'$); 66.20 (CH_2 npe); 63.38 ($\text{C5}'$); 54.95 (OCH_3); 34.22 (CH_2 npe); 25.45 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 17.73 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); -4.92 (SiCH_3); -5.39 (SiCH_3)

ESI(-): m/z 832,5 (M-H^-)

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-6-O-(4-nitro-phenylethyl)-inosin 136



$\text{C}_{45}\text{H}_{51}\text{N}_5\text{O}_9\text{Si}$

833,98 g/mol

5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 3'- *O*- *tert.*-butyldimethylsilyl- 6- *O*-(4-nitro-phenylethyl)-inosin **136** entstand als Nebenprodukt bei der Darstellung von 5'-*O*-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 2'- *O*- *tert.*- butyldimethylsilyl- 6- *O*-(4-nitrophenylethyl)-inosin **135**.

Ausbeute: 140 mg (32,2 %)

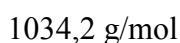
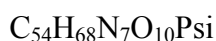
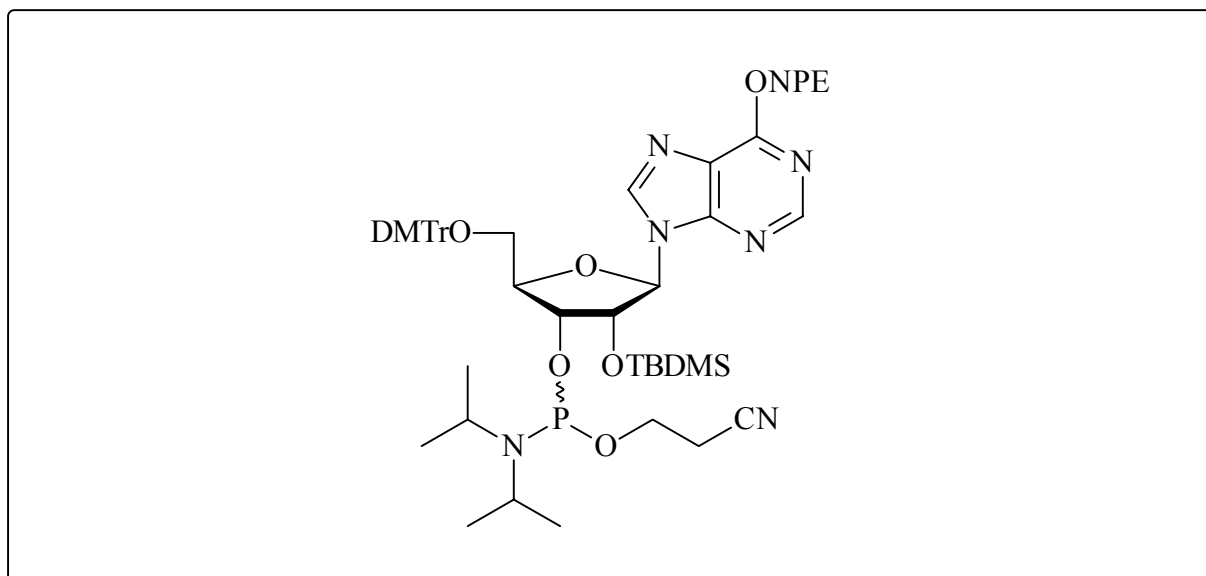
DC: $R_f = 0,35$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6)
8.56 (s, 1H, 8H); 8.46 (s, 1H, 2H); 8.15 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H_{ar}); 7.60 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H_{ar}); 7.34 – 6.80 (m, 13H, H_{ar}); 6.00 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H, 1'H); 5.43 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H, 2'-OH); 4.87 (q, $J = 5.4$ Hz, 1H, 2'H); 4.83 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, CH_2 npe); 4.51 (t, $J = 4.6$ Hz, 1H, 3'H); 4.06 (q, $J = 4.5$ Hz, 1H, 4'H); 3.71 (s, 6H, OCH_3); 3.36 (m, 1H, 5'H); 3.29 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, CH_2 npe); 3.14 (m, 1H, 5'H); 0.84 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 0.08 (s, 3H, SiCH_3); 0.04 (s, 3H, SiCH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (100,6 MHz, DMSO-d_6)
159.81 (C_{ar}); 158.04 (DMTr); 151.75 (C6); 151.41 (C_{ar}); 146.49 (C4); 146.23 (C2); 144.70 (DMTr); 143.24 (C8); 135.45 (DMTr); 135.38 (DMTr); 130.16 (C_{ar}); 129.62 (DMTr); 129.57 (DMTr); 127.66 (DMTr); 127.58 (DMTr); 126.59 (DMTr); 123.35 (C5); 121.23 (C_{ar}); 113.04 (DMTr); 88.34 (C1'); 85.56 (DMTr); 83.50 (C4'); 72.10 (C2'); 72.05 (C3'); 66.20 (CH_2 npe); 63.01 (C5'); 54.94 (OCH_3); 34.19 (CH_2 npe); 25.69 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 17.92 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); -4.55 (SiCH_3); -5.16 (SiCH_3)

ESI(-): m/z 832,4 (M-H)⁻

3'-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-6-O-(4-nitrophenylethyl)-inosin 137



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

200 mg (0,24 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-6-O-(4-nitrophenylethyl)-inosin 135 wurden in 10 ml abs. Acetonitril gelöst und mit 530 μl (4 mmol) *sym.* Collidin und 14 μl (0,18 mmol) 1-Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und 130 μl (0,58 mmol) 2-Cyanethyl-diisopropylchlorphosphoramidit 66 zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde 15 Minuten bei 0°C und 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml gesättigter wäßriger NaHCO₃-Lösung gequenchet. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch pDC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 99:1. Das Produkt (ein Gemisch zweier Diastereomere) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 196 mg (79,0 %)

DC: R_f = 0,65; 0,75 (CH₂Cl₂/MeOH 99:1)

- $^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
8.42, 8.40 (s, 2H, 8H); 8.17, 8.14 (s, 1H, 2H); 8.17, 8.16 (d, $J = 8.8$ Hz, $J = 8.7$ Hz, 4H, H_{ar}); 7.50, 7.50 (d, $J = 8.8$ Hz, $J = 8.6$ Hz, 4H, H_{ar}); 7.51 – 6.79 (m, 26H, H_{ar}); 6.07, 6.02 (d, $J = 6.3$ Hz, $J = 5.5$ Hz, 2H, 1'H); 5.05, 4.99 (t, $J = 5.5$ Hz, $J = 5.3$ Hz, 2H, 2'H); 4.43 – 4.26 (m, 4H, 3'H, 4'H); 3.79, 3.78 (s, 12H, OCH_3); 3.39 – 3.28 (m, 4H, 5'H); 2.49, 2.30 (m, 4H, OCH_2); 1.19 (m, 12H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 0.83, 0.75 (s, 18H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); -0.02, -0.03, -0.18, -0.23 (s, 12H, SiCH_3)
- $^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
151.59 und 149.58 (Verhältnis 1 : 1,6)
- ESI(-): m/z 1034,6 (M-H^-)

11.4 Synthese der Oligonukleotide

Die RNA Synthesen wurden im 1 μmol Maßstab an einem Synthesizer der Firma Eppendorf Biotronik (Modell D300+) bzw. einem Synthesizer der Firma PerSeptive Biosystems (Modell Expedite 8905) durchgeführt. Es wurden 500 Å CPG-Träger von PerSeptive eingesetzt. Die Standardkupplungszeit von 10 min. für RNA-Bausteine wurde für alle modifizierten Nukleotide übernommen. Die Kupplungsausbeuten waren denen der Standard-Phosphoramidite mit Ausnahme des Benzimidazol-Bausteines **77** vergleichbar. Die RNA-Amiditbausteine wurden in Konzentrationen von 0,1 M eingesetzt. Nach beendeter Synthese wurde die Dimethoxytritylgruppe vom letzten Baustein abgespalten. Die Oligonukleotide wurden bei 55°C über Nacht durch Behandlung mit konz. Ammoniak/Methanol 3:1 entschützt und vom Träger abgespalten. Das Trägermaterial wurde durch Sterilfiltration über Nalgene 0,2 μm Spritzenfilter mit Zelluloseacetatmembran abgetrennt und das Filtrat in einem SpeedVac Konzentrator bis zur Trockne eingengt. Danach wurde 1 ml Triethylamin-Trihydrofluorid zugesetzt. Nach 24 h Einwirkdauer bei RT waren die 2'-TBDMS Schutzgruppen abgespalten. Es wurden 3 ml auf -20°C vorgekühltes *n*-Butanol zugegeben und für 3 h bei -20°C ausgefällt. Anschließend wurde bei 12000 rpm für 15 min. zentrifugiert. Nach dieser Zeit wurde der Überstand vorsichtig abdekantiert und das erhaltene Pellet in 150 μl mit Diethylpyrocarbonat vorbehandeltem Wasser und 150 μl 1-Methyl-2-pyrrolidinon gelöst. Es folgte die Aufreinigung mittels Anionenaustausch-HPLC.

11.5 Aufreinigung und Analytik der Oligonukleotide

11.5.1 Aufreinigung durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die RNA Oligonukleotide wurden im „Trityl off“-Modus synthetisiert und mittels Anionenaustausch-HPLC aufgereinigt. Dazu stand eine HPLC Anlage von JASCO, bestehend aus einer PU-980 Pumpe, LG-980-02-Mixer, UV-970 Detektor, Säulenofen und Computer zur Verfügung. Als analytische Säule wurde eine Dionex NucleoPac™ PA100 Säule (250 × 4 mm) mit einer Flußrate von 1,5 ml/min. eingesetzt. Als präparative Säule wurde eine Dionex NucleoPac™ PA100 Säule (250 × 9 mm) mit einer Flußrate von 5 ml/min. benutzt. Es wurden lineare Gradienten von 0% bis 70% Puffer B in A (in 40 min.) verwendet (Puffer A: DEPC-Wasser (pH 8,0), Puffer B: 1 M LiCl (pH 8,0)). Die UV-Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Nach erfolgter Trennung wurden die Produktfraktionen über Sephadex PD 10 Säulen mit G25 Material entsalzt. Schließlich wurde die Menge an Oligonukleotid durch Bestimmung der OD₂₆₀-Einheiten ermittelt. Das Produkt wurde durch MALDI-Massenspektrometrie auf seine Reinheit untersucht.

11.5.2 Quantifizierung der Menge an Oligonukleotid

Das aufgereinigte und entsalzte Oligonukleotid wurde in 1,0 ml dest. Wasser gelöst (Wasser mit DEPC behandelt !). Es wurden 10 µl entnommen und in einer 10 mm Quarzküvette mit dest. Wasser (Wasser mit DEPC behandelt) auf 1000 µl aufgefüllt. Die Extinktion (engl.: absorbance) oder optische Dichte bei 260 nm wurde gemessen. Der am Gerät angezeigte Wert wurde mit dem Verdünnungsfaktor (100) multipliziert. Das Ergebnis ist die Ausbeute in OD₂₆₀-Einheiten. Diese läßt sich mittels des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ in die Konzentration umrechnen.

11.5.3 Bestimmung der Extinktionskoeffizienten von Oligonukleotiden

Der molare Extinktionskoeffizient von Oligonukleotiden kann aus der Summe der bekannten Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nukleotide abgeschätzt werden. Nach Eckstein (Eckstein, 1991) gilt näherungsweise der folgende Zusammenhang:

$$[11-1] \quad \epsilon = (8,8 \cdot nT + 7,3 \cdot nC + 11,7 \cdot nG + 15,4 \cdot nA) \cdot 0,9 [1000 \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}]$$

Hierbei ist für n die Häufigkeit der jeweiligen Basen im Oligonukleotid einzusetzen. Der Faktor 0,9 berücksichtigt die verringerte UV-Extinktion aufgrund von Basenstapelungswechselwirkungen im Einzelstrang.

Eine exaktere Methode zur Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten ist von Puglisi und Tinoco (Tinoco, 1989) sowie Gray (Gray *et al.*, 1995) angegeben worden. Dabei wird die Wechselwirkung der Chromophore mit ihren nächsten Nachbarn berücksichtigt. Diese bewirkt, daß der Extinktionskoeffizient eines Dinukleotids nicht der Summe der Einzelnukleotide entspricht, sondern daß es sequenzspezifische Abweichungen gibt. Die Zahlenwerte für RNA sind in Tabelle 11.1 angegeben. Der Extinktionskoeffizient ergibt sich aus zwei mal der Summe aller im Oligonukleotid vorkommenden Dimere minus der Summe aller Mononukleotide ohne die beiden endständigen Nukleotide (Gl. [11-2]):

$$[11-2] \quad \varepsilon(\text{ACGU} \dots) = 2 [\varepsilon(\text{AC}) + \varepsilon(\text{CG}) + \varepsilon(\text{GU}) + \dots] - [\varepsilon(\text{C}) + \varepsilon(\text{G}) + \varepsilon(\text{U}) + \dots]$$

| Baustein | RNA | Baustein | RNA |
|----------|-------|----------|-------|
| A | 15,34 | CG | 9,39 |
| C | 7,60 | CU | 8,37 |
| G | 12,16 | GA | 12,92 |
| U | 10,21 | GC | 9,19 |
| AA | 13,65 | GG | 11,43 |
| AC | 10,67 | GU | 10,96 |
| AG | 12,79 | UA | 12,52 |
| AU | 12,14 | UC | 8,90 |
| CA | 10,67 | UG | 10,40 |
| CC | 7,52 | UU | 10,11 |

Tabelle 11.1: Extinktionskoeffizienten für monomere und dimere Nukleotide bei 260 nm nach Puglisi und Tinoco (1989) sowie Gray *et al.* (1995). Die Werte gelten für 25°C, pH 7,0 und eine Ionenstärke von 0,1.

Da die Extinktionskoeffizienten für die Purin- und Pyrimidin-analogen Bausteine nicht bekannt sind, wurde in diesen Fällen mit den Werten für Guanosin bzw. Uridin gerechnet.

Die Konzentration der Oligonukleotid-Lösung folgt aus dem Lambert-Beerschen-Gesetz, wobei c die Konzentration in mol/l und d die Schichtdicke der Küvette in cm sowie OD_{260} die dimensionslose Extinktion bei 260 nm bedeuten (Gl. [11-3] und [11-4]):

$$[11-3] \quad OD_{260} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

$$[11-4] \quad c = OD_{260} / \varepsilon \cdot d$$

11.6 Aufnahme der UV-Schmelzkurven

Die UV-Schmelzkurven wurden in einem Zweistrahl UV-/VIS-Spektralphotometer Cary 1 der Firma Varian mit Peltier-gesteuertem, thermostatisierbarem Küvettenhalter gemessen. Als Puffer diente ein Phosphat-Puffer der Zusammensetzung 140 mM Natriumchlorid, 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat und 10 mM Natriumdihydrogenphosphat. Die angesetzten Lösungen wurden durch Zugabe der entsprechenden Menge an Salzsäure auf den pH-Wert 7,0 eingestellt. Das verwendete Wasser war mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) vorbehandelt. Dazu wurde eine 0,1 %ige Lösung angesetzt, über Nacht bei RT stehen gelassen und anschließend 30 Minuten autoklaviert.

Zur Messung wurde eine Referenzküvette der Schichtdicke 1 cm mit 1 ml des Puffers gefüllt und in den Referenzstrahl gestellt. Die Probenküvette gleicher Schichtdicke wurde mit dem gleichen Puffer befüllt und nach Einbringen in den Strahlengang wurde ein Nullabgleich bei 350 nm durchgeführt. Nun wurde eine Konzentration von je 2 μ M der beiden Stränge, die den Duplex bilden in die Probenküvette pipettiert. Die notwendigen Konzentrationen wurden nach Gl. [11-3] in OD_{260} -Einheiten umgerechnet. Dazu wurde für ε der berechnete Extinktionskoeffizient des Einzelstranges, für c die gewünschte Konzentration von 2 μ M und für die Schichtdicke d 1 cm eingesetzt. Die Oligonukleotide lagen als Stammlösungen in einem bekannten Volumen destilliertem Wasser vor.

Vor Beginn der Messung wurden die Küvetten mit Teflon-Deckeln fest verschlossen, um ein Verdampfen des Lösungsmittels während der Messung zu verhindern. Die Messung begann mit einer Denaturierung. Dazu wurden die Küvetten für 10 min. auf 80°C erhitzt und anschließend mit 5°C/min. renaturiert (Programm „denat.adl“). Es wurde auf die Starttemperatur (0°C bzw. 10°C) abgekühlt und die Temperatur für 10 Minuten gehalten.. Die nun folgende Aufnahme der Schmelzkurve bei 260 und 274 nm (Nullabgleich bei 350 nm) wurde mit einer Heizrate von 0,5°C/min. durchgeführt. Alle 30 Sekunden wurde ein Datenpunkt registriert (Programm „dna2hblk.adl“). Als Temperatur wurde die Temperatur des Probenblocks des Spektrometers angegeben. Dies ist ausreichend exakt (Varian, 1998).

Nach beendeter Messung wurden die Daten automatisch aufgezeichnet und die Probe auf 20°C abgekühlt. Alle Messungen wurden mindestens als Doppelbestimmungen durchgeführt. Durch die Messung bei zwei verschiedenen Wellenlängen standen so zumindest vier Meßreihen je Duplex zur Verfügung. Die Auswertung der Kurven bezüglich T_m und thermodynamischer Daten ergab keine signifikanten Unterschiede als Funktion der Wellenlänge (260 oder 274 nm). Der T_m wurde sowohl aus $\alpha = f(T)$ Kurven als auch aus der gefitteten Kurve ermittelt. Die Übereinstimmung war gut. Für alle Messungen unterhalb 20°C wurde die Küvettenkammer mit Stickstoff gespült, um Kondensation der Luftfeuchtigkeit auf den Küvettenoberflächen zu vermeiden.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Abbildungen der gemessenen Schmelzkurven wurden die Extinktionswerte normiert. Dies geschieht mit Hilfe der folgenden Rechenvorschrift:

$$[11-5] \quad OD_{\text{normiert}} = (OD(T) - OD_A) / (OD_E - OD_A)$$

Dabei sind OD_A der Anfangs- und OD_E der Endwert der Extinktion.

11.7 CD-Spektroskopie der Oligonukleotide

Die CD-Spektren wurden mit einem JASCO J-710 Spektropolarimeter aufgenommen, das mit einem thermostatisierten (Neslab RTE-100) Küvettenhalter ausgerüstet war. Dazu wurden die gleichen Proben, die zuvor in der UV-Spektroskopie untersucht worden waren, eingesetzt. Als Auswerte-Software stand das Programm Standard Analysis, Version 1.33 (1995) von JASCO zur Verfügung. Zur Messung der wellenlängenabhängigen Spektren wurden jeweils fünf Spektren im Bereich von 350 nm bis 200 nm akkumuliert. Folgende Geräteeinstellungen wurden verwendet: resolution 0,2 nm, scan speed 50 nm/min., response 1 sec. und band width 1,0 nm. Von den so aufgenommenen Spektren wurde immer das bei gleicher Temperatur registrierte Spektrum des Puffers subtrahiert. Anschließend wurden die erhaltenen Kurven per Software geglättet (Befehl: noise reduction).

11.8 Bestimmung der Verteilungskoeffizienten

Zur Bestimmung der Verteilungskoeffizienten wurden die Nukleoside in Wasser gelöst, so daß eine Extinktion der Lösungen zwischen 0,8 und 1,2 erreicht wurde. Von diesen Lösungen wurden jeweils 2 ml mit dem gleichen Volumen 1-Octanol versetzt und für 10 min. intensiv durchmischt. Anschließend wurden die Proben für 10 min. bei 10 000 rpm zentrifugiert und die zwei Phasen getrennt. Es wurden die Extinktionen der wäßrigen und der Octanol Phasen am UV-Spektrometer gemessen. Die Verteilungskoeffizienten $\log P$ wurden nach Gleichung [11-6] berechnet.

$$[11-6] \quad \log P = E_{\text{Octanol}} / E_{\text{Wasser}}$$

11.9 Bestimmung der HPLC-Retentionszeiten

Zur Bestimmung der Retentionszeiten wurden die für die Bestimmung der Verteilungskoeffizienten verwendeten Lösungen der ungeschützten Nukleoside eingesetzt. Die Retentionszeiten wurden auf einer HPLC Anlage von JASCO, bestehend aus einer PU-980 Pumpe, LG-980-02-Mixer, UV-970 Detektor, Säulenofen und Computer bestimmt. Als analytische Säule wurde eine RP-18 (5 μm) Säule der Firma Merck (LiChrospher EcoCART 125-3, Nr. 647318) mit einer Flußrate von 0,6 ml/min. eingesetzt. Als Elutionsmittel wurde 5% Acetonitril in Wasser verwendet. Die UV-Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm.

12 Literaturverzeichnis

Adams, M. D. *et al.*; The genome sequence of *Drosophila melanogaster*, *Science*, **2000**, 287, 2185-2195

Albright, J.D.; Goldman, L.; Dimethyl sulfoxid-acid anhydride mixtures for the oxidation of alcohols, *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, 89, 2416-2423

Almond, J.; Pattison, J.; Human BSE, *Nature*, **1997**, 389, 437-440

Antolic, S.; Kojic-Prodic, B.; Tomic, S.; Nigovic, B.; Magnus, V.; Cohen, J. D.; Structural studies on monofluorinated derivatives of the Phytohormone indole-3-acetic acid, *Acta Cryst.* **1996**, B52, 651-661

Avery, O.T.; MacLeod, C.M.; McCarty M.; Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III, *J. Exp. Med.*, **1944**, 79, 137-158

Bahr, U.; Karas, M.; Hillenkamp, F.; Analysis of biopolymers by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry, *Fres. J. Anal. Chem.*, **1994**, 348, 783-791

Balzarini, J.; Baba, M.; Pauwels, R.; Herdewijn, P.; De Clercq, E.; Anti-retrovirus activity of 3'-fluoro- and 3'-azido-substituted pyrimidine 2',3'-dideoxynucleoside analogues, *Biochem. Pharmacol.*, **1988**, 37, 2847-2856

Balzarini, J.; Cools, M.; DeClercq, E.; Estimation of the lipophilicity of anti-HIV nucleoside analogues by determination of the partition coefficient and retention time on a Lichrospher 60 RP-8 HPLC column, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **1989**, 158, 413-422

Barker, R.; Fletcher, H.G. Jr.; 2,3,5-Tri-*O*-benzyl-D-ribosyl and –L-arabinosyl bromides, *J. Org. Chem.*, **1969**, *34*, 384-389

Bats, J.W.; Parsch, J.; Engels, J.W.; 1-Deoxy-1-(3-fluorophenyl)- β -D-ribofuranose, *Acta Cryst. C*, **1999**, *55*, IUC9900070

Bats, J.W.; Parsch, J.; Engels, J.W.; 1-Deoxy-1-(2-fluorophenyl)- β -D-ribofuranose, *Acta Cryst. C*, **1999a**, *55*, IUC9900069

Bats, J.W.; Parsch, J.; Engels, J.W.; 1-Deoxy-1-(4-fluorophenyl)- β -D-ribofuranose, its hemihydrate, and 1-deoxy-1-(2,4-difluorophenyl)- β -D-ribofuranose: Structural evidence for intermolecular C-H \cdots F-C interactions, *Acta Cryst. C*, **2000**, *56*, 201-205

Beaucage, S.L.; Caruthers, M.H.; Deoxynucleoside phosphoramidites – a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis, *Tetrahedron Lett.*, **1981**, *22*, 1859-1862

Beaucage, S.L.; Iyer, R.P.; Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach, *Tetrahedron*, **1992**, *48*, 2223-2311

Beaucage, S.L.; Iyer, R.P.; The synthesis of modified oligonucleotides by phosphoramidite approach and their applications, *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 6123-6194

Beijer, B.; Sulston, I.; Sproat, B.S.; Rider, P.; Lamond, A.I.; Neuner, R.; Synthesis and applications of oligoribonucleotides with selected 2'-*O*-methylation using the 2'-*O*-[1-(2-fluorophenyl)-4-methoxypiperidin-4-yl] protecting group, *Nucleic Acids Res.*, **1990**, *18*, 5143-5151

Berger, M.; Wu, Y.; Ogawa, A.K.; McMinn, D.L.; Schultz, P.G.; Romesberg, F.E.; Universal bases for hybridisation, replication and chain termination, *Nucleic Acids Res.*, **2000**, *28*, 2911-2914

Bergstrom, D.E.; Ruth, J.L.; Reddy, P.A.; De Clercq, E.; Synthesis of (E)-5-(3,3,3-trifluoro-1-propenyl)-2'-deoxyuridine and related analogues: Potent and unusually selective antiviral

activity of (E)-5-(3,3,3-trifluoro-1-propenyl)-2'-deoxyuridine against herpes simplex virus typ 1, *J. Med. Chem.*, **1984**, 27, 279-284

Bergstrom, D.E.; Swartling, D.J.; Fluorine substituted analogs of nucleic acid components, *Mol. Struct. Energ.*, **1988**, 8, 259-308

Bergstrom, D.E.; Zhang, P.M.; Toma, P.H.; Andrews, P.C.; Nichols, R.; Synthesis, structure and deoxyribonucleic acid sequencing with a universal base: 1-(2'-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-3-nitropyrrrole, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 1201-1209

Bergstrom, D.E.; Zhang, P.M.; Johnson, W.T.; Design and synthesis of heterocyclic carboxamides as natural nucleic-acid base mimics, *Nucleosides Nucleotides*, **1996**, 15, 59-68

Berner, S.; Mühlegger, K.; Seliger, H.; Studies on the role of tetrazole in the activation of phosphoramidites, *Nucleic Acids Res.*, **1989**, 17, 853-864

Blackburn, G.M.; Phosphonates as analogs of biological phosphates, *Chem. Ind. (London)*, **1981**, 134-138

Blackburn, G.M.; Perrée, T.D.; Rashid, A.; Bisbal, C.; Lebleu, B.; Isosteric and isopolar analogs of nucleotides, *Chemica Scripta*, **1986**, 26, 21-24

Blackburn, G.M.; Gait, M.J.; Nucleic acids in chemistry and biology, 2nd edition, Oxford University Press, Oxford New York Tokyo, **1996**

Boenigk, D.; Mootz, D.; Fluorides and fluoro acids. Part 18. The system pyridine-hydrogen fluoride at low temperatures. Formation and crystal structures of solid complexes with very strong NHF and FHF hydrogen bonding, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 2135-2139

Bonchev, D.; Cremaschi, P.; C-H Group as proton donor by formation of a weak hydrogen bond, *Theor. Chim. Acta*, **1974**, 35, 69-80

Bragg, W.H.; Bragg, W.C.; The reflection of X-rays by crystals, *Proc. Roy. Soc. London*, **1913**, (A) 88, 428-438

Brahms, J.; Optical activity and the conformation of polynucleotides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 3298-3300

Brahms, J.; Circular dichroism investigations of the two conformations of polyriboadenylic acid, *Nature*, **1964**, *202*, 797-798

Brahms, J.; Mommaerts, W.F.H.M.; A study of conformation of nucleic acids in solution by means of circular dichroism, *J. Mol. Biol.*, **1964**, *10*, 73-88

Brahms, J.; Optical activity and the conformation of polynucleotide models of nucleic acids, *J. Mol. Biol.*, **1965**, *11*, 785-801

Brahms, J.; Maurizot, J.C.; Michelson, A.M.; Conformation and thermodynamic properties of oligocytidylic acids, *J. Mol. Biol.*, **1967**, *25*, 456-480

Brinck, T.; Murray, J.S.; Politzer, P.; Octanol/water partition coefficients expressed in terms of solute molecular surface areas and electrostatic potentials, *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 7070-7073

Brown, D.M.; Todd, A.R.; Nucleotides, part X. Some observations on structure and chemical behaviour of nucleic acids, *J. Chem. Soc.*, **1952**, 52-58

Brückner, C.; Holzinger, H.; Reissig, H.U.; Diastereoselective syntheses of highly substituted methyl tetrahydrofuran-3-carboxylates by reactions of γ -lactols with silylated nucleophiles, *J. Org. Chem.*, **1988**, *53*, 2450-2456

Bruno, G.; Chimirri, A.; Monforte, A.M.; Nicoló, F.; Scopelliti, R.; 1-Aryl-1H,3H-thiazolo[3,4-a]benzimidazole derivatives, *Acta Cryst.*, **1997**, *C53*, 1337-1341

Bush, C.A.; Brahms, J.; Optical activity of single-strand oligonucleotides, *J. Chem. Phys.*, **1967**, *46*, 79-88

Caruthers, M.D.; Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses, *Science*, **1985**, *230*, 281-285

Caruthers, M.H.; Barone, A.D.; Beaucage, S.L.; Dodds, D.L.; Fisher, E.F.; McBride, L.J.; Matteucci, M.; Stabinski, Z.; Tang, J.-Y.; Chemical synthesis of deoxynucleotides by the phosphoramidite method, *Methods Enzymol.*, **1987**, *154*, 287-313

Chargaff, E.; Structure and function of nucleic acids as cell constituents, *Fed. Proc.*, **1951**, *10*, 654-659

Chaudhuri, N.C.; Ren, R.X.F.; Kool, E.T.; C-Nucleosides derived from simple aromatic hydrocarbons, *Synlett*, **1997**, *4*, 341-347

Cheng, D.M.; Kan, L.S.; Ts'o, P.O.P.; Uesugi, S.; Takatsuka, Y.; Ikehara, M.; Multinuclear magnetic resonance studies of monomers and dimers containing 2'-fluoro-2'-deoxyadenosine, *Biopolymers*, **1983**, *22*, 1427-1444

Chidgeavadze, Z.G.; Scamrov, A.V.; Beabealashvilli, R.S.; Kvasnyuk, E.I.; Zaitseva, G.V.; Mikhailopulo, I.A.; Kowollik, G.; Langen, P.; 3'-Fluoro-2',3'-dideoxyribonucleoside-5'-triphosphates: terminators of DNA synthesis, *FEBS Lett.*, **1985**, *183*, 275-278

Coe, P.L.; Waring, A.J.; Yarwood, T.D.; The lithiation of fluorinated benzenes and its dependence on solvent and temperature, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1995**, 2729-2737

Dahl, B.H.; Nielsen, J.; Dahl, O.; Mechanistic studies on the phosphoramidite coupling reaction in oligonucleotide synthesis. I. Evidence for nucleophilic catalysis by tetrazole and rate variations with the phosphorus substituents, *Nucleic Acids Res.*, **1987**, *15*, 1729-1743

Dickerson, R.E. et al.; Definitions and nomenclature of nucleic acid structure components, *Nucleic Acids Res.*, **1989**, *17*, 1797-1803

Dunitz, J.D.; Taylor, R.; Organic fluorine hardly ever accepts hydrogen bonds, *Chem. Eur. J.*, **1997**, *3*, 89-98

Eckstein, F. (Hrsg.); Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, **1991**

Edelhoch, H.; Osborne, J.C. Jr.; The thermodynaminc basis of the stability of proteins, nucleic acids, and membranes, *Adv. Protein Chem.*, **1976**, *30*, 183-250

Etzold, G.; Hintsche, R.; Kowollik, G.; Langen, P.; Nucleoside von Fluorzucker-VI. Synthese und Reaktivität von 3'-Fluor- und 3'-Chlor-3-Desoxythymidin, *Tetrahedron*, **1971**, *27*, 2463-2472

Falk, M.; Hartman, K.A. Jr.; Lord, R.C.; Hydration of deoxyribonucleic acid. II. An infrared study, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 387-391

Fauvet, G.; Masseux, M.; Chevalier, R.; Study of the crystal structure of benzonitrile at 198 K, *Acta Cryst.*, **1978**, *B34*, 1376-1378

Felsenfeld, G.; Hirschman, S.Z.; A neighbor-interaction analysis of the hypochromism and spectra of DNA, *J. Mol. Biol.*, **1965**, *13*, 407-427

Finger, G.C.; Reed, F.H.; Finnerty, J.L.; Aromatic fluorine compounds. V. 1,3,5-Trifluorobenzene, *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, *73*, 153-155

Fisher, E.F.; Caruthers, M.H.; Color coded triarylmethylprotecting groups useful for deoxypolynucleotide synthesis, *Nucleic Acids Res.*, **1983**, *11*, 1589-1599

Fitzgerald, M.C.; Smith, L.M.; Mass spectrometry of nucleic acids: the promise of matrix-assisted laser desorption-ionization (MALDI) mass spectrometry, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1995**, *24*, 117-140

Gaffney, B.L.; Jones, R.A.; A new strategy for the protection of deoxyguanosine during oligonucleotide synthesis, *Tetrahedron Lett.*, **1982**, *23*, 2257-2260

Gait, M.J.; (Hrsg.) Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford **1984**

Gao, X.; Gaffney, B.L.; Hadden, S.; Jones, R.A.; Transient protection. 2. One flask synthesis of 6-O-[(4-nitrophenyl)ethyl]-2'-deoxyguanosine nucleosides, *J. Org. Chem.*, **1986**, *51*, 755-758

Gallicchio, E.; Kubo, M.M.; Levy, R.M.; Entropy-enthalpy compensation in solvation and ligand binding revisited, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 4526-4527

Gandhi, V.; Mineishi, S.; Huang, P.; Chapman, A.J.; Young, Y.; Chen, F.; Nowak, B.; Chubb, S.; Hertel, L.W.; Plunkett, W.; Cytotoxicity, metabolism, and mechanisms of action of 2',2'-difluorodideoxyguanosine in chinese hamster ovary cells, *Cancer Res.*, **1995**, *55*, 1517-1524

Garegg, P.J.; Lindh, I.; Regberg, T.; Stawinski, J.; Strömberg, R.; Nucleoside-H-phosphonates, *Tetrahedron Lett.*, **1986**, *27*, 4055-4058

Gasparutto, D.; Livache, T.; Bazin, H.; Dupla, A.M.; Guy, A.; Khorlin, A.; Molko, D.; Roget, A.; Teoule, R.; Chemical synthesis of a biologically active natural t-RNA with it's minor bases, *Nucleic Acids Res.*, **1992**, *20*, 5152-5166

Gombar, V.K.; Enslein, K.; Assessment of *n*-octanol/water partition coefficient: When is the assessment reliable?, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **1996**, *36*, 1127-1134

Gray, D.M.; Ratliff, R.L.; Vaughan, M.R.; Circular dichroism spectroscopy of DNA, *Methods Enzymol.*, **1992**, *211*, 389-406

Gray, D.M.; Hung, S.-H.; Johnson, K.H.; Absorption and circular dichroism spectroscopy of nucleic acid duplexes and triplexes, *Methods Enzymol.*, **1995**, *246*, 19-34

Green, E.A.; Rosenstein, R.D.; Shiono, R.; Abraham, D.J.; Trus, B.L.; Maesh, R.E.; The crystal structure of uridine, *Acta Cryst.*, **1975**, *B31*, 102-107

Green, R.; Szostak, J.W.; Benner, S.A.; Rich, A.; Usman, N.; Synthesis of RNA containing inosine: Analysis of the sequence requirements for the 5' splice site of the *Tetrahymena* group I intron, *Nucleic Acids Res.*, **1991**, *19*, 4161-4166

Guckian, K.M.; Schweitzer, B.A.; Ren, R.X.F.; Sheils, C.J.; Paris, P.L.; Tahmassebi, D.C.; Kool, E.T.; Experimental measurement of aromatic stacking affinities in the context of duplex DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 8182-8183

Guckian, K.M.; Kool, E.T.; Hochpräzise Gestaltnachahmung durch ein Difluortoluol-Desoxynucleosid – ein replikationsfähiger Ersatz für Thymidin, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2942-2945

Guckian, K.M.; Krugh, T.R.; Kool, E.T.; Solution structure of a DNA duplex containing a replicable difluorotoluene-adenine pair, *Nat. Struct. Biol.*, **1998**, *5*, 954-959

Guckian, K.M.; Krugh, T.R.; Kool, E.T.; Solution structure of a nonpolar, non-hydrogen-bonded base pair surrogate in DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 6841-6847

Haasnoot, C.A.G.; Altona, C.; A conformational study of nucleic acid phosphate ester bonds using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance, *Nucleic Acids Res.* **1979**, *6*, 1135-1149

Hakimelahi, G.H.; Proba, Z.A.; Ogilvie, K.K.; Nitrate ions as catalyst for selective silylations of nucleosides, *Tetrahedron Lett.*, **1981**, *22*, 4775-4778

Hakimelahi, G.H.; Proba, Z.A.; Ogilvie, K.K.; New catalysts and procedures for the dimethoxytritylation and selective silylation of ribonucleosides, *Can. J. Chem.*, **1982**, *60*, 1106-1113

Hanessian, S.; Liak, T.J.; Vanasse, B.; Facile cleavage of benzyl ethers by catalytic transfer hydrogenation, *Synthesis*, **1981**, 396-397

Hansske, F.; Madej, D.; Robins, M.J.; 2'- und 3'-Ketonucleosides and their arabino and xylo reduction products, *Tetrahedron*, **1984**, *40*, 125-135

Harada, K.; Matulic-Adamic, J.; Price, R.W.; Schinazi, R.F.; Watanabe, K.A.; Nucleosides. 139. Synthesis of anticyclomegalovirus and antiherpes simplex virus activity of 5'-modified analogues of 2'-fluoro-arabinosylpyrimidine nucleosides, *J. Med. Chem.*, **1987**, *30*, 226-230

Harrell, S.A.; McDaniel, D.H.; Strong hydrogen bonds II. The hydrogen difluoride ion, *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, *86*, 4497

Heath, P.; Mann, J.; Walsh, E.B.; Wadsworth, A.H.; The preparation of dioxaprostacyclin analogues from D-(-)-ribose, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1983**, 2675-2679

Hertel, L.W.; Kroin, J.S.; Misner, J.W.; Tustin, J.M.; Synthesis of 2-deoxy-2,2-difluoro-D-ribose and 2-deoxy-2,2-difluoro-D-ribofuranosyl nucleosides, *J. Org. Chem.*, **1988**, *53*, 2406-2409

Himmelsbach, F.; Schulz, B.S.; Trichtinger, T.; Charubala, R.; Pfeleiderer, W.; The p-nitrophenylethyl (NPE) group, *Tetrahedron*, **1984**, *40*, 59-72

Hoogsteen, K.; The structure of crystals containing a hydrogen-bonded complex of 1-methylthymine and 9-methyladenine, *Acta Cryst.*, **1959**, *12*, 822-823

Hossain, N.; van Halbeek, H.; De Clercq, E.; Herdewijn, P.; Synthesis of 3'-C-branched 1'-5'-anhydromannitol nucleosides as new antiherpes agents, *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 2209-2226

Howard, J.A.K.; Hoy, V.J.; O'Hagan, D.; Smith, G.T.; How good is fluorine as a hydrogen bond acceptor?, *Tetrahedron*, **1996**, *52*, 12613-12622

Hunter, C.A.; Sequence-dependent DNA structure, the role of base stacking interactions, *J. Mol. Biol.*, **1993**, *230*, 1025-1054

Ikehara, M.; 2'-Substituted 2'-deoxypurinenucleotides, their conformation and properties, *Heterocycles*, **1984**, *21*, 75-90

IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN), Abbreviations and symbols for the description of conformations of polynucleotide chains, *Eur. J. Biochem.*, **1983**, *131*, 9-15

Jenkins, I.D.; Verheyden, J.P.H.; Moffatt, J.G.; 4'-Substituted nucleosides. 2. Synthesis of the nucleoside antibiotic nucleocidin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, *98*, 3346-3357

Joecks, A.; Koppel, H.; Schleinitz, K.D.; Cech, D.; NMR- spectroscopic studies of the conformational behavior of some 2' and 3'- halogeno-substituted pyrimidine nucleosides, *J. Prakt. Chem.*, **1983**, 325, 881-892

Jones, S.J.; Reese, C.B.; Migration of *t*-butyldimethylsilyl protecting groups, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1979**, 2762-2764

Karas, M.; Hillenkamp, F.; Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons, *Anal. Chem.*, **1988**, 60, 2299-2301

Karipides, A.; McKinney, C.; Peiffer, K.; Structure of Calcium-bis-(4-fluorobenzoate)-trihydrate, *Acta Cryst.*, **1988**, C44, 46-48

Kelly, T.J.jr.; Smith, H.O.; A restriction enzyme from *Hemophilus influenza*, II. Base sequence and recognition site, *J. Mol. Biol.*, **1970**, 51, 393-409

Khorana, H.G.; Polynucleotide synthesis and the genetic code, *Fed. Proc.*, **1965**, 24, 1473-1487

Kirk, K.L.; Cohen, L.A.; The synthesis of some fluoronitrobenzimidazoles and their reactivities toward peptide nucleophiles, *J. Org. Chem.*, **1969**, 34, 384-389

Kirpekar, F.; Nordhoff, E.; Kristiansen, K.; Roepstorff, P.; Lezius, A.; Hahner, S.; Karas, M.; Hillenkamp, F.; Matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of enzymatically synthesized RNA up to 150 kDa, *Nucleic Acids Res.*, **1994**, 22, 3866-3870

Kobayashi, Y.; Kumadaki, I.; Yamamoto, K.; Simple synthesis of trifluoromethylated pyrimidine nucleosides, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1977**, 536-537

Koch, U.; Egert, E.; An improved description of the molecular charge density in force fields with atomic multipole moments, *J. Comput. Chem.*, **1995**, 16, 937-944

Kool, E.T.; Replication of non-hydrogen bonded bases by DNA Polymerases: A mechanism for steric matching, *Biopolymers*, **1998**, 48, 3-17

Kool, E.T., Morales, J.C.; Guckian, K.M.; Einsicht in Stabilität und Replikation der DNA durch Nachahmung ihrer Struktur und Funktion, *Angew. Chem.*, **2000**, *112*, 1046-1068

Kool, E.T.; Synthetically modified DNAs as substrates for polymerases, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2000a**, *4*, 602-608

Krohn, K.; Heins, H.; Wielcknes, K.; Synthesis and cytotoxic activity of C-glycosidic nicotinamide riboside analogues, *J. Med. Chem.*, **1992**, *35*, 511-517

Larsen, S.; Marthi, K.; Structures of racemic monofluoro-substituted mandelic acids, their relation to the thermochemical properties and an analysis of short intermolecular fluorine-carbon contacts, *Acta Cryst.* **1994**, *B50*, 373-381

Lawrence, C.W.; Borden, A.; Banerjee, S.K.; LeClerc, J.E.; Mutation frequency and spectrum resulting from a single abasic site in a single-stranded vector, *Nucleic Acids Res.*, **1990**, *18*, 2153-2157

Lehmann, W.D.; Massenspektrometrie in der Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford, **1996**

Leo, A.; Hansch, C.; Elkins, D.; Partition coefficients and their uses, *Chem. Rev.*, **1971**, *71*, 525-616

Letsinger, R.L.; Finnan, J.L.; Heaver, G.A.; Lunsford, W.B.; Phosphite coupling procedure for generating internucleotide links, *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, *97*, 3278-3279

Letsinger, R.L.; Lunsford, W.B.; Synthesis of thymidine oligonucleotides by phosphite triester intermediates, *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, *98*, 3655-3661

Lewin, B.; Gene: Lehrbuch der molekularen Genetik, VCH Verlag, Weinheim, Basel, Cambridge, New York **1988**

Lien, E.J.; Gao, H.; Prabhakar, H.; Physical factors contributing to the partition coefficient and retention time of 2',3'-dideoxynucleoside analogues, *J. Pharm. Sci.*, **1991**, *80*, 517-521

Linn, S.; Arber, W.; Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*, X. *In vitro* restriction of phage fd replicative form, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1968**, *59*, 1300-1306

Liu, D.; Moran, S.; Kool, E.T.; Bi-stranded, multisite replication of a base pair between difluorotoluene and adenine: confirmation by 'inverse' sequencing, *Chem. Biol.*, **1997**, *4*, 919-926

Loakes, D.; Brown, D.M.; 5-Nitroindole as an universal base analogue, *Nucleic Acids Res.*, **1994**, *22*, 4039-4043

Loakes, D.; Brown, D.M.; Linde, S.; Hill, F.; 3-Nitropyrrole and 5-nitroindole as universal bases in primers for DNA sequencing and PCR, *Nucleic Acids Res.*, **1995**, *23*, 2361-2366

Loakes, D.; Hill, F.; Brown, D.M.; Salisbury, S.A.; Stability and structure of DNA oligonucleotides containing non-specific base analogues, *J. Mol. Biol.*, **1997**, *270*, 426-435

Marky, L.A.; Breslauer, K.J.; Calculating thermodynamic data for transitions of any molecularity from equilibrium melting curves, *Biopolymers*, **1987**, *26*, 1601-1620

Marshall, E.; Rival genome sequencers celebrate a milestone together, *Science*, **2000**, *288*, 2294-2295

Matulic-Adamic, J.; Watanabe, K.A.; Price, R.W.; Nucleosides. 138. Synthesis and biological activity of α -monofluoro- and α,α -difluoro-thymine, *Chimica Scripta*, **1986**, *26*, 127-134

Matulic-Adamic, J.; Beigelman, L.; Portmann, S.; Egli, M.; Usman, N.; Synthesis and Structure of 1-Deoxy-1-phenyl- β -D-ribofuranose and its incorporation into oligonucleotides, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3909-3911

Matulic-Adamic, J.; Karpeisky, A.M.; Gonzales, C.; Burgin Jr., A.B.; Usman, N.; McSwiggen, J.A.; Beigelman, L.; Modified nucleosides for ribozyme structure-activity studies, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1996a**, *61*, 271-275

Matulic-Adamic, J.; Beigelman, L.; Synthesis of 3-(β -D-ribofuranosyl)-2-fluoropyridine and 3-(β -D-ribofuranosyl)-pyridin-2-one, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 203-206

Maxam, A.M.; Gilbert, W.; A new method of sequencing DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1977**, 74, 560-564

McBride, L.J.; Caruthers, M.H.; An investigation of several deoxynucleoside phosphoramidites useful for synthesizing deoxyoligonucleotides, *Tetrahedron Lett.*, **1983**, 24, 245-248

McNamara, D. J.; Cook, P.D.; Synthesis and antitumor activity of fluorine-substituted 4-amino-2(1H)-pyrimidinones and their nucleosides. 3-Deazacytosines, *J. Med. Chem.*, **1987**, 30, 340-347

Mendel, G.; Versuche über Pflanzenhybriden. *Verhandlungen des Naturforschenden Vereines in Brünn*, **1866**, 3-47

Merrifield, R.B.; Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2149-2154

Mitsunobu, O.; The use of diethylazodicarboxylate and triphenylphosphine in synthesis and transformation of natural products, *Synthesis*, **1981**, 1-28

Montgomery, J.A.; Hewson, K.; Synthesis of potential anticancer agents. XXXIV. Fluorobenzimidazoles and fluorobenzotriazoles, *J. Med. Chem.*, **1965**, 8, 737-740

Morales, J.C.; Kool, E.T.; Minor groove interactions between polymerase and DNA: More essential to replication than Watson – Crick hydrogen bonds?, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 2323-2324

Morales, J.C.; Kool, E.T.; Importance of terminal base pair hydrogen-bonding in 3'-end proofreading by the Klenow fragment of DNA polymerase I, *Biochemistry*, **2000**, 39, 2626-2632

Morales, J.C.; Kool, E.T.; Functional hydrogen bonding map of the minor groove binding tracks of six DNA polymerases, *Biochemistry*, **2000a**, *39*, 12979-12988

Morales, J.C.; Kool, E.T.; Varied molecular interactions at the active sites of several DNA polymerases: Nonpolar nucleoside isosteres as probes, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000b**, *122*, 1001-1007

Moran, S.; Ren, R.X.F.; Rumney IV, S.; Kool, E.T.; Difluorotoluene, a nonpolar isostere for thymine, codes specifically and efficiently for adenine in DNA replication, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 2056-2057

Moran, S.; Ren, R.X.F.; Kool, E.T.; A thymidine triphosphate shape analog lacking Watson-Crick pairing ability is replicated with high sequence selectivity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997a**, *94*, 10506-10511

Narang, S.A.; Brousseau, R.; Hsiung, H.M.; Michniewicz, J.J.; Chemical synthesis of deoxynucleotides by the modified triester method, *Methods Enzymol.*, **1980**, *65*, 610-628

Neilson, T.; Werstiuk, E.S.; Oligoribonucleotide synthesis. II. Preparation of 2'-*O*-tetrahydropyranyl derivatives of adenosine and cytidine necessary for insertion in stepwise synthesis, *Can. J. Chem.*, **1971**, *49*, 493-499

Nichols, R.; Andrews, P.C.; Zhang, P.; Bergstrom, D.E.; A universal nucleoside for use at ambiguous site in DNA primers, *Nature*, **1994**, *369*, 492-493

Nirenberg, M.W.; Matthaei, J.H.; Jones, O.W.; Martin, R.G.; Barondes, S.H.; Approximation of genetic code via cell-free protein synthesis directed by template RNA, *Fed. Proc.*, **1963**, *22*, 55-61

Ochoa, S.; Synthetic polynucleotides and the genetic code, *Fed. Proc.*, **1963**, *22*, 62-74

Ogilvie, K.K.; Sadana, K.L.; Thompson, E.A.; The use of silyl groups in protecting the hydroxyl functions of ribonucleosides, *Tetrahedron Lett.*, **1974**, 2861-63

Ogilvie, K.K.; Beaucage, S.L.; Schiffman, A.L.; Theriault, N.Y.; Sadana, K.L.; The synthesis of oligoribonucleotides. II. The use of silyl protecting groups in nucleoside and nucleotide chemistry, *Can. J. Chem.*, **1978**, *56*, 2768-2780

Pankiewicz, K.W.; Fluorinated nucleosides, *Carbohydr. Res.*, **2000**, *327*, 87-105

Parinov, S.; Barsky, V.; Yershov, G.; Kirillov, E.; Timofeev, E.; Belgovskiy, A.; Mirzabekov, A.; DNA-sequencing by hybridization to micro chip octanucleotide and decanucleotide extended by stacked pentanucleotides, *Nucleic Acids Res.*, **1996**, *24*, 2998-3004

Parsch, J.; Engels, J.W.; C-F...H-C Hydrogen Bonds in Crystals of Fluorobenzene Ribonucleosides, *Collection Symposium Series*, Vol. 2, Ed. A. Holy and M. Hocek, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, **1999**, 11-14.

Parsch, J.; Engels, J.W.; Synthesis of Fluorobenzene and Benzimidazole Nucleic-Acid Analogues and Their Influence on Stability of RNA Duplexes, *Helv. Chim. Acta*, **2000**, *83*, 1791-1808

Pauling, L.; „The nature of the chemical bond“, 2nd Edition, Cornell University Press, Ithaca New York, **1940**

Pauling, L.; „The nature of the chemical bond“, 3rd Edition, Cornell University Press, Ithaca New York, **1960**

Paz-Elizur, T.; Takeshita, M.; Livneh, Z.; Mechanism of bypass synthesis through an abasic site analog by DNA polymerase I, *Biochemistry*, **1997**, *36*, 1766-1773

Pearlman, W.M.; Noble metal hydroxides on carbon nonpyrophoric dry catalysts, *Tetrahedron Lett.*, **1967**, 1663-1664

Pein, C.D.; Cech, D.; Zur Synthese von Difluormethylethern verschieden substituierter Pyrimidinnucleoside durch Reaktion mit Difluorcarben, *Tetrahedron Lett.*, **1985**, *26*, 4915-4918

Pfützner, K.E.; Moffatt, J.G.; Sulfoxide-carbodiimide reactions. I. A facile oxidation of alcohols, *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, *87*, 5661-5678

Pieles, U.; Zürcher, W.; Schär, M.; Moser, H.E.; Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for the mass and sequence analysis of natural and modified oligonucleotides, *Nucleic Acids Res.*, **1993**, *21*, 3191-3196

Pitsch, S.; Weiss, P.A.; Jenny, L.; Ribonucleoside-derivative and methode for preparing the same, Patent, **1999**, International publication number WO99/09044

Pochet, S.; Dugue, L.; Oligodeoxynucleotides embodying the ambiguous base-Z, 5-aminoimidazole-4-carboxamide, *Nucleosides Nucleotides*, **1995**, *14*, 1195-1210

Puglisi, J.D.; Tinoco, I.; Absorbance melting curves of RNA, *Methods Enzymol.*, **1989**, *180*, 304-325

Purdy, D.F.; Zintek, L.B.; Nair, V.; Synthesis of isonucleosides related to AZT and AZU, *Nucleosides Nucleotides*, **1994**, *13*, 109-126

Ren, X.F.; Schweitzer, B.A.; Sheils, C.J.; Kool, E.T.; Stabile DNA-Schleifen durch Einbau unpolarer und keine Wasserstoffbrücken bildender Nucleosid-Isostere, *Angew. Chem.*, **1996**, *108*, 834-837

Rowland, R.S.; Taylor, R.; Intermolecular nonbonded contact distances in organic crystal structures: Comparison with distances expected from van der Waals Radii, *J. Phys. Chem.*, **1996**, *100*, 7384-7391

Saenger, W.; Principles of nucleic acid structure, Springer Verlag, New York Berlin, **1984**

Saiki, R.K.; Scharf, S.J.; Faloona, F.; Mullis, K.B.; Horn, G.T.; Erlich, H.A.; Arnheim, N.; Enzymatic amplification of beta-globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, **1985**, *230*, 1350-1354

Sala, M.; Pezo, V.; Pochet, S.; Wainhobson, S.; Ambiguous base-pairing of the purine analogue 1'-(2'-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-imidazole-4-carboxamide during PCR, *Nucleic Acids Res.*, **1996**, *24*, 3302-3306

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R.; DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1977**, *74*, 5463-5467

Schaaper, R.M.; Kunkel, T.A.; Loeb, L.A.; Infidelity of DNA synthesis associated with bypass of apurine sites, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1983**, *80*, 487-491

Schaller, H.; Weimann, G.; Lerch, B.; Khorana, H.G.; Studies on polynucleotides. XXIV. The stepwise synthesis of specific deoxyribonucleotides (4). Protected derivatives of deoxyribonucleosides and new syntheses of deoxyribonucleoside-3'-phosphates, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 3821-3827

Schweitzer, B.A.; Kool, E.T.; Aromatic nonpolar nucleosides as hydrophobic isosteres of pyrimidine and purine nucleosides, *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 7238-7242

Schweitzer, B.A.; Kool, E.T.; Hydrophobic, non-hydrogen-bonding bases and base pairs in DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 1863-1872

Schweitzer, M.; Synthese und Untersuchung chemisch modifizierter DNA am Beispiel der Oligonucleosid-Methylphosphonate, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Dissertation, **1998**

Searle, M.S.; Williams, D.H.; On the stability of nucleic acid structures in solution: enthalpy-entropy compensations, internal rotations and reversibility, *Nucleic Acids Res.*, **1993**, *21*, 2051-2056

Seela, F.; Bourgeois, W.; Rosemeyer, H.; Wenzel, T.; Synthesis of 4-substituted 1H benzimidazole 2'-deoxyribonucleosides and utility of the 4-nitro compound as universal base, *Helv. Chim. Acta*, **1996**, *79*, 488-498

Shimoni, L.; Glusker, J.P.; The geometry of intermolecular interactions in some crystalline fluorine-containing organic compounds, *Structural Chem.*, **1994**, *5*, 383-397

Sinha, N.D.; Biernat, J.; Köster, H.; β -Cyanoethyl *N,N*-dialkylamino/*N*-morpholinomonochloro phosphoamidites, new phosphitylating agents facilitating ease of deprotection and work-up of synthesized oligonucleotides, *Tetrahedron. Lett.*, **1983**, *24*, 5843-5846

Smart, B.E.; „Characteristics of C-F Systems“ in „Organofluorine Chemistry: Principals and Commercial Applications“ Ed Banks, R.E. Plenum Press, New York, **1994**

Smith, M.; Rammler, D.H.; Goldberg, I.H.; Khorana, H.G.; Studies on polynucleotides. XIV. Specific synthesis of the C-3'- C-5'-interribonucleotide linkage. Synthesis of uridylyl-(3'-5')-uridine and uridylyl-(3'-5')-adenosine, *J. Am. Chem. Soc.*, **1962**, *84*, 430-440

Smith, H.O.; Wilcox, K.W.; A restriction enzyme from *Hemophilus influenza*, I. Purification and general properties, *J. Mol. Biol.*, **1970**, *51*, 379-391

Stawinski, J.; Strömberg, R.; Thelin, M.; Westman, E.; Studies on the *t*-butyldimethylsilyl groups as 2'-*O* protection in oligonucleotide synthesis via H-phosphonate approach, *Nucleic Acids Res.*, **1988**, *16*, 9285-9298

Still, W.C.; Kahn, M.; Mitra, A.; Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution, *J. Org. Chem.*, **1978**, *43*, 2923-2925

Strähle, J.; Untersuchungsmethoden in der Chemie: Einführung in die moderne Analytik, Herausgegeben von H. Naumer und W. Heller, 2. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart New York, **1990**

Stryer, L.; Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York, **1991**

Stults, J.T.; Marsters, J.C.; Improved electrospray ionization of oligodeoxynucleotides, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1991**, *5*, 359-363

Tanaka, K.; Waki, H.; Iod, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T.; Protein and polymer analyses up to m/z 100000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.*, **1988**, 2, 151-153

Thalladi, V.R.; Weiss, H.C.; Bläser, D.; Boese, R.; Nangia, A.; Desiraju, G.R.; C-H...F interactions in the crystal structures of some fluorobenzenes, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 8702-8710

Thiellier, H.P.M.; Koomen, G.J.; Pandit, U.K.; Unconventional nucleotide analogues – XVIII. Ring expansion of uridine halocarbene adducts. Synthesis of diazepine nucleosides, *Tetrahedron*, **1977**, 33, 2609-2612

Timpe, W.; Dax, K.; Wolf, N.; Weidmann, H.; 3-Desoxyhex-2-enono-1,4-lactone aus D-Hexofuran(osid)-urono-6,3-lactonen, *Carbohydr. Res.*, **1975**, 39, 53-60

Uesugi, S.; Miki, H.; Ikehara, M.; Iwahashi, H.; Kyogoku, Y.; A linear relationship between electronegativity of 2'-substituent and conformation of adenine nucleosides, *Tetrahedron Lett.* **1979**, 42, 4073-4076

Uesugi, S.; Kaneyusa, T.; Imura, J.; Ikehara, M.; Cheng, D.M.; Kan, L.S.; Ts'o, P.O.P.; ¹H-NMR studies on the dinucleoside monophosphates containing 2'-halogeno-2'-deoxypurine nucleosides: Effects of 2'-substitutes on conformation, *Biopolymers*, **1983**, 22, 1189-1202

Ulku, D.; Huddle, B.P.; Morrow, J.C.; Crystal structure of pyridine-1-oxide, *Acta Cryst.*, **1971**, B27, 432-436

Varian; Mitteilung der technischen Abteilung, Varian Darmstadt, **1998**

Vij, A.; Staples, R.J.; Kirchmeier R.L.; Shreeve, J.M.; Monospiroaryloxyphosphazenes: p-Fluorophenoxy derivatives containing the 1,2-phenylenedioxy and 2,3-naphthalenedioxy groups, *Acta Cryst.* **1996**, C52, 2515-2520

Vogel, H.J.; Bridger, W.A.; Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of the methylene and fluoro analogues of adenine nucleotides. Effects of pH and Magnesium ion binding, *Biochemistry*, **1982**, *21*, 394-401

Vorbrüggen, H.; Krolkiewicz, K.; Bennua, B.; Nucleoside synthesis with trimethylsilyl triflate and perchlorate as catalysts, *Chem. Ber.*, **1981**, *114*, 1234-1255

Vorbrüggen, H.; Höfle, G.; On the mechanism of nucleoside synthesis, *Chem. Ber.*, **1981a**, *114*, 1256-1268

Waehnert, U.; Langen, P.; Incorporation of 3'-deoxy-3'-fluorothymidylat into DNA in vitro, *Proc. Hung. Annu. Meet. Biochem.*, **1979**, *19*, 27-28

Wang, S.; Friedman, A.E.; Kool, E.T.; Origins of high sequence selectivity: a stopped flow kinetics study of DNA/RNA hybridization by duplex- and triplex-forming oligonucleotides, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 9774-9784

Warshel, A.; Papazyan, A.; Kollman, P.A.; Cleland, W.W.; Kreevoy, M.M.; Frey, P.A.; On low-barrier hydrogen bonds and enzyme catalysis, *Science*, **1995**, *269*, 102-106

Watanabe, K.A.; Reichman, U.; Hirota, K.; Lopez, C.; Fox, J.J.; Nucleosides 110. Synthesis and antiherpes virus activity of some 2'-fluoro-2'-deoxyarabinosylpyrimidine nucleosides, *J. Med. Chem.*, **1979**, *22*, 21-24

Watanabe, K.A.; Su, T.L.; Klein, R.S.; Chu, C.K.; Matsuda, A.; Chun, M.W.; Lopez, C.; Fox, J.J.; Nucleosides. 123. Synthesis of antiviral nucleosides: 5-substituted 1-(2-deoxy-2-halogeno- β -D-arabinofuranosyl)cytosines and -uracils. Some structure-activity relationships, *J. Med. Chem.*, **1983**, *26*, 152-156

Watanabe, K.A.; Su, T.L.; Reichman, U.; Greenberg, N.; Lopez, C.; Fox, J.J.; Nucleosides. 129. Synthesis of antiviral nucleosides: 5-alkenyl-1-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)uracils, *J. Med. Chem.*, **1984**, *27*, 91-94

Watson, J.D.; Crick, F.H.C.; Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature*, **1953**, *171*, 737-738

Watson, J.D.; Crick, F.H.C.; Genetic implications of the structure of deoxyribonucleic acid, *Nature*, **1953a**, *171*, 964-967

Wepster, B.M.; Verkade, P.E.; Steric effects on mesomerism. III. Estimation of the direct influence of substituents on the rate of deacylation of *ortho*- and *para*-nitro-acetanilide, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1949**, *68*, 77-87

Westman, E.; Strömberg, R.; Removal of *t*-butyldimethylsilyl protection in RNA-synthesis. Triethylamine trihydrofluoride (TEA·3HF) is a more reliable alternative to tetrabutylammonium fluoride (TBAF), *Nucleic Acids Res.*, **1994**, *22*, 2430-2431

Winter, R.; Noll, F.; Methoden der Biophysikalischen Chemie, Teubner Verlag, Stuttgart, **1998**

Witt, O.N.; Utermann, A.; Ein neues Nitrierungsverfahren, *Ber.*, **1906**, *39*, 3901-3905

Wörner, K.; Synthese und Charakterisierung kleiner strukturbildender Oligonucleotide, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Dissertation, **1997**

Wörner, K.; Strube, T.; Engels, J.W.; Synthesis and stability of GNRA-loop analogs, *Helv. Chim. Acta*, **1999**, *82*, 2094-2104

Wu, X.; Pitsch, S.; Synthesis and pairing properties of oligonucleotide analogues containing a metal-binding site attached to β -D-allofuranosyl cytosine, *Nucleic Acids Res.*, **1998**, *26*, 4315-4323

Yoshikawa, M.; Kato, T.; Takenishi, T.; A novel method for phosphorylation of nucleosides to 5'-nucleotides, *Tetrahedron Lett.*, **1967**, *50*, 5065-5068

13 Anhang

7 Teil A Kristallstrukturen

- A1** 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **30** kristallisiert aus Wasser
- A2** 1'-Desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **34** kristallisiert aus Wasser
- A3** 1'-Desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **34** kristallisiert aus Methanol bei 20°C
- A4** 1'-Desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **34** kristallisiert aus Methanol bei 4°C
- A5** 1'-Desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **35** kristallisiert aus Methanol
- A6** 1'-Desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **36** kristallisiert aus Methanol
- A7** 1'-Desoxy-1'-(2,4,6-trifluorphenyl)- β -D-ribofuranose **86** kristallisiert aus Methanol

8 Teil B Ausgewählte Spektren

9 Teil C Abkürzungsverzeichnis

10 Teil A Kristallstrukturen

**A1 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose 30
kristallisiert aus Wasser**

Crystal data of 1'-Deoxy-1'-(2, 4-difluorophenyl) - β -D -ribofuranose at -139°C from water

| | |
|--------------------------|---|
| formula | $\text{C}_{11} \text{H}_{12} \text{F}_2 \text{O}_4$ |
| mol. weight | 246.21 |
| crystal color | colorless, transparent |
| crystal shape | thick plate |
| crystal dimensions | 0.20 x 0.70 x 0.75 mm |
| crystal system | monoclinic |
| space group | C 2 |
| space group number | 5 |
| a | 14.684(2) Å |
| b | 4.6609(6) Å |
| c | 15.772(2) Å |
| β | 99.48(1) $^{\circ}$ |
| V | 1064.7(3) Å ³ |
| Z | 4 |
| D _{calc} | 1.536 g/cm ³ |
| linear absorption coeff. | 1.4 cm ⁻¹ |
| radiation | Mo-K $_{\alpha}$ |
| scan range | sphere |
| (2 theta)max | 62 $^{\circ}$ |
| resolution | 0.69 Å |

| | |
|-----------------------------------|-------|
| number of reflections measured | 9582 |
| number of independent reflections | 3049 |
| reflections used with $I > 0$ | 3019 |
| number of variables | 201 |
| | |
| R(F) | 0.041 |
| wR(F) | 0.041 |
| S | 1.11 |

A single crystal was measured on a SIEMENS SMART diffractometer at a temperature of about -139°C . Repeatedly measured reflections remained stable. An empirical absorption correction was made using program SADABS. The correction factor ranged from 0.698 to 1.000. Equivalent reflections were averaged. Friedel opposites were not averaged. $R(I)_{\text{internal}} = 0.029$. The structure was determined by direct methods using program SHELXS. The H atoms were taken from a difference Fourier synthesis and were refined with isotropic thermal parameters. The non-H atoms were refined with anisotropic thermal parameters. The structure was refined on F values using weighting scheme:

$$w(F) = 4 * F^2 / [\sigma^2(F^2) + (0.03 * F^2)^2].$$

The final difference density was between -0.22 and $+0.35 \text{ e}/\text{\AA}^3$. The calculations were performed with the SMART, SHELX and MolEN program systems.

Discussion of the Structure

The ribofuranose ring has an unsymmetrical C2-exo, C3-endo twist conformation with atom C2 0.24 \AA below and atom C3 0.40 \AA above the plane through C1, O4 and C4. The hydroxyl group attached to C2 is in an axial position, the hydroxyl group attached to C3 is in an equatorial position with respect to the five-membered ring. The ethanol group attached to C4 approximately is in a bisecting positions, while the phenyl group at C1 is in a pseudo-axial position. The shortest intramolecular contact distance is $2.43(2) \text{ \AA}$ between O4 and H7 and is just outside the van der Waals contact distance of 2.4 \AA . The crystal packing shows intermolecular hydrogen bonding between the hydroxyl groups.

Hydrogen bonds:

| O - H ... O | O - H | H...O | O...O | O-H-O | symmetry |
|-----------------|---------|---------|----------|--------|--------------------|
| | [Å] | [Å] | [Å] | [deg] | |
| O2 - H02 ... O5 | 0.72(2) | 2.07(2) | 2.781(1) | 168(2) | 0.5+x, y-0.5, z |
| O3 - H03 ... O5 | 0.71(2) | 2.12(2) | 2.828(1) | 171(2) | -0.5-x, y-0.5, 1-z |
| O5 - H05 ... O3 | 0.75(2) | 1.98(2) | 2.725(1) | 174(2) | -0.5-x, y-0.5, 1-z |

Thus each molecule is connected by intermolecular hydrogen bonding to four neighboring molecules. The hydrogen bonding results in a two-dimensional network of molecules parallel to the a and b axes. The shortest inter-molecular F...H distances are 2.57(1) Å between F2 and H5B (symmetry: x+0.5, y-0.5, z) and 2.60(2) Å between F1 and H10 (symmetry: -x, y, -z). These distances are almost 0.25 Å longer than the van der Waals contact distance and thus hardly contribute to the crystal packing forces. Neighboring hydrogen bonded layers show T-shaped arrangements of the phenyl groups. Such arrangements have been shown to result in favourable intermolecular attractive forces (Koch and Egert, 1995).

Table of Positional Parameters and Their Estimated Standard Deviations

| Atom | x | y | z | B(A ²) |
|------|-------------|-----------|------------|--------------------|
| F1 | -0.10380(6) | 1.4125(0) | 0.00864(6) | 2.51(2) |
| F2 | 0.02676(5) | 0.7277(2) | 0.21081(6) | 2.16(2) |
| O2 | -0.06544(6) | 0.4488(2) | 0.40898(6) | 1.57(2) |
| O3 | -0.15560(6) | 0.8686(2) | 0.48250(6) | 1.57(2) |
| O4 | -0.23402(6) | 0.5473(2) | 0.27474(6) | 1.52(2) |
| O5 | -0.37662(6) | 0.8555(2) | 0.42158(6) | 1.57(2) |
| C1 | -0.13859(8) | 0.6012(3) | 0.26733(9) | 1.32(2) |
| C2 | -0.09120(8) | 0.6934(3) | 0.35712(9) | 1.25(2) |
| C3 | -0.17082(8) | 0.8385(3) | 0.39218(8) | 1.30(2) |
| C4 | -0.25161(8) | 0.6430(3) | 0.35712(9) | 1.29(2) |
| C5 | -0.34658(9) | 0.7841(3) | 0.34249(9) | 1.57(2) |
| C6 | -0.13292(8) | 0.8194(3) | 0.19740(8) | 1.35(2) |
| C7 | -0.20874(9) | 0.9695(3) | 0.15435(9) | 1.59(2) |
| C8 | -0.20042(9) | 1.1683(3) | 0.0907(1) | 1.81(3) |
| C9 | -0.1135(1) | 1.2163(3) | 0.07055(9) | 1.78(2) |
| C10 | -0.03566(9) | 1.0744(4) | 0.10999(9) | 1.85(2) |

| | | | | |
|-----|-------------|-----------|------------|---------|
| C11 | -0.04826(8) | 0.8767(3) | 0.17222(8) | 1.51(2) |
| H1 | -0.114(1) | 0.421(4) | 0.2507(9) | 1.4(3)* |
| H2 | -0.040(1) | 0.811(4) | 0.354(1) | 1.6(3)* |
| H02 | -0.015(1) | 0.442(5) | 0.417(1) | 3.5(5)* |
| H3 | -0.183(1) | 1.018(3) | 0.3660(9) | 1.0(3)* |
| H03 | -0.144(1) | 0.735(4) | 0.503(1) | 1.6(3)* |
| H4 | -0.250(1) | 0.485(4) | 0.3956(9) | 1.6(3)* |
| H05 | -0.366(1) | 0.728(4) | 0.450(1) | 1.6(3)* |
| H5B | -0.346(1) | 0.960(4) | 0.3114(9) | 1.4(3)* |
| H5A | -0.390(1) | 0.643(3) | 0.311(1) | 1.2(3)* |
| H7 | -0.268(1) | 0.936(4) | 0.172(1) | 2.0(3)* |
| H8 | -0.253(1) | 1.260(4) | 0.061(1) | 2.4(4)* |
| H10 | 0.024(1) | 1.107(5) | 0.096(1) | 3.2(4)* |

Starred atoms were refined isotropically. Anisotropically refined atoms are given in the form of the isotropic equivalent displacement parameter defined as:

$$(4/3) * [a^2*B(1,1) + b^2*B(2,2) + c^2*B(3,3) + ab(\cos \gamma)*B(1,2) + ac(\cos \beta)*B(1,3) + bc(\cos \alpha)*B(2,3)]$$

Table of General Displacement Parameter Expressions - U's

| Name | U(1,1) | U(2,2) | U(3,3) | U(1,2) | U(1,3) | U(2,3) |
|------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|------------|
| F1 | 0.0360(4) | 0.0301(5) | 0.0309(4) | 0.0021(4) | 0.0101(3) | 0.0108(4) |
| F2 | 0.0150(3) | 0.0336(5) | 0.0344(4) | 0.0060(3) | 0.0065(3) | 0.0095(4) |
| O2 | 0.0115(3) | 0.0208(4) | 0.0275(5) | 0.0019(4) | 0.0032(3) | 0.0062(4) |
| O3 | 0.0225(4) | 0.0165(4) | 0.0207(4) | 0.0005(4) | 0.0039(3) | -0.0013(4) |
| O4 | 0.0127(3) | 0.0226(5) | 0.0234(4) | -0.0043(4) | 0.0061(3) | -0.0055(4) |
| O5 | 0.0164(4) | 0.0201(4) | 0.0244(4) | 0.0058(4) | 0.0071(3) | 0.0030(4) |
| C1 | 0.0128(5) | 0.0170(6) | 0.0219(5) | -0.0015(5) | 0.0069(4) | -0.0018(5) |
| C2 | 0.0124(5) | 0.0165(6) | 0.0193(5) | -0.0008(5) | 0.0041(4) | 0.0012(5) |
| C3 | 0.0144(5) | 0.0135(5) | 0.0216(6) | 0.0012(5) | 0.0031(4) | -0.0012(5) |
| C4 | 0.0125(5) | 0.0158(6) | 0.0213(6) | 0.0011(4) | 0.0039(4) | -0.0009(5) |
| C5 | 0.0144(5) | 0.0236(7) | 0.0220(6) | 0.0035(5) | 0.0038(5) | -0.0000(5) |
| C6 | 0.0160(5) | 0.0166(6) | 0.0191(5) | 0.0004(5) | 0.0035(4) | -0.0023(5) |
| C7 | 0.0162(5) | 0.0217(6) | 0.0224(6) | 0.0009(5) | 0.0034(5) | -0.0018(6) |
| C8 | 0.0218(6) | 0.0229(7) | 0.0232(6) | 0.0035(5) | 0.0012(5) | 0.0004(5) |
| C9 | 0.0281(6) | 0.0196(6) | 0.0208(6) | -0.0007(6) | 0.0060(5) | 0.0012(5) |
| C10 | 0.0216(5) | 0.0256(7) | 0.0250(6) | -0.0010(5) | 0.0090(5) | 0.0014(6) |
| C11 | 0.0155(5) | 0.0197(6) | 0.0226(6) | 0.0032(5) | 0.0036(5) | -0.0005(5) |

The form of the anisotropic displacement parameter is:

$\exp [-2\pi i \{h^2 a^2 U(1,1) + k^2 b^2 U(2,2) + l^2 c^2 U(3,3) + 2hkabU(1,2) + 2hlacU(1,3) + 2klbcU(2,3)\}]$ where a, b and c are reciprocal lattice constants.

Table of Bond Distances in Angstroms

| Atom 1 | Atom 2 | Distance | Atom 1 | Atom 2 | Distance |
|--------|--------|----------|--------|--------|----------|
| F1 | C9 | 1.363(2) | C2 | C3 | 1.531(2) |
| F2 | C11 | 1.359(2) | C3 | C4 | 1.526(2) |
| O2 | C2 | 1.418(2) | C4 | C5 | 1.525(2) |
| O3 | C3 | 1.412(2) | C6 | C7 | 1.393(2) |
| O4 | C1 | 1.447(2) | C6 | C11 | 1.392(2) |
| O4 | C4 | 1.437(2) | C7 | C8 | 1.386(2) |
| O5 | C5 | 1.429(2) | C8 | C9 | 1.384(2) |
| C1 | C2 | 1.533(2) | C9 | C10 | 1.377(2) |
| C1 | C6 | 1.513(2) | C10 | C11 | 1.381(2) |

Numbers in parentheses are estimated standard deviations in the least significant digits.

Table of Bond Angles in Degrees

| Atom 1 | Atom 2 | Atom 3 | Angle | Atom 1 | Atom 2 | Atom 3 | Angle |
|--------|--------|--------|-----------|--------|--------|--------|----------|
| C1 | O4 | C4 | 109.86(9) | O5 | C5 | C4 | 112.0(1) |
| O4 | C1 | C2 | 105.8(1) | C1 | C6 | C7 | 123.9(1) |
| O4 | C1 | C6 | 110.2(1) | C1 | C6 | C11 | 119.7(1) |
| C2 | C1 | C6 | 114.5(1) | C7 | C6 | C11 | 116.4(1) |
| O2 | C2 | C1 | 110.2(1) | C6 | C7 | C8 | 122.0(1) |
| O2 | C2 | C3 | 107.1(1) | C7 | C8 | C9 | 118.0(1) |
| C1 | C2 | C3 | 101.54(9) | F1 | C9 | C8 | 118.9(1) |
| O3 | C3 | C2 | 113.9(1) | F1 | C9 | C10 | 118.0(1) |
| O3 | C3 | C4 | 114.2(1) | C8 | C9 | C10 | 123.2(1) |
| C2 | C3 | C4 | 101.5(1) | C9 | C10 | C11 | 116.3(1) |
| O4 | C4 | C3 | 105.6(1) | F2 | C11 | C6 | 118.1(1) |
| O4 | C4 | C5 | 107.0(1) | F2 | C11 | C10 | 117.8(1) |
| C3 | C4 | C5 | 115.8(1) | C6 | C11 | C10 | 124.2(1) |

Numbers in parentheses are estimated standard deviations in the least significant digits.

Table of Torsion Angles in Degrees

| Atom 1 | Atom 2 | Atom 3 | Atom 4 | Angle |
|--------|--------|--------|--------|-----------------|
| C4 | O4 | C1 | C2 | 9.26 (0.14) |
| C4 | O4 | C1 | C6 | -114.99 (0.12) |
| C1 | O4 | C4 | C3 | 15.96 (0.14) |
| C1 | O4 | C4 | C5 | 139.82 (0.11) |
| O4 | C1 | C2 | O2 | 83.00 (0.12) |
| O4 | C1 | C2 | C3 | -30.25 (0.13) |
| C6 | C1 | C2 | O2 | -155.43 (0.10) |
| C6 | C1 | C2 | C3 | 91.32 (0.12) |
| O4 | C1 | C6 | C7 | 7.08 (0.19) |
| O4 | C1 | C6 | C11 | -172.14 (0.12) |
| C2 | C1 | C6 | C7 | -112.03 (0.15) |
| C2 | C1 | C6 | C11 | 68.75 (0.16) |
| O2 | C2 | C3 | O3 | 46.29 (0.14) |
| O2 | C2 | C3 | C4 | -76.90 (0.12) |
| C1 | C2 | C3 | O3 | 161.83 (0.11) |
| C1 | C2 | C3 | C4 | 38.64 (0.12) |
| O3 | C3 | C4 | O4 | -157.35 (0.11) |
| O3 | C3 | C4 | C5 | 84.47 (0.15) |
| C2 | C3 | C4 | O4 | -34.36 (0.13) |
| C2 | C3 | C4 | C5 | -152.54 (0.11) |
| O4 | C4 | C5 | O5 | 172.57 (0.11) |
| C3 | C4 | C5 | O5 | -70.07 (0.15) |
| C1 | C6 | C7 | C8 | 179.85 (0.14) |
| C11 | C6 | C7 | C8 | -0.90 (0.21) |
| C1 | C6 | C11 | F2 | 1.37 (0.19) |
| C1 | C6 | C11 | C10 | -179.07 (0.14) |
| C7 | C6 | C11 | F2 | -177.91 (0.12) |
| C7 | C6 | C11 | C10 | 1.65 (0.22) |
| C6 | C7 | C8 | C9 | -0.17 (0.24) |
| C7 | C8 | C9 | F1 | -179.50 (0.12) |
| C7 | C8 | C9 | C10 | 0.64 (0.23) |
| F1 | C9 | C10 | C11 | -179.84 (0.13) |
| C8 | C9 | C10 | C11 | 0.02 (0.43) |
| C9 | C10 | C11 | F2 | 178.33 (0.13) |
| C9 | C10 | C11 | C6 | -1.22 (0.23) |

Table of Least-Squares Planes

Orthonormal Equation of Plane 1

$$-0.0484 X + -0.7203 Y + -0.6919 Z - -4.7495 = 0$$

$$0.0006 \quad 0.0004 \quad 0.0004 \quad 0.0019$$

Crystallographic Equation of Plane

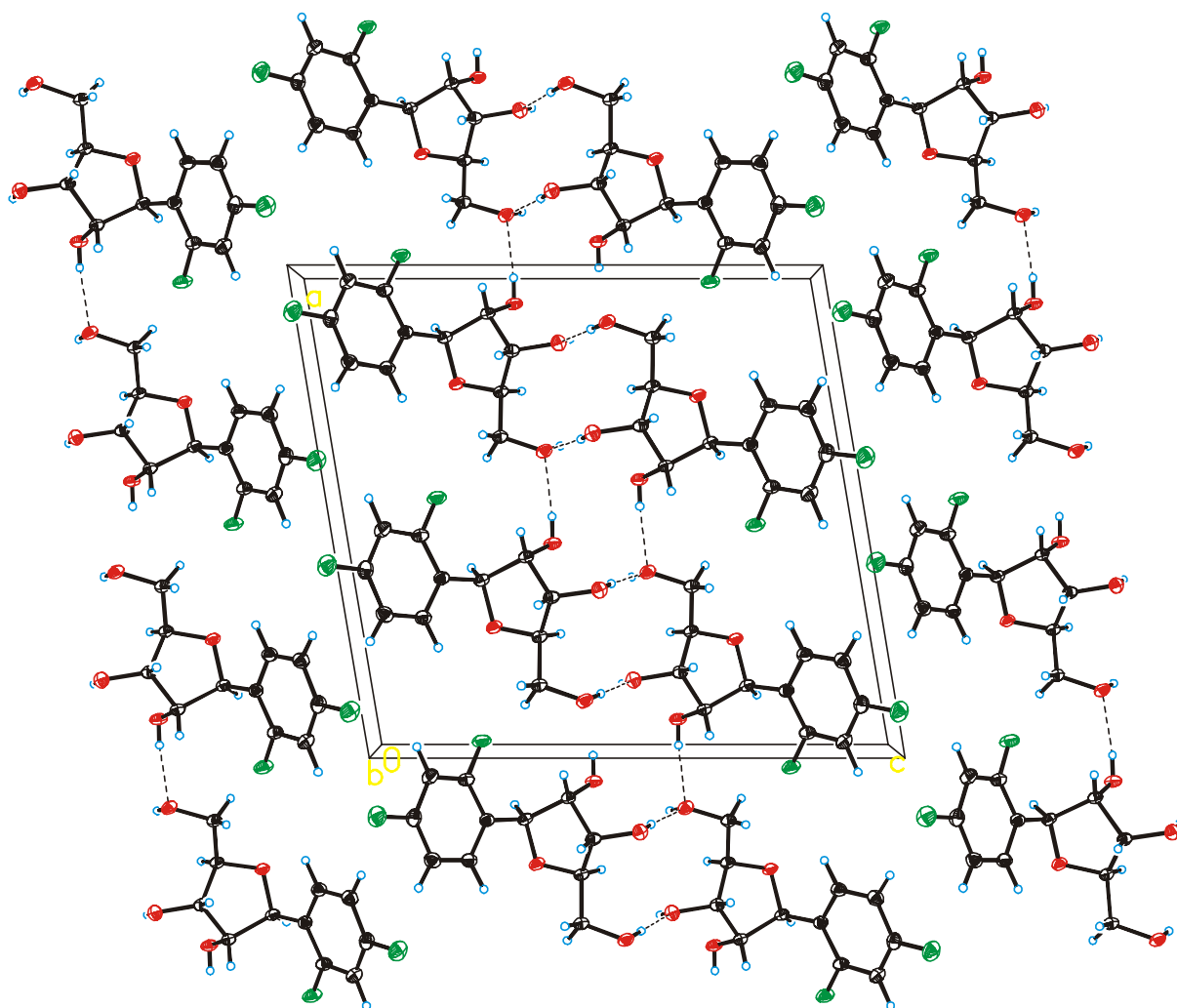
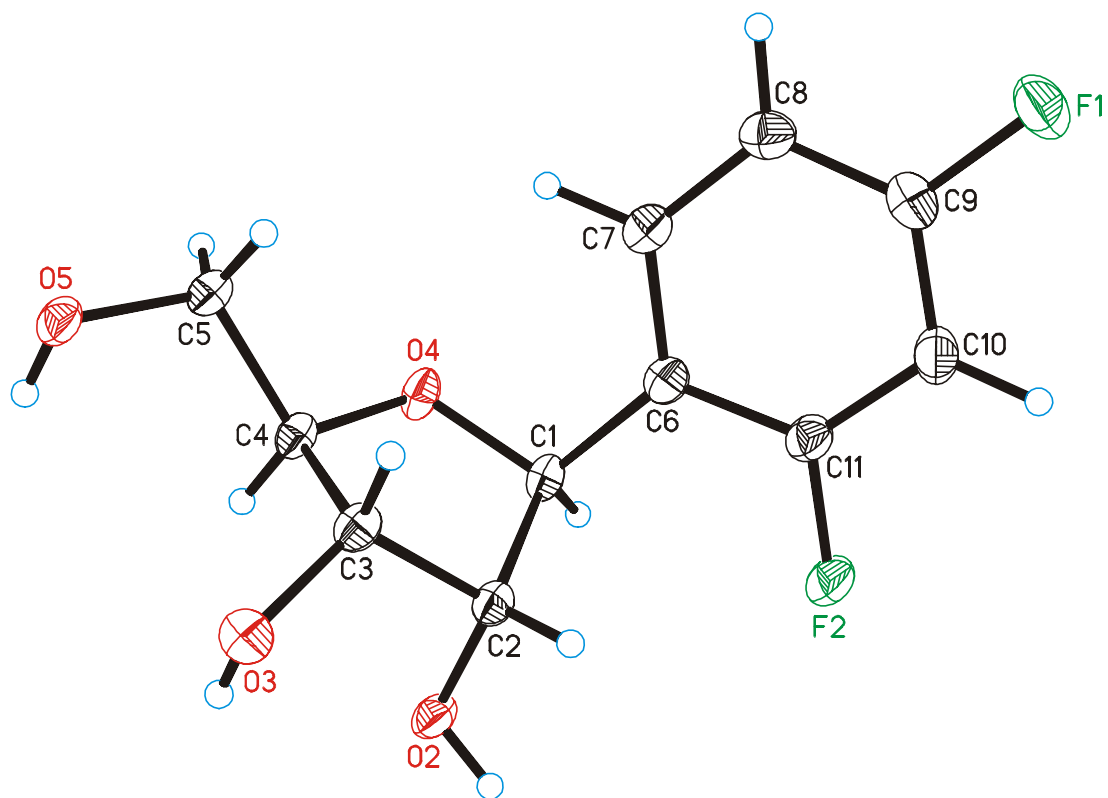
$$-0.7110 X + -3.3574 Y + -10.6384 Z - -4.7495 = 0$$

$$0.0092 \quad 0.0020 \quad 0.0653 \quad 0.0019$$

| Atom | X | Y | Z | Distance | Esd |
|---------------|---------|--------|--------|----------|------------|
| C6 | -2.4644 | 3.8194 | 3.0708 | -0.0071 | + - 0.0014 |
| C7 | -3.4660 | 4.5189 | 2.4011 | 0.0009 | + - 0.0015 |
| C8 | -3.1786 | 5.4453 | 1.4115 | 0.0044 | + - 0.0015 |
| C9 | -1.8497 | 5.6690 | 1.0976 | -0.0038 | + - 0.0015 |
| C10 | -0.8092 | 5.0079 | 1.7111 | -0.0026 | + - 0.0016 |
| C11 | -1.1559 | 4.0864 | 2.6791 | 0.0082 | + - 0.0014 |
| Chi Squared = | | | | 78.6 | |

----- Other Atoms -----

| | | | | | |
|----|---------|--------|--------|---------|------------|
| C1 | -2.7292 | 2.8023 | 4.1587 | -0.0145 | + - 0.0014 |
| F1 | -1.5467 | 6.5838 | 0.1344 | -0.0110 | + - 0.0006 |
| F2 | -0.1545 | 3.3917 | 3.2795 | 0.0447 | + - 0.0010 |



**A2 1'-Desoxy-1'-(4-fluorophenyl)- β -D-ribofuranose 34 kristallisiert
aus Wasser**

Crystal data of 1'-Desoxy-1'-(4-fluorophenyl)- β -D-ribofuranose at -119°C from water

| | |
|-----------------------------------|---|
| formula | $\text{C}_{11} \text{H}_{13} \text{O}_4 \text{F}, 0.5 (\text{H}_2\text{O})$ |
| mol. weight (incl. hydrate) | 237.23 |
| crystal color | colorless, transparent |
| crystal shape | block |
| crystal dimensions | 0.40 x 0.44 x 0.45 mm |
| crystal system | monoclinic |
| space group | C 2 |
| space group number | 5 |
| a | 29.356(6) Å |
| b | 5.3068(7) Å |
| c | 7.353(1) Å |
| β | $93.22(1)^{\circ}$ |
| V | 1143.7(4) Å ³ |
| Z | 4 |
| D _{calc} | 1.378 g/cm |
| linear absorption coeff. | 1.1 cm^{-1} |
| radiation | Mo-K α |
| scan range | sphere |
| (2 theta)max | 61° |
| resolution | 0.70 Å |
| number of reflections measured | 5566 |
| number of independent reflections | 2827 |
| reflections used with $I > 0$ | 2818 |

| | |
|---------------------|-------|
| number of variables | 206 |
| R(F) | 0.035 |
| wR(F) | 0.046 |
| S | 1.51 |

A single crystal was measured on a SIEMENS SMART diffractometer at a temperature of about 119°C. Repeatedly measured reflections remained stable. No absorption correction was made. Equivalent reflections were averaged. Bijvoet pairs of reflections were not averaged. R(I)internal = 0.041. The structure was determined by direct methods using program SHELXS. The H atoms were taken from a difference Fourier synthesis and were refined with isotropic thermal parameters. The non-H atoms were refined with anisotropic thermal parameters. The structure was refined on F values using weighting scheme:

$w(F) = 4 * F^2 / [\sigma^2(F^2) + (0.03 * F^2)^2]$. The final difference density was between -0.16 and +0.35 e/Å³. The calculations were performed with the SMART, SHELX and MolEN program systems.

Discussion of the Structure

The five-membered ribofuranose ring has a conformation which is intermediate between a C2'-endo envelope and a C1'-exo, C2'-endo twist. The conformation of the molecule is very similar to that observed in the related structure of the water-free compound. Corresponding conformation angles differ less than 6. The phenyl group attached to C1 and the hydroxyl group attached to C2 are in equatorial positions, the hydroxyl group attached to C3 is in an axial position with respect to the five-membered ring. The molecule shows no short intramolecular contact distances. The crystal packing shows four intermolecular hydrogen bonds:

Hydrogen bonds:

| O - H ... O | O - H | H ... O | O ... O | O - H - O | symmetry |
|---------------|---------|---------|----------|-----------|------------|
| | [Å] | [Å] | [Å] | [deg] | |
| O1-H01 ... O3 | 0.80(2) | 1.90(2) | 2.701(1) | 176(2) | 1-x, y, -z |
| O2-H02 ... O5 | 0.86(2) | 1.81(2) | 2.660(1) | 168(2) | x, y, z+1 |

| | | | | | | | |
|--------|-----|----|---------|---------|----------|--------|-------------|
| O3-H03 | ... | O2 | 0.89(2) | 1.80(2) | 2.670(1) | 166(2) | 1-x, y, 1-z |
| O5-H05 | ... | O1 | 0.90(2) | 1.88(2) | 2.777(1) | 172(1) | x, y-1, z |

The water molecule lies on a crystallographic two-fold axis and is hydrogen bonded to the hydroxyl groups of four different molecules. The hydrogen bonding results in a two-dimensional network in the a, b - direction. An additional intermolecular contact with a distance of 2.38(2) Å between F and H10 of a neighboring molecule (symmetry code: 0.5-x, y-0.5, 2-z) approaches the van der Waals contact distance of 2.35 Å between F and H. A similar short intermolecular contact was found in the crystal structure of the water-free compound. Intermolecular C-H...F-C interactions are not uncommon in crystal structures. They have also been reported by Karipides *et al.* (Karipides *et al.*, 1988), Bruno *et al.* (Bruno *et al.*, 1997), Antolic *et al.* (Antolic *et al.*, 1996) and Vij *et al.* (Vij *et al.*, 1996). A search in the Cambridge Crystallographic Data Base among 500 structures containing fluorophenyl groups revealed about 240 different C-H...F-C interactions with H...F distances shorter than 2.6 Å (150 shorter than 2.5 Å and 34 shorter than 2.4 Å). Larsen and Marthi have shown the F atom to bear a small negative charge (Larsen and Marthi, 1994). Thus the C-F group is a likely candidate for electrostatic interactions with electropositive groups. There are no other short intermolecular contact distances.

Table of Positional Parameters and Their Estimated Standard Deviations

| Atom | x | y | z | B(A ²) |
|------|------------|------------|------------|--------------------|
| F | 0.23971(3) | 0.0784(0) | 0.8826(1) | 3.74(2) |
| O1 | 0.5000 | 0.4644(2) | 0.0000 | 1.77(2) |
| O2 | 0.44746(3) | -0.0342(2) | 0.5940(1) | 2.14(2) |
| O3 | 0.47406(3) | 0.1638(2) | 0.2721(1) | 1.86(1) |
| O4 | 0.36667(3) | 0.0944(2) | 0.2205(1) | 2.10(1) |
| O5 | 0.42036(3) | -0.2904(2) | -0.1206(1) | 2.00(1) |
| C1 | 0.38200(4) | 0.1324(2) | 0.4072(1) | 1.49(2) |
| C2 | 0.41855(4) | -0.0703(2) | 0.4369(1) | 1.39(2) |
| C3 | 0.44400(4) | -0.0474(2) | 0.2619(1) | 1.51(2) |
| C4 | 0.40457(4) | 0.0067(2) | 0.1208(1) | 1.59(2) |
| C5 | 0.38858(4) | -0.2239(3) | 0.0117(2) | 1.81(2) |
| C6 | 0.34325(4) | 0.1163(2) | 0.5315(1) | 1.55(2) |
| C7 | 0.31066(4) | -0.0737(3) | 0.5133(2) | 2.15(2) |
| C8 | 0.27580(5) | -0.0892(3) | 0.6333(2) | 2.49(2) |

| | | | | |
|-----|------------|-----------|-----------|---------|
| C9 | 0.27465(4) | 0.0877(3) | 0.7700(2) | 2.35(2) |
| C10 | 0.30654(5) | 0.2742(3) | 0.7951(2) | 2.53(2) |
| C11 | 0.34129(5) | 0.2885(3) | 0.6736(2) | 2.05(2) |
| H1 | 0.3968(5) | 0.297(3) | 0.424(2) | 1.4(3)* |
| H01 | 0.5066(6) | 0.373(4) | -0.082(2) | 2.6(3)* |
| H2 | 0.4044(6) | -0.233(3) | 0.437(2) | 1.6(3)* |
| H02 | 0.4351(7) | -0.106(4) | 0.684(2) | 2.5(3)* |
| H03 | 0.4998(6) | 0.115(3) | 0.332(2) | 2.4(3)* |
| H3 | 0.4586(6) | -0.200(3) | 0.241(2) | 2.0(3)* |
| H4 | 0.4127(6) | 0.138(3) | 0.043(2) | 1.9(3)* |
| H5A | 0.3849(6) | -0.374(3) | 0.098(2) | 2.4(3)* |
| H5B | 0.3599(6) | -0.193(3) | -0.050(2) | 1.8(3)* |
| H05 | 0.4449(6) | -0.371(3) | -0.071(2) | 2.3(3)* |
| H7 | 0.3130(7) | -0.203(3) | 0.425(2) | 3.0(4)* |
| H8 | 0.2541(7) | -0.220(4) | 0.622(2) | 2.8(4)* |
| H10 | 0.3036(9) | 0.401(5) | 0.885(3) | 4.6(5)* |
| H11 | 0.3635(5) | 0.419(3) | 0.685(2) | 1.5(3)* |

Starred atoms were refined isotropically. Anisotropically refined atoms are given in the form of the isotropic equivalent displacement parameter defined as:

$$(4/3) * [a^2 * B(1,1) + b^2 * B(2,2) + c^2 * B(3,3) + ab(\cos \gamma) * B(1,2) + ac(\cos \beta) * B(1,3) + bc(\cos \alpha) * B(2,3)]$$

Table of General Displacement Parameter Expressions - U's

| Name | U(1,1) | U(2,2) | U(3,3) | U(1,2) | U(1,3) | U(2,3) |
|------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|------------|
| F | 0.0419(4) | 0.0544(5) | 0.0488(4) | -0.0020(4) | 0.0302(3) | 0.0070(4) |
| O1 | 0.0301(6) | 0.0204(5) | 0.0175(4) | 0.0 | 0.0071(4) | 0.0 |
| O2 | 0.0198(4) | 0.0462(5) | 0.0154(3) | -0.0055(4) | 0.0002(3) | 0.0055(4) |
| O3 | 0.0183(3) | 0.0317(4) | 0.0208(3) | -0.0029(3) | 0.0023(3) | 0.0062(3) |
| O4 | 0.0234(4) | 0.0407(4) | 0.0159(3) | 0.0129(4) | 0.0011(3) | 0.0004(3) |
| O5 | 0.0304(4) | 0.0300(4) | 0.0155(3) | 0.0037(4) | 0.0030(3) | -0.0006(3) |
| C1 | 0.0211(4) | 0.0207(5) | 0.0151(4) | 0.0010(4) | 0.0035(3) | 0.0001(4) |
| C2 | 0.0167(4) | 0.0210(5) | 0.0152(4) | -0.0004(4) | 0.0015(3) | 0.0030(4) |
| C3 | 0.0200(4) | 0.0221(5) | 0.0154(4) | 0.0023(4) | 0.0031(3) | 0.0016(4) |
| C4 | 0.0211(5) | 0.0236(5) | 0.0159(4) | 0.0026(4) | 0.0033(4) | 0.0016(4) |
| C5 | 0.0238(5) | 0.0272(5) | 0.0178(4) | -0.0014(4) | 0.0029(4) | 0.0001(4) |
| C6 | 0.0203(4) | 0.0207(5) | 0.0183(4) | 0.0017(4) | 0.0037(4) | -0.0002(4) |
| C7 | 0.0247(5) | 0.0256(5) | 0.0317(5) | -0.0018(5) | 0.0038(4) | -0.0048(5) |

| | | | | | | |
|-----|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|------------|
| C8 | 0.0256(5) | 0.0284(6) | 0.0414(6) | -0.0053(5) | 0.0082(5) | 0.0007(5) |
| C9 | 0.0267(5) | 0.0340(6) | 0.0301(5) | 0.0031(5) | 0.0143(4) | 0.0077(5) |
| C10 | 0.0361(6) | 0.0357(6) | 0.0253(5) | 0.0003(6) | 0.0123(4) | -0.0060(5) |
| C11 | 0.0288(6) | 0.0254(5) | 0.0247(5) | -0.0044(5) | 0.0088(4) | -0.0056(4) |

The form of the anisotropic displacement parameter is:

$\exp [-2\pi i \{h^2 a^2 U(1,1) + k^2 b^2 U(2,2) + l^2 c^2 U(3,3) + 2hkabU(1,2) + 2hlacU(1,3) + 2klbcU(2,3)\}]$ where a, b and c are reciprocal lattice constants.

Table of Bond Distances in Angstroms

| Atom 1 | Atom 2 | Distance | Atom 1 | Atom 2 | Distance |
|--------|--------|----------|--------|--------|----------|
| F | C9 | 1.354(2) | C3 | C4 | 1.537(2) |
| O2 | C2 | 1.407(1) | C4 | C5 | 1.523(2) |
| O3 | C3 | 1.426(1) | C6 | C7 | 1.391(2) |
| O4 | C1 | 1.435(1) | C6 | C11 | 1.392(2) |
| O4 | C4 | 1.443(1) | C7 | C8 | 1.391(2) |
| O5 | C5 | 1.429(2) | C8 | C9 | 1.377(2) |
| C1 | C2 | 1.526(2) | C9 | C10 | 1.367(2) |
| C1 | C6 | 1.501(2) | C10 | C11 | 1.396(2) |
| C2 | C3 | 1.529(1) | | | |

Numbers in parentheses are estimated standard deviations in the least significant digits.

Table of Bond Angles in Degrees

| Atom 1 | Atom 2 | Atom 3 | Angle | Atom 1 | Atom 2 | Atom 3 | Angle |
|--------|--------|--------|-----------|--------|--------|--------|----------|
| C1 | O4 | C4 | 108.77(8) | C3 | C4 | C5 | 113.8(1) |
| O4 | C1 | C2 | 102.60(9) | O5 | C5 | C4 | 111.3(1) |
| O4 | C1 | C6 | 111.51(9) | C1 | C6 | C7 | 121.6(1) |
| C2 | C1 | C6 | 115.06(9) | C1 | C6 | C11 | 119.0(1) |
| O2 | C2 | C1 | 114.10(9) | C7 | C6 | C11 | 119.4(1) |
| O2 | C2 | C3 | 112.27(9) | C6 | C7 | C8 | 120.6(1) |
| C1 | C2 | C3 | 101.33(8) | C7 | C8 | C9 | 118.2(1) |
| O3 | C3 | C2 | 110.41(9) | F | C9 | C8 | 118.1(1) |
| O3 | C3 | C4 | 109.21(9) | F | C9 | C10 | 118.7(1) |
| C2 | C3 | C4 | 101.40(9) | C8 | C9 | C10 | 123.2(1) |

| | | | | | | | |
|----|----|----|-----------|----|-----|-----|----------|
| O4 | C4 | C3 | 106.87(8) | C9 | C10 | C11 | 118.2(1) |
| O4 | C4 | C5 | 107.7(1) | C6 | C11 | C10 | 120.5(1) |

Numbers in parentheses are estimated standard deviations in the least significant digits.

Table of Torsion Angles in Degrees

| Atom 1 | Atom 2 | Atom 3 | Atom 4 | Angle |
|--------|--------|--------|--------|-----------------|
| C4 | O4 | C1 | C2 | -32.34 (0.11) |
| C4 | O4 | C1 | C6 | -156.02 (0.10) |
| C1 | O4 | C4 | C3 | 8.22 (0.12) |
| C1 | O4 | C4 | C5 | 130.87 (0.10) |
| O4 | C1 | C2 | O2 | 164.27 (0.09) |
| O4 | C1 | C2 | C3 | 43.40 (0.10) |
| C6 | C1 | C2 | O2 | -74.45 (0.12) |
| C6 | C1 | C2 | C3 | 164.69 (0.09) |
| O4 | C1 | C6 | C7 | 44.79 (0.15) |
| O4 | C1 | C6 | C11 | -138.46 (0.11) |
| C2 | C1 | C6 | C7 | -71.52 (0.14) |
| C2 | C1 | C6 | C11 | 105.24 (0.12) |
| O2 | C2 | C3 | O3 | -43.88 (0.13) |
| O2 | C2 | C3 | C4 | -159.55 (0.10) |
| C1 | C2 | C3 | O3 | 78.26 (0.10) |
| C1 | C2 | C3 | C4 | -37.41 (0.10) |
| O3 | C3 | C4 | O4 | -97.41 (0.10) |
| O3 | C3 | C4 | C5 | 143.88 (0.09) |
| C2 | C3 | C4 | O4 | 19.14 (0.12) |
| C2 | C3 | C4 | C5 | -99.57 (0.11) |
| O4 | C4 | C5 | O5 | 167.33 (0.09) |
| C3 | C4 | C5 | O5 | -74.41 (0.12) |
| C1 | C6 | C7 | C8 | 178.10 (0.11) |
| C11 | C6 | C7 | C8 | 1.36 (0.19) |
| C1 | C6 | C11 | C10 | -177.99 (0.11) |
| C7 | C6 | C11 | C10 | -1.16 (0.18) |
| C6 | C7 | C8 | C9 | -0.17 (0.20) |
| C7 | C8 | C9 | F | 177.50 (0.11) |
| C7 | C8 | C9 | C10 | -1.30 (0.21) |
| F | C9 | C10 | C11 | -177.31 (0.12) |
| C8 | C9 | C10 | C11 | 1.49 (0.21) |
| C9 | C10 | C11 | C6 | -0.22 (0.20) |

Table of Least-Squares Planes

Orthonormal Equation of Plane 1

$$-0.5367 X + 0.5981 Y + -0.5952 Z - -7.2520 = 0$$

$$0.0004 \quad 0.0005 \quad 0.0004 \quad 0.0039$$

Crystallographic Equation of Plane

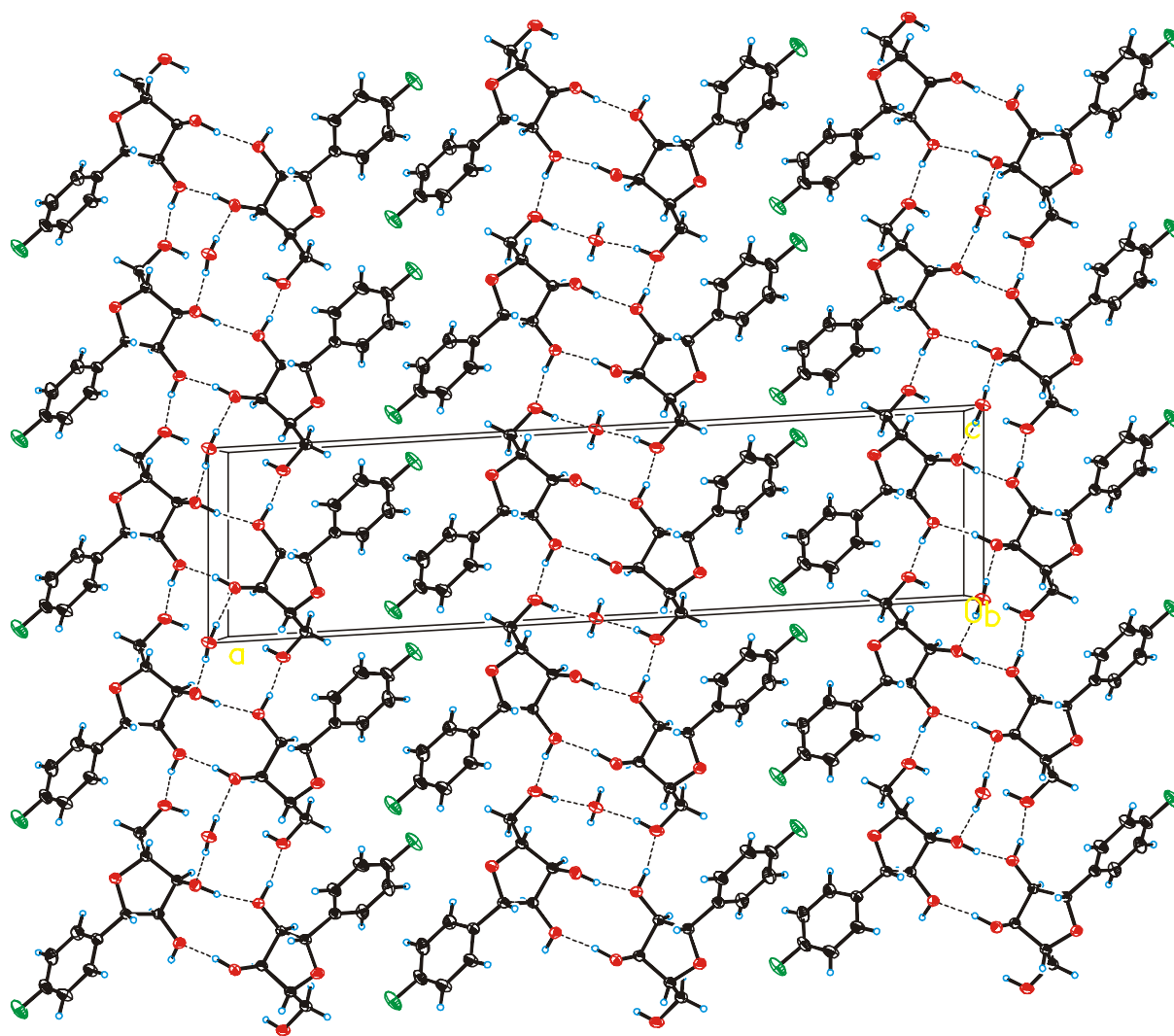
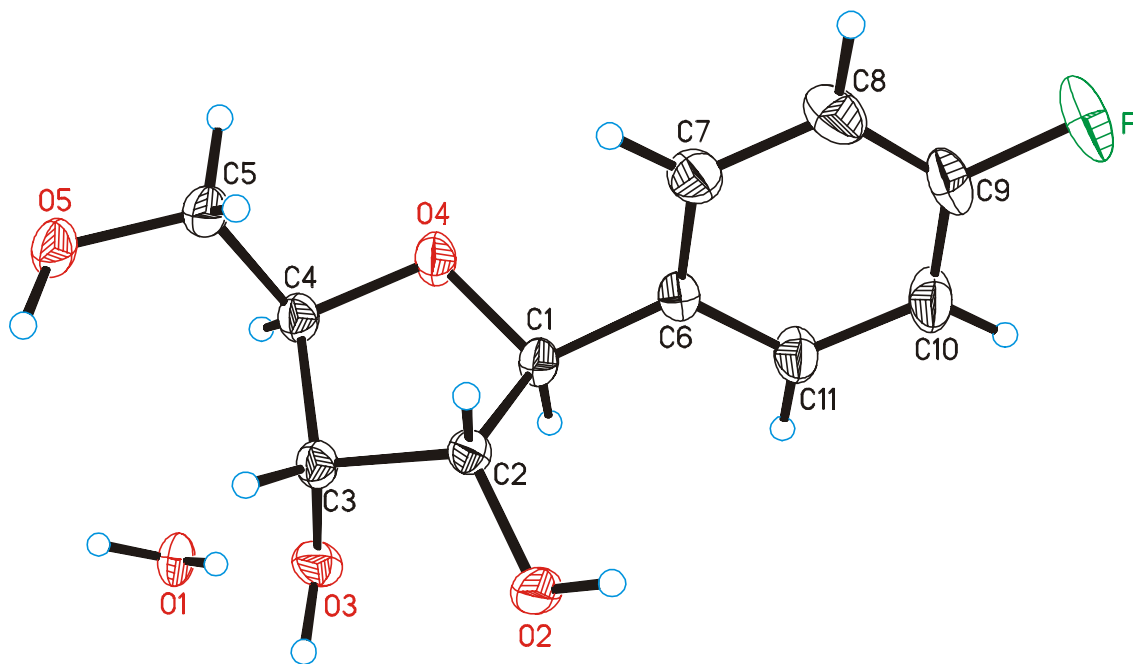
$$-15.7546 X + 3.1740 Y + -4.1482 Z - -7.2520 = 0$$

$$0.0132 \quad 0.0024 \quad 0.0093 \quad 0.0039$$

| Atom | X | Y | Z | Distance | Esd |
|---------------------|--------|---------|--------|----------|------------|
| C6 | 9.8571 | 0.6173 | 3.9017 | 0.0089 | + - 0.0011 |
| C7 | 8.9080 | -0.3911 | 3.7683 | -0.0055 | + - 0.0013 |
| C8 | 7.8352 | -0.4735 | 4.6496 | -0.0036 | + - 0.0014 |
| C9 | 7.7449 | 0.4656 | 5.6530 | 0.0093 | + - 0.0013 |
| C10 | 8.6707 | 1.4549 | 5.8375 | -0.0056 | + - 0.0014 |
| C11 | 9.7410 | 1.5310 | 4.9452 | -0.0035 | + - 0.0013 |
| Chi Squared = 161.5 | | | | | |

----- Other Atoms -----

| | | | | | |
|----|---------|--------|--------|---------|------------|
| F | 6.6730 | 0.4162 | 6.4794 | 0.0632 | + - 0.0007 |
| C1 | 11.0459 | 0.7027 | 2.9896 | -0.0352 | + - 0.0011 |



A3 1'-Desoxy-1'-(4-fluorophenyl)- β -D-ribofuranose 34 kristallisiert aus Methanol bei 20°C

Crystal data of 1'-Deoxy-1'-(4-fluorophenyl)- β -D -ribofuranose at -139°C from methanol

| | |
|-----------------------------------|--|
| formula | C ₁₁ H ₁₃ O ₄ F |
| mol. weight | 228.22 |
| crystal color | colorless, transparent |
| crystal shape | plate |
| crystal dimensions | 0.15 x 0.64 x 1.30 mm |
| crystal system | orthorhombic |
| space group | P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ |
| space group number | 19 |
| a | 5.4741(9) Å |
| b | 7.3018(7) Å |
| c | 26.791(3) Å |
| V | 1070.9(3) Å ³ |
| Z | 4 |
| D _{calc} | 1.415 g/cm ³ |
| linear absorption coeff. | 1.11 cm ⁻¹ |
| radiation | Mo-K α |
| scan range | sphere |
| (2 theta)max | 64° |
| resolution | 0.67 Å |
| number of reflections measured | 18821 |
| number of independent reflections | 3417 |
| reflections used with I > 0 | 3403 |
| number of variables | 197 |

| | |
|-------|-------|
| R(F) | 0.035 |
| wR(F) | 0.040 |
| S | 1.39 |

A single crystal was measured on a SIEMENS SMART diffractometer at a temperature of about -139°C . Repeatedly measured reflections remained stable. An empirical absorption correction using program SADABS gave an effective transmission range from 0.901 to 1.000. Equivalent reflections were averaged. Bijvoet pairs of reflections were not averaged. $R(\text{I})_{\text{internal}} = 0.019$. The structure was determined by direct methods using program SHELXS. The H atoms were taken from a difference Fourier synthesis and were refined with isotropic thermal parameters. The non-H atoms were refined with anisotropic thermal parameters. The structure was refined on F values using weighting scheme:

$$w(\text{F}) = 4 * \text{F}^2 / [\text{sigma}^2(\text{F}^2) + (0.03 * \text{F}^2)^2].$$

The final difference density was between -0.18 and $+0.30 \text{ e}/\text{\AA}^3$. The calculations were performed with the SMART, SHELX and MOLEN program systems.

Discussion of the Structure

The ribofuranose ring approximately has an unsymmetrical twist conformation with atoms C1 0.23 \AA below and C2 0.39 \AA above the plane through atoms O4, C4 and C3 (C1'-exo, C2'-endo). The related structure of 1-phenyl- β -D-ribofuranose (Matulic-Adamic *et al.*, 1996) on the other hand has a conformation close to a C2'-endo, C3'-exo twist. These different conformations may result from different crystal packings of both structures. The phenyl group attached to C1 and the hydroxyl group attached to C2 are in equatorial positions, the hydroxyl group attached to C3 is in an axial position with respect to the five-membered ring. The molecule shows no short intramolecular contact distances.

The crystal packing shows three intermolecular hydrogen bonds:

Hydrogen bonds:

| O - H ... O | O - H | H ... O | O ... O | O - H - O | symmetry |
|-----------------|------------------|------------------|------------------|-----------|-------------------|
| | [\AA] | [\AA] | [\AA] | [deg] | |
| O2 - H02 ... O3 | 0.89(2) | 1.91(2) | 2.729(1) | 153(2) | 1-x, 0.5+y, 1.5-z |
| O3 - H03 ... O5 | 0.79(1) | 2.02(2) | 2.775(1) | 161(2) | 2-x, 0.5+y, 1.5-z |
| O5 - H05 ... O2 | 0.76(2) | 1.93(2) | 2.683(1) | 172(2) | x, y-1, z |

In this way each molecule is connected by hydrogen bonding to six different neighboring molecules leading to a two-dimensional network in the a,b - direction. An additional intermolecular contact with a distance of 2.30(2) Å between F and H10 of a neighboring molecule (symmetry code: 0.5+x, 1.5-y, 2-z) approaches the van der Waals contact distance of 2.35 Å between F and H. Only weak electrostatic interactions connect the molecules in the crystallographic c - direction which is the thin dimension of the plate-shaped crystals.

Table of Positional Parameters and Their Estimated Standard Deviations

| Atom | x | y | z | B(A ²) |
|------|-----------|------------|------------|--------------------|
| F | 0.5477(2) | 0.6308(1) | 1.01692(2) | 3.10(1) |
| O2 | 0.7688(1) | 0.33437(9) | 0.78924(3) | 1.52(1) |
| O3 | 0.6392(1) | -0.0039(1) | 0.74922(3) | 1.71(1) |
| O4 | 0.5899(2) | -0.0384(1) | 0.86969(3) | 1.98(1) |
| O5 | 1.0240(1) | -0.3719(1) | 0.81934(3) | 1.79(1) |
| C1 | 0.5638(2) | 0.1480(1) | 0.85406(3) | 1.40(1) |
| C2 | 0.7842(2) | 0.1767(1) | 0.81958(3) | 1.25(1) |
| C3 | 0.7997(2) | -0.0056(1) | 0.79135(3) | 1.30(1) |
| C4 | 0.7078(2) | -0.1420(1) | 0.83051(3) | 1.52(1) |
| C5 | 0.9145(2) | -0.2511(1) | 0.85454(3) | 1.75(2) |
| C6 | 0.5573(2) | 0.2736(1) | 0.89836(3) | 1.40(1) |
| C7 | 0.7353(2) | 0.2621(2) | 0.93563(3) | 1.92(2) |
| C8 | 0.7337(2) | 0.3840(2) | 0.97559(4) | 2.18(2) |
| C9 | 0.5538(2) | 0.5154(2) | 0.97717(4) | 2.04(2) |
| C10 | 0.3779(2) | 0.5331(2) | 0.94092(4) | 2.36(2) |
| C11 | 0.3819(2) | 0.4099(2) | 0.90132(4) | 1.88(2) |
| H1 | 0.423(2) | 0.167(2) | 0.8331(3) | 0.6(2)* |
| H2 | 0.931(2) | 0.190(2) | 0.8400(4) | 1.3(2)* |
| H02 | 0.624(3) | 0.350(2) | 0.7748(4) | 3.1(3)* |
| H3 | 0.965(2) | -0.035(2) | 0.7802(3) | 1.1(2)* |
| H03 | 0.708(3) | 0.047(2) | 0.7274(4) | 3.6(4)* |
| H4 | 0.577(2) | -0.223(2) | 0.8158(3) | 1.1(2)* |
| H05 | 0.939(3) | -0.449(2) | 0.8111(4) | 2.9(3)* |
| H5B | 1.042(3) | -0.166(2) | 0.8654(4) | 1.9(3)* |
| H5A | 0.855(3) | -0.316(2) | 0.8823(5) | 3.0(3)* |
| H7 | 0.864(3) | 0.169(2) | 0.9347(4) | 2.6(3)* |
| H8 | 0.862(3) | 0.381(2) | 1.0018(5) | 2.4(3)* |

| | | | | |
|-----|----------|----------|-----------|---------|
| H10 | 0.255(3) | 0.634(3) | 0.9448(5) | 4.2(4)* |
| H11 | 0.261(3) | 0.415(2) | 0.8779(4) | 2.9(3)* |

Starred atoms were refined isotropically.

Anisotropically refined atoms are given in the form of the isotropic equivalent displacement parameter defined as:

$$(4/3) * [a^2*B(1,1) + b^2*B(2,2) + c^2*B(3,3) + ab(\cos \gamma)*B(1,2) + ac(\cos \beta)*B(1,3) + bc(\cos \alpha)*B(2,3)]$$

Table of General Displacement Parameter Expressions - U's

| Name | U(1,1) | U(2,2) | U(3,3) | U(1,2) | U(1,3) | U(2,3) |
|------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| F | 0.0467(4) | 0.0371(3) | 0.0341(3) | -0.0061(4) | 0.0023(3) | -0.0213(3) |
| O2 | 0.0220(3) | 0.0133(3) | 0.0224(3) | -0.0009(3) | -0.0004(3) | 0.0015(3) |
| O3 | 0.0260(3) | 0.0210(3) | 0.0178(3) | -0.0041(3) | -0.0044(3) | -0.0014(3) |
| O4 | 0.0363(4) | 0.0143(3) | 0.0246(3) | 0.0001(3) | 0.0105(3) | 0.0004(3) |
| O5 | 0.0260(3) | 0.0150(3) | 0.0272(3) | 0.0005(3) | -0.0012(3) | -0.0032(3) |
| C1 | 0.0183(3) | 0.0154(4) | 0.0197(3) | -0.0000(3) | 0.0010(3) | -0.0017(3) |
| C2 | 0.0167(3) | 0.0135(3) | 0.0172(3) | 0.0003(3) | -0.0005(3) | -0.0016(3) |
| C3 | 0.0194(4) | 0.0144(3) | 0.0157(3) | 0.0000(3) | -0.0009(3) | -0.0018(3) |
| C4 | 0.0245(4) | 0.0138(4) | 0.0196(3) | -0.0010(4) | 0.0009(3) | -0.0018(3) |
| C5 | 0.0302(5) | 0.0171(4) | 0.0192(4) | 0.0008(4) | -0.0024(4) | -0.0005(4) |
| C6 | 0.0187(4) | 0.0167(4) | 0.0176(3) | 0.0003(3) | 0.0011(3) | -0.0013(3) |
| C7 | 0.0224(4) | 0.0293(5) | 0.0212(4) | 0.0058(4) | -0.0019(4) | -0.0026(4) |
| C8 | 0.0252(5) | 0.0359(5) | 0.0216(4) | 0.0001(5) | -0.0024(4) | -0.0064(4) |
| C9 | 0.0305(5) | 0.0228(4) | 0.0244(4) | -0.0062(4) | 0.0033(4) | -0.0090(4) |
| C10 | 0.0326(5) | 0.0227(4) | 0.0343(5) | 0.0075(4) | 0.0002(5) | -0.0083(4) |
| C11 | 0.0239(4) | 0.0223(4) | 0.0251(4) | 0.0062(4) | -0.0039(4) | -0.0048(4) |

The form of the anisotropic displacement parameter is:

$$\exp [-2\pi^2 \{h^2a^2U(1,1) + k^2b^2U(2,2) + l^2c^2U(3,3) + 2hkabU(1,2) + 2hlacU(1,3) + 2klbcU(2,3)\}]$$

where a, b and c are reciprocal lattice constants.

Table of Bond Distances in Angstroms

| Atom 1 | Atom 2 | Distance | Atom 1 | Atom 2 | Distance |
|--------|--------|----------|--------|--------|----------|
| F | C9 | 1.358(1) | C3 | C4 | 1.532(1) |
| O2 | C2 | 1.412(1) | C4 | C5 | 1.526(1) |
| O3 | C3 | 1.430(1) | C6 | C7 | 1.397(1) |
| O4 | C1 | 1.431(1) | C6 | C11 | 1.385(1) |
| O4 | C4 | 1.446(1) | C7 | C8 | 1.392(2) |
| O5 | C5 | 1.423(1) | C8 | C9 | 1.376(2) |
| C1 | C2 | 1.534(1) | C9 | C10 | 1.374(2) |
| C1 | C6 | 1.501(1) | C10 | C11 | 1.391(2) |
| C2 | C3 | 1.534(1) | | | |

Numbers in parentheses are estimated standard deviations in the least significant digits.

Table of Bond Angles in Degrees

| Atom 1 | Atom 2 | Atom 3 | Angle | Atom 1 | Atom 2 | Atom 3 | Angle |
|--------|--------|--------|-----------|--------|--------|--------|-----------|
| C1 | O4 | C4 | 109.24(7) | C3 | C4 | C5 | 112.65(8) |
| O4 | C1 | C2 | 103.18(8) | O5 | C5 | C4 | 110.86(7) |
| O4 | C1 | C6 | 110.64(7) | C1 | C6 | C7 | 120.76(9) |
| C2 | C1 | C6 | 114.30(8) | C1 | C6 | C11 | 120.07(9) |
| O2 | C2 | C1 | 114.32(8) | C7 | C6 | C11 | 119.06(9) |
| O2 | C2 | C3 | 115.29(7) | C6 | C7 | C8 | 120.4(1) |
| C1 | C2 | C3 | 102.82(7) | C7 | C8 | C9 | 118.3(1) |
| O3 | C3 | C2 | 110.33(7) | F | C9 | C8 | 118.32(9) |
| O3 | C3 | C4 | 110.17(8) | F | C9 | C10 | 118.6(1) |
| C2 | C3 | C4 | 102.04(7) | C8 | C9 | C10 | 123.1(1) |
| O4 | C4 | C3 | 107.68(7) | C9 | C10 | C11 | 117.8(1) |
| O4 | C4 | C5 | 107.32(7) | C6 | C11 | C10 | 121.3(1) |

Numbers in parentheses are estimated standard deviations in the least significant digits.

Table of Torsion Angles in Degrees

| Atom 1 | Atom 2 | Atom 3 | Atom 4 | Angle |
|--------|--------|--------|--------|-----------------|
| C4 | O4 | C1 | C2 | -30.51 (0.09) |
| C4 | O4 | C1 | C6 | -153.19 (0.08) |
| C1 | O4 | C4 | C3 | 9.84 (0.10) |
| C1 | O4 | C4 | C5 | 131.36 (0.08) |
| O4 | C1 | C2 | O2 | 164.74 (0.07) |
| O4 | C1 | C2 | C3 | 39.03 (0.08) |
| C6 | C1 | C2 | O2 | -75.06 (0.10) |
| C6 | C1 | C2 | C3 | 159.23 (0.08) |
| O4 | C1 | C6 | C7 | 50.07 (0.12) |
| O4 | C1 | C6 | C11 | -133.64 (0.10) |
| C2 | C1 | C6 | C7 | -65.87 (0.12) |
| C2 | C1 | C6 | C11 | 110.41 (0.11) |
| O2 | C2 | C3 | O3 | -40.31 (0.10) |
| O2 | C2 | C3 | C4 | -157.37 (0.08) |
| C1 | C2 | C3 | O3 | 84.76 (0.08) |
| C1 | C2 | C3 | C4 | -32.30 (0.09) |
| O3 | C3 | C4 | O4 | -102.22 (0.09) |
| O3 | C3 | C4 | C5 | 139.64 (0.08) |
| C2 | C3 | C4 | O4 | 14.96 (0.10) |
| C2 | C3 | C4 | C5 | -103.19 (0.08) |
| O4 | C4 | C5 | O5 | 173.88 (0.08) |
| C3 | C4 | C5 | O5 | -67.77 (0.10) |
| C1 | C6 | C7 | C8 | 177.40 (0.10) |
| C11 | C6 | C7 | C8 | 1.08 (0.16) |
| C1 | C6 | C11 | C10 | -177.27 (0.10) |
| C7 | C6 | C11 | C10 | -0.92 (0.16) |
| C6 | C7 | C8 | C9 | -0.25 (0.18) |
| C7 | C8 | C9 | F | 178.02 (0.10) |
| C7 | C8 | C9 | C10 | -0.78 (0.17) |
| F | C9 | C10 | C11 | -177.86 (0.10) |
| C8 | C9 | C10 | C11 | 0.93 (0.17) |
| C9 | C10 | C11 | C6 | -0.06 (0.21) |

Table of Least-Squares Planes

Orthonormal Equation of Plane 1

$$0.5916 X + 0.6212 Y + -0.5138 Z - -9.3141 = 0$$

$$0.0004 \quad 0.0004 \quad 0.0004 \quad 0.0106$$

Crystallographic Equation of Plane

$$3.2387 X + 4.5362 Y + -13.7660 Z - -9.3141 = 0$$

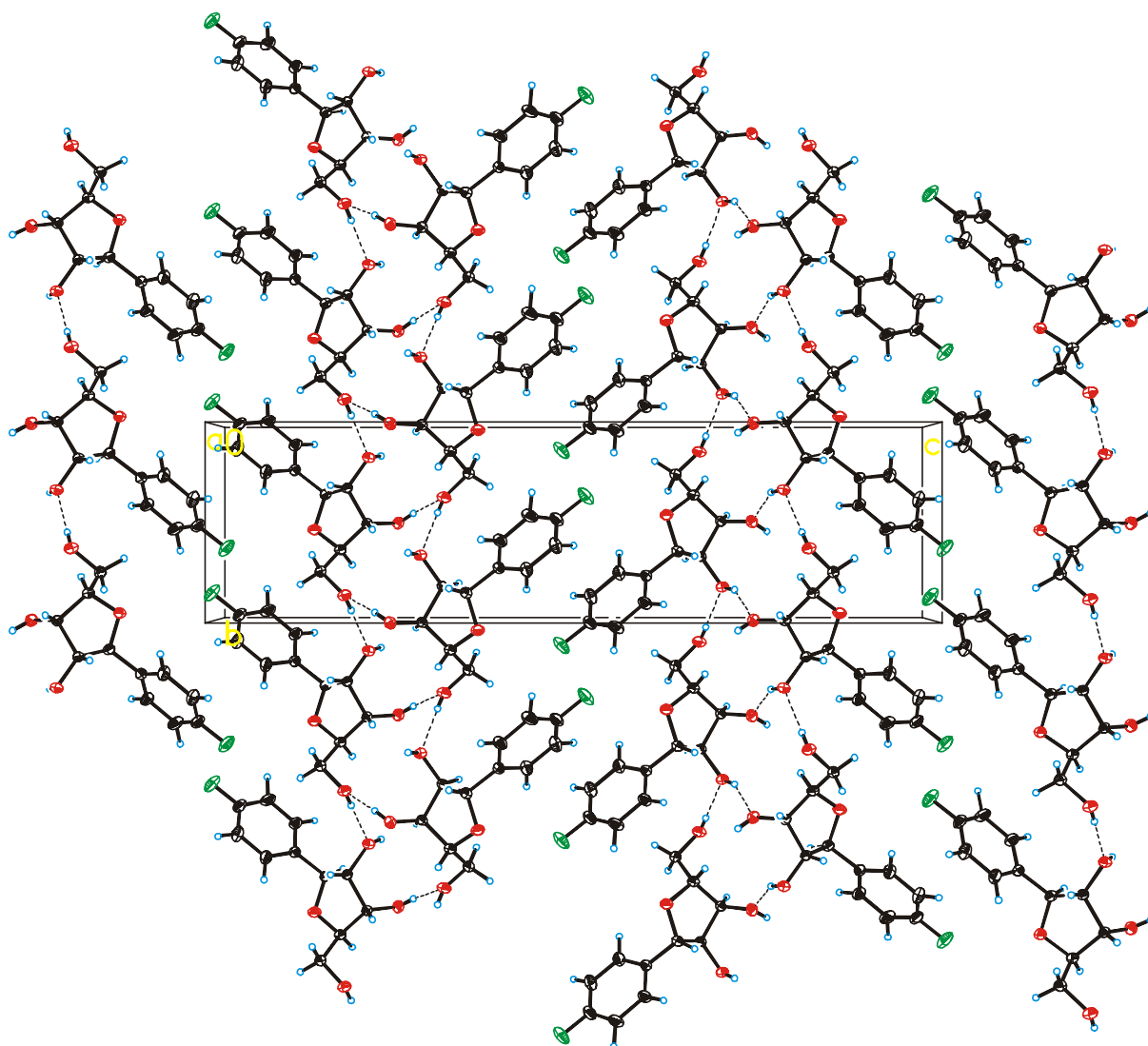
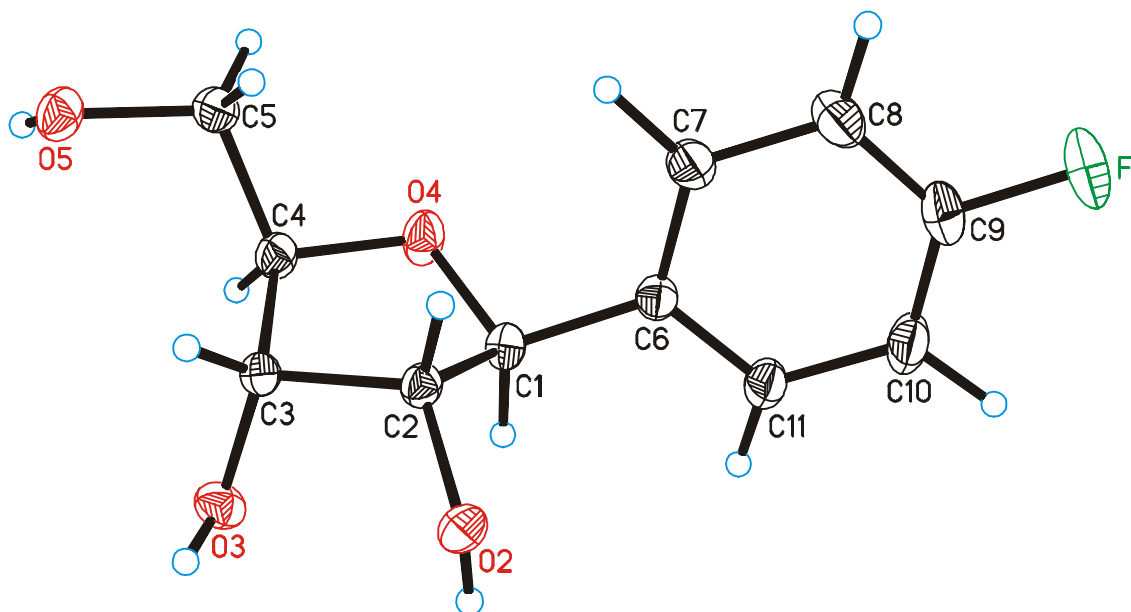
$$0.0021 \quad 0.0026 \quad 0.0103 \quad 0.0106$$

| Atom | X | Y | Z | Distance | Esd |
|------|--------|--------|---------|----------|------------|
| C6 | 3.0507 | 1.9980 | 24.0681 | -0.0066 | + - 0.0010 |
| C7 | 4.0249 | 1.9137 | 25.0665 | 0.0044 | + - 0.0011 |
| C8 | 4.0161 | 2.8036 | 26.1371 | 0.0020 | + - 0.0012 |
| C9 | 3.0315 | 3.7633 | 26.1794 | -0.0061 | + - 0.0011 |
| C10 | 2.0687 | 3.8928 | 25.2083 | 0.0037 | + - 0.0012 |
| C11 | 2.0907 | 2.9928 | 24.1474 | 0.0027 | + - 0.0011 |

Chi Squared = 113.4

----- Other Atoms -----

| | | | | | |
|----|--------|--------|---------|---------|------------|
| F | 2.9979 | 4.6057 | 27.2445 | -0.0499 | + - 0.0008 |
| C1 | 3.0865 | 1.0804 | 22.8812 | 0.0544 | + - 0.0010 |



**A4 1'-Desoxy-1'-(4-fluorophenyl)- β -D-ribofuranose 34 kristallisiert
aus Methanol bei 4°C**

Crystal data of 1'-Desoxy-1'-(4-fluorophenyl)- β -D-ribofuranose at -138°C from methanol

| | |
|-----------------------------------|--|
| formula | C ₁₁ H ₁₃ O ₄ F |
| mol. weight | 228.22 |
| crystal color | colorless, transparent |
| crystal shape | large rod |
| crystal dimensions | 0.28 x 0.45 x 0.66 mm |
| crystal system | orthorhombic |
| space group | P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ |
| space group number | 19 |
| a | 6.711(1) Å |
| b | 6.7653(7) Å |
| c | 22.846(3) Å |
| V | 1037.2(3) Å ³ |
| Z | 4 |
| D _{calc} | 1.461 g/cm ³ |
| linear absorption coeff. | 1.21 cm ⁻¹ |
| radiation | Mo-K α |
| scan range | sphere |
| (2 theta)max | 65° |
| resolution | 0.66 Å |
| number of reflections measured | 19988 |
| number of independent reflections | 3512 |
| reflections used with I > 0 | 3470 |
| number of variables | 198 |

| | |
|-------|-------|
| R(F) | 0.050 |
| wR(F) | 0.036 |
| S | 0.85 |

A single crystal was measured on a SIEMENS SMART diffractometer at a temperature of about -138°C . Repeatedly measured reflections remained stable. A numerical absorption correction was made based on six crystal faces. The transmission factor ranged from 0.932 to 0.968. Equivalent reflections were averaged. Bijvoet pairs of reflections were not averaged. $R(\text{I})_{\text{internal}} = 0.057$. The structure was determined by direct methods using program SHELXS. The H atoms were taken from a difference Fourier synthesis and were refined with isotropic thermal parameters. The non-H atoms were refined with anisotropic thermal parameters. The structure was refined on F values using weighting scheme:

$$w(\text{F}) = 4 * \text{F}^2 / [\text{sigma}^2(\text{F}^2) + (0.03 * \text{F}^2)^2].$$

The final difference density was between -0.20 and $+0.30 \text{ e}/\text{\AA}^3$. The calculations were performed with the SMART, SHELX and MOLEN program systems.

Discussion of the Structure

The ribofuranose ring has a conformation which is intermediate between a C2-endo,C3-exo twist and a C2-endo envelope. The conformation of the molecule is rather similar to the conformation observed in 1-deoxy-1-(3-fluorophenyl)- β -D-ribofuranose (Bats *et al.*, 1999) and the conformation observed in 1-deoxy-1-phenyl- β -D-ribofuranose (Matulic-Adamic *et al.*, 1996).

The phenyl group attached to C1 is in a bisecting position, the hydroxyl group attached to C2 is in pseudo-equatorial position, the hydroxyl group attached to C3 and the methanol group attached to C4 are in a pseudo-axial positions with respect to the five-membered ring. The shortest intramolecular contact distance is $2.44(1) \text{ \AA}$ between O4 and H7.

The crystal packing shows three intermolecular hydrogen bonds:

Hydrogen bonds:

| O - H ... O | O - H | H ... O | O ... O | O - H - O | symmetry |
|-----------------|---------|---------|----------|-----------|-------------------|
| | [Å] | [Å] | [Å] | [deg] | |
| O2 - H02 ... O5 | 0.79(1) | 1.95(1) | 2.708(1) | 161(1) | x-1, y, z |
| O3 - H03 ... O2 | 0.78(2) | 1.95(2) | 2.722(1) | 171(1) | -x, y-0.5, 1.5-z |
| O5 - H05 ... O3 | 0.83(1) | 1.97(1) | 2.784(1) | 170(1) | 1-x, y-0.5, 1.5-z |

In this way each molecule is connected by hydrogen bonding to six different neighboring molecules leading to a two-dimensional network in the a,b - direction. The bonding in the c - direction consists of weak intermolecular C10-H10...F interactions with a H...F distance of 2.42(1) Å and a weak intermolecular C8-H8...Cg interaction with a H...Cg distance of 2.84 Å (Cg is the ring centroid of the phenyl ring).

Table of Positional Parameters and Their Estimated Standard Deviations

| Atom | x | y | z | B(A2) |
|------|------------|-----------|------------|---------|
| F | 0.3375(1) | 1.1135(1) | 0.46229(3) | 3.62(2) |
| O2 | -0.0661(1) | 0.5746(1) | 0.67097(4) | 1.56(1) |
| O3 | 0.1309(1) | 0.4104(1) | 0.76621(3) | 1.64(1) |
| O4 | 0.4643(1) | 0.5645(1) | 0.68273(4) | 1.60(2) |
| O5 | 0.7325(1) | 0.2278(1) | 0.66745(4) | 1.70(2) |
| C1 | 0.2813(2) | 0.6619(2) | 0.66805(5) | 1.23(2) |
| C2 | 0.1270(2) | 0.4957(2) | 0.66330(5) | 1.24(2) |
| C3 | 0.1978(2) | 0.3493(2) | 0.70967(5) | 1.25(2) |
| C4 | 0.4242(2) | 0.3667(2) | 0.70449(5) | 1.25(2) |
| C5 | 0.5201(2) | 0.2160(2) | 0.66472(5) | 1.55(2) |
| C6 | 0.3034(2) | 0.7840(2) | 0.61309(5) | 1.41(2) |
| C7 | 0.4729(2) | 0.7748(2) | 0.57827(5) | 1.93(2) |
| C8 | 0.4862(2) | 0.8876(2) | 0.52745(6) | 2.47(3) |
| C9 | 0.3288(2) | 1.0064(2) | 0.51276(5) | 2.42(3) |
| C10 | 0.1599(2) | 1.0218(2) | 0.54618(6) | 2.21(3) |
| C11 | 0.1486(2) | 0.9098(2) | 0.59700(5) | 1.71(2) |
| H1 | 0.239(2) | 0.747(2) | 0.7015(5) | 0.8(2)* |
| H2 | 0.141(2) | 0.441(2) | 0.6231(5) | 1.4(3)* |
| H02 | -0.147(2) | 0.490(2) | 0.6686(5) | 3.0(3)* |
| H3 | 0.146(2) | 0.219(2) | 0.7017(5) | 1.6(3)* |
| H03 | 0.121(2) | 0.319(2) | 0.7865(6) | 3.9(4)* |

| | | | | |
|-----|----------|----------|-----------|---------|
| H4 | 0.484(2) | 0.358(2) | 0.7422(5) | 0.7(2)* |
| H5B | 0.483(2) | 0.246(2) | 0.6240(5) | 1.7(3)* |
| H5A | 0.478(2) | 0.082(2) | 0.6781(5) | 1.6(3)* |
| H05 | 0.772(2) | 0.143(2) | 0.6907(5) | 2.7(3)* |
| H7 | 0.580(2) | 0.693(2) | 0.5888(5) | 2.6(3)* |
| H8 | 0.594(2) | 0.883(2) | 0.5043(6) | 2.6(3)* |
| H10 | 0.061(2) | 1.099(2) | 0.5352(5) | 2.7(3)* |
| H11 | 0.026(2) | 0.922(2) | 0.6215(5) | 0.5(2)* |

Starred atoms were refined isotropically. Anisotropically refined atoms are given in the form of the isotropic equivalent displacement parameter defined as:

$$(4/3) * [a^2 * B(1,1) + b^2 * B(2,2) + c^2 * B(3,3) + ab(\cos \gamma) * B(1,2) + ac(\cos \beta) * B(1,3) + bc(\cos \alpha) * B(2,3)]$$

Table of General Displacement Parameter Expressions - U's

| Name | U(1,1) | U(2,2) | U(3,3) | U(1,2) | U(1,3) | U(2,3) |
|------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| F | 0.0744(6) | 0.0365(4) | 0.0267(4) | -0.0138(5) | 0.0020(4) | 0.0120(4) |
| O2 | 0.0123(3) | 0.0168(4) | 0.0300(4) | -0.0002(3) | 0.0002(4) | -0.0017(4) |
| O3 | 0.0247(4) | 0.0188(4) | 0.0188(4) | -0.0025(4) | 0.0053(4) | 0.0013(4) |
| O4 | 0.0135(4) | 0.0125(4) | 0.0347(5) | -0.0007(3) | -0.0016(4) | 0.0036(4) |
| O5 | 0.0144(4) | 0.0184(4) | 0.0319(4) | 0.0003(3) | 0.0002(4) | 0.0025(4) |
| C1 | 0.0143(5) | 0.0142(4) | 0.0184(5) | -0.0004(4) | -0.0005(5) | -0.0021(5) |
| C2 | 0.0136(5) | 0.0148(4) | 0.0186(5) | -0.0004(4) | 0.0002(5) | -0.0021(5) |
| C3 | 0.0150(5) | 0.0145(4) | 0.0181(5) | -0.0027(5) | 0.0019(5) | -0.0018(4) |
| C4 | 0.0150(5) | 0.0145(5) | 0.0181(5) | -0.0009(4) | -0.0019(4) | 0.0004(5) |
| C5 | 0.0160(5) | 0.0169(5) | 0.0259(6) | -0.0010(5) | 0.0001(5) | -0.0036(5) |
| C6 | 0.0209(5) | 0.0130(5) | 0.0196(5) | -0.0039(5) | 0.0003(5) | -0.0032(4) |
| C7 | 0.0268(6) | 0.0181(5) | 0.0286(6) | -0.0003(5) | 0.0077(5) | -0.0025(5) |
| C8 | 0.0404(8) | 0.0262(7) | 0.0274(6) | -0.0073(6) | 0.0156(6) | -0.0022(6) |
| C9 | 0.0527(9) | 0.0201(5) | 0.0191(6) | -0.0111(7) | -0.0002(6) | 0.0027(5) |
| C10 | 0.0356(7) | 0.0205(6) | 0.0277(6) | -0.0014(6) | -0.0072(6) | 0.0045(5) |
| C11 | 0.0236(6) | 0.0189(5) | 0.0225(5) | -0.0017(5) | -0.0017(5) | 0.0004(5) |

The form of the anisotropic displacement parameter is:

$$\exp [-2\pi i \{h^2 a^2 U(1,1) + k^2 b^2 U(2,2) + l^2 c^2 U(3,3) + 2hkabU(1,2) + 2hlacU(1,3) + 2klbcU(2,3)\}] \text{ where } a, b \text{ and } c \text{ are reciprocal lattice constants.}$$

Table of Bond Distances in Angstroms

| Atom 1 | Atom 2 | Distance | Atom 1 | Atom 2 | Distance |
|--------|--------|----------|--------|--------|----------|
| F | C9 | 1.363(1) | C3 | C4 | 1.529(2) |
| O2 | C2 | 1.412(1) | C4 | C5 | 1.510(2) |
| O3 | C3 | 1.428(1) | C6 | C7 | 1.390(2) |
| O4 | C1 | 1.433(1) | C6 | C11 | 1.392(2) |
| O4 | C4 | 1.453(1) | C7 | C8 | 1.392(2) |
| O5 | C5 | 1.429(1) | C8 | C9 | 1.369(2) |
| C1 | C2 | 1.532(2) | C9 | C10 | 1.371(2) |
| C1 | C6 | 1.510(2) | C10 | C11 | 1.389(2) |
| C2 | C3 | 1.526(2) | | | |

Numbers in parentheses are estimated standard deviations in the least significant digits.

Table of Bond Angles in Degrees

| Atom 1 | Atom 2 | Atom 3 | Angle | Atom 1 | Atom 2 | Atom 3 | Angle |
|--------|--------|--------|-----------|--------|--------|--------|-----------|
| C1 | O4 | C4 | 110.18(8) | C3 | C4 | C5 | 114.75(9) |
| O4 | C1 | C2 | 104.96(8) | O5 | C5 | C4 | 111.18(9) |
| O4 | C1 | C6 | 111.23(9) | C1 | C6 | C7 | 122.1(1) |
| C2 | C1 | C6 | 114.13(9) | C1 | C6 | C11 | 118.7(1) |
| O2 | C2 | C1 | 109.53(9) | C7 | C6 | C11 | 119.2(1) |
| O2 | C2 | C3 | 116.39(9) | C6 | C7 | C8 | 120.3(1) |
| C1 | C2 | C3 | 102.51(9) | C7 | C8 | C9 | 118.5(1) |
| O3 | C3 | C2 | 110.01(9) | F | C9 | C8 | 119.1(1) |
| O3 | C3 | C4 | 111.11(9) | F | C9 | C10 | 117.8(1) |
| C2 | C3 | C4 | 101.88(9) | C8 | C9 | C10 | 123.1(1) |
| O4 | C4 | C3 | 106.34(9) | C9 | C10 | C11 | 118.0(1) |
| O4 | C4 | C5 | 109.70(9) | C6 | C11 | C10 | 120.9(1) |

Numbers in parentheses are estimated standard deviations in the least significant digits.

Table of Torsion Angles in Degrees

| Atom 1 | Atom 2 | Atom 3 | Atom 4 | Angle |
|--------|--------|--------|--------|-----------------|
| C4 | O4 | C1 | C2 | -17.28 (0.11) |
| C4 | O4 | C1 | C6 | -141.18 (0.09) |
| C1 | O4 | C4 | C3 | -6.36 (0.11) |
| C1 | O4 | C4 | C5 | 118.28 (0.10) |
| O4 | C1 | C2 | O2 | 158.02 (0.09) |
| O4 | C1 | C2 | C3 | 33.83 (0.11) |
| C6 | C1 | C2 | O2 | -79.96 (0.11) |
| C6 | C1 | C2 | C3 | 155.86 (0.09) |
| O4 | C1 | C6 | C7 | 8.66 (0.15) |
| O4 | C1 | C6 | C11 | -171.28 (0.10) |
| C2 | C1 | C6 | C7 | -109.85 (0.13) |
| C2 | C1 | C6 | C11 | 70.20 (0.13) |
| O2 | C2 | C3 | O3 | -38.15 (0.13) |
| O2 | C2 | C3 | C4 | -156.07 (0.09) |
| C1 | C2 | C3 | O3 | 81.35 (0.10) |
| C1 | C2 | C3 | C4 | -36.57 (0.10) |
| O3 | C3 | C4 | O4 | -89.99 (0.10) |
| O3 | C3 | C4 | C5 | 148.54 (0.10) |
| C2 | C3 | C4 | O4 | 27.14 (0.11) |
| C2 | C3 | C4 | C5 | -94.33 (0.11) |
| O4 | C4 | C5 | O5 | 66.98 (0.12) |
| C3 | C4 | C5 | O5 | -173.41 (0.09) |
| C1 | C6 | C7 | C8 | 179.04 (0.12) |
| C11 | C6 | C7 | C8 | -1.02 (0.18) |
| C1 | C6 | C11 | C10 | -178.57 (0.11) |
| C7 | C6 | C11 | C10 | 1.48 (0.18) |
| C6 | C7 | C8 | C9 | -0.21 (0.21) |
| C7 | C8 | C9 | F | -178.21 (0.12) |
| C7 | C8 | C9 | C10 | 1.05 (0.21) |
| F | C9 | C10 | C11 | 178.67 (0.11) |
| C8 | C9 | C10 | C11 | -0.60 (0.20) |
| C9 | C10 | C11 | C6 | -0.69 (0.19) |

Table of Least-Squares Planes

Orthonormal Equation of Plane 1

$$-0.4136 X + -0.7471 Y + -0.5204 Z - -12.1018 = 0$$

0.0005 0.0004 0.0005 0.0042

Crystallographic Equation of Plane

$$-2.7755 X + -5.0541 Y + -11.8895 Z - -12.1018 = 0$$

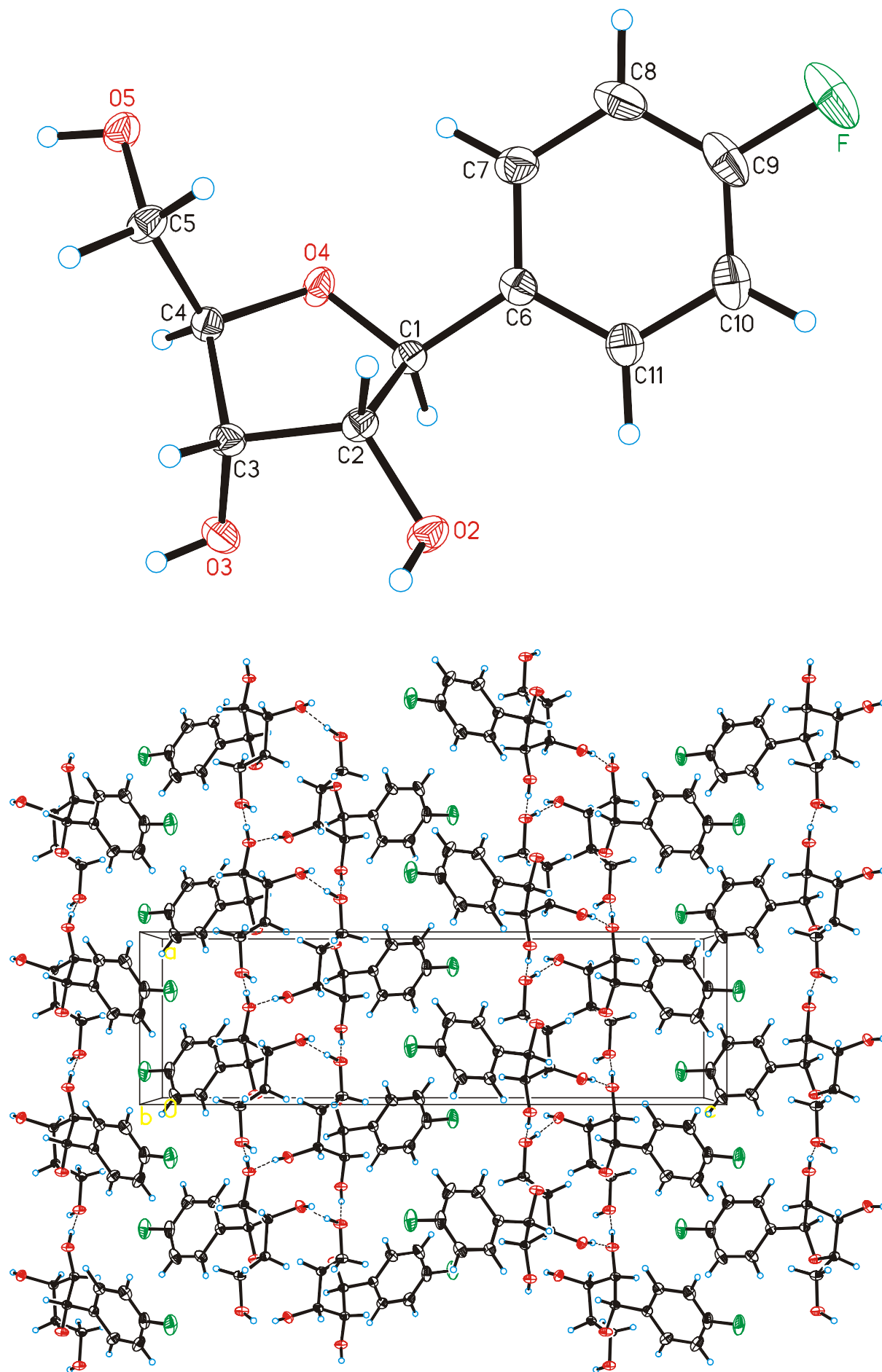
0.0033 0.0024 0.0103 0.0042

| Atom | X | Y | Z | Distance | Esd |
|------|--------|--------|---------|------------|--------|
| C6 | 2.0359 | 5.3041 | 14.0066 | 0.0079 +- | 0.0011 |
| C7 | 3.1739 | 5.2417 | 13.2109 | -0.0021 +- | 0.0013 |
| C8 | 3.2629 | 6.0051 | 12.0500 | -0.0051 +- | 0.0014 |
| C9 | 2.2067 | 6.8083 | 11.7145 | 0.0064 +- | 0.0013 |
| C10 | 1.0729 | 6.9130 | 12.4779 | -0.0003 +- | 0.0013 |
| C11 | 0.9970 | 6.1550 | 13.6389 | -0.0068 +- | 0.0012 |

Chi Squared = 117.6

----- Other Atoms -----

| | | | | | |
|----|--------|--------|---------|-----------|--------|
| C1 | 1.8877 | 4.4780 | 15.2620 | 0.0329 +- | 0.0011 |
| F | 2.2647 | 7.5333 | 10.5613 | 0.0408 +- | 0.0009 |



**A5 1'-Desoxy-1'-(3-fluorophenyl)- β -D-ribofuranose 35 kristallisiert
aus Methanol**

Crystal data of 1'-Desoxy-1'-(3-fluorophenyl)- β -D-ribofuranose at -133°C from methanol

| | |
|-----------------------------------|---|
| formula | $\text{C}_{11} \text{H}_{13} \text{O}_4 \text{F}$ |
| mol. weight | 228.22 |
| crystal color | colorless, transparent |
| crystal shape | rod |
| crystal dimensions | 0.18 x 0.44 x 0.60 mm |
| crystal system | monoclinic |
| space group | $P 2_1$ |
| space group number | 4 |
| a | 6.758(1) Å |
| b | 6.839(1) Å |
| c | 11.038(2) Å |
| β | $101.31(1)^{\circ}$ |
| V | 500.3(2) Å ³ |
| Z | 2 |
| D _{calc} | 1.515 g/cm ³ |
| linear absorption coeff. | 1.20 cm ⁻¹ |
| radiation | Mo-K α |
| scan range | sphere |
| (2 theta)max | 63° |
| resolution | 0.68 Å |
| number of reflections measured | 8291 |
| number of independent reflections | 2801 |
| reflections used with I > 0 | 2783 |

| | |
|---------------------|-------|
| number of variables | 197 |
| R(F) | 0.037 |
| wR(F) | 0.045 |
| S | 1.14 |

A single crystal was measured on a SIEMENS SMART diffractometer at a temperature of about -133°C . Repeatedly measured reflections remained stable. A numerical absorption correction based on six crystal faces gave a transmission range from 0.934 to 0.979. Equivalent reflections were averaged. Friedel opposites were not averaged. $R(\text{I})_{\text{internal}} = 0.059$. The structure was determined by direct methods using program SHELXS. The H atoms were taken from a difference Fourier synthesis and were refined with isotropic thermal parameters. The non-H atoms were refined with anisotropic thermal parameters. The structure was refined on F values using weighting scheme:

$$w(\text{F}) = 4 * \text{F}^2 / [\text{sigma}^2(\text{F}^2) + (0.03 * \text{F}^2)^2].$$

The final difference density was between -0.23 and $+0.30 \text{ e}/\text{\AA}^3$. The calculations were performed with the SMART, SHELX and MOLEN program systems.

Discussion of the Structure

The crystal structure of the title compound is isomorphous with the crystal structure of 1-phenyl- β -D-ribofuranose (Matulic-Adamic *et al.*, 1996). Thus the F atom attached to the phenyl group has no influence on the crystal packing. The F atom, indeed, is not involved in short intra- or intermolecular interactions. The five-membered ribofuranose ring approximately has a C2'-endo, C3'-exo twist conformation. Hydroxyl group O2 is in an equatorial position, hydroxyl group O3 is in an axial position, the ethanol group attached to C4 is in a pseudo-axial position and the phenyl group attached to C1 is in a bisecting position with respect to the five-membered ring. The molecule shows a short intramolecular contact distance of $2.43(2) \text{ \AA}$ between O4 and H7 which is equal to the van der Waals contact distance of 2.4 \AA between O and H. The crystal packing shows three intermolecular hydrogen bonds:

Hydrogen bonds:

| O - H ... O | O - H | H ... O | O ... O | O - H - O | symmetry |
|-----------------|---------|---------|----------|-----------|------------------|
| | [Å] | [Å] | [Å] | [deg] | |
| O2 - H02 ... O5 | 0.78(2) | 1.93(3) | 2.701(1) | 171(2) | x+1, y, z |
| O3 - H03 ... O2 | 0.81(2) | 1.95(2) | 2.756(1) | 171(2) | 1-x, y-0.5, -2-z |
| O5 - H05 ... O3 | 0.88(2) | 1.93(3) | 2.812(1) | 175(2) | -x, y-0.5, -2-z |

In this way each molecule is connected by hydrogen bonding to six different neighboring molecules leading to a two-dimensional network in the a,b - direction. The phenyl groups of neighboring layers show T-shaped arrangements. Such arrangements have been shown to result in favourable intermolecular attractive forces (Koch and Egert, 1995). An additional intermolecular distance of 2.51(2) Å between O4 and H4 of a neighboring molecule (symmetry: -x, 0.5+y, -2-z) is only 0.1 Å longer than the van der Waals contact distance and may be considered as a weak, electrostatic interaction.

Table of Positional Parameters and Their Estimated Standard Deviations

| Atom | x | y | z | B(A ²) |
|------|------------|------------|-------------|--------------------|
| F | -0.0334(1) | -0.8177(0) | -0.49446(9) | 2.64(2) |
| O2 | 0.6167(1) | -1.1387(2) | -0.83233(9) | 1.29(1) |
| O3 | 0.3604(1) | -1.2986(2) | -1.03720(8) | 1.38(2) |
| O4 | 0.0792(1) | -1.1452(1) | -0.86993(8) | 1.20(1) |
| O5 | -0.1745(1) | -1.4760(2) | -0.8287(1) | 1.59(2) |
| C1 | 0.2706(2) | -1.0500(2) | -0.8334(1) | 0.95(2) |
| C2 | 0.4273(2) | -1.2148(2) | -0.8193(1) | 0.99(2) |
| C3 | 0.3293(2) | -1.3608(2) | -0.9189(1) | 1.04(2) |
| C4 | 0.1064(2) | -1.3432(2) | -0.9098(1) | 1.02(2) |
| C5 | 0.0391(2) | -1.4871(2) | -0.8224(1) | 1.44(2) |
| C6 | 0.2748(2) | -0.9295(2) | -0.7183(1) | 1.07(2) |
| C7 | 0.1137(2) | -0.9320(2) | -0.6572(1) | 1.33(2) |
| C8 | 0.1247(2) | -0.8176(2) | -0.5530(1) | 1.59(2) |
| C9 | 0.2900(2) | -0.7025(2) | -0.5055(1) | 1.68(2) |
| C10 | 0.4489(2) | -0.7005(2) | -0.5670(1) | 1.62(2) |
| C11 | 0.4428(2) | -0.8118(2) | -0.6741(1) | 1.38(2) |
| H1 | 0.295(2) | -0.966(3) | -0.899(2) | 0.7(3)* |
| H2 | 0.426(2) | -1.279(2) | -0.744(1) | 0.9(3)* |
| H02 | 0.688(3) | -1.229(4) | -0.830(2) | 3.2(5)* |
| H03 | 0.355(3) | -1.396(3) | -1.080(2) | 2.0(4)* |

| | | | | |
|-----|-----------|-----------|-----------|---------|
| H3 | 0.386(3) | -1.494(3) | -0.901(2) | 1.5(3)* |
| H4 | 0.023(3) | -1.362(3) | -0.986(2) | 1.3(3)* |
| H5A | 0.097(3) | -1.467(3) | -0.739(2) | 1.9(4)* |
| H5B | 0.065(3) | -1.615(3) | -0.846(2) | 1.8(4)* |
| H05 | -0.229(3) | -1.576(4) | -0.874(2) | 3.4(5)* |
| H7 | -0.002(2) | -1.010(3) | -0.682(2) | 1.4(3)* |
| H9 | 0.290(3) | -0.631(4) | -0.437(2) | 3.0(4)* |
| H10 | 0.565(3) | -0.622(4) | -0.538(2) | 3.2(5)* |
| H11 | 0.566(2) | -0.797(2) | -0.722(1) | 0.3(2)* |

Starred atoms were refined isotropically. Anisotropically refined atoms are given in the form of the isotropic equivalent displacement parameter defined as:

$$(4/3) * [a^2*B(1,1) + b^2*B(2,2) + c^2*B(3,3) + ab(\cos \gamma)*B(1,2) + ac(\cos \beta)*B(1,3) + bc(\cos \alpha)*B(2,3)]$$

Table of General Displacement Parameter Expressions - U's

| Name | U(1,1) | U(2,2) | U(3,3) | U(1,2) | U(1,3) | U(2,3) |
|------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| F | 0.0338(4) | 0.0376(5) | 0.0344(4) | -0.0081(4) | 0.0202(3) | -0.0123(4) |
| O2 | 0.0104(3) | 0.0145(4) | 0.0244(4) | -0.0002(3) | 0.0046(3) | 0.0002(4) |
| O3 | 0.0230(4) | 0.0165(4) | 0.0147(3) | 0.0000(4) | 0.0078(3) | -0.0012(3) |
| O4 | 0.0109(3) | 0.0114(3) | 0.0220(4) | 0.0005(3) | 0.0003(3) | -0.0041(3) |
| O5 | 0.0137(4) | 0.0167(4) | 0.0308(4) | -0.0006(4) | 0.0060(3) | 0.0001(4) |
| C1 | 0.0116(4) | 0.0116(4) | 0.0125(4) | 0.0011(4) | 0.0011(4) | -0.0019(4) |
| C2 | 0.0115(4) | 0.0124(4) | 0.0138(4) | 0.0006(4) | 0.0027(4) | -0.0002(4) |
| C3 | 0.0138(4) | 0.0106(5) | 0.0157(4) | 0.0000(4) | 0.0046(4) | -0.0008(4) |
| C4 | 0.0126(4) | 0.0103(5) | 0.0149(4) | 0.0006(4) | 0.0009(4) | -0.0007(4) |
| C5 | 0.0145(5) | 0.0159(5) | 0.0244(5) | 0.0010(5) | 0.0040(4) | 0.0063(5) |
| C6 | 0.0143(5) | 0.0111(5) | 0.0144(4) | 0.0025(4) | 0.0008(4) | -0.0003(4) |
| C7 | 0.0175(5) | 0.0151(5) | 0.0182(5) | -0.0018(4) | 0.0041(4) | -0.0019(4) |
| C8 | 0.0219(5) | 0.0191(6) | 0.0205(5) | 0.0020(5) | 0.0071(4) | -0.0018(5) |
| C9 | 0.0246(6) | 0.0199(6) | 0.0175(5) | 0.0031(5) | -0.0005(5) | -0.0051(5) |
| C10 | 0.0196(5) | 0.0175(5) | 0.0219(5) | 0.0000(5) | -0.0021(5) | -0.0059(5) |
| C11 | 0.0157(5) | 0.0167(5) | 0.0192(5) | 0.0002(5) | 0.0012(4) | -0.0031(5) |

The form of the anisotropic displacement parameter is:

$$\exp [-2\pi^2\{h^2a^2U(1,1) + k^2b^2U(2,2) + l^2c^2U(3,3) + 2hkabU(1,2) + 2hlacU(1,3) + 2klbcU(2,3)\}]$$

where a, b and c are reciprocal lattice constants.

Table of Bond Distances in Angstroms

| Atom 1 | Atom 2 | Distance | Atom 1 | Atom 2 | Distance |
|--------|--------|----------|--------|--------|----------|
| F | C8 | 1.352(2) | C3 | C4 | 1.534(2) |
| O2 | C2 | 1.415(2) | C4 | C5 | 1.509(2) |
| O3 | C3 | 1.427(2) | C6 | C7 | 1.389(2) |
| O4 | C1 | 1.434(1) | C6 | C11 | 1.399(2) |
| O4 | C4 | 1.446(2) | C7 | C8 | 1.381(2) |
| O5 | C5 | 1.433(2) | C8 | C9 | 1.383(2) |
| C1 | C2 | 1.533(2) | C9 | C10 | 1.378(2) |
| C1 | C6 | 1.510(2) | C10 | C11 | 1.400(2) |
| C2 | C3 | 1.536(2) | | | |

Numbers in parentheses are estimated standard deviations in the least significant digits.

Table of Bond Angles in Degrees

| Atom 1 | Atom 2 | Atom 3 | Angle | Atom 1 | Atom 2 | Atom 3 | Angle |
|--------|--------|--------|-----------|--------|--------|--------|----------|
| C1 | O4 | C4 | 110.43(9) | C3 | C4 | C5 | 114.5(1) |
| O4 | C1 | C2 | 105.2(1) | O5 | C5 | C4 | 111.2(1) |
| O4 | C1 | C6 | 110.6(1) | C1 | C6 | C7 | 121.0(1) |
| C2 | C1 | C6 | 114.65(9) | C1 | C6 | C11 | 119.2(1) |
| O2 | C2 | C1 | 109.9(1) | C7 | C6 | C11 | 119.8(1) |
| O2 | C2 | C3 | 116.0(1) | C6 | C7 | C8 | 118.6(1) |
| C1 | C2 | C3 | 102.27(9) | F | C8 | C7 | 118.6(1) |
| O3 | C3 | C2 | 109.9(1) | F | C8 | C9 | 118.3(1) |
| O3 | C3 | C4 | 111.06(9) | C7 | C8 | C9 | 123.1(1) |
| C2 | C3 | C4 | 101.1(1) | C8 | C9 | C10 | 117.9(1) |
| O4 | C4 | C3 | 106.15(9) | C9 | C10 | C11 | 120.9(1) |
| O4 | C4 | C5 | 110.1(1) | C6 | C11 | C10 | 119.6(1) |

Numbers in parentheses are estimated standard deviations in the least significant digits.

Table of Torsion Angles in Degrees

| Atom 1 | Atom 2 | Atom 3 | Atom 4 | Angle |
|--------|--------|--------|--------|-----------------|
| C4 | O4 | C1 | C2 | -14.65 (0.12) |
| C4 | O4 | C1 | C6 | -138.94 (0.10) |
| C1 | O4 | C4 | C3 | -9.90 (0.12) |
| C1 | O4 | C4 | C5 | 114.52 (0.11) |
| O4 | C1 | C2 | O2 | 156.75 (0.09) |
| O4 | C1 | C2 | C3 | 32.99 (0.11) |
| C6 | C1 | C2 | O2 | -81.57 (0.12) |
| C6 | C1 | C2 | C3 | 154.67 (0.10) |
| O4 | C1 | C6 | C7 | 4.58 (0.16) |
| O4 | C1 | C6 | C11 | -174.55 (0.11) |
| C2 | C1 | C6 | C7 | -114.11 (0.13) |
| C2 | C1 | C6 | C11 | 66.76 (0.15) |
| O2 | C2 | C3 | O3 | -39.69 (0.14) |
| O2 | C2 | C3 | C4 | -157.15 (0.10) |
| C1 | C2 | C3 | O3 | 79.86 (0.11) |
| C1 | C2 | C3 | C4 | -37.60 (0.11) |
| O3 | C3 | C4 | O4 | -86.78 (0.11) |
| O3 | C3 | C4 | C5 | 151.52 (0.11) |
| C2 | C3 | C4 | O4 | 29.86 (0.11) |
| C2 | C3 | C4 | C5 | -91.83 (0.12) |
| O4 | C4 | C5 | O5 | 66.72 (0.13) |
| C3 | C4 | C5 | O5 | -173.79 (0.10) |
| C1 | C6 | C7 | C8 | -179.43 (0.12) |
| C11 | C6 | C7 | C8 | -0.30 (0.20) |
| C1 | C6 | C11 | C10 | -179.57 (0.12) |
| C7 | C6 | C11 | C10 | 1.29 (0.20) |
| C6 | C7 | C8 | F | 179.00 (0.12) |
| C6 | C7 | C8 | C9 | -0.93 (0.22) |
| F | C8 | C9 | C10 | -178.81 (0.12) |
| C7 | C8 | C9 | C10 | 1.12 (0.22) |
| C8 | C9 | C10 | C11 | -0.07 (0.27) |
| C9 | C10 | C11 | C6 | -1.10 (0.21) |

Table of Least-Squares Planes

Orthonormal Equation of Plane 1

$$-0.3185 X + 0.7626 Y + -0.5630 Z - -1.5517 = 0$$

$$0.0006 \quad 0.0004 \quad 0.0005 \quad 0.0052$$

Crystallographic Equation of Plane

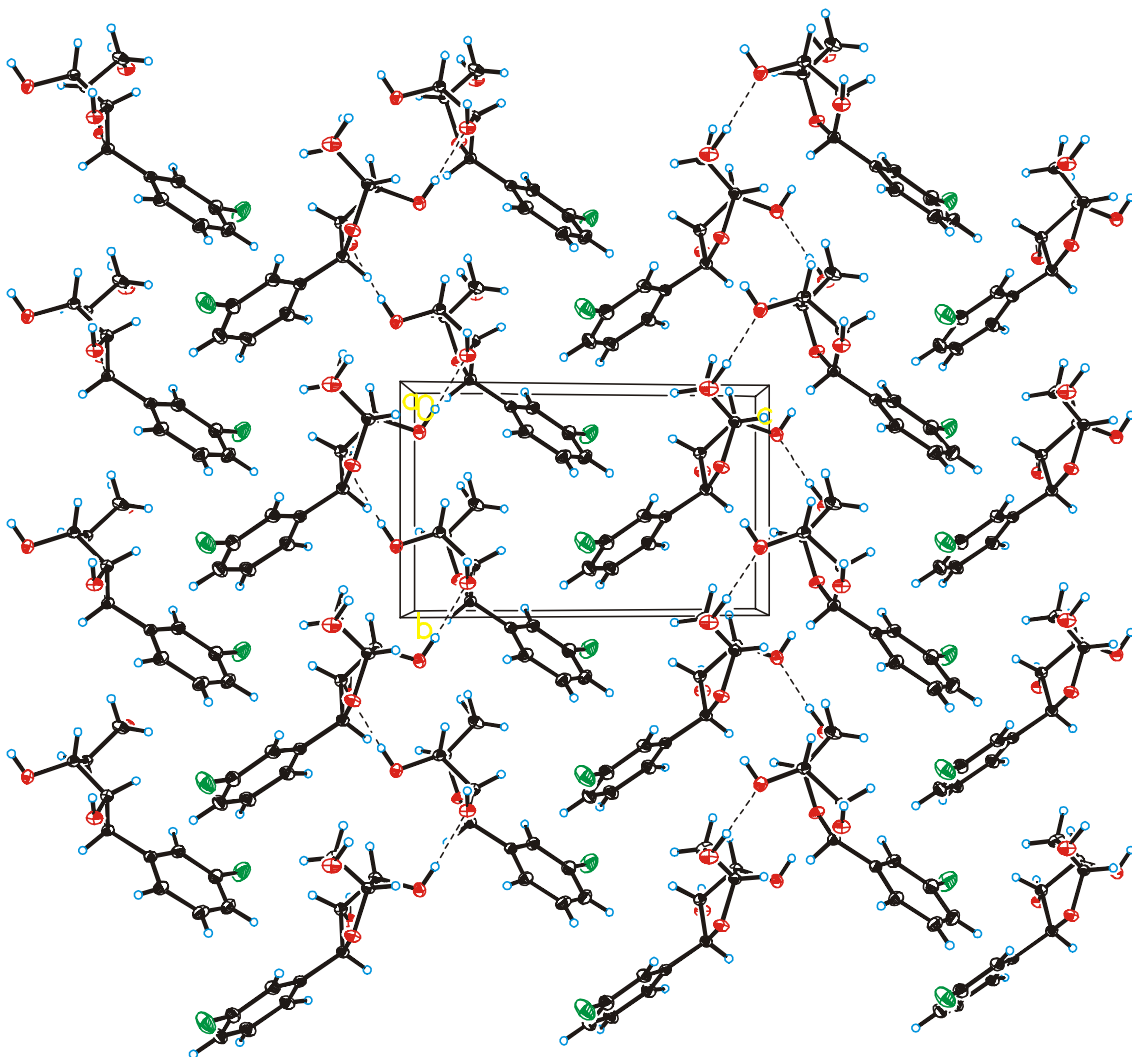
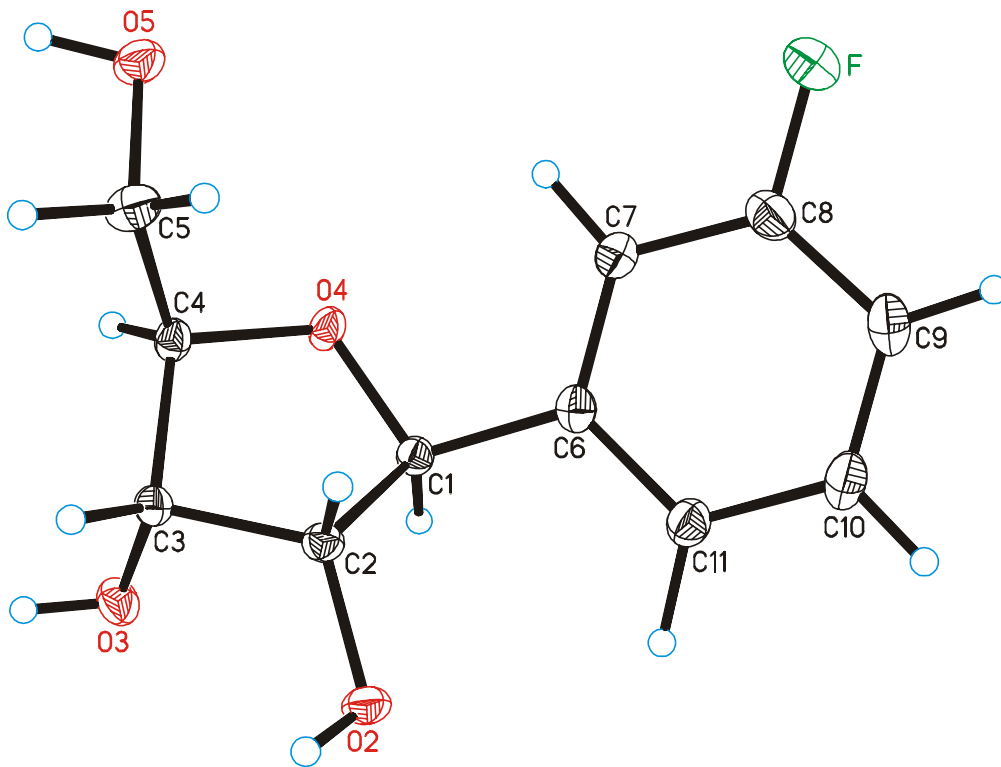
$$-2.1523 X + 5.2157 Y + -5.4046 Z - -1.5517 = 0$$

$$0.0037 \quad 0.0025 \quad 0.0511 \quad 0.0052$$

| Atom | X | Y | Z | Distance | Esd |
|--------------------|--------|---------|---------|----------|------------|
| C6 | 3.4117 | -6.3570 | -7.7749 | -0.0053 | + - 0.0012 |
| C7 | 2.1905 | -6.3742 | -7.1126 | -0.0024 | + - 0.0014 |
| C8 | 2.0394 | -5.5920 | -5.9850 | 0.0074 | + - 0.0014 |
| C9 | 3.0540 | -4.8043 | -5.4711 | -0.0044 | + - 0.0014 |
| C10 | 4.2605 | -4.7907 | -6.1373 | -0.0032 | + - 0.0014 |
| C11 | 4.4515 | -5.5522 | -7.2966 | 0.0080 | + - 0.0013 |
| Chi Squared = 97.2 | | | | | |

----- Other Atoms -----

| | | | | | |
|----|--------|---------|---------|---------|------------|
| C1 | 3.6325 | -7.1813 | -9.0206 | -0.0029 | + - 0.0012 |
| F | 0.8446 | -5.5925 | -5.3517 | 0.0309 | + - 0.0006 |



**A6 1'-Desoxy-1'-(2-fluorophenyl)- β -D-ribofuranose 36 kristallisiert
aus Methanol**

Crystal data of 1'-Desoxy-1'-(2-fluorophenyl)- β -D-ribofuranose at -140°C from methanol

| | |
|-----------------------------------|--|
| formula | $\text{C}_{11} \text{H}_{13} \text{F O}_4$ |
| Mol. weight | 228.22 |
| crystal color | colorless, transparent |
| crystal shape | plate |
| crystal dimensions | 0.15 x 0.70 x 0.80 mm |
| crystal system | monoclinic |
| space group | C 2 |
| space group number | 5 |
| a | 13.244(2) Å |
| b | 5.1116(8) Å |
| c | 15.520(3) Å |
| β | $102.20(1)^{\circ}$ |
| V | 1026.9(4) Å ³ |
| Z | 4 |
| D _{calc} | 1.476 g/cm ³ |
| linear absorption coeff. | 1.2 cm ⁻¹ |
| radiation | Mo-K _{α} |
| scan range | sphere |
| (2 theta)max | 63° |
| resolution | 0.68 Å |
| number of reflections measured | 9678 |
| number of independent reflections | 2967 |
| reflections used with I > 0 | 2956 |

| | |
|---------------------|-------|
| number of variables | 197 |
| R(F) | 0.033 |
| wR(F) | 0.041 |
| S | 1.16 |

A single crystal was measured on a SIEMENS SMART diffractometer at a temperature of about -140°C . Repeatedly measured reflections remained stable. A numerical absorption correction was made based on six crystal faces. The transmission factor ranged from 0.916 to 0.982. Equivalent reflections were averaged. Friedel opposites were not averaged. $R(\text{I})_{\text{internal}} = 0.048$. The structure was determined by direct methods using program SHELXS. The H atoms were taken from difference Fourier syntheses and were refined with isotropic thermal parameters. The non-H atoms were refined with anisotropic thermal parameters. The structure was refined on F values using weighting scheme:

$$w(\text{F}) = 4 * \text{F}^2 / [\text{sigma}^2(\text{F}^2) + (0.03 * \text{F}^2)^2].$$

The final difference density was between -0.22 and $+0.33 \text{ e}/\text{\AA}^3$. The calculations were performed with the SMART, SHELX and MOLEN program systems.

Discussion of the Structure

The ribofuranose ring has a C2-endo envelope conformation with ring atom C2 0.60 \AA above the plane through C1, O4, C4 and C3. The hydroxyl group attached to C2 is in an equatorial position, the hydroxyl group attached to C3 is in a pseudo-axial position with respect to the five-membered ring. The ethanol group attached to C4 and the phenyl group attached to C1 are both approximately in bisecting positions. The shortest intramolecular contact distance is $2.44(2) \text{ \AA}$ between O4 and H7 and is just outside the van der Waals contact distance of 2.4 \AA . The crystal packing shows intermolecular hydrogen bonding between the hydroxyl groups.

Hydrogen bonds:

| O - H ... O | O - H | H...O | O...O | O-H-O | symmetry |
|-----------------|---------|---------|----------|--------|------------------|
| | [Å] | [Å] | [Å] | [deg] | |
| O2 - H02 ... O5 | 0.76(2) | 2.22(2) | 2.961(1) | 165(2) | x-0.5, y-0.5, z |
| O3 - H03 ... O5 | 0.79(1) | 1.99(2) | 2.771(1) | 167(2) | 0.5-x, y-0.5, -z |
| O5 - H05 ... O2 | 0.76(2) | 2.06(2) | 2.816(1) | 175(1) | 0.5+x, y-0.5, z |

Thus each molecule is connected by intermolecular hydrogen bonding to six neighboring molecules. The hydrogen bonding results in a two-dimensional network of molecules parallel to the a and b axes. The crystal packing shows an additional weak, electrostatic interaction between O3 and H2 (symmetry: x, y-1, z) with a O3...H2 distance of 2.37(2) Å, which corresponds to the van der Waals contact distance. The shortest inter-molecular F...H distance is 2.55(2) Å between F and H5B (symmetry: x-0.5, y-0.5, z) and is 0.2 Å longer than the van der Waals contact distance. Neighboring hydrogen bonded layers show T-shaped arrangements of the phenyl groups. Such arrangements have been shown to result in favourable intermolecular attractive forces (Koch and Egert, 1995).

Table of Positional Parameters and Their Estimated Standard Deviations

| Atom | x | y | z | B(A2) |
|------|-------------|------------|------------|---------|
| F | -0.00766(5) | 0.2921(0) | 0.30224(4) | 2.16(1) |
| O2 | 0.04230(5) | 0.3642(2) | 0.11184(5) | 1.49(1) |
| O3 | 0.17035(6) | -0.0480(2) | 0.08126(5) | 1.48(1) |
| O4 | 0.28750(5) | 0.2050(2) | 0.25542(5) | 1.52(1) |
| O5 | 0.43850(5) | 0.3482(2) | 0.08827(5) | 1.56(1) |
| C1 | 0.17946(7) | 0.2598(2) | 0.24370(6) | 1.17(1) |
| C2 | 0.14954(7) | 0.3700(2) | 0.14942(6) | 1.13(1) |
| C3 | 0.21580(7) | 0.2034(2) | 0.10075(6) | 1.11(1) |
| C4 | 0.31487(7) | 0.1720(2) | 0.17070(6) | 1.14(1) |
| C5 | 0.39682(7) | 0.3754(2) | 0.16600(7) | 1.40(2) |
| C6 | 0.16206(8) | 0.4503(2) | 0.31316(6) | 1.31(2) |
| C7 | 0.23713(9) | 0.6302(2) | 0.35205(7) | 1.70(2) |
| C8 | 0.2171(1) | 0.8142(2) | 0.41246(7) | 2.01(2) |
| C9 | 0.1207(1) | 0.8233(3) | 0.43450(7) | 2.08(2) |
| C10 | 0.04445(9) | 0.6467(3) | 0.39690(7) | 1.95(2) |
| C11 | 0.06717(8) | 0.4650(2) | 0.33794(7) | 1.50(2) |

| | | | | |
|-----|-----------|-----------|-----------|---------|
| H1 | 0.145(1) | 0.110(3) | 0.2481(9) | 1.2(2)* |
| H2 | 0.170(1) | 0.540(3) | 0.150(1) | 1.4(3)* |
| H02 | 0.024(1) | 0.225(4) | 0.101(1) | 2.7(3)* |
| H3 | 0.226(1) | 0.293(3) | 0.0465(9) | 1.4(3)* |
| H03 | 0.140(1) | -0.053(4) | 0.031(1) | 2.1(3)* |
| H4 | 0.3423(9) | -0.001(3) | 0.1680(8) | 0.3(2)* |
| H5B | 0.452(1) | 0.360(3) | 0.220(1) | 1.8(3)* |
| H5A | 0.371(1) | 0.557(3) | 0.1638(9) | 1.6(3)* |
| H05 | 0.465(1) | 0.215(3) | 0.092(1) | 1.7(3)* |
| H7 | 0.305(1) | 0.624(4) | 0.333(1) | 2.0(3)* |
| H8 | 0.270(1) | 0.925(4) | 0.441(1) | 3.3(4)* |
| H9 | 0.104(1) | 0.960(4) | 0.479(1) | 3.1(4)* |
| H10 | -0.028(1) | 0.648(3) | 0.406(1) | 1.7(3)* |

Starred atoms were refined isotropically. Anisotropically refined atoms are given in the form of the isotropic equivalent displacement parameter defined as:

$$(4/3) * [a^2*B(1,1) + b^2*B(2,2) + c^2*B(3,3) + ab(\cos \gamma)*B(1,2) + ac(\cos \beta)*B(1,3) + bc(\cos \alpha)*B(2,3)]$$

Table of General Displacement Parameter Expressions - U's

| Name | U(1,1) | U(2,2) | U(3,3) | U(1,2) | U(1,3) | U(2,3) |
|------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|------------|
| F | 0.0177(3) | 0.0343(4) | 0.0310(3) | -0.0050(3) | 0.0076(2) | -0.0110(3) |
| O2 | 0.0129(3) | 0.0212(3) | 0.0214(3) | 0.0022(3) | 0.0009(2) | 0.0011(3) |
| O3 | 0.0218(3) | 0.0153(3) | 0.0186(3) | -0.0050(3) | 0.0030(3) | -0.0023(3) |
| O4 | 0.0137(3) | 0.0287(4) | 0.0152(3) | 0.0045(3) | 0.0028(2) | 0.0038(3) |
| O5 | 0.0145(3) | 0.0222(3) | 0.0237(3) | 0.0026(3) | 0.0068(2) | 0.0059(3) |
| C1 | 0.0133(3) | 0.0153(4) | 0.0161(3) | 0.0010(3) | 0.0033(3) | 0.0023(3) |
| C2 | 0.0133(3) | 0.0131(4) | 0.0163(3) | 0.0008(3) | 0.0023(3) | 0.0019(3) |
| C3 | 0.0134(3) | 0.0135(4) | 0.0155(3) | -0.0020(3) | 0.0036(3) | 0.0009(3) |
| C4 | 0.0126(3) | 0.0134(4) | 0.0178(3) | 0.0004(3) | 0.0040(3) | 0.0008(3) |
| C5 | 0.0151(4) | 0.0173(4) | 0.0210(4) | -0.0030(3) | 0.0040(3) | 0.0000(4) |
| C6 | 0.0189(4) | 0.0162(4) | 0.0143(3) | -0.0003(4) | 0.0025(3) | 0.0017(4) |
| C7 | 0.0238(5) | 0.0206(5) | 0.0194(4) | -0.0046(4) | 0.0027(4) | 0.0010(4) |
| C8 | 0.0361(6) | 0.0203(5) | 0.0178(4) | -0.0061(4) | 0.0013(4) | -0.0013(4) |
| C9 | 0.0397(6) | 0.0215(5) | 0.0169(4) | 0.0035(5) | 0.0045(4) | -0.0022(4) |
| C10 | 0.0268(5) | 0.0281(5) | 0.0193(4) | 0.0049(4) | 0.0055(4) | -0.0027(4) |
| C11 | 0.0178(4) | 0.0207(4) | 0.0180(4) | 0.0004(4) | 0.0024(3) | -0.0011(4) |

The form of the anisotropic displacement parameter is:

$\exp [-2\pi i \{h^2 a^2 U(1,1) + k^2 b^2 U(2,2) + l^2 c^2 U(3,3) + 2hkabU(1,2) + 2hlacU(1,3) + 2klbcU(2,3)\}]$ where a, b and c are reciprocal lattice constants.

Table of Bond Distances in Angstroms

| Atom 1 | Atom 2 | Distance | Atom 1 | Atom 2 | Distance |
|--------|--------|----------|--------|--------|----------|
| F | C11 | 1.356(1) | C3 | C4 | 1.524(1) |
| O2 | C2 | 1.417(1) | C4 | C5 | 1.516(1) |
| O3 | C3 | 1.424(1) | C6 | C7 | 1.395(1) |
| O4 | C1 | 1.431(1) | C6 | C11 | 1.392(2) |
| O4 | C4 | 1.446(1) | C7 | C8 | 1.392(2) |
| O5 | C5 | 1.435(1) | C8 | C9 | 1.390(2) |
| C1 | C2 | 1.540(1) | C9 | C10 | 1.388(2) |
| C1 | C6 | 1.506(1) | C10 | C11 | 1.381(2) |
| C2 | C3 | 1.532(1) | | | |

Numbers in parentheses are estimated standard deviations in the least significant digits.

Table of Bond Angles in Degrees

| Atom 1 | Atom 2 | Atom 3 | Angle | Atom 1 | Atom 2 | Atom 3 | Angle |
|--------|--------|--------|-----------|--------|--------|--------|-----------|
| C1 | O4 | C4 | 110.08(7) | C3 | C4 | C5 | 114.26(8) |
| O4 | C1 | C2 | 103.99(8) | O5 | C5 | C4 | 112.38(8) |
| O4 | C1 | C6 | 109.60(7) | C1 | C6 | C7 | 122.2(1) |
| C2 | C1 | C6 | 113.33(8) | C1 | C6 | C11 | 121.09(9) |
| O2 | C2 | C1 | 114.70(8) | C7 | C6 | C11 | 116.6(1) |
| O2 | C2 | C3 | 114.47(8) | C6 | C7 | C8 | 121.1(1) |
| C1 | C2 | C3 | 101.89(8) | C7 | C8 | C9 | 120.2(1) |
| O3 | C3 | C2 | 110.24(8) | C8 | C9 | C10 | 119.9(1) |
| O3 | C3 | C4 | 108.54(8) | C9 | C10 | C11 | 118.3(1) |
| C2 | C3 | C4 | 101.75(7) | F | C11 | C6 | 118.5(1) |
| O4 | C4 | C3 | 106.98(8) | F | C11 | C10 | 117.8(1) |
| O4 | C4 | C5 | 106.47(8) | C6 | C11 | C10 | 123.7(1) |

Numbers in parentheses are estimated standard deviations in the least significant digits.

Table of Torsion Angles in Degrees

| Atom 1 | Atom 2 | Atom 3 | Atom 4 | Angle |
|--------|--------|--------|--------|-----------------|
| C4 | O4 | C1 | C2 | -22.66 (0.11) |
| C4 | O4 | C1 | C6 | -144.12 (0.08) |
| C1 | O4 | C4 | C3 | -1.16 (0.11) |
| C1 | O4 | C4 | C5 | 121.40 (0.09) |
| O4 | C1 | C2 | O2 | 161.35 (0.08) |
| O4 | C1 | C2 | C3 | 37.10 (0.09) |
| C6 | C1 | C2 | O2 | -79.71 (0.11) |
| C6 | C1 | C2 | C3 | 156.05 (0.08) |
| O4 | C1 | C6 | C7 | 27.47 (0.13) |
| O4 | C1 | C6 | C11 | -156.35 (0.09) |
| C2 | C1 | C6 | C7 | -88.19 (0.12) |
| C2 | C1 | C6 | C11 | 87.98 (0.12) |
| O2 | C2 | C3 | O3 | -46.18 (0.11) |
| O2 | C2 | C3 | C4 | -161.19 (0.08) |
| C1 | C2 | C3 | O3 | 78.22 (0.09) |
| C1 | C2 | C3 | C4 | -36.79 (0.09) |
| O3 | C3 | C4 | O4 | -91.88 (0.09) |
| O3 | C3 | C4 | C5 | 150.56 (0.08) |
| C2 | C3 | C4 | O4 | 24.39 (0.10) |
| C2 | C3 | C4 | C5 | -93.17 (0.09) |
| O4 | C4 | C5 | O5 | 174.37 (0.08) |
| C3 | C4 | C5 | O5 | -67.78 (0.11) |
| C1 | C6 | C7 | C8 | 176.32 (0.10) |
| C11 | C6 | C7 | C8 | -0.02 (0.26) |
| C1 | C6 | C11 | F | 4.19 (0.15) |
| C1 | C6 | C11 | C10 | -175.65 (0.10) |
| C7 | C6 | C11 | F | -179.42 (0.10) |
| C7 | C6 | C11 | C10 | 0.73 (0.16) |
| C6 | C7 | C8 | C9 | -0.67 (0.17) |
| C7 | C8 | C9 | C10 | 0.68 (0.17) |
| C8 | C9 | C10 | C11 | -0.02 (0.50) |
| C9 | C10 | C11 | F | 179.43 (0.09) |
| C9 | C10 | C11 | C6 | -0.72 (0.18) |

Table of Least-Squares Planes

Orthonormal Equation of Plane 1

$$-0.1691 X + 0.6399 Y + -0.7497 Z - -2.2803 = 0$$

$$0.0005 \quad 0.0004 \quad 0.0003 \quad 0.0028$$

Crystallographic Equation of Plane

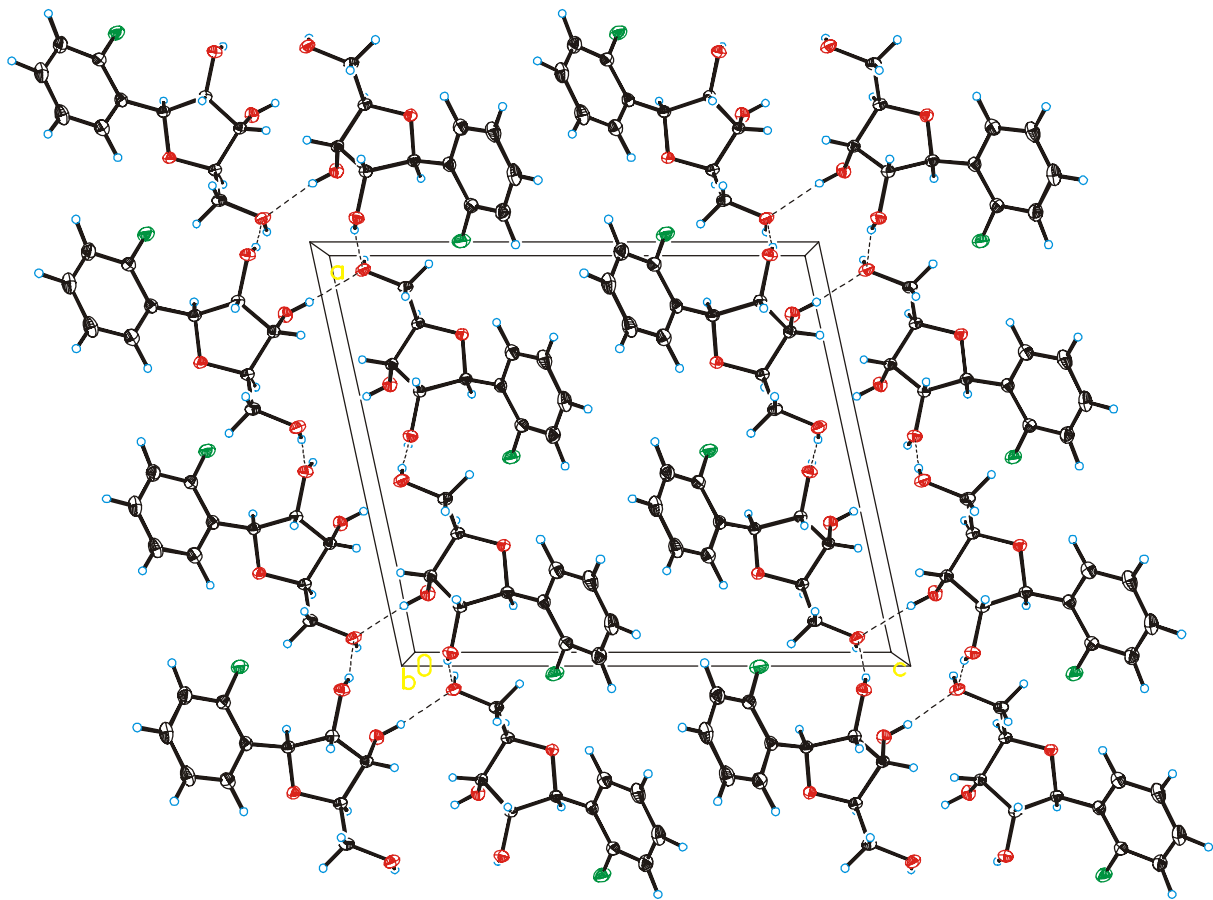
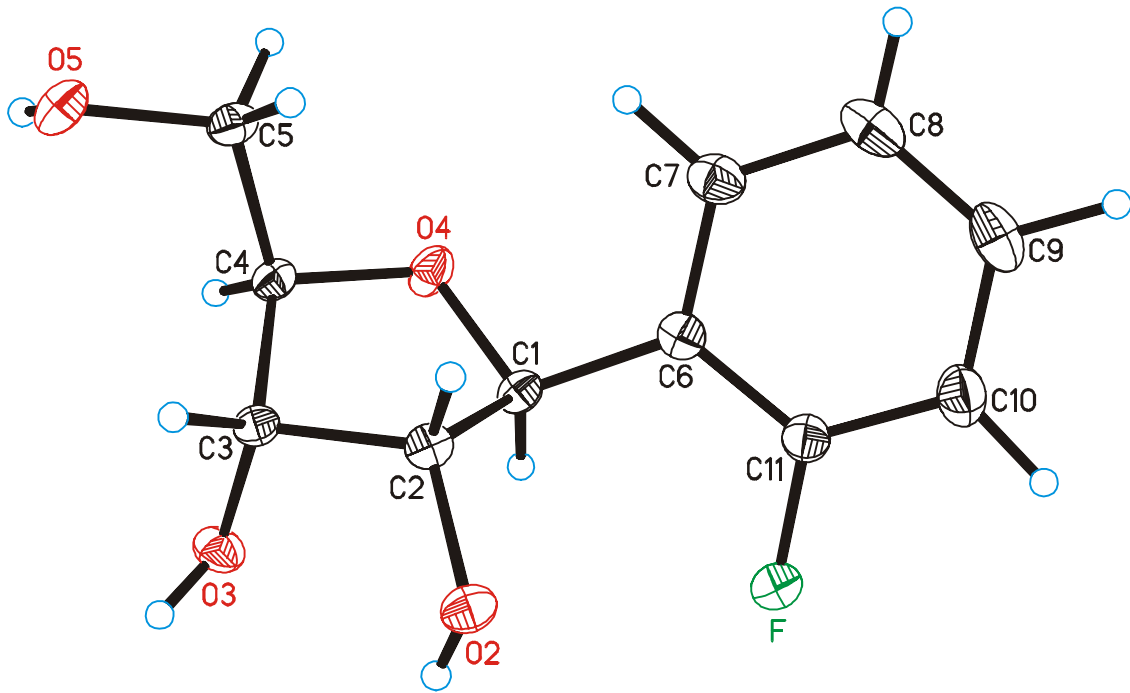
$$-2.2391 X + 3.2707 Y + -10.8175 Z - -2.2803 = 0$$

$$0.0062 \quad 0.0018 \quad 0.0710 \quad 0.0028$$

| Atom | X | Y | Z | Distance | Esd |
|---------------|---------|--------|--------|-------------------|-----|
| C6 | 1.1191 | 2.3017 | 4.7505 | 0.0025 +- 0.0010 | |
| C7 | 1.9858 | 3.2215 | 5.3404 | 0.0022 +- 0.0011 | |
| C8 | 1.5226 | 4.1620 | 6.2568 | -0.0047 +- 0.0012 | |
| C9 | 0.1739 | 4.2085 | 6.5911 | 0.0025 +- 0.0012 | |
| C10 | -0.7130 | 3.3056 | 6.0208 | 0.0023 +- 0.0012 | |
| C11 | -0.2187 | 2.3770 | 5.1263 | -0.0049 +- 0.0011 | |
| Chi Squared = | | | | 55.4 | |

----- Other Atoms -----

| | | | | | |
|----|---------|--------|--------|-------------------|--|
| C1 | 1.5774 | 1.3278 | 3.6968 | 0.0918 +- 0.0010 | |
| F | -1.0927 | 1.4929 | 4.5848 | -0.0169 +- 0.0005 | |



**A7 1'-Desoxy-1'-(2,4,6-trifluorophenyl)- β -D-ribofuranose 86
kristallisiert aus Methanol**

Crystal data of 1'-Desoxy-1'-(2,4,6-trifluorophenyl)- β -D-ribofuranose at -138°C from methanol

| | |
|-----------------------------------|--|
| formula | $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{O}_4$ |
| mol. Weight | 264.20 |
| crystal color | colorless, transparent |
| crystal shape | prism |
| crystal dimensions | 0.30 x 0.40 x 0.75 mm |
| crystal system | orthorhombic |
| space group | $P 2_12_12_1$ |
| space group number | 18 |
| a | 4.9651(6) Å |
| b | 11.208(1) Å |
| c | 20.223(4) Å |
| V | 1125.4(3) Å ³ |
| Z | 4 |
| D _{calc} | 1.559 g/cm ³ |
| linear absorption coeff. | 1.41 cm ⁻¹ |
| radiation | Mo-K α |
| scan range | sphere |
| (2 theta)max | 65° |
| resolution | 0.66 Å |
| number of reflections measured | 21902 |
| number of independent reflections | 3801 |
| reflections used with I > 0 | 3761 |

| | |
|---------------------|-------|
| number of variables | 212 |
| R(F) | 0.040 |
| wR(F) | 0.036 |
| S | 1.010 |

A single crystal was measured on a SIEMENS SMART diffractometer at a temperature of about -138°C . Repeatedly measured reflections remained stable. No absorption correction was made. Equivalent reflections were averaged. Bijvoet pairs of reflections were not averaged. $R(I)_{\text{internal}} = 0.051$. The structure was determined by direct methods using program SHELXS. The H atoms were taken from a difference Fourier synthesis and were refined with isotropic thermal parameters. The non-H atoms were refined with anisotropic thermal parameters. The structure was refined on F values using weighting scheme:

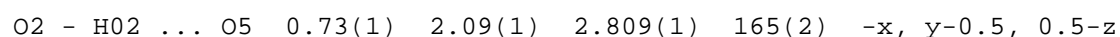
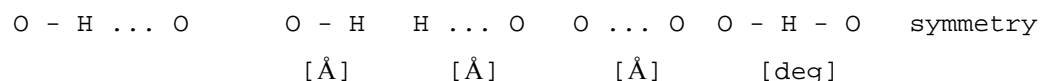
$$w(F) = 4 * F^2 / [\sigma^2(F^2) + (0.03 * F^2)^2].$$

A residual electron density maximum of about $2.6 \text{ e}/\text{\AA}^3$ at a distance of 1.85 \AA from C8 was identified as a fractionally occupied Br atom. Its occupancy factor refined to $0.0370(9)$. Thus the occupancy factor of hydrogen atom H8 was set to 0.963 . The final difference density was between -0.18 and $+0.32 \text{ e}/\text{\AA}^3$. A refinement of the Flack x - parameter gave $x = -0.03(5)$. This confirms the absolute configuration of the structure. The calculations were performed with the SMART, SHELX and MolEN program systems.

Discussion of the Structure

The ribofuranose ring approximately has a C2-endo envelope conformation. The phenyl group attached to C1 and the hydroxyl group attached to C2 are in pseudo-equatorial positions, the hydroxyl group attached to C3 is in a pseudo-axial position and the methanol group attached to C4 is in a bisecting position with respect to the five-membered ring. The shortest intramolecular contact distance is $2.35(1) \text{ \AA}$ between F3 and H1. This distance approaches the van der Waals contact distance.

The crystal packing shows three intermolecular hydrogen bonds:



O3 - H03 ... O4 0.82(1) 2.00(1) 2.818(1) 173(1) $-x, y-0.5, 0.5-z$
 O5 - H05 ... O2 0.75(1) 2.02(1) 2.773(1) 173(2) $1-x, 0.5+y, 0.5-z$

In this way each molecule is connected by hydrogen bonding to four different neighboring molecules leading to a two-dimensional network in the a,b - direction. Other intermolecular distances within the hydrogen bonded layers are: F1...H3: 2.51(1) Å ($1-x, 0.5+y, 0.5-z$) and F1...H03: 2.54(1) Å ($-x, 0.5+y, 0.5-z$). The bonding in the c - direction consists of a weak intermolecular C10-H10...O5 interaction with a H10...O5 distance of 2.50(1) Å ($-x, 1.5-y, z-0.5$). Other intermolecular distances between adjacent hydrogen bonded layers are: F2...H5A: 2.56(1) Å ($1-x, 1.5-y, z-0.5$) and F2...H4: 2.62(1) Å ($-x, 1.5-y, z-0.5$). These distances are about 0.2 to 0.25 Å longer than the van der Waals contact distance between F and H. Thus they hardly contribute to the crystal packing forces.

Table of Positional Parameters and Their Estimated Standard Deviations

| Atom | x | y | z | B(A ²) |
|------|------------|------------|-------------|--------------------|
| F1 | 0.4749(1) | 0.75064(6) | 0.16227(3) | 1.83(1) |
| F2 | 0.2155(2) | 0.85794(9) | -0.05163(4) | 4.55(2) |
| F3 | -0.2733(2) | 0.56703(7) | 0.06334(4) | 2.40(1) |
| O2 | 0.1940(2) | 0.38864(7) | 0.15943(4) | 1.57(1) |
| O3 | -0.1039(2) | 0.41867(7) | 0.27951(4) | 1.78(1) |
| O4 | 0.0290(2) | 0.67105(7) | 0.23607(4) | 1.24(1) |
| O5 | 0.3101(2) | 0.77555(7) | 0.34736(4) | 1.62(1) |
| C1 | 0.0262(2) | 0.59234(9) | 0.17982(5) | 1.10(2) |
| C2 | 0.2186(2) | 0.49166(9) | 0.19903(5) | 1.24(2) |
| C3 | 0.1490(2) | 0.47594(9) | 0.27238(5) | 1.33(2) |
| C4 | 0.1135(2) | 0.60497(9) | 0.29465(5) | 1.15(2) |
| C5 | 0.3673(2) | 0.6584(1) | 0.32298(6) | 1.52(2) |
| C6 | 0.0895(2) | 0.6597(1) | 0.11756(5) | 1.35(2) |
| C7 | 0.3002(2) | 0.7399(1) | 0.11145(6) | 1.55(2) |
| C8 | 0.3459(3) | 0.8085(1) | 0.05607(7) | 2.37(2) |
| C9 | 0.1759(3) | 0.7906(1) | 0.00329(7) | 2.82(3) |
| C10 | -0.0301(3) | 0.7097(1) | 0.00324(6) | 2.70(3) |
| C11 | -0.0679(2) | 0.6466(1) | 0.06111(6) | 1.84(2) |
| H1 | -0.158(3) | 0.555(1) | 0.1758(6) | 1.0(2)* |
| H2 | 0.405(2) | 0.525(1) | 0.1939(7) | 1.6(3)* |
| H02 | 0.061(3) | 0.362(1) | 0.1644(8) | 2.7(3)* |
| H3 | 0.285(3) | 0.433(1) | 0.2964(6) | 1.4(2)* |

| | | | | |
|--------------------|-----------|-----------|------------|----------|
| H03 | -0.094(3) | 0.347(1) | 0.2727(7) | 1.8(3)* |
| H4 | -0.018(2) | 0.613(1) | 0.3294(6) | 0.7(2)* |
| H05 | 0.441(3) | 0.809(1) | 0.3480(7) | 2.7(3)* |
| H5B | 0.508(3) | 0.657(1) | 0.2882(7) | 1.8(3)* |
| H5A | 0.422(3) | 0.610(1) | 0.3605(6) | 1.4(3)* |
| H8 | 0.486(3) | 0.861(1) | 0.0516(8) | 3.2(4)* |
| (occupancy: 0.963) | | | | |
| H10 | -0.151(3) | 0.703(1) | -0.0361(7) | 2.9(3)* |
| | | | | |
| Br | 0.6157(7) | 0.9223(3) | 0.0483(2) | 2.06(5)* |
| (occupancy: 0.037) | | | | |

Starred atoms were refined isotropically.

Anisotropically refined atoms are given in the form of the isotropic equivalent displacement parameter defined as:

$$(4/3) * [a^2*B(1,1) + b^2*B(2,2) + c^2*B(3,3) + ab(\cos \gamma)*B(1,2) + ac(\cos \beta)*B(1,3) + bc(\cos \alpha)*B(2,3)]$$

Table of General Displacement Parameter Expressions - U's

| Name | U(1,1) | U(2,2) | U(3,3) | U(1,2) | U(1,3) | U(2,3) |
|------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| F1 | 0.0177(3) | 0.0228(3) | 0.0291(3) | -0.0037(3) | -0.0005(3) | -0.0016(3) |
| F2 | 0.0612(6) | 0.0798(6) | 0.0320(4) | 0.0080(5) | 0.0142(4) | 0.0312(4) |
| F3 | 0.0246(4) | 0.0383(4) | 0.0282(3) | -0.0028(3) | -0.0073(3) | -0.0085(3) |
| O2 | 0.0182(4) | 0.0135(3) | 0.0282(4) | -0.0001(3) | 0.0038(3) | -0.0053(3) |
| O3 | 0.0263(4) | 0.0130(3) | 0.0284(4) | -0.0065(3) | 0.0075(3) | -0.0016(3) |
| O4 | 0.0200(3) | 0.0120(3) | 0.0150(3) | 0.0038(3) | -0.0014(3) | -0.0004(3) |
| O5 | 0.0176(4) | 0.0161(3) | 0.0278(4) | -0.0031(3) | -0.0009(3) | -0.0034(3) |
| C1 | 0.0131(4) | 0.0126(4) | 0.0163(4) | 0.0007(4) | 0.0003(4) | -0.0016(4) |
| C2 | 0.0126(4) | 0.0122(4) | 0.0222(5) | 0.0014(4) | 0.0011(4) | -0.0020(4) |
| C3 | 0.0176(5) | 0.0121(4) | 0.0207(5) | 0.0011(4) | -0.0014(4) | 0.0014(4) |
| C4 | 0.0162(4) | 0.0128(4) | 0.0148(4) | 0.0016(4) | -0.0018(4) | 0.0009(4) |
| C5 | 0.0173(5) | 0.0167(4) | 0.0238(5) | 0.0018(4) | -0.0051(4) | -0.0012(4) |
| C6 | 0.0181(5) | 0.0164(5) | 0.0166(4) | 0.0038(4) | 0.0014(4) | -0.0009(4) |
| C7 | 0.0185(5) | 0.0196(5) | 0.0209(5) | 0.0034(5) | 0.0033(4) | -0.0000(4) |
| C8 | 0.0282(6) | 0.0285(6) | 0.0332(6) | 0.0022(5) | 0.0132(5) | 0.0091(5) |
| C9 | 0.0388(7) | 0.0464(7) | 0.0221(5) | 0.0120(6) | 0.0108(6) | 0.0139(5) |
| C10 | 0.0347(6) | 0.0508(8) | 0.0172(5) | 0.0103(6) | -0.0002(6) | 0.0013(6) |

C11 0.0204(5) 0.0286(6) 0.0211(5) 0.0043(5) -0.0001(5) -0.0032(5)

The form of the anisotropic displacement parameter is:

$\exp [-2\pi i \{h^2 a^2 U(1,1) + k^2 b^2 U(2,2) + l^2 c^2 U(3,3) + 2hkabU(1,2) + 2hlacU(1,3) + 2klbcU(2,3)\}]$ where a,b, and c are reciprocal lattice constants.

Table of Bond Distances in Angstroms

| Atom 1 | Atom 2 | Distance | Atom 1 | Atom 2 | Distance |
|--------|--------|----------|--------|--------|----------|
| F1 | C7 | 1.350(1) | C2 | C3 | 1.533(2) |
| F2 | C9 | 1.357(2) | C3 | C4 | 1.525(1) |
| F3 | C11 | 1.355(1) | C4 | C5 | 1.508(2) |
| O2 | C2 | 1.410(1) | C6 | C7 | 1.385(2) |
| O3 | C3 | 1.418(1) | C6 | C11 | 1.391(2) |
| O4 | C1 | 1.440(1) | C7 | C8 | 1.377(2) |
| O4 | C4 | 1.459(1) | C8 | C9 | 1.375(2) |
| O5 | C5 | 1.431(1) | C9 | C10 | 1.368(2) |
| C1 | C2 | 1.529(1) | C10 | C11 | 1.380(2) |
| C1 | C6 | 1.501(1) | | | |

Numbers in parentheses are estimated standard deviations in the least significant digits.

Table of Bond Angles in Degrees

| Atom 1 | Atom 2 | Atom 3 | Angle | Atom 1 | Atom 2 | Atom 3 | Angle |
|--------|--------|--------|-----------|--------|--------|--------|----------|
| C1 | O4 | C4 | 109.48(8) | C1 | C6 | C7 | 124.0(1) |
| O4 | C1 | C2 | 104.21(8) | C1 | C6 | C11 | 121.2(1) |
| O4 | C1 | C6 | 110.64(8) | C7 | C6 | C11 | 114.8(1) |
| C2 | C1 | C6 | 116.98(9) | F1 | C7 | C6 | 118.4(1) |
| O2 | C2 | C1 | 113.95(9) | F1 | C7 | C8 | 117.6(1) |
| O2 | C2 | C3 | 115.83(9) | C6 | C7 | C8 | 124.0(1) |
| C1 | C2 | C3 | 100.94(8) | C7 | C8 | C9 | 116.7(1) |
| O3 | C3 | C2 | 110.49(9) | F2 | C9 | C8 | 117.7(1) |
| O3 | C3 | C4 | 107.28(9) | F2 | C9 | C10 | 118.5(1) |
| C2 | C3 | C4 | 101.71(8) | C8 | C9 | C10 | 123.8(1) |
| O4 | C4 | C3 | 105.95(8) | C9 | C10 | C11 | 116.2(1) |
| O4 | C4 | C5 | 110.29(9) | F3 | C11 | C6 | 117.7(1) |
| C3 | C4 | C5 | 113.10(9) | F3 | C11 | C10 | 117.9(1) |

O5 C5 C4 109.24(9) C6 C11 C10 124.4(1)

Numbers in parentheses are estimated standard deviations in the least significant digits.

Table of Torsion Angles in Degrees

| Atom 1 | Atom 2 | Atom 3 | Atom 4 | Angle |
|--------|--------|--------|--------|-----------------|
| C4 | O4 | C1 | C2 | -22.77 (0.10) |
| C4 | O4 | C1 | C6 | -149.32 (0.09) |
| C1 | O4 | C4 | C3 | -3.20 (0.11) |
| C1 | O4 | C4 | C5 | 119.54 (0.09) |
| O4 | C1 | C2 | O2 | 163.97 (0.08) |
| O4 | C1 | C2 | C3 | 39.11 (0.10) |
| C6 | C1 | C2 | O2 | -73.55 (0.12) |
| C6 | C1 | C2 | C3 | 161.59 (0.09) |
| O4 | C1 | C6 | C7 | 46.74 (0.14) |
| O4 | C1 | C6 | C11 | -132.03 (0.11) |
| C2 | C1 | C6 | C7 | -72.35 (0.14) |
| C2 | C1 | C6 | C11 | 108.88 (0.12) |
| O2 | C2 | C3 | O3 | -49.98 (0.12) |
| O2 | C2 | C3 | C4 | -163.63 (0.09) |
| C1 | C2 | C3 | O3 | 73.59 (0.10) |
| C1 | C2 | C3 | C4 | -40.06 (0.10) |
| O3 | C3 | C4 | O4 | -88.52 (0.10) |
| O3 | C3 | C4 | C5 | 150.54 (0.09) |
| C2 | C3 | C4 | O4 | 27.51 (0.10) |
| C2 | C3 | C4 | C5 | -93.43 (0.10) |
| O4 | C4 | C5 | O5 | 66.20 (0.11) |
| C3 | C4 | C5 | O5 | -175.35 (0.09) |
| C1 | C6 | C7 | F1 | 6.30 (0.17) |
| C1 | C6 | C7 | C8 | -174.78 (0.11) |
| C11 | C6 | C7 | F1 | -174.87 (0.10) |
| C11 | C6 | C7 | C8 | 4.06 (0.18) |
| C1 | C6 | C11 | F3 | -2.82 (0.16) |
| C1 | C6 | C11 | C10 | 176.73 (0.12) |
| C7 | C6 | C11 | F3 | 178.31 (0.10) |
| C7 | C6 | C11 | C10 | -2.14 (0.18) |
| F1 | C7 | C8 | C9 | 175.96 (0.11) |
| C6 | C7 | C8 | C9 | -2.97 (0.19) |
| C7 | C8 | C9 | F2 | 179.42 (0.12) |
| C7 | C8 | C9 | C10 | -0.27 (0.23) |
| F2 | C9 | C10 | C11 | -177.70 (0.12) |

| | | | | |
|----|-----|-----|-----|----------------|
| C8 | C9 | C10 | C11 | 1.99 (0.22) |
| C9 | C10 | C11 | F3 | 178.85 (0.12) |
| C9 | C10 | C11 | C6 | -0.70 (0.20) |

Table of Least-Squares Planes

Orthonormal Equation of Plane 1

$$0.6101 X + -0.7142 Y + -0.3430 Z - -5.8070 = 0$$

$$0.0004 \quad 0.0004 \quad 0.0005 \quad 0.0032$$

Crystallographic Equation of Plane

$$3.0294 X + -8.0047 Y + -6.9374 Z - -5.8070 = 0$$

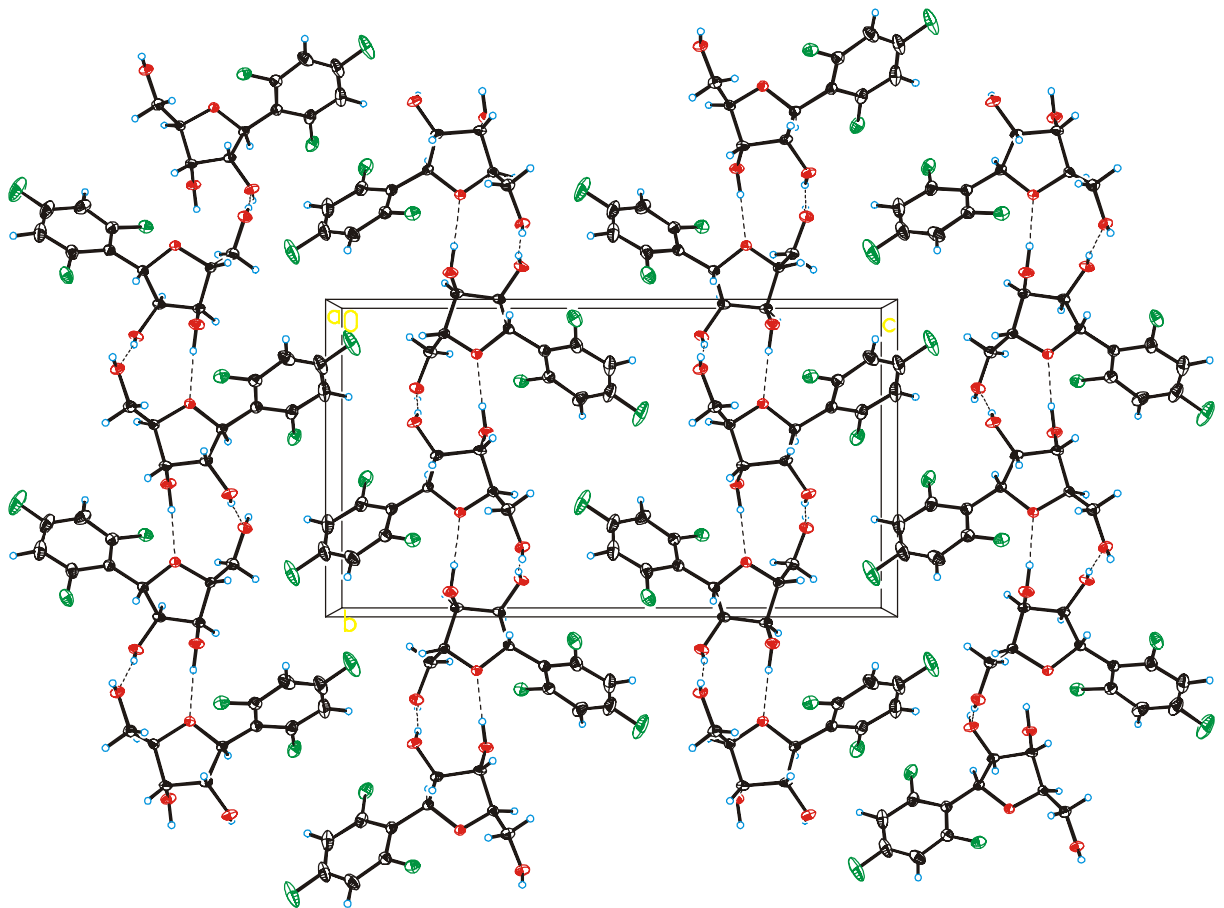
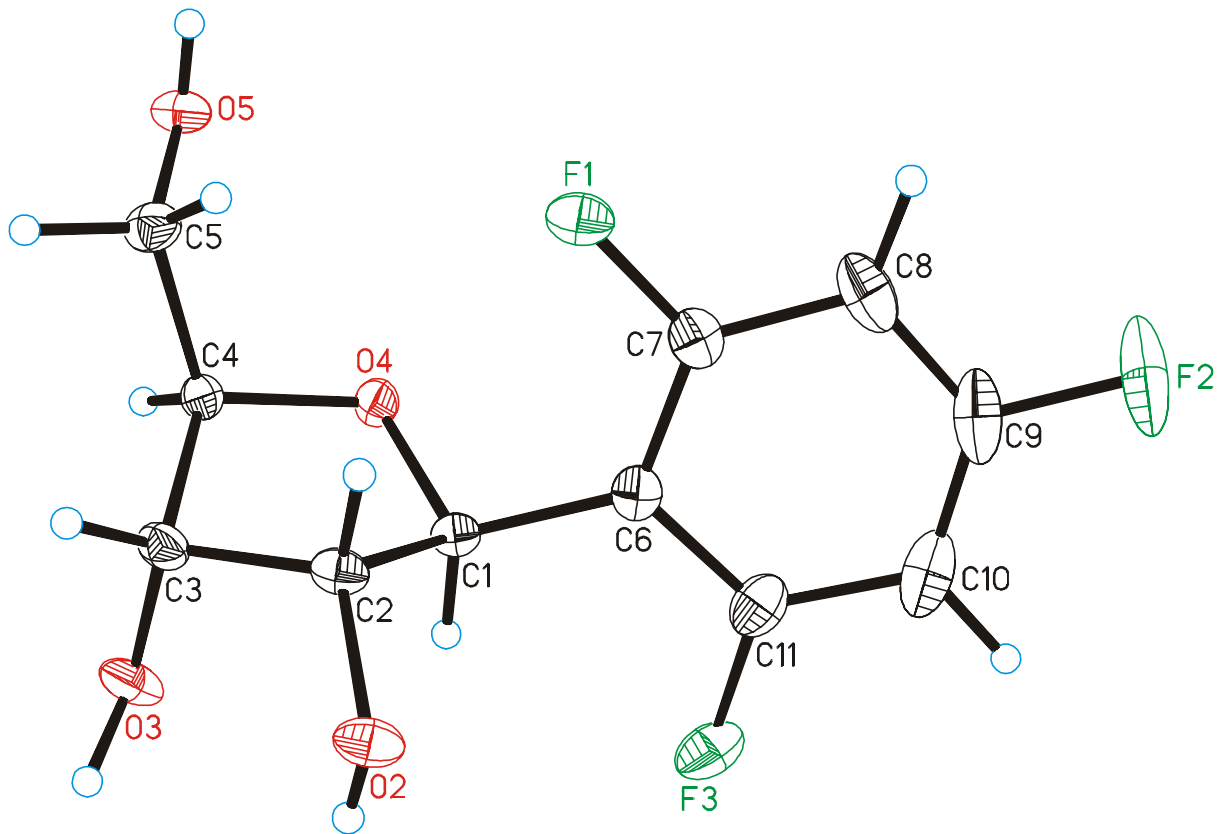
$$0.0022 \quad 0.0042 \quad 0.0104 \quad 0.0032$$

| Atom | X | Y | Z | Distance | Esd |
|------|---------|--------|--------|-------------------|-----|
| C6 | 0.4443 | 7.3939 | 2.3775 | -0.0181 +- 0.0011 | |
| C7 | 1.4907 | 8.2928 | 2.2539 | 0.0208 +- 0.0012 | |
| C8 | 1.7174 | 9.0617 | 1.1338 | -0.0057 +- 0.0013 | |
| C9 | 0.8736 | 8.8615 | 0.0665 | -0.0115 +- 0.0015 | |
| C10 | -0.1494 | 7.9540 | 0.0655 | 0.0128 +- 0.0015 | |
| C11 | -0.3373 | 7.2470 | 1.2357 | 0.0016 +- 0.0012 | |

Chi Squared = 741.0

----- Other Atoms -----

| | | | | | |
|----|---------|--------|---------|-------------------|--|
| C1 | 0.1303 | 6.6391 | 3.6365 | -0.1025 +- 0.0010 | |
| F1 | 2.3577 | 8.4133 | 3.2817 | 0.1112 +- 0.0007 | |
| F2 | 1.0699 | 9.6161 | -1.0440 | -0.0496 +- 0.0010 | |
| F3 | -1.3567 | 6.3554 | 1.2809 | 0.0009 +- 0.0008 | |

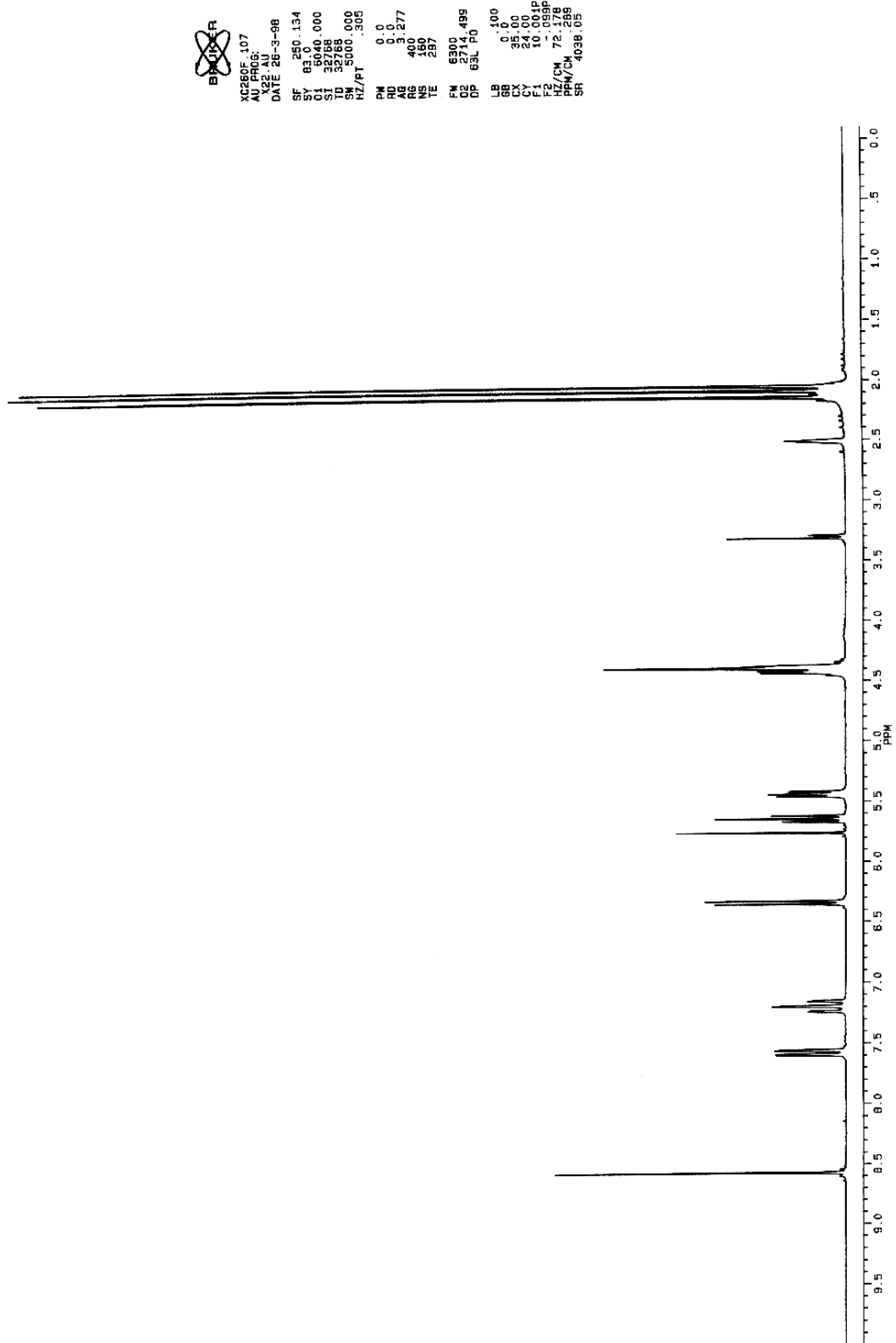


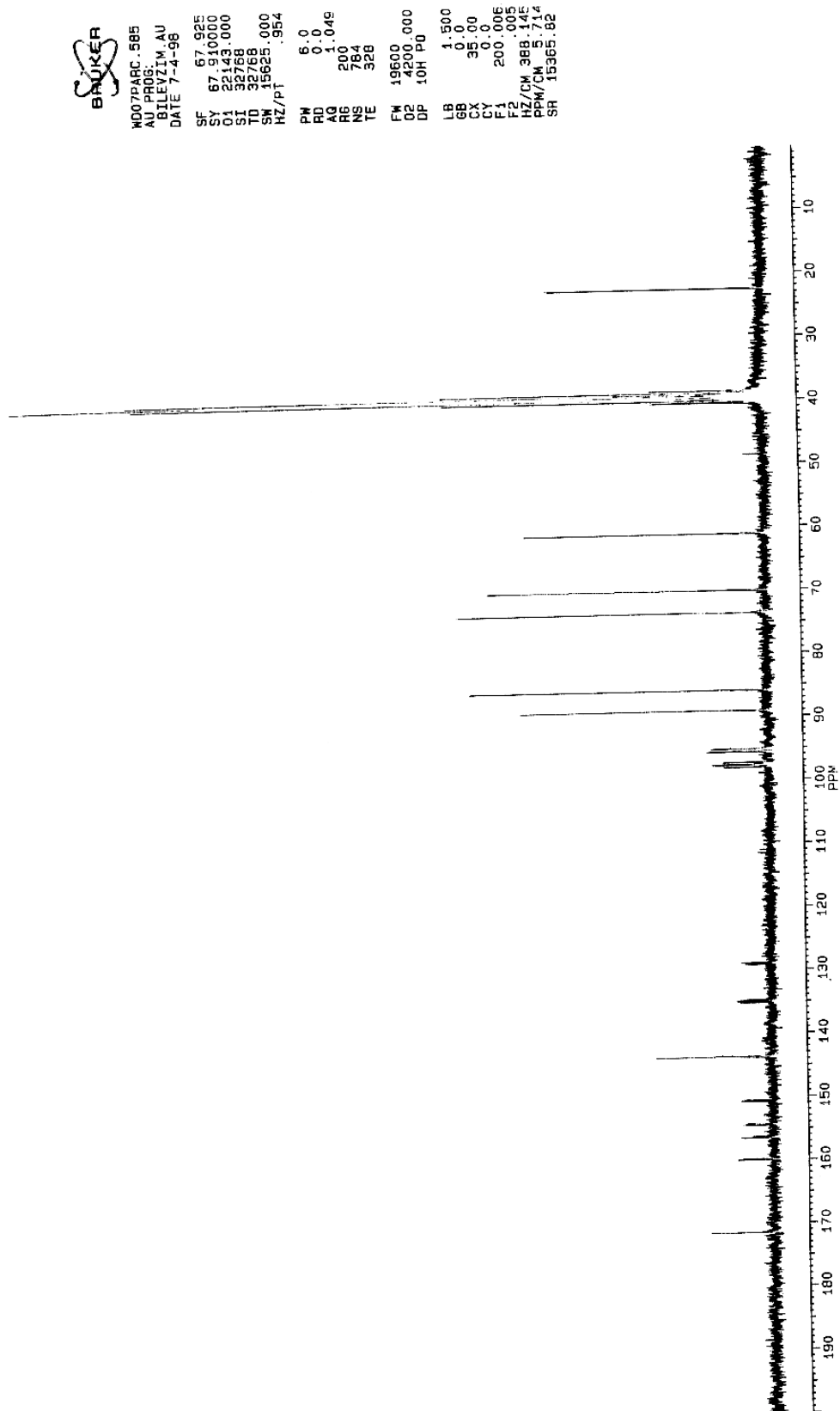
11 Teil B Ausgewählte Spektren

- B1 ^1H -NMR Spektrum von 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **56**
- B2 ^{13}C -NMR Spektrum von 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **33**
- B3 ^1H -NMR Spektrum von 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4-fluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **68**
- B4 ROESY-NMR Spektrum von 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4-fluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **68**
- B5 ROESY-NMR Spektrum von 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4-fluor-3-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **69**
- B6 ^{31}P -NMR Spektrum von 3'-*O*-(2-Cyanethoxydiisopropyl-phosphin)-1'-desoxy-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-(4-fluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **73**
- B7 ^1H -NMR Spektrum von 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose **62**
- B8 ^1H -NMR Spektrum von 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **30**
- B9 ^1H -NMR Spektrum von 1'-Desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **34**
- B10 ^1H -NMR Spektrum von 1'-Desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **35**
- B11 ^1H -NMR Spektrum von 1'-Desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **36**
- B12 ^{19}F -NMR Spektrum von 1'-Desoxy-1'-(2,4,6-trifluorphenyl)- β -D-ribofuranose **86**
- B13 ^1H -NMR Spektrum von 2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose **94**
- B14 ^1H -NMR Spektrum von 1-Desoxy- β -D-ribofuranose **39**

B1 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **56**

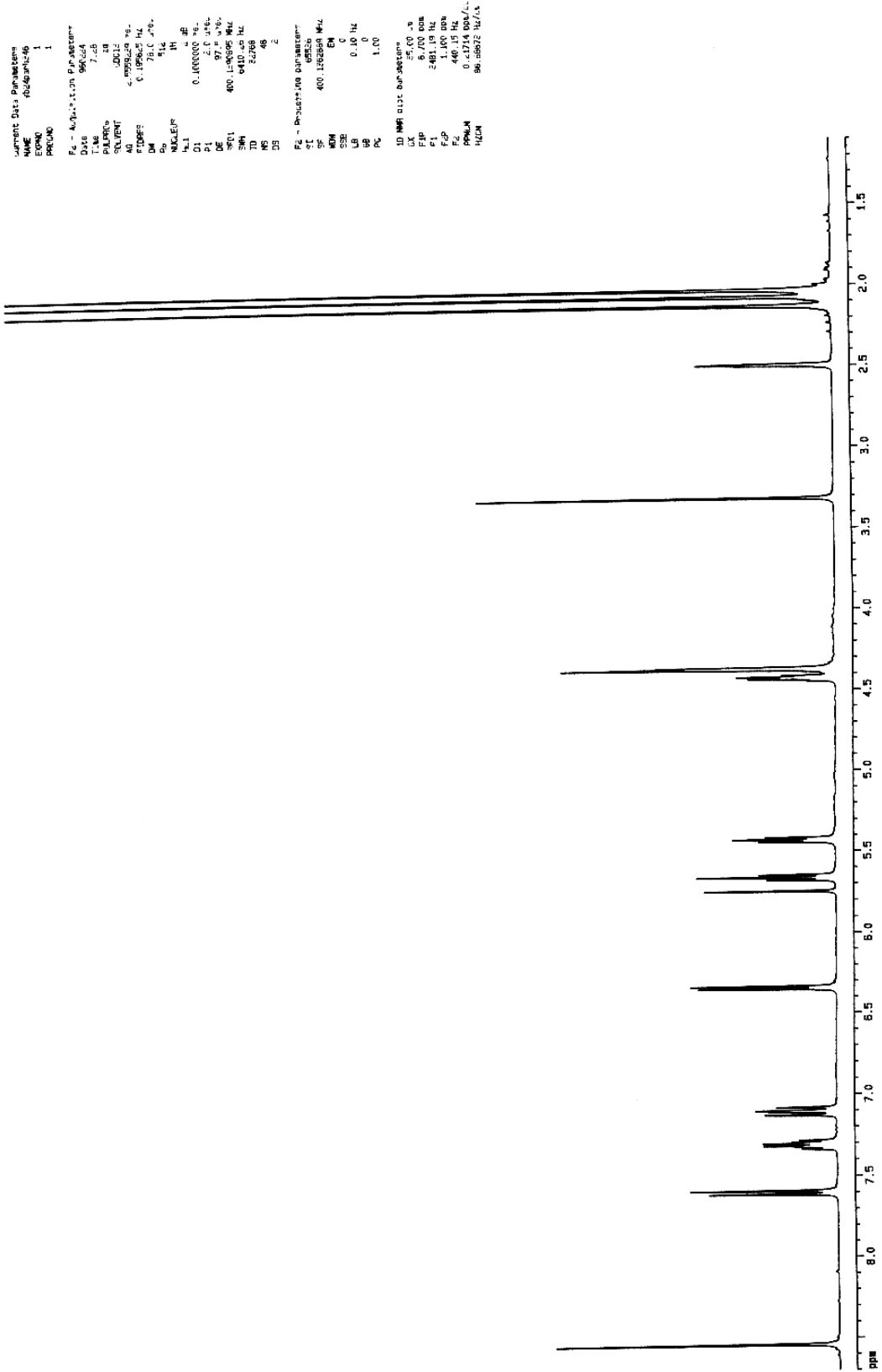
PARSCH JP166 DMSD



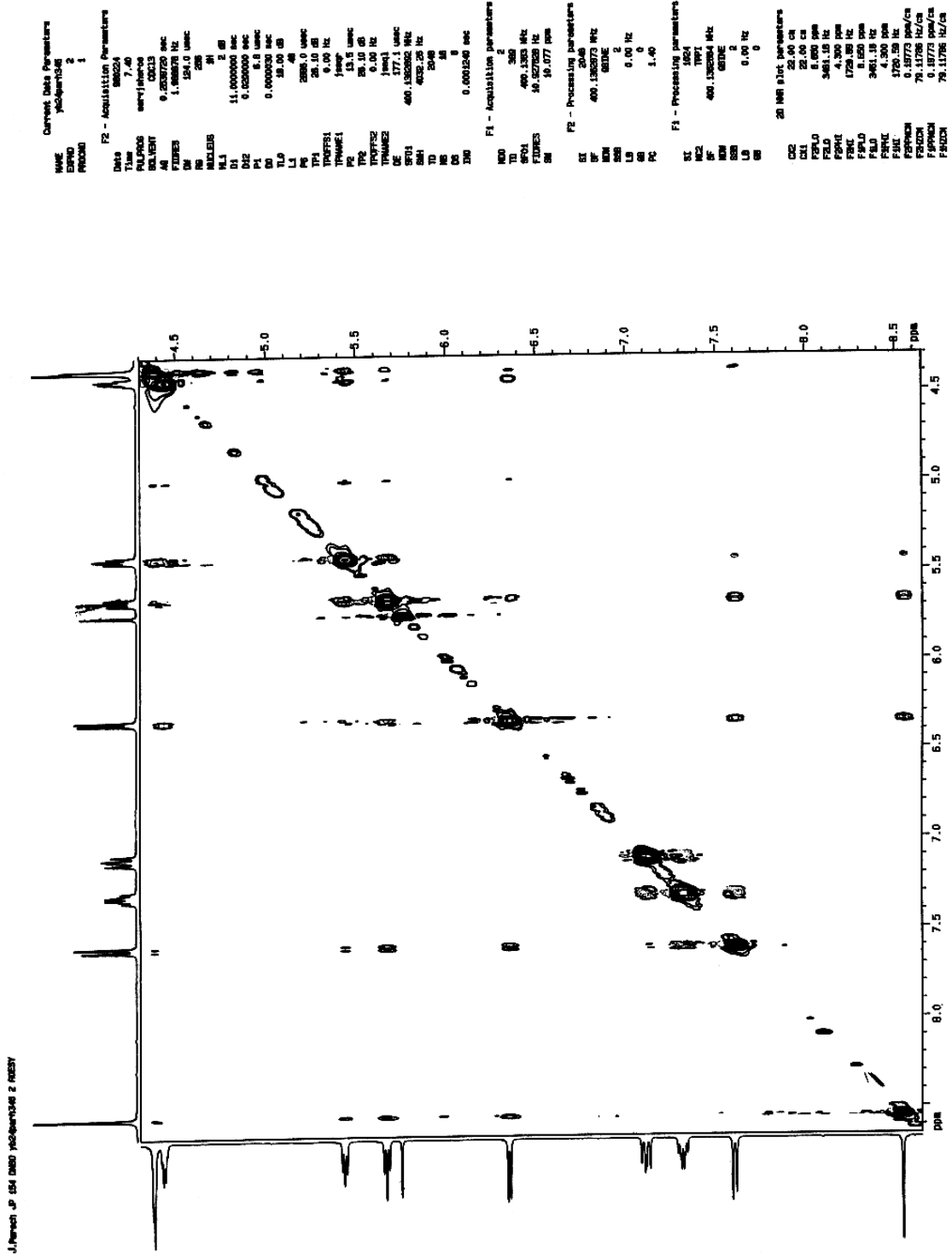
B2 ^{13}C -NMR Spektrum von 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **33**

B3 ¹H-NMR Spektrum von 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4-fluor-1-*N*-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose **68**

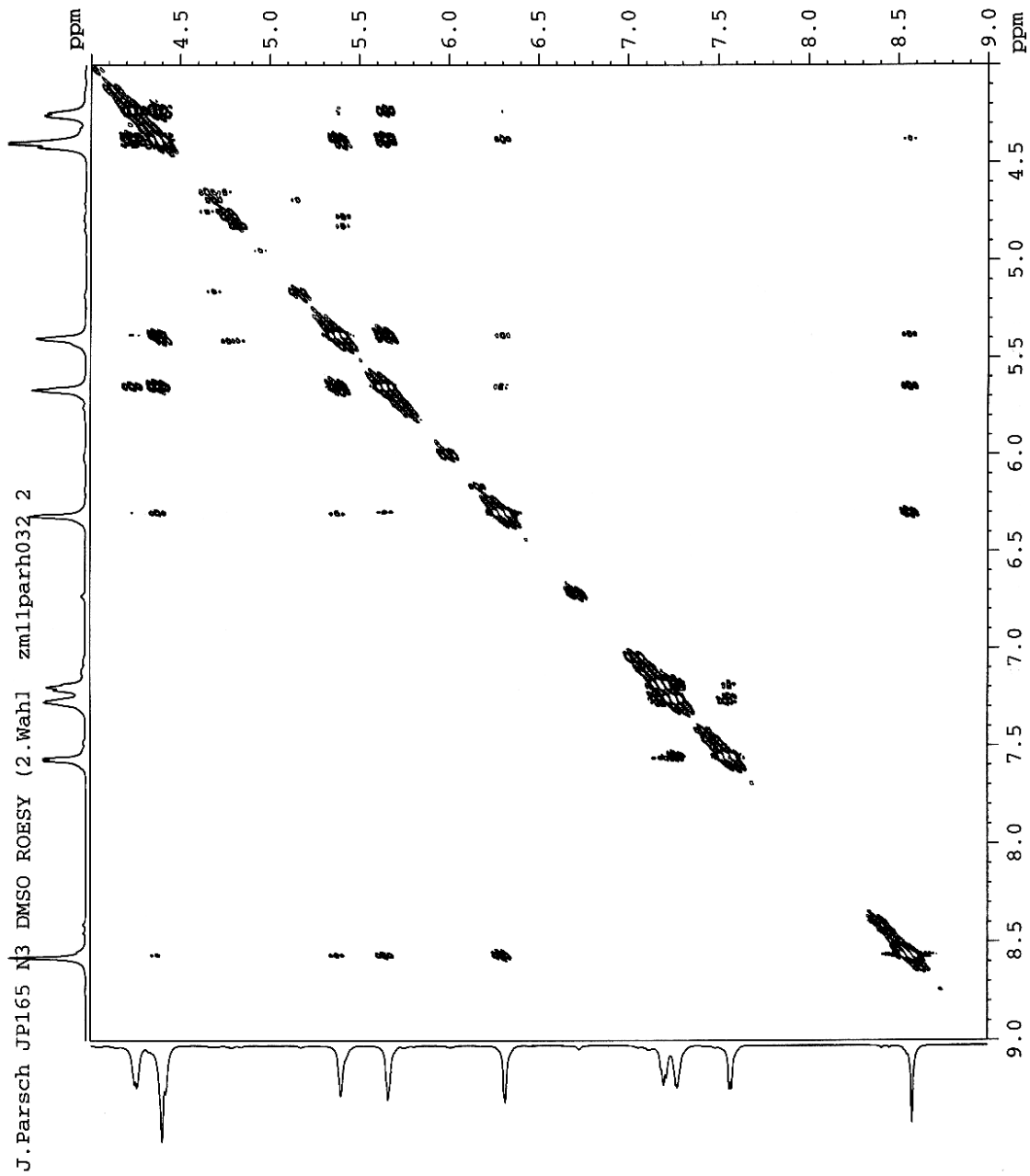
J. Parsch JP 154 DMSO yb24parh346 1 1H



B4 ROESY-NMR Spektrum von 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4-fluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **68**

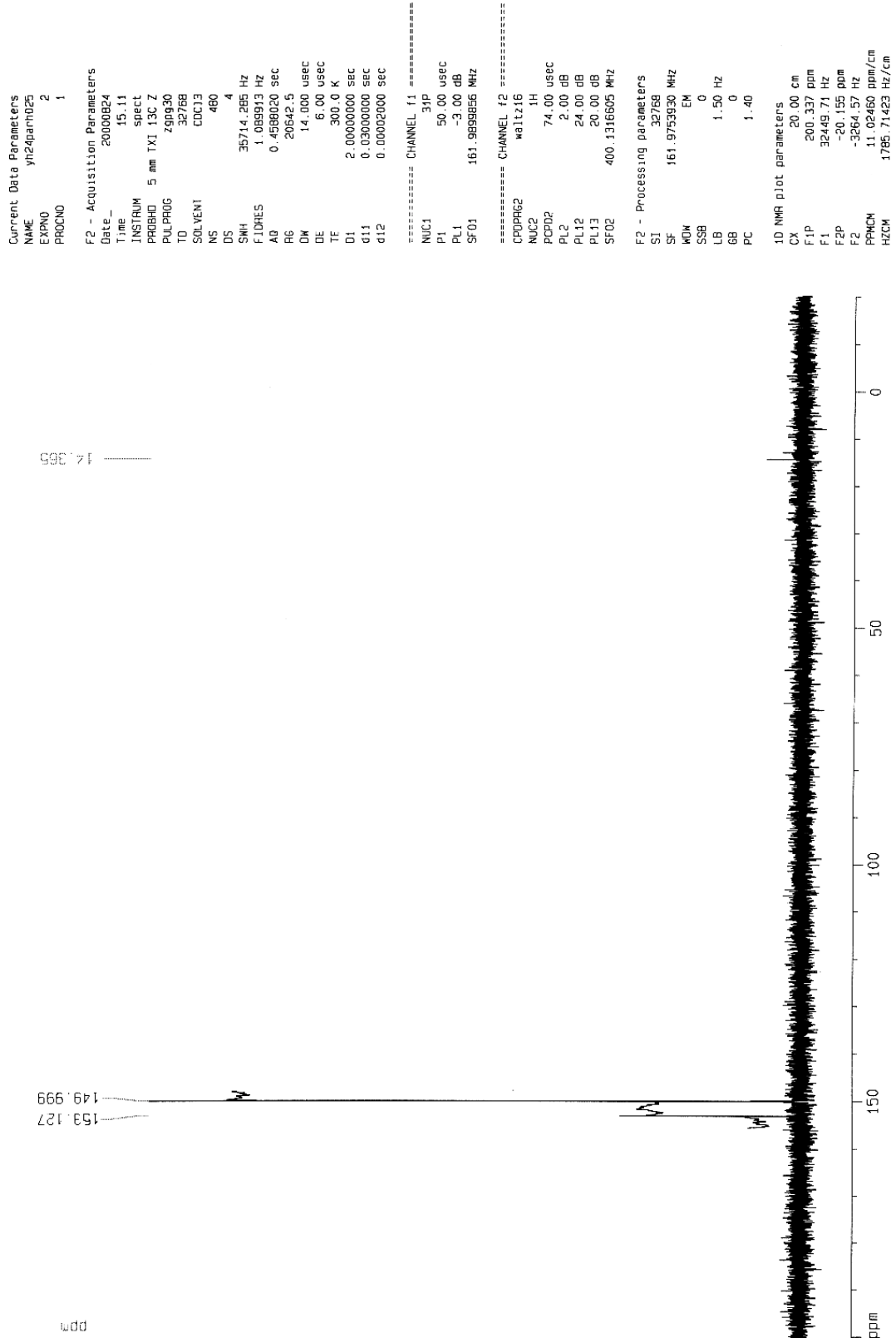


B5 ROESY-NMR Spektrum von 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4-fluor-3-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **69**

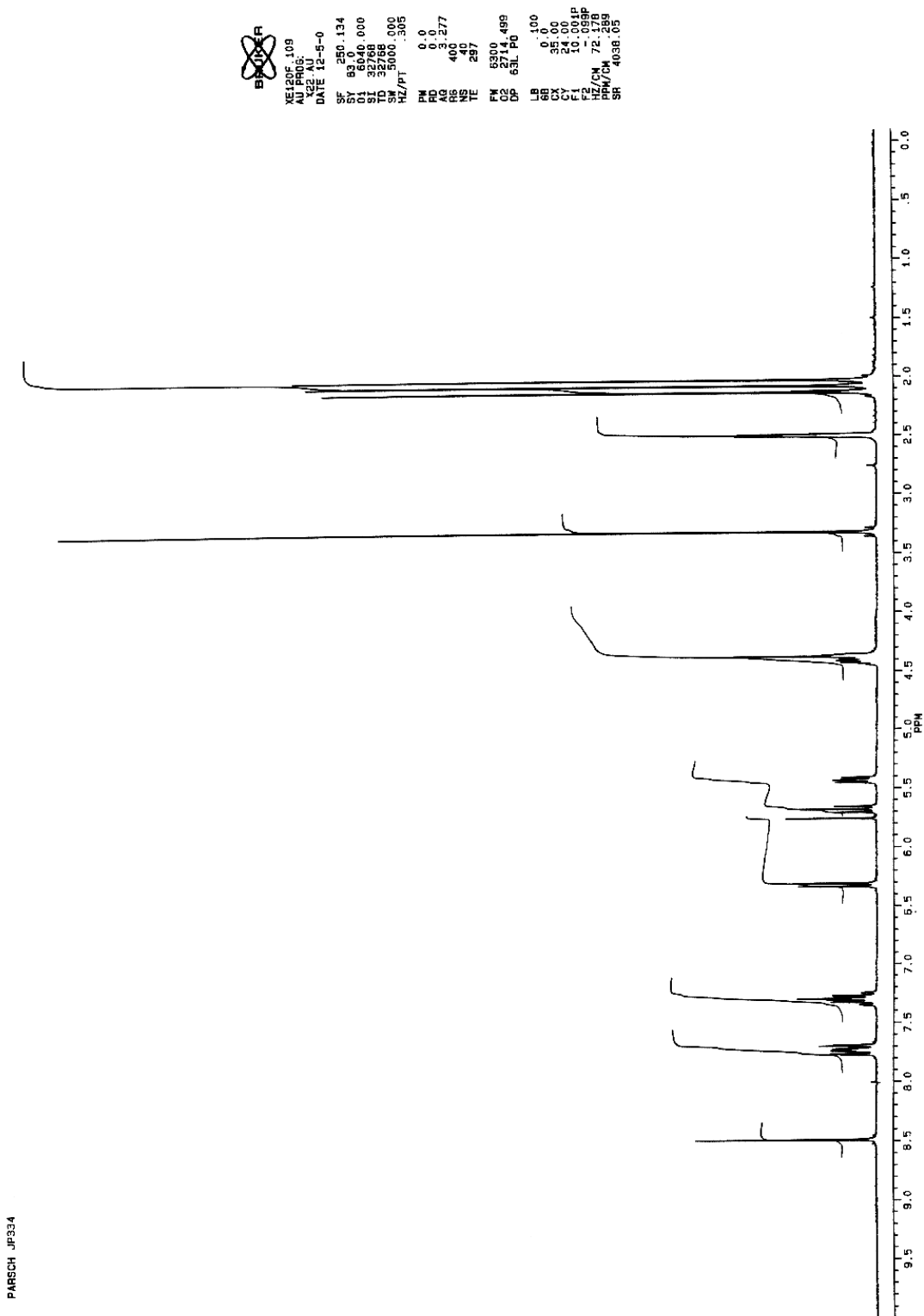


B6 ^{31}P -NMR Spektrum von 3'-*O*-(2-Cyanoethoxydiisopropyl-phosphin)-1'-desoxy-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-(4-fluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **73**

J. Parsch JP 353 31P yn24parh025 2/1




B7 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-benzimidazolyl- β -
D-ribofuranose **62**

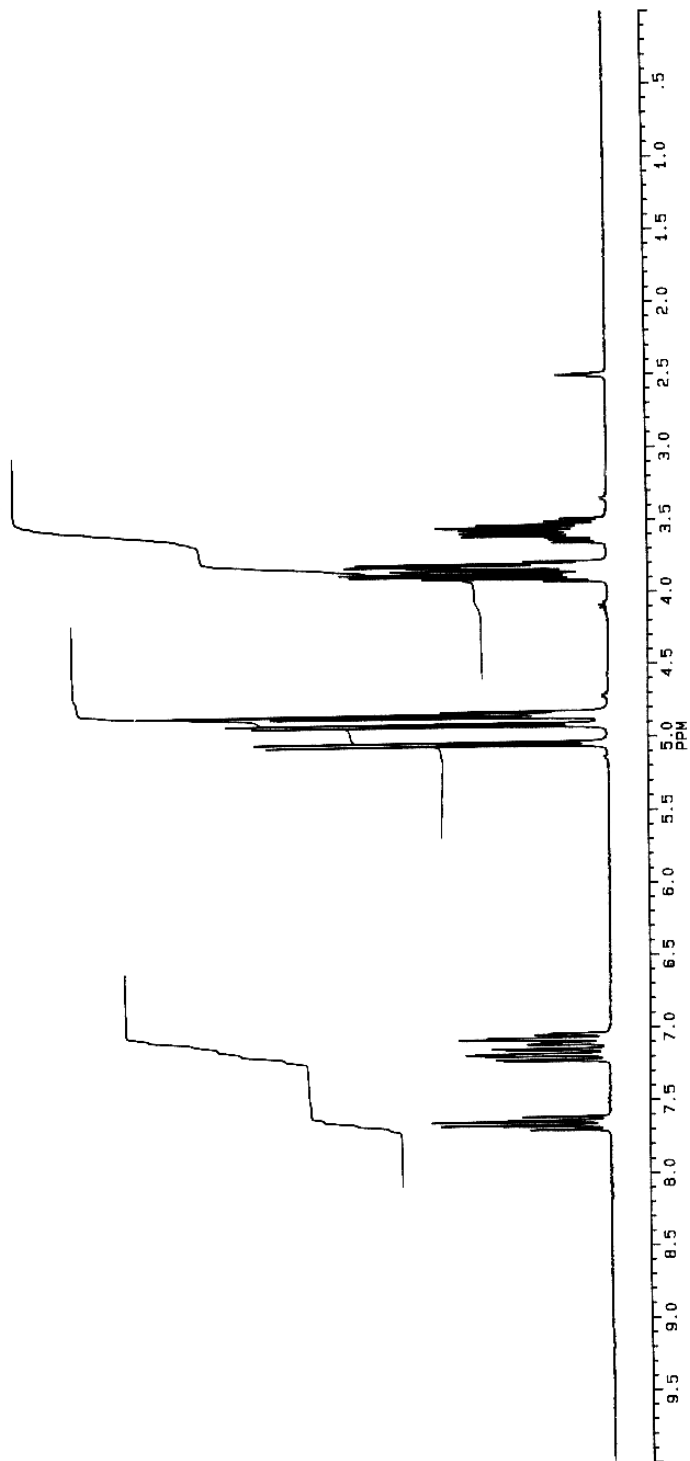


B8 ^1H -NMR Spektrum von 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **30**

J. PARSCH JP 227 DMSO MN19PARH.020

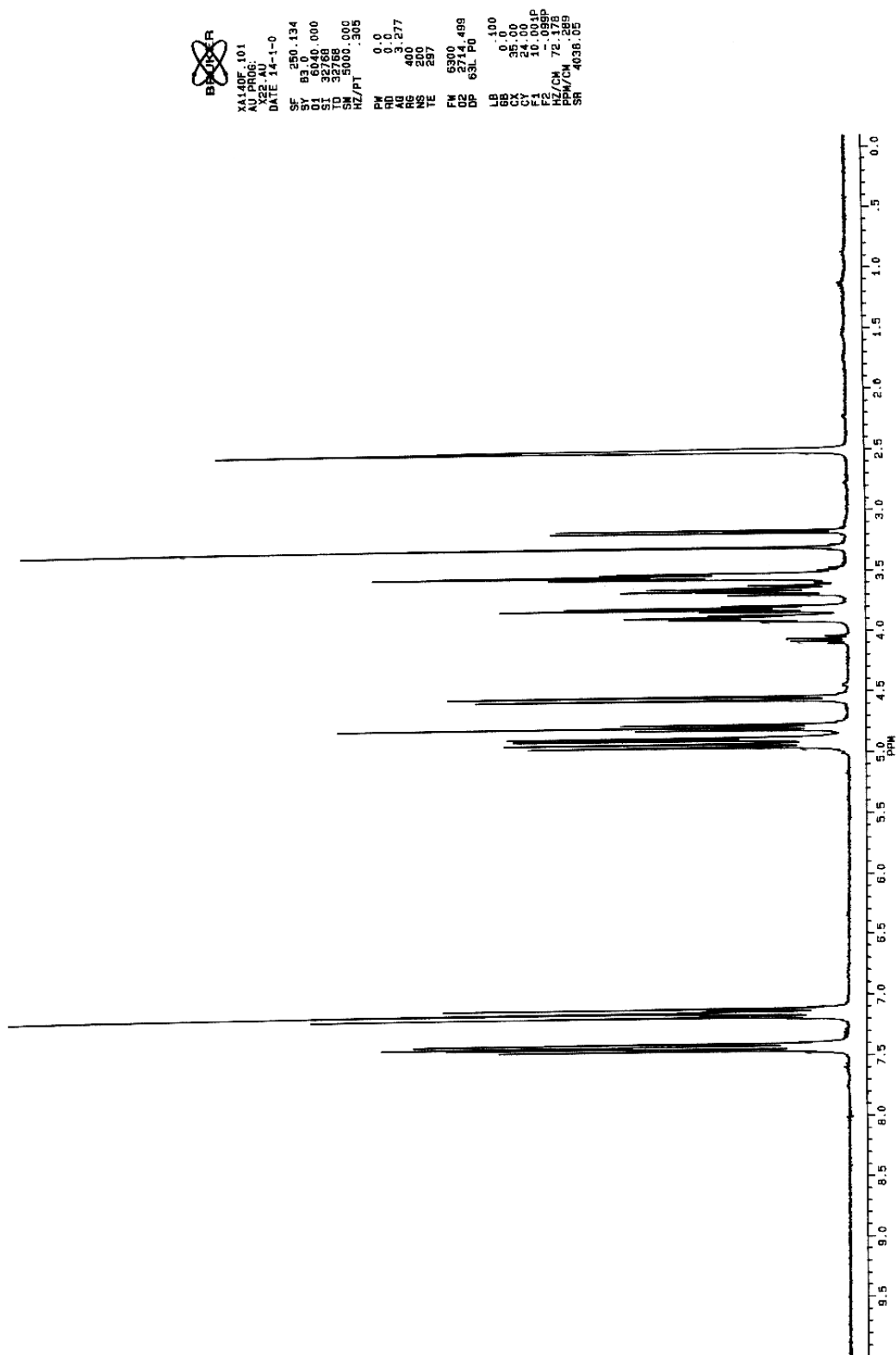


 MN19PARH.020
 DATE 19-1-99
 SF 270.134
 SY 120.130000
 O1 6093.000
 SI 32768
 TD 16384
 SW 4065.041
 HZ/PT .24E
 PH 1.5
 PD 0.0
 AQ 2.01E
 RG 20
 NS 200
 TE 299
 FM 5100
 O2 0.0
 DP 60L P0
 LB 0.0
 GB 0.0
 CX 351.00
 CY 0.0000
 F3 10.0000
 HZ/CM 77.184
 PPM/CM
 SR 4338.88



B9 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von 1'-Desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **34**

J. PARSCH JP 299 DMSO



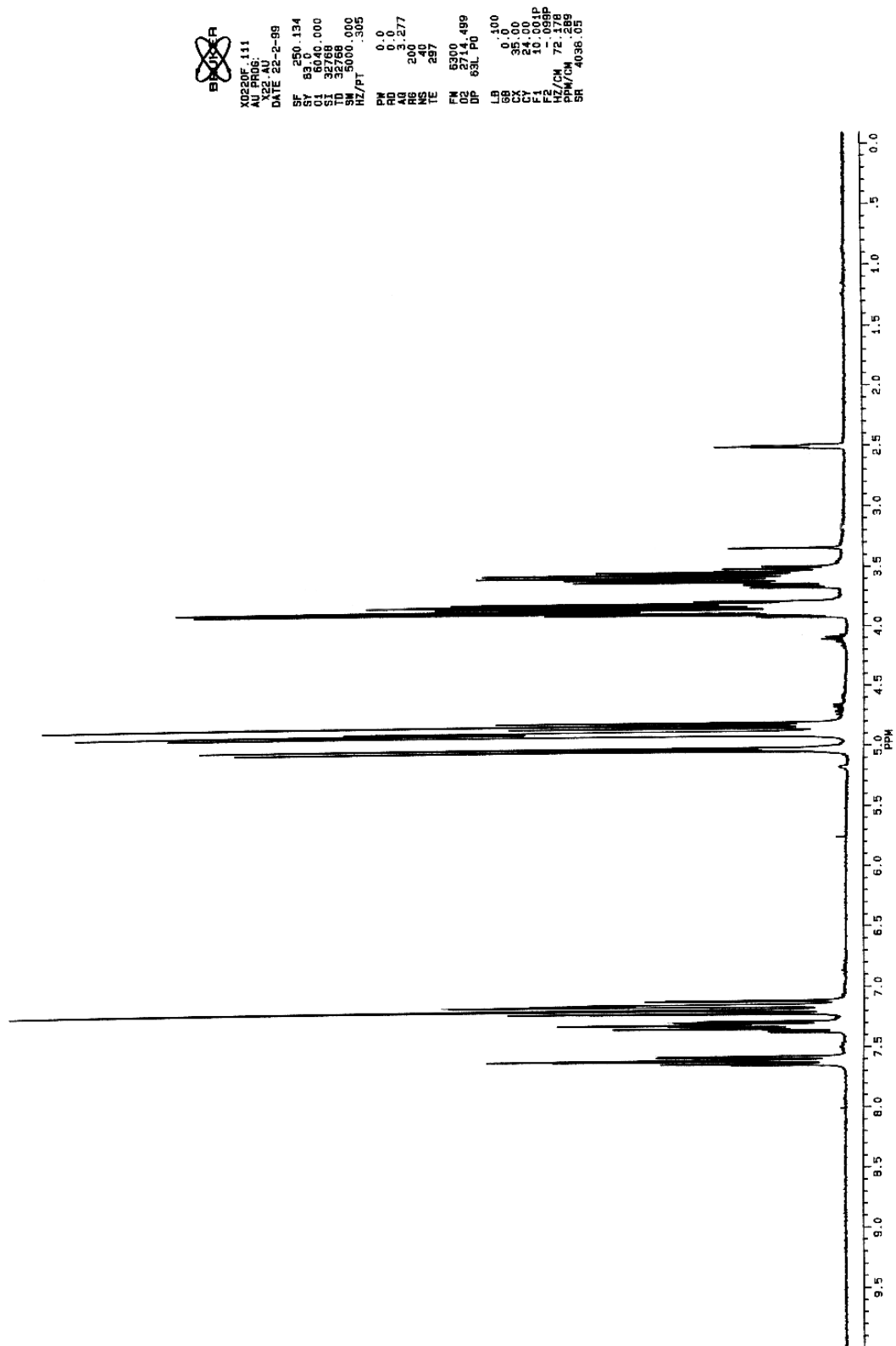
B10 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von 1'-Desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **35**

PARSCH JP213 DMSO WL11PARH.959



B11 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von 1'-Desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose **36**

J. PARSCH JP 236 DMSO



B12 ^{19}F -NMR Spektrum von 1'-Desoxy-1'-(2,4,6-trifluorphenyl)- β -D-ribofuranose**86**

```

Current Data Parameters
NAME      w130parf257
EXPNO    1
PROCNO   1

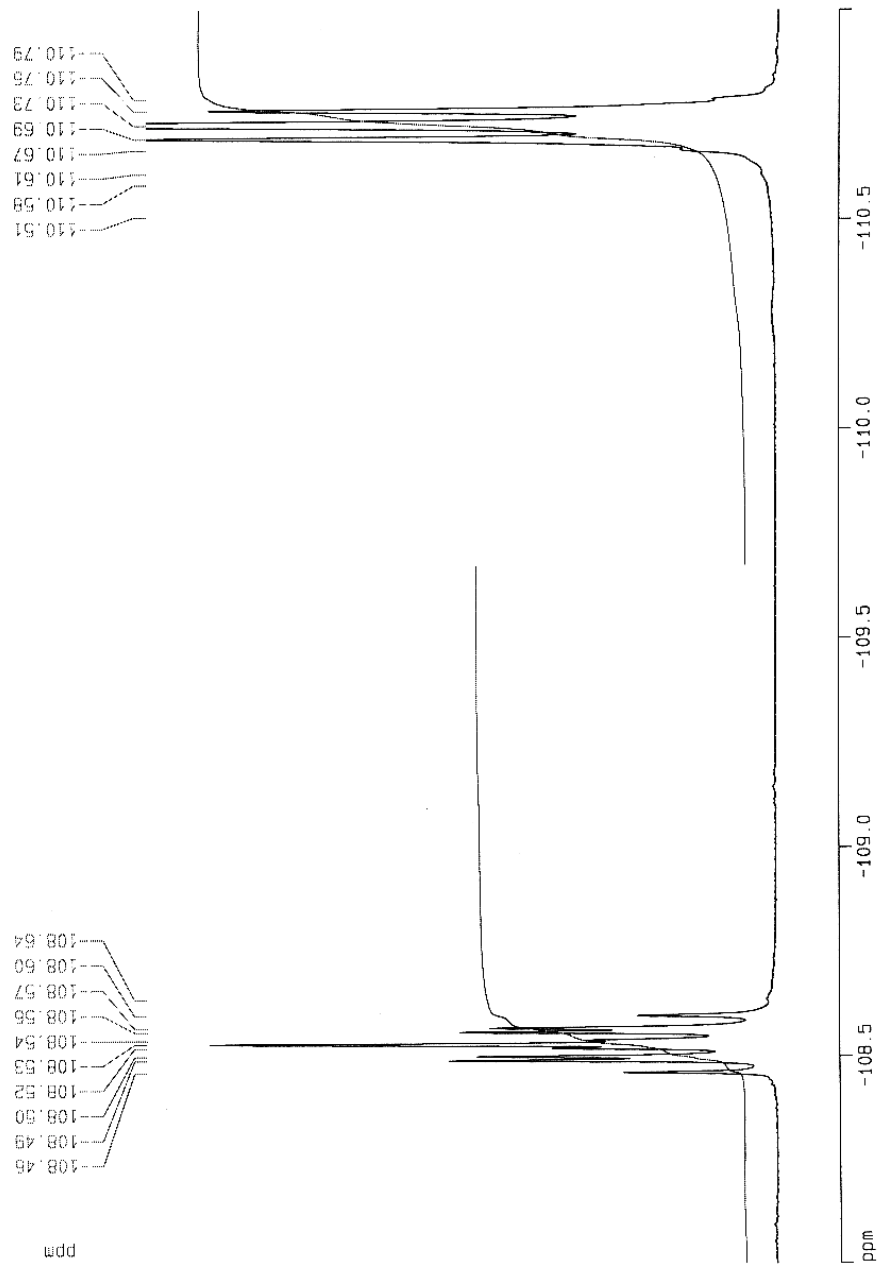
F2 - Acquisition Parameters
Date_    20001130
Time     2.23
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm QNP 1H/
PULPROG  zgpg30
TD       262144
SOLVENT  D2O
NS       200
DS       4
SWH      14124.294 Hz
FIDRES  0.053880 Hz
AQ       9.2799473 sec
RG       574.7
DM       35.400 usec
DE       6.00 usec
TE       300.0 K
D1       1.00000000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1     19F
P1       6.00 usec
PL1      0.00 dB
SFO1     235.3315657 MHz

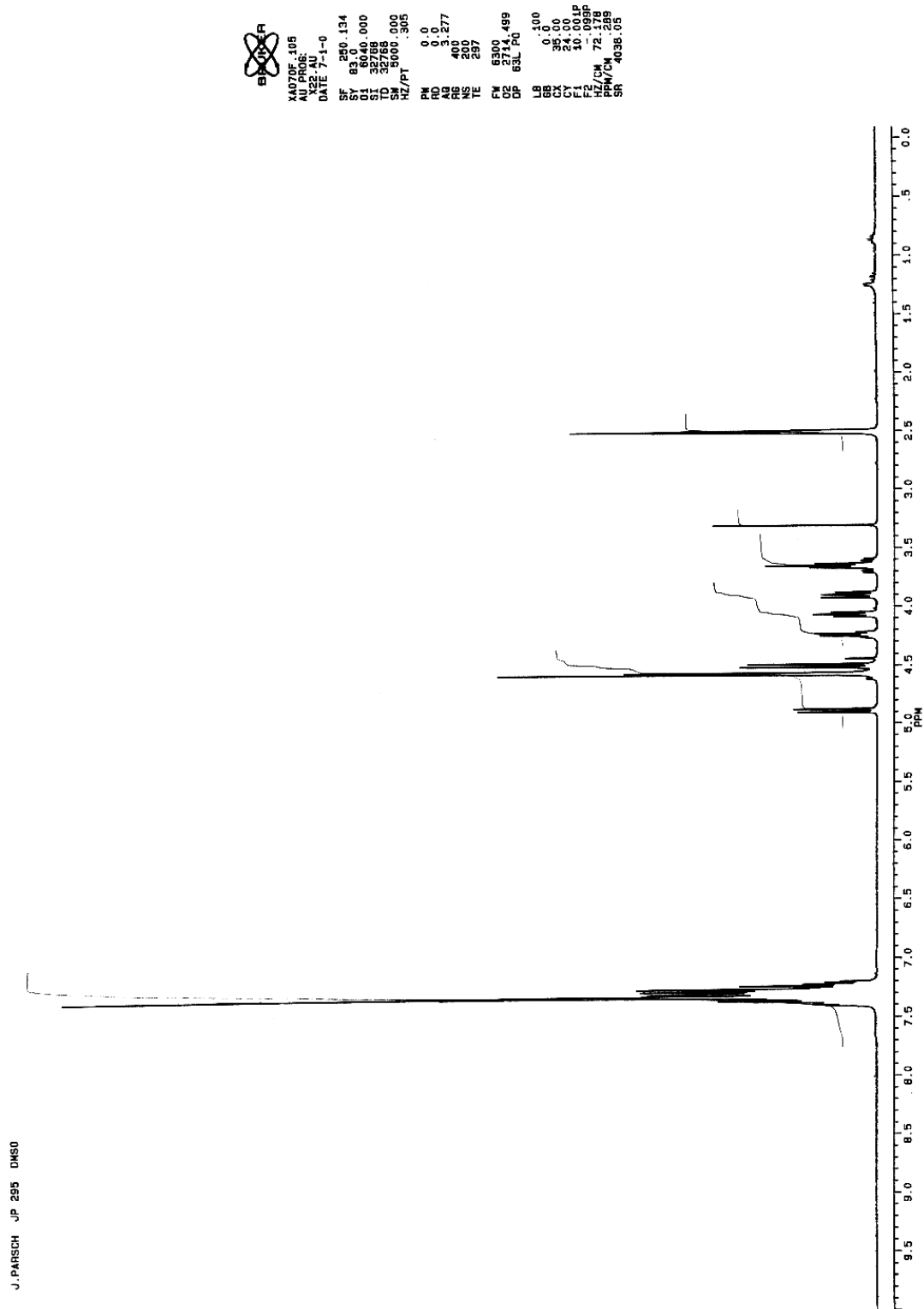
F2 - Processing parameters
SI       262144
SF       235.3574550 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       0.10 Hz
GB       0
PC       1.00

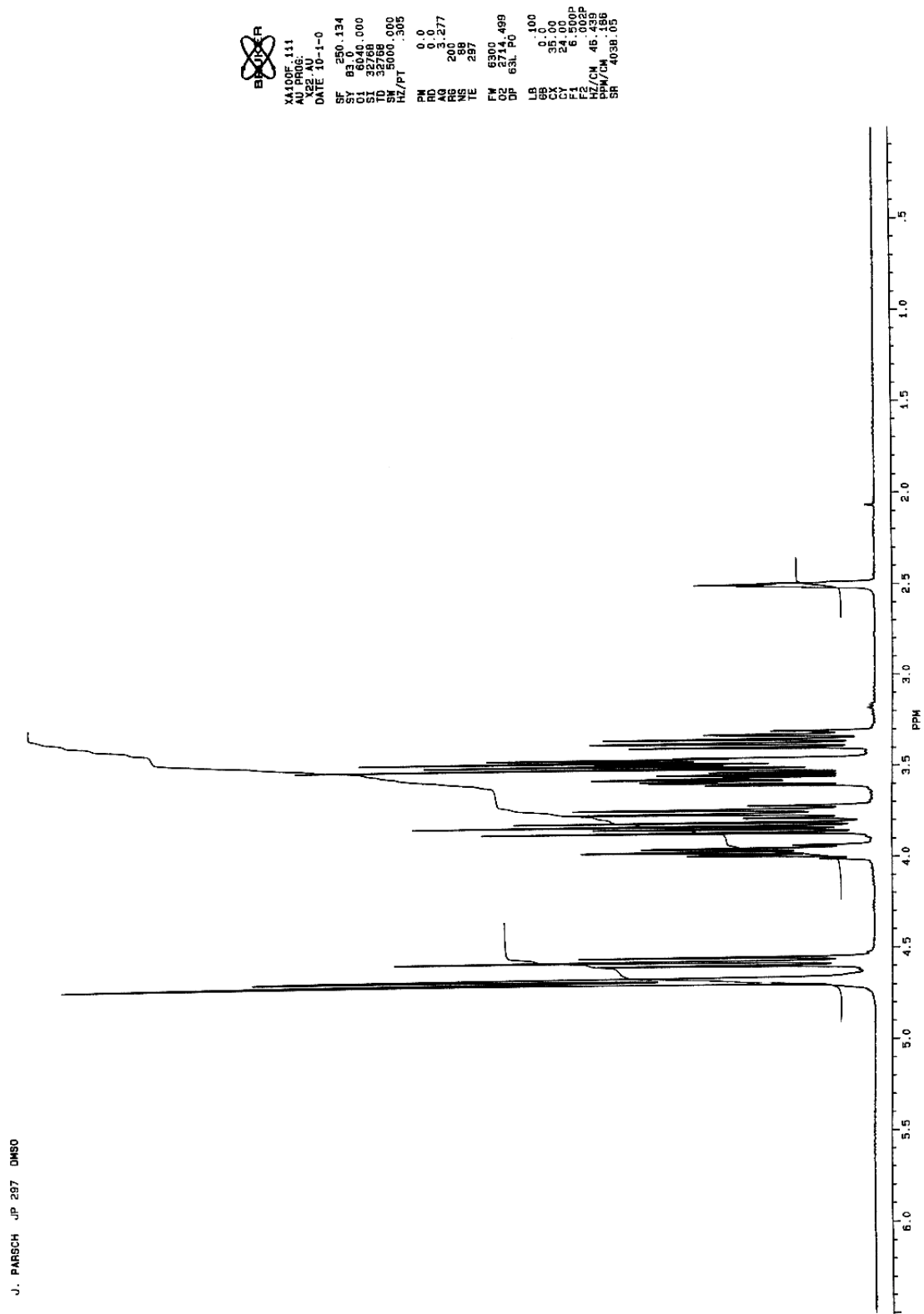
1D NMR plot parameters
CX       20.00 cm
F1P      -108.000 ppm
F1       -25418.61 Hz
F2P      -111.000 ppm
F2       -26124.68 Hz
PPMCH   0.15000 ppm/cm
HZCM    35.30362 Hz/cm

```



B13 $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von 2',3',5'-Tri-*O*-benzyl-1'-desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose 94



B14 ^1H -NMR Spektrum von 1-Desoxy- β -D-ribofuranose **39**

12 Teil C Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|--|
| a | Akzeptor |
| α | Bruchteil der Oligonukleotide im geordneten Zustand |
| A | Adenin, Adenosin |
| Å | Ångström |
| Abb. | Abbildung |
| Abk. | Abkürzung |
| abs. | absolut |
| Ac | Acetyl |
| ac | anticlinal |
| ap | antiperiplanar |
| ar | aromatisch |
| a_w | Wasseraktivität |
| | |
| B | 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose |
| b_o | Ordinatenschnittpunkt der oberen Basislinie von Oligonucleotid Schmelzkurven |
| b_u | Ordinatenschnittpunkt der unteren Basislinie von Oligonucleotid Schmelzkurven |
| Bn | Benzyl |
| br | breit |
| BSA | Bis-(trimethylilyl)-acetamid |
| BSE | Bovine spongiform encephalopathy |
| Bu | Butyl |
| Bz | Benzoyl |
| bzw. | beziehungsweise |
| | |
| C | Celsius |
| C | Cytosin, Cytidin |
| c | Konzentration |
| ca. | circa |
| CD | Circular Dichroismus |
| cm | Zentimeter |

| | |
|---------------------|--|
| CJD | Creutzfeld-Jakob disease |
| COSY | korrelierte Spektroskopie (engl.: correlated spectroscopy) |
| CPG | controlled pore glass (engl.) |
| CSD | Cambridge Structural Database |
| c_t | totale Strangkonzentration |
| δ | Chemische Verschiebung |
| d | Dichte |
| d | Dublett |
| d | Schichtdicke |
| d | Netzebenenabstand |
| d | Donor |
| D | 1'-Desoxy-1'-(4-fluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose |
| D | Dimensional |
| DAST | Diethylaminoschwefeltrifluorid |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| dd | Dublett von Dublett |
| ddA | Didesoxyadenosin |
| ddI | Didesoxyinosin |
| $\Delta\epsilon$ | molarer Circular dichroismus |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| ΔG^0 | Freie Standardreaktionsenthalpie |
| ΔH^0 | Standardreaktionsenthalpie |
| d.h. | das heißt |
| DIPEA | Diisopropylethylamin |
| DMF | <i>N,N</i> -Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DMSO-d ₆ | Dimethylsulfoxid sechsfach deuteriert |
| DMTr | Dimethoxytriphenylmethyl, Dimethoxytrityl |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| ΔS^0 | Reaktionsentropie |
| dt | Dublett von Triplett |
| Du | Duplex |

| | |
|----------------|---|
| E | 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1- <i>N</i> -benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose |
| E | Extinktion (engl.: absorbance) |
| E | envelope |
| E _L | Extinktion für linkscircular polarisiertes Licht |
| E _R | Extinktion für rechtscircular polarisiertes Licht |
| ϵ | Extinktionskoeffizient |
| ϵ_L | Extinktionskoeffizient für linkscircular polarisiertes Licht |
| ϵ_R | Extinktionskoeffizient für rechtscircular polarisiertes Licht |
| E. coli | Escherichia coli |
| El. | Elementar |
| engl. | englisch |
| eq. | Äquivalente |
| ESI(-) | Elektrospray-Ionisation im negativen Modus |
| ESI(+) | Elektrospray-Ionisation im positiven Modus |
| Et | Ethyl |
| et al. | et alii (und andere) |
| | |
| F | 1'-Desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose |
| f | Funktion |
| 2FA | 2-Fluoradenosin |
| FC | Flash-Chromatographie |
| FDA | US Food and Drug Administration |
| FdU | 5-Fluor-2'-desoxyuridin |
| FIAC | 2'-Fluor-5-iod-1- β -D-arabinofuranosylcytosin |
| FIAU | 2'-Fluor-5-iod-1- β -D-arabinofuranosyluracil |
| fl. | flüssig |
| FLT | 3'-Fluor-2',3'-didesoxythymidin |
| FMAU | 2'-Fluor-5-methyl-1- β -D-arabinofuranosyluracil |
| 6FN | 6-Fluornebularin |
| Fpmp | 1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-1-yl |
| FT | Fourier Transformation |
| | |
| G | Guanin, Guanosin |
| Γ | Hydratation |

| | |
|-----------------|--|
| g | gasförmig |
| g | Gramm |
| ges. | gesättigt(e) |
| H | 1'-Desoxy-1'-(3-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose |
| h | Stunde(n) |
| HIV | Human immunodeficiency virus |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: high performance liquid chromatography) |
| Hz | Hertz |
| I | Inosin |
| ibu | isobutyryl |
| <i>i</i> Pr | Isopropyl |
| IR | Infrarot |
| I_R | Intensität rechts polarisiertes Licht |
| I_L | Intensität links polarisiertes Licht |
| J | Kopplungskonstante in der NMR-Spektroskopie |
| K | 1'-Desoxy-1'-(2-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose |
| K | Gleichgewichtskonstante |
| K | Kelvin |
| Kap. | Kapitel |
| katal. | katalytisch |
| kcal | Kilokalorien |
| K_{Diss} | Dissoziationskonstante |
| konz. | konzentriert |
| krist. | kristallin |
| λ | Wellenlänge |
| λ_{max} | Wellenlänge des Absorptionsmaximums |
| LDA | Lithiumdiisopropylamin |
| LDI | Laserdesorption/Ionisation |

| | |
|----------------|--|
| ln | natürlicher Logarithmus |
| log | dekadischer Logarithmus |
| log P | Verteilungskoeffizient |
| Lsg. | Lösung |
| M | 1'-Desoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose |
| M | molar |
| m | Masse |
| m | Multipllett |
| m _o | Steigung der oberen Basislinie von Oligonukleotid Schmelzkurven |
| m _u | Steigung der unteren Basislinie von Oligonukleotid Schmelzkurven |
| MALDI | Matrix unterstützte Laser Desorption/Ionisation (engl.: matrix assisted laser desorption/ionization) |
| max. | maximal |
| Me | Methyl |
| mg | Milligramm |
| mGrad | Milligrad |
| MHz | Megahertz |
| min. | Minute(n) |
| ml | Milliliter |
| μ M | Mikrometer |
| mm | Millimeter |
| mM | millimolar |
| mmol | Millimol |
| MMTr | Monomethoxytriphenylmethyl, Monomethoxytrityl |
| mRNA | Boten-Ribonukleinsäure |
| MS | Massenspektrometrie |
| μ V | Mikrovolt |
| N | 1-Desoxy-D-ribofuranose |
| N | normal |
| n | Molekularität des Überganges |
| n.b. | nicht berechnet |
| nM | nanomolar |

| | |
|------------------------|---|
| nm | Nanometer |
| NMR | Kernmagnetische Resonanz (engl.: Nuclear Magnetic Resonance) |
| NPE | Nitrophenylethyl |
| Nr. | Nummer |
| O | 1'-Desoxy-1'-benzimidazolyl- β -D-ribofuranose |
| o | ortho |
| OD ₂₆₀ | Optische Dichte bei 260 nm, Extinktion bei 260 nm |
| OD _o | Optische Dichte (Extinktion) der oberen Basislinie von Oligonukleotid Schmelzkurven |
| OD _u | Optische Dichte (Extinktion) der unteren Basislinie von Oligonukleotid Schmelzkurven |
| ODN | Oligodesoxynukleotid |
| p | para |
| p.a. | pro analysi |
| PCR | Polymerase Ketten Reaktion (engl.: polymerase chain reaction) |
| pDC | präparative Dünnschichtchromatographie |
| PIPES | Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure) |
| pm | picometer |
| ppm | parts per million |
| Θ | Elliptizität |
| $[\Theta]_{\lambda}$ | spezifische Elliptizität |
| $[\Theta_M]_{\lambda}$ | molare Elliptizität |
| q | Quartett |
| R | universelle Gaskonstante |
| r | Radius |
| r | ribo |
| r ² | Gütefaktor der linearen Regression |
| R _f | Retentionsfaktor |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROE | Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect |

| | |
|----------------|---|
| ROESY | Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (engl.) |
| RP | Umkehrphase (engl.: reversed phase) |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (engl.: revolutions per minute) |
| rRNA | ribosomale Ribonucleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| | |
| s | Singulett |
| s | Sekunde(n) |
| S | Strang |
| Sdp. | Siedepunkt |
| Smp. | Schmelzpunkt |
| sym. | symmetrisch |
| | |
| T | Thymin, Thymidin |
| T | Temperatur |
| T | twist |
| t | Triplett |
| tac | tertbutylphenoxyacetyl |
| Taq | Thermus aquaticus |
| TASF | Tris-(dimethylamino)-schwefel-(trimethylsilyl)-difluorid |
| TBDMS | <i>tert.</i> Butyldimethylsilyl |
| TBAF | Tetrabutylammoniumfluorid |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TEA | Triethylamin |
| techn. | technisch |
| tert. | tertiär |
| Tf | Trifluormethylsulfonat, Triflat |
| THF | Tetrahydrofuran |
| T _m | Schmelztemperatur (engl.: melting temperature) |
| TMS | Trimethylsilyl |
| TMSTf | Trimethylsilyltrifluormethansulfonat, Trimethylsilyltriflat |
| TOF | Flugzeit (engl.: time of flight) |
| TOM | Triisopropylsilyloxymethyl |
| Tr | Triphenylmethyl, Trityl |

| | |
|----------|---------------------------|
| tRNA | transfer Ribonucleinsäure |
| U | Uracil, Uridin |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volumen |
| verd. | verdünnt |
| vgl. | vergleiche |
| VIS | sichtbar (engl.: visible) |
| wäßr. | wäßrig |
| ψ t | Pseudotriplett |
| z | Ladung |
| z.B. | zum Beispiel |

Publikationen, Vorträge und Poster

a) Publikationen:

- Parsch, J.; Engels, J.W.; C-F...H-C Hydrogen Bonds in Crystals of Fluorobenzene Ribonucleosides, *Collection Symposium Series*, Vol. 2, Ed. A. Holy and M. Hocek, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, **1999**, 11-15.
- Bats, J.W.; Parsch, J.; Engels, J.W.; 1-Deoxy-1-(2-fluorophenyl)- β -D-ribofuranose, *Acta Cryst. C*, **1999**, 55, IUC9900069
- Bats, J.W.; Parsch, J.; Engels, J.W.; 1-Deoxy-1-(3-fluorophenyl)- β -D-ribofuranose, *Acta Cryst. C*, **1999**, 55, IUC9900070
- Bats, J.W.; Parsch, J.; Engels, J.W.; 1-Deoxy-1-(4-fluorophenyl)- β -D-ribofuranose, its hemihydrate, and 1-deoxy-1-(2,4-difluorophenyl)- β -D-ribofuranose: Structural evidence for intermolecular C-H...F-C interactions, *Acta Cryst. C*, **2000**, 56, 201-205
- Parsch, J.; Engels, J.W.; Synthesis of Fluorobenzene and Benzimidazole Nucleic-Acid Analogues and Their Influence on Stability of RNA Duplexes, *Helv. Chim. Acta*, **2000**, 83, 1791-1808
- Parsch, J.; Engels, J.W.; Stacking and Stability of RNA Duplexes Containing Fluorobenzene and Fluorobenzimidazole Nucleosides, *Nucleosides Nucleotides*, **2001**, 20, 815-818

b) Vorträge:

- C-F...H-C hydrogen bonds in nucleic acid recognition, Vortrag auf dem „XIth Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components“ vom 04.09. – 10.09.1999 in Spindleruv Mlýn, Tschechische Republik

c) Poster:

- Fluoro-modified Ribonucleoside Analogues: Influence on the Stability of the UUCG-hairpin Loop, Poster auf dem 5. Kolloquium des DFG-Schwerpunktprogramms „RNA-Biochemie“ vom 14.11. – 18.11.1999 in Kloster Banz
- Stacking and stability of RNA duplexes containing fluorobenzene and fluorobenzimidazole nucleosides, Poster auf dem „XIVth International Roundtable Nucleosides, Nucleotides, and Their Biological Applications“ vom 10.09. – 14.09.2000 in San Francisco, USA
- Synthese von Fluorbenzol- und Fluorbenzimidazolnucleosiden und ihr Einfluß auf Enzymaktivität und -spezifität, Poster bei der Begutachtung des beantragten Sonderforschungsbereichs 1781 „RNA-Liganden-Wechselwirkungen“ vom 11.01. – 12.01.2001 in Frankfurt am Main

Curriculum vitae

Jörg Parsch

* 11. Februar 1972 in Frankfurt am Main

Schule

1978 – 1982 Grundschule in Eschborn-Niederh ochstadt
1982 – 1988 Heinrich von Kleist Gesamtschule in Eschborn (Gymnasialzweig)
1988 – 1991 Eichwald-Gymnasium, Gymnasiale Oberstufe in Schwalbach am
Taunus
12.6.1991 Abitur

Wehrdienst

7.1991 – 6.1992 4. Batterie Flugabwehrregiment 2 in Kassel

Studium

seit 10.1992 Chemiestudium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in
Frankfurt am Main

22.11.1994 Vordiplom

2.7.1997 Diplom,
Thema der Diplomarbeit: „Synthese modifizierter
Nukleins urebausteine für eine Palladium-katalysierte
Ringschlußreaktion“ unter der Leitung von Prof. Dr. J.W. Engels

seit 9.1997 Anfertigung der Dissertation am Institut für Organische
Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main in
der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J.W. Engels

9.1997 – 8.2000 Mitglied und Stipendiat im Graduiertenkolleg „Chemische und
biologische Synthese von Wirkstoffen“