

Synthese und Anwendung 2'-O-modifizierter universeller Nucleosidanaloga als RNA Inhibitoren

Dissertation
zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

vorgelegt dem Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie

der Goethe-Universität Frankfurt am Main

Jens Haas

geb. in Mainz

Frankfurt am Main, 2008

(D 30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Goethe-Universität
als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. D. Steinhilber

Erster Gutachter: Prof. Dr. J.W. Engels

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. A. Heckel

Datum der Disputation: 12.12.2008

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit
von April 2005 bis September 2008
im Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie
der Goethe-Universität Frankfurt am Main
unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Joachim W. Engels angefertigt.

Für meine Familie.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Therapeutische Oligonucleotide	1
1.1.1 Antisense Strategie.....	2
1.1.2 Ribozyme.....	5
1.1.3 RNA-Interferenz.....	6
1.2 Chemische Modifikation von Oligonucleotiden	8
1.2.1 Gründe für chemische Modifikationen.....	8
1.2.2 Modifikationen an der 2'-Position.....	13
1.2.3 Universelle Nucleoside.....	18
2. ZIELSETZUNG	23
3. ALLGEMEINER TEIL	25
3.1 Chemische Synthesen	25
3.1.1 Synthesen der Nucleosid-Bausteine.....	25
3.1.2 Glycosilierungsreaktion nach Vorbrüggen.....	28
3.1.2.1 Deacetylierung.....	31
3.1.3 Synthese des 2'-unmodifizierten Nucleosidbausteins 46	32
3.1.3.1 Orthogonale Blockierung der 2'-bzw. 5'-OH-Funktion.....	32
3.1.3.2 Phosphitylierung.....	34
3.1.4 Einführung von 2'-O-Modifikationen an Nucleosidbausteinen.....	37
3.1.4.1 Synthese und Einführung der Markiewicz-Schutzgruppe.....	37
3.1.4.2 2'-O-Alkylierungen.....	38
3.1.4.3 Einführung einer 2'-O-Cyanoethyl-Modifikation via Michael-Addition.....	45
3.1.4.4 Zugang zur 2'-O-Aminopropyl-Modifikation.....	48
3.1.4.5 Versuch der Synthese 2'-O-verzweigter Modifikationen.....	50
3.1.4.6 Kupplung von Carbonsäurederivaten an den 2'-O-Aminopropyllinker unter Peptidkupplungsbedingungen.....	52
3.1.5 Einführung von 2'-O-Modifikationen an der festen Phase.....	60

3.1.6	Modifikation von LCAA-CPG-Festphasenmaterial.....	67
3.2	Synthese von Oligonucleotiden.....	71
3.2.1	Automatisierte Festphasensynthese von Oligonucleotiden.....	72
3.2.2	Aufreinigung und Analytik der synthetisierten RNA-Oligomere.....	76
3.3	Spektroskopische Untersuchungen der Oligonucleotide.....	85
3.3.1	UV-Spektroskopie.....	85
3.3.2	CD-Spektroskopie.....	95
3.4	Untersuchungen modifizierter siRNAs in biologischen Assays.....	101
4.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	108
5.	EXPERIMENTELLER TEIL.....	115
5.1	Allgemeine Arbeitsbedingungen.....	115
5.2	Synthese der Einzelverbindungen.....	118
5.3	Synthese und Analytik der Oligonucleotide.....	197
6.	ANHANG.....	200
6.1	Spektrenanhang.....	200
6.2	Abkürzungsverzeichnis.....	205
6.3	Literaturverzeichnis.....	209

1 Einleitung

1.1 Therapeutische Oligonucleotide

Oligonucleotide bilden eine Klasse von Biomakromolekülen, die ein großes Potential für Forschungen – vor allem hinsichtlich einer möglichen therapeutischen Anwendung – besitzt. Per Definition handelt es sich bei Oligonucleotiden um oligomere Einheiten aus etwa 10 bis 100 DNA oder RNA Monomeren.

Im menschlichen Körper findet die enzymatische Synthese von Desoxyribonucleinsäuren (DNA) und Ribonucleinsäuren (RNA) im Zellinnern durch die DNA- bzw. RNA-Polymerase statt. Durch die Entwicklung der Festphasensynthese in den 70er Jahren des vergangenen Jahrhunderts war ein einfacher synthetischer Zugang zu diesen Biomakromolekülen eröffnet worden. Darüberhinaus ist es durch diese Entwicklung nun auch möglich, modifizierte Nucleosidbausteine in die wachsende Kette eines Oligonucleotids einzubauen und somit modifizierte Oligomere darzustellen. Die chemische Synthese bzw. die Modifikation von Oligonucleotiden eröffnete fortan ein neues Feld der Forschung – und damit auch neue therapeutische Möglichkeiten.^[1]

In den letzten Jahren fokussierten sich sämtliche, auf Oligonucleotide basierende Strategien vorwiegend auf die Inhibierung der Genexpression. Hierbei ist die mRNA (messenger RNA) das Target der Wahl, da sie in der Transkriptions-Translations-Kette von DNA zu Proteinen eine Schlüsselrolle einnimmt.

Derzeit existieren mehrere Strategien, bei denen unterschiedliche Klassen von Oligonucleotiden genutzt werden. Diesen Konzepten gemeinsam ist, dass es sich hierbei nicht um gentherapeutische Ansätze handelt, da per Definitionem nicht in das Genom eingegriffen wird. Besonders vielversprechend sind die im Folgenden genannten:

- 1.) Antisense-Oligonucleotide
- 2.) Ribozyme
- 3.) kurze, interferierende RNAs (engl.: small interfering RNAs, siRNAs)

In Abbildung 1 findet sich eine schematische Darstellung dieser Methoden, auf die nun im Einzelnen ausführlicher eingegangen werden soll.

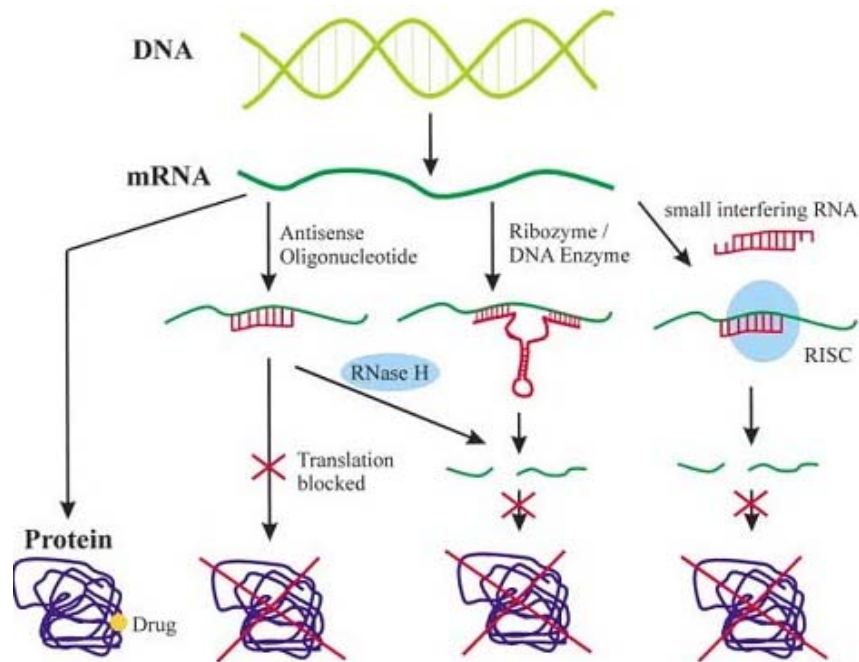


Abbildung 1: Darstellung zu Eingriffsmöglichkeiten in die Genexpression auf mRNA-Ebene
(Quelle: J.Kurreck, „Antisense technologies“ *Eur.J.Biochem.* **2003**, 270, 1628-1644)

1.1.1 Antisense Strategie

Antisense-Oligonucleotide sind einzelsträngige, kurzkettige Nucleinsäuremoleküle mit einer definierten Abfolge von Basen. Sie besitzen in der Regel eine Länge von 15 bis 20 Nucleotiden und binden über komplementäre Basenpaarung an die RNA eines Zielproteins.^[1-3] Aufgrund dieser sequenzspezifischen Watson-Crick Basenpaarung kommt es zu einer gezielten Hemmung der Expression des Zielproteins. Dieses Prinzip wurde in den späten 70er Jahren des 20. Jahrhunderts durch Zamecnik und Stephenson entwickelt.^[4]

Für die Wirkungsweise des Konzepts der post-transkriptionalen Genaussschaltung konnten zwei wesentliche Mechanismen herausgestellt werden: So wird zum einen bei den meisten antisense-Oligonucleotiden die Ribonuclease H (RNase H) aktiviert.^[5] Dieses Enzym ist in der Zelle für den Abbau von RNA-Primern bei der DNA-Replikation bzw. für das Herausschneiden von fehleingebauten RNA-Nucleotiden in die DNA verantwortlich. Zudem erkennt die RNase H DNA-RNA Hybride und schneidet den RNA-Teil aus solchen Duplexen heraus. Antisense-Oligonucleotide, die keine Aktivierung der RNase H induzieren, können die Translation durch eine sterisch bedingte Blockierung des Ribosoms inhibieren. Dieser Ansatz ist vor allem dann sehr effizient, wenn das antisense-Oligonucleotid entweder direkt das 5'-Ende oder aber das AUG-Startcodon der Target-RNA adressiert und damit dessen Bindung an

das Ribosom stört. Zusätzlich ist eine Inhibierung des Spleißvorgangs durch antisense-Oligonucleotide möglich.

Für das Design von therapeutisch wirksamen antisense-Oligonucleotiden sind freilich neben der exakten Kenntnis der Sequenz der adressierten RNA auch weitere wichtige Anforderungen vonnöten. So spielt z.B. eine ausreichende Stabilität gegenüber abbauenden Enzyme eine sehr entscheidende Rolle. „Nackte“ Oligonucleotide werden *in vivo* sehr schnell durch Nucleasen angegriffen und abgebaut.^[6-8] Aus diesem Grund ist eine chemische Modifizierung von Oligonucleotiden notwendig, da hierdurch eine vielfach längere Halbwertszeit der Oligonucleotide im Serum erreicht werden kann.^[9]

Eine der ersten und nach wie vor am häufigsten eingesetzte Modifikationen, um Oligonucleotide zu stabilisieren, ist die Einführung sog. Phosphorthioate.^[10] Diese werden daher zur „ersten Generation“ von antisense-Oligonucleotiden gezählt. Bei den Phosphorthioaten ist ein nicht-verbrückendes Sauerstoffatom im Phosphatrückgrat des Oligonucleotids durch ein Schwefelatom ersetzt (s. Abbildung 2). Phosphorthioat-DNAs besitzen eine Halbwertszeit in menschlichem Serum von 9-10 Stunden gegenüber etwa einer Stunde bei unmodifizierten Oligodesoxynucleotiden.^[11] Außerdem behindert diese Modifikation in keinsten Weise die Watson-Crick Basenpaarung und auch eine mögliche Aktivierung der RNase H (s.o.) bleibt bestehen.^[12] Ein entscheidender Nachteil der Phosphorthioate ist jedoch ihre hohe Bindungsaffinität zu Proteinen, was eine erhöhte Zelltoxizität zur Folge haben kann.^[13]

Zur zweiten Generation der antisense-Oligonucleotide zählt man überwiegend Modifikationen an der Zuckereinheit von RNA- bzw. DNA-Oligomeren.^[3] Hierbei kommen in erster Linie Modifikationen an der 2'-O-Position der Ribose in RNA-Bausteinen in Frage. Auf diese wird in Kap. 1.2.2 detaillierter eingegangen. Es sei noch erwähnt, dass mittlerweile auch antisense-Oligonucleotide der dritten Generation existieren; hierbei handelt es sich um weitaus exotischere Modifikationsmotive. Sogenannte „Locked Nucleic Acids“ (LNA), „Peptide nucleic Acids“ (PNA) aber auch Morpholin-phosphoramidate oder Cyclohexen-Nucleinsäuren sind populäre Vertreter dieser Klasse. Aus nachfolgender Abbildung lassen sich die Strukturen dieser Modifikationen entnehmen.

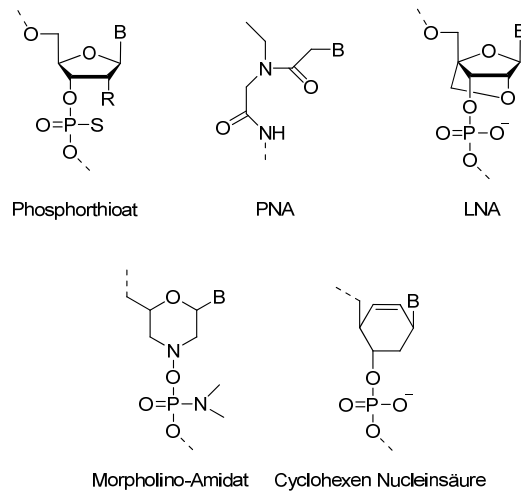


Abbildung 2: In der antisense-Strategie verwendete Modifikationsmotive

Da die antisense-Strategie zur Herstellung therapeutischer Oligonucleotide der zurzeit sicherlich besterforschte Ansatz auf diesem Gebiet darstellt, befinden sich derzeit bereits einige antisense-Oligonucleotide in klinischen Testphasen. Vitravene[®] ist hierbei das erste – auch in Deutschland – als Arzneistoff zugelassene antisense-Oligonucleotid.¹ Es wird zur Behandlung von AIDS-Patienten mit Cytomegalie-Virus-Infektion (CMV-Retinitis) eingesetzt und wurde 1998 von der Fa. ISIS auf den Markt gebracht. Bei diesem antisense-Oligonucleotid handelt es sich um ein 21mer, das als vollmodifiziertes Phosphorthioat vorliegt. Weitere aussichtsreiche antisense-Oligonucleotide, die sich derzeit in klinischen Tests befinden, sind in Tabelle 1 aufgeführt, wobei es sich bei dieser Auflistung nur um einen kleinen Ausschnitt aus der aktuellen Studiensituation handelt. Es kann davon ausgegangen werden, dass in den kommenden Jahren eine Fülle der derzeit in klinischen Studien befindlichen antisense-Oligonucleotide die Marktzulassung erhalten werden, wodurch weitere medizinische Fortschritte in der Behandlung schwerer Krankheiten (u.a. Krebs) zu erwarten sind.

¹ Vitravene[®] ist in Deutschland unter dem Markennamen Formiviren[®] erhältlich.

Tabelle 1: Auswahl an antisense-Oligonucleotiden in klinischen Studien; Quelle: J.Kurreck, „Therapeutic Oligonucleotides“ 2008, RSC-Publishing.

Firma	Produkt	Indikation	Modifikation	Status
ISIS	Vitravene	CMV-Retinitis	Phosphorthioat	zugelassen
Methylgene	MG98	Krebs	Phosphorthioat	Phase II
EpiGenesis	Epi-2010	Asthma	Phosphorthioat	Phase II
ISIS	Alicaforsen	Morbus Crohn [#]	Phosphorthioat	Phase II
ISIS	ISIS 113715	Diabetes	2'-MOE	Phase II
ISIS	ATL-1102	Psoriasis	2'-MOE	Phase I
ISIS/Lilly	Ly2181308	Krebs	2'-MOE	Phase I
Santaris	SPC2996	B-Zellen Lymphom	LNA	Phase I/II
AviBioPharma	AVI4065	Hepatitis-C Virus	PMO	Phase I

[#] Alicaforsen wird nebenbei auch gegen die Colitis Ulcerosa klinisch getestet.

1.1.2 Ribozyme

Bei Ribozymen handelt es sich um katalytisch aktive, kurze RNA-Oligonucleotide mit einer Länge von bis zu ca. 150 Basen. Ähnlich wie bei Proteinen wird bei Ribozymen durch bestimmte Sequenzelemente eine Struktur stabilisiert, die ein aktives Zentrum schafft, in dem die Phosphatesterhydrolyse katalysiert ablaufen kann.^[14, 15] Für die Aufrechterhaltung dieser katalytischen Wirkung ist die Gegenwart von Metallionen (Mg^{2+} , K^{+}) notwendig.

Von besonderem therapeutischem Interesse sind das Hammerhead- sowie das Hairpin-Ribozym.^[16, 17] Hierbei richtet sich die Anwendung vorwiegend gegen Viruserkrankungen.^[18]

Eine ausführliche Beschreibung über den Einsatz von Ribozymen in der klinischen Applikation und der Möglichkeit ihrer synthetischen Modifikation findet sich in den Reviews von Schubert und Fedor.^[19, 20]

1.1.3 RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein evolutionärer, hochkonservierter Mechanismus der posttranskriptionalen Gen-Ausschaltung, der durch doppelsträngige RNA-Moleküle ausgelöst wird.^[21] Sie wurde 1998 als erstes in den Nematoden *Caenorhabditis elegans* von A. Fire und C. Mello entdeckt.^[22] Für diese Entdeckung wurden beide Forscher im Jahre 2006 mit dem Medizin-Nobelpreis ausgezeichnet. Allerdings wurde die nützliche Bedeutung der RNA-Interferenz erst im ganzen Ausmaß deutlich, als Tuschl *et al.* diesen Mechanismus auch in Säugetierzellen nachweisen konnten.^[23] Demnach handelt es sich bei der RNAi um einen zellulären Verteidigungsmechanismus, der u.a. durch Virusinfektionen aktiviert wird.^[24] Dieser Mechanismus bewirkt die Erkennung und den Abbau von doppelsträngigen Replikations-Intermediaten, wie sie bei der Replikation viraler RNA entstehen und gewährt so einen Schutz vor RNA-Viren. In Abbildung 3 ist der mechanistische Ablauf der RNA-Interferenz schematisch dargestellt. Er soll im folgenden kurz erläutert werden.

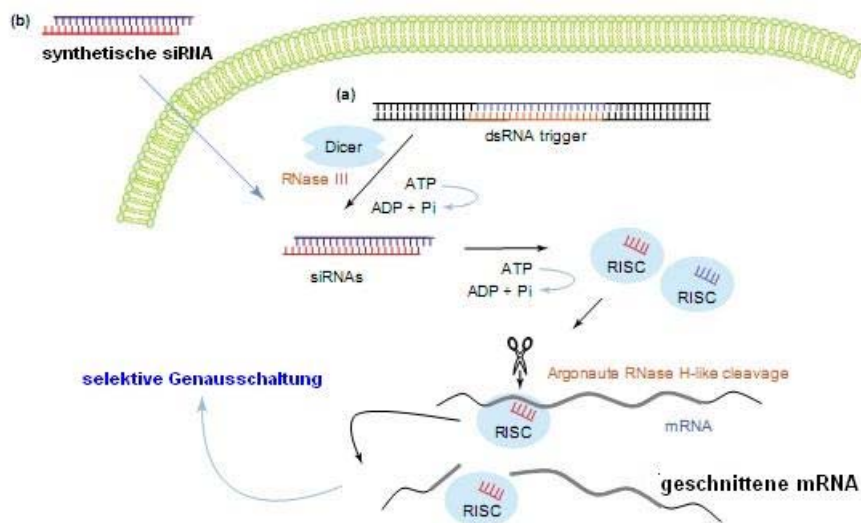


Abbildung 3: Mechanismus der RNA-Interferenz. Quelle: M. Manoharan, "RNA interference and chemically modified small interfering RNAs" *Curr. Op. Chem. Biol.* **2004**, 8, 570-579.

Der Mechanismus der RNA-Interferenz wird durch das Auftreten kurzer, doppelsträngiger RNA-Moleküle (dsRNA) im Cytoplasma ausgelöst.^[25] Ein Enzym namens „Dicer“ schneidet aus diesen Doppelsträngen Fragmente heraus, die etwa eine Länge von 21 Nucleotiden

besitzen.^[26] Hierbei handelt es sich um sog. „small interfering RNAs“ – kurz siRNAs. Diese kurzen Doppelstränge besitzen einen 5'-Phosphatrest sowie häufig einen 3'-Überhang bestehend aus zwei Nucleotiden.^[27] Dieser siRNA-Duplex wird nun von einem (inaktiven) Ribonucleoprotein-Komplex aufgenommen, woraufhin eine ATP-abhängige Entwindung beider Stränge stattfindet. Während ein Einzelstrang (der sog. sense oder passenger-Strang) aus dem Komplex austritt und sofort durch Nucleasen abgebaut wird, bleibt der komplementäre Gegenstrang (antisense oder guide-Strang genannt) im Enzymkomplex gebunden. Dieser ist fortan aktiv und wird als „RNA-Induced Silencing Complex“ (RISC) bezeichnet. RISC besitzt u.a. auch eine RNase-Aktivität, die durch einen katalytischen Protein-Kern aus der Familie der Argonaut-Proteine gebildet wird.^[28] Es findet nun an einer Bindungsstelle des RISC die Anknüpfung von mRNA statt, die an einer zur antisense-siRNA komplementären Sequenz mittels Watson-Crick Basenpaarung bindet. Diese Ziel-mRNA wird nun durch die RNase des RISC in der Mitte zerschnitten und dadurch inaktiviert; die mRNA-Fragmente werden sogleich durch weitere Endonucleasen abgebaut.^[29] Nach der Dissoziation des Komplexes von der mRNA steht die siRNA für eine weitere Spaltung zur Verfügung. Damit verfügt dieser Mechanismus insgesamt über einen katalytischen Charakter: Es zeigte sich, dass bereits die Gabe von substöchiometrischen Mengen an dsRNA den Spiegel von homologer mRNA in Zellen innerhalb von zwei bis drei Stunden stark erniedrigt.^[26]

Der Mechanismus der RNA-Interferenz muss allerdings nicht notwendigerweise durch längere dsRNA eingeleitet werden; vielmehr zeigte sich, dass auch die Verabreichung von (synthetischer) siRNA zur Aktivierung beitragen kann.^[27] Dieser Befund hat zur Folge, dass sich dieser höchst effektive Mechanismus zur posttranskriptionalen Gen-Ausschaltung auch vergleichsweise leicht durch die Zugabe von synthetischer siRNA bei Kenntnis der exakten Proteinzielsequenz aus der komplementären mRNA aktivieren lässt, wodurch ein sehr wirksames Hilfsmittel zur Genabschaltung verfügbar ist.^[30-32] Dadurch wurde auch schnell deutlich, dass die RNA-Interferenz über ein großes therapeutisches Potential verfügt, das sich durch die Suche bzw. die Synthese geeigneter siRNA ausschöpfen lässt.^[33]

In Anbetracht der Tatsache, dass die Entdeckung der RNA-Interferenz erst wenige Jahre zurückliegt (s.o.), ist es umso erstaunlicher, dass bereits heute einige therapeutische Präparate auf siRNA-Basis in der klinischen Entwicklung sind.

So ist etwa ein siRNA-Therapeutikum als Wirkstoff gegen die altersbedingte Degeneration der Macula, eine Augenerkrankung, von der Firma Quark-Biotech derzeit in klinischer

Entwicklung (Phase II-Studie). Prä-klinische Studien existieren zurzeit für auf RNAi-basierende Therapien u.a. gegen Hepatitis B und C Viren (Nucleonics/Intradigm), Leberkrebs (Calando) sowie für solide Tumoren (Intradigm).^[34]

Insgesamt kann man feststellen, dass im Vergleich zur antisense-Strategie oder zu Ribozymen die RNA-Interferenz über ein weitaus höheres therapeutisches Potential verfügt.^[35-37] Dies hat zur Folge, dass z.B. im Vergleich zu antisense-Oligonucleotiden eine deutlich geringere Menge an siRNAs nötig ist, um eine gleichstarke Genausschaltung zu bewirken.

Wie allerdings schon für antisense-Oligonucleotide geschildert, müssen auch synthetische siRNAs gewisse Anforderungen erfüllen, um als wirksame Initiatoren für die RNA-Interferenz in Frage zu kommen.^[3, 9, 38, 39]

Man kann dabei vier wichtige Anforderungsprofile für das Design von synthetischen siRNAs unterscheiden:

- 1.) Steigerung der thermodynamischen Stabilität und Nucleasestabilität
- 2.) Verlängerung der Serumhalbwertszeit *in vivo*
- 3.) Verbesserung der Bioverfügbarkeit der pharmakokinetischen Eigenschaften
- 4.) Steigerung der target-Affinität

Um diese Anforderungen erfüllen zu können, bedient man sich beim Design von therapeutisch relevanten siRNAs ebenfalls chemischer Modifikationen. Welche hierbei im Einzelnen derzeit präferiert werden, und welche grundlegenden Konzepte dabei verfolgt werden, wird im nachfolgenden Kapitel diskutiert.

1.2 Chemische Modifizierung von Oligonucleotiden

1.2.1 Gründe für chemische Modifikationen

Die sicherlich größte Hürde, die im Rahmen der therapeutischen Anwendung mit Oligonucleotiden zu überwinden ist, ist das sog. ‚Delivery‘, also die gezielte Applikation der Wirkstoffmoleküle in die Zielzelle. Bei allen hierfür aufgebrauchten Anstrengungen muss

freilich stets die Aufrechterhaltung der eigentlichen Aktivität des Oligonucleotids berücksichtigt werden. In den weiteren Betrachtungen wird in erster Linie das Design von siRNAs für den Einsatz in der RNA-Interferenz diskutiert, da es für die thematische Grundlage dieser Arbeit den höheren Stellenwert besitzt. Prinzipiell lassen sich aber die hier dargelegten Aspekte auch auf andere Oligonucleotid-Strategien übertragen.

siRNAs überwinden Zellmembranen – wie Oligonucleotide generell – nicht ohne Weiteres. Dies begründet sich vor allem in der negativen Ladung und der Größe dieser Moleküle, wodurch der Durchgang durch die hydrophobe Lipiddoppelschicht der Zellwand erheblich gehindert wird.

Der derzeit wohl am häufigsten genutzte Ansatz, diesen Schwierigkeiten des Transports von siRNAs in die Zielzelle zu begegnen, ist die Verwendung von kationischen Lipiden als Vektorsysteme für Oligonucleotide.^[40, 41] Als populäre Vertreter für die Herstellung solcher Lipid-Komplexe seien an dieser Stelle Diolelylphosphatidylethanolamin (DOPE) oder auch Polyamidoamin (PAMAM) zur Herstellung von Dendrimer-Komplexen genannt.^[42] Hierbei werden die Nucleinsäurestränge entweder nicht-kovalent durch Liposomen umschlossen und bilden dadurch ein lipophiles Gerüst, das z.B. endocytotisch von den Zellen aufgenommen werden kann,^[43] oder aber es lassen sich lipophile Anker-moleküle, wie z.B. Cholesterol, kovalent an die Oligonucleotide anknüpfen.^[44] Die Anbindung solcher Konjugate erfolgt in der Regel am 5'-Ende eines siRNA-Stranges – und hierbei am Ende des sense-Stranges, da mittlerweile bekannt ist, dass eine 5'-Phosphorylierung des antisense-Stranges für dessen Aktivität unabdinglich ist.^[3, 9] Ein entscheidender Nachteil der nicht-kovalenten Methode ist jedoch, dass in Tierversuchen mit Mäusen eine unerwünschte Induktion von Entzündungsfaktoren wie Cytokinen oder sogar die Aktivierung von Tumor-Nekrose Faktoren festgestellt wurde, was eine Anwendung solcher Lipidkomplexe erheblich erschwert.^[45] Zudem besteht die Möglichkeit, dass eine Freisetzung der siRNA aus den Liposomen innerhalb der Zellen – und damit eine Aktivierung der RNA-Interferenz – gar nicht oder nur unzureichend stattfindet, was zudem auch zu einer erhöhten Zelltoxizität führen kann.^[46] Bei der kovalenten Anbindung lipophiler Transportmoleküle wie Fettsäuren oder Cholesterol wurde eine erhöhte Aufnahme dieser Oligonucleotid-Komplexe in der Leber gefunden, was einerseits in den meisten Fällen unerwünscht ist und andererseits dort ebenfalls zelltoxische Folgen haben kann.^[47]

Eine weitere Strategie des „Drug deliveries“ verfolgt die Verwendung von sogenannten „Zellpenetrierenden Peptiden“ (engl.: cell-penetrating peptides, CPP).^[42] Dabei handelt es sich um

die kovalente Verknüpfung von siRNAs mit überwiegend kationischen Aminosäureketten von einer Länge bis zu etwa 30 Aminosäuren. Auch hier findet wie bereits erwähnt eine 5'-terminale Anbringung dieser Peptidkonjugate an ein siRNA-Oligomer statt. Die zelluläre Aufnahme dieser Komplexe findet rezeptorunabhängig statt – ob es sich aber tatsächlich auch um einen nicht-endocytotischen Mechanismus handelt, ist bislang noch nicht geklärt. In jedem Falle werden derzeit bei dem Einsatz von CPPs sehr vielversprechende Resultate erzielt; so haben Muratovska und Eccles mit der Verwendung von CPPs einen eGFP-knock-down von fast 80 % erzielt, was der Wirkung von *in vitro* - Versuchen standardmäßig eingesetzten Lipofectamins entspricht.^[48]

Bei allen an siRNA durchgeführten Modifizierungen muss jedoch beachtet werden, dass sich diese Oligonucleotid-Duplexe sehr empfindlich gegenüber der Position und der Beschaffenheit der Modifikation verhalten.

So hängt beispielsweise das Auftreten von so genannten „Off-target“-Effekten sehr stark von der sequenzspezifischen Modifikation einer siRNA ab.^[49] Bei diesem Phänomen sorgt eine siRNA für den Abbau „falscher“ mRNA bzw. „falscher“ mRNA-Sequenzen. Dadurch werden letztlich unerwünschte Proteine inhibiert, was wiederum weitreichende Konsequenzen für einen Organismus zur Folge haben kann. Für die eigentlichen Ursachen dieses unerwünschten Nebeneffekts sind mehrere Möglichkeiten in Betracht zu ziehen. Zum einen können Transfektionskomplexe Cytokin- oder Interferonantworten auslösen (s.o.), zum anderen kann auch der eigentlich in der RNA-Interferenz inaktive sense-Strang eine mRNA-Degradation auslösen.^[50] Überwiegend ist aber wohl die fehlende Komplementarität zwischen einer siRNA und der Ziel-mRNA hierfür verantwortlich.^[51] Dies kann entweder durch natürlich vorkommende (Punkt-)Mutationen in der mRNA oder durch sterische- bzw. positionsungünstige Modifikationen in der siRNA verursacht werden.^[49]

Aus Abbildung 4 lässt sich entnehmen, an welchen Positionen einer siRNA Modifikationen sinnvoll zu sein scheinen, bzw. welche Effekte sich hierdurch beobachten lassen.

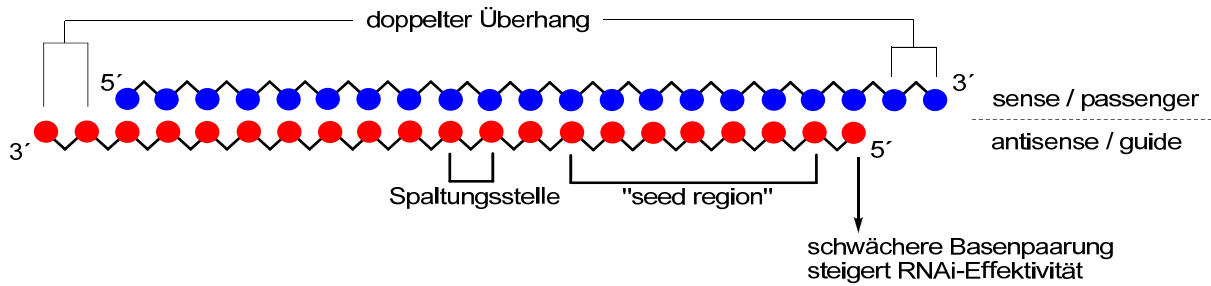


Abbildung 4: Allgemeine Positionsabhängigkeit von chem. Modifikationen in siRNAs.
 Nach: D. Bumcrot *et al.* "RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs"
Nature chem. Biol. **2006**, 2, 711-719.

Besonderes Augenmerk sollte hierbei auf die sog. „seed region“ gelegt werden. Diese beschreibt einen Abschnitt im antisense-Strang von Position 2 bis Position 8 gezählt vom 5'-Ende, der eine entscheidene Rolle in der micro-RNA-Spezifität besitzt.^[52] Demzufolge sollte gerade in diesem Sequenzabschnitt eine hohe Komplementarität zur Ziel-mRNA für eine deutliche Unterdrückung von Off-target-Effekten sorgen. Daneben konnte bereits gezeigt werden, dass chemische Modifikationen der Nucleotide innerhalb dieser „seed region“ einen signifikanten Verlust von Off-target-Effekten bewirken.^[49] Darüberhinaus besitzt die Region zwischen Position 10 bis 12 vom 5'-Ende des antisense-Stranges eine entscheidene Rolle in der mRNA-Spaltung; hier findet wahrscheinlich die Bindung zur Ziel-mRNA im RISC und deren Spaltung statt. Daher werden Modifikationen in diesem Bereich besonders schlecht toleriert.

Eine für Modifikationen dagegen sehr interessante Position befindet sich direkt am 5'-Ende des antisense-Stranges: Schwarz *et al.* stellten fest, dass für die gezielte Aufnahme eines Stranges durch den Enzymkomplex RISC eine thermodynamische Asymmetrie beider Stränge vonnöten bzw. von Vorteil ist. So sucht sich der RISC gewissermaßen das thermodynamisch weniger stabile Ende eines siRNA-Duplexes aus und bindet selektiv an den an dieser Stelle instabileren Strang.^[53] Dieser Befund ist für chemisch modifizierte Nucleoside insofern von besonderer Bedeutung, da man durch den gezielten Einbau eines verhältnismäßig destabilisierenden Nucleosids am 5'-Ende des gewünschten antisense-Stranges eine bevorzugte Aufnahme dieses Stranges durch den RISC erreichen könnte. Dadurch ließe sich eine höhere Spezifität zur gewünschten Ziel-mRNA – und unter Umständen auch eine Steigerung der RNA-Interferenz-Aktivität – erreichen. Dieses Konzept spielte auch bei den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten modifizierten Nucleosiden eine wichtige Rolle: Da die

untersuchten universellen Nucleosidbausteine unabhängig von der verwendeten 2'-O-Modifikation eine thermodynamische Destabilisierung eines RNA-Duplexes verursachen (vgl. Kap. 3.3.1), scheinen sie im Rahmen des Konzeptes der asymmetrischen Strangselektion von Interesse zu sein. Für die biologischen Assays wurden daher diese Nucleosidbausteine am 5'-Ende des antisense-Strangs des verwendeten siRNA-Konstruktes eingebaut (s. Kap. 3.2 bzw. 3.4).

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass chemisch modifizierte Oligonucleotide auch gerade im Hinblick auf die Technik der RNA-Interferenz von wichtiger Bedeutung für den therapeutischen Einsatz sind.

Selbst wenn die Modifikationen zu einer Verringerung der *in vitro* Effektivität der RNA-Interferenz führen, können sie doch die Effizienz *in vivo* z.T. erheblich steigern, da sie beispielsweise für eine längere Bioverfügbarkeit, Serumstabilität und für eine verbesserte Zellaufnahme der siRNAs sorgen.

Mögliche Angriffspunkte für Modifizierungen finden sich z.B. an der Nucleobase, am C2' der Ribose oder am Phosphatrückgrat (s. Abbildung 5).

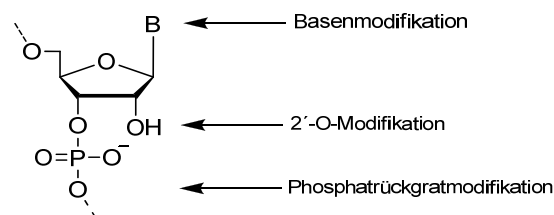


Abbildung 5: Möglichkeiten zur Modifikation von Ribonucleotiden

Bereits in Kap. 1.1.1 fand eine sehr populäre Phosphatrückgratmodifikation Erwähnung: Die Phosphorthioate. Auch bei siRNAs wurde diese Möglichkeit der chemischen Modifikation angewendet und zeigte dort ebenfalls RNAi-Aktivität bei hoher Nucleaseresistenz.^[54] Allerdings erscheint der antisense-Strang für diese Art von Modifikationen besonders empfindlich zu sein – zudem wurden ebenfalls zelltoxische Folgen beobachtet. Als weitere, bei siRNAs bereits getestete Rückgratmodifikation soll hier noch die Boranophosphat-Modifikation genannt werden; die derart modifizierten siRNAs zeigten eine hohe Aktivität sowie Nucleaseresistenz bei deutlicher niedriger Zelltoxizität.^[55] Als allerdings wichtigster Angriffspunkt für chemische Modifikationen gilt die 2'-Position der Ribose.^[56] Im nachfolgenden Kapitel soll hierauf detaillierter eingegangen werden.

1.2.2 Modifikationen an der 2'-Position

Aufgrund der Feststellung, dass die 2'-Hydroxyfunktion für die Erkennung einer siRNA durch den RISC sowie für dessen Aktivität keine Rolle spielt,^[57] ist gerade die Modifizierung dieser funktionellen Gruppe besonders bevorzugt und es finden sich zahlreiche Modifikationsmotive an dieser Stelle.^[42, 49]

Da schon früh bekannt war, dass der vergleichsweise rasche Abbau von unmodifizierter RNA *in vivo* durch Nucleasen überwiegend durch einen Angriff an der 2'-Position der Ribose ausgeht, waren Modifikationen an dieser Stelle schon seit längerem von besonderer Bedeutung.^[56] In Abbildung 6 sind die Strukturen einiger sehr gebräuchlicher C2'-Modifikationen dargestellt.

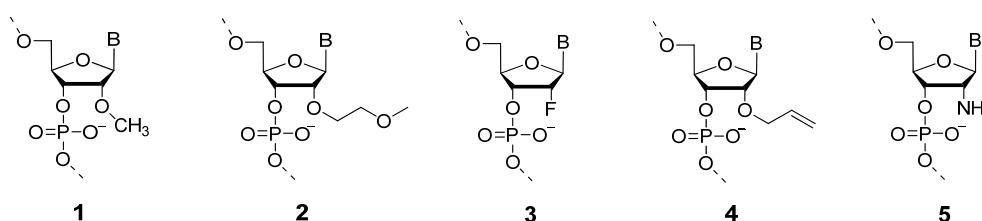


Abbildung 6: Sehr häufig eingesetzte 2'-Modifikationen in Oligonucleotiden; B = Nucleobase

Die 2'-O-Methyl-Modifikation **1** ist die sicherlich am häufigsten eingesetzte Modifizierung dieser Art in siRNA-Assays.^[56, 58] Hiermit modifizierte Oligonucleotide zeigen z.T. eine deutlich verlängerte Halbwertszeit im Serum, was durch eine erheblich gesteigerte Nucleaseresistenz begründet ist.^[50] Ausserdem bilden 2'-O-Methyl-modifizierte Oligonucleotide stabilere Duplexe als vergleichbare, unmodifizierte Oligomere.^[59] Es ist daher auch nicht verwunderlich, dass die 2'-O-Methyl-Modifikation auch als natürlich auftretende Modifizierung in tRNAs oder rRNAs gefunden wurde.^[59] Nucleoside, die eine solche Modifikation besitzen, sind bereits seit geraumer Zeit kommerziell erhältlich und werden häufig zur Synthese von Oligonucleotiden eingesetzt.

Recht ähnlich verhält es sich mit der 2'-Fluor-Modifikation **3**, oder der 2'-Amino-Modifikation **5**, die beide ebenfalls die Resistenz von Oligonucleotiden gegenüber Nucleasen erhöhen.^[38] Allerdings sind beide Modifikationsmotive synthetisch weniger einfach

zugänglich, besitzen einen negativen Einfluss auf die Pharmakokinetik und zeigen zudem zelltoxische Eigenschaften.^[59]

2'-O-(2-Methoxyethyl)-modifizierte Oligonucleotide **2** werden bereits seit einigen Jahren in der antisense-Technologie eingesetzt. Diese Modifikation zeigt ebenfalls eine Erhöhung der Nucleaseresistenz sowie eine thermodynamische Stabilisierung eines RNA-Duplexes.^[56, 60]

Für sämtliche 2'-O-Modifikationen gilt, dass sie die A-helicale-Struktur der RNA nicht wesentlich stören dürfen um einen möglichst positiven Effekt auf die RNA-Interferenz-Aktivität ausüben zu können.^[38] Zudem ist eine C3'-*endo* Konformation der Ribose im Zuge der Aufnahme einer siRNA durch den RISC ebenfalls eine wichtige Voraussetzung für einen Oligonucleotid-Duplex.

Diese Anforderungen werden auch durch andere, weniger gebräuchliche Modifikationsmotive erfüllt. So sind beispielsweise 2'-O-Aminoalkyl-Modifikationen ebenfalls im Fokus des wissenschaftlichen Interesses.^[60]

2'-O-Aminoalkyl-Modifikationen ermöglichen einen teilweisen Ausgleich der negativen Ladung eines RNA-Oligonucleotids. Durch den kationischen Charakter dieser Modifikation kann ausserdem die Bindungsaffinität bzw. die thermodynamische Stabilität eines RNA-RNA-Duplexes erhöht werden.^[61, 62]

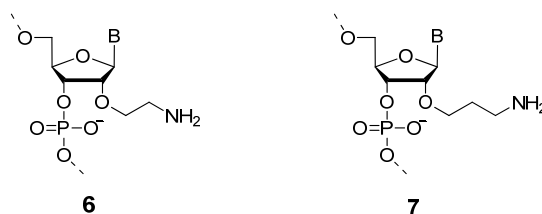


Abbildung 7: Kationische Modifikationen: 2'-O-Aminoethyl **6** bzw. 2'-O-Aminopropyl **7**

Hashimoto *et al.* konnten für eine Modifikation mit C5-(Aminoethyl)pyrimidinen zeigen, dass die Geometrie von DNA-Duplexen hierdurch nicht gestört wird.^[63, 64] Allerdings kann bei solchartigen Basenmodifikationen, die in Richtung der großen Furche eines Duplexes zeigen, kein Gewinn der Duplexstabilität erzielt werden. Vielversprechender erscheinen stattdessen Aminoalkylmodifizierungen in der kleinen Furche von Duplexen also am C2' der Ribose.

Gerade für 2'-O-Aminopropyl-Modifizierte Ribonucleotide **7** konnten im Kontext von antisense-Experimenten erhöhte Nucleaseresistenz (bis zu 100facher Erhöhung!) und eine

Duplexstabilisierung beobachtet werden.^[65] Da die Aminopropylfunktion mit einem pK_S -Wert von etwa 9 unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegt, sind positive Auswirkungen einer solchen Modifikation auf die Hybridisierungseigenschaften auch sehr naheliegend.^[66] Über eine erhöhte Bindungsaffinität von 2'-O-Aminoethyl-modifizierten DNA Duplexen wurde bereits vor mehr als 10 Jahren von Cuenoud *et al.* berichtet.^[67]

Der synthetische Zugang zu Aminoalkylmodifikationen erfolgt – ähnlich wie zu anderen C2'-Alkylethern (vgl. Abb. 6) – in der Regel durch eine nucleophile Substitution eines Alkylrestes an der 2'-Hydroxyfunktion. Da die 2'-OH-Gruppe über die höchste Acidität in einem Nucleosid verfügt ($pK_S \sim 12$), lässt sich diese vergleichsweise leicht deprotonieren.^[68] Allerdings werden zu diesem Zweck nach wie vor recht harsche Bedingungen gewählt: Neben starken organischen Basen findet man in der Literatur überwiegend den Einsatz von Alkalimetallhydriden, wie z.B. Natriumhydrid.^[69] Weitere Details zu selektiven 2'-O-Alkylierungen finden sich in Kap. 3.1.4.2. Griffey *et al.* wählten als Alkylierungsreagenz *N*-(3-Brompropyl)phthalimid.^[65] Ein Vorteil dieser Syntheseroute liegt in der Verwendung des Phthalimid-Restes, der gewissermaßen als basenlabile Schutzgruppe für die γ -Aminopropylfunktion betrachtet werden kann. Allerdings wird schon hier berichtet, dass sich dieser Phthalimidrest postsynthetisch nur schwer abspalten lässt, weshalb man von den gängigen Aufarbeitungsbedingungen nach erfolgter Oligonucleotidsynthese abweichen muss.^[65] Eine selektive Maskierung der nucleophilen Aminofunktion ist jedoch unabdingbar, um in den weiteren Syntheseschritten hin zum 3'-Phosphoramidit Nebenreaktionen zu unterdrücken. Als sehr bewährte Aminoschutzgruppe hat sich daher auch die Trifluoracetylenschutzgruppe herausgestellt; sie wird unter milden Bedingungen mit Trifluoressigsäureanhydrid eingeführt und kann nach erfolgter Oligonucleotidsynthese im Zuge der basischen Aufarbeitung simultan und quantitativ entfernt werden.^[63, 65, 70] Aufgrund der bereits erwähnten harschen Bedingungen, die zur Deprotonierung der 2'-OH-Funktion verwendet werden, ist nebenbei auch eine durchdachte Schutzgruppenstrategie am restlichen Nucleosidgerüst vonnöten. Insgesamt lässt sich aber gerade dieser Syntheseschritt als ausbeutenlimitierend betrachten: Meistens lassen sich 2'-Alkylreste nur in befriedigenden bis moderaten Ausbeuten (ca. 50 – 70 %) einführen. Dies gilt insbesondere im Hinblick der weiteren Einführung einer 2'-Aminoalkylfunktion – da hierfür wie bereits angedeutet weitere Schutzgruppen unerlässlich sind. In einer von Jin *et al.* vorgestellten Synthese zur Einführung eines trifluoracetylgeschützten 2'-O-Aminoethylrests in Uridin werden – ausgehend vom ungeschützten Uridin-Nucleosid **8** – 11 Syntheseschritte

vollzogen, um letztlich ein für die automatisierte Oligonucleotidsynthese nutzbares 2'-O-Aminoethyl-modifiziertes Uridin-Phosphoramidit **9** zu erhalten.^[70]

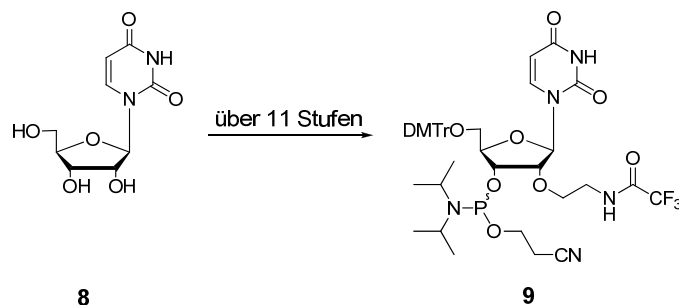


Abbildung 8: Synthese von 2'-O-Aminoethyluridin **9** mit Trifluoracetylschutzgruppe nach Jin *et al.*

Dies belegt, dass die Einführung von 2'-O-Aminoalkylresten in Nucleosidbausteinen mit hohem synthetischen Aufwand verbunden ist. Zumeist sind die Einföhrungsbedingungen harsch, die Aufreinigungsprozeduren komplex und die Ausbeuten bestenfalls moderat.

Saneyoshi *et al.* präsentiern 2005 einen synthetischen Zugang zur Einföhrung einer 2'-O-Cyanoethyl-Modifikation, die im Rahmen von Nuclease-Resistenz-Assays vielversprechende Resultate lieferte.^[71] Das Besondere an der Darstellung dieser 2'-O-modifizierten Nucleosidbausteine liegt in den milden Bedingungen und den hohen erzielten Ausbeuten: Der Cyanoethylrest wird durch Additionsreaktion von Acrylnitril im Sinne einer Michael-Addition eingeföhrt (s. Abb. 9).

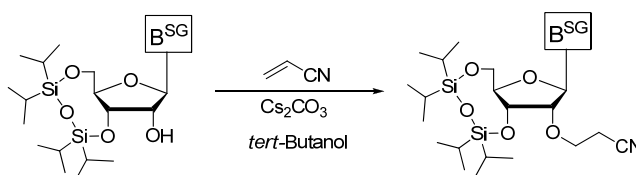


Abbildung 9: Einföhrung einer 2'-O-Cyanoethyl-Modifikation nach Saneyoshi *et al.*
 B^{SG} = Schutzgruppenmaskierte Nucleobasen

Zwar handelt es sich bei dieser 2'-O-Modifikation um eine polarisierbare Nitrilfunktion; im Rahmen der bereits diskutierten Strategie zur Einföhrung von kationischen Modifikationsmotiven kann diese Funktionalität aber keinen Beitrag leisten.

Aminoalkylmodifizierte Nucleosidbausteine besitzen neben den bereits diskutierten Vorzügen einer Stabilisierung eines Oligonucleotidduplexes und der möglichen Verbesserung

dessen zellulärer Aufnahme bedingt durch den Ladungsausgleich zusätzlich einen weiteren synthetischen Vorteil: Eine eingeführte Aminofunktion lässt sich unter geeigneten Bedingungen weitergehend derivatisieren. Naheliegender ist vor diesem Kontext sicherlich die mögliche Ausbildung einer Amidbindung durch Kupplung mit einem geeigneten Carbonsäurederivat. Ein solches Konzept zur weitreichenden Modifizierung der 2'-O-Position von Nucleosidbausteinen findet sich in der Literatur nur kaum. Kazanova *et al.* stellen zwar die mögliche Darstellung von 2'-O-Methylribonucleosiden, die einen α -Aminosäurerest in 2'-Position enthalten, vor, ihre Syntheseroute geht allerdings ebenfalls von der bereits erwähnten, umständlichen Alkylierungsmethode am 2'-OH aus.^[72] Ausserdem läuft diese Route nicht über einen 2'-O-Aminoalkylrest, sondern vielmehr über eine 2'-O- β -Hydroxyethyl-Funktion **11**, die mit *N,N'*-Disuccinimidylcarbonat in den Aktivester **12** umgewandelt wird, woran sich eine natürliche α -Aminosäure basenkatalysiert kuppeln lässt.

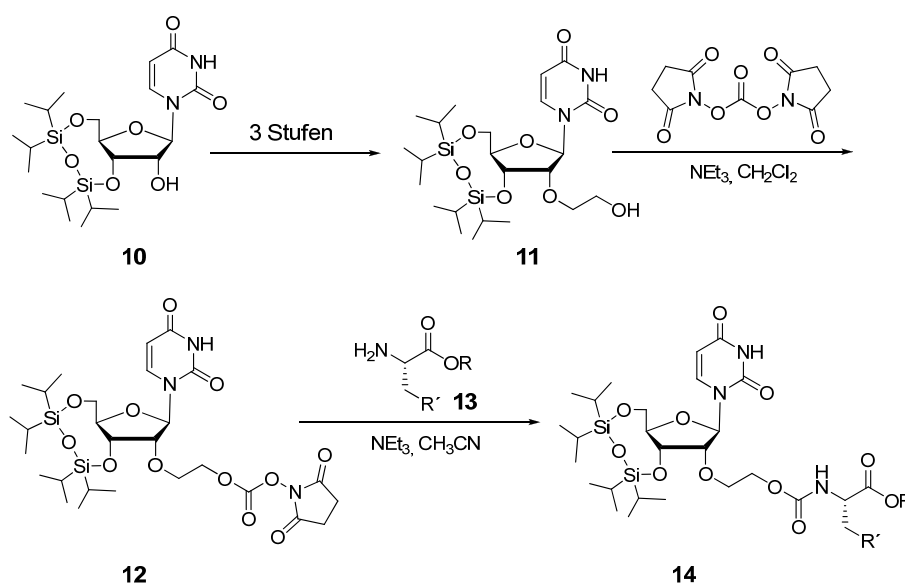


Abbildung 10: Kupplung von α -Aminosäuren an einen 2'-O-Alkyllinker nach Kazanova *et al.*

Allerdings konnte solch eine Modifizierungsmethode bislang nur für Uridin präsentiert werden.

Von weiterem Interesse sind sicherlich solche Modifikationen, die sich postsynthetisch an ein Oligonucleotid anbringen lassen. Auch in diesem Zusammenhang wären 2'-O-Aminoalkyllinker von praktischer Bedeutung: Eine solche Aminofunktion ließ sich gegebenenfalls auch nach erfolgter Oligonucleotidsynthese unter Peptidkuppelungsbedingungen

derivatisieren. Oligonucleotidkonjugate, die über ein solches Modifikationsmotiv verfügen, lassen sich jedoch überwiegend an den terminalen Enden von RNA bzw. DNA Oligomeren finden; 2'-O-Verknüpfungen sind in diesem Zusammenhang noch unpopulär.^[73] Mehr Einzelheiten hierzu finden sich in Kap. 3.1.5 des allgemeinen Teiles dieser Arbeit.

Zusammenfassend lässt sich zur Darstellung 2'-O-modifizierter Nucleoside feststellen, dass aufgrund der limitierenden Faktoren in der Synthese (mehrstufige Synthesen, dadurch verminderte Ausbeuten) die Anzahl an erfolgsversprechenden Modifikationsmotiven momentan recht überschaubar ist. Allerdings finden sich in der Literatur der letzten fünf bis zehn Jahre vermehrt neue Ansätze, 2'-O-modifizierte RNA-Nucleotide zugänglich zu machen, die auch von medizinischem Interesse sein können. Es seien hierbei mit 2'-O-[2-Amino-2-oxoethyl]^[74], 2'-O-[3-(*N,N*-Dimethylamino)propyl]^[61], 2'-O-{2-[*N,N*-(Dialkyl)aminooxy]ethyl}^[75] oder auch 2'-O-(Tetrazol-5-yl)ethyl^[76] nur einige genannt. Man erkennt hinter diesen Modifikationsmotiven jeweils die Intention, eine protonierbare Funktionalität einzufügen, um somit einen zusätzlichen Stabilitätsgewinn des Oligomers bzw. verbesserte Zellaufnahme-Eigenschaften zu erlangen.

1.2.3 Universelle Nucleoside

Unter dem Konzept eines universellen Nucleosids versteht man die Verwendung eines Nucleosid-Analogons, welches mit allen natürlichen Nucleobasen eine etwa gleichstarke Basenpaarung in einem Nucleinsäureduplex eingeht.^[77] Ein ideales universelles Nucleosid sollte noch weiterhin gewissen chemischen sowie biologischen Anforderungen gerecht werden, diese wären im Einzelnen:

- möglichst geringe Destabilisierung des gebildeten Duplexes
- sollen als Templat für die Polymerase dienen
- keine Inhibierung der Polymerase beim Einbau als Triphosphat

Bislang konnte noch kein universelles Nucleosid entwickelt werden, das alle diese Anforderungen in befriedigendem Ausmaß erfüllt. Allerdings existieren derzeit bereits einige

vielversprechende Nucleosid-Analoga, die zumindest teilweise sehr gute Eigenschaften als universelle Nucleoside zeigen.^[78]

Bereits in den ersten Ansätzen, artifizielle Nucleosidanaloga zu entwickeln, die von einer universellen Natur sind, wurde versucht, das typische Wasserstoffbrückendonator- bzw. Akzeptormuster in einem Nucleinsäure-Duplex aufzubrechen.

Hierbei wurden Nucleosidanaloga entwickelt, welche die Struktur der natürlichen Nucleoside mit größtmöglicher Ähnlichkeit nachbilden sollten, ohne aber in der Lage zu sein, polare Wasserstoffbrückenbindungen zu bilden.^[79] Überwiegend wurde sich in diesen Anläufen auf DNA-Nucleoside mit erhöhter Hydrophobizität konzentriert – in erster Linie deshalb, da man für universelle Nucleoside in DNA-Primern für die PCR und in der Sequenzierung große Anwendungsmöglichkeiten sah. In Abbildung 11 sind einige der ersten Kandidaten für universelle DNA-Nucleosidanaloga dargestellt.

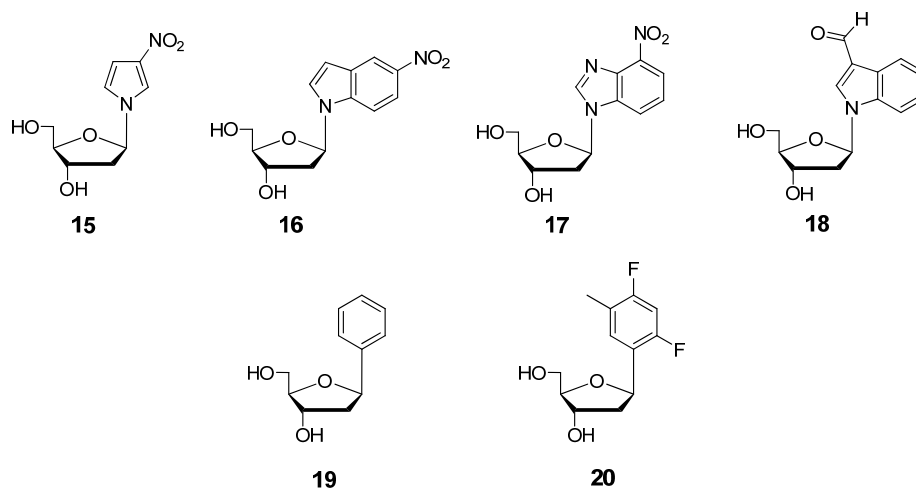


Abbildung 11: Universelle DNA-Nucleosidanaloga

3-Nitropyrrol **15** zeigte bereits eine sehr geringe Schwankungsbreite in den T_m -Werten diverser DNA-Duplexe.^[80-82] Dies konnte ebenso für das Nitroindolnucleosid **16** festgestellt werden.^[83] Dass allerdings neben elektronischen Effekten auch sterische Faktoren eine wichtige Rolle spielen, wurde bereits früh am Beispiel des 4-Nitrobenzimidazols **17** deutlich: Die zu Adenin isostere Nucleobase bevorzugt bei der Duplexbildung Thymidin als Partner.^[84] Auch das 3-Formylindolnucleosid **18** zeigt einige Eigenschaften eines universellen Nucleosids.^[85] Zudem lässt sich seine Aldehydfunktion postsynthetisch modifizieren, wodurch sich eine breitere Anwendungsmöglichkeit dieses DNA-Nucleosidanalogs ergibt.

Allen in Abb. 11 gezeigten Nucleosid-Analoga ist gemeinsam, dass sie kein klassisches Wasserstoffbrückenbindungsmuster in DNA-Duplexen eingehen können. Stattdessen wurde versucht, durch ein entsprechendes Substitutionsmuster die π - π - Wechselwirkungen zu beeinflussen. Ein Phenylring alleine, wie in 1',2'-Dideoxy-1'-phenyl- β -D-ribofuranose **19** kann aber offensichtlich keinen Beitrag zum π -Stacking leisten: Diese Modifikation bewirkt eine ausgeprägte Destabilisierung eines Duplexes.^[86]

Kool *et al.* berichten dagegen, dass 1',2'-Dideoxy-1'-(2,4-difluortoluol-5-yl)- β -D-ribofuranose **20** ein hervorragendes Mimetikum für natürliches Thymidin darstellt.^[79] Demnach besitzt dieses Nucleosid-Analogon die praktisch identische Kristallstruktur wie Thymidin. Ausserdem wird es als Ersatz für Thymidin sehr spezifisch in Templat-DNA-Strängen eingebaut. Allerdings sind DNA-DNA-Duplexe, die **20** als universelles Nucleosid beinhalten, deutlich weniger stabil als natürliche Duplexe.

Durch das gestiegene Interesse an therapeutischen Oligonucleotiden (s. Kap. 1.1) sind in den vergangenen Jahren auch die Untersuchungen von RNA-relevanten universellen Nucleosid-analoga vorangetrieben worden. Im Arbeitskreis von Prof. Engels wurden in erster Linie eingehende Untersuchungen mit fluorierten Nucleosidanaloga durchgeführt, wodurch sich einige interessante Kandidaten von universellen Nucleosiden herauskristallisiert haben.

Die 1'-Desoxy-1'-(2,4-difluorphenyl)- β -D-ribofuranose **21** zeigt eine sehr geringe Schwankung in den T_m -Werten eines RNA-Duplexes.^[87] So liegt der Unterschied der Schmelztemperaturen eines Duplexes aus **21** mit jeweils einem der vier natürlichen Nucleosiden innerhalb eines Bereiches von 0.5°C. Allerdings bewirkt dieses Nucleosid eine signifikante Reduktion der thermodynamischen Stabilität eines Duplexes. Nichtsdestotrotz behält ein mit diesem Nucleosidanalogen mehrfach modifizierter siRNA-sense-Strang Aktivität in RNA-Interferenz-Tests bei.^[88] Darüberhinaus kann er, wenn er an Position 7 im sense-Strang inkorporiert wird, sogar eine Steigerung der RNAi-Aktivität verursachen.^[88] In thermodynamischen Stabilitätstest hat sich zudem das dreifach-fluorierte Pendant **22** als sehr potentes Nucleosidanalogen herausgestellt.^[89] Es bildet mit allen natürlichen Nucleosiden stabilere Duplexe als **21** – allerdings zeigt es eine größere Schwankungsbreite der T_m -Werte und ist damit „weniger universell“. Im Gegensatz hierzu scheint das Nucleosid aus 4,6-Difluorbenzimidazol **23** sehr gute Eigenschaften als universelles Nucleosid zu besitzen: Es bildet vergleichsweise stabile Duplexe, eine geringe Schwankungsbreite der T_m -Werte und konnte darüberhinaus erfolgreich als Templat für die T7-RNA Polymerase getestet werden.^[90]

In den jüngsten Untersuchungen wurden daher zu diesem Nucleosid **23** isostere Nucleosidanaloga hergestellt und ebenfalls auf ihre thermodynamischen Eigenschaften hin untersucht. Dabei haben sich vor allem das 4,6-Difluorindol-Nucleosid **24** sowie die 1'-Desoxy-1'-(7-*N*-purinyl)- β -D-ribofuranose **25** als mögliche Alternativen zu **23** erwiesen.^[91] Beide Nucleosidanaloga bilden stabilere Duplexe als das 4,6-Difluorbenzimidazolnucleosid **23**.

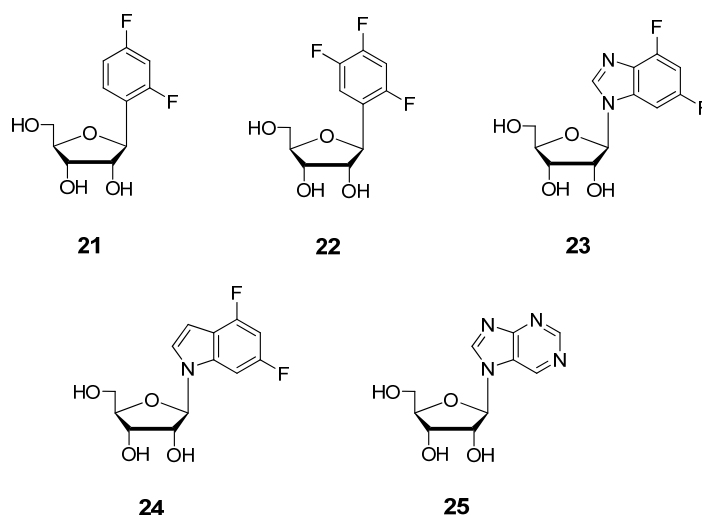


Abbildung 12: Universelle RNA-Nucleosidanaloga

An dieser Stelle sollte allerdings festgehalten werden, dass sämtliche bislang hier vorgestellten RNA-Nucleosid-Mimetika zu einer Destabilisierung eines RNA-Duplexes führen. Die hierbei ermittelten Schmelzpunkte liegen z.T. deutlich (ca. 10°C) unterhalb denen natürlicher Duplexen. Dennoch zeigen diese Nucleosidanaloga bereits vielversprechende Eigenschaften als universelle Nucleoside und könnten – auch im Hinblick auf die bereits vorgestellten Methoden einer weiteren Modifizierung an der 2'-Position – gewinnbringende Kandidaten für den Einsatz in biologischen Assays bis hin zu medizinischen Untersuchungen werden.

Da, wie bereits erwähnt wurde, fluorierte Nucleosidanaloga wie z.B. das 2,4-Difluorphenyl Nucleosid **21** in RNA-Interferenz Tests positive Resultate lieferten,^[88] kann man davon ausgehen, dass ein solches Modifikationsmotiv von den beteiligten Enzymen akzeptiert wird. Zudem konnten diese Untersuchungen belegen, dass – zumindest an bestimmten Positionen eines siRNA-Duplexes – ein signifikantes Wasserstoffbrückenmuster weit weniger notwendig

ist, als bislang vermutet wurde. Vielmehr scheinen sterische Faktoren in der siRNA-Erkennung ebenso wichtig zu sein. Insofern sind Nucleosidmimetika wie das 4,6-Difluorbenzimidazol **23** oder auch das isostere 7*N*-Purin **25** potentiell sehr aussichtsreiche Kandidaten als universelle Nucleoside.

Die Verwendung von universellen Nucleosidanaloga spielt gerade im Rahmen der RNA-Interferenz eine große Rolle: Diese Technik, die ein wertvolles Werkzeug gegen RNA-Viren darstellt, ließ sich auch für eine Bekämpfung von HI-Viren einsetzen. Erste Ansätze für derartige Strategien sind bereits in klinischer Untersuchung.^[92] Aufgrund der Tatsache, dass das HI-Virus über eine besonders hohe Mutationsrate verfügt, ist eine erfolgsversprechende Therapie auf siRNA-Basis sehr schwierig: Durch diese „Escape-Mutation“ wird eine zunächst geeignete siRNA schnell wirkungslos, da sich die entsprechende Ziel-mRNA durch Punktmutationen einem Angriff entziehen kann.^[93, 94]

An dieser Stelle wäre das Konzept der universellen Nucleosidanaloga von besonderem Nutzen: Da bekannt ist, dass bestimmte Stellen einer viralen RNA besonders ausgeprägt zu dieser „Escape-Mutation“ neigen, ließen sich die universellen Nucleoside insbesondere an den hierzu komplementären Stellen einer erfolgsversprechenden siRNA einfügen – wodurch auch nach Mutation der mRNA noch eine RNAi-Aktivität gewährleistet werden könnte.

Im Hinblick eines solchen Konzeptes zum therapeutischem Einsatz von universellen Nucleosiden in der RNA-Interferenz wäre freilich auch die weitreichende Modifizierung solcher Nucleosidmimetika von großem Interesse: Aus synthetischer Sicht sind viele dieser Nucleosidanaloga (vgl. Abb. 11 u. 12) für eine chemische Modifizierung – z.B. am C2' – leichter zugänglich als die natürlichen Vertreter. Dadurch wäre neben der Ausnutzung des universellen Charakters dieser Nucleoside auch eine Verbesserung z.B. der Zellaufnahme oder eine Verlängerung der *in vivo* Serumhalbwertszeit möglich.

2 Zielsetzung

RNA-Oligonucleotide stehen derzeit im Fokus medizinischer und pharmazeutischer Forschungen. Mithilfe chemisch-synthetischer Modifizierungen erhofft man sich, die nach wie vor bestehenden Hürden bei der medizinischen Anwendung therapeutischer Oligonucleotide überwinden zu können. In Anbetracht der Fülle an immer neuartigen Modifikationsmotiven von synthetischen Oligonucleotiden zeigt sich, wie sehr die Suche nach optimierten Oligonucleotiden im Hinblick ihrer möglichen medizinischen Anwendung von wissenschaftlichem Interesse ist.

Nachdem im Arbeitskreis von Prof. Engels bereits umfassend an fluorierten Nucleosiden geforscht wurde,^[89, 95-98] wodurch sich 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **23** als potentieller Kandidat eines universellen Nucleosids für den Einsatz in RNA-Oligonucleotiden herausgestellt hat,^[87] konnte zuletzt für das 2'-O-Aminoethyl-modifizierte Derivat dieses Nucleosidbausteins **26** eine Steigerung in der Duplexstabilität von RNA-Oligonucleotiden nachgewiesen werden.^[90] Diesen Befunden zugrundeliegend sollen im Rahmen dieser Doktorarbeit neuartige 2'-O-Modifikationen am Beispiel des 4,6-Difluorbenzimidazol-Nucleosidbausteins **23** entwickelt werden. Dabei soll die Entwicklung neuer Methodiken zur Modifizierung an der 2'-O-Position generell ebenso im Mittelpunkt stehen, wie die Darstellung ihrer Phosphoramidite als kupplungsfähige Monomere für den Einsatz in der RNA-Oligonucleotid-Festphasensynthese.

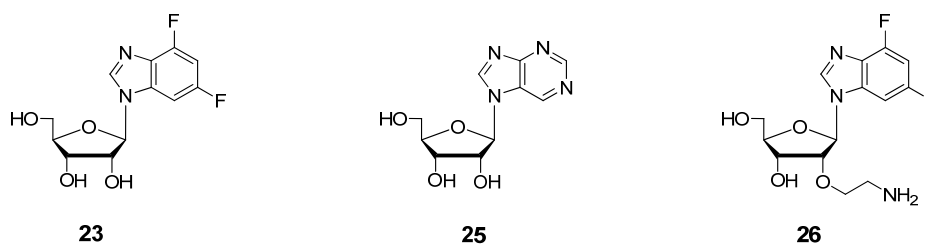


Abbildung 13: Bereits erprobte universelle Nucleosidanaloga

In erster Linie sind hierbei solche Modifikationsmuster von Interesse, die prinzipiell den anionischen Charakter eines RNA-Oligomers herabsetzen und dadurch für eine bessere

zelluläre Aufnahme Sorge tragen. Unter diesem Aspekt gilt es auch, lipophilen Modifikationsmotiven, wie z.B. Fettsäuren, Aufmerksamkeit zu schenken.

Ein weiterer Schwerpunkt liegt in der Synthese von modifizierten Oligonucleotiden, die anhand bekannter und etablierter RNA-12mer Systeme unter Verwendung spektroskopischer Methoden auf ihre thermodynamischen Eigenschaften hin untersucht werden können. Dadurch lassen sich beispielsweise Rückschlüsse auf den jeweiligen Einfluss der verwendeten 2'-O-Modifikation auf die Stabilisierung eines RNA-Duplexes ziehen. Schließlich sollen nach den o.g. Auswahlkriterien aussichtsreiche 2'-O-modifizierte universelle Nucleosidbausteine in siRNA-Oligomere eingebaut werden. Diese sollen in biologischen Untersuchungen auf ihre RNA-Interferenz-Aktivität hin untersucht werden – gleichzeitig soll eine mögliche Steigerung der Nucleaseresistenz sowie das Zellaufnahme-Vermögen dieser modifizierten siRNAs evaluiert werden.

Abschließend gilt es, die erzielten synthetischen Fortschritte auch an anderen universellen Nucleosidanaloga zu erproben. Zu diesem Zweck wurde das dem 4,6-Difluorbenzimidazolnucleosid **23** isostere 7*N*-Purinnucleosid **25** herangezogen; dadurch soll die mögliche Vielfalt der neuartigen 2'-Modifikationsmotiven sowie deren einfache Zugänglichkeit aufgezeigt werden.

3 Allgemeiner Teil

3.1 Chemische Synthesen

3.1.1 Synthese der Nucleosid-Bausteine

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollten – basierend auf vorangegangenen Arbeiten im Arbeitskreis von Prof. Engels – bereits bekannte sog. universelle Nucleosid-Analoga spezifisch an der 2'-O-Position der Ribose modifiziert werden.

Dabei standen vorwiegend solche Modifikationsmuster im Vordergrund, die möglicherweise den anionischen Charakter eines RNA-Oligonucleotids herabsetzen, bzw. die Lipophilie desselben erhöhen und dadurch eine bessere zelluläre Aufnahme von Oligomeren, wie z.B. siRNAs, ermöglichen könnten (vgl. Kap. 1.2).

Grundlage für die Auswahl der Nucleosid-Bausteine bildeten die Arbeiten von Parsch und Klöpffer, die sich mit der Selektion möglicher universeller Nucleobasen beschäftigten.^[87, 90]

Demnach zeigte vor allem die 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **23**, welche dem natürlichen Nucleosid Guanosin **27** sterisch sehr ähnlich ist, eine sehr gute Erfüllung des universellen Charakters.

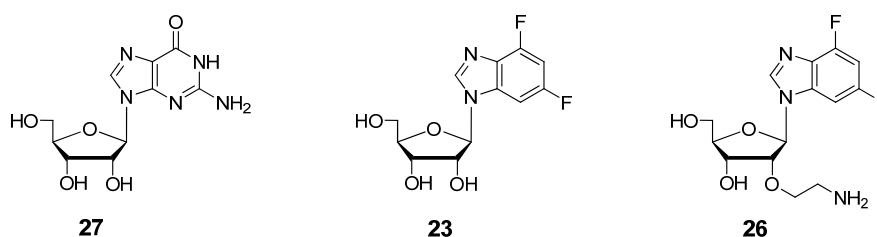


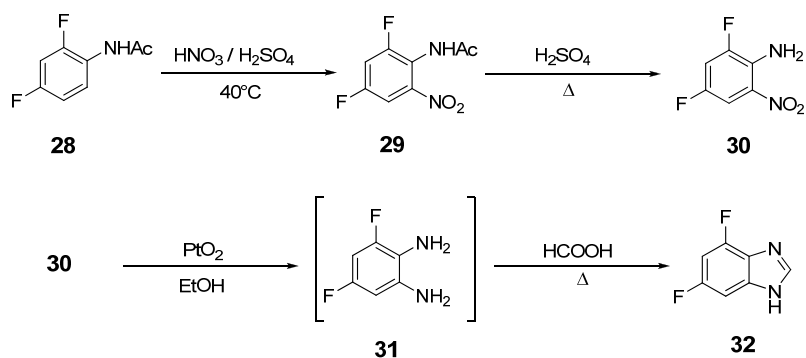
Abbildung 14: Natürliches Guanosin **27**, 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **23**, 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-(β -aminoethyl)- β -D-ribofuranose **26**

Dieser beruht überwiegend darauf, dass aufgrund der Substitution der Wasserstoffbrückendonator- bzw. -akzeptorfunktionalitäten durch Fluoratome keine klassischen Wasserstoffbrücken ausgebildet werden können. Wie Parsch und Engels zeigen konnten, führen diese Fluorsubstituenten im aromatischen System der Nucleobase jedoch zu einer Erhöhung der Basenstapelungseigenschaften, des sog. π -Stackings.^[99] Ausserdem konnten durch

Kristallstrukturanalysen Fluor-Wasserstoff-Wasserstoffbrücken nachgewiesen werden, die für eine zusätzliche Stabilität in RNA-Duplexen sorgen.^[98] Aufgrund dieser thermodynamischen Untersuchungen des 4,6-Difluorbenzimidazol-Nucleosids entwickelten Klöpffer und Engels modifizierte Hammerhead-Ribozyme, die aufgrund des Einbaus ebenjenes universellen Nucleosids in der Lage sind, häufig auftretende Punktmutationen zu tolerieren.^[100] Bereits in diesen Arbeiten wurde zusätzlich ein 4,6-Difluorbenzimidazol-Nucleosidbaustein verwendet, der an der 2'-O-Position durch eine Aminoethyl-Gruppe modifiziert war (s. Abb. 14, **26**). Durch diese zusätzliche 2'-O-Aminoethyl-Modifikation ließ sich ein zusätzlicher Gewinn in der Duplexstabilität im Vergleich zum unmodifizierten 4,6-Difluorbenzimidazolnucleosid **23** erzielen (s. Kap. 3.3).

Darstellung von 4,6-Difluorbenzimidazol **32**

Zur Darstellung von 4,6-Difluorbenzimidazol startet man ausgehend vom käuflichen 2,4-Difluoracetanilid **28** mit einer Nitrierungsreaktion. Hierbei erfolgt die Einführung der Nitrogruppe in ortho-Position zur Acetyl-geschützten Aminofunktion unter Standardbedingungen mit Nitriersäure aus 65 %iger HNO₃ und konz. Schwefelsäure in Eisessig.^[101] Durch die induktiven und mesomeren Effekte der bereits vorhandenen Substituenten wird ausschließlich das einfach nitrierte Produkt **29** in sehr guten Ausbeuten von über 85 % erhalten. Anschließend entfernt man unter sauren Bedingungen die Acetylschutzgruppe. Im nächsten Schritt erfolgt die Reduktion der Nitrogruppe zum Amin unter heterogener Metallkatalyse bei Atmosphärendruck. Hierfür wird Platin(IV)oxid als Katalysator eingesetzt; die Reduktion erfolgt unter Wasserstoffatmosphäre in absolutem Ethanol als protisches Lösungsmittel. Das auf diese Weise erhaltene 3,5-Difluor-2-aminoanilin **31** ist recht luftempfindlich und wird daher nicht weiter aufgereinigt. Aufgrund seiner Reaktivität setzt man es direkt mit Ameisensäure zum gewünschten 4,6-Difluorbenzimidazol **32** um. Diese Ringschlussreaktion, der eine β -Eliminierung folgt, die schließlich zum gewünschten Produkt führt, erfolgt unter Rückflusskochen und liefert das 4,6-Difluorbenzimidazol **32** in nahezu quantitativer Ausbeute.^[102]



Schema 1: Synthese von 4,6-Difluorbenzimidazol **32** ausgehend von 2,4-Difluoroacetanilid **28**

Die hohe Reinheit des Rohproduktes von **32**, sowie dessen schlechte Löslichkeit im Elutionsmittel, erlaubten es, das 4,6-Difluorbenzimidazol ohne weitere Aufreinigung direkt einer Glycosilierungsreaktion zu unterwerfen.

7H-Purin als Nucleobase

Das Puringerüst findet sich in der Natur in vielen Verbindungen wieder; so bildet es z.B. neben dem Pyrimidin das Grundgerüst für die Bausteine der Nucleinsäuren. Außerdem leiten sich wichtige Alkaloide vom Purin ab.^[103] Chemisch gesehen kann das Purin als kondensiertes Ringsystem betrachtet werden, das sich aus dem Sechsring Pyrimidin und dem Fünfring Imidazol zusammensetzt. Unsubstituiertes Purin liegt in einem tautomeren Gleichgewicht zwischen dem 7H-Purin **33b** und dem 9H-Purin **33a** vor (s. Abb. 2).

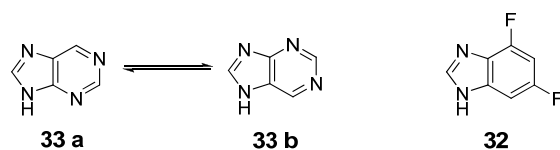


Abbildung 15: Tautomeres Gleichgewicht zwischen 9H-Purin **33a** und 7H-Purin **33b**; 4,6-Difluorbenzimidazol **32**, welches isoster zu 7H-Purin **33b** ist.

Wie aus Abbildung 15 ebenfalls hervorgeht, ist das 7H-Purin **33b** sterisch dem 4,6-Difluorbenzimidazol **32** sehr ähnlich; so befinden sich beim 7H-Purin im Sechsring anstelle der Fluorsubstituenten Stickstoffatome. J. Bozilovic hat in ihrer Arbeit mit Purinnucleosiden

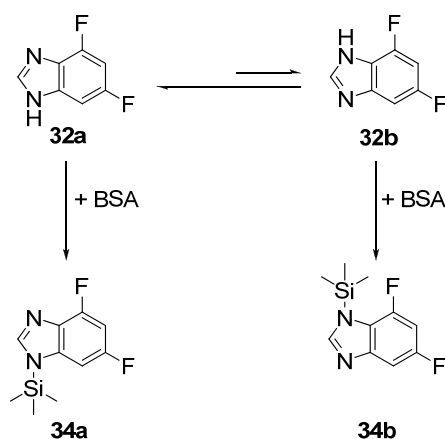
feststellen können, dass 7*N*-Purinnucleoside die Duplexstabilität im Vergleich zum 4,6-Difluorbenzimidazol-nucleosid um drei bis fünf Grad Celsius erhöhen.^[91] Aufgrund dieser empirisch gefundenen Resultate wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit der synthetische Teil auch auf 7*N*-Purinribonucleoside ausgeweitet.

3.1.2 Glycosilierungsreaktion nach Vorbrüggen^[104, 105]

Zur Verknüpfung der Nucleobasen mit dem Zucker Ribose, der Glycosilierungsreaktion, wurde nach den Vorgaben der Silyl-Hilbert-Johnson-Reaktion verfahren. Diese ist für Purine und Benzimidazole die Synthesevorschrift der Wahl, und liefert β -N1-verknüpfte Nucleoside in hohen Ausbeuten.

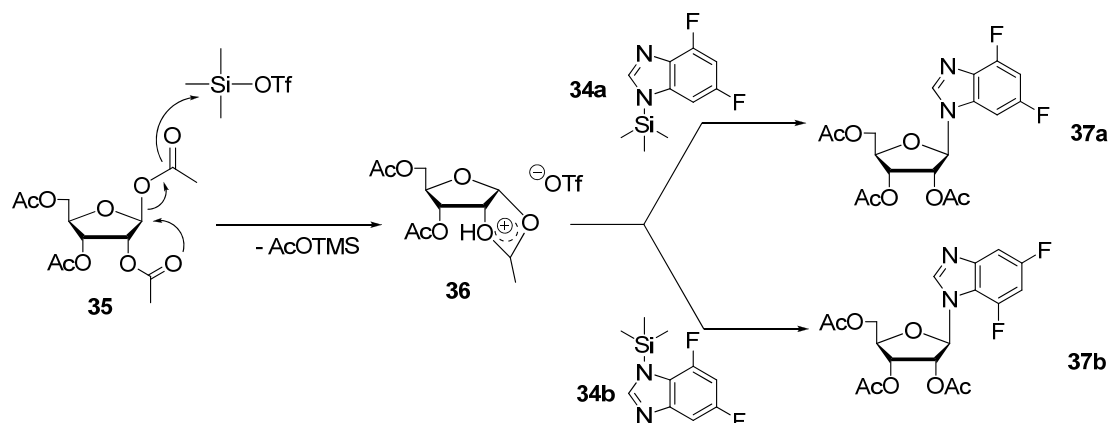
Der Mechanismus dieser C-N - Bindungsknüpfungsreaktion soll im Folgenden am Beispiel der Glycosilierung von 4,6-Difluorbenzimidazol **32** mit 1,2,3,5-Tetra-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose **35** erläutert werden. Im Falle der Darstellung des 1'-Desoxy-1'-(7-*N*-purin)- β -D-ribofuranose-Bausteines **39** lassen sich die mechanistischen Betrachtungen übertragen.

Wie aus Schema 2 ersichtlich ist, liegt das 4,6-Difluorbenzimidazol **32** in zwei tautomeren Formen vor. So kann das N1-Proton zum N3-Stickstoff wandern, wodurch Verbindung **32b** entsteht. Das Gleichgewicht dieser Isomerisierung liegt allerdings weit auf der Seite des N1-Isomers **32a**, was sich vorwiegend durch das Fluorsubstitutionsmuster am aromatischen Sechsring erklären lässt. Da im ersten Reaktionsschritt der Silyl-Hilbert-Johnson-Reaktion eine Silylierung der Fünfring-Stickstoffatome mit *N,O*-Bis(trimethylsilyl)-acetamid erfolgt, werden aufgrund des beschriebenen tautomeren Gleichgewichts beide Isomere **34a** und **34b** silyliert (s. Schema 2).



Schema 2: Silylierung von 4,6-Difluorbenzimidazol **32** mit *N,O*-Bis(trimethylsilyl)-acetamid

Gleichzeitig setzt man 1,2,3,5-Tetra-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose **35** mit der Lewisäure Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (TMSOTf) um. Hierbei bildet sich das Kation **36** durch einen intramolekularen Angriff der C2'-Acetylgruppe auf die C1-Position unter gleichzeitiger Abspaltung der C1-Acetylgruppe (s. Schema 3). Die C1-Acetylgruppe wird dabei als Trimethylsilylacetat abgefangen. Bedingt durch diesen Nachbargruppeneffekt steht der durch den intramolekularen Angriff der C2-Acetylgruppe resultierende Fünfring in α -Stellung am Ribosering. Dadurch kann dieser nach Zugabe der silylierten Nucleobase **34a** bzw. **34b** das stabilisierte Kation **36** nur von der β -Seite des Riboseringes nucleophil angreifen.



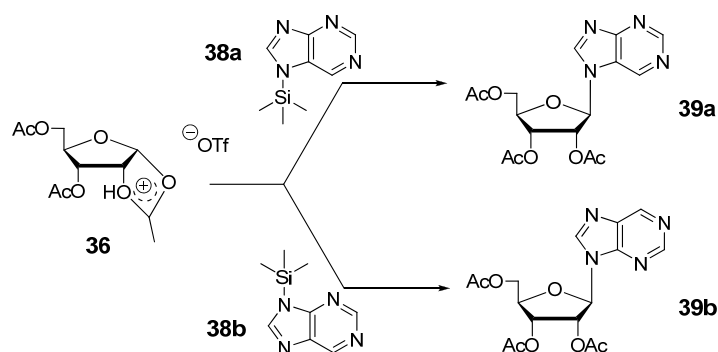
Schema 3: Mechanistischer Ablauf der Glykosilierungsreaktion

Durch den nucleophilen Angriff wird das kationische Fünfringsystem an der Ribose wieder geöffnet und die Nucleobase wird kovalent über eine C-N-Bindung an die Ribose gebunden.

Die Reaktion verläuft thermodynamisch kontrolliert und liefert reine β -Nucleoside. Das Verhältnis zwischen 1*N*-Nucleosid **37a** und 3*N*-Nucleosid **37b** liegt im Falle des 4,6-Difluorbenzimidazols bei etwa 16:1. So konnte auf die hier dargestellte Weise die gewünschte 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluorbenzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **37** in guten Ausbeuten von ca. 80 % isoliert werden.

Eine Unterscheidung der beiden Regioisomeren gelingt mittels 2D-NMR-Spektroskopie. So lassen sich im ROESY-Spektrum des gewünschten N1-Isomers intensive Kreuzpeaks zwischen H1' des Zuckers und dem H7 der Nucleobase detektieren. Weitere Details zur Charakterisierung der beiden Regioisomeren sind ausführlich in der Arbeit von Parsch aufgeführt.^[87]

Während zur Synthese des 4,6-Difluorbenzimidazol-Nucleosids **37** ausschließlich nach der klassischen Literaturvorschrift von Vorbrüggen verfahren wurde, wurde für die Synthese des entsprechenden 7*N*-Purin-Nucleosids ein Syntheseprotokoll herangezogen, das eine mikrowellenunterstützte Glycosilierungsreaktion vorsah.^[106] Im Vergleich zur konventionellen, thermischen Methode, bietet die mikrowellenunterstützte Vorbrüggen-Glycosilierung vor allem in der Reaktionszeit Vorteile: Während unter klassischen Bedingungen erst nach ca. 3 Stunden keine weitere Umsetzung mehr mittels Dünnschichtchromatographie beobachtet werden kann, ist beim Einsatz der Mikrowelle bereits nach ca. 100 Minuten die Reaktion weitestgehend beendet.



Schema 4: Entstehung der beiden regioisomeren Purin-Nucleoside **39a** bzw. **39b**.

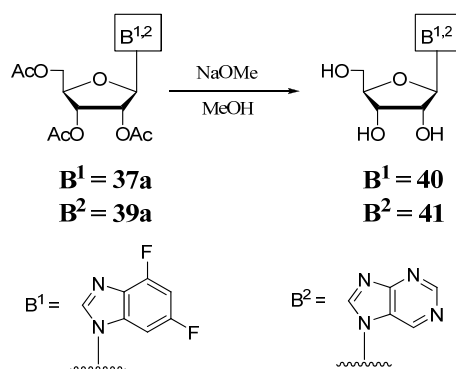
Hinsichtlich Ausbeuten bzw. der Regioselektivitäten lassen sich allerdings zwischen beiden Methoden keine nennenswerten Unterschiede ausmachen: Die Produktverteilung dieser Reaktion liegt sehr zu Ungunsten des gewünschten 7*N*-Nucleosids weshalb überwiegend (ca.

70 %) 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(9-*N*-purin)- β -D-ribofuranose **39b** als Nebenprodukt entsteht. Diese Tatsache, sowie die durch die Ausmaße der Bestrahlungskammer limitierte Ansatzgröße führten dazu, dass die Glycosilierung mit käuflichem Purin mehrfach durchgeführt werden musste.

Wie schon bei der Synthese des 4,6-Difluorbenzimidazolnucleosids **37** erwähnt, lassen sich auch beim Purin-Nucleosid **39** die beiden entstehenden Isomere durch zweidimensionale NMR-Spektroskopie unterscheiden (s. oben).

3.1.2.1 Deacetylierung

Die Deacetylierung der beiden Nucleosid-Bausteine 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(7-*N*-purinyl)- β -D-ribofuranose **39a** bzw. 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluorbenzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **37a** erfolgte nach Standardvorschrift durch Zugabe katalytischer Mengen von Natriummethanolat in absolutem Methanol.^[107] Bereits nach wenigen Minuten sind die Acetylschutzgruppen quantitativ abgespalten und das 2',3',5'-ungeschützte Nucleosid **40** bzw. **41** ist für weitere Umsetzungen zugänglich.



Schema 5: Deacetylierung des 4,6-Difluorbenzimidazol **37a** bzw. 7*N*-Purin Nucleosids **39a**

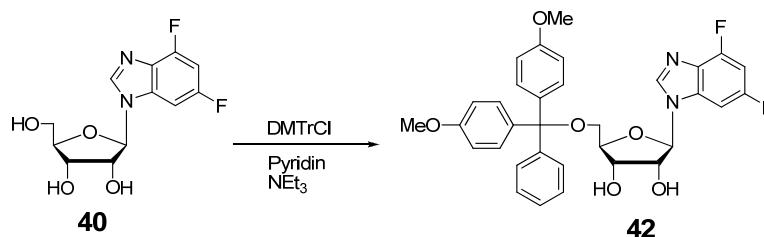
3.1.3 Synthese des 2'-unmodifizierten Nucleosidbausteins 46

Um die in späteren Kapiteln erwähnten 2'-O-modifizierten Nucleosid-Bausteine auf den Einfluss der 2'-Modifikation hin untersuchen zu können, wurde auch das 3'-Phosphoramidit des 2'-unmodifizierte 4,6-Difluorbenzimidazolbausteins, welches sich für den Einbau in RNA-Oligonucleotiden eignet, synthetisiert. Dadurch war es möglich, den jeweiligen Einfluss der 2'-Modifikation z.B. auf thermodynamische aber auch strukturelle Eigenschaften hin mit dem unmodifizierten Baustein direkt zu vergleichen. Beim 7*N*-Purin-Analagon wurde aus Zeitgründen aber vorwiegend aufgrund der geringen Menge an ungeschütztem Nucleosid **39a** (vgl. 3.1.1) auf diese Syntheseroute verzichtet. Stattdessen wurden die analytisch erzielten Resultate mit den Daten verglichen, die von J. Bozilovic im Rahmen ihrer Doktorarbeit erzielt wurden.

3.1.3.1 Orthogonale Blockierung der 2'- bzw. 5'-OH - Funktion

Um einen Nucleosidbaustein herzustellen, der sich für den Einsatz in der automatisierten Oligonucleotidsynthese eignet, ist die orthogonale Blockierung der 2'- bzw. 5'-Hydroxyfunktion der Ribose vonnöten. Da im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit auf die klassische Phosphoramidit-Methode^[108-113] zurückgegriffen wurde, wurde die 5'-Hydroxyfunktion mit einer säurelabilen Schutzgruppe, die im Laufe der Oligonucleotidsynthese mit Trichloressigsäure (TCA) abgespalten wird, selektiv blockiert. Als Standardschutzgruppe für diesen Zweck hat sich die 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylgruppe (DMTr) etabliert.^[114, 115] Sie bietet den Vorteil, dass das im Laufe der Oligonucleotidsynthese abgespaltene DMTr-Kation im sichtbaren Bereich von 498 nm absorbiert, was sich zur spektroskopischen Bestimmung der Kupplungsabweiche nach jeder DMTr-Abspaltung nutzen lässt (vgl. Kap. 3.2.1).^[116]

Die Einführung der DMTr-Schutzgruppe gelingt durch 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid in 1.3 äquivalentem Überschuss in Pyridin als Lösungsmittel. Triethylamin wird als Hilfsbase zugesetzt; das Pyridin sorgt zudem dafür, dass das während der Reaktion entstehende HCl als Pyridiniumchlorid abgefangen wird, wodurch sich eine mögliche Rückreaktion unterdrücken lässt.

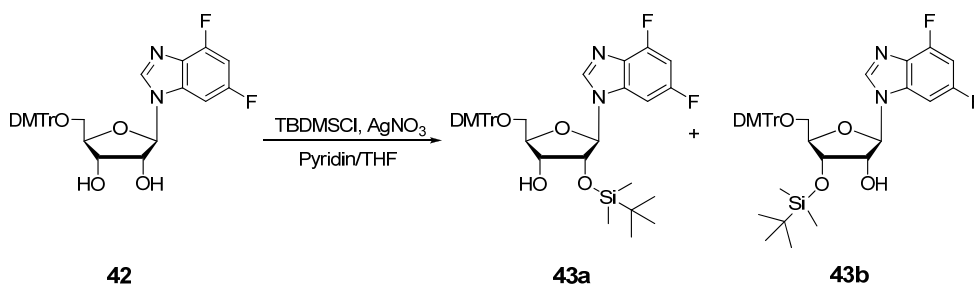


Schema 6: 5'-Dimethoxytritylierung von 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose **40**.

Die hohe Selektivität der Dimethoxytriphenylmethyl-Schutzgruppe zur 5'-OH-Funktion der Ribose lässt sich durch die erhöhte Reaktivität des primären Alkohols im Vergleich zu den sekundären Alkoholen am 2'- bzw. 3'-Kohlenstoffatom erklären. In der Regel lassen sich bei dieser Reaktion Ausbeuten von 70 – 85 % erzielen, wobei zu erwähnen ist, dass eine Nebenreaktion, wie etwa eine 3'-Dimethoxytritylierung, nicht beobachtet wurde.

Zur Maskierung der 2'-Hydroxyfunktion wurde auf die in der Nucleosidchemie bewährte *tert*-Butyldimethylsilyl Schutzgruppe (TBDMS) zurückgegriffen.^[117, 118]

Die 2'-O-TBDMS-Blockierung erfolgte mittels Zugabe von *tert*-Butyldimethylchlorsilan (1 M in THF) in einer Mischung aus absolutem Pyridin und absolutem THF (1:1) bei Raumtemperatur. Um die Ausbeute an erwünschtem 2'-Produkt zu erhöhen, wurde der Reaktionsmischung Silbernitrat zugesetzt.^[119]



Schema 7: Einführung der TBDMS-Schutzgruppe

Bei dieser Reaktion entsteht immer ein Gemisch aus beiden Regioisomeren, 2'-O-TBDMS-**43a** und 3'-O-TBDMS-Nucleosid **43b** (s. Schema 7). Aufgrund der Migrationsstendenz der TBDMS-Gruppe in Richtung 3'-OH-Funktion,^[120, 121] verläuft die Blockierungsreaktion eher zu Gunsten des unerwünschten 3'-O-silylierten Produkts **43b**. Letztlich müssen beide isomeren Produkte durch präparative HPLC aufgetrennt werden; eine eindeutige

Unterscheidung ist dann mit Hilfe ^1H - ^1H -COSY-NMR Spektroskopie möglich. Auf diese Weise konnten 41 % des gewünschten 2'-O-TBDMS-geschützten Nucleosids **43a** isoliert werden.

3.1.3.2 Phosphitylierung

Zur Synthese von kupplungsfähigen Nucleosid-Bausteinen für die Oligonucleotidsynthese bedarf es reaktiver Phosphitylierungsreagenzien, die in einer selektiven Substitutionsreaktion mit der 3'-Hydroxyfunktion der Ribose zum Phosphoramidit reagieren. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Reagenzien zur Darstellung der jeweiligen Phosphoramidite sind in Abbildung 16 dargestellt.

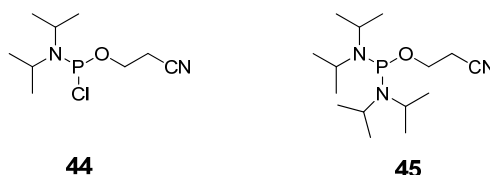
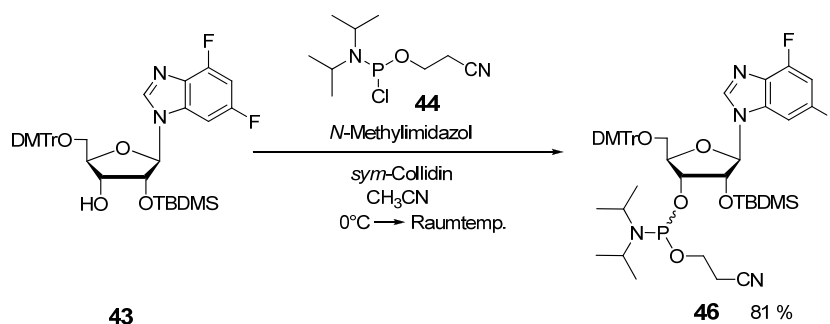


Abbildung 16: Verwendete Phosphitylierer; 2-Cyanoethyl-diisopropylchlorphosphoramidit **44**, 2-Cyanoethyl-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphoramidit **45**

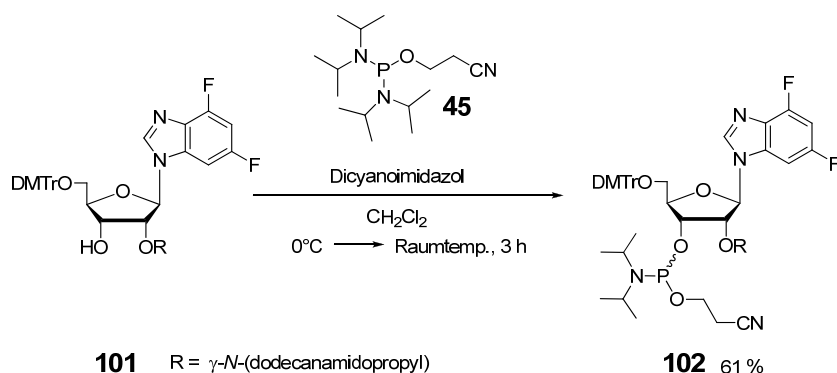
In der Regel wurde auf das 2-Cyanoethyl-diisopropylchlorphosphoramidit **44** zurückgegriffen. Im Vergleich zum 2-Cyanoethyl-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphoramidit **45** ist es um einiges reaktiver, da das Chloratom im Gegensatz zum Diisopropylamin als bessere Abgangsgruppe fungiert.^[112] Für eine Phosphoramiditsynthese mit 2-Cyanoethyl-diisopropylchlorphosphoramidit **44** wurde das 2',-5'-blockierte Nucleosid **43** in absolutem Acetonitril gelöst und mit *sym*-Collidin sowie *N*-Methylimidazol als Aktivator versetzt. Nach Abkühlung der Lösung auf 0°C wurde langsam der Phosphitylierer hinzugesetzt; mittels DC-Kontrolle ließ sich der Verlauf der Phosphitylierungsreaktion gut verfolgen. Nachdem das Edukt abreagiert war, wurde kurz auf Raumtemperatur erwärmt und schließlich die Reaktion durch Zugabe weniger Milliliter 0.01 M Zitronensäure-Lsg. gequencht. Dieser Schritt – wie auch das weitere Extrahieren mit 0.01 M Zitronensäure-Lsg. – diente der Protonierung des Collidins, welches sich auf diese Weise mit der wässrigen Phase vom Produkt abtrennen ließ.^[122]



Schema 8: Synthese des Phosphoramidits **46** mit 2-Cyanoethyldiisopropylchlorphosphoramidit **44**

Es sei an dieser Stelle schon erwähnt, dass sich die Synthese des 7*N*-Purin-Amidits **110** schwieriger gestaltete; so wurde bei der Amiditsynthese von **110** nach Standardprotokoll überwiegend das hydrolysierte H-Phosphonat erhalten, welches sich nicht mehr zum Einsatz für die automatisierte Oligonucleotidsynthese unter Standardbedingungen eignet. Weitere Details sind in Kap. 3.1.5 beschrieben.

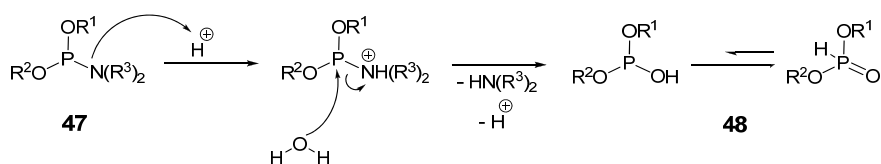
2-Cyanoethyl-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphoramidit **45** wurde lediglich zur Synthese des 2'-O-modifizierten Bausteins **102** eingesetzt (s. 3.1.4.6). Wie schon erwähnt, ist dieses Reagenz weniger reaktiv, woraus eine längere Reaktionsdauer resultiert. Gleichzeitig ist diese Synthese allerdings weitaus weniger empfindlich gegenüber hydrolytischer H-Phosphonatbildung. Zudem kann auf *sym*-Collidin als Hilfsbase verzichtet werden, wodurch sich eine leichtere Aufreinigung des Amidits ergibt. Allerdings zeigen sowohl Literaturangaben^[123] wie auch Erfahrungswerte im Umgang mit diesem Phosphitylierer, dass hierbei z.T. deutlich geringere Ausbeuten an Phosphoramiditen trotz längerer Reaktionszeit erzielt werden, weshalb überwiegend o.g. Reagenz 2-Cyanoethyldiisopropylchlorphosphoramidit **44** zum Einsatz kam. In Schema 9 ist exemplarisch eine Phosphitylierung mit 2-Cyanoethyl-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphoramidit **45** dargestellt.



Schema 9: Synthese des Phosphoramidits **102** mit 2-Cyanoethyl,*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphoramidit **45**

Bei sämtlichen Phosphitylierungsreaktionen entstehen die entsprechenden Phosphoramidite als Diastereomerenpaar. Die Diastereomeren unterscheiden sich nur leicht in ihrer chemischen Verschiebung im ^{31}P -NMR und lassen sich durch einfache chromatographische Methoden nicht trennen. Da jedoch beide Isomere in der Oligonucleotid-Festphasensynthese eingesetzt werden können – letztlich geht die stereochemische Information am Phosphoratom durch die Oxidation zum Phosphat verloren (vgl. Kap. 3.2) – konnte auf eine aufwändige Isolierung der Diastereomeren verzichtet werden.

Die bei Phosphitylierungen entstehenden unerwünschten Hydrolyseprodukte, die sog. H-Phosphonate, lassen sich im ^{31}P -NMR aufgrund ihres im Vergleich zum Phosphoramidit hochfeldigeren Shifts ($\delta = \text{ca. } 15 - 5 \text{ ppm}$) einfach erkennen. Meistens konnte die Entstehung dieser für die Phosphoramidit-Kupplungschemie am Synthesizer unbrauchbaren Nebenprodukte der Phosphitylierungsreaktion durch schnelle Reaktionsführung sowie durch strikten Ausschluss von Wasser während der Reaktion gut unterdrückt werden.



Schema 10: Mechanistische Entstehung eines H-Phosphonats **48** aus Hydrolyse eines Phosphoramidits **47**

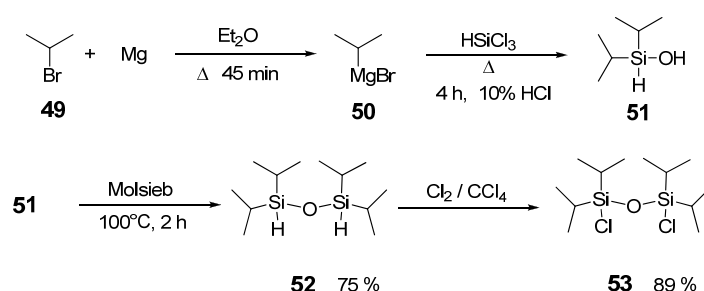
3.1.4 Einführung von 2'-O-Modifikationen an Nucleosidbausteinen

Zur gezielten Modifizierung der 2'-Position der Ribose in Nucleosiden ist es notwendig, zuvor die 3'- bzw. 5'-OH Funktion zu blockieren, um unerwünschte Nebenreaktion zu verhindern.

Sämtliche, im Folgenden dieser Arbeit diskutierten 2'-O-Modifikationen basieren auf der simultanen Blockierung der 3',5'-OH Funktion mit der 1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl (TiPDS) Schutzgruppenstrategie.^[124] Diese bietet die gleichzeitige Einführung einer Silyl-Schutzgruppe (sog. Markiewicz-Schutzgruppe) für die 3'- bzw. 5'-Hydroxyfunktion der Ribose.

3.1.4.1 Synthese und Einführung der Markiewicz-Schutzgruppe^[124]

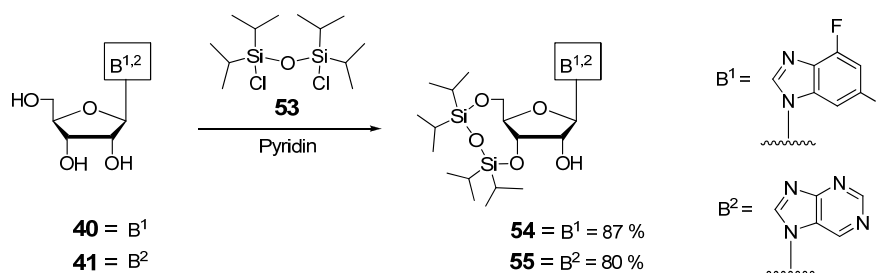
Zur Einführung der Markiewicz-Schutzgruppe bedient man sich des 1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxandichlorids **53**, welches synthetisch gut zugänglich ist. Ausgehend von Isopropylbromid **49** und Magnesium wird das Grignardreagenz **50** hergestellt, das mit Trichlorsilan umgesetzt wird. Anschließende Hydrolyse liefert das Diisopropylsilanol **51**, welches schließlich unter Erwärmen zum Dimeren Disiloxan **52** kondensiert. Im letzten Schritt erfolgt die Chlorierung des 1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxans **52** mit einer Chlorgas-gesättigten Tetrachlorkohlenstofflösung. Insgesamt konnte nach fraktionierter Destillation im Ölpumpenvakuum das gewünschte 1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxandichlorid **53** in 89 %iger Ausbeute, bezogen auf das Disiloxan **52**, synthetisiert werden.



Schema 11: Synthese von 1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxandichlorid **53**

Die simultane Blockierung der 3', 5'-OH-Funktion der Nucleosidbausteine **40** bzw. **41** mit der Markiewicz-Schutzgruppe erfolgt durch langsame Zugabe von 1,1,3,3-Tetraisopropyl-

disiloxandichlorid **53** zu den in absolutem Pyridin gelösten Edukten.^[125] Nach 4 h Rühren bei Raumtemperatur lässt sich kein Edukt mehr mittels Dünnschichtchromatographie nachweisen. Zudem ist das Fortschreiten der Reaktion durch das stetige Ausfallen an Pyridiniumchlorid gut zu beobachten. Nach Aufarbeitung wurden die gewünschten Produkte **54** bzw. **55** in in sehr guten Ausbeuten von 87 % bzw. 80 % erhalten.



Schema 12: Einführung der Markiewicz-Schutzgruppe an die Nucleosidbausteine **40** bzw. **41**

Die Bildung eines 9-Ring-Disiloxan-Systems bedingt durch Migration der Schutzgruppe im *cis*-Diol-System der Ribose (3'-OH zum 2'-OH) wurde nur bei sehr langen Reaktionszeiten (Rühren über Nacht) beobachtet.

Die Abspaltung der Markiewicz-Schutzgruppe erfolgt – wie bei Silyl-Schutzgruppen üblich – durch Fluorid-Ionen. Als Standardreagenz hat sich eine Lösung aus Tetrabutylammoniumfluorid in THF (1 M), welche kommerziell erhältlich ist, etabliert.^[124] Im Falle eines 2'-O-Cyanoethyl-modifizierten Bausteins **72** reicht allerdings die Basizität der Fluorid-Ionen aus, um den Cyanoethylrest nach einem β -Eliminierungsmechanismus abzuspalten.^[126] In diesem Fall lässt sich die Markiewicz-Schutzgruppe unter Erhaltung des 2'-O-Cyanoethyl-Restes mit $\text{NEt}_3 \cdot 3\text{HF}$ quantitativ entfernen (vgl. Kap 3.1.4.3).^[71]

3.1.4.2 2'-O-Alkylierungen^[69]

Den synthetisch frühest bekannte Zugang zu 2'-O-Modifikationen von Nucleosiden bot die einfache Alkylierung der 2'-Hydroxyfunktion. So war beispielsweise die erste durchgeführte Modifizierung an der Ribose eines Nucleosidbausteins die 2'-Methoxy-Modifikation, wobei mit Methyljodid als Alkylierungsreagenz gearbeitet wurde.^[127] Broom und Robins synthetisierten Mitte der sechziger Jahre des letzten Jahrhunderts 2'-O-Methyladenosin durch Umsetzung von Adenosin mit Diazomethan in wässrigem Dimethoxyethan;^[128] Kinoshita *et*

al. entwickelte etwa fünfzehn Jahre später die Darstellung von 2'-O-Methylnucleosiden durch Trimethylsulfoniumhydroxid als Alkylierungsmittel.^[129, 130]

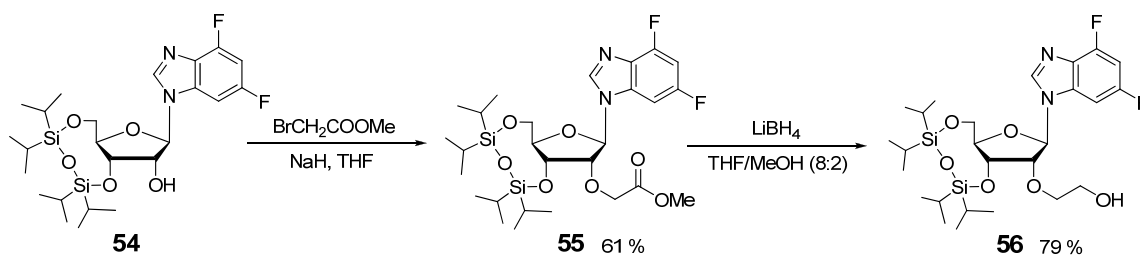
Alle Alkylierungsreaktionen besitzen die Gemeinsamkeit, dass mit starken Basen zur Deprotonierung der 2'-OH-Funktion gearbeitet werden muss. Zwar ist die 2'-Hydroxylgruppe mit einem pK_S -Wert von ~ 12 die acideste im nucleosidischen System, dennoch lassen sich in der Literatur nur wenige Methoden zur selektiven 2'-OH-Deprotonierung finden.^[68] Daher kommen entweder Alkalimetallhydroxide zum Einsatz – Reese *et al.* stellten Mitte der sechziger Jahre des letzten Jahrhunderts die Alkylierung von 3',5'-Di-*O*-trityluridin mit Benzylchlorid in Gegenwart von Kaliumhydroxid vor^[131] – oder aber man bedient sich starker organischer Basen wie z.B. 2-*tert*-Butylimino-2-diethylamino-1,3-dimethylperhydro-1,3,2-diazaphospholin (BDDDP).^[132] Sehr weit verbreitet sind auch Alkalimetallhydride wie Natriumhydrid.^[133, 134] Insgesamt ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass sich durch neuentwickelte Schutzgruppenstrategien, wie z.B. die in Kap. 3.1.4.1 vorgestellte Verwendung der Markiewicz-Schutzgruppe, die Ausbeuten sowie die Vielfalt an 2'-O-Modifikationen immens steigern ließen.

Entscheidende Motivation für die Entwicklung neuer 2'-O-modifizierter Nucleosidbausteine ist in erster Linie die Optimierung von Oligonucleotiden für den biologischen bzw. medizinischen Einsatz. So zeigte sich z.B., dass sich gerade 2'-modifizierte RNAs besonders für den Einsatz in der Antisense-Technologie eignen.^[3, 135] Ebenso bieten 2'-modifizierte siRNAs neue Ansätze für die RNA-Interferenz-Technologie.^[37, 38] Weitere Ansatzpunkte und Strategien für den Einsatz 2'-modifizierter Oligonucleotide wurden bereits in der Einleitung in Kap. 1.2.2 diskutiert.

Gerade in den letzten Jahren wurde daher viel über neue 2'-O-modifizierte RNA-Nucleoside berichtet – auf einige soll im Folgenden näher eingegangen werden.

2'-O-Aminoethyl - Nucleoside

Wie schon im vorherigen Abschnitt erwähnt, erhält man den Zugang zu 2'-O-Aminoethyl modifizierten Nucleosiden durch eine Alkylierung der 2'-OH-Gruppe; als Standardreagenz hierfür hat sich Bromessigsäuremethylester etabliert.^[67] Auf diese Weise wurde auch bereits der 2'-O-Aminoethyl-modifizierte 4,6-Difluorbenzimidazolbaustein **56** in der Arbeitsgruppe von J.W. Engels synthetisiert (Schema 13).^[90, 100]



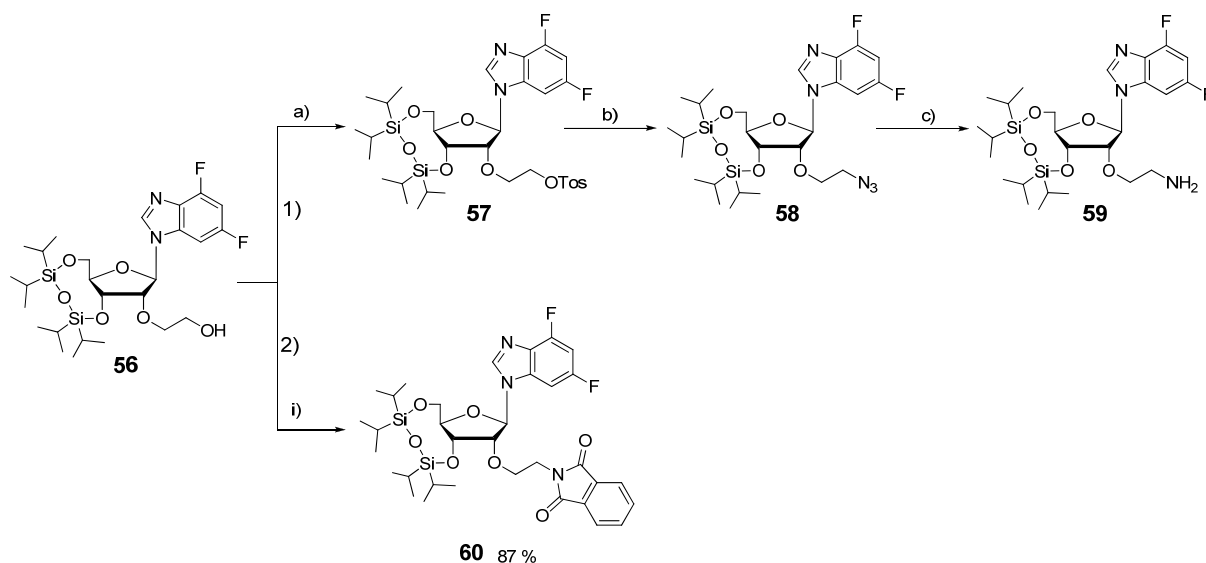
Schema 13: Reaktionssequenz ausgehend von 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose **54**; zunächst erfolgt die 2'-Alkylierung zu **55**, anschließend die Reduktion mit LiBH₄ zu Verbindung **56**.

Die hierbei verwendete Synthesekaskade beginnt mit besagter nucleophiler Substitution von Bromessigsäuremethylester nach vorheriger Deprotonierung der 2'-Hydroxyfunktion mit Natriumhydrid. Aufgrund seiner elektronenziehender Substituenten ist das Alkylierungsreagenz befähigt, bereits bei Raumtemperatur mit dem Alkoholat zu reagieren. Allerdings werden unter diesen Bedingungen selten Ausbeuten von über 65 % erzielt.

Man erhält das 2'-alkylierte Derivat **55**, welches eine Esterfunktion innehat. Diese kann unter milden Bedingungen und hohen Ausbeuten mit Lithiumborhydrid in einem Lösungsmittelgemisch aus THF/Methanol (4:1) zum primären Alkohol **56** reduziert werden.

Eine solche Reaktionssequenz ist auch auf natürlich Nucleoside übertragbar, bedarf allerdings aufgrund der zusätzlichen funktionellen Gruppen an der Nucleobase weiterer Schutzgruppen und ist daher weit weniger trivial.^[136]

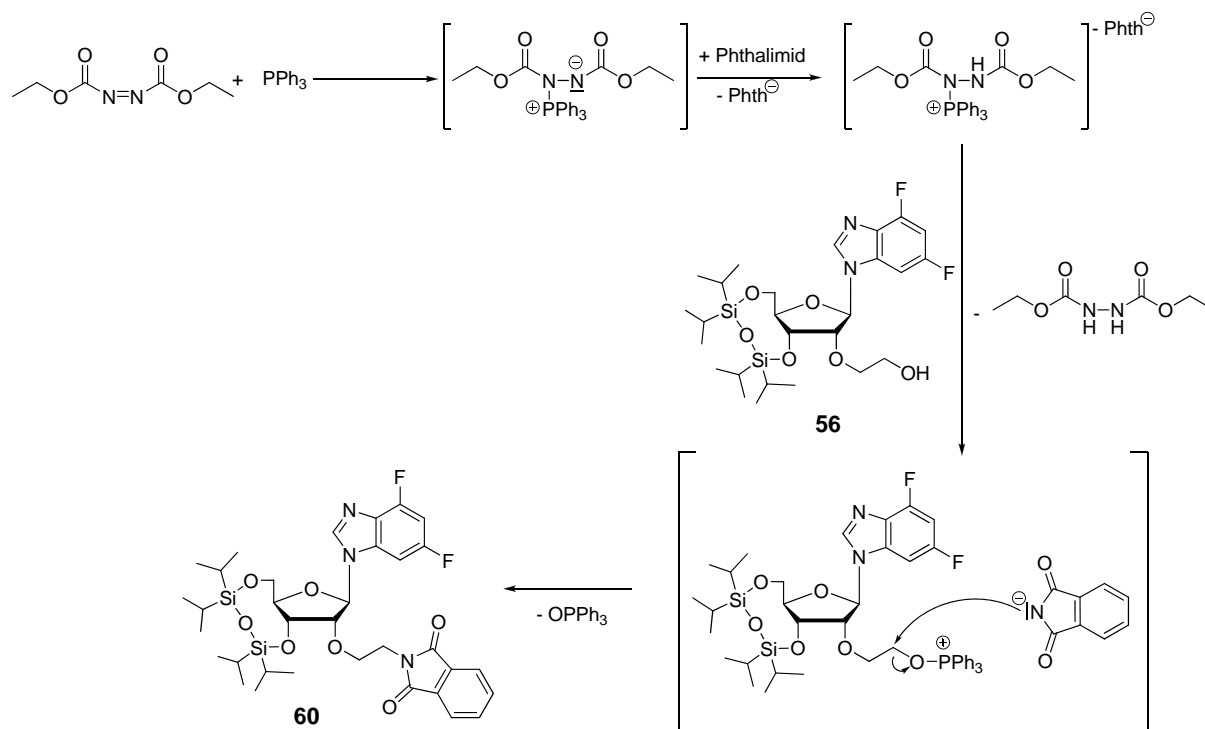
Um ausgehend vom 2'-β-Hydroxyethyl-Nucleosid **56** zum gewünschten 2'-O-β-Aminoethyl-Baustein **59** zu gelangen, ist eine weitere Substitutionsreaktion vonnöten. Nachdem bis vor einigen Jahren noch ein recht aufwändiger Syntheseweg vom 2'-O-β-(Paratoluolsulfonsäure)ethyl-Nucleosid **57** über das entsprechende 2'-β-Azidoethyl-Nucleosid **58** und schließlich eine katalytische Hydrierung der Azidfunktion zum primären Amin **59** als Methode der Wahl bestand, konnte durch die Umsetzung im Sinne einer Mitsunobu-Reaktion^[137] das Intermediat **56** in ein Phthalimid-geschütztes Amin **60** überführen; auf diese Weise wurde auch zusätzlich direkt eine für die weiteren Synthesen notwendige Schutzgruppe für die Aminofunktion eingeführt.^[90] Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde der 2'-O-Aminoethyl-Baustein **60** nach letztgenannter Methode durch Umsetzung von **56** mit Phthalimid hergestellt.



Schema 14: Synthese von 4,6-Difluorbenzimidazol-2'-O-aminoethyl-Nucleosiden. Reagenzien Route 1): a) TsCl, DMAP, NEt_3 ; b) NaN_3 , DMF; c) PdC, H_2 ; Reagenzien Route 2): i) Phthalimid, PPh_3 , DEAD.

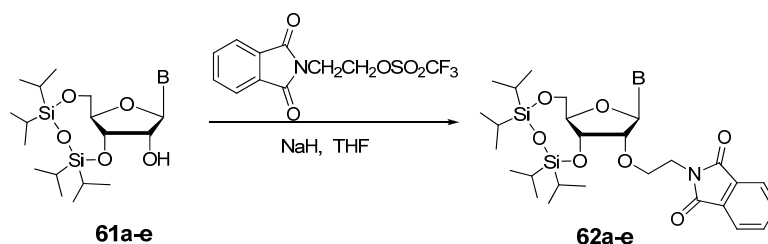
Wie aus Schema 14 ersichtlich ist, bietet die Reaktionsroute 2) eine Verkürzung des Syntheseweges hin zum geschützten 2'-O-Aminoethyl Derivat **60** um drei Reaktionsschritte. Dabei ist die Ausbeute an 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(β -phthalimidoethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **60** mit bis zu 87 % durch die längere Route 1) sicherlich nicht zu übertreffen. Allerdings zeigte sich, dass die Phthalimidschutzgruppe, die nach erfolgreicher Oligonucleotid-Festphasensynthese unter basischen Bedingungen labil ist, nach Standardprotokoll (NH_3/EtOH , 40°C , 24 h) nicht quantitativ abzuspalten ist. Letztlich musste das Aufarbeitungsprotokoll zur Entschützung der RNA-Oligonucleotide in sofern geändert werden, als dass man das CPG-gebundene Oligomer für mindestens 48 h in Ammoniak/Methanol bei 40°C inkubieren muss.^[138]

Im nachfolgenden Schema 15 ist der Mechanismus der Mitsunobu-Reaktion von Verbindung **56** mit Phthalimid dargestellt.



Schema 15: Vorschlag zum Mechanismus der Reaktion von 3',5'-*O*-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-*O*-(β -hydroxyethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **56** mit Phthalimid unter Mitsunobu-Bedingungen.

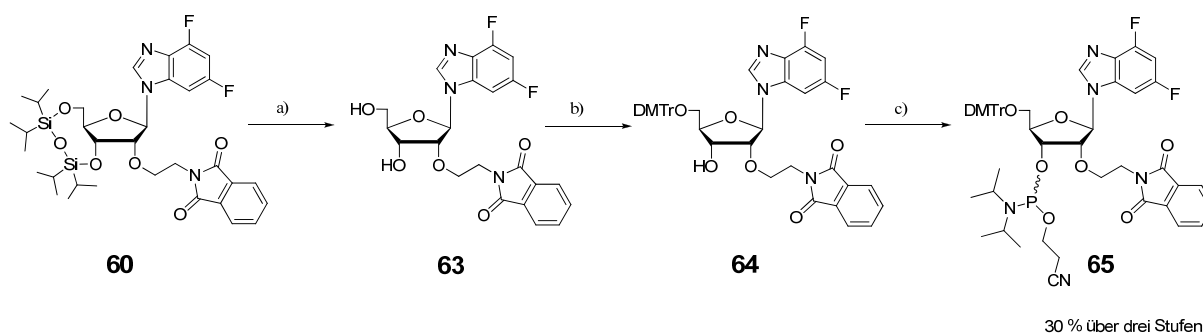
Smicius und Engels konnten für alle vier natürlichen Nucleoside – Adenosin, Guanosen, Cytidin und Uridin – einen neuen Zugang zur 2'-*O*-Aminoethyl-Modifizierung entwickeln.^[138] Im Mittelpunkt steht hierbei eine direkte Alkylierung eines 3',5'-Markiewiczgeschützten Nucleosidbausteins **61**, der auch an der Nucleobase mit ausgewählten Schutzgruppen blockiert ist. Die Alkylierung dieser Verbindungen erfolgt erneut unter Deprotonierung mit Natriumhydrid in absolutem THF als Lösungsmittel. Als Alkylierungsreagenz wird Phthalimidoethyltriflat eingesetzt. Unter diesen Bedingungen ließen sich die entsprechenden 2'-*O*-Phthalimidoethyl-Derivate in Ausbeuten zwischen 18 % (für N^6, N^6 -dibenzoylgeschütztes Adenosin) und 65 % (für Uridin) herstellen.



Schema 16: Direkte Alkylierung der Nucleoside-Baustein **60 a-e** mit Phthalimidoethyltriflat.

Im Rahmen dieser Arbeit fand diese Methode allerdings keine Anwendung; 3',5'-*O*-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-*O*-(β -phthalimidoethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **60** wurde ausschließlich nach o.g. Methode unter Mitsunobu-Bedingungen hergestellt.

60 wurde über drei Stufen mit einer Gesamtausbeute von 30 % in das entsprechende 3'-*O*-Phosphoramidit **64** überführt.



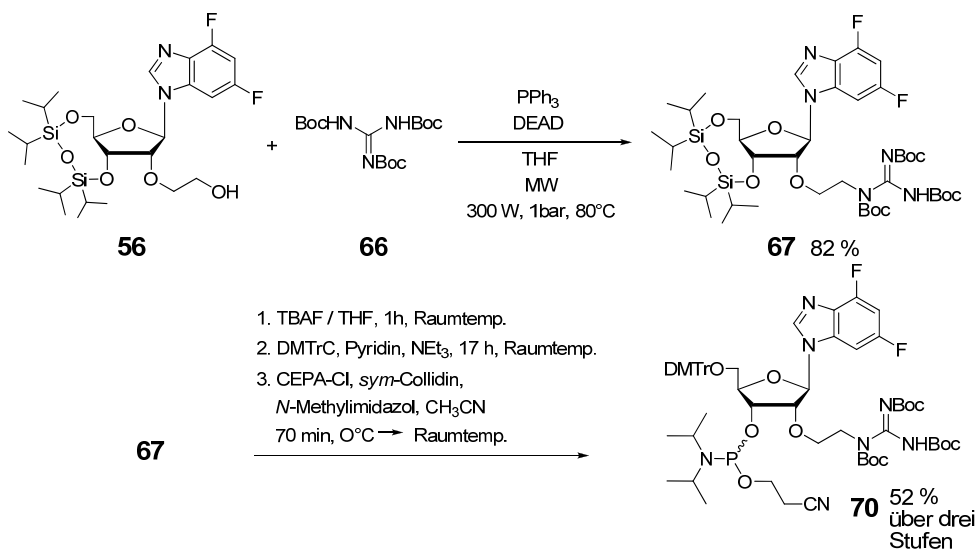
Schema 17: Synthese von 3'-*O*-(2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylamin)phosphin-5'-*O*-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-2'-*O*-(β -phthalimidoethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **65** ausgehend von Verbindung **60**. Reagenzien: a) TBAF in THF, 40 min.; b) DMTrCl, Pyridin, NEt₃, 17 h; c) 2-Cyanoethyl diisopropylchlorophosphoramidit, *sym*-Collidin, *N*-Methylimidazol, CH₃CN, 45 min, 0°C.

Zunächst erfolgt die Abspaltung die 3',5'-Markiewicz-Schutzgruppe mit TBAF in THF, anschließend wird die 5'-Hydroxyfunktion selektiv mit 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid blockiert (vgl. Kap. 3.1.3.1). Schließlich erhält man das gewünschte Phosphoramidit **65** durch Umsetzung von **64** mit 2-Cyanoethyl diisopropylchlorophosphoramidit **44** (vgl. 3.1.3.2). Dieser Baustein wurde zur automatisierten Oligonucleotidsynthese am Synthesizer eingesetzt (vgl. Kap. 3.2).

Zugang zur 2'-O-Guanidiniummethyl Modifikation

Im Kontext der Suche nach kationischen 2'-O-Modifikationen für den Einsatz zur siRNA-Synthese präsentierte Prakash *et al.* 2004 den Zugang zu 2'-O-[2-(Guanidinium)ethyl]-modifizierten Oligonucleotiden.^[66] Da die Guanidinium-Gruppe einen pK_s -Wert von 12.5 besitzt, liegt sie über einen weiten pH-Bereich protoniert vor. Odadzic *et al.* konnte speziell für Adenosin einen optimierten Syntheseweg zur 2'-O-[2-(Guanidinium)ethyl]-Modifikation aufzeigen, bei dem – wie im vorherigen Kapitel gezeigt – das *N,N',N''*-(Tri-*tert*-butyloxycarbonyl)guanidin unter Mitsunobu-Bedingungen an eine 2'-O- β -Hydroxyethyl – Funktion geknüpft wurde.^[136]

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf analoge Art und Weise auch die 3',5'-*O*-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-*O*-(β -*N,N',N''*-(tri-*tert*-butyloxycarbonyl)guanidinoethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **67** hergestellt und schließlich über drei weitere Stufen in das entsprechende Phosphoramidit **70** überführt (Schema 18).



Schema 18: Synthese des 2'-O-2-[tri(Boc)-guanidinium]-ethyl-modifizierten Bausteins **67** unter Mitsunobu-Bedingungen und weitere Synthese zum analogen 3'-O-Phosphoramidit **70**

Auch bei dieser Umsetzung unter Mitsunobu-Bedingungen wurde mit Mikrowellenunterstützung gearbeitet (s.o.), wobei das Produkt **67** in sehr guter Ausbeute von 83 % erhalten wurde. Die Abspaltung der Markiewicz-Schutzgruppe, die nachfolgende DMTr-Blockierung der 5'-OH-Funktion sowie abschließend die 3'-O-Phosphitylierung erfolgten in

einer Gesamtausbeute von 52 % und führten zum Amidit **70**, welches sich als monomerer Baustein für den Einsatz in der Festphasen-Oligonucleotidsynthese eignet.

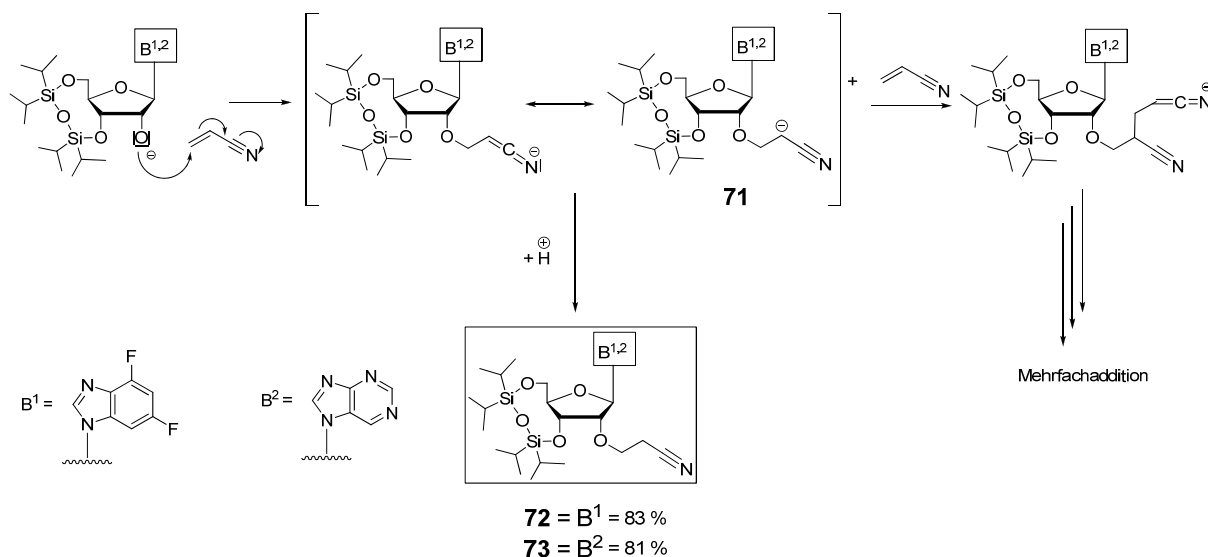
3.1.4.3 Einführung einer 2'-O-Cyanoethyl Modifikation via Michael-Addition

Wie in Kap. 3.1.4.2 diskutiert, findet die Einführung von 2'-O-Modifikation in Nucleosiden in der Regel unter harschen Bedingungen statt; zumeist ist der Einsatz von starken Basen vonnöten und nicht selten werden toxische Alkylierungsreagenzien verwendet.

Eine interessante Alternative boten 2005 Saneyoshi *et al.*, die von der Einführung einer 2'-O-Cyanoethylfunktion in alle vier natürlichen RNA-Nucleoside berichteten.^[71] Eine solcher 2'-Substituent besitzt aufgrund seiner Sterik Ähnlichkeit zur bereits erwähnten 2'-O-Aminoethyl Funktion. Durch ihre Polarisierbarkeit kann die Nitrilfunktion ausserdem auch einen Beitrag zur Duplexstabilisierung leisten und – vielmehr noch – hinsichtlich der Stabilität von RNA-Oligonucleotiden gegen den enzymatischen Abbau durch Nucleasen bietet sie ebenfalls vielversprechende Ansätze.

Der synthetische Zugang zur 2'-O-Cyanoethyl Funktion liegt in der Addition von Acrylnitril an die deprotonierte 2'-Hydroxyfunktion gemäß einer Michael-Addition. Die Schwierigkeit dieses synthetischen Ansatzes liegt einerseits in der Selektivität zur 2'-OH Gruppe, andererseits in der Unterdrückung einer möglichen Mehrfachaddition des Elektrophils Acrylnitril. Da Michael-Additionen von Alkoholen mit Acrylnitril normalerweise starker Basen zur Aktivierung der Alkoholfunktion bedürfen,^[139] war die Suche nach alternativen Methoden zur Deprotonierung der 2'-OH Funktion von Nucleosiden unumgänglich. Saneyoshi *et al.* setzten schließlich nach umfangreichen Testsynthesen Caesiumcarbonat als Base ein, die, bei Umsetzung mit 20fachem Überschuß an Acrylnitril, das gewünschte Produkt lieferte. Allerdings erhielt man noch immer ein Gemisch aus einfach- und mehrfach addiertem Produkt, was sich mechanistisch durch das intermediär auftretende Carbanion in α -Position zur Cyanogruppe erklären ließ (s. Schema 19). Dieses kann als Ausgangspunkt für einen weiteren Additionsschritt mit dem im Überschuß vorliegenden Acrylnitril dienen und somit zu unerwünschten verzweigten Nebenprodukten bis hin zu Polymeren führen. Um dieses Problem zu bewältigen, setzten Saneyoshi *et al.* *tert*-Butanol als Lösungsmittel ein. *tert*-Butanol ist mit seinem pK_s -Wert von etwa 18 gerade noch sauer genug, um als Protonenlieferant für das intermediäre Carbanion zu dienen. Darüberhinaus ist das entstehende *tert*-Butyl-Anion nicht ausreichend nucleophil, um den Reaktionsablauf zu

stören. Auf diese Weise konnten Saneyoshi *et al.* geschütztes Uridin in 95 %iger Ausbeute selektiv zum 2'-O-Cyanoethyl Derivat umsetzen. Nach dieser Vorschrift wurden daher auch 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **54** bzw. das analoge 7N-Purin Derivat **55** einer Michael-Addition mit Acrylnitril unterworfen.



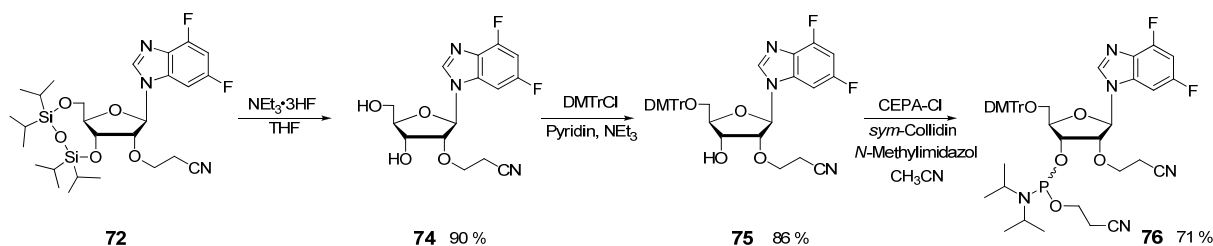
Schema 19: Mechanismus der Michael-Addition von Acrylnitril an die deprotonierte 2'-Hydroxyfunktion

Wie aus Schema 19 ersichtlich ist, fungiert Acrylnitril als Michael-Akzeptor beim Angriff des Alkoholats. Intermediär wird, wie bereits erwähnt, ein Carbanion gebildet, das durch ein Proton (in diesem Fall aus dem Lösungsmittel *tert*-Butanol herrührend) abgefangen wird, wodurch letztlich das 2'-cyanoethylierte Produkt entsteht. Als mögliche Nebenreaktion ist die Mehrfachaddition von Acrylnitril dargestellt. Auf diese Weise konnten die 2'-O-cyanoethylierten Produkte **72** bzw. **73** in Ausbeuten von 83 % bzw. 81 % isoliert werden.² Zusätzlich sei noch zu bemerken, dass bei den im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten 2'-O-Modifikationen auf weitere Schutzgruppen an der Nucleobase verzichtet werden konnte, da sowohl das 4,6-Difluorbenzimidazol **32** als auch das 7N-Purin **33** nicht über reaktive funktionelle Gruppen verfügen.

² Anmerkung: Die Ausbeuten der Michael-Addition hängen wesentlich von der Beschaffenheit des eingesetzten Acrylnitrils ab. So konnten die erzielten Ausbeuten nur beim Einsatz von frisch destilliertem Acrylnitril erreicht werden.

Synthese von 3'-(2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylamin)phosphin)-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytri-phenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)-2'-*O*-(β -cyanoethyl)- β -D-ribofuranose **76**

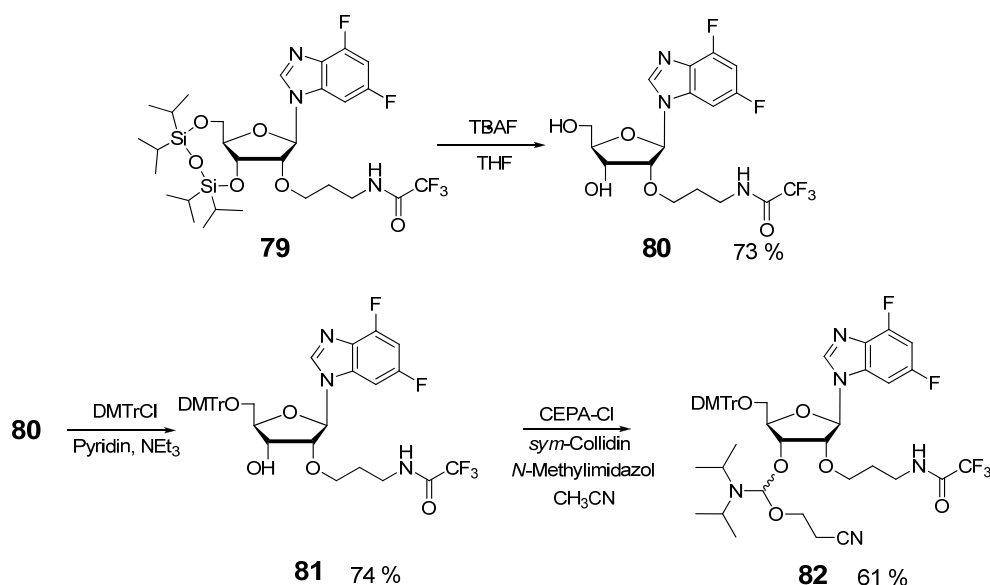
Ausgehend vom 2'-*O*-cyanoethylierten Nucleosidbaustein **72** ließ sich durch eine dreistufige Synthese das entsprechende 3'-Phosphoramidit **76** herstellen. Hierbei findet allerdings, wie bereits in 3.1.4.1 angedeutet, die Abspaltung der Markiewicz-Schutzgruppe nicht unter Standardbedingungen, d.h. mit Tetrabutylammoniumfluorid in THF, sondern mit einer Lösung aus Triethylamin Trihydrofluorid ($\text{NEt}_3 \cdot 3\text{HF}$) in THF statt.^[71] Dieses Reagenz reagiert – im Gegensatz zu TBAF – nicht basisch und kann daher keine β -Eliminierung des 2'-*O*-Cyanoethyl-Rests einleiten. 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)-2'-*O*-(β -cyanoethyl)- β -D-ribofuranose **74** wird anschließend an der 5'-Position mit der DMTr-Schutzgruppe blockiert und schließlich gemäß der in Kap. 3.1.3.2 vorgestellten Prozedur zum Phosphoramidit umgesetzt.



Schema 20: Synthese des 2'-*O*-cyanoethylmodifizierten Phosphoramidits **76** aus **72** in drei Stufen

Das Phosphoramidit **76** wurde ebenfalls für die Oligonucleotidsynthese am RNA-Synthesizer herangezogen. Im Zuge der Aufarbeitung des RNA-Oligomers bleibt die 2'-*O*-Cyanoethyl Modifikation im Gegensatz zur ebenfalls basenlabilen β -cyanoethyl-Schutzgruppe am Phosphoratom erhalten. Die Modifikation ist sowohl gegen die Behandlung mit Ammoniak/Ethanol (3:1), als auch gegen $\text{NEt}_3 \cdot 3\text{HF}$, welches zur Entfernung der übrigen 2'-Silylschutzgruppen verwendet wird, inert.^[126]

Da die Trifluoracetylenschutzgruppe unter den Standardbedingungen zur Synthese eines 3'-Phosphoramidits inert ist, konnte der gewünschte Baustein **82** gemäß oben beschriebener Syntheseroute hergestellt werden. Hierfür erfolgte nach Entfernen der 3',5'-Markiewicz-Schutzgruppe mit TBAF in THF die Einführung der DMTr-Schutzgruppe an der 5'-Hydroxyfunktion und schließlich die Phosphitylierungsreaktion mit 2-Cyanoethyl-diisopropylchlorphosphoramidit **43** (Schema 23).



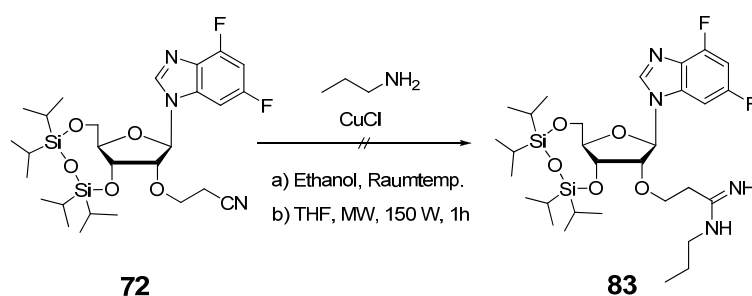
Schema 23: Synthese von 3'-O-(2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylamin)phosphin-5'-O-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)-2'-O-(γ -*N*-trifluoroacetamidopropyl)- β -D-ribofuranose **82** ausgehend von Verbindung **79**

Das 2'-O-Aminopropyl-Phosphoramidit **82** wurde ebenfalls mittels automatisierter Oligonucleotidsynthese in RNA-Oligomere eingebaut (s. Kap. 3.2).

3.1.4.5 Versuch der Synthese 2'-O-verzweigter Modifikationen

Da wie bereits in Kap. 2 erwähnt ein wesentlicher Aspekt dieser Doktorarbeit in der Herstellung neuartiger, kationischer 2'-O-Modifikationen zur möglichen Verbesserung der Zellaufnahme von RNA-Oligonucleotiden (siRNAs) bestand, sollte nun ausgehend vom bereits bestehenden Zugang zur 2'-O-Cyanoethyl-Modifikation (vgl. 3.1.4.3) weitere Synthesewege zur Herstellung ebenjener Modifizierungen erprobt und optimiert werden. Daher wurde ausgehend von 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisloxan-1,3-diyl)-2'-O-(β -

cyanoethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **72** versucht, Verzweigungen mit kationischem Charakter an die bereits bestehende 2'-O-Modifikation zu knüpfen. Ein erster Ansatz bestand in der Addition von *n*-Propylamin an die Nitrilfunktion der 2'-O-Cyanoethyl Modifikation unter Kupfer(I)chlorid Katalyse.^[142] Auf diese Weise sollte sich die Nitrilfunktion von **72** in eine Amidin-Funktion **83** umwandeln lassen, wobei sich durch das delokalisierte System die Möglichkeit der Protonierung unter physiologischen Bedingungen ergeben könnte.



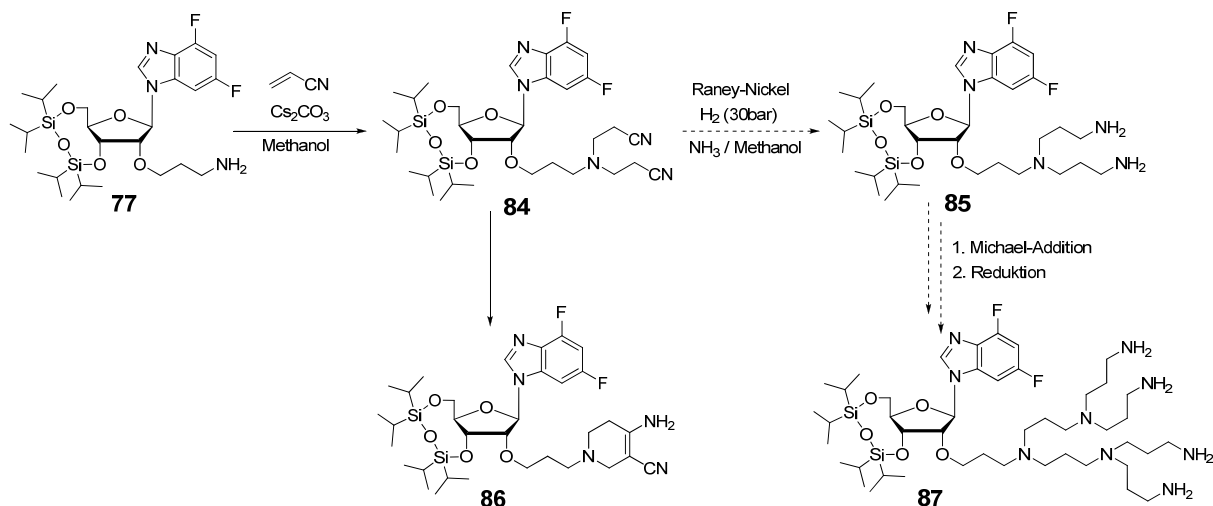
Schema 24: Versuch der Umsetzung von **72** mit *n*-Propylamin zu Verbindung **83**

Um zur gewünschten Amidin-Zielverbindung **83** zu gelangen, wurden verschiedene Bedingungen getestet. Während z.B. beim Rühren unter Raumtemperatur in absolutem Ethanol als Lösungsmittel keine Reaktion stattfand, konnte beim mikrowellenunterstützten Ansatz mit THF als Lösungsmittel Produktbildung via ESI-MS-Kontrolle im rohen Reaktionsansatz beobachtet werden; allerdings ließ sich das gewünschte Produkt **83** nicht isolieren. Letztlich wurde dieser Syntheseweg nicht weiter verfolgt.

In einem weiteren Ansatz wurde versucht, aus 3',5'-*O*-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-*O*-(γ -aminopropyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **77** durch eine weitere Michael-Addition mit Acrylnitril zum 2'-*O*-Propyl-N-(dicyanoethyl)-Derivat **84** zu gelangen. Dieses könnte nach erneuter Reduktion zum Di-*N*-propylamin-Derivat **85** als Ausgangspunkt für eine erneute Michael-Addition mit Acrylnitril sein und eine wiederholte Addition von Acrylnitril wäre möglich.

Durch solch eine Abfolge von Additions-Reduktions Zyklen ließe sich eine – je nach Anzahl der durchgeführten Zyklen – hochverzweigte, kationische Seitenketten-Modifizierung an der 2'-*O*-Funktion des Nucleosidbausteins einführen.^[143, 144] Da solche dendrimerischen Moleküle derzeit auch als mögliche Carrier-Systeme für den Transport von Nucleinsäuren in Zellen

bzw. Zellgeweben getestet werden (vgl. Kap. 1.2.1), wäre solch eine kovalent an ein Oligonucleotid gebundene Seitenkettenmodifikation von großem präparativen Interesse.^[42]



Schema 25 : Michael-Additions-Reduktions -Kaskadenzyklus zur Synthese hochverzweigter 2'-O-Modifikationen

Wie auch Schema 25 ersichtlich ist, traten bei dieser Syntheseroute schon recht früh Schwierigkeiten auf: Obwohl schon im ersten Schritt bei der Michael-Addition von Acrylnitril an **77** in protischerem Lösungsmittel (Methanol, $pK_s = 15.5$) gearbeitet wurde, war eine spontane Zyklisierung des Produkts **84** zum Nebenprodukt **86** in hohem Maße zu beobachten. Ausserdem traten in diesem Reaktionsschritt neben dem zweifach addierten auch nur einfach addiertes Produkt auf, was sich chromatographisch nur schwer abtrennen ließ. Trotz einiger Versuche, diese Syntheseroute so zu verbessern, dass zumindest das Di-N-propylamin-Derivat **85** in befriedigendem Maße erhalten werden konnte, zeigten sich die genannten Schwierigkeiten als zu massiv, weshalb auch von diesem Ansatz Abstand genommen wurde.

3.1.4.6 Kupplung von Carbonsäurederivaten an den 2'-O-Aminopropyllinker unter Peptidkupplungsbedingungen

Eine einfache Möglichkeit, weitere Modifizierungsmotive an den 2'-O-Aminopropyllinker von 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(γ -aminopropyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **77** zu knüpfen, bietet die Kupplungs-

reaktion von Carbonsäurederivaten an das primäre Amin unter Ausbildung einer Amidbindung. Da in Verbindung **77** lediglich die γ -Amino-Gruppe am 2'-Linker als reaktive funktionelle Gruppe zur Verfügung steht, sollte eine Umsetzung mit einer aktivierten Carboxylgruppe, wie sie in der Peptidsynthese eingesetzt wird, selektiv möglich sein.

In Abbildung 17 sind einige der gebräuchlichsten Kupplungsreagenzien zum Aufbau der Amidbindung dargestellt.^[145]

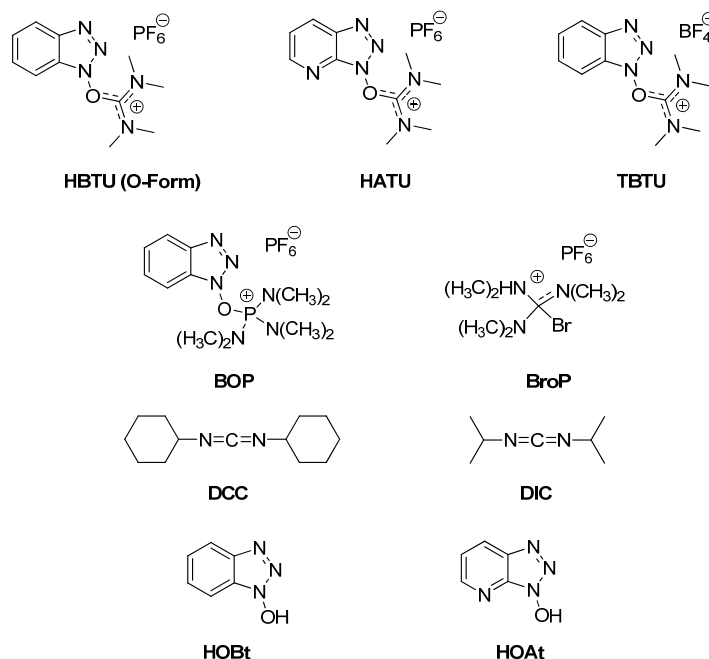
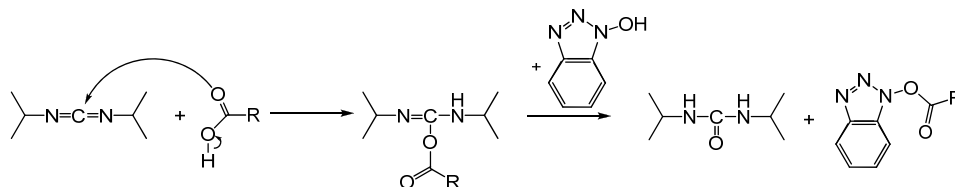


Abbildung 17: Strukturen einiger üblicher Kupplungsreagenzien

Durch den Einsatz dieser Kupplungsreagenzien wird einerseits die Carboxylgruppe in eine weitaus reaktivere Spezies überführt (s. Schema 26) andererseits verhindern diese Reagenzien das unerwünschte Racemisieren der Kupplungskomponenten und unterdrücken zudem Nebenreaktionen.

Zur Kupplung eines Carbonsäurederivates an die 2'-O-Aminopropyl-Funktion wurde mit Diisopropylcarbodiimid (DIC) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT)^[146] als Kupplungsreagenzien gearbeitet,^[147] bei der in Kap. 3.1.5 diskutierten Festphasenkupplung an Oligonucleotiden fand auch das Uroniumsalz *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU)^[148] gemeinsam mit 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) Anwendung.

Aus nachfolgendem Schema lässt sich der Mechanismus der Carboxyl-Aktivierung mit DIC / HOBT entnehmen.



Schema 26: Mechanismus zur Aktivierung einer Carbonsäure mit DIC und HOBT

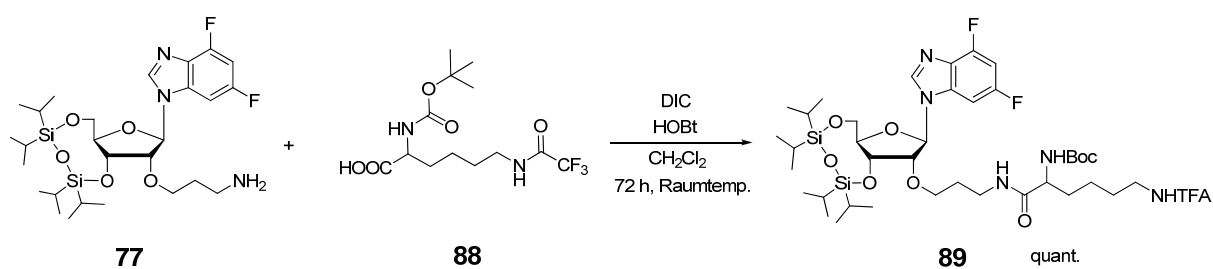
Hierbei erfolgt zunächst der Angriff der Carboxylgruppe an das Carbodiimid. Im zweiten Schritt reagiert das Intermediat mit HOBT schließlich zu einem Aktivester. Die zusätzliche Entstehung eines Harnstoffderivates stellt die treibende Kraft der Aktivierungsreaktion dar. Unter Zuhilfenahme dieser in der Peptidkupplungschemie gebräuchlichen Methode zur Knüpfung von Amidbindungen, wurden verschiedene Carbonsäurederivate an die Aminofunktion von 3',5'-*O*-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-*O*-(γ -aminopropyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **77** gekuppelt.

Kupplung von *N* _{α} -*tert*-Butyloxycarbonyl-*N* _{ϵ} -trifluoracetyl-L-lysin

Aufgrund seiner basischen, protonierbaren Aminoseitenkette sowie der Tatsache, dass es sich um eine in Organismen ubiquitär vorhandene, proteinogene Aminosäure handelt, kommt Lysin als mögliche Kupplungskomponente sehr gut in Frage. Freilich müssen hier sowohl die α - als auch die Seitenkettenaminofunktion durch Schutzgruppen vor möglichen Nebenreaktionen, wie z.B. einer Homokupplung, maskiert werden. Da *N* _{α} -*tert*-Butyloxycarbonyl-*N* _{ϵ} -trifluoracetyl-L-lysin durch die Fa. Fluka kommerziell erhältlich ist, wurde dieses geschützte Lysin-Derivat zum Zwecke der Kupplung an die Aminofunktion von 3',5'-*O*-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-*O*-(γ -aminopropyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **77** eingesetzt. Die durch die *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)^[149] Schutzgruppe blockierte α -Aminofunktion sollte im Verlauf der Synthese

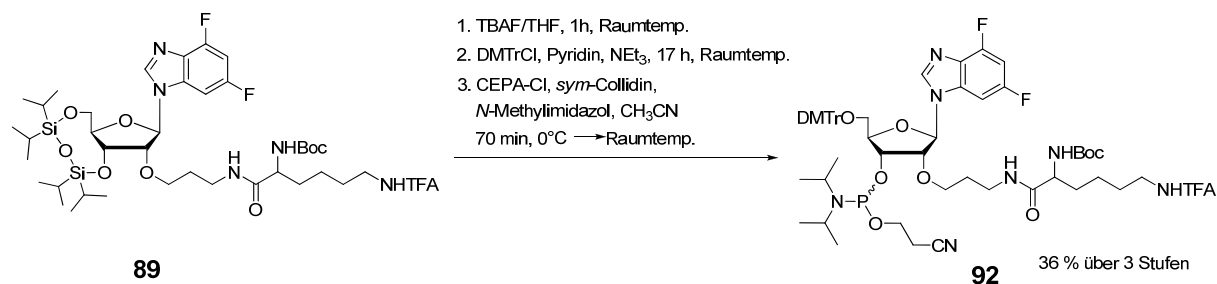
zum Phosphoramidit **92** geschützt bleiben, in Folge der sauren Behandlung im Rahmen der DMTr-Abspaltung während der automatisierten Oligonucleotidsynthese wird dann jedoch die säurelabile Boc-Schutzgruppe entfernt und das freie α -Amin liegt wieder vor (vgl. 3.1.5).

Die Trifluoracetylschutzgruppe, die die Seitenkettenaminofunktion maskiert, wird, wie bereits in Kap. 3.1.4.4 erwähnt, im Zuge der basischen Aufarbeitung des Oligonucleotids abgespalten.



Schema 27: Kupplung von N_{α} -*tert*-butyloxycarbonyl- N_{ϵ} -trifluoracetyllysin **88** an Nucleosidbaustein **77** unter Peptidkupplungsbedingungen

Die Kupplungsreaktion von **77** mit N_{α} -*tert*-Butyloxycarbonyl- N_{ϵ} -trifluoracetyllysin **88** erfolgt unter Peptidkupplungsbedingungen mithilfe der Kupplungsreagenzien DIC und HOBT in absolutem Dichlormethan. Alle Komponenten wurden äquimolar eingesetzt. Nach 72 h Rühren bei Raumtemperatur sind die Edukte abreagiert und man erhält das Kupplungsprodukt **89** in quantitativer Ausbeute. Da es bereits in hoher Reinheit vorliegt, konnte auf eine Säulenchromatographie verzichtet werden und das Rohprodukt wurde direkt in der nächsten Stufe eingesetzt. Aus dem Kupplungsprodukt 3',5'-*O*-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-*O*-(γ - N -(N_{α} -*tert*-butyloxycarbonyl- N_{ϵ} -trifluoracetyllysinamidopropyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1- N -benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **89** konnte nach einer drei Stufen umfassenden Synthese das entsprechende 3'-*O*-Phosphoramidit **92** in einer Gesamtausbeute von 36 % erhalten werden (Schema 28).



Schema 28: Synthese von 3'-O-(2-Cyanethoxy-N,N-diisopropylamin)phosphin-5'-O-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-2'-O-(γ-N-(N_α-tert-butylloxycarbonyl-N_ε-trifluoracetyllysynamidopropyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose **92** aus **89** in drei Stufen

Dabei konnte auf die bereits in Kap. 3.1.3.2 beschriebenen Synthesemethoden zurückgegriffen werden. 3'-O-(2-Cyanethoxy-N,N-diisopropylamin)phosphin-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-(γ-N-(N_α-tert-butylloxycarbonyl-N_ε-trifluoracetyl-L-lysynamidopropyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose **92** konnte somit auch als kupplungsfähiger Baustein zur RNA-Oligonucleotidsynthese herangezogen werden (s. Kap. 3.2).

Kupplung von 5-Carboxyspermin

Nachdem durch die Kupplung eines geschützten Lysin-Derivats bereits ein zusätzlicher Gewinn an kationischem Charakter der 2'-O-Modifikation des universellen Nucleosidbausteins **23** erzielt werden konnte, galt die Suche nach weiteren potentiellen Kupplungskomponenten zur Steigerung der positiven Ladung an der Seitenkettenmodifikation.

Als vielversprechendes Molekül kam das durch die Fa. Polyplus-transfection/Frankreich³ zur Verfügung gestellte 5-Carboxyspermin^[150] in Betracht. Hierbei handelt es sich um ein durch eine Carboxylgruppe derivatisiertes Spermin-Analogon. Spermin ist ein natürlich vorkommendes Polyamin, welches aufgrund seiner polykationischen Eigenschaften stabilisierend auf Nucleinsäuren wirkt.^[151-153] So konnte es beispielsweise bereits in Ribosomen, tRNA sowie in Viren nachgewiesen werden, wo es wahrscheinlich die DNA bzw. RNA stabilisiert.^[154] Seit einiger Zeit werden bereits Spermin bzw. Poly-

³ Polyplus-transfection SA, Boulevard Sébastien Brant, BP 90018, 67400 Illkirch, France

sperminkonjugate als mögliche Carrier-Moleküle für den Zellaufnahme-Transport von Nucleinsäuren verwendet.^[155, 156] Allerdings wird in diesen Ansätzen das entsprechende Spermin-Konjugat überwiegend an das 5'-Ende eines Oligonucleotidstrangs bzw. an das Phosphatrückgrat gebunden.^[157] Durch die zusätzliche Carboxylgruppe ist das 5-Carboxyspermin ein geeignetes Edukt zur Kupplung mit 3',5'-*O*-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-*O*-(γ -aminopropyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **77**. Von der Fa. Polyplus-transfection konnte direkt das komplett Boc-geschützte 5-Carboxyspermin **93** (s. Abbildung 18) bezogen werden. Es liegt als racemisches Gemisch beider möglicher Stereoisomere vor.

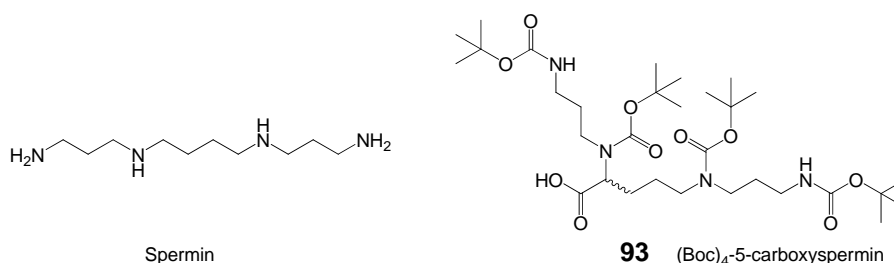
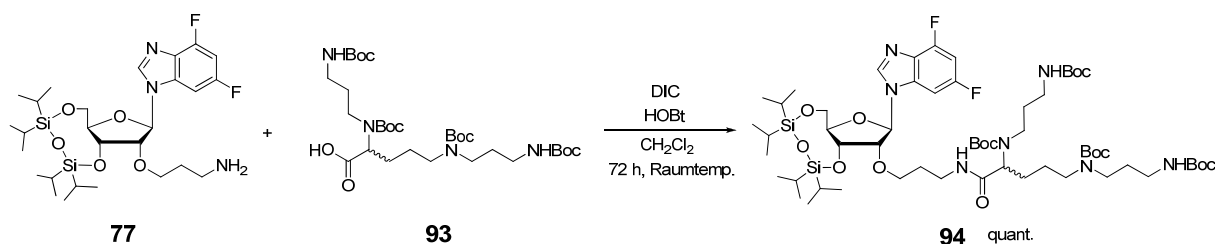


Abbildung 18: Strukturen von Spermin bzw. (Boc)₄-5-Carboxyspermin **93**

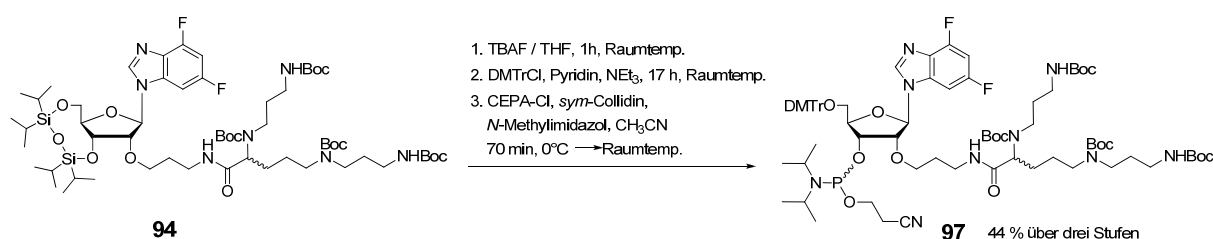
Der synthetische Zugang zum geschützten 5-Carboxyspermin **93** wurde von Behr entwickelt.^[150] Ausgehend von der α -Aminosäure Ornithin wird mittels Michael-Addition mit Acrylnitril N_{α},N_{δ} -Bis(2-cyanoethyl)ornithin hergestellt, welches sich nach Raney-Nickel-katalysierter Hydrierung zum N_{α},N_{δ} -Bis(3-aminopropyl)ornithin umsetzen läßt; dies entspricht bereits dem 5-Carboxyspermin. Nachfolgend werden alle primären und sekundären Aminofunktionen durch die Boc-Schutzgruppe maskiert, wodurch man das N_{α},N_{δ} -Bis(*tert*-butyl-carbamoyl)- N_{α},N_{δ} -bis(3-[*tert*-butyl-carbamoylamino]propyl)ornithin, also (Boc)₄-5-Carboxyspermin **93**, erhält. Da dieses Reagenz durch die Fa. Polyplus-transfection in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt wurde, wurde eine Synthese von **93** im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht durchgeführt.

Die Kupplung mit **77** fand abermals unter den in Kap. 3.1.4.6 vorgestellten Bedingungen statt.



Schema 29: Kupplung von (Boc)₄-5-Carboxyspermin **93** an Nucleosidbaustein **77** unter Peptidkuppelungsbedingungen

Auch bei dieser Kupplungsreaktion konnte das Produkt **94** in hoher Reinheit und quantitativer Ausbeute erhalten werden – es wurde daher ohne weitere Aufreinigung direkt in den nächsten Syntheseschritt eingesetzt. Dieser bestand wiederum aus der Abspaltung der Markiewicz-Schutzgruppe mit TBAF in THF. Anschließend wurde die 5'-DMTr-Schutzgruppe aufgezo-gen bevor im letzten Schritt die Umsetzung zum 3'-O-Phosphoramidit **97** erfolgte. Die komplette Synthesekaskade ist in Schema 30 abgebildet.



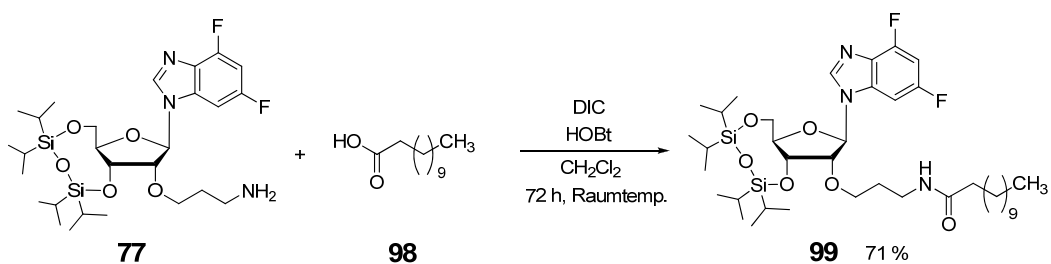
Schema 30: Synthese von 3'-O-(2-Cyanoethoxy-N,N-diisopropylamin)phosphin-5'-O-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-2'-O-(γ-N-(N_α,N_δ-bis(tert-butyl-carbamoyl)-N_α,N_δ-bis(3-[tert-butylcarbamoylamino]propyl)ornithin)propylamid)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose **97** aus **94** in drei Stufen

Auch dieses Phosphoramidit wurde am Oligonucleotid-Synthesizer in RNA-Oligomere eingebaut (s. Kap. 3.2). Wie bereits erwähnt, werden sämtliche Boc-Schutzgruppe im Laufe der automatisierten Oligonucleotidsynthese durch die Behandlung mit Trichloressigsäure (TCA) sauer abgespalten, wodurch man ein kationisch modifiziertes Oligomer enthält.

Kupplung von Laurinsäure

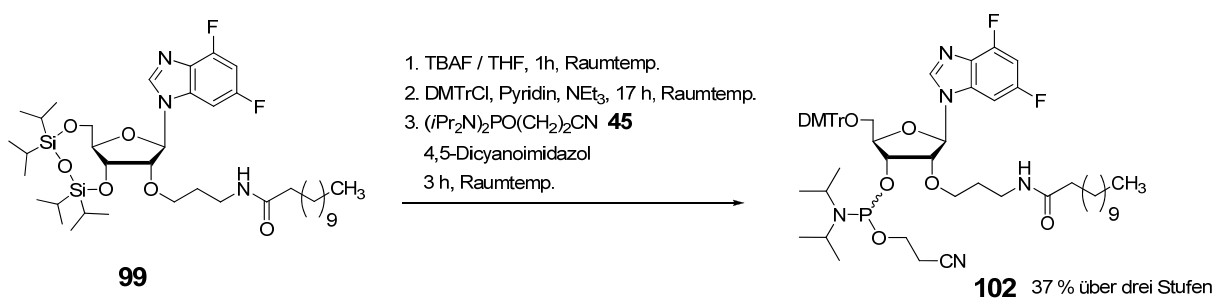
Um im Kontrast zum polykationischen Spermin-Derivat **94** ein ungeladenes, aber sterisch ähnlich anspruchsvolles Molekül an den 2'-O-Aminopropyl-Linker von **77** zu koppeln, wurde die Fettsäure Laurinsäure (Dodecansäure) **98** als Kupplungskomponente gewählt.

Da es sich um eine gesättigte Fettsäure ohne weitere funktionellen Gruppen handelt, waren hierbei weitere Schutzgruppen nicht notwendig. Die Laurinsäure konnte daher unter den bekannten Bedingungen (s.o.) an das primäre Amin gekuppelt werden.



Schema 31: Kupplung von Laurinsäure **98** an den Nucleosidbaustein **77** unter Peptidkuppelungsbedingungen

Bei dieser Kupplungsreaktion musste das Rohprodukt nach der Aufarbeitung säulenchromatographisch aufgereinigt werden, da die Reinheit für ein direktes Einsetzen im folgenden Syntheseschritt nicht ausreichte. Wahrscheinlich fand die Kupplung hierbei nicht ganz vollständig statt, da noch freie Laurinsäure als Verunreinigung vorlag.



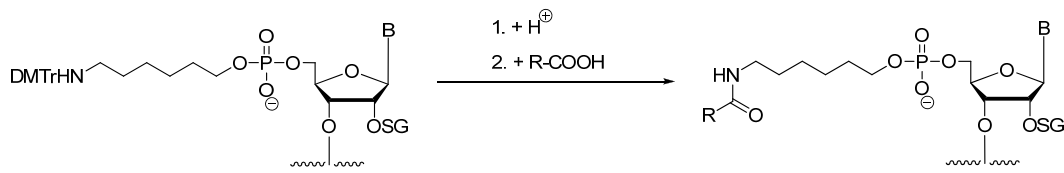
Schema 32: Synthese von 3'-O-(2-Cyanoethoxy-N,N-diisopropylamin)phosphin-5'-O-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-2'-O-(γ-N-(dodecanamidopropyl))-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose **102** aus **99** in drei Stufen

Nach dem Entfernen der 3′-,5′-Markiewicz Schutzgruppe mit TBAF in THF erfolgte die 5′-DMTr-Schützung und schließlich die Synthese zum 3′-O-Phosphoramidit **102**. Bei der Phosphitylierung wurde an dieser Stelle 2-Cyanoethyl-*N,N,N,N*′-tetraisopropylphosphoramidit **45** (s. Abbildung 16) als Phosphitylierungsreagenz eingesetzt, was eine deutliche Verlängerung der Reaktionszeit zur Folge hatte (vgl. Kap. 3.1.3.2). Schließlich konnte auch auf diese Weise das Amidit **102** mit zufriedenstellender Ausbeute von 63 % hergestellt werden und war für den weiteren Einsatz in der Oligonucleotidsynthese zugänglich. Die Gesamtausbeute der drei Synthesestufen ausgehend vom Kupplungsprodukt **99** lag bei 37 %.

3.1.5 Einführung von 2′-O-Modifikationen an der festen Phase

Der zweifelsohne eleganteste Weg, 2′-O-modifizierte Oligomere zu erhalten, liegt in der Modifizierung von Oligonucleotiden an der festen Phase.^[73, 158, 159] Dieser Ansatz bietet die Möglichkeit einer kombinatorischen Modifizierung von Oligonucleotiden mit geeigneten 2′-O-Seitenketten, die sich anschließend z.B. auf ihre thermodynamischen Eigenschaften hin analysieren lassen oder sich auch für den Einsatz in biologischen Systemen (siRNA-Synthese) anbieten.

Überwiegend finden Festphasenmodifikationen von Oligonucleotiden am 3′-, bzw. am 5′-Terminus des Oligonucleotidstrangs statt.^[73, 159, 160] Hierbei entstehen Bindungen zwischen einem Oligonucleotid und dem Konjugat z.B. durch die Ausbildung von Amidbindungen, Disulfidbrücken oder diverse Esterbrücken (Phosphorester, Thioester etc.).^[73] Sehr häufig, da vergleichsweise leicht zugänglich, ist die Konjugation an das 5′-Ende eines Oligonucleotids nach dessen Festphasensynthese; nach Abspaltung der 5′-DMTr-Schutzgruppe liegt eine aktivierbare Hydroxyfunktion vor. Außerdem lässt sich eine maskierte nucleophile oder elektrophile Gruppierung an das Oligonucleotid mittels standardisierter Phosphoramidit-Kupplungschemie knüpfen – so ist z.B. eine N-DMTr-6-aminohexyl-Derivatisierung denkbar. Hier liegt nach vollendeter Festphasenoligonucleotidsynthese eine freie Aminofunktion am 5′-Ende des Oligomers vor, an die weitere Konjugate unter Ausbildung einer Amidbindung geknüpft werden können (s. Schema 33).



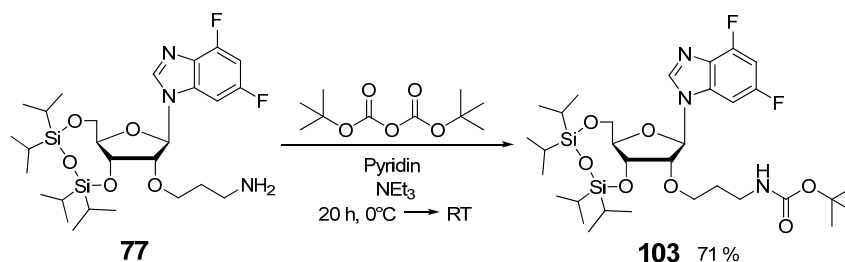
Schema 33: Möglichkeit zur Einführung einer 5'-Modifikation am Oligonucleotid mittels N-DMTr-6-aminohexyl-Derivatisierung. SG = Schutzgruppe

Um das 3'-Endes eines Oligomers postsynthetisch zu modifizieren, muss aufgrund der Tatsache, dass in der Regel die automatisierte Festphasensynthese vom 3'- zum 5'-Ende vollzogen wird, mit bereits modifiziertem Festphasenmaterial (solid-support) gearbeitet werden. Hierbei liegt z.B. das zur Synthese von Oligonucleotiden häufig eingesetzte CPG (controlled-pore-glass)-Material mit bereits modifizierten Seitenketten vor. So ist beispielsweise kommerziell erhältliches Aminoalkyl-modifiziertes CPG-Material für diese Zwecke einsetzbar, an welches sich entsprechende Konjugate kovalent anknüpfen lassen. Näheres hierzu wird in Kap. 3.1.6 erläutert.

Die kovalente Anbringung von Biokonjugaten, wie beispielsweise Peptide, an die 2'-O-Position der Ribose wird weitaus seltener durchgeführt, als am 3'- bzw. 5'-Ende eines Oligomers. Als möglicher Grund hierfür ist auf der einen Seite sicherlich der schwierigere Zugang zu aktivierbaren Strukturmotiven an der 2'-O-Funktion zu nennen; auf der anderen Seite bedarf es dann noch der richtigen Schutzgruppenstrategie und Kupplungsmethode im Laufe der Oligonucleotidsynthese. Im Falle der vorliegenden Arbeit wurde bereits ein einfacher Zugang zu 2'-O-Aminopropyl-modifizierten universellen Nucleosidbausteinen aufgezeigt. Eine weitere Überlegung war an dieser Stelle nun die Möglichkeit einer zusätzlichen, postsynthetischen Modifizierung dieses Nucleosidbausteins nach erfolgter Oligonucleotidsynthese. Als methodische Grundlage wurde die Boc-Schutzgruppenstrategie für diesen Nucleosidbaustein gewählt. Mit dieser Schutzgruppe sollte es möglich sein, einen geschützten 2'-O-Aminopropylbaustein in ein RNA-Oligomer einzubauen. Im Laufe der automatisierten Oligonucleotidsynthese würde das Amin wieder freigesetzt werden und stünde somit einer weiteren Kupplungsreaktion mit einem Carbonsäurederivat – ähnlich wie in Kap. 3.1.4.6 – zur Verfügung.

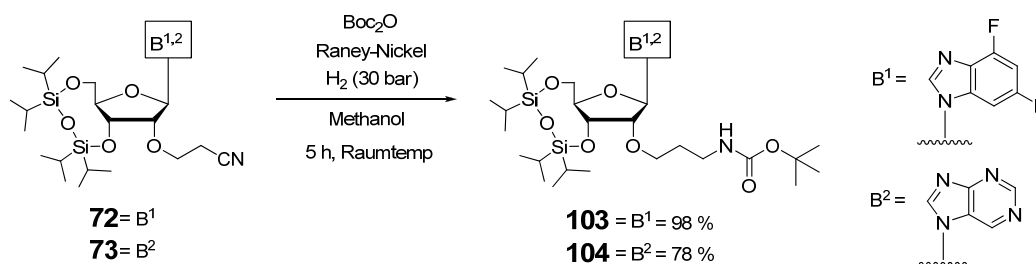
Zunächst wurde daher nach erfolgter Reduktion zum primären Amin die 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(γ -aminopropyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benz-

imidazolyl)- β -D-ribofuranose **77** einer Blockierung durch die Boc-Schutzgruppe unterworfen.^[149] Im ersten Ansatz erfolgte die Blockierung der 2'-O-Aminopropyl-Funktion von **77** durch Zugabe von Di-*tert*-Butyldicarbonat (Bocanhydrid) in absolutem Pyridin unter Zusatz von Triethylamin.



Schema 34: Umsetzung des freien Amins aus **77** mit Di-*tert*-Butyldicarbonat zu **103**

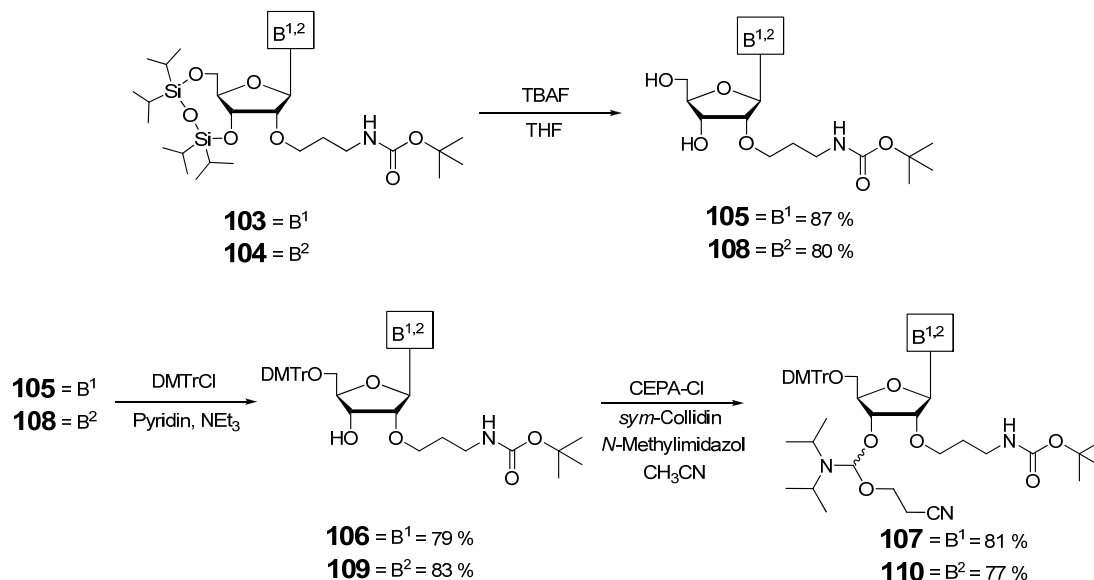
Die Einführung der Boc-Schutzgruppe gelingt auf diese Weise in 71 %iger Ausbeute. Allerdings ließ sich der Syntheseweg vereinfachen und die Ausbeute an Boc-geschütztem Nucleosid **103** deutlich steigern, indem ausgehend vom 2'-O-Cyanoethyl-modifizierten Baustein **72** die Boc-Schätzung *in situ* während der Raney-Nickel-katalysierten Hydrierung durchgeführt wurde (Schema 35).



Schema 35: Simultane Reduktion und Boc-Blockierung der 2'-O-Cyanoethyl-Funktion

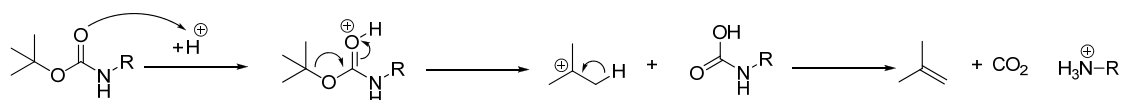
Diese Methode wurde auch für den 7*N*-Purin-Baustein **73** verwendet. In beiden Fällen musste nach erfolgter Hydrierung im Autoklaven das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt werden – die gewünschten 2'-O-Boc-aminopropyl-Nucleosidbausteine **103** bzw. **104** konnten auf diese Weise in guten bis sehr guten Ausbeuten von 98 % bzw. 78 % isoliert werden. Nachfolgend ließen sich die Boc-geschützten Nucleosid-Bausteine **103** bzw. **104**

nach der bereits ausführlich behandelten Syntheseroute in drei Stufen zu den entsprechenden 3'-O-Phosphoramiditen umsetzen.



Schema 36: Synthese von 3'-O-(2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylamin)phosphin-5'-O-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)-2'-O-(γ -*N*-*tert*-butyloxy-carbonylpropyl)- β -D-ribofuranose **107** bzw. dem 7*N*-Purin analogon **110** ausgehend aus **103** bzw. **104** in drei Stufen

Beide Phosphoramidite wurden in der RNA-Oligonucleotidsynthese eingesetzt. Die säurelabile Boc-Schutzgruppe wird im Laufe der Synthese zusammen mit den 5'-DMTr-Schutzgruppen durch Behandlung mit Trichloressigsäure (3 %ig in Dichlormethan) abgespalten, wodurch die Aminofunktion an dem 2'-O-Propyllinker frei wird. Aus nachfolgendem Schema ist die acidolytische Abspaltung der Boc-Schutzgruppe zu entnehmen.

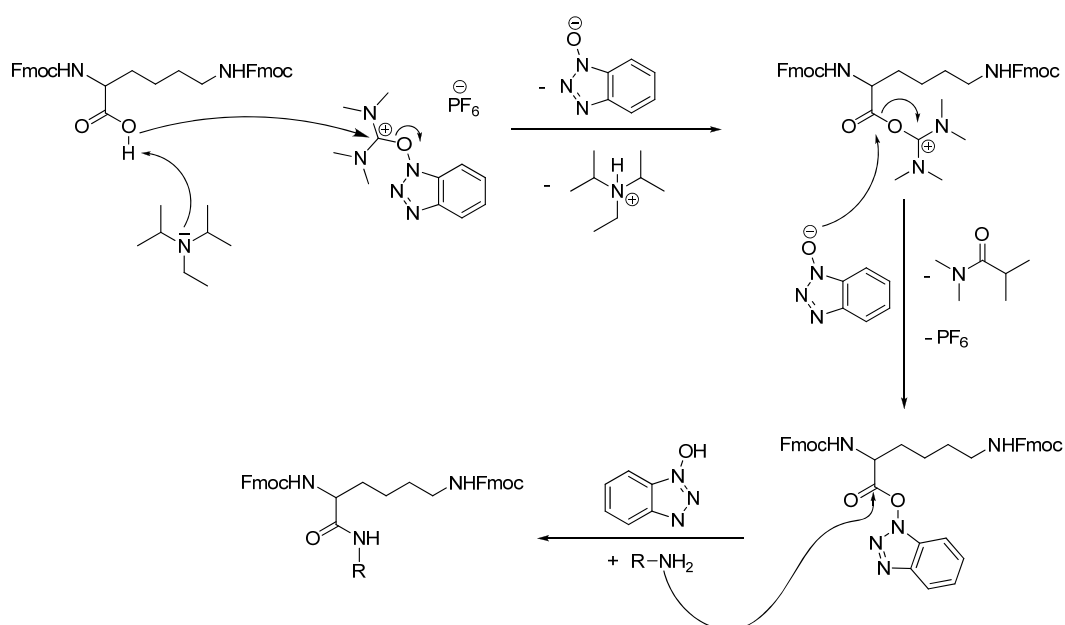


Schema 37: Mechanismus der acidolytischen Abspaltung der Boc-Schutzgruppe

Nach beendeter Oligonucleotidsynthese am Synthesizer wurde somit ein komplett geschütztes RNA-Oligomer erhalten, welches ein selektiv ungeschütztes primäres Amin am modifizierten

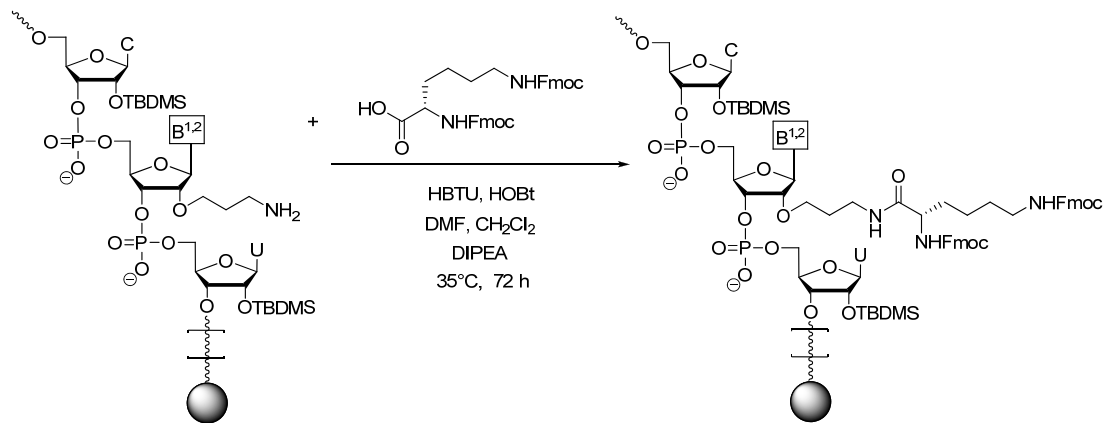
Nucleotid trägt. Hieran konnten nun weitere Kupplungsreaktionen analog zu den bereits diskutierten Kupplungen mit Carbonsäurederivaten unter Peptidkuppelungsbedingungen (vgl. Kap. 3.1.4.6) durchgeführt werden. Wie erwähnt, befindet sich das RNA-Oligonucleotid noch kovalent an das CPG-Festphasenmaterial gebunden; für die durchgeführten Kupplungsreaktionen mussten daher spezielle Bedingungen gewählt werden, die die Kupplung an der festen Phase ermöglichen.

Entsprechend bestehender Literaturvorschriften wurde zur Aktivierung des Carbonsäurederivats eine Kombination aus HBTU/HOBt verwendet.^[161]



Schema 38: Mechanismus der Peptidkupplung unter Verwendung von HBTU und HOBt

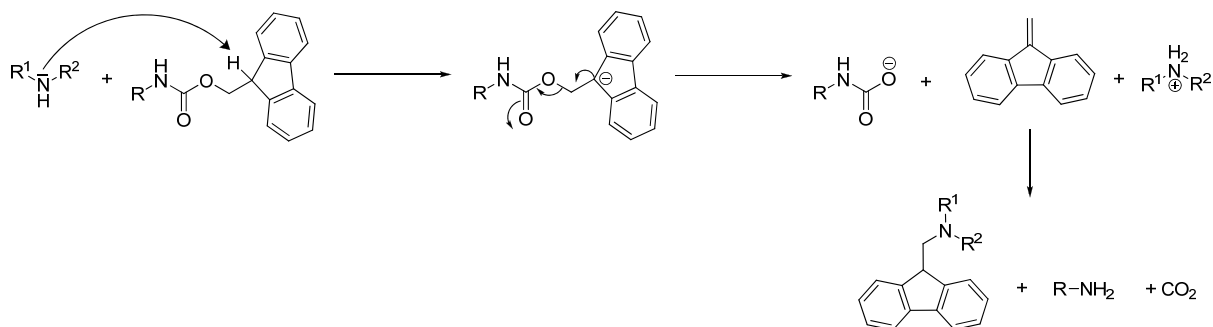
Hierbei wird die Carbonsäurekomponente, in Schema 38 ist exemplarisch N_{α},N_{ϵ} -Di-Fmoc-L-Lysin dargestellt, mit dem Uroniumsalz HBTU und dem Additiv HOBt in einem Gemisch aus absolutem DMF und absolutem Dichlormethan vorgelegt. Anschließend erfolgt die Deprotonierung der Carbonsäurekomponente durch *N*-Ethyl-diisopropylamin (DIPEA), wodurch sich als Zwischenstufe das reaktive O-Acyl-Uroniumsalz bildet. Dieses reagiert mit dem deprotonierten HOBt zum Aktivester, der sich letztlich mit dem freien Amin zur gewünschten Amidverbindung umsetzt.^[162]



Schema 39: Festphasenkupplung von *N*_ω,*N*_ε-Di-Fmoc-L-Lysin an ein Oligonucleotid

Da das Oligonucleotid noch kovalent an das CPG-Festphasenmaterial gebunden ist, findet die Kupplung unter heterogenen Bedingungen statt. Daher wird der Reaktionsansatz in einem Schüttelinkubator für 72 h unter leichter Erwärmung (ca. 35°C) geschüttelt. Problematisch ist, dass sich der Verlauf der Kupplungsreaktion nicht z.B. mittels Dünnschichtchromatographie verfolgen lässt. Es hat sich daher empirisch herausgestellt, dass eine Reaktionszeit von 72 h für eine vollständige Kupplung vonnöten ist.

Anschließend wird das CPG-Festphasenmaterial mehrmals mit DMF und Dichlormethan gespült, um die entstandenen Nebenprodukte vom Oligonucleotid-Konjugat abzuwaschen. Nachfolgend fährt man mit der bei der Oligonucleotidsynthese gewohnten Aufarbeitung fort (vgl. Kap. 3.2.2); d.h., man spaltet das Oligomer unter basischen Bedingungen (wässr. Ammoniak/Ethanol 3:1) vom Festphasenmaterial ab und entfernt gleichzeitig sämtliche basenlabile Schutzgruppen. Hierbei werden auch die Aminoschutzgruppen der Kupplungskomponente entfernt. Wie im o.g. Fall wurde hier auf die Fmoc-Strategie zurückgegriffen. Unter den genannten Bedingungen findet somit auch die β -Eliminierung statt, die zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe führt (Schema 40).



Schema 40: Mechanismus der basischen Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Nach dieser Prozedur konnten diverse Oligonucleotid-Konjugate (s. Tab. 2 - 5) in unterschiedlichen Längen synthetisiert werden. Nebenreaktionen wie z.B. eine mögliche Esterbildung zwischen der freien 5'-OH-Gruppe des Oligomers und der Carbonsäurekomponente konnten nicht beobachtet werden. Die intermediäre Bildung solcher Esterkondensate ist wahrscheinlich, allerdings findet im Zuge der Aufarbeitung die aminolytische Verseifungsreaktion aufgrund der basischen Bedingungen statt, weshalb solche Nebenprodukte letztlich nicht isolierbar auftreten.

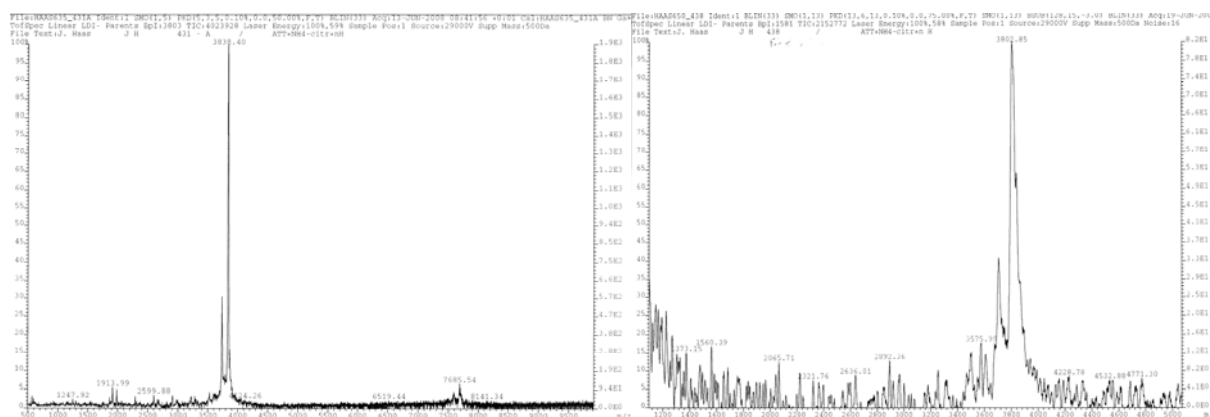


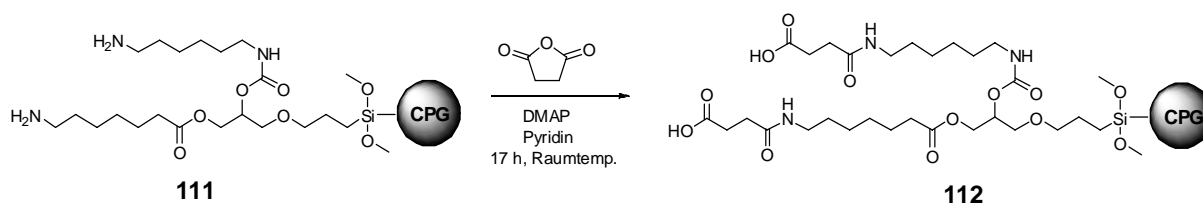
Abbildung 19: MALDI-Massenspektren zweier mittels Festphasensynthese hergestellter Oligonucleotide. Links: Lysin-Kupplung an DFBI-Nucleosid (Strang **U9**, Vgl. Tab. 2; ber. Masse: 3838,12 g/mol, gef. Masse: 3838,40 g/mol); Rechts: Lysin-Kupplung an 7N-Purin-Nucleosid (Strang **P1** Tab. 4; ber. Masse: 3804,12 g/mol, gef. Masse: 3802,85 g/mol).

Abbildung 19 zeigt zwei MALDI-Massenspektren von hergestellten Oligonucleotiden, an denen jeweils analog zu Schema 39 Lysin gekuppelt wurde. Bei dem Spektrum links fand die Kupplung an ein 4,6-Difluorbenzimidazol-Nucleosid statt (Oligomer **U9**). Beim Spektrum rechts wurde an die 2'-O-Aminopropyl-Modifikation des 7N-Purin-Nucleosids gekuppelt

(Oligomer **P1**). Hier ist aufgrund der geringeren Konzentration der Probenlösung das Signal-Rausch-Verhältnis recht ausgeprägt. Bei beiden Spektren lässt sich jedoch der Molpeak des gewünschten Oligonucleotid-Konjugats sehr gut erkennen.

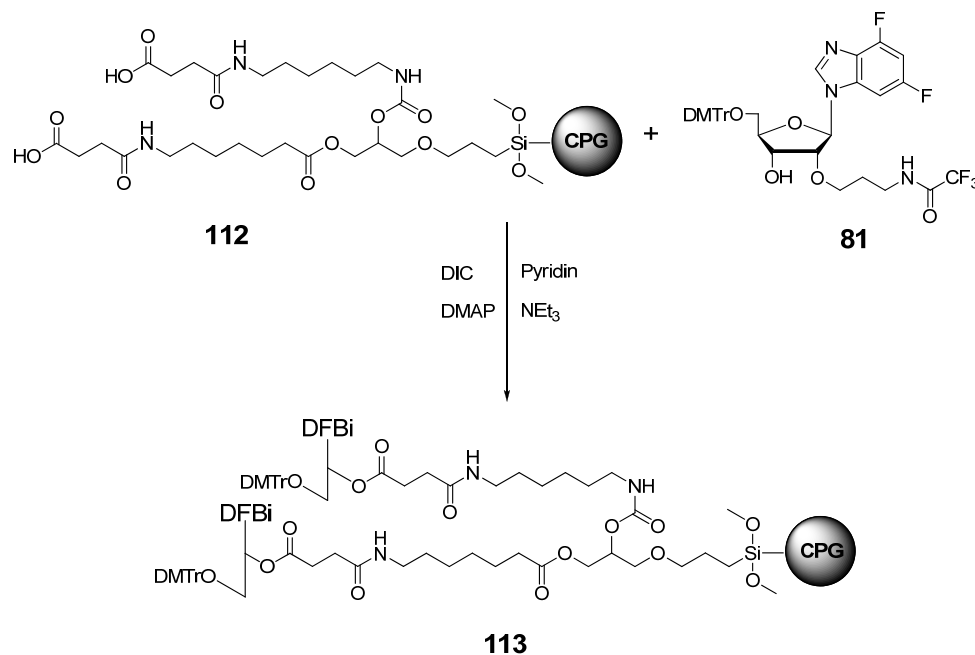
3.1.6 Modifikation von LCAA-CPG – Festphasenmaterial

Nach den bisher vorgestellten Methoden, dem Einbau modifizierter Nucleosidbausteine in RNA-Oligonucleotide bzw. der postsynthetischen Modifikation von Nucleotiden an der festen Phase, lassen sich RNA-Oligomere an beliebigen Positionen auf unterschiedliche Weise modifizieren. Eine Ausnahme besteht allerdings in der gezielten Modifikation am 3'-Ende eines Oligonucleotids; da die konventionelle automatisierte Oligonucleotidsynthese beginnend mit dem an der festen Phase (häufig CPG-Material,^[163] s.o.) gebundenen ersten Nucleosidbaustein vom 3'-Ende zum 5'-Ende hin verläuft, ist eine gezielte Modifizierung am 3'-Ende eines Oligomers in erster Linie durch Derivatisierung des CPG-Festphasenmaterials möglich.^[77, 164] Eine gängige Methode, CPG-Festphasenmaterial zu derivatisieren, geht von der Verwendung von käuflichem LCAA-(Long chain amino alkyl)-CPG-Material aus (s. Schema 41). Die freien terminalen Aminogruppen der Alkylketten lassen sich mit Bernsteinsäureanhydrid unter Zusatz von Dimethylaminopyridin (DMAP) zu freien Carbonsäuren aktivieren. Anschließend findet eine Veresterung z.B. mit modifizierten Nucleosiden über die freie 3'-OH-Funktion unter geeigneter Aktivierung der Carbonsäure statt. Als quantitativer Nachweis zum Erfolg der Aktivierung lässt sich eine kleine Menge des aktivierten CPG-Materials mit Ninhydrin-Lösung behandeln. Im Vergleich zum nicht-aktivierten LCAA-CPG, bei dem die freien Aminofunktion durch den Farbstoff tief lila angefärbt werden, bleibt das aktivierte CPG-Festphasenmaterial farblos.



Schema 41: Aktivierung von LCAA-CPG mit Bernsteinsäureanhydrid

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(γ -N-trifluoracetamidopropyl)- β -D-ribofuranose **81** auf die beschriebene Weise an LCAA-CPG-Festphasenmaterial gebunden. Als Synthesevorschrift wurde ein Protokoll aus *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* herangezogen.^[165]



Schema 42: Kupplung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(γ -N-trifluoracetamidopropyl)- β -D-ribofuranose **81** an aktiviertes LCAA-CPG-Festphasenmaterial **112**

Als Solvens für diese heterogene Kupplungsreaktion wurde absolutes Pyridin verwendet. Zur Aktivierung der Säurefunktionen wurde Diisopropylcarbodiimid eingesetzt; ausserdem wurden DMAP und Triethylamin zugesetzt. Das Gemisch wurde im Rundkolben unter Argonatmosphäre für 20 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nachdem sämtliche Reagenzien nach der Kupplungsreaktion durch diverse Waschschriffe abgespült worden sind, wurde nicht abreagiertes Nucleosid sowie nicht umgesetztes aktiviertes LCAA-CPG-Material **112** durch Capping an unerwünschten Nebenreaktion gehindert. Der Erfolg der Kupplungsreaktion lässt sich durch die sog. Beladung des LCAA-CPG-Festphasenmaterials mit dem Nucleosid ermitteln. Hierfür wird die saure Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe vom gekuppelten Nucleosid photometrisch erfasst; das Tritylkation, welches ein Absorptionsmaximum bei

einer Wellenlänge von 498 nm besitzt, lässt sich mittels nachfolgender Formel zur Berechnung der Beladung des CPG-Materials heranziehen:

$$\text{Beladung} = \frac{\text{Volumen} \times \text{Absorption}}{\varepsilon} \times \frac{1000}{\text{Masse}}$$

Wobei gilt: Volumen in mL, Absorption bei $\lambda = 498 \text{ nm}$, $\varepsilon = \text{Extinktionskoeffizient der DMTr-Gruppe (76 mL cm}^{-1} \mu\text{mol}^{-1})$ und Masse = Einwaage an CPG-Material in Gramm

Für das Kupplungsprodukt **113** konnte eine Beladung von $\sim 35 \mu\text{mol/g}$ ermittelt werden, was im Vergleich zu käuflichem CPG-Material mit natürlichen Nucleosiden (z.B. CPG-Material von ChemGenes, ca. $42 \mu\text{mol/g}$) eine sehr gute Kupplungsausbeute repräsentiert.

Dies konnte auch durch den Einsatz des derivatisierten CPG-Materials in der Oligonucleotidsynthese belegt werden. Mit diesem derivatisiertem CPG-Festphasenmaterial wurde eine 12mer - Oligonucleotidsynthese gestartet (Oligomer **U13**, Tab. 2, Kap. 3.2.2).

In nachfolgender Abbildung ist das MALDI-Massenspektrum dieses Oligomers dargestellt.

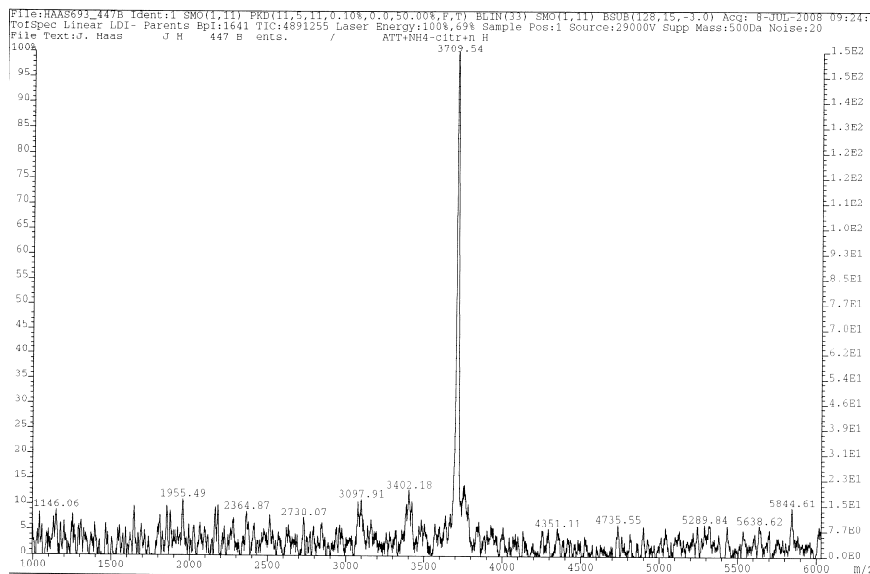
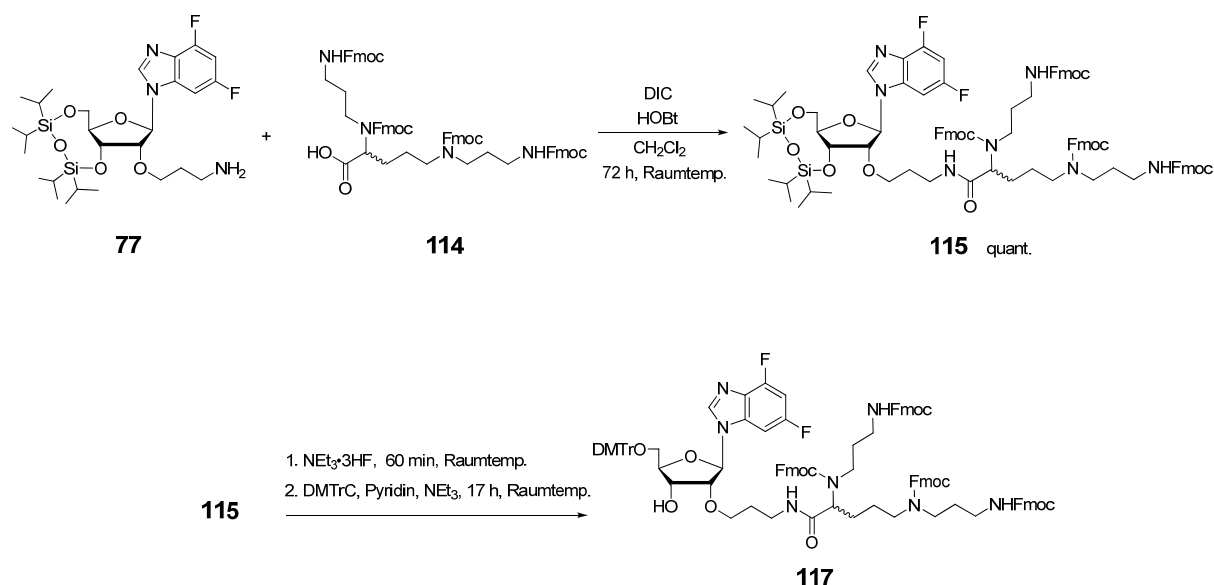


Abbildung 20: MALDI-Massenspektrum des Oligomers **U13**. Die Synthese wurde mit dem aus dem Nucleosid **81** hergestellten CPG-Festphasenmaterial **113** durchgeführt und beinhaltet daher eine 4,6-Difluorbenzimidazol-2'-O-aminopropyl-Modifikation am 3'-Ende. Berechnete Masse: 3710.05 g/mol, gefundene Masse: 3709.54 g/mol. vgl. Tab. 2.

Nach dieser gelungenen CPG-Derivatisierung wurde versucht, einen mit Spermin modifizierten Nucleosidbaustein nach gleicher Methode an LCAA-CPG-Festphasenmaterial zu binden. Wie schon beim 2'-O-Aminopropyl-Baustein **81**, müssen hierbei die Aminofunktionen durch basenlabile Schutzgruppen blockiert werden, um unerwünschte Nebenreaktionen während der Kupplung mit dem aktivierten CPG-Festphasenmaterial auszuschließen. Im Falle des Spermins wurde das (Fmoc)₄-5-carboxyspermin **114** zur Kupplung eingesetzt. Es wurde, wie auch schon das analoge Boc-Derivat, von der Fa. Polyplus-transfection bezogen (s.o).

Zunächst fand die drei Stufen umfassende Synthese des Kupplungsbausteins **116**, 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl-2'-O-(γ -N-(N $_{\alpha}$,N $_{\delta}$ -bis(9-H-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-N $_{\alpha}$,N $_{\delta}$ -bis(3-[9-H-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]aminopropyl)ornithin)propylamid)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose, ausgehend von 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(γ -aminopropyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **77** und (Fmoc)₄-5-carboxyspermin **114** statt (Schema 43).



Schema 43: Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl-2'-O-(γ -N-(N $_{\alpha}$,N $_{\delta}$ -bis(9-H-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-N $_{\alpha}$,N $_{\delta}$ -bis(3-[9-H-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]aminopropyl)ornithin)-propylamid)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **117**

Die Kupplung des Fmoc-geschützten 5-Carboxyspermins **114** mit dem Nucleosid **77** verlief erneut glatt in quantitativer Ausbeute, wobei abermals auf eine chromatographische

Aufreinigung verzichtet werden konnte. Im anschließenden Syntheseschritt, der Abspaltung der Markiewicz-Schutzgruppe mit Fluorid, musste, wie schon beim 2'-O-Cyanoethyl-Derivat, vgl. Kap. 3.1.4.3, mit Triethylamin Trihydrofluorid gearbeitet werden, da die Basizität von Tetrabutylammoniumfluorid ausreicht, um die Fmoc-Schutzgruppe teilweise abzuspalten.^[166] Die abschließende 5'-DMTr-Blockierung fand wieder unter den gewohnten Reaktionsbedingungen statt. Insgesamt konnte das gewünschte Nucleosid **117** mit einer Gesamtausbeute von 58 % über drei Stufen erhalten werden.

Die Kupplung dieses Nucleosidbausteins **117** an das aktivierte LCAA-CPG-Festphasenmaterial **112** wurde analog zu obiger Vorschrift durchgeführt. Allerdings wurde auf den Cappingschritt mit Piperidin verzichtet, um eine unerwünschte Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen zu vermeiden.

Letztlich konnte jedoch mit dem (Fmoc)₄-5-carboxylspermin-Derivat **117** keine befriedigende Beladung des CPG-Materials erreicht werden – eine mit diesem Festphasenmaterial gestartete Oligonucleotidsynthese schlug daher fehl. Die nach obiger Formel errechnete Beladung konnte hierbei mit < 25 μmol/g beziffert werden.

Sehr wahrscheinlich ist der sterisch anspruchsvolle 2'-O-Aminopropylspermin-Substituent inklusive der raumgreifenden Fmoc-Schutzgruppen so groß, dass eine Kupplungsreaktion sehr stark gehindert ist. Da ein positiver Ninhydrin-Test mit dem bereits gekuppelten LCAA-CPG-Derivat **117** darüberhinaus darauf hindeutet, dass freie Aminofunktionen vorhanden sind, lässt sich davon ausgehen, dass im Laufe der Kupplungsreaktion die sehr basenlabile Fmoc-Schutzgruppe wohl auch teilweise abgespalten wurde.

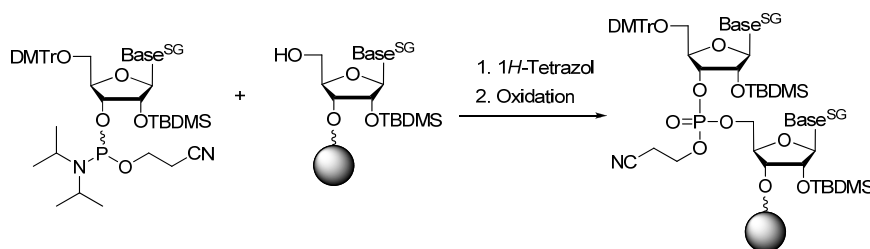
3.2 Synthese von Oligonucleotiden

Die 3'-Phosphoramidite von Nucleosidbausteinen, wie sie in Kap. 3.1 dieser Arbeit dargestellt sind, eignen sich zum Einsatz in der automatisierten Synthese von langkettigen Oligonucleotiden. Sowohl bei DNA-, als auch bei RNA-Oligomeren handelt es sich um Biopolymere, die aus der sich wiederholenden Kondensationen einzelner Nucleotide entstehen und in der Abfolge der einzelnen Nucleotide und in der Gesamtlänge variieren.

In den siebziger Jahren des 20. Jahrhunderts gelang durch die Entwicklung der Oligonucleotid-Festphasensynthese ein wesentlicher Durchbruch in der Herstellung von DNA- bzw. RNA-Oligomeren. Letsinger *et al.* entwickelten dabei basierend auf die wenige Jahre zuvor von Merrifield vorgestellte Festphasensynthese für Polypeptide^[167] einen Zugang zu Oligonucleotiden, der im Vergleich zu der homogenen Synthese deutliche Vorteile besitzt.^[168, 169] So bietet die Festphasensynthese kürzere Syntheszeit, effizientere Kupplungen und dadurch höhere Ausbeuten der langketten Moleküle, die zudem in hoher Reinheit isoliert werden können.

3.2.1 Automatisierte Festphasensynthese von Oligonucleotiden

Als weiterer Fortschritt in dieser Technologie kann die von Beaucage und Caruthers eingeführte automatisierte Festphasensynthese betrachtet werden.^[109, 112] Hierbei wird auf die auch noch heutzutage am häufigsten eingesetzte Phosphoramidit-Methode zur Herstellung von Oligonucleotiden an Synthesizern zurückgegriffen.^[108, 111, 113] Dabei wird ein orthogonal geschütztes 3'-Nucleosidphosphoramidit in Gegenwart eines Aktivator (häufig 1*H*-Tetrazol) mit der 5'-Hydroxyfunktion eines am Festphasenmaterial gebundenen Nucleosids zu einem Phosphittriestern umgesetzt.



Schema 44: Ablauf ein Kupplung mittels Phosphoramidit-Methode, SG = Schutzgruppe

Als Festphasenmaterial kommt überwiegend das bereits schon erwähnte CPG-Material^[163] (spherische Glaskügelchen mit einer Porengröße zwischen 500 und 1000 Å) aber auch sog. "Tentagel" (Polystyrol-Polymerkügelchen)^[170] zum Einsatz.

Der erste Nucleosidbaustein einer Oligonucleotidsynthese ist über die 3'-OH-Funktion kovalent mittels eines basenlabilen Linkers mit dem Festphasenmaterial verbunden.

Die automatisierte Oligonucleotid-Festphasensynthese verläuft in der Regel – entgegen der biologischen Synthesen von Nucleinsäure durch Polymerasen – von 3'→5'- Richtung. Die Synthese kann durch einen Syntheszyklus beschrieben werden, der durch die Entschützung der 5'-Hydroxyfunktion des ersten Nucleosids an der festen Phase mit 3 %iger Trichloressigsäure in Dichlormethan gestartet wird. Der Synthesekreislauf wird so lange wiederholt, bis die gewünschte Länge des Oligonucleotids erreicht worden ist.

In nachfolgender Abbildung ist ein solcher Festphasensynthesekreislauf nach der Phosphoramiditmethode, wie er auch im Rahmen dieser Arbeit Anwendung gefunden hat, dargestellt.

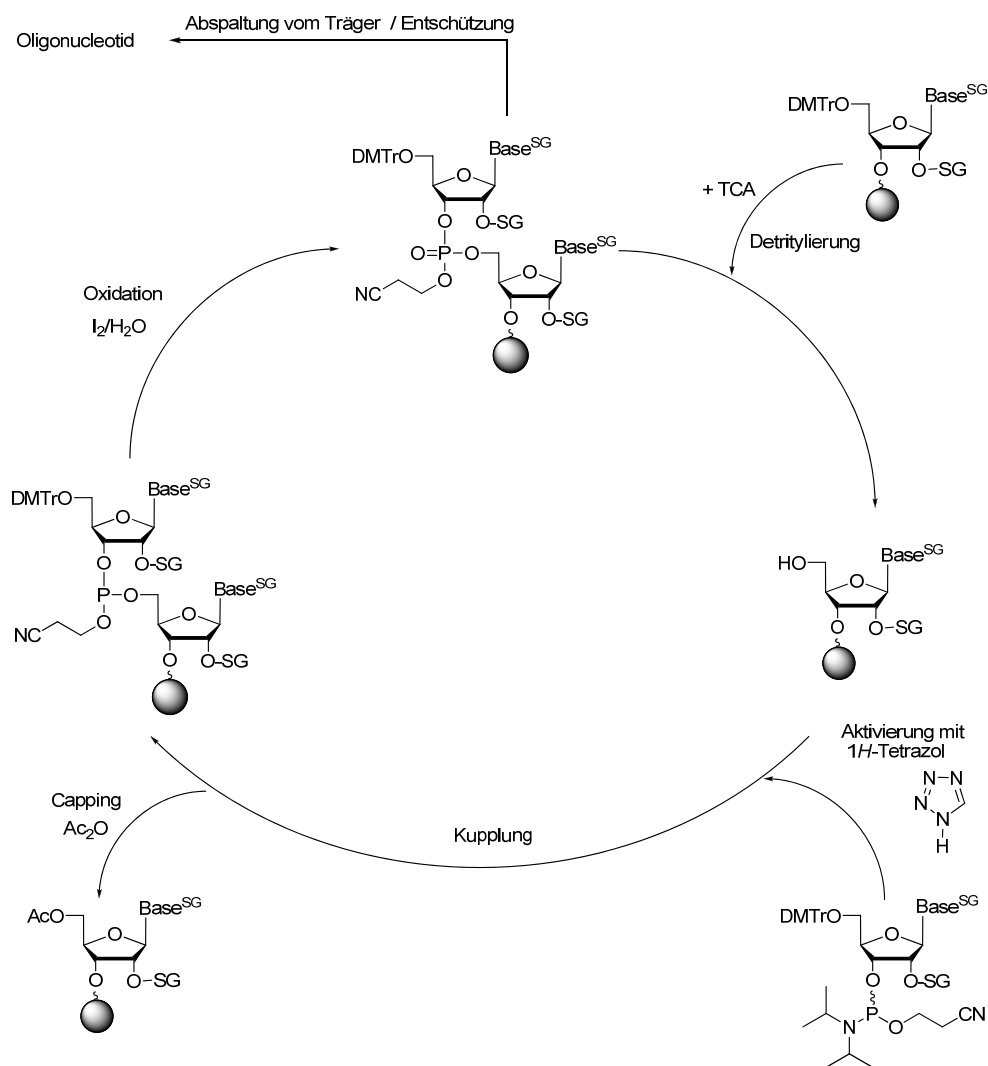


Abbildung 21: Synthesekreislauf der Phosphoramidit-Methode

Wie bereits beschrieben, wird der zweite Phosphoramidit-Nucleosidbaustein nach Aktivierung mit 1*H*-Tetrazol an die freie 5'-OH-Funktion des ersten Bausteins gekuppelt. Vermutlich reagiert das Tetrazol ($pK_S = 4.9$)^[171] dabei zunächst als Säure und protoniert das Nucleosid am Phosphor- oder Stickstoffatom der 3'-Amiditfunktion. Dieses Kation kann dann mit einem zweiten Tetrazol-Molekül zum Tetrazolid reagieren; das Tetrazolid greift nun als sehr reaktive Spezies die 5'-OH-Funktion des trägergebundenen Nucleosidbausteins an – und unter Abspaltung von 1*H*-Tetrazol wird das erste dimere Oligonucleotid ausgebildet. Dieser von Dahl *et al.* postulierte Mechanismus betrachtet das Tetrazol sowohl als sauren, wie auch als nucleophilen Katalysator.^[172]

Für die nachfolgende Kupplungsreaktion wird das zu aktivierende Phosphoramidit in 50 bis 100fachem Überschuss eingesetzt. Es bildet sich ein Phosphortriester, in dem das Phosphoratom die Oxidationsstufe +III besitzt. Zuvor findet das sog. capping, also das Maskieren von nicht abreagierten 5'-Hydroxyfunktionen durch Zusatz von Acetanhydrid statt. Auf diese Weise werden Nebenreaktionen unterdrückt und eine Synthese von Fehlsequenzen findet praktisch nicht mehr statt. Im anschließenden Schritt wird der dreiwertige Phosphor durch Zugabe von Iod in einem Wasser/Pyridin-Gemisch zum fünfwertigen Phosphor oxidiert. Das auf diese Weise entstandene erste Kupplungsaddukt steht für eine weitere Kupplung im Syntheseyklus zur Verfügung.

RNA-Oligonucleotidsynthesen lassen sich auf die Weise in Kupplungsausbeuten von 98 bis 99 % durchführen, womit sich Oligomere in Längen bis zu 100 Nucleotiden (nt) herstellen lassen.^[165] Die mathematische Beziehung zwischen der Gesamtausbeute einer Oligonucleotidsynthese und der durchschnittlichen Kupplungsausbeute lässt sich durch folgende Formel beschreiben:

$$GA = \left[\frac{KA}{100} \right]^{N-1} \times 100 \%$$

Wobei gilt: GA = Gesamtausbeute ; KA = Kupplungsausbeute, N = Länge des Oligomers.

Diese Kupplungsausbeuten gelten jedoch in erster Linie für die Verwendung unmodifizierter, natürlicher Nucleosidbausteine; durch den Einsatz von anderen Nucleosidanaloga – erst Recht durch die Verwendung von Nucleosidbausteinen, die über eine teilweise sterisch

einflußreiche Modifizierung an der 2'-Funktion der Ribose verfügen – verringern sich die Kupplungsausbeuten.

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Oligonucleotide wurden nach o.g. Phosphoramidit-Methode im 1 µmol-Maßstab an einem Syntheseautomaten der Fa. PerSeptive Biosystems (Modell: Expedite 8905) hergestellt.

Für die Synthesen kamen selbst zu befüllende Synthesesäulchen der Fa. Eurogentec zum Einsatz. Es wurden die standardisierten Syntheseprotokolle für RNA-Synthesen verwendet – für natürliche Nucleosidbausteine wurde eine Kupplungszeit von ca. 12 Minuten eingehalten; bei modifizierten Nucleosidbausteinen wurde i.d. Regel sog. „double coupling“ verwendet, wodurch sich die Kupplungszeit für diesen Baustein auf 30 Minuten verlängerte. Alle RNA Oligonucleotidsynthesen wurden im sog. „DMTr-Off“-Modus durchgeführt, d.h. sie endeten mit der Abspaltung der 5'-O-DMTr-Schutzgruppe am letzten Nucleosidbaustein.

Die Effizienz der einzelnen Kupplungsreaktionen im Laufe der Oligonucleotidsynthese konnten mittels eines im Synthesautomaten integrierten Trityl-Monitor verfolgt werden. Dieser misst nach dem Zyklus die Abspaltung des Tritylkations photometrisch bei $\lambda = 498$ nm. Hierdurch lässt sich in etwa die Ausbeute eines Kupplungsschrittes nachverfolgen; am Synthesizer lässt sich ein graphischer Plot, das sog. Tritylprotokoll, als Balkendiagramm anzeigen. In Abbildung 22 sind exemplarisch die Tritylprotokolle verschiedener RNA-Synthesen abgebildet.

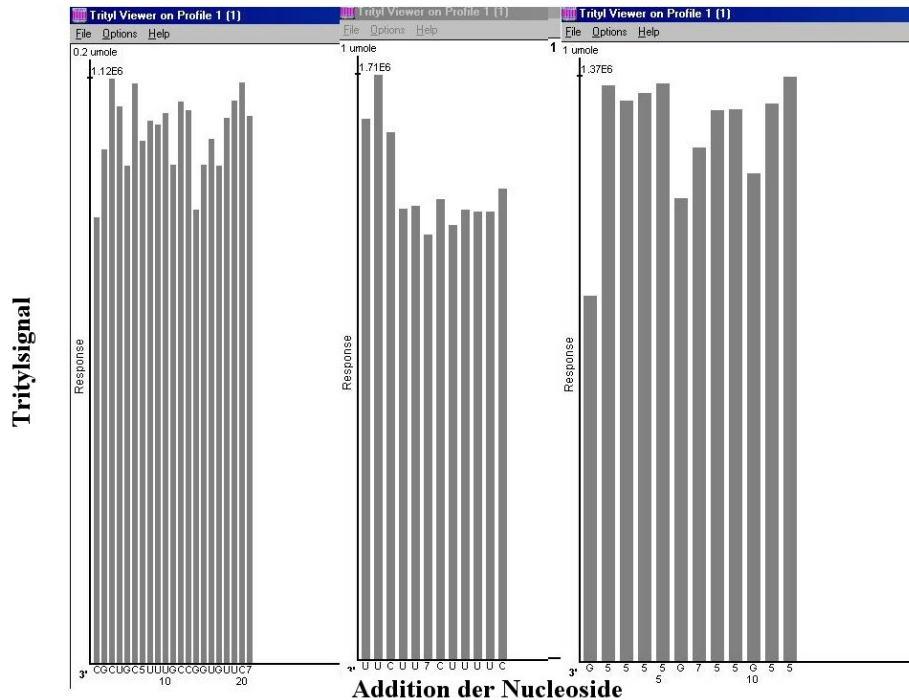


Abbildung 22: Exemplarische Trityl-Protokolle; A): 21mer mit DFBi-2'-O-(Boc)-Aminopropyl – Modifikation **107**, B): Pyrimidinreiches 12mer mit DFBi-2'-O-(Boc)-Aminopropyl – Modifikation **107**, C): Purinreiches 12mer mit 7N-Purin-2'-O-(Boc)-Aminopropyl – Modifikation **110**. Die Modifikationen wurden an Position „7“ eingebaut; 5 = Adenosin.

Um nach erfolgter Oligonucleotidsynthese am Synthesizer ein ungeschütztes, entsalztes RNA-Oligomer zu erhalten, müssen einige postsynthetische Aufarbeitungsschritte erfolgen – diese sollen im Folgenden Erwähnung finden.

3.2.2 Aufreinigung und Analytik der synthetisierten RNA-Oligomere

Im ersten Schritt der Aufarbeitung eines synthetisierten RNA-Oligonucleotids erfolgt die basische Abspaltung von der festen Phase simultan mit der Deblockierung sämtlicher basenlabiler Schutzgruppen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Behandlung des CPG-gebundenen Oligomers mit einem Ammoniak-Ethanol-Gemisch (3:1) für 24 h bei 40°C gewählt.^[173] Dabei erfolgte neben der aminolytischen Esterspaltung vom Trägermaterial (zumeist werden hierbei Succinyl-Linker gespalten)^[164, 174] auch die Entfernung der basenlabilen Nucleosidschutzgruppen, wie sie bei den natürlichen Nucleosidbausteinen verwendet werden (z.B. *iso*-Butyryl, Acetyl, Benzoyl) sowie die Abspaltung der β -

Cyanoethyl-Schutzgruppe am Phosphat. Darüberhinaus erfolgt in diesem Schritt auch die Abspaltung basenlabiler Aminoschutzgruppen an der 2'-O-Modifikation. Während die Trifluoracetylschutzgruppe, wie sie z.B. beim 2'-O-Aminopropyl-Baustein **107** bzw. **110** angewendet wurde, unter den genannten Bedingungen quantitativ abzuspalten ist, reichen die gleichen Konditionen nicht aus, um die Phthalimidoschutzgruppe des 2'-O-Aminoethyl-Nucleosids **65** vollständig zu entfernen. Hierbei musste die Inkubationszeit im Ammoniak/Ethanol-Gemisch auf bis zu 48 h verlängert werden.

Nach dem Abtrennen der Oligoribonucleotid-Lösung vom CPG-Material und dem Einengen dieser Lösung in der Vakuumzentrifuge (SpeedVac), erfolgt die Abspaltung der Fluoridlabilen Schutzgruppen – also überwiegend die 2'-O-TBDMS-Schutzgruppen. Bis zu diesem Zeitpunkt kann auf eine sterile Behandlung der RNA-Oligomere weitestgehend verzichtet werden, da Nucleasen in erster Linie die freie 2'-OH-Funktion für den Abbau von RNA benötigen.^[58] Die Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppen erfolgt durch Zusatz einer Triethylamin-Trihydrofluorid-Lösung unter sterilen Bedingungen und Erwärmung (60°C) für 90 Minuten.^[175, 176]

Schließlich kann das ungeschützte Oligonucleotid durch Zugabe von *n*-Butanol ausgefällt werden. Das RNA-Pellet wird kurz getrocknet und kann mittels Anionenaustauscher-HPLC gereinigt werden. Die Anionenaustauscher-HPLC Trennung ist neben der präparativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) die Standardmethode zur Reinigung von RNA-Oligomeren.^[177, 178] Hierbei werden die einzelnen Oligonucleotid-Fragmente nach ihren Ladungsunterschieden aufgetrennt. Das negativ geladene Phosphatrückgrat eines Oligonucleotids interagiert mit auf der stationären Phase immobilisierten kationischen Gruppen. Die gebundenen Oligonucleotide lassen sich dann mit einem Gradienten von steigender Ionenstärke (Salzgehalt) von der Trennsäule spülen, wobei das längste Oligomer zuletzt eluiert wird. Als Elutionsmittel wurde ein steriles Gemisch aus Wasser (pH = 8.0) und 1 M LiCl-Lösung verwendet; das Wasser wurde zuvor mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt und autoklaviert, um frei von RNAsen zu sein.^[179]

Mit dieser Trennmethode lassen sich die gewünschten RNA-Oligomere in guten Ausbeuten und hoher Reinheit von den synthesebedingten Abbruchsequenzen abtrennen. Allerdings zeigten sich bei vermehrt kationisch modifizierten RNA-Oligomeren auftretende Schwierigkeiten bei der Trennung. Bedingt durch die Modifikation, mit der ein Teil der negativen Ladung der RNA neutralisiert wird, verändert sich die ansonsten für die jeweilige Oligomerenlänge typische Retentionszeit hin zu kürzerer Verweildauer auf der Trennsäule.

Dadurch konnte beobachtet werden, dass sich in Fraktionen gleicher Retentionszeit unterschiedlich lange RNA Fragmente (Abbruchsequenz und modifiziertes Oligomer mit gleicher Ladung) befanden.

Nachfolgend sind einige exemplarische HPLC-Chromatogramme abgebildet.

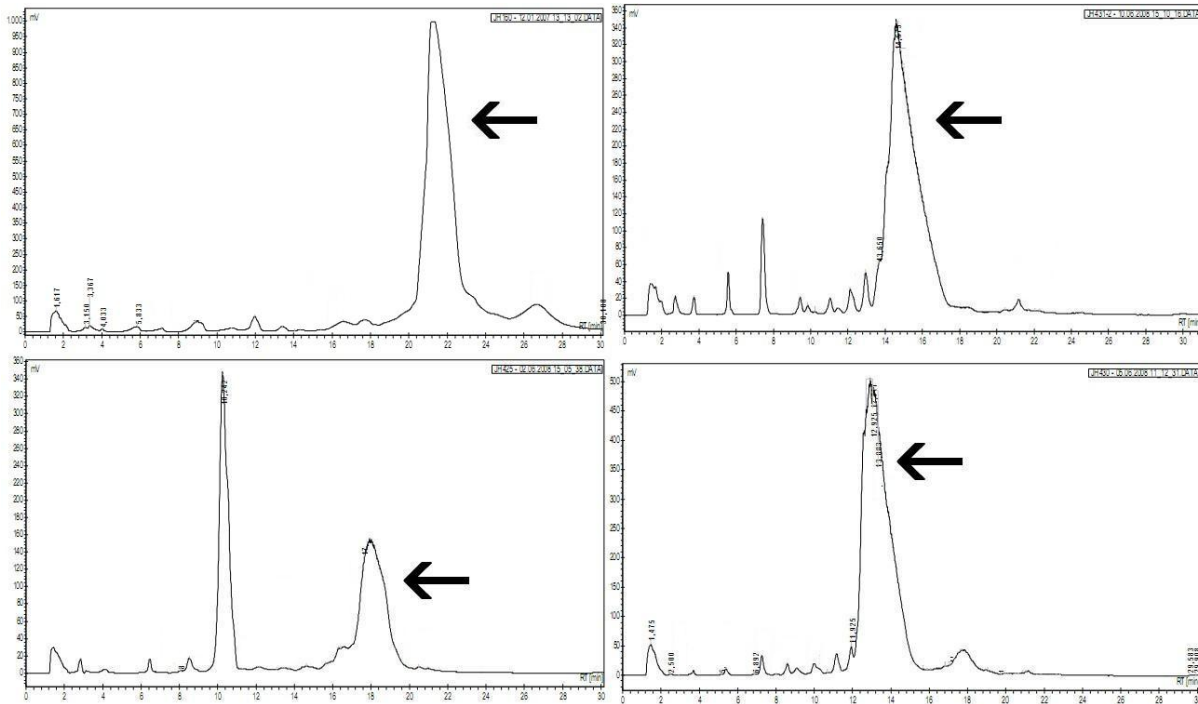


Abbildung 23: HPLC-Chromatogramme von modifizierten RNA-12meren. Der Peak, der das gewünschte 12mer repräsentiert, ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Oben links: Laurinsäure-Modifikation (**A12**), Oben rechts: Lysin-Modifikation nach Festphasenkupplung (**A9**), Unten links: Aminopropyl-Modifikation (**A4**), Unten rechts: Lysin-Modifikation (**U8**).

Aus obiger Abbildung lassen sich sehr gut die erwähnten Verschiebungen der unterschiedlich modifizierten 12mere erkennen. Während das Oligonucleotid mit der lipophilen Laurinsäure-Modifikation (oben links) mit einer Retentionszeit von ca. 22 min eluiert wird, lässt sich das Aminopropyl-modifizierte 12mer (unten links) bereits nach 18 min von der Säule spülen. Bei den beiden Lysin-modifizierten Oligonucleotiden (oben rechts bzw. unten rechts) ist der vergleichsweise geringe Unterschied der Retentionszeiten in erster Linie durch die unterschiedlichen Sequenzen der 12mer-Stränge (einmal der purinreiche Strang, oben; einmal das pyrimidinreiche 12mer, unten) zu erklären.

Das nach Anionenaustauscher-HPLC erhaltene Oligonucleotid gewünschter Länge ist bedingt durch den verwendeten Elutionsgradienten durch große Mengen an Salz verunreinigt. Im

letzten Schritt der Oligonucleotid-Aufreinigungsprozedur muss daher noch eine gründliche Entsalzung der RNA-Probe mittels Gelfiltration erfolgen. Für diesen Zweck wurden käufliche, bereits vorgepackte Sephadex-G25-Entsalzungssäulchen der Fa. Eurogentec verwendet. Das Trennprinzip der Gelfiltration 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 Salzionen hinein diffundieren, während die großen Oligonucleotid-Moleküle ausgeschlossen bleiben und somit rasch eluiert werden. Die nach der Entsalzung erhaltenen Fraktionen haben unterschiedliche Salzgehalte. Für die Charakterisierung mittels Massenspektrometrie sowie für die spektroskopischen Untersuchungen und die biologischen Anwendungen wurden jeweils die reinsten, salzärmsten Fraktionen verwendet.

Die Quantifizierung der entsalzten RNA-Probe erfolgt mittels UV-Spektroskopie. Dabei wird die optische Dichte (OD), also die Extinktion, der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm am Photometer ermittelt.^[179] Bei bekannten Extinktionskoeffizient kann nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die Konzentration der Probe wie folgt ermittelt werden:

$$c = OD_{260} / \varepsilon \cdot d$$

Mit: c = Konzentration der RNA in $\mu\text{g/mL}$, OD_{260} = optische Dichte der Probe bei $\lambda = 260 \text{ nm}$, ε = Extinktionskoeffizient, d = Schichtdicke (1 cm)

Als generelle Faustregel lässt sich sagen, dass 1 OD_{260} etwa 33 $\mu\text{g/mL}$ RNA entspricht.

Als wichtigste Nachweismethode zum Erfolg der durchgeführten Oligonucleotidsynthesen wurde die Massenspektrometrie herangezogen. Zur Charakterisierung von RNA-Oligonucleotiden hat sich vor allem die MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight)-Massenspektrometrie etabliert.^[180-182] Diese Methode ermöglicht die unfragmentierte Analyse von Oligonucleotiden mit hoher Empfindlichkeit.

Weitere Einzelheiten zur Quantifizierung der synthetisierten Oligonucleotide sind dem experimentellen Teil, Kap. 5.3 zu entnehmen.

Aus Abb. 24 kann man die MALDI-MS-Spektren zweier synthetisierter, modifizierter RNA-Oligomere entnehmen.

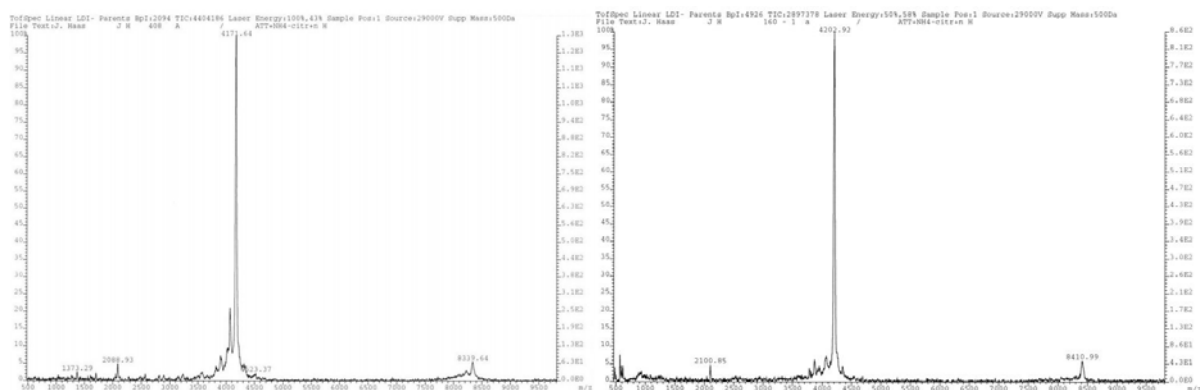


Abbildung 24: MALDI-MS - Spektren von modifizierten RNA-12meren; links: 2'-O-AP-Arginin Modifikation, Strang: **A10**, ber. Masse: 4170.52 g/mol, gef. Masse: 4171.62 g/mol. Rechts: 2'-O-AP-Laurinsäure Modifikation, Strang **A12**, ber. Masse: 4196.62 g/mol, gef. Masse: 4202.92 g/mol.

Für die Oligonucleotid-Konjugate, die mittels Festphasenkupplung hergestellt wurden (vgl. Kap. 3.1.5) erfolgte grundsätzlich eine analoge Aufarbeitung. Da allerdings nach beendeter automatisierter Oligonucleotidsynthese am Synthesizer die Kupplung eines Carbonsäurederivats an das festphasengebundene Oligomer erfolgte, mussten leichte Änderungen bei der Entfernung der Schutzgruppen vorgenommen werden.

Die basische Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte hierbei zumeist für bis zu 30 h in Ammoniak/Ethanol (3:1) bei 40°C – vor allem dann, wenn die Kupplungskomponente selbst auch basenlabile Schutzgruppen, wie z.B. Fmoc, besaß.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auf die oben beschriebene Weise zwei Arten von RNA-Oligonucleotiden hergestellt: Zum einen RNA-12mere, die als Modellsystem zur spektroskopischen Untersuchung des Einflusses der jeweiligen Modifikation auf die thermodynamische Stabilität eines RNA-Duplexes dienen. Zum anderen wurden RNA-21mere als sog. siRNAs (vgl. Kap. 3.4) synthetisiert, in die verschiedene 2'-O-Modifikationen inkorporiert wurden. Diese sollten in biologischen Assays auf ihre biologischen Eigenschaften hin untersucht werden. Zu diesem Zweck kam ausschließlich das 4,6-Difluorbenzimidazol-Nucleosid zum Einsatz.

Für die thermodynamischen Untersuchungen des Einflusses der 2'-O-Modifikationen auf einen Duplex wurden zwei 12mer - Stränge gewählt, die sich für diesen Zweck in den letzten Jahren im Arbeitskreis von Prof. Engels etabliert haben.^[87, 90, 98, 99]

Es handelt sich dabei um jeweils einen pyrimidin- und einen purinreichen Strang mit folgenden Sequenzen:

Pyrimidinreicher Strang (U1): 3'-UUCUUUCUUUUC-5'

Purinreicher Strang (A1): 5'-AAGAAAGAAAAG-3'

Die modifizierten Nucleoside wurden jeweils in der Mitte der Stränge (fett u. kursiv markierte Base) eingebaut. In Tabelle 2 sind die synthetisierten pyrimidinreichen RNA-12mere mit den jeweiligen Modifikationen und dem gemessenen Molgewicht dargestellt.

Tabelle 2: Übersicht über die synthetisierten pyrimidinreichen RNA-12mere; Alle Modifikationen besitzen 4,6-Difluorbenzimidazol als Nucleobase. AE = aminoethyl, AP = aminopropyl, CE = cyanoethyl, GE = guanidinoethyl, Spe = Spermin, Lys = Lysin, Arg = Arginin, Laur = Laurinsäure. Lys¹ bzw. Arg¹ = herkömml. Synthese; Lys² bzw. Arg² = Festphasenkupplung

Kürzel	Sequenz	Modifikation	Masse ber. [Da]	Masse gef. [Da]
U1	3' - UUC UUU CUU UUC - 5'	keine	3609.11	3606.96
U2	3' - UUC UUX CUU UUC - 5'	2'-OH	3652.99	3647.51
U3	3' - UUC UUX CUU UUC - 5'	2'-O-AE	3696.04	3713.34
U4	3' - UUC UUX CUU UUC - 5'	2'-O-AP	3710.05	3706.01
U5	3' - UUC UUX CUU UUC - 5'	2'-O-CE	3706.02	3704.05
U6	3' - UUC UUX CUU UUC - 5'	2'-O-GE	3738.32	3737.43
U7	3' - UUC UUX CUU UUC - 5'	2'-O-AP-Spe	3938.25	3956.22
U8	3' - UUC UUX CUU UUC - 5'	2'-O-AP-Lys ¹	3838.12	3837.70
U9	3' - UUC UUX CUU UUC - 5'	2'-O-AP-Lys ²	3838.12	3838.40
U10	3' - UUC UUX CUU UUC - 5'	2'-O-AP-Arg ¹	3866.12	3888.44
U11	3' - UUC UUX CUU UUC - 5'	2'-O-AP-Arg ²	3866.12	3860.24
U12	3' - UUC UUX CUU UUC - 5'	2'-O-AP-Laur	3892.22	3892.77
U13	3' - XUC UUU CUU UUC - 5'	2'-O-AP	3710.05	3709.54

Für das Oligomer **U4**, welches das 4,6-Difluorbenzimidazolnucleosid mit einer 2'-O-Aminopropyl-Modifikation beinhaltet, wurde der Nucleosidbaustein **82** in die RNA Festphasensynthese eingesetzt. Für die RNA-Oligomere **U7**, **U8**, **U10** und **U12** wurde die in

Kap. 3.1.4.6 diskutierte Syntheseroute angewendet; die Oligomeren **U11** und **U12** wurden nach der in Kap. 3.1.5 beschriebene Methode der Festphasenmodifikation hergestellt. Die MALDI-MS-spektrometrische Analyse zeigt, dass **U8** und **U9** sowie **U10** und **U11** die gleiche molare Masse besitzen, weshalb davon auszugehen ist, dass es sich um die gleichen Oligonucleotide handelt.

Bei dem Oligomer **U13** kam das nach Kap. 3.1.6 beschriebene CPG-Derivat mit 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(γ -N-trifluoracetamidopropyl)- β -D-ribofuranose **113** zum Einsatz. Beginnend mit diesem modifizierten CPG-Festphasenmaterial wurde eine 12mer Synthese gestartet, wodurch sich das gewünschte, am 3'-Ende modifizierte RNA-Oligomer in guter Ausbeute herstellen ließ.

Nachfolgend sind sämtliche purinreiche 4,6-Difluorbenzimidazol-2'-O-modifizierten 12mere aufgelistet.

Tabelle 3: Übersicht über die synthetisierten purinreichen RNA-12mere; Alle Modifikationen besitzen 4,6-Difluorbenzimidazol als Nucleobase. AE = aminoethyl, AP = aminopropyl, CE = cyanoethyl, GE = guanidinoethyl, Spe = Spermin, Lys = Lysin, Arg = Arginin, Laur = Laurinsäure. Lys¹, Arg¹, Laur¹ = herkömml. Synthese; Lys², Arg², Laur² = Festphasenkupplung

Kürzel	Sequenz	Modifikation	Masse ber. [Da]	Masse gef. [Da]
A1	5' - AAG AAA GAA AAG - 3'	keine	3935.54	3937.01
A2	5' - AAG AAX GAA AAG - 3'	2'-OH	3957.39	3956.75
A3	5' - AAG AAX GAA AAG - 3'	2'-O-AE	4000.44	3999.35
A4	5' - AAG AAX GAA AAG - 3'	2'-O-AP	4014.45	4007.19
A5	5' - AAG AAX GAA AAG - 3'	2'-O-CE	4010.42	4028.02
A6	5' - AAG AAX GAA AAG - 3'	2'-O-GE	4042.72	4043.23
A7	5' - AAG AAX GAA AAG - 3'	2'-O-AP-Spe	4242.65	4249.27
A8	5' - AAG AAX GAA AAG - 3'	2'-O-AP-Lys ¹	4142.52	4141.36
A9	5' - AAG AAX GAA AAG - 3'	2'-O-AP-Lys ²	4142.52	4148.90
A10	5' - AAG AAX GAA AAG - 3'	2'-O-AP-Arg ¹	4170.52	4171.64
A11	5' - AAG AAX GAA AAG - 3'	2'-O-AP-Arg ²	4170.52	4184.77
A12	5' - AAG AAX GAA AAG - 3'	2'-O-AP-Laur ¹	4196.62	4202.92
A13	5' - AAG AAX GAA AAG - 3'	2'-O-AP-Laur ²	4196.62	4213.44

Auch bei dieser Syntheserieihe wurde für das Oligonucleotid **A4** der Nucleosidbaustein **82** verwendet. Wie schon für die pyrimidinreichen Stränge, wurde auch hier bei den RNA-Oligomeren **A7**, **A8**, **A10** und **A12** die in Kap. 3.1.4.6 diskutierte Syntheseroute angewendet; die Oligomeren **A11**, **A12** sowie **A13** wurden ebenfalls mittels Festphasenkupplung nach bereits erfolgter Oligonucleotidsynthese hergestellt (s. Kap. 3.1.5).

Für sämtliche hergestellten RNA-Oligonucleotide lässt sich feststellen, dass es nicht immer möglich war, den Molpeak des ungeladenen Oligomers [M+H] zu detektieren. Stattdessen konnten in den MALDI-Spektren nicht selten verschiedene Salzaddukte gefunden werden. Überwiegend wurde das einfach geladene Natriumaddukt, sowie das ebenfalls einfach geladene Ammoniumaddukt des entsprechenden Oligomers detektiert. Beim Oligomer **A7**, dem Spermin-Addukt, wurde als 100 %-Peak das zweifache Natriumaddukt gefunden.

Da die Synthesestrategie der Festphasenkupplung nach erfolgter Oligonucleotidsynthese auch auf den 7*N*-Purin-Baustein **110** ausgeweitet wurde (vgl. Kap. 3.1.5), konnten somit auch purin- und pyrimidinreiche RNA-12mere, die diesen 7*N*-Purin Baustein inklusive einer 2'-O-Modifikation beinhalten, hergestellt werden.

Tabelle 4: Synthetisierte Oligonucleotide mit dem 7*N*-Purinbaustein **109**. Alle Stränge wurde nach der in Kap. 3.1.5 vorgestellten Festphasenmethode hergestellt. Lys = Lysin, Arg = Arginin

Kürzel	Sequenz	Modifikation	Masse ber. [Da]	Masse gef. [Da]
P1	3' - UUC UUX CUU UUC - 5'	2'-O-AP-Lys	3804.12	3802.85
P2	3' - UUC UUX CUU UUC - 5'	2'-O-AP-Arg	3832.12	3830.26
P3	5' - AAG AAX GAA AAG - 3'	2'-O-AP-Lys	4108.52	4126.03
P4	5' - AAG AAX GAA AAG - 3'	2'-O-AP-Arg	4136.52	4132.49

Wie bereits erwähnt, wurden neben den RNA-12meren auch 21mere hergestellt, mit denen im Rahmen einer Projektkooperation (EU-RIGHT – Projekt) die biologischen Eigenschaften der modifizierten siRNA-Stränge untersucht werden sollten.

Als Targetsequenz wurde eine siRNA gewählt, die gegen ein etablierte Sequenz aus der eGFP mRNA gerichtet ist.^[136, 183] Alle Modifikationen wurden in den antisense-Strang (auch guide-Strang genannt) dieser siRNA mit folgender Sequenz eingebaut:



Der Einbau der modifizierten universellen Nucleosidbausteine erfolgte an der Stelle des letzten Adenosin-Nucleosids am 5'-Ende der Sequenz. Dieser Idee liegt zugrunde, dass an dieser Position zum einen Modifikationen besonders gut toleriert werden, zum anderen sich eine Destabilisierung des siRNA-Duplexes, bedingt durch den Einbau des nicht-natürlichen Nucleosids, von Vorteil für die leichtere Entwindung des Duplexes durch das Enzym Dicer auswirkt.^[50, 58] Dadurch könnte sich die spezifische Aufnahme des antisense-Stranges durch den RIS-Komplex erhöhen, wodurch sich eine Steigerung des RNAi-knock-down erzielen ließe.^[50] In Tabelle 5 sind die für diese Zwecke hergestellten siRNA-antisense-Stränge aufgeführt:

Tabelle 5: Synthetisierte siRNA-21mere aus der antisense – Sequenz von eGFP. Alle Modifikationen besitzen 4,6-Difluorbenzimidazol als Nucleobase. AP = Aminopropyl, CE = Cyanoethyl, Lys = Lysin, Arg = Arginin, Laur = Laurinsäure.

Kürzel	Sequenz	Modifikation	Masse ber. [Da]	Masse gef. [Da]
AS1	3'-CGCUGCAUUUGCCGGUGUUCA-5'	keine	6641.99	6648.04
AS2	3'-CGCUGCAUUUGCCGGUGUUCX-5'	2'-O-AP	6719.90	6735.62
AS3	3'-CGCUGCAUUUGCCGGUGUUCX-5'	2'-O-CE	6715.87	6721.39
AS4	3'-CGCUGCAUUUGCCGGUGUUCX-5'	2'-O-AP-Lys	6847.57	6845.70
AS5	3'-CGCUGCAUUUGCCGGUGUUCX-5'	2'-O-AP-Arg	6875.97	6822.91
AS6	3'-CGCUGCAUUUGCCGGUGUUCX-5'	2'-O-AP-Laur	6905.07	6912.59

Für das 21mer **AS2** wurde – wie schon bei den entsprechenden 12meren (s.o.) – der Nucleosidbaustein **82** mit einer Trifluoracetylgeschützten 2'-O-Aminopropyl-Modifikation verwendet. Beim 21mer **AS5** wurde die Arginin-Modifikation gemäß der in Kap. 3.1.5 vorgestellten Festphasensynthese nach erfolgter Oligonucleotidsynthese an den 2'-O-Aminopropyl-Linker angeknüpft. Das Tritelprotokoll dieser Synthese ist in Abbildung 22, links, dargestellt. Im MALDI-Massenspektrum konnte als 100 %-Peak das zweifache Natriumaddukt detektiert werden.

3.3 Spektroskopische Untersuchungen der Oligonucleotide

Die in Kap. 3.2 vorgestellten synthetisierten RNA-12mere wurde zu spektroskopischen Untersuchungen herangezogen. Dadurch sollte der Einfluss der unterschiedlichen 2'-Modifikationen innerhalb der pyrimidin- bzw. purinreichen Sequenzen untersucht werden. Es fanden zwei wichtige Methoden zur Untersuchung von Oligonucleotiden Anwendung:

- 1.: UV-Spektroskopie zur Aufnahme von Schmelzkurven
- 2.: CD-Spektroskopie zur Analyse der Sekundär- und Tertiärstruktur

Beide Methoden werden im Folgenden kurz vorgestellt und die erzielten Ergebnisse werden diskutiert.

3.3.1 UV-Spektroskopie

Unter Zuhilfenahme der UV-Spektroskopie lassen sich wichtige Erkenntnisse über die thermodynamische Stabilität eines Nucleinsäure-Duplexes gewinnen. So lässt sich mit dieser Methode der sog. Schmelzpunkt (T_m) eines Duplexes ermitteln. Unter dem Schmelzpunkt eines Duplexes versteht man die Temperatur, bei der genau die Hälfte der Moleküle einer Probe noch als Duplex vorliegen; die andere Hälfte ist bei dieser Temperatur schon aufgeschmolzen und liegt folglich als Einzelstrang vor.^[179] Der T_m -Wert ist daher ein charakteristischer Parameter für die thermodynamische Stabilität eines Duplexes und ein wichtiges meßbares Kriterium. Dieser Meßmethode liegt die Änderung der Extinktion im Laufe des Übergangs vom Doppel- zum Einzelstrang zugrunde. Durch die Erhöhung der Temperatur im Laufe einer Messung wird der RNA-Duplex aufgeschmolzen wobei sich durch die Änderung der Basenstapelungswechselwirkungen der Nucleobasen auch deren Extinktion verändert. Bei einem Übergang von der geordneten Struktur (Duplex) in eine ungeordnete Struktur (Einzelstrang als Knäuel) nimmt die Extinktion zu – man spricht hierbei von der sog. Hyperchromizität. Beim Auftragen der Temperatur gegen die Extinktion verläuft dieser Übergang nicht linear, sondern bildet einen sigmoidalen Kurvenverlauf, an dessen Wendepunkt sich der bereits erwähnte T_m -Wert, also der Schmelzpunkt des RNA-Duplexes

befindet. Dieser Schmelzpunkt ist im wesentlichen von der Länge, der Sequenz, aber auch von der Salzkonzentration und dem pH-Wert der Probenlösung abhängig.^[184] So steigt der Schmelzpunkt etwa mit der Salzkonzentration der Lösung. Desweiteren ist das Ausmaß der Änderung der Extinktion wellenlängenabhängig. Das Hypochromizitätsmaximum eines A-T-Basenpaares liegt etwa bei 260 nm, während es bei G-C-Basenpaaren bei 276 nm liegt.^[185] Aus diesem Grund findet die Aufnahme der Schmelzkurven in diesem Wellenlängenbereich statt.

Charakteristisch für das Schmelzen von Nucleinsäurestrukturen ist die Kooperativität dieses Prozesses.^[186] Demnach übt ein Nucleosid direkten Einfluß auf die Konformation seines Nachbarn aus. Wird daher ein Basenpaar durch die Erhöhung der Temperatur getrennt, so lösen sich auch die Wasserstoffbrückenbindungen des Nachbarpaares schnell auf; dies bewirkt einen dem Öffnen eines Reißverschlusses ähnlichen Effekt der Aufbrechung des Duplexes. Eine wichtige Folge der Kooperativität des Schmelzvorgangs ist die Tatsache, dass kurze Oligonucleotid-Komplexe entweder nur in komplett geordneten, nativen Strukturen, oder aber in gänzlich ungeordneten, denaturierten Strukturen vorliegen können. Dieser Befund wird allgemein als „Alles-oder-Nichts“-Modell bezeichnet und bildet eine wichtige Grundlage in der theoretischen Beschreibung zur Thermodynamik der Schmelzvorgängen von Oligonucleotiden.^[187] Grundsätzlich lässt sich sagen, je höher der gemessene Schmelzpunkt eines Nucleinsäure-Duplexes ist, desto stabiler ist auch seine Struktur. Durch bestimmte Annahmen und Kalkulationen, die im Rahmen des „Alles-oder-Nichts“-Modells getroffen werden können, lassen sich auch die thermodynamischen Größen ΔH^0 , ΔS^0 sowie ΔG^0 als gute Näherungen ermitteln.^[188]

Für eine exakte T_m -Wert Bestimmung und vor allem für eine gute Vergleichbarkeit der daraus gewonnenen thermodynamischen Daten muss die Aufnahme der Schmelzkurven unter standardisierten Bedingungen stattfinden. Alle im Folgenden vorgestellten Messresultate wurden in einer Pufferlösung mit 10 mM Phosphat- und 140 mM Natriumchloridkonzentration bei einem pH-Wert von 7.0 aufgenommen. Alle Messungen wurden an einem Spectralphotometer (Mod. V650) der Fa. Jasco durchgeführt. Zur Auswertung der Messungen wurde die Software SpectraManager Vers. 2.0 von Jasco verwendet.

Die exakte Vorgehensweise für das Aufnehmen einer Schmelzkurve mit einem modifizierten RNA-12mer aus Tab. 2, 3 od. 4 lässt sich aus Kap. 5.3 im Experimentellen Teil entnehmen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene RNA-12mere, wie sie in Kap. 3.2.2 vorgestellt worden sind, für die UV-spektroskopischen Untersuchungen herangezogen. Es handelt sich

dabei um nicht selbstkomplementäre Oligonucleotide, weshalb der Übergang vom Duplex zu den Einzelsträngen stets von bimolekularer Natur war. Bei jeder durchgeführten Messreihe wurde als Referenz ein Duplex aus den beiden unmodifizierten 12meren **A1** und **U1** mitgemessen. Hierbei handelt es sich um einen Watson-Crick *match* Duplex – also um einen RNA-Duplexstrang, der über das natürliche Hybridisierungsmuster von A-U bzw. G-C Basenpaaren verfügt.

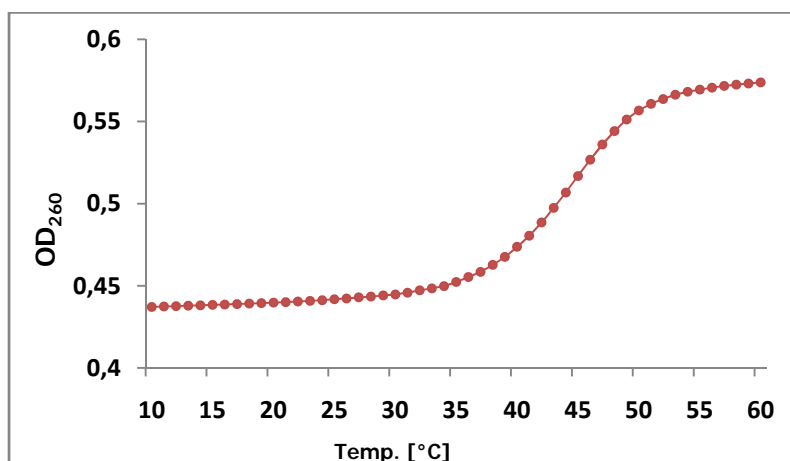


Abbildung 25: Gemessene Schmelzkurve des unmodifizierten Duplexes aus **U1** und **A1**. Der ermittelte Schmelzpunkt liegt bei 44,7°C.

Abbildung 25 zeigt die gemessene Schmelzkurve des Duplexes aus den beiden 12mer-Strängen **A1** und **U1**, die beide unmodifiziert sind. Nach Berechnung des Schmelzpunktes, was mithilfe der Software SigmaPlot 8.0 erfolgte, wurde für diesen Duplex – und damit für das Watson-Crick A-U - Basenpaar – ein T_m -Wert von 44,7°C ermittelt. Ausgehend von diesem Wert wurde für alle im Folgenden diskutierten monomodifizierten RNA-12mer-Stränge der Temperaturunterschied (ΔT_m) zum A-U Basenpaar angegeben. Insgesamt sollte durch die durchgeführten Messungen in erster Linie der Einfluß des unterschiedlichen 2'-O-Substitutionsmusters der monomodifizierten RNA-12mere auf die thermodynamische Stabilität untersucht werden. Als Grundlage dienten die in den Arbeiten von Parsch^[87] und Klöpffer^[90] beschriebenen Ergebnisse, nach denen das 4,6-Difluorbenzimidazol - Nucleosid als universelles Nucleosid betrachtet werden kann (siehe auch Kap. 1.2.3). Ebenso wurde bereits die 2'-O-Aminoethyl-Modifikation beim 4,6-Difluorbenzimidazol-Nucleosid in diesem Kontext untersucht,^[90] für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde

dennoch der gleiche Nucleosidbaustein **65** synthetisiert und als Modifikation in die 12mer-Sequenzen inkorporiert (**A3** bzw. **U3**).

Da aufgrund der von Klöpffer erzielten Resultaten davon ausgegangen werden kann, dass eine 2'-O-Modifikation den universellen Charakter des 4,6-Difluorbenzimidazol-Nucleosids nicht weiter beeinträchtigt,^[90, 100] wurden diesbezüglich keine weiteren Untersuchungen unternommen. Es fanden daher ausschließlich die Untersuchungen der RNA-12mere aus Tab. 2 bzw. 3 statt, in denen diese mit dem jeweiligen unmodifizierten komplementären 12mer-Strang (entweder **A1** oder **U1**) zum Duplex hybridisiert wurden.

Aus den ermittelten T_m -Werten konnten ausserdem weitere thermodynamische Daten bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde die in der Arbeit von J. Parsch erläuterte Methode nach dem van't Hoff Plot angewendet.^[87] Hierbei kann ausgehend von einer graphischen Auftragung von $R \ln K$ gegen $1/T$ (R = ideale Gaskonstante; K = Gleichgewichtskonstante am Punkt $T = T_m$) durch die Gleichung:

$$R \ln K = - \Delta H^0 \cdot 1/T + \Delta S^0$$

die Änderung der freien Enthalpie $-\Delta H^0$ als Steigung der Geraden sowie die Änderung der Entropie ΔS^0 als deren Ordinatenabschnitt ermittelt werden.^[187] Da im Rahmen dieser Methode einige Näherungen getroffen werden bzw. das Anfitten der Kurve auf Kosten von Genauigkeitsverlusten verläuft, sind die thermodynamischen Werte, die auf diese Weise erhalten werden, Fehler behaftet. In erster Linie ist ein Vergleich dieser Werte nur innerhalb eines unter gleichen Bedingungen gemessenen Datenensembles möglich. Selbst dann bieten diese Daten nur eine grobe Abschätzung der vorliegenden Zustandsänderung des Duplexes. Aus den ΔS^0 bzw. ΔH^0 – Werten kann man zudem die Änderung der freien Energie ΔG^0 durch die Formel

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

berechnet werden. Dieser Wert kann als „Änderung der Stabilitätsenergie“ des Überganges vom geordneten Zustand in den ungeordneten Zustand angesehen werden und liefert damit ein – wenn auch nicht absolutes – Maß für die Stabilität eines Duplexes. Die Bestimmung der Schmelzpunkte sowie die Berechnung der thermodynamischen Daten erfolgte durch computerunterstützte Anpassung unter Verwendung des Programms SigmaPlot 8.0.^[189]

In Tabelle 6 sind sämtliche thermodynamischen Werte für die modifizierten pyrimidinreichen Stränge dargestellt.

Tabelle 6: Schmelzpunkte und daraus ermittelte thermodynamische Daten der RNA-Duplexe aus den monomodifizierten pyrimidinreichen 12meren mit jeweils unmod. Gegenstrang (A1); T = 298 K, Fehler für ΔH^0 und $T\Delta S^0 \pm 5\%$, ΔG^0 8 %.

Kürzel	Modifikation	T_m -Wert [°C]	ΔT_m [°C]	ΔH^0 [kcal/mol]	$T\Delta S^0$ [kcal/mol]	ΔG^0 [kcal/mol]
U1	keine	44.7 ± 0.2	-----	98.3	84.3	14.0
U2	2'-OH	28.5 ± 0.2	16.2	82.7	73.6	9.1
U3	2'-O-AE	27.3 ± 0.2	17.4	67.8	59.2	8.6
U4	2'-O-AP	27.6 ± 0.4	17.1	73.3	64.4	8.9
U5	2'-O-CE	28.5 ± 0.5	16.2	86.5	77.1	9.4
U6	2'-O-GE	27.4 ± 0.2	17.3	70.1	61.4	8.7
U7	2'-O-AP-Spe	27.3 ± 0.3	17.4	68.9	60.9	8.0
U8	2'-O-AP-Lys ¹	28.3 ± 0.2	16.4	77.2	68.3	8.9
U9	2'-O-AP-Lys ²	28.4 ± 0.4	16.3	79.0	69.9	9.1
U10	2'-O-AP-Arg ¹	28.5 ± 0.3	16.2	82.5	73.6	8.9
U11	2'-O-AP-Arg ²	28.1 ± 0.4	16.6	86.2	77.2	9.0
U12	2'-O-AP-Laur ¹	29.4 ± 0.4	15.3	91.1	81.5	9.6

Im Vergleich der T_m -Werte von Tabelle 6 fällt auf, dass diese innerhalb der modifizierten Stränge **U2** bis **U12** kaum signifikant voneinander abweichen. Während überraschenderweise gerade die sterisch anspruchsvolle 2'-O-Aminopropylaurinsäure-Modifikation (Duplex **U12/A1**) mit 29.4°C den höchsten T_m -Wert innerhalb dieser Reihe besitzt, liegt der T_m -Wert der Spermin-Modifikation (Duplex **U7/A1**) – zusammen mit der Aminoethyl-Modifikation (Duplex **U3/A1**) – mit 27.3°C am niedrigsten, weicht aber nur um 2.1°C von der Laurinsäure-Modifikation ab. Alle anderen monomodifizierten Stränge befinden sich mit ihrem T_m -Wert innerhalb dieser Spanne. Zwischen der 2'-O-Aminoethyl-, der 2'-O-Aminopropyl- und der 2'-O-Cyanoethyl-Modifikation lassen sich daher ebenfalls keine wesentlichen Stabilisierungsunterschiede ausmachen. Insgesamt jedoch destabilisieren sämtliche monomodifizierten Oligonucleotide den RNA-Duplex erheblich; im Vergleich zum unmodifizierten Duplex aus **U1/A1** liegt die durchschnittliche Destabilisierung dieser Meßreihe bei 16.6°C. Selbst der Duplex aus dem 2'-O-unmodifizierten 4,6-Difluorbenzimidazol-Nucleosid **U2/A1** weicht im

T_m -Wert nicht von den 2'-O-modifizierten Duplexen ab. Dieser Befund steht im Einklang mit dem von J. Bozilovic gefundenen T_m -Wert von 28.4°C für das gleiche Basenpaar aus dem 4,6-Difluorbenzimidazol-Nucleosid und dem natürlichen Adenosin.^[91]

In Abbildung 26 sind die gemessenen T_m -Werte aus Tab. 6 als Balkendiagramm graphisch dargestellt.

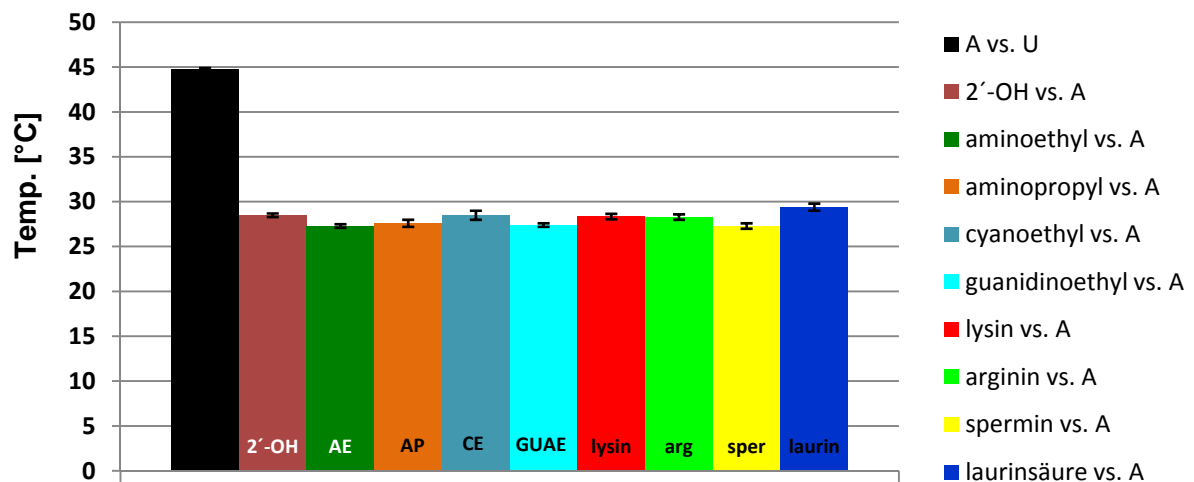


Abbildung 26: Balkendiagramm zu den T_m -Werten aus Tab. 6. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Werte der unterschiedlich hergestellten Lysin bzw. Arginin-Modifikationen (**U8**, **U9** bzw. **U10**, **U11**) gemittelt und vereinigt.

Da auch sämtliche 2'-O-modifizierten 4,6-Difluorbenzimidazol-Bausteine in purinreiche RNA-12mere eingebaut wurden (s. Tab. 3), wurde nach deren Hybridisierung mit dem unmodifizierten Gegenstrang **U1** von diesen Duplexen ebenfalls Schmelzkurven aufgenommen. Die dadurch erhaltenen Resultate finden sich in Tabelle 7 wieder.

Tabelle 7: Schmelzpunkte und daraus ermittelte thermodynamische Daten der RNA-Duplexe aus den monomodifizierten purinreichen 12meren mit jeweils unmod. Gegenstrang (**U1**); T = 298 K, Fehler für ΔH^0 und $T\Delta S^0 \pm 5\%$, ΔG^0 8 %.

Kürzel	Modifikation	T_m -Wert [°C]	ΔT_m [°C]	ΔH^0 [kcal/mol]	$T\Delta S^0$ [kcal/mol]	ΔG^0 [kcal/mol]
A1	keine	44.7 ± 0.2	-----	98.3	84.3	14.0
A2	2'-OH	30.5 ± 0.6	14.2	87.5	77.5	10.0
A3	2'-O-AE	28.3 ± 0.4	16.4	83.4	74.8	8.6
A4	2'-O-AP	29.0 ± 0.3	15.7	77.8	69.0	8.8
A5	2'-O-CE	29.8 ± 0.6	14.9	74.1	64.9	9.2
A6	2'-O-GE	30.2 ± 0.3	14.5	74.3	65.1	9.2
A7	2'-O-AP-Spe	25.3 ± 0.5	19.4	87.2	78.7	8.5
A8	2'-O-AP-Lys ¹	30.3 ± 0.5	14.4	88.6	79.5	9.1
A9	2'-O-AP-Lys ²	29.9 ± 0.5	14.8	90.5	81.2	9.3
A10	2'-O-AP-Arg ¹	29.1 ± 0.2	15.6	76.9	68.0	8.9
A11	2'-O-AP-Arg ²	29.0 ± 0.3	15.7	79.1	70.0	9.1
A12	2'-O-AP-Laur ¹	29.4 ± 0.2	15.3	81.4	72.5	8.9

Auch bei dieser Messreihe fällt auf, dass die Abweichungen der T_m -Werte innerhalb der einzelnen Modifikationen äußerst gering ausfallen. Der höchste T_m -Wert dieser Reihe konnte für das 2'-O-unmodifizierte DFBi-Nucleosid (Duplex **A2/U1**) mit 30.5°C ermittelt werden. Der niedrigste Schmelzpunkt wurde für die 2'-O-Aminopropyl-Spermin-Modifikation (Duplex **A7/U1**) mit 25.3°C erhalten. Erneut lässt sich jedoch feststellen, dass alle monomodifizierten Duplexe im Vergleich zum unmodifizierten Duplex **U1/A1** über eine deutlich Destabilisierung verfügen (Mittelwert ΔT_m : 15.5°C). Dieser Wert liegt jedoch um etwa 1°C niedriger, als bei der Messreihe der monomodifizierten pyrimidinreichen Oligonucleotide. Sehr wahrscheinlich sorgen die Basenstapelungswechselwirkungen innerhalb des purinreichen 12mers mit dem Purin-Analogon 4,6-Difluorbenzimidazol für eine bessere Überlappung der π -Bindungen. Im Gegensatz dazu ist das π -stacking im purinreichen 12mer durch den Einbau dieses universellen Nucleosidbausteins gestört, weshalb sich dieser Unterschied in der Destabilisierung dieser Duplexe feststellen lässt. Dieser Effekt ist zwar recht gering, kann jedoch offensichtlich nicht durch 2'-O-Modifikationen egalisiert werden. Der niedrige T_m -Wert der Spermin-Modifikation (Duplex **A7/U1**) lässt sich vermutlich auf

die Störung der helicalen RNA-Struktur durch den sperrigen 2'-O-Rest des modifizierten Nucleosidbausteins zurückführen; weshalb er innerhalb dieses Oligomers im Vergleich zum pyrimidinreichen 12mer stärker ins Gewicht fällt, kann allerdings nicht beantwortet werden.

Ein Balkendiagramm der gemessenen T_m -Werte von Tab. 7 findet sich in nachfolgender Abbildung 27 wieder:

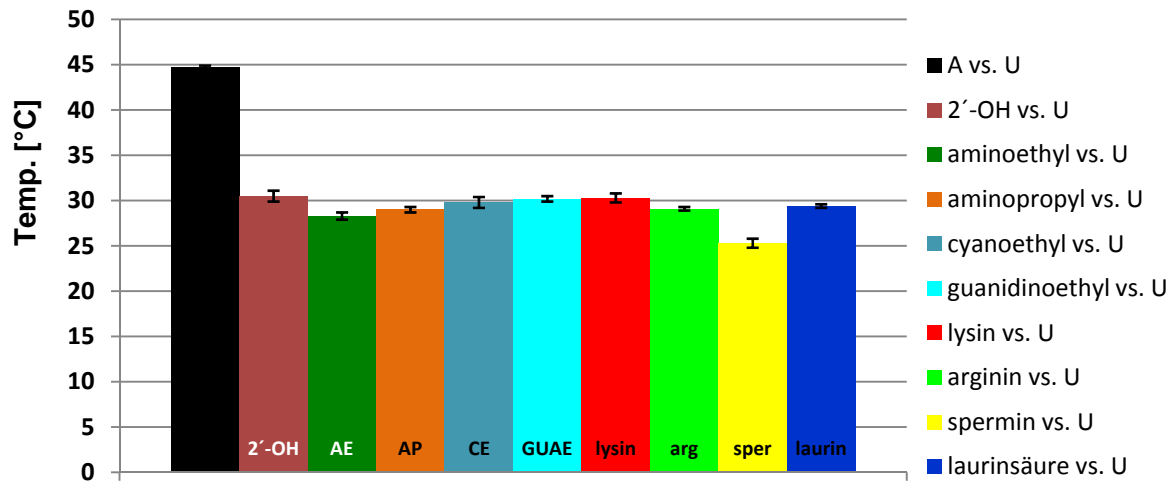


Abbildung 27: Balkendiagramm zu den T_m -Werten aus Tab. 7. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Werte der unterschiedlich hergestellten Lysin bzw. Arginin-Modifikationen (**A8**, **A9** bzw. **A10**, **A11**) gemittelt und vereinigt.

Auch mit den 7*N*-Purin-Nucleosidbausteinen wurden – wie schon in Kap. 3.1.5 bzw. 3.2.2 erwähnt – 12mere mit 2'-O-Modifikationen hergestellt. Dabei handelte es sich jeweils um ein purin- bzw. ein pyrimidinreiches RNA-12mer mit einer 2'-O-Aminopropyllysin und einer 2'-O-Aminopropylarginin-Modifikation (s. Tab. 4). Diese 12mere wurden ebenfalls mit dem unmodifizierten Gegenstrang (entweder **A1** oder **U1**) zum Duplex hybridisiert und es wurde der Anstieg der Extinktion in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen. Die hierdurch erhaltenen Schmelzkurven sind in Abbildung 28 dargestellt. Alle daraus gewonnenen Daten sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

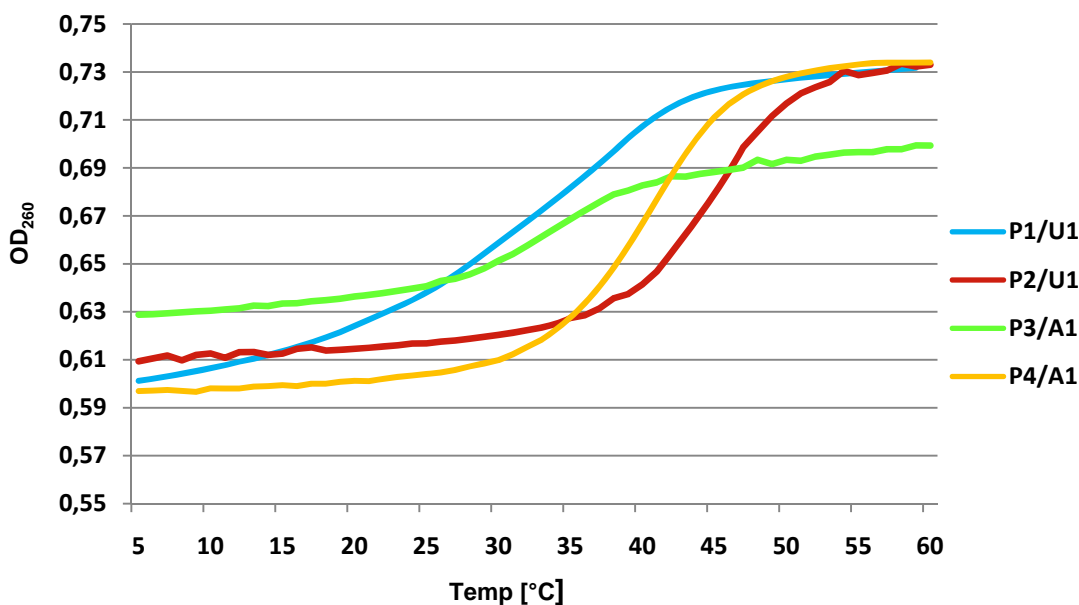


Abbildung 28: Schmelzkurven für die 7N-Purin-modifizierte 12mer Duplexe (vgl. Tab. 8)

Tabelle 8: Schmelzpunkte und daraus ermittelte thermodynamische Daten der RNA-Duplexe aus den monomodifizierten 12meren mit dem 7N-Purin-Baustein. **P1** und **P2** wurden jeweils mit **U1** hybridisiert, **P3** und **P4** wurden mit **A1** hybridisiert. $T = 298 \text{ K}$, Fehler für ΔH^0 und $T\Delta S^0 \pm 5 \%$, $\Delta G^0 \pm 8 \%$.

Kürzel	Modifikation	T_m -Wert [°C]	$\Delta-T_m$ [°C]	ΔH^0 [kcal/mol]	$T\Delta S^0$ [kcal/mol]	ΔG^0 [kcal/mol]
P1	2'-O-AP-Lys	36.5 ± 0.4	8.2	73.8	62.3	11.5
P2	2'-O-AP-Arg	45.2 ± 0.3	0.5	89.8	73.9	15.9
P3	2'-O-AP-Lys	33.2 ± 0.3	11.5	83.1	73.6	9.5
P4	2'-O-AP-Arg	40.6 ± 0.3	4.1	90.1	77.4	12.7

In dieser Meßreihe besitzen alle modifizierten Duplexe höhere Schmelzpunkte und damit eine höhere Stabilität als die analog modifizierten 4,6-Difluorbenzimidazol-Oligonucleotide (vgl. Tab. 6 bzw. 7). Besonders der Duplex aus **P2/U1**, der eine 2'-O-Aminopropylarginin Modifikation trägt, besitzt mit 45.2°C den höchsten aller hier gemessenen Schmelzpunkte. Dieser liegt sogar noch etwas höher, als der des unmodifizierten Duplexes aus **U1/A1** (44.7°C). Wird dieselbe Modifikation in den pyrimidinreichen Strang inkorporiert (**P4**) und mit dem unmodifizierten purinreichen Gegenstrang **A1** hybridisiert, liegt der Schmelzpunkt mit 40.6°C zwar immernoch recht hoch, ist aber doch 4.6°C unterhalb des Duplexes aus

P2/U1. Dieser Befund lässt sich ebenfalls durch die bereits erwähnte verringerte Stabilität aufgrund der schwächeren Basenstapelungswechselwirkungen des 7*N*-Purin-Nucleosids mit seinen Pyrimidinnachbarn erklären (s.o.). Der Stabilitätsunterschied zwischen der Lysin- und der Argininmodifikation ist sehr deutlich. Wodurch dieser zustande kommt, lässt sich nicht beantworten, zumal ein ähnlicher Effekt im Falle der 4,6-Difluorbenzimidazol-Nucleoside nicht beobachtet werden konnte. Da ein 2'-O-unmodifizierter 7*N*-Purin-Baustein bereits in der Arbeit von J. Bozilovic untersucht wurde, fällt im Vergleich hierzu auf, dass die Modifikationen einen erheblichen Beitrag zur Duplex-Stabilität leisten.^[91]

Um letztlich präzisere Aussagen und klare Erklärungen für das Verhalten der modifizierten 7*N*-Purin-Nucleoside im Rahme dieser Duplex-Stabilitätsmessungen machen zu können, sind sicherlich weitere Untersuchungen mit anderen 2'-O-modifizierten 7*N*-Purin-Nucleosiden erforderlich.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich im Falle der 2'-O-modifizierten 4,6-Difluorbenzimidazol-Nucleoside keine Beiträge der Modifikationen zur Duplexstabilität erkennen lassen. Vielmehr liegen sämtliche monomodifizierten Duplexe innerhalb eines recht homogenen Schmelzbereiches von ca. 29°C. Zwischen den durch herkömmliche Peptidkupplung hergestellten 2'-O-modifizierten-Nucleosidbausteine und den mittels Festphasenkupplung synthetisierten Oligonucleotidkonjugate sind keine nennenswerten Unterschiede in der Duplexstabilität festzustellen (vgl. z.B. Duplexe **U8/A1**, **U9/A1**, Tab.6 mit Lysin Modifikation oder Duplexe **A10/U1**, **A11/U1** mit Arginin Modifikation, Tab.7). Dies lässt den Schluss zu, dass man mittels Kupplung an der festen Phase vergleichbar gute modifizierte Oligonucleotid-Konjugate erhält.

Im Falle der 7*N*-Purin-Nucleosidbausteine ließen sich recht vielversprechende Resultate in den thermodynamischen Untersuchungen der RNA-Duplexe vorfinden – diese bedürfen aber noch einer weiteren experimentellen Evaluierung.

Abschließend sollte hier Erwähnung finden, dass im Vergleich zu den von Klöpffer bzw. Parsch gefundenen thermodynamischen Werten des 4,6-Difluorbenzimidazol-Nucleosids in dieser Arbeit erhebliche Abweichungen bestanden; so wurde beispielweise auch in diesen früheren Arbeiten ein Schmelzpunkt von 37.8°C für den unmodifizierten Duplex aus **U1/A1** angegeben. Als mögliche Begründung für diese Unterschiede lässt zu vorwiegend das veränderte Testsystem erwähnen: Im Rahmen dieser Arbeit wurde an einem neuen UV-Spektrometer der Fa. Jasco gearbeitet, dieser lieferte reproduzierbar die hier vorgestellten Resultate.

3.3.2 CD –Spektroskopie^[190]

Aus den in Kap. 3.3.1 gewonnenen Daten der UV-spektroskopischen Untersuchungen der monomodifizierten RNA-12mere lassen sich Rückschlüsse auf deren Stabilität ziehen – die sich wiederum auf den Einfluss der jeweiligen 2'-O-Modifikation übertragen lassen.

Ein weiteres wichtiges Kriterium zur Beurteilung eines modifizierten Oligonucleotides ist dessen strukturelle Veränderung, welche möglicherweise durch den Einbau von modifizierten Nucleosiden verursacht wird.

Um RNA-Oligonucleotide im Kontext der RNA-Interferenz therapeutisch zu nutzen, bzw. um überhaupt aktive siRNA-Oligomere vorliegen zu haben, ist eine definierte RNA Struktur wesentliche Voraussetzung. Es konnte hierbei hinlänglich gezeigt werden, dass RNA-Oligonucleotide nur dann eine RNA-Interferenz-Aktivität besitzen, wenn sie im Doppelstrang als sog. A-Helix vorliegen.^[58] Um die gewünschten Informationen zur Struktur von RNA, vor allem wenn diese synthetisch modifiziert vorliegt, zu erhalten, bedient man sich in erster Linie der Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie.

Bei dieser spektroskopischen Messmethode nutzt man die Wechselwirkung von zirkular polarisiertem Licht mit optisch aktiven Molekülen. Diese absorbieren z.B. zirkular rechts polarisiertes Licht stärker als zirkular links polarisiertes Licht. Als Meßgröße wird bei dieser Methode die sog. wellenlängenabhängige Elliptizität Θ_λ als Funktion der Wellenlänge λ aufgetragen, wodurch man ein CD-Spektrum erhält.^[179, 190] Die Elliptizität Θ_λ ist über die Intensität des rechts- bzw. linkspolarisierten Lichts nach dem Absorptionsvorgang definiert und lässt sich über das Lambert-Beer'sche Gesetz aus den Extintionskoeffizienten der Probe berechnen. Bei solchen Messungen erhält man für die Elliptizität Θ_λ sowohl positive als auch negative Werte. Man spricht dann je nach Vorzeichen von einem positiven bzw. einem negativen Cotton-Effekt.^[179]

Gerade für optisch aktive Biomakromoleküle wie Proteine und Nucleinsäuren eignet sich diese Messmethode gut, um strukturelle Informationen zu diesen Molekülen zu erhalten. Bei Nucleinsäure sorgt die Chiralität der Zuckereinheiten für die hierdurch gewonnenen Informationen; sie induzieren den zirkularen Dichroismus in die Absorptionsbanden der chromophoren Nucleobasen. Entscheidender Nachteil dieser Anwendung ist jedoch, dass die CD-Spektroskopie keine genaue Aussage über die vorliegende Struktur liefern kann – es ist lediglich ein Vergleich der Intensitäten und Lagen einzelner Banden mit Spektren bekannter

Strukturen möglich. Ausserdem sind CD-Spektren von Oligonucleotiden sequenzabhängig, weshalb sich die Spektren unterschiedlicher RNA-Sequenzen nicht ohne weiteres vergleichen lassen. Dennoch bietet diese Methode eine Reihe von Vorteilen: In erster Linie sind dabei die recht hohe Empfindlichkeit, die einfache Durchführbarkeit sowie ihre nicht destruktive Natur bei geringer Probenmenge zu nennen.^[191]

Intensive Untersuchungen der Struktur von Nucleinsäuren mithilfe dieser spektroskopischen Methode finden seit etwa Mitte der 60er Jahre des 20. Jahrhunderts statt.^[192-195] Zuverlässige Aussagen über die Sekundär- und Tertiärstrukturen von RNA-Oligonucleotiden finden sich in der Literatur jedoch erst seit etwa 15 Jahren.^[196] So konnte für die typische RNA-A-Helix ein charakteristisches Maximum bei etwa 260 nm sowie ein Minimum bei ca. 240 nm festgestellt werden. Während sich die grundsätzliche Struktur eines RNA-A-Helix-Spektrums nicht verändert, sind kleine Schwankungen der Lage der Maxima und Minima möglich. Anhand dieser bekannten Strukturmerkmale lassen sich die im Rahmen dieser Arbeit aufgezeichneten CD-Spektren vergleichen, wodurch letztlich eine Aussage über das notwendige Vorliegen einer A-Helix Konformation getroffen werden kann.

Zur Aufnahme der CD-Spektren wurde ein J-710 Spektrometer der Fa. Jasco mit thermostatisiertem Küvettenhalter verwendet. Für die Messungen wurden die gleichen Proben wie für die UV-Spektroskopie verwendet. Weitere Details zur Durchführung der Messungen finden sich in Kap. 5.3.

Aus Abbildung 29 lassen sich einige CD-Spektren der Messreihe zu Tab. 6 entnehmen. Hierbei wurden die monomodifizierten pyrimidinreichen RNA-12mere, die im Rahmen der UV-spektroskopischen Untersuchungen mit dem unmodifizierten Gegenstrang **A1** hybridisiert worden sind, bei 20°C vermessen.

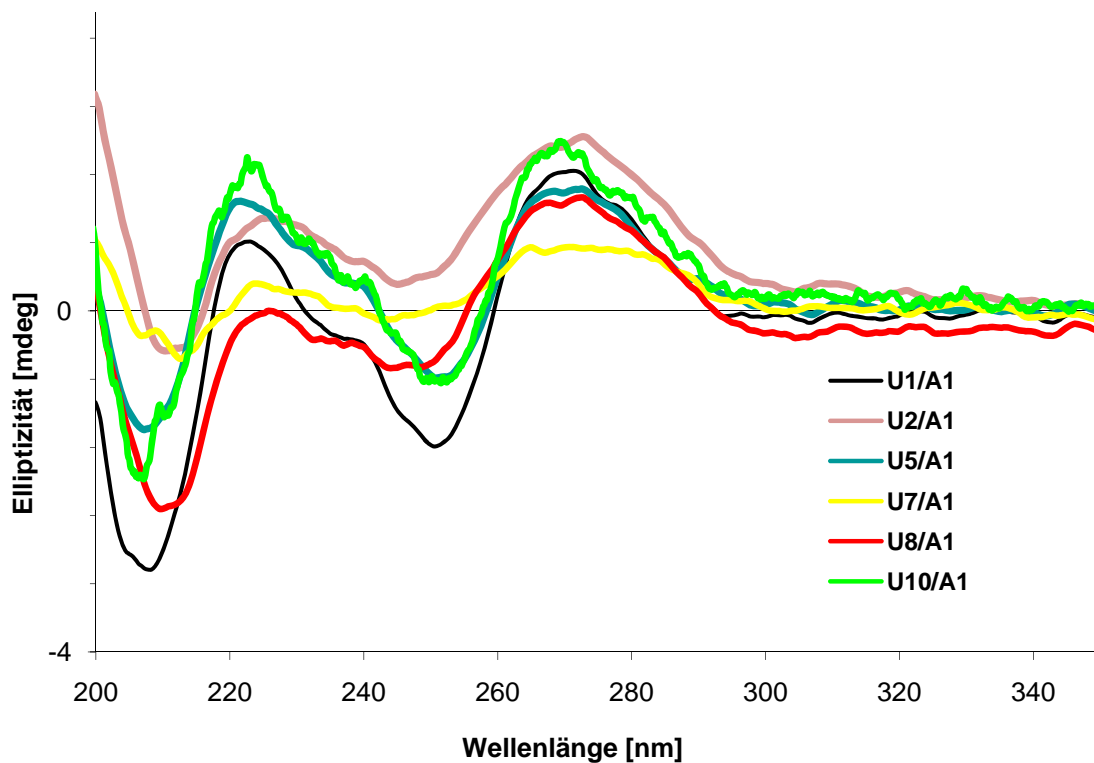


Abbildung 29: Exemplarische CD-Spektren einiger monomodifizierten pyrimidinreichen 12mer-Stränge – der purinreiche Gegenstrang **A1** ist hierbei unmodifiziert. Alle Spektren wurden bei 20°C aufgenommen.

Zum Vergleich wurde auch der komplett unmodifizierte Duplex aus **U1/A1** gemessen (schwarze Kurve). Dieser Duplex entspricht demnach einer nahezu optimalen A-Helix - Struktur. Man kann recht deutlich erkennen, dass die modifizierten Duplexe ebenfalls über diesen Kurvenverlauf verfügen. Zwischen dem Duplex aus **U2/A1**, also einem 4,6-Difluorbenzimidazol-Nucleosid ohne 2'-O-Modifikation und dem Duplex aus **U5/A1**, der 2'-O-Cyanoethyl-Modifikation lassen sich kaum Unterschiede erkennen. Beide Kurven besitzen ein charakteristisches Maximum bei ca. 270 nm sowie ein Minimum bei etwa 210 nm. Auch die 2'-O-Aminopropyllysin-Modifikation (Duplex **U8/A1**) folgt recht gut dem „idealen“ Kurvenverlauf der A-Helix aus **U1/A1**. Lediglich der Duplex **U7/A1**, also die inkorporierte 2'-O-Aminopropylspermin-Modifikation, zeigt eine weniger ausgeprägte Struktur – besitzt aber insgesamt immernoch den gleichen Kurvenverlauf. Diese Resultate lassen sich mit den aus Kap. 3.3.1 gewonnenen Daten der UV-spektroskopischen Untersuchungen recht gut in Einklang bringen. Dort waren für die T_m -Werte kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen modifizierten RNA-Duplexen zu erkennen. Die Ergebnisse der CD-Spektren lässt darauf schließen, dass bei allen Modifikationen eine A-Helix Struktur als solche vorhanden ist, die

einzelnen Modifikationen je nach sterischem Anspruch jedoch gewisse Störungen dieser Struktur verursachen. Inwieweit dies zu den beobachteten Destabilisierungen der Duplexe (bei dieser Messreihe ca. 16.6°C mittlere Erniedrigung des Schmelzpunktes gegenüber den unmodifizierten Duplex aus **U1/A1**) führen kann, lässt sich nicht ohne weiteres beantworten. In Abbildung 30 sind einige CD-Spektren der Messreihe zu Tabelle 7 abgebildet. Es handelt sich hierbei um monomodifizierte purinreiche RNA-12mere, die mit dem unmodifizierten Gegenstrang **U1** hybridisiert worden sind. Auch hier erfolgten die Messungen bei 20°C.

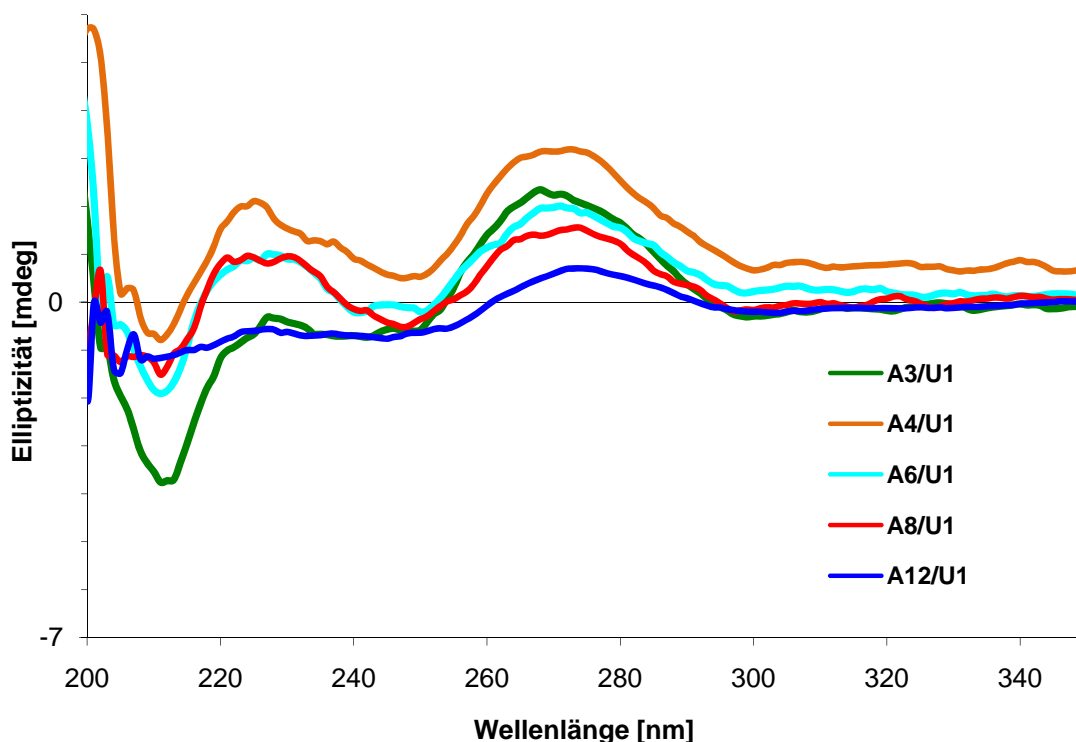


Abbildung 30: Exemplarische CD-Spektren einiger monomodifizierten purinreichen 12mer-Stränge – der pyrimidinreiche Gegenstrang **U1** ist hierbei unmodifiziert. Alle Spektren wurden bei 20°C aufgenommen.

Auch aus diesen Spektren lässt sich die A-Helix Struktur, wie sich idealerweise vom unmodifizierten Duplex **U1/A1** (vgl. Abb. 29) gebildet wird, gut erkennen. Zwischen einem 2'-O-Aminoethyl-modifizierten 12mer (**A3/U1**) und dem mit 2'-O-Aminopropyl modifizierten Duplex (**A4/U1**) lässt sich kein wesentlicher Unterschied im Verlauf des CD-Spektrum erkennen. Auch eine 2'-O-guanidinoethyl-Modifikation (**A6/U1**) folgt der A-Helix Struktur. Allerdings ist bei der 2'-O-Aminopropyllaurinsäure-Modifikation (**A12/U1**) eine sehr ausgeprägte Störung der Kurve ersichtlich: Es lässt sich kein für die A-Helix typisches Minimum bei $\lambda \approx 210$ nm erkennen. Man kann daher davon ausgehen, dass die sterisch

anspruchsvolle Alkylseitenkette dieser Modifikation den A-Helix Verlauf empfindlich stört. Dieser Befund findet in der Auswertung der UV-Schmelzkurven aus Kap. 3.3.1 jedoch keine Bestätigung: Für diesen Duplex wurde ein Schmelzpunkt von 29.4°C ermittelt – damit liegt er um gut 1°C höher als beim Duplex **A3/U1** mit der 2'-O-Aminoethyl-Modifikation. Vermutlich wirkt sich die Störung der Helix-Konformation insgesamt weniger stark auf die thermodynamische Stabilität aus, vor allem in Hinblick der Tatsache, dass für sämtliche modifizierte Duplexe dieser Messreihe eine Destabilisierung nachgewiesen werden konnte. Da die weiterhin untersuchten 7*N*-Purin-modifizierten Duplexe (vgl. Tab. 8) über erstaunlich hohe Schmelzpunkte und damit über eine deutliche geringere Destabilisierung gegenüber dem unmodifizierten Duplex verfügen, war eine CD-spektroskopische Untersuchung dieser Oligomere ebenfalls von Interesse. In nachfolgender Abbildung 31 sind zwei Spektren aus dieser Messreihe dargestellt.

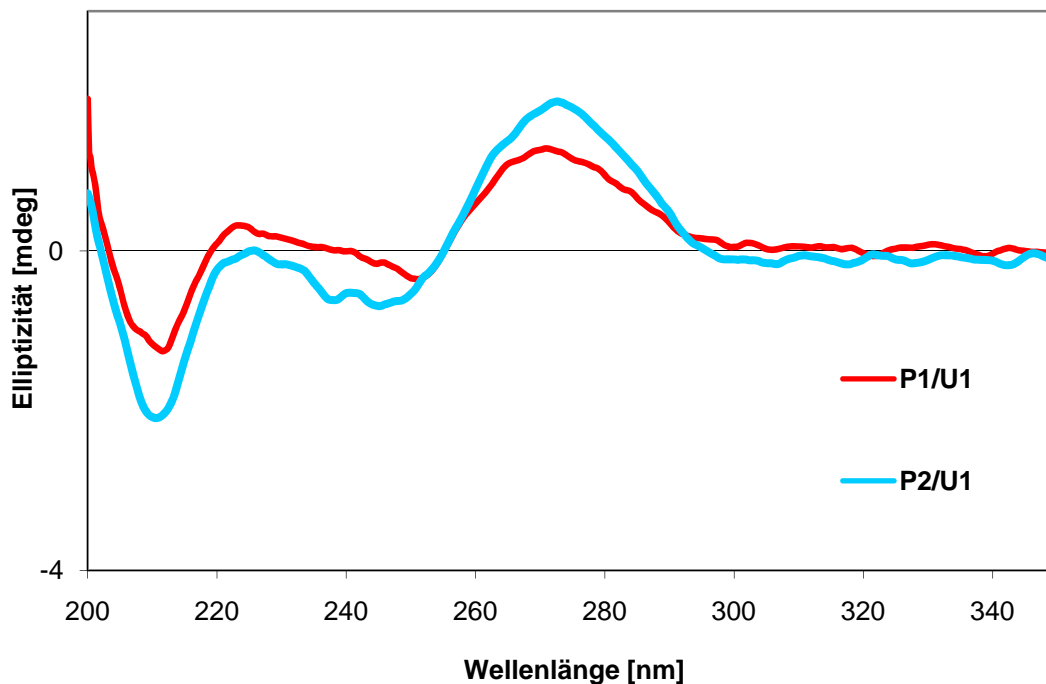


Abbildung 31: CD-Spektren der monomodifizierten purinreichen 12mer-Stränge mit 7*N*-Purinnucleosid. Der Gegenstrang **U1** ist unmodifiziert. Alle Spektren wurden bei 20°C aufgenommen.

Es fällt sofort auf, dass der Duplex **P2/U1** dem Verlauf einer A-Helix (vgl. **U1/A1** aus Abb. 15) sehr gut folgt. Für diesen Duplex, der ein 2'-O-Aminopropylarginin modifiziertes 7*N*-Purin-Nucleosid enthält, konnte auch ein sehr hoher T_m -Wert von 45.2°C ermittelt werden.

Da im Vergleich hierzu der Duplex aus **P1/U1**, also die analoge 2'-O-Aminopropyllysin Modifikation, über eine weniger ausgeprägte A-Helixstruktur zu verfügen scheint, und auch dessen Schmelzpunkt (36.5°C) deutlich niedriger liegt, liegt die Vermutung nahe, dass die sterisch weniger ausgeprägte Guanidinium-Funktion der Argininmodifikation dank ihrer positiven Ladung zu diesem Effekt beitragen kann. Um diese Theorie zu untermauern wären allerdings weitere Untersuchungen mit modifizierten 7*N*-Purin-Nucleosiden notwendig.

Insgesamt kann zu den aufgenommenen CD-Spektren unter Berücksichtigung der eingangs erwähnten Grundlagen und Voraussetzungen folgende Zusammenfassung getroffen werden:

- Grundsätzlich wird die A-Helix Struktur durch den Einbau sterisch wenig anspruchsvoller 2'-O-modifizierter universeller Nucleosidbausteine nur in geringem Maße beeinflusst – dies lässt sich auch durch früher gemachten Untersuchungen im Arbeitskreis von Prof. Engels bekräftigen.
- Ein genereller Einfluss einer strukturellen Störung der A-helicalen Konformation auf die thermodynamische Stabilität kann anhand der hier durchgeführten Experimente nicht ohne Weiteres gefunden werden. Hierfür wäre die Untersuchung z.B. von unterschiedlich langen RNA-Oligomeren oder der Einbau mehrerer modifizierter Nucleoside in einen Strang notwendig.
- Da im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen davon ausgegangen werden kann, dass die eingeführte 2'-O-Aminopropyl-Modifikation nur sehr geringen Einfluss auf die Gesamtkonformation einer RNA-Helix ausübt, lässt sich eine Anwendung solchartig modifizierter RNA-Nucleosidbausteine im Hinblick auf RNA-Interferenz-Untersuchungen rechtfertigen.

3.4 Untersuchungen modifizierter siRNAs in biologischen Assays

Wie bereits in Kap. 3.2.2 angedeutet, war neben der Synthese und der spektroskopischen Untersuchungen von modifizierten RNA-12meren auch die Synthese modifizierter siRNAs ein wesentlicher Aspekt dieser Arbeit.

Im Rahmen einer Zusammenarbeit im Sonderforschungsbereich 579 mit der Arbeitsgruppe von Dr. S. Klein konnte gezeigt werden, dass 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1H-benzimidazol-1-yl)-2'-(β -aminoethyl)- β -D-ribofuranose **26** als universelles Nucleosid fungiert und – eingebaut in einen siRNA-antisense Strang, der gegen die mRNA von eGFP gerichtet ist – einen effektiveren knock-down im mRNA und eGFP-Protein-Level induziert, als etwa ein C-C mismatch-Basenpaar.^[58, 197, 198]

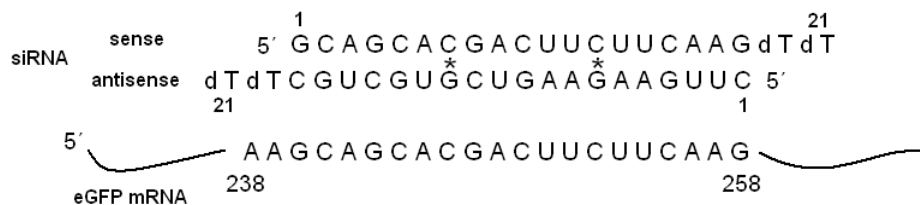


Abbildung 32: Schematische Darstellung des verwendeten siRNA-Konstrukts.

Abbildung 32 zeigt die siRNA-Sequenz, die in diesem Test eingesetzt wurde. Das 2'-O-Aminoethyl-modifizierte 4,6-Difluorbenzimidazol Nucleosid wurde an Pos. 7 und 13 in den antisense- Strang eingebaut (s. Markierung). An diesen Stellen wurden auch die Watson-Crick-mismatch-Basenpaare als Kontrolle eingebaut. Im Bild unten ist der zum antisense-Strang komplementäre Ausschnitt der mRNA-Sequenz zu sehen.

Die modifizierten antisense-Stränge wurden mit einem Cy5-markierten sense-Strang hybridisiert. Anschließend wurden HeLa-GFP-Zellen mit diesen siRNA-Duplexen transfiziert, wobei die Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie bestimmt wurde. Hierdurch konnte eine durchschnittliche Transfektionseffizienz von 90 – 95 % ermittelt werden. Nach 24 h wurde der mRNA-Gehalt der Zellen mittels TaqMan-PCR bestimmt.

In nachfolgendem Diagramm ist das Resultat dieser Messung abgebildet. Man erkennt, dass die modifizierte siRNA im Vergleich zum C/C mismatch eine ca. um 20 % höhere mRNA knock-down Aktivität besitzt.

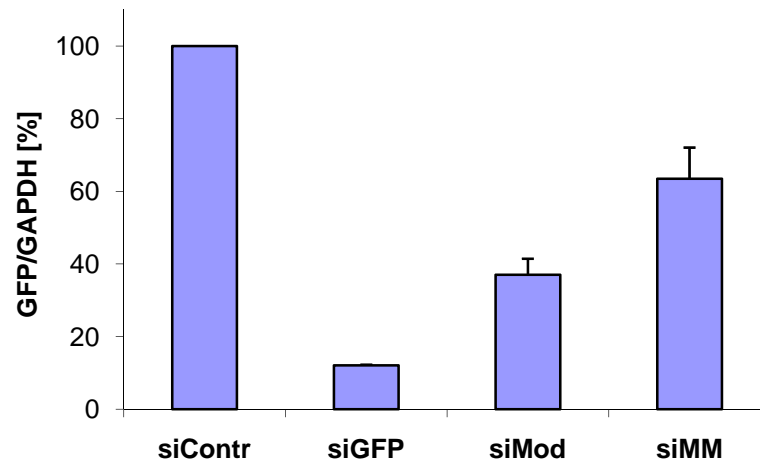


Abbildung 33: Balkendiagramm zur Effektivität des GFP-mRNA knock-down. siContr = Negativkontrolle; siGFP = Positivkontrolle (unmod. antisense-Strang), siMod = einfach modifizierter antisense Strang mit DFBi-2'-O-Aminoethyl-Modifikation an Pos. 7, siMM = C-C mismatch an Pos. 7.

Weitere Details zu diesen Messungen sind der Dissertation von T. Müller-Kuller zu entnehmen.^[197]

Diese Ergebnisse konnten genutzt werden, um die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten 4,6-Difluorbenzimidazol Nucleoside mit neuartigen 2'-O-Modifikationen ebenfalls auf ihren mRNA-knock-down-Einfluss in RNA-Interferenz-Tests zu untersuchen.

Dabei sollten die mittels der in Kap. 3.1 zugänglichen 2'-O-modifizierten Nucleosidbausteine in RNA-21mere eingebaut werden. Neben der RNAi-Aktivität ließen sich diese Oligonucleotide in biologischen Assays auf ihre Nucleaseresistenz untersuchen. Letztlich sollte auch die unterschiedliche Zellaufnahmefähigkeit, der sog. „uptake“, dieser modifizierten siRNAs experimentell bestimmt werden.

Im Rahmen einer Zusammenarbeit im Sonderforschungsbereich 579 mit dem Arbeitskreis von Prof. Göringer wurden zunächst Versuche zur enzymatischen 5'-Phosphorylierung der Oligonucleotide aus Tabelle 5 unternommen. Dadurch sollte gezeigt werden, dass eine 5'-terminale 2'-Modifizierung die für die RNA-Interferenz notwendige Phosphorylierung am 5'-

Ende des antisense-Stranges nicht unterbindet. Hierbei wurde zur exakten Quantifizierung der Phosphorylierung radioaktives ^{32}P -Material eingesetzt. Die radioaktive Markierung fand mit γ - ^{32}P -ATP unter Verwendung einer T4-Polynucleotidkinase statt. Es wurden jeweils ca. 250 pmol der siRNAs mit 20 μCi γ - ^{32}P -ATP umgesetzt, die RNAs wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Resultate dieser Versuche sind in Tabelle 9 zusammengefasst:

Tabelle 9: Ergebnisse der 5'-Phosphorylierung der siRNA-Stränge. Die Radioaktivität des γ - ^{32}P konnte mittels Szintillationsmessung ermittelt werden. Zur Bestimmung der cpm wurde ein Aliquot von 1 μL entnommen (Gesamtvolumen: 20 μL). Der Einbau bezieht sich auf die Gesamtmenge an eingesetztem γ - ^{32}P -ATP.

Kürzel	Sequenz	Modifikation	Counts/min	Einbau ^{32}P [%]
AS1	3'-CGCUGCAUUUGCCGGUGUUCA-5'	keine	539 054	2.43
AS2	3'-CGCUGCAUUUGCCGGUGUUCX-5'	2'-O-AP	146 033	0.66
AS3	3'-CGCUGCAUUUGCCGGUGUUCX-5'	2'-O-CE	257 147	1.16
AS4	3'-CGCUGCAUUUGCCGGUGUUCX-5'	2'-O-AP-Lys	90 204	0.41
AS5	3'-CGCUGCAUUUGCCGGUGUUCX-5'	2'-O-AP-Arg	135 151	0.61
AS6	3'-CGCUGCAUUUGCCGGUGUUCX-5'	2'-O-AP-Laur	81 971	0.37

Man kann aus diesen Messwerten schnell den vorhandenen Einfluss der 2'-Modifikation auf die Aktivität der Polymerase ablesen: Der unmodifizierte antisense-Strang **AS1** ließ sich mit der höchsten Ausbeute phosphorylieren. Ein sterisch anspruchsvoller Laurinsäurerest (**AS6**) hindert dagegen den Einbau eines terminalen Phosphatrestes merklich. Eine 2'-O-Aminopropylmodifikation sorgt ebenso wie ein 2'-O-Cyanoethyl-Rest für eine leichte Reduzierung der gemessenen Radioaktivität. Dennoch liegen diese Modifikationsmuster – ebenso wie auch die Arginin-Modifikation (**AS5**) – noch im gut messbaren Bereich. Ohnehin scheint es möglich, die Effizienz einer 5'-Phosphorylierungsreaktion gegebenenfalls durch eine höhere RNA-Konzentration (in diesem Fall wurden 250 pmol an siRNA eingesetzt) sowie auch durch eine längere Reaktionsdauer zu erhöhen.

Insgesamt zeigen diese Resultate, dass eine 5'-Phosphorylierung auch beim Vorliegen einer Modifikation direkt am 5'-Ende eines Oligonucleotides möglich ist. Daher ist die Untersuchung der siRNAs im Hinblick auf ihre RNAi-Aktivität durchaus sinnvoll.

Durch Kooperationen im Rahmen des EU-Projektes „RIGHT“ (= RNA Interference Technology as Human Therapeutic Tool) konnten RNA-Interferenz-Aktivitätstests anhand

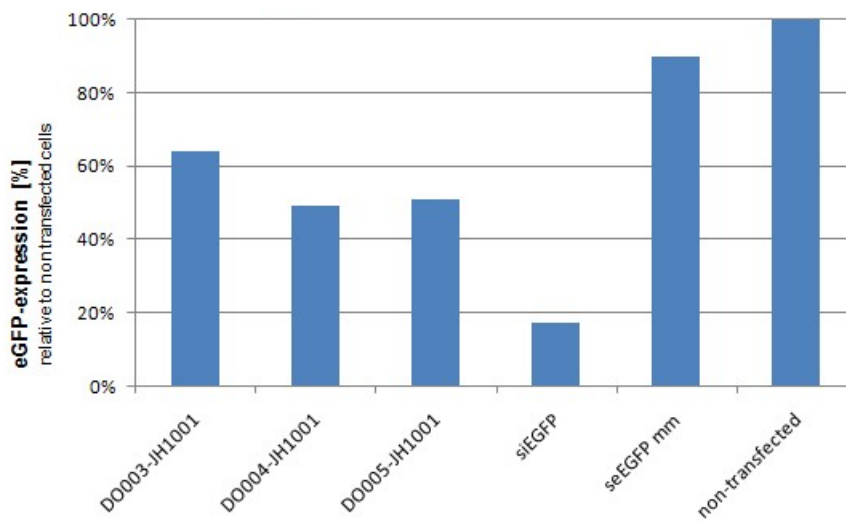
eines etablierten eGFP-Modells durchgeführt werden.^[183] Die hierbei verwendete siRNA besitzt folgende Sequenz:

sense: 5'- GAC GUA AAC GGC CAC AAG UUC-3'
antisense: 3'- CGCUG CAU UUG CCG GUG UUC A -5'

Aus Gründen, die bereits in der Einleitung (s. Kap. 1.2.1) sowie in Kap. 3.2.2 erläutert worden sind, wurden die 2'-O-modifizierte 4,6-Difluorbenzimidazol-Nucleoside anstelle des letzten Adenosins am 5'-Ende des antisense-Stranges eingebaut.

Eine Übersicht über die hergestellten siRNAs findet sich in Tabelle 5 in Kap. 3.2.2. Die modifizierten antisense-siRNAs wurden mit den komplementären sense-Strängen, die z.T. ebenfalls Modifikationen beinhalteten, hybridisiert. Diese siRNA-Duplexe wurden in eine H1299 Lungenkarzinom-Zelllinie, die eGFP stabil exprimiert, transfiziert. Zur Transfektion wurde eine Konzentration an siRNA von 10 nM eingesetzt. Die molekularbiologischen Untersuchungen wurden am Institut für Molekularbiologie der Universität von Aarhus, Dänemark durchgeführt.

Abbildung 34 zeigt die Resultate eines ersten Tests, in dem ein universelles Nucleosid in den antisense-Strang (s.o.) einer ebenfalls gegen eGFP gerichteten siRNA eingebaut wurde. Es handelt sich hierbei um eine 2'-O-Aminopropyl-Modifikation eines 4,6-Difluorbenzimidazol-Nucleosids (Kürzel: JH1001). Dies entspricht dem Oligonucleotid **AS2** aus Tabelle 5. Wird dieser antisense-Strang mit einem ebenfalls modifizierten sense-Strang (DO003-005) hybridisiert, lässt sich eine Inhibierung der eGFP-Expression zwischen 37 - 51 % erreichen. Für weitere Untersuchungen wurden auch die anderen in Tabelle 5 dargestellten Oligonucleotide eingesetzt; ein Ergebnis dieser Tests lag bis zur Niederschrift dieser Arbeit jedoch noch nicht vor.



DO003 5'-GAC GUA AAC GGC CAC AAG UUC-3' 2'-O-AE
DO004 5'-GAC GUA AAC GGC CAC AAG UUC-3' 2'-O-GE
DO005 5'-GAC GUA AAC GGC CAC AAG UUC-3' 2'-O-CE

Abbildung 34: Oben: Balkendiagramm des eGFP-knock-down mit modifizierten siRNAs; unten sind die jeweils verwendeten sense-Stränge abgebildet. Hierbei wurden die natürlichen Nucleoside (A bzw. U) mit einer 2'-O-Aminoethyl (DO003), einer 2'-O-Guanidinoethyl (DO004) bzw. mit einer 2'-O-Cyanoethyl (DO005) - Modifikation versehen. Die Synthesen dieser modifizierten Nucleosidbausteine sowie der Oligonucleotide wurden von D. Odadzic durchgeführt. Bei JH1001 handelt es sich um den mit 4,6-Difluorbenzimidazol-2'-O-Aminopropyl modifizierten antisense Strang (s. **AS2** Tab. 5). siEGFP entspricht der unmodifizierten siRNA (Positivkontrolle), seEGFP mm entspricht einer mismatch siRNA als Negativkontrolle. Außerdem wurde nicht transfizierte Zellen zur Standardisierung des eGFP-levels verwendet.

Um die mögliche Verbesserung der zellulären Aufnahme bedingt durch die unterschiedlichen Modifikationen evaluieren zu können, wurden abschließende RNAi-Untersuchungen durchgeführt, bei denen die siRNA-21mere zusätzlich mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert waren.

Zu diesem Zweck wurde der sog. TAMRA-Farbstoff (6-Carboxy-Tetramethylrhodamin), s. Abb. 35, eingesetzt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff, der ein Extinktionsmaximum bei $\lambda = 556$ nm besitzt, sollte kovalent an die Oligonucleotide gebunden werden. Hierfür wurde das von der Fa. GlenResearch käuflich erhältliche 3'-TAMRA-CPG-Material verwendet. Nachdem eine Synthesäule mit diesem CPG-Material beladen wurde, konnte hieran gemäß standardisierter TBDMS-Oligonucleotidchemie das RNA-21mer synthetisiert werden.

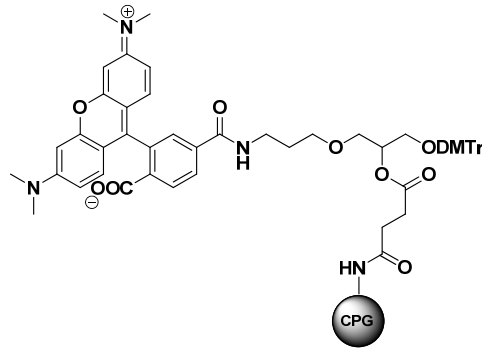


Abbildung 35: 3'-TAMRA-CPG zur Fluoreszenzmarkierung von siRNA-21meren

Der Vorteil des TAMRA-Fluorophors ist seine Absorption und Emission im roten Wellenlängenbereich des sichtbaren Lichtes, welche nicht mit der Fluoreszenz des eGFP-Signals überlappt und somit eine gleichzeitige Detektion beider Signale ermöglicht.

Hierdurch lässt sich in *in vitro* Experimenten durch Detektion des TAMRA-Signals die Zellaufnahme der siRNA-Duplexe nachweisen und gleichzeitig kann, bei Verwendung einer geeigneten Zelllinie, auch der eGFP knock-down detektiert werden.

Aus Tabelle 10 können die zu diesem Zweck hergestellten RNA-21mere entnommen werden.

Tabelle 10: Hergestellte siRNA-21mere aus der eGFP-Sequenz für Zellaufnahme Assays. Alle Modifikationen besitzen 4,6-Difluorbenzimidazol als Nucleobase. AP = Aminopropyl, Lys = Lysin, Spe = Spermin, Laur = Laurinsäure. S1 = unmodifizierter sense-Strang.

Kürzel	Sequenz	Modifikation	Masse Ber. [Da]	Masse Gef. [Da]
AS7	3'-FCGCUGCAUUUGCCGGUGUUCA-5'	keine	7201.3	7256.7
AS8	3'-FCGCUGCAUUUGCCGGUGUUCX-5'	2'-O-AP	7279.2	7283.1
AS9	3'-FCGCUGCAUUUGCCGGUGUUCX-5'	2'-O-AP-Lys	7407.3	7453.9
AS10	3'-FCGCUGCAUUUGCCGGUGUUCX-5'	2'-O-AP-Spe	7507.4	7530.8
AS11	3'-FCGCUGCAUUUGCCGGUGUUCX-5'	2'-O-AP-Laur	7461.4	7468.7
S1	3'-CUUGAACACCGGCAAUGCAG-5'	keine	6718.2	6724.1

Alle hergestellten antisense-Stränge (AS7 – AS 11) sind am 3'-Ende mit dem TAMRA-Fluorophor gelabelt. Beim 21mer S1 handelt es sich um den komplementären sense-Strang, der unmodifiziert und ungelabelt zum jeweiligen Annealing der antisense-Stränge eingesetzt wird.

Bei den massenspektroskopischen Analysen der TAMRA-markierten und modifizierten antisense-RNAs konnte eine Fragmentierung der Oligonucleotide festgestellt werden: In nahezu allen Fällen war ein Fragment mit einem Molekulargewicht von ca. 420 Da detektierbar. Gleichzeitig lag der höchste Molpeak bei einem Molekulargewicht, der exakt um diesen Betrag unter der kalkulierten Molekülmasse lag. Sehr wahrscheinlich fragmentiert das Oligonucleotid messtechnischbedingt; hierbei wird der TAMRA-Fluorophor vom Oligomer abgespalten und kann als freies Amid (MW = 429.5 g/mol) detektiert werden.

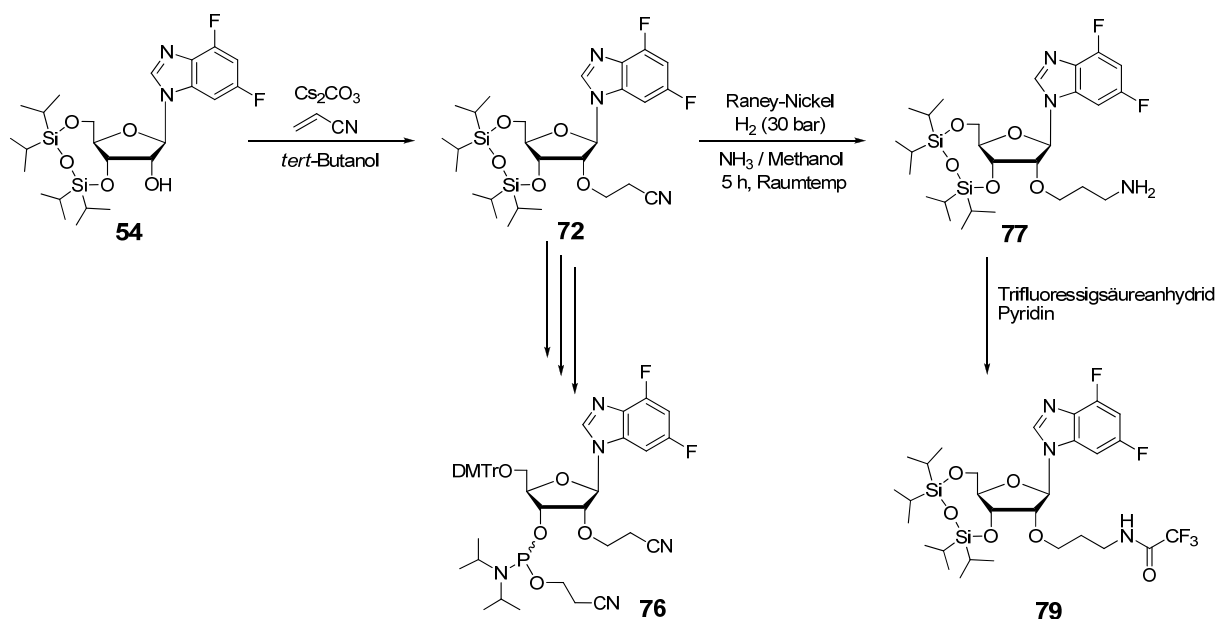
Die molekularbiologischen Untersuchungen zur Quantifizierung der Zellaufnahme dieser modifizierten siRNAs wurden von der Fa. Polyplus-transfection (s. auch Kap. 3.1.4.6) im Rahmen des EU-RIGHT-Projektes durchgeführt. Bis zur Niederschrift dieser Arbeit lagen allerdings noch keine Resultate dieser Tests vor.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Ideale universelle Nucleosid-Analoga könnten im Hinblick auf therapeutische Oligonucleotide einen enormen Sprung in der Entwicklung darstellen. Wie bereits berichtet, bestehen derzeit schon einige vielversprechende Ansätze, einen solchen Nucleosidbaustein zu generieren, der sich zur universellen Basenpaarung in Oligonucleotidduplexen eignet, ohne Verluste in der Duplexstabilität oder in der enzymatischen Aktivität zu verursachen.

Zudem bieten solche Nucleosidanaloga auch aus synthetischer Sicht große Vorteile: Durch ihre Struktur sind chemische Modifikationen – wie beispielsweise Modifizierungen an der Zuckereinheit – leichter zugänglich, als bei den natürlichen Nucleosiden.

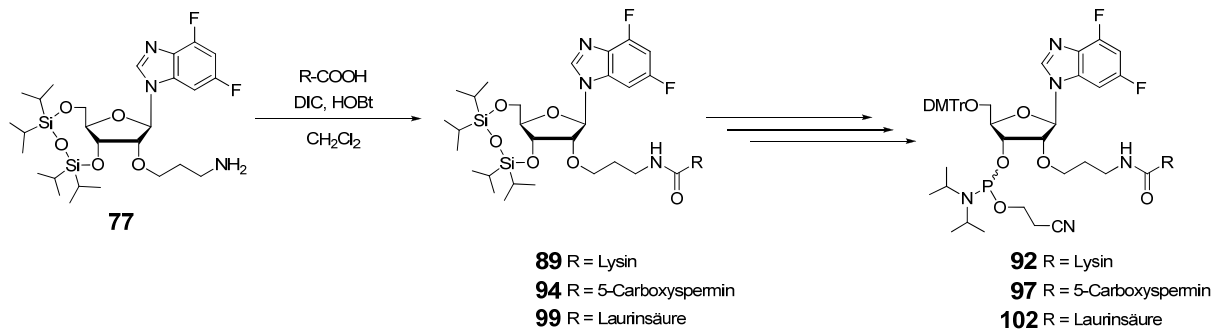
Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, bereits bekannte und erprobte universelle Nucleosidbausteine solchermaßen zu modifizieren, das bei ihrer Anwendung in Oligonucleotiden diese Vorteile besser zum Tragen kommen. Vor diesem Hintergrund besaßen vor allem protonierbare 2'-O-Modifikationsmotive eine besondere Relevanz. Im Vergleich zur bereits bekannten 2'-O-Aminoethyl-Modifikation des 4,6-Difluorbenzimidazol-Nucleosidbausteins konnte eine um eine Methyleneinheit längere 2'-O-Aminopropylfunktion dieses Nucleosidbausteins hergestellt werden. Dabei wurde eine Syntheseroute eingeschlagen, mit der diese Modifikation in hohen Ausbeuten und hoher Reinheit aus dem 3',5'-Markiewicz-geschützten Nucleosid **53** eingeführt werden konnte. Grundlage dieser Modifizierungsmethode war eine Michael-Addition von Acrylnitril an die 2'-OH-Funktion unter basischen Bedingungen. Damit konnte ein 2'-O-Cyanoethylrest an das Nucleosid geknüpft werden; dieser wurde als Modifikationsmotiv beibehalten und es konnte das entsprechende 3'-Phosphoramidit **76** hergestellt werden. Als besonders vielseitig erweist sich der 2'-O-Cyanoethyllinker allerdings durch die Möglichkeit, sich mittels Raney-Nickel-katalysierter Hydrierung in das primäre Amin überführen zu lassen. Durch diese Michael-Addition-Reduktionssequenz konnte erwähnte 2'-O-Aminopropylmodifikation **77** in nur zwei Stufen mit einer Gesamtausbeute von über 80 % an das Difluorbenzimidazolnucleosid geknüpft werden. Diese Methode zeigt sich daher als sehr gute Alternative zu den literaturbekannten Alkylierungsprozeduren zur Einführung von 2'-O-Modifikationen.



Schema 45: Michael-Additions - Reduktionssequenz zur Synthese eines 2'-O-Aminopropylnucleosids **77**. Alternativ lässt sich aus der 2'-O-Cyanoethyl-Modifikation **72** auch das entsprechende 3'-Phosphoramidit **76** in drei Stufen herstellen

Durch die Wahl einer geeigneten Aminoschutzgruppe ließ sich das 2'-O-Aminopropylmodifizierte Nucleosid **77** in vier Stufen in das entsprechende 3'-Phosphoramidit **82** überführen. Zu diesem Zweck wurde die Trifluoracetylenschutzgruppe ausgewählt, da sie als basenlabile Schutzgruppe sehr leicht im Zuge der postsynthetischen Behandlung mit Ammoniak/Ethanol vom Oligonucleotid abgespalten werden kann.

Die 2'-O-Aminopropylfunktion wurde aber auch als Ausgangspunkt zur Kupplung weiterer erfolgsversprechender Modifikationsmotiven verwendet: In diesem Ansatz wurden mittels standardisierter Peptidkupplungschemie Carbonsäurederivate an die freie Aminofunktion von **77** gekuppelt. Auf diese Weise waren neuartige 2'-O-Modifizierungen, wie z.B. Lysin- oder auch Laurinsäurekonjugate zugänglich; diese waren über den Propylamidlinker mit dem Nucleosid verbunden. Im Hinblick der polykationischen Modifizierung konnte somit auch ein Sperminderivat an die Aminopropylfunktion gekuppelt werden: Zu diesem Zweck wurde (Boc)₄-5-carboxyspermin eingesetzt. Sämtliche dieser Konjugate konnten ebenfalls nach mehrstufigen Synthesen in das 3'-Phosphoramidit überführt werden und wurden schließlich erfolgreich in RNA-Oligonucleotide eingebaut.



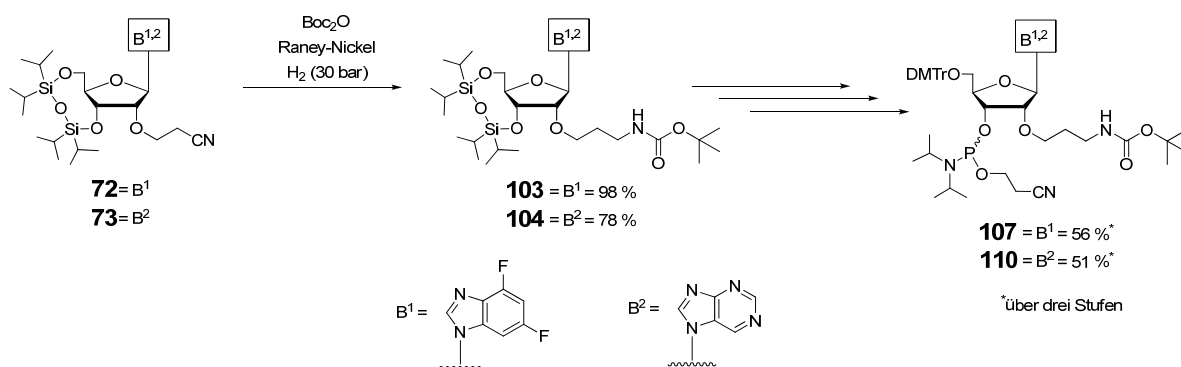
Schema 46: Kupplung von Carbonsäurederivaten an die 2'-O-Aminopropylfunktion von **77** unter Peptidkupplungsbedingungen

Für den Einbau dieser 2'-modifizierten universellen Nucleosidanaloga in RNA-Oligonucleotide wurden zunächst kurze 12mer-Sequenzen gewählt, die sich bereits als gute Testsysteme für spektroskopische Untersuchungen herausgestellt haben. Hierbei wurden jeweils monomodifizierte 12mere synthetisiert; diese wurden mit dem unmodifizierten Gegenstrang zum Duplex hybridisiert. Hernach konnten mit diesen Duplexen spektroskopische Untersuchungen wie UV-Schmelzkurvenanalysen und CD-Spektroskopie durchgeführt werden. Sämtliche modifizierten Nucleosidanaloga wurden sowohl in den purinreichen, als auch in den pyrimidinreichen 12mer-Strang inkorporiert.

Bei diesen Messungen stellte sich für die modifizierten 4,6-Difluorbenzimidazolnucleoside eine sehr geringe Schwankungsbreite der gemessenen T_m -Werte heraus. Zudem besaßen alle modifizierten Nucleoside einen destabilisierenden Einfluss im Vergleich zur idealen Watson-Crick-Basenpaarung auf den RNA-Duplex. Einen Stabilitätsgewinn durch polykationische Modifikationsmotive, z.B. durch eine Sperminmodifikation, konnte nicht beobachtet werden. Da in jüngsten Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Prof. Engels mit einer 2'-unmodifizierten 4,6-Difluorbenzimidazol-Modifikation vergleichbare Resultate erzielt wurden, lässt sich dieser thermodynamisch eher ungünstige Effekt auf die Duplexstabilität am ehesten der Nucleobase zusprechen. Für sterisch anspruchsvolle Modifikationen, wie für das bereits erwähnte Spermin oder auch für die Laurinsäuremodifikation, konnten durch CD-spektroskopische Untersuchungen ermittelt werden, dass die A-helicale Struktur der RNA-Duplexe durch diese raumgreifenden Modifikationen empfindlich gestört wird. Auch dadurch lässt sich die beobachtete Destabilisierung erklären. Da allerdings der Einbau der modifizierten Nucleosidbausteine stets an der gleichen Position in der Strangmitte erfolgte,

lässt sich nicht beantworten, wie sich die Modifikationen im Falle des Einbaus an anderen Positionen – speziell am Ende eines Oligonucleotids – auf die thermodynamische Stabilität hin auswirken.

Wie bereits erwähnt, konnten durch die Kupplung von Carbonsäurederivaten an die 2'-O-Aminofunktion des Nucleosidbausteins **77** einige neue Modifikationsmotive erhalten werden. Um die Flexibilität zu erhöhen, wurde auch eine mögliche postsynthetische Kupplungsmethode in Betracht gezogen. Diese ließ sich durch den Einbau des geeignet geschützten 2'-Aminopropyl-Nucleosidbausteins in ein RNA-Oligomer erfolgreich umsetzen: Durch einfache Zugabe von Bocanhydrid in den Reduktionsansatz von **72** zu **103** gelang eine simultane Boc-Schätzung des 2'-O-Aminopropylderivats in quantitativer Ausbeute. Diese Prozedur konnte auch auf ein 7*N*-Purinnucleosidanalogue **73** übertragen werden, welches im Hinblick auf die thermodynamische Stabilisierung eines RNA-Duplexes einem 4,6-Difluorbenzimidazolbaustein gegenüber überlegen zu sein scheint. Die Boc-geschützten Derivate **103** bzw. **104** konnten ebenfalls zu den jeweiligen 3'-Phosphoramiditen umgesetzt werden. Diese wurden in die automatisierte Festphasensynthese von Oligonucleotiden eingesetzt.



Schema 47: Simultane Reduktion und Boc-Schätzung von **72** bzw. **73** und Synthese der entsprechenden 3'-Phosphoramidite **107** und **110**

Wie erwartet, wurde die säureempfindliche Boc-Schutzgruppe quantitativ im Zuge der Trichloressigsäurebehandlung im Laufe des Synthesesyklus abgespalten, wodurch die freie 2'-O-Aminopropylfunktion zugänglich wurde. Daher ließ sich eine selektive Festphasenkupplungsmethode evaluieren: Abermals wurden unter Peptidkupplungsbedingungen – diesmal mit HBTU / HOBt als Aktivierungsreagenzien – Carbonsäurederivate wie z.B. die

modifiziertes 4,6-Difluorbenzimidazolnucleosid **81** an LCAA-CPG-Festphasenmaterial geknüpft. Zur Blockierung der Aminofunktion fand dabei wieder die Trifluoracetyl-schutzgruppe Einsatz; ein derart modifiziertes CPG-Festphasenmaterial konnte erfolgreich hergestellt werden und sein Kupplungsvermögen konnte durch die Synthese eines RNA-12mers (**U13**) unter Beweis gestellt werden.

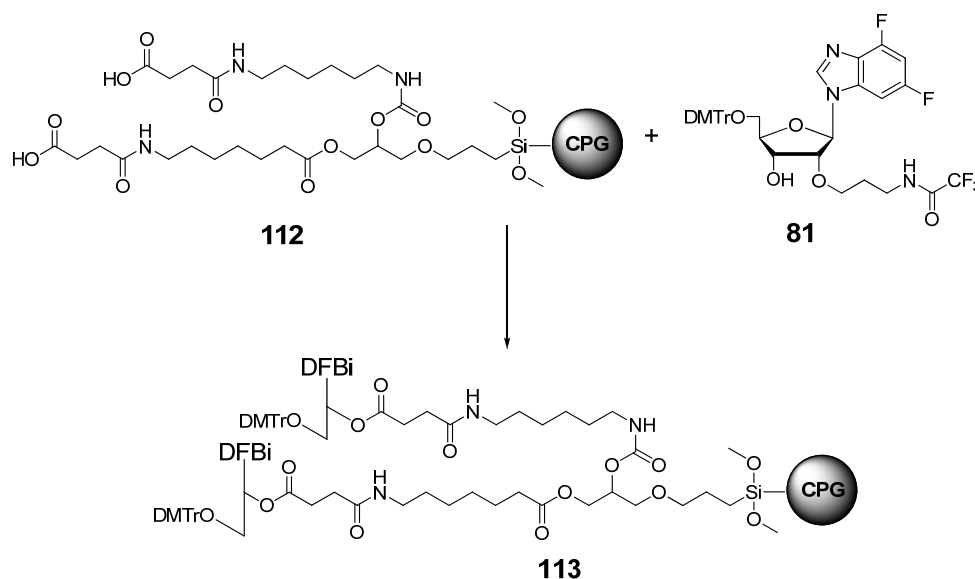


Abbildung 37: Kupplung des 2'-O-Aminopropyl-Nucleosids **81** an aktiviertes LCAA-CPG **112**

Eine Derivatisierung von LCAA-CPG-Festphasenmaterial mit einem 2'-O-Propylamido-spermin-Derivat **117** misslang jedoch. Dies legt den Verdacht nahe, dass dieses Nucleosid-analogon über eine sterisch zu anspruchsvolle Modifikation verfügt und daher eine Kupplung bedingt durch diese sterische Hinderung in unzureichendem Maße stattfindet.

Neben den thermodynamischen Untersuchungen sollten die dargestellten Modifikationsmotive auch ihren Einsatz in biologischen Assays finden. Hierin sollte beispielsweise das Vermögen einer Nucleaseinhibierung im Hinblick auf eine größere Serumstabilität untersucht werden. Ausserdem wurden gerade solche 2'-O-Modifikationsmuster gewählt, die durch ihren kationischen Charakter die anionische Natur eines RNA-Oligonucleotids zumindest teilweise neutralisieren können. Dadurch wäre die mögliche Verbesserung der zellulären Aufnahme bzw. der Membrandurchgängigkeit des Oligonucleotids gewährleistet. Zu diesen Zwecken wurden einige der in dieser Arbeit hergestellten Modifikationsmotive auch in siRNAs

(21mere) eingebaut. Im Hinblick der gefundenen destabilisierenden Eigenschaften der 2'-O-modifizierten 4,6-Difluorbenzimidazolnucleoside wurde das Prinzip der asymmetrischen Strangselektion durch den RISC im Rahmen des RNA-Interferenz-Mechanismus als geeignete Basis zur gezielten Modifizierung von siRNAs herangezogen. Aus diesem Grund fand der Einbau der modifizierten 4,6-Difluorbenzimidazolbausteine am 5'-Terminus des antisense-Stranges statt. In einigen ersten Testläufen konnte für dieses universelle Nucleosidanalogen bereits RNAi-Aktivität ermittelt werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass der Einbau dieser modifizierten Nucleosidbausteine am 5'-Ende die enzymatische Phosphorylierung ebendort zwar durchaus beeinträchtigt, aber nicht verhindert. Aus diesem Grund wurden fluoreszenzfarbstoffgelabelte, modifizierte siRNAs hergestellt, die in abschließenden Tests auf ihre Zellaufnahme sowie auf ihre RNAi-Aktivität hin untersucht werden sollen. Das Ergebnis dieser Versuche stand zur Niederschrift dieser Arbeit noch aus.

Im Hinblick auf die mit dem 2'-O-modifizierten-7*N*-Purinnucleosid erzielten thermodynamischen Resultate lässt sich dieses Nucleosidanalogen wohl als sehr vielversprechendes universelles Nucleosid betrachten. Demnach sind weitere Untersuchungen dieses Nucleosidbausteins sowohl in spektroskopischen Analysen, als auch für den Einsatz in biologischen Assays (RNA-Interferenz Aktivität) durchaus sinnvoll.

Mit geeigneter Schutzgruppenstrategie lässt sich die im Rahmen dieser Arbeit erarbeitete Festphasenmethode zur Kupplung von Carbonsäurederivaten möglicherweise auch auf natürliche Nucleoside übertragen – der problematische Schlüsselschritt in dieser Syntheseroute ist sicherlich die Raney-Nickel - katalysierte Reduktion des 2'-O-Cyanoethyllinkers zur Aminopropylfunktion.

Da in den letzten Jahren auch andere universelle Nucleosidanaloga mit erfolgversprechendem Verhalten in thermodynamischen Untersuchungen entwickelt worden sind – im Arbeitskreis von Prof. Engels hat sich z.B. auch ein 4,6-Difluorindolnucleosid in diesem Zusammenhang etablieren können – ist eine einfache Übertragung der Synthesestrategie neuartiger 2'-O-Modifikationen, wie sie in dieser Arbeit präsentiert werden konnte, auf diese Nucleosidanaloga leicht möglich und könnte zu neuen Erkenntnissen in der Herstellung therapeutisch relevanter Oligonucleotide führen.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeine Arbeitsbedingungen

Lösungsmittel:

Soweit nicht anders beschrieben, wurden sämtliche Lösungsmittel zu chromatographischen Zwecken techn. eingesetzt, zuvor jedoch nach Standardprotokoll getrocknet und abdestilliert.

Lösungsmittel für synthetische Einsätze wurden von der Fa. Fluka in *pro analysi* Qualität bezogen und über Molekularsieb gelagert.

Zur Synthese der Oligonucleotide wurden Lösemittel der Fa. Biosolve in DNA-Synthese - Qualität eingesetzt.

Dünnschichtchromatographie:

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurden auf Aluminium-Fertigplatten der Fa. Merck angefertigt, die mit Kieselgel 60 F₂₄₅ beschichtet sind. Die Ermittlung der R_F-Werte erfolgte bei Kammerättigung mit dem jeweiligen Laufmittelgemisch. Zur Detektion UV-aktiver Substanzen wurde UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 254$ verwendet. UV-inaktive Substanzen konnten auf eine der nachfolgend angegebenen Methoden detektiert werden:

- Iod-Kristalle in einer DC-Entwicklungskammer
- Eintauchen der entwickelten DC-Platte in eine 10%ige KMnO₄-Lsg. und anschließende Erwärmung
- Anfärben der entwickelten DC-Platte mit Ninhydrin-Sprühreagenz (Fa. Fluka)

Säulenchromatographie:

Säulenchromatographische Reinigungen wurden nach dem Verfahren der Flash-Chromatographie an Kieselgel der Fa. Macherey-Nagel (Kieselgel 60, Korngröße: 0.04-0.063 mm) durchgeführt. Es standen verschiedene Säulendimensionen zur Verfügung. Die Trennungen wurden entweder isokratisch oder mit Stufengradienten durchgeführt. Weitere Details sind bei den einzelnen Synthesevorschriften aufgeführt.

HPLC:

Die Aufreinigung der synthetisierten RNA-Oligonucleotide erfolgte an einer HPLC der Fa. Jasco, Modell 980. Die Trennungen erfolgten an einer semipräparativen AE-Säule der Fa. Dionex, Model NucleoPac PA 100 (Säulendimensionen 250 x 9 mL) mit einer Flußrate von 5 mL/min. Es wurden lineare Gradienten von 0 % bis 70 % Puffer B in Puffer A (in 40 min) verwendet; Puffer A: DEPC-H₂O (pH = 8.0), Puffer B: 1 M LiCl in Puffer A (pH = 8.0).

Die Detektion erfolgte am UV-Detektor (Modell: UV-970, Fa. Jasco) bei $\lambda = 260$ nm.

NMR-Spektroskopie:

Die Messungen der NMR-Spektren wurden auf folgenden Geräten der Fa. Bruker durchgeführt:

- Bruker AM 250: 250 MHz-¹H-NMR und 62.9 MHz-¹³C-NMR
- Bruker AV 300: 300 MHz-¹H-NMR, 75.5 MHz-¹³C-NMR u. 121.5 MHz-³¹P-NMR
- Bruker AV 400: 400 MHz-¹H-NMR, 100.6 MHz-¹³C-NMR u. 162 MHz-³¹P-NMR

Die durchgeführten NMR-Experimente sowie die verwendeten Lösungsmittel sind bei den einzelnen Verbindungen gekennzeichnet. Die Zuordnung der Signale erfolgte zusätzlich durch 2D-NMR-Experimente; daher wurden zusätzlich auch ¹H-¹H-COSY, HSQC, HMBC sowie ¹³C-DEPT - Spektren aufgenommen und zur Strukturaufklärung herangezogen. Alle Messungen erfolgten bei 300 K. Die chemischen Verschiebungen sind relativ zu den Signalen der Lösungsmittel CDCl₃ (¹H, $\delta = 7.26$, ¹³C, $\delta = 77.16$), DMSO-d₆ (¹H, $\delta = 2.50$, ¹³C, $\delta = 39.52$), MeOH-d₄ (¹H, $\delta = 3.31$, ¹³C, $\delta = 49.00$) sowie Aceton-d₆ (¹H, $\delta = 2.05$, ¹³C, $\delta = 29.84$) angegeben. Die Verschiebung der ³¹P-NMR-Signale wurde gegen einen externen Standard von 85%iger Phosphorsäure angegeben.

Massenspektrometrie:

Sämtliche ESI-Spektren der Einzelverbindungen wurden auf einem Gerät der Fa. Fisons aufgenommen, wobei eine VG-Plattform II mit Quadrupol-Analysator zur Verfügung stand. MALDI-TOF-Massenspektren der Einzelverbindungen wurden auf einem Flugzeit

Massenspektrometer (VG Tofspec) im linearen Modus gemessen. Als Matrix wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure verwendet.

Für die Messung der Oligonucleotide stand ebenfalls das o.g. Gerät zur Verfügung; hierbei wurde mit einer Mischung aus 6-Aza-2-thiothymine sowie Norharman als Matrix gearbeitet.

Weiterhin wurden MALDI-Spektren der Oligomere an einem Voyager DE-PRO-Gerät der Fa. Applied Biosystems im Arbeitskreis von Prof. Karas aufgenommen. Es wurde hier im linearen Modus gemessen, wobei als Matrix 3-Hydroxypicolinsäure zum Einsatz kam.

HRMS:

Hochaufgelöste Massenspektrometrie wurde am Institut für Organische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz durchgeführt. Für die Aufzeichnung der HRMS-Spektren kam ein Micromass-Q-TOF-Ultima 3-Massenspektrometer der Fa. Waters zum Einsatz. Eine Lösung von Natriumformiat diente als interne Referenz. Beim Einsatz eine „LockSpray-Interface“ dienten Natriumformiat oder NaI/CsI in Wasser/Isopropanol Gemischen als externe Referenz. Zur Probeninjektion wurde ein Wasser/Acetonitril-Gemisch verwendet.

Schmelzpunktbestimmung:

Die Schmelzpunkte wurden an einer Schmelzpunktbestimmungs-Apparatur der Fa. Büchi (Modell Büchi 510) nach der Methode von Tottoli gemessen.

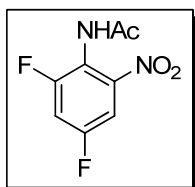
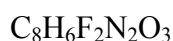
Zum Einengen wässriger Oligonucleotidlösungen stand eine SpeedVac-Vakuumzentrifuge der Fa. Savant, Modell SC 110 zur Verfügung.

Autoklavenreaktionen wurden in einem Laborautoklav, Modell 1, der Fa. Roth durchgeführt.

Mikrowellen unterstützte Reaktionen wurde an einer Synthesemikrowelle der Fa. CEM, Modell „Discover“ durchgeführt. Die jeweiligen Bedingungen sind bei den einzelnen Synthesevorschriften angegeben.

5.2 Synthese der Einzelverbindungen

2,4-Difluor-6-nitroacetanilid

**29**

216.14 g/mol

23.24 g (135.8 mmol) 2,4-Difluoracetanilid werden in 26 mL konz. Schwefelsäure und 8.8 mL Eisessig gelöst. Hierzu werden langsam 17.6 mL Nitriersäure zugetropft, wobei die Temperatur 40°C nicht überschreiten darf. Anschließend wird die Reaktionsmischung für 90 min bei Raumtemp. gerührt. Man gießt Reaktionslösung auf 200 mL Eiswasser und kühlt weitere 30 min im Eisbad, um die Auskristallisation des Produktes zu vervollständigen. Der gelbe Niederschlag wird abgesaugt, mit Eiswasser gewaschen und getrocknet. Nach Umkristallisation aus Ethanol erhält man das Produkt als gelben Feststoff.

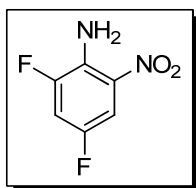
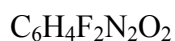
Ausbeute: 28.16 g (130.2 mmol, 96 %)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, Aceton- d_6):

δ [ppm] = 9.31 (br s, 1H, NH), 7.68–7.64 (m, 1H, H5), 7.55 (dt, 1H, $J = 8.3$ Hz, H3), 2.01 (s, 3H, CH_3).

Schmelzpunkt: 124°C

ESI(+)-MS: m/z 216.7 [M], 233.9 [M+Na] $^+$

2,4-Difluor-6-nitroanilin**30**

174.10 g/mol

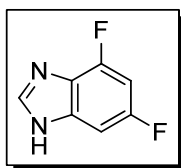
27.2 g (125.8 mmol) 2,4-Difluor-6-nitroacetanilid **29** werden unter Rühren und Eisbadkühlung in 28 mL konz. Schwefelsäure gelöst. Die braune Lösung wird 2 h bei 95°C gerührt und anschließend auf ca. 500 g Eis gegossen. Es bildet sich ein gelber Niederschlag. Zur vollständigen Auskristallisation wird die Suspension weitere 45 min unter Eisbadkühlung gerührt. Nach Filtration und Waschen mit Eiswasser wird der Feststoff getrocknet und aus H₂O/Ethanol 20:3 umkristallisiert.

Ausbeute: 15.2 g (69 mmol, 69 %)

¹H-NMR: (250 MHz, DMSO-d₆)

δ [ppm] = 7.61–7.50 (m, 2H, H3, H5); 7.15 (br s, 2H, NH₂).

ESI(-)-MS: *m/z* 173.0 [M-H]⁻

4,6-Difluorbenzimidazol**32**C₇H₄F₂N₂

154.11 g/mol

Man löst in einem ausgeheizten Rundkolben unter Argonatmosphäre 7.9 g 2,4-Difluor-6-nitroanilin **30** (45.4 mmol) in abs. Ethanol. Unter Argon-Gegenstrom werden 1.0 g Platin(IV)dioxid (4.5 mmol) zugegeben. Nach Evakuieren der Apparatur wird mit Wasserstoff geflutet und 3 h bei Raumtemp. unter H₂-Atmosphäre gerührt. Nach vollständiger Entfärbung der gelben Lösung wird der Katalysator über Celite Filter Gel abgesaugt. Das Filtrat wird i. Vak. bis zur Trockene eingengt. Der ölige Rückstand wird unter Schutzgasatmosphäre in 395 mL konz. Ameisensäure aufgenommen und 90 min refluxiert. Nach Abkühlen auf Raumtemp. engt man die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer bis zur Trockne ein. Der zurückbleibende graubraune Feststoff kann aufgrund seiner Reinheit (> 98 %) und seiner schlechten Löslichkeit direkt zum Nucleosid umgesetzt werden. Für analytische Zwecke sublimiert man einen Teil des Produktes und erhält Verbindung **32** als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 6.61 g (94 %)

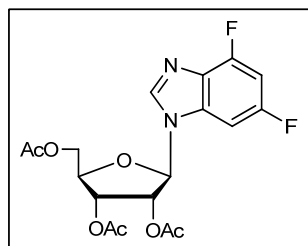
¹H-NMR: (250 MHz, DMSO-d₆)

δ [ppm] = 12.90 (br s, 1H, NH), 8.30 (s, 1H, H2), 7.27 (dd, *J* = 2.3 Hz, *J* = 8.9 Hz, 1H, H7), 7.04 (dt, *J* = 2.1 Hz, *J* = 10.5 Hz, 1H, H5).

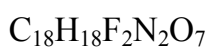
Schmelzpunkt.: 233°C

ESI(+)-MS: *m/z* 154.1 [M]

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



37



412.33 g/mol

Man suspendiert in einem ausgeheizten Kolben unter Argonatmosphäre 8.02 g (52 mmol) 4,6-Difluorbenzimidazol **32** in 80 mL abs. Acetonitril und versetzt das Gemisch mit 19 mL (77 mmol) *N,O*-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid. Die Reaktionslösung wird für 15 min unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemp. werden 16.36 g (60 mmol, 1.1 eq.) 1,2,3,5-Tetra-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose sowie 11.0 mL (61 mmol) Trimethylsilyltrifluorsulfonat (TMSOTf) in 85 ml abs. Acetonitril zugesetzt. Man refluxiert das Reaktionsgemisch für 2.5 h und kühlt anschließend auf Raumtemp. ab. Schließlich quencht man die Reaktion durch Zugabe von 15 mL wäbr. NaHCO₃-Lösung und extrahiert das Gemisch dreimal mit jeweils 120 mL Methylenchlorid. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 95:5. Das gewünschte N1-Isomer (*fast*-Isomer) **37a** erhält man als farblosen Schaum.

Ausbeute: 16.58 g (40 mmol, 77 %)

¹H-NMR: (250 MHz, CDCl₃)

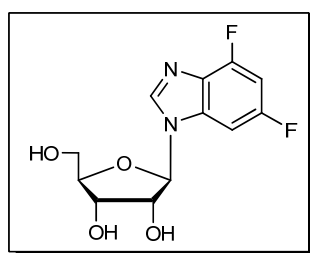
δ [ppm] = 8.12 (s, 1H, H2), 7.20 (dd, $J = 8.2$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1H, H7), 6.85 (dt, $J = 10.0$ Hz, 1H, H5), 6.01 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H, H1'), 5.39 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, H2'), 5.30–5.26 (m, 1H, H3'), 4.36–4.27 (m, 3H, H5', H5'', H4'), 2.07 (s, 3H, CH₃), 2.02 (s, 3H, CH₃), 1.97 (s, 3H, CH₃).

^{13}C -NMR: (63.7 MHz, CDCl_3)

δ [ppm] = 171.0, 170.4, 170.0 (s x CO), 159.3 (C4), 152.2 (C6), 143.8 (C2), 135.5 (C9), 128.9 (C8), 98.8 (C5), 95.0 (C7), 88.5 (C1'), 82.9 (C4'), 72.6 (C2'), 70.1 (C3'), 61.5 (C5'), 21.4, 21.2, 20.9 (3 x CH_3).

ESI(+)-MS: m/z 413.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$

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



40

$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_4$

286.23 g/mol

16.5 g (40 mmol) 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **37** werden in 99 mL abs. Methanol gelöst. Man gibt anschließend 0.92 mL (13.6 mmol, 0.33 eq, 5.4 M in MeOH) Natriummethanolat-Lösung dazu und rührt die Suspension für 30 min bei Raumtemp. Durch Zugabe von vier Spateln eines schwach sauren Ionenaustauschers (Dowex 50WX8, Korngröße 200 – 400) stoppt man anschließend die Reaktion und neutralisiert die Lösung. Nach Abfiltration des Ionenaustauschers engt man das Filtrat i. Vak ein und kristallisiert den Rückstand aus wenig Wasser um. Auf diese Weise erhält man 10.7 g eines leicht gelben Feststoffs.

Ausbeute: 10.7 g (37.4 mmol, 93 %)

^1H -NMR: (400 MHz, DMSO-d_6)

δ [ppm] = 8.52 (s, 1H, H2), 7.64 (dd, $J = 9.2$ Hz, $J = 2.1$ Hz, 1H, H7), 7.13 (dt, $J = 10.4$ Hz, 1H, H5), 5.87 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, H1'), 5.49 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, 2'-OH), 5.25–5.21 (m, 2H, 3'-OH, 5'-OH), 4.34 (q, $J = 6.3$ Hz, 1H, H2'), 4.16–4.10 (m, 1H, H3'), 4.03–3.99 (m, 1H, H4'), 3.70–3.65 (m, 2H, H5', H5'').

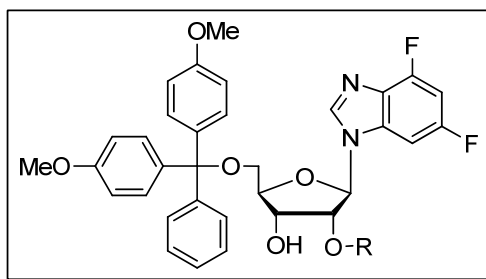
^{13}C -NMR: (101 MHz, DMSO- d_6)

δ [ppm] = 157.1 (C4), 150.5 (C6), 143.7 (C2), 135.1 (C9), 129.0 (C8), 97.6 (C5), 95.4 (C7), 89.0 (C1'), 85.8 (C4'), 73.6 (C2'), 70.0 (C3'), 61.1 (C5')

ESI(-)-MS: m/z 284.1 $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$

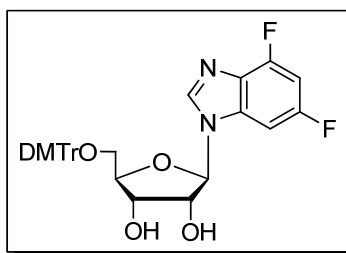
Allgemeine Reaktionsvorschrift Nr. 1 zur 5'-Dimethoxytritylierung der

Nucleosid-Bausteine



Das i. Hochvak. getrocknete 3',5'-entschützte Nucleosid (1 mmol) wird unter Argonatmosphäre in abs. Pyridin (ca. 8 mL) gelöst. Das Reaktionsgemisch wird mittels Injektionsspritze mit Triethylamin (300 μL) versetzt und schließlich wird zuvor i. Hochvak. getrocknetes 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (1.3 mmol, 1.3 eq.) zugegeben. Man lässt die orangefarbene Reaktionslösung ü. N. bei Raumtemp. rühren und kontrolliert das Fortschreiten der Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5). Man stoppt die Reaktion durch Zugabe weniger Milliliter Methanol und extrahiert die Reaktionslösung mehrmals mit einer wässr. ges. NaHCO_3 -Lsg. Die wässrige Phase wird zwei Mal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösemittels i. Vak. wird der Rückstand zunächst zwei Mal mit wenig Toluol coevaporiert und schließlich mittels Säulenchromatographie aufgereinigt, wobei als Eluent ein Gemisch aus $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ von 95:5 eingesetzt wird.

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose



42

$C_{33}H_{30}F_2N_2O_6$

588.60 g/mol

Die DMTr-Schutzgruppe wird entsprechend nach der allgemeinen Vorschrift Nr. 1 eingeführt. Eingesetzte Mengen: 1 g (3.49 mmol) 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **40**, 28 mL abs. Pyridin, 1.05 mL NEt_3 , 1.54 g 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (4.5 mmol, 1.3 eq.). Reaktionsdauer: 19 h.

Ausbeute: 1.75 g (2.97 mmol, 85 %), gelblicher Schaum.

DC: $R_f = 0.5$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 98:2)

1H -NMR: (400 MHz, $DMSO-d_6$)

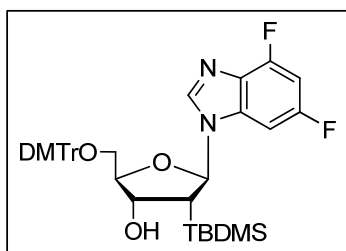
δ [ppm] = 8.44 (s, 1H, H2), 7.48 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, H7), 7.40–7.21 (m, 9H, H_{arom}), 7.17–7.12 (m, 1H, H7), 6.83 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H, H_{arom}), 5.94 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, H1'), 5.68 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H, 2'-OH), 5.29 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H, 3'-OH), 4.50 (q, $J = 5.4$ Hz, 1H, H2'), 4.22 (q, $J = 5.2$ Hz, 1H, H3'), 4.13–4.11 (m, 1H, H4'), 3.75–3.73 (m, 6H, 2 x OCH_3), 3.24–3.22 (m, 2H, H5', H5'').

^{13}C -NMR: (100.6 MHz, $DMSO-d_6$)

δ [ppm] = 158.2 (CF), 158.0 (C_{arom}), 151.9 (CF), 150.2 (C_{arom}), 145.2 (C2), 143.6 (C_{arom}), 135.6 (C9), 130.1 (C_{arom}), 128.3 (C8), 127.9, 124.4 (C_{arom}), 113.6 (C_{arom}), 98.3 (C5), 95.2 (C7), 88.9 (C1'), 86.7 (C4'), 85.0 (C2'), 73.7 (C3'), 70.5 (C5'), 55.0 (OCH_3).

MALDI(+)-MS: m/z 589.8 $[M+H]^+$

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



43

$C_{39}H_{44}F_2N_2O_6Si$

702.84 g/mol

In einem ausgeheizten Rundkolben werden 1 g (1.7 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **42** in 16 mL eines 1:1-Gemisches aus abs. THF und abs. Pyridin gelöst. Es werden 340 mg (2 mmol) Silbernitrat sowie 2.44 mL einer 1 M *tert*-Butyldimethylsilylchlorid-Lösung in THF zugesetzt und man rührt das Reaktionsgemisch für 20 h bei Raumtemp. Anschließend stoppt man die Reaktion durch Zugabe weniger mL einer wässr. ges. $NaHCO_3$ -Lsg. und filtriert das ausgefallene Silberchlorid ab. Das klare Filtrat wird mehrfach mit Dichlormethan extrahiert. Nach dem Trocknen der vereinigten organischen Phasen über $MgSO_4$ wird das Lösemittel i. Vak. entfernt und der Rückstand zweimal mit Toluol coevaporiert. Zur weiteren Aufreinigung und zur Abtrennung der beiden Regioisomere (2'-O-TBDMS bzw. 3'-O-TBDMS) wird der i. Hochvak. getrocknete Rückstand einer präparativen HPLC-Trennung unterworfen. Säulenmaterial: MN Nucleoprep 100-20 von Macherey-Nagel; Laufmittel: *n*-Hexan/Isopropylacetat (3:2), wobei das gewünschte 2'-Isomer **43a** als sog. *slow*-Isomer erhalten wird.

Ausbeute: 466 mg (0.7 mmol, 41 %), farbloser Schaum.

DC: $R_f = 0.55$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 99:1)

1H -NMR: (400 MHz, $DMSO-d_6$)

δ [ppm] = 8.48 (s, 1H, H2), 7.47 (dd, $J = 8.9$ Hz, $J = 2.0$ Hz, 1H, H7), 7.39–6.84 (m, 13H, H_{arom}), 7.12 (dt, $J = 8.5$ Hz, $J = 2.0$ Hz, 1H, H5), 5.95 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H, H1'), 5.21 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, 3'-OH), 4.59 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H, 2'H), 4.19 (m, 1H,

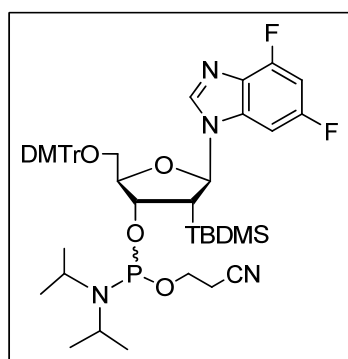
H3'), 4.14 (m, 1H, H4') 3.73 (s, 6H, OCH₃), 3.30 (m, 2H, H5'), 0.72 (s, 9H, C(CH₃)₃), -0.08 (s, 3H, SiCH), -0.21 (s, 3H, SiCH).

¹³C-NMR: (100.6 MHz, DMSO-d₆)

158.1 (C4), 158.0 (C_{arom}), 152.6 (C6), 144.5 (C_{arom}), 143.5 (C2), 135.1 (C_{arom}), 135.1 (C_{arom}) 134.4 (C9), 129.6 (C_{arom}), 128.9 (C8), 127.7 (C_{arom}), 127.4 (C_{arom}), 126.6 (C_{arom}), 113.1 (C_{arom}), 97.9 (C5), 95.2 (C7), 88.5 (C1'), 85.7 (DMTr), 84.3 (C4'), 74.6 (C2'), 69.6 (C3'), 63.3 (C5'), 54.8 (OCH₃), 25.3 (SiC(CH₃)₃), 17.6 (SiC(CH₃)₃), -5.6 (SiCH₃), -5.9 (SiCH₃).

ESI(-)-MS: *m/z* 701.6 [M-H]⁻

3'-O-(2-Cyanethoxy-*N,N*-diisopropylamin)phosphin-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose



46

C₄₈H₆₁F₂N₄O₇PSi

903.04 g/mol

Man löst unter Argonatmosphäre in einem ausgeheizten Rundkolben 240 mg (0.34 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose **43** in 4.5 mL abs. Acetonitril. Nach Zugabe von 362 μL *sym*-Collidin (2.7 mmol, 8 eq.), sowie 13.5 μL *N*-Methylimidazol (0.17 mmol, 0.5 eq.) wird das Reaktionsgemisch auf 0°C abgekühlt. Langsam setzt man mittels Kanüle 137 μL (0.61

mmol, 1.8 eq.) 2-Cyanoethyldiisopropylchlorphosphoramidit **44** hinzu und rührt für 60 min bei 0°C. Das Fortschreiten der Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert (CH₂Cl₂/MeOH 96:4). Schließlich lässt man das Reaktionsgemisch kurz auf Raumtemp. erwärmen und beendet die Phosphitylierung durch Zugabe weniger mL einer 0.01 M Zitronensäure-Lsg. Es wird drei Mal mit jeweils 20 mL 0.01 M Zitronensäure-Lsg. extrahiert und die wässrige Phase wird zwei Mal gegen Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Extrakte werden über MgSO₄ und getrocknet das Lösemittel wird i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird unter Argon in wenig Dichlormethan aufgenommen und an Kieselgel im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/MeOH (97:3) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute: 188 mg (0.19 mmol, 81%), beide Diastereomere als farbloser Schaum.

DC: $R_f = 0.59$ (CH₂Cl₂/MeOH 97:3)

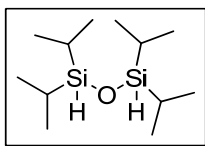
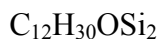
¹H-NMR: (400 MHz, Aceton-d₆)

δ [ppm] = 8.35 (s, 1H, H₂), 7.54–7.30 (m, 10H, H₇, H_{arom}), 6.95–6.90 (m, 5H, H₅, H_{arom}), 6.10 (d, $J = 7.4$ Hz 1H, H₁'), 4.92–4.89 (m, 1H, H₃'), 4.57–4.52 (m, 1H, H₂'), 4.45–4.43 (m, 1H, H₄'), 4.14–4.01 (m, 2H, H₅' , H₅''), 3.81 (s, 6H, O-CH₃), 3.78–3.70 (m, 2H, -OCH₂CH₂CN), 3.55–3.53 (m, 2H, -CH-CH₃ aus *i*Pr), 2.88–2.85 (m, 2H, OCH₂CH₂CN), 1.24 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H, 2 x CH₃ *i*Pr), 1.14 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H, 2 x CH₃ *i*Pr), 0.82 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 0.00, -0.27 (s, 6H, SiCH₃).

³¹P-NMR: (121.5 MHz, Aceton-d₆)

δ [ppm] = 148.5, 148.3. (Verhältnis: 1:4)

MALDI(+)-MS: m/z 903.03 [M]

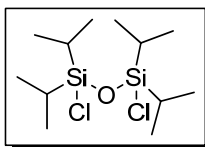
1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan**52**

246.18 g/mol

Man gibt zu 19.5 g (0.8 mol) Magnesiumspänen in einem ausgeheizten Dreihalskolben unter Schutzgasatmosphäre 100 mL abs. Diethylether. Nachfolgend werden langsam 78 mL (0.8 mol) 2-Brompropan in 150 mL Diethylether zugetropft. Nach Anspringen der Grignard-Reaktion wird die Suspension für 45 min refluxiert. Anschließend gibt man zum Reaktionsgemisch tropfenweise 28 mL (0.28 mol) Trichlorsilan in 350 mL Diethylether hinzu und refluxiert nach vollständiger Zugabe für weitere 4 h. Es ist die Bildung eines farblosen Niederschlages zu beobachten, der sich nach Zugabe von 300 mL 10%iger Salzsäure zur abgekühlten Reaktionsmischung langsam wieder auflöst. Das Reaktionsgemisch wird mit Wasser gewaschen, die wässr. Phase wird gegen Dichlormethan ausgeschüttelt und die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und i.Vak eingeeengt. Der ölige Rückstand wird für 150 min über Molekularsieb bei 100°C gerührt; anschließend erfolgt Destillation im Ölpumpenvakuum (Sdp. 75°C , 3 mbar).

Ausbeute: 25.1 g (75 %)

Brechungsindex: $n_D^{20} = 1.435$ $^1\text{H-NMR}$: (250 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 4.22 (s, 2H, Si-H), 1.21–1.01 (m, 28H, Si- CH_3 , Si-*i*Pr).

1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxandichlorid**53** $C_{12}H_{28}Cl_2OSi_2$

314.43 g/mol

Herstellung der Cl_2 -gesättigten CCl_4 -Lösung:

Aus einer Chlor-Gasflasche wird das Chlor zur Trocknung zunächst durch eine mit konz. Schwefelsäure gefüllte Waschflasche geleitet und anschließend unter Rühren 30 min in 400 mL Tetrachlorkohlenstoff geleitet. Die zuvor farblose Flüssigkeit färbt sich gelb. Überschüssiges Chlor wird mit ges. Natriumhydroxid-Lsg. vernichtet.

Chlorierung von 1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan **52**:

In einem Rundkolben wird zu 25 g 1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan **52** so lange eine Chlor-gesättigte CCl_4 -Lösung zugetropft, bis die entstehende Gelbfärbung der Lösung nicht mehr verschwindet. Anschließend entfernt man den Tetrachlorkohlenstoff i. Vak. und man destilliert den Rückstand im Ölpumpenvakuum. Man erhält das Produkt 1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxandichlorid als farblose Flüssigkeit mit einem Siedepunkt von 110°C bei 10 mbar.

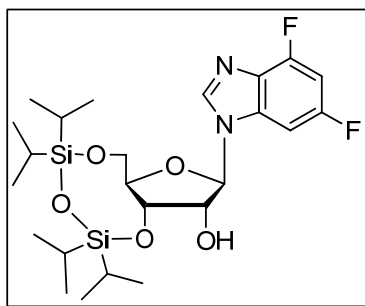
Ausbeute: 28.6 g (89 %), farblose Flüssigkeit

1H -NMR: (250 MHz, $CDCl_3$)

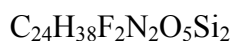
δ [ppm] = 1.19–0.99 (m, 28H, Si- CH_3 , Si-*i*Pr)-

ESI(-)-MS: m/z 313.2 [M-H]⁻

3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose



54



528.74 g/mol

In einem ausgeheizten Rundkolben werden unter Schutzgasatmosphäre 2.69 g (9.4 mmol) 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose **40** in 28 mL abs. Pyridin gelöst. Nach langsamer Zugabe von 3.88 mL (12.2 mmol, 1.3 eq.) 1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxandichlorid **53** rührt man die Reaktionsmischung für 6 h bei Raumtemp. Hierbei ist die Bildung des ausfallenden Pyridiniumchlorids als farbloser Niederschlag zu beobachten. Die Reaktion wird durch Zugabe von wenigen mL Wasser gestoppt und man wäscht das Reaktionsgemisch drei Mal mit jeweils 75 mL einer ges. NaHCO₃-Lösung. Die wässrige Phase wird mehrmals Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird mehrmals mit wenig Toluol coevaporiert und schließlich säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt. Als Eluent wird ein Gemisch aus Dichlormethan/Methanol 98:2 verwendet. Man erhält das Produkt **53** als farblosen Schaum.

Ausbeute: 4.34 g (8.2 mmol, 87 %), farbloser Schaum

DC: R_f = 0.37 (CH₂Cl₂/MeOH 98:2)

¹H-NMR: (250 MHz, CDCl₃)

δ [ppm] = 8.13 (s, 1H, H2), 7.01 (dd, *J* = 8.2 Hz, *J* = 2.2 Hz, 1H, H7), 6.79 (dt, *J* = 10.2 Hz, *J* = 2.2 Hz, 1H, H5), 5.85 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H1'), 4.56–4.51 (m, 1H,

H3'), 4.20–4.05 (m, 4H, H2', H4', H5', H5''), 3.27 (br s, 1H, 2'-OH), 1.09–0.98 (m, 28H, Si-CH₃, Si-*i*Pr).

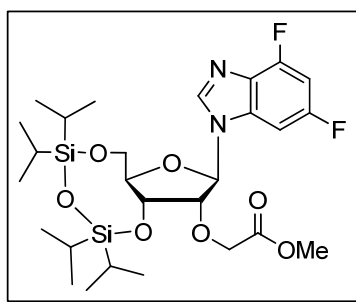
¹³C-NMR: (63 MHz, CDCl₃)

δ [ppm] = 161.4 (d, *J* = 10.7 Hz, CF), 156.5 (dd, *J* = 10.8 Hz, CF), 151.6 (C2), 134.3 (C9), 129.6 (C8), 98.7 (q, *J* = 22.6 Hz, C5), 93.5 (C7), 90.5 (C1'), 82.1 (C4'), 75.0 (C2'), 69.7 (C3'), 60.7 (C5'), 17.2 (SiCH₂CH₃), 13.0 (SiCH₂CH₃).

ESI(+)-MS: *m/z* 529.7 [M-H]⁺

ESI-HRMS: Berechnet für [C₂₄H₃₈F₂N₂O₅Si₂+H]⁺: 529.2365, gefunden: 529.2361.

3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(methoxycarbonylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose



55

C₂₇H₄₂F₂N₂O₇Si₂

600.25 g/mol

Es werden 895 mg (1.69 mmol) 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose **54** unter Argonatmosphäre in 9 mL abs. THF gelöst. Man kühlt das Reaktionsgemisch auf –30°C, gibt 26 mg trockenes Natriumhydrid (1.07 mmol, 1.5 eq.) hinzu und rührt das Reaktionsgemisch 20 min bei –20°C. Nun werden innerhalb von 15 min tropfenweise 198 μL (2.13 mmol, 3 eq.) Bromessigsäuremethylester zugesetzt. Anschließend rührt man das milchig-trübe Reaktionsgemisch ü. N. bei 0°C. Die Reaktionskontrolle erfolgt mittels DC im Laufmittel CH₂Cl₂/MeOH (97:3). Nach beendeter Reaktion wird die Reaktionslösung im Scheidetrichter mehrfach mit einer ges. NaCl-Lsg. gewaschen und die wässr. Phase wird mehrfach mit Dichlormethan extrahiert. Nach dem Trocknen der vereinigten organischen Phasen über

MgSO₄ entfernt man das Lösemittel i. Vak. und reinigt den Rückstand säulen-
chromatographisch an Kieselgel im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/MeOH (98:2).

Ausbeute: 624 mg (1.04 mmol, 61 %), farbloser Schaum.

DC: R_f = 0.41 (CH₂Cl₂/MeOH 98:2)

¹H-NMR: (250 MHz, CDCl₃)

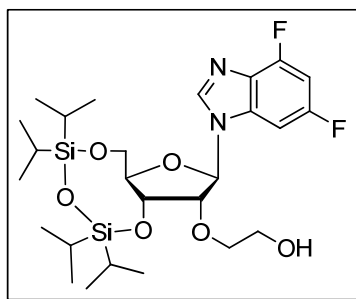
δ [ppm] = 8.30 (s, 1H, H2), 7.24 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H7), 6.81 (dt, *J* = 10.2 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H, H5), 6.02 (s, 1H, H1'), 4.55–4.50 (m, 1H, H3'), 4.48–4.44 (m, 2H, CH₂), 4.33–4.27 (m, 1H, H2'), 4.22–4.17 (m, 1H, H4'), 4.07–4.00 (m, 2H, H5', H5''), 3.77 (s, 3H, CH₃), 1.10–1.03 (m, 28H Si-CH₃, Si-*i*Pr).

¹³C-NMR: (64 MHz, CDCl₃)

δ [ppm] = 170.7 (CO), 159.0 (CF), 155.5 (CF), 140.9 (C2), 134.4 (C_{arom}), 129.0 (C_{arom}), 98.9 (C5), 94.0 (C7), 89.8 (C1'), 82.2 (C4'), 81.2 (C2'), 70.0 (C3'), 68.1 (Cα), 59.5 (C5'), 52.1 (CH₃), 17.3 (SiCH₂CH₃), 13.5, 13.0, 12.7 (SiCH₂CH₃).

ESI(+)-MS: *m/z* 601.3 [M+H]⁺

**3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(β-hydroxyethyl)-1'-
desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose**



56

C₂₆H₄₂F₂N₂O₆Si₂

572.25 g/mol

Unter Schutzgasatmosphäre werden 459 mg (0.76 mmol) 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraiso-
propylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(methoxycarbonylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-

benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **55** in 7.5 mL einer Mischung aus abs. THF und abs. Methanol (4:1) gelöst und man kühlt die Lösung auf 0°C ab. Nach Zugabe von 70 mg (3.19 mmol, ~ 4.2 eq.), Lithiumborhydrid rührt man die Lösung ü. N. bei 4°C. Schließlich lässt man auf Raumtemp. erwärmen und stoppt die Reaktion durch Zugabe von wenig ges. Ammoniumchlorid-Lsg. Das Reaktionsgemisch wird mit Dichlormethan extrahiert, die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird mittels Säulenchromatographie an Kieselgel aufgereinigt. Eluent: CH₂Cl₂/MeOH (98:2).

Ausbeute: 337 mg (0.59 mmol, 78 %), farbloser, amorpher Feststoff.

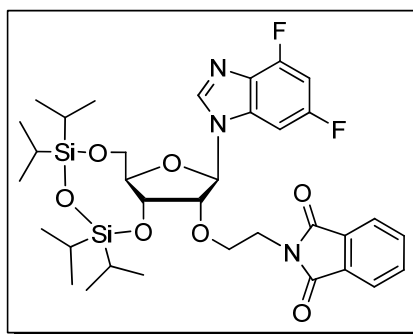
DC: $R_f = 0.16$ (CH₂Cl₂/MeOH 98:2)

¹H-NMR: (250 MHz, CDCl₃)

δ [ppm] = 8.25 (s, 1H, H2), 6.94 (dd, $J = 8.2$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1H, H7), 6.82 (dt, $J = 10.1$ Hz, $J = 2.1$ Hz, 1H, H5), 5.85 (s, 1H, H1'), 4.47 (q, $J = 4.6$ Hz, 1H, H3'), 4.26–4.20 (m, 1H, H4'), 4.14–4.08 (m, 1H, H2'), 4.01–3.95 (m, 1H, α -CH₂), 3.90–3.84 (m, 3H, α -CH₂, H5', H5''), 3.74–3.71 (m, 2H, β -CH₂), 2.49 (br s, 1H, OH), 1.15–1.01 (m, 28H Si-CH₃, Si-*i*Pr).

ESI(+)-MS: m/z 573.3 [M+H]⁺

3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(β -phthalimidoethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose



60

C₃₄H₄₅F₂N₃O₇Si₂

701.90 g/mol

In einem ausgeheizten Rundkolben werden 440 mg (0.77 mmol) 3',5'-*O*-(1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-2'-*O*-(β -hydroxyethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **56** vorgelegt und 35 mL abs. THF gelöst. Zur braunen Lösung werden 116 mg (0.79 mmol) Phthalimid sowie 301 mg (1.15 mmol, 1.5 eq.) Triphenylphosphin zugesetzt und man rührt bis alles in Lösung gegangen ist. Anschließend gibt man langsam 180 mg Diethylazodicarboxylat (DEAD, 1.15 mmol, 1.5 eq.) mittels Injektionspritze hinzu und rührt das Reaktionsgemisch ü. N. bei Raumtemp. Danach stoppt man die Reaktion durch Zugabe weniger mL einer wässr. ges. NaHCO₃-Lsg. und extrahiert das Reaktionsgemisch mehrfach mit Dichlormethan. Nach dem Trocknen der organischen Extrakte über MgSO₄ wird im Vakuum vom Lösemittel befreit und der braunfarbene Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt. Eluent: CH₂Cl₂/MeOH (98:2 → 9:1).

Ausbeute: 470 mg (0.67 mmol, 87 %), leicht gelbfarbener Schaum

DC: $R_f = 0.50$ (CH₂Cl₂/MeOH 98:2)

¹H-NMR: (250 MHz, CDCl₃)

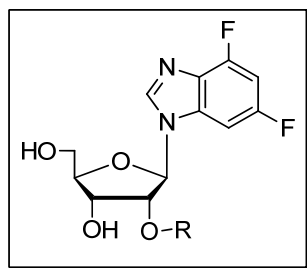
δ [ppm] = 8.19 (s, 1H, H2), 7.88–7.85 (m, 2H, H_{phthalimid}), 7.77–7.72 (m, 2H, H_{phthalimid}), 6.96 (dd, $J = 8.1$ Hz, $J = 2.0$ Hz, 1H, H7), 6.77 (dt, $J = 10.2$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1H, H5), 5.78 (s, 1H, H1'), 4.48 (q, $J = 4.4$ Hz, 1H, H3'), 4.32–4.30 (m, 1H, H4'), 4.27–4.19 (m, 3H, H2', α -CH₂), 3.97–3.44 (m, 2H, β -CH₂), 3.89–3.84 (m, 2H, H5', H5'), 1.14–0.96 (m, 28H Si-CH₃, Si-*i*Pr).

¹³C-NMR: (64 MHz, CDCl₃)

δ [ppm] = 169.7 (CO), 168.3 (CO), 156.5 (CF), 141.2 (C2), 134.4, 134.1, 133.8, 133.1, 132.0, 123.1 (6 x C_{arom}), 98.6 (C5), 93.7 (C7), 89.5 (C1'), 82.3 (C4'), 81.2 (C2'), 70.1 (C3'), 69.0 (C α), 59.4 (C5'), 38.2 (C β), 17.2 (SiCH₃), 13.4, 13.0, 12.8 (SiCH₃).

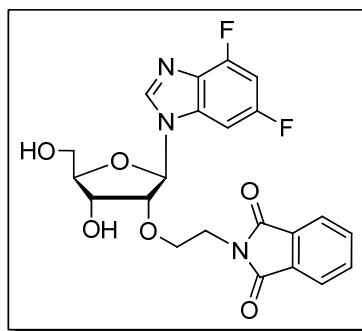
MALDI(-)-MS: m/z 699.5 [M-2H]²⁻

**Allgemeine Reaktionsvorschrift Nr. 2 zur 3'-5'-Entschützung der
Nucleosid-Bausteine**



Das 3'-5'-Markiewicz-blockierte Nucleosid (1 mmol) wird in 40 mL abs. THF unter Schutzgasatmosphäre gelöst. Es werden langsam 2.5 äquivalente einer 1 M Tetra-butylammoniumfluorid-Lösung in THF zugetropft. Man kontrolliert das Fortschreiten der Entschütungsreaktion mittels Dünnschichtchromatographie und engt schließlich die Reaktionslösung i.Vak. ein. Der verbleibende Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt.

**1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(β-phthalimidoethyl)-β-D-
ribofuranose**



63

$C_{22}H_{19}F_2N_3O_6$

459.12 g/mol

Die Abspaltung der 3'-5'-TiPDS-Schutzgruppe erfolgt analog zur allgemeinen Vorschrift Nr. 2. Eingesetzte Mengen : 455 mg (0.65 mmol) 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(β-phthalimidoethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-β-D-ribo-

furanose **60**. Reaktionsdauer : 40 min. Aufreinigung durch Säulenchromatographie an Kieselgel im Laufmittel CH₂Cl₂/MeOH (95:5 → 7:3).

Ausbeute: 212 mg (0.46 mmol, 71 %), leichtgelber, amorpher Feststoff

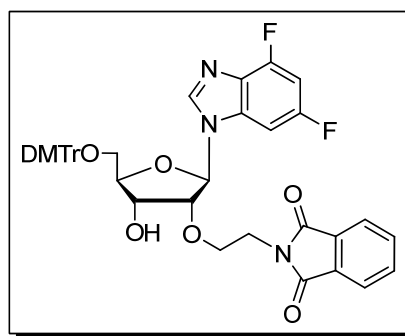
DC: R_f = 0.17 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5)

¹H-NMR: (250 MHz, DMSO-d₆)

δ [ppm] = 8.46 (s, 1H, H2), 7.85–7.73 (m, 4H, H_{phthalimid}), 7.49 (dd, *J* = 9.1 Hz, *J* = 2.0 Hz, 1H, H7), 7.04 (dt, *J* = 10.0 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H, H5), 5.95 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H, H1'), 5.30 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, 3'-OH), 5.23 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H, 5'-OH), 4.35–4.27 (m, 2H, H3',H4'), 4.03–4.01 (m, 1H, α-CH₂), 3.96–3.89 (m, 1H, H2'), 3.75–3.65 (m, 5H, H5', H5'', α-CH₂, β-CH₂).

ESI(-)-MS: *m/z* 457.9 [M-H]⁻

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-(β-phthalimidoethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose



64

C₄₃H₃₇F₂N₃O₈

761.25 g/mol

Die selektive Blockierung der 5'-OH-Funktion durch 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid erfolgt analog zu allgemeiner Vorschrift Nr. 1. Eingesetzte Mengen: 345 mg (0.75 mmol) 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(β-phthalimidoethyl)-β-D-ribofuranose **63**, 331 mg (0.98 mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid, 4 mL abs. Pyridin, 173 μL NEt₃. Reaktionsdauer: 17 h.

Ausbeute: 430 mg (0.55 mmol, 75 %), hellgelber Schaum.

DC: $R_f = 0.40$ (CH₂Cl₂/MeOH 98:2)

¹H-NMR: (250 MHz, CDCl₃)

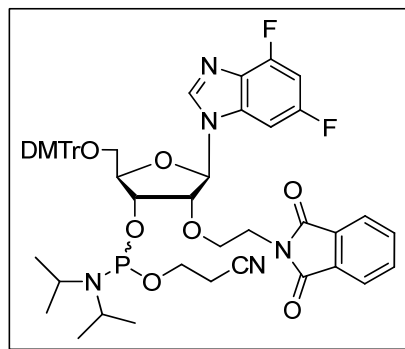
δ [ppm] = 7.95 (s, 1H, H2), 7.76–7.64 (m, 4H, H_{phthalimid}), 7.23–7.13 (m, 9H, H_{arom}), 6.91 (dd, $J = 7.7$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H, H7), 6.78–6.72 (m, 4H, H_{arom}), 6.66 (dt, $J = 9.7$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1H, H5), 5.77 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H, H1'), 4.38–4.35 (m, 1H, H3'), 4.26–4.21 (m, 1H, H2'), 4.17–4.13 (m, 1H, H4'), 3.84–3.78 (m, 1H, α -CH₂), 3.71 (s, 6H, OCH₃), 3.69–3.65 (m, 2H, H5', H5''), 3.43–3.42 (m, 2H, β -CH₂), 3.38–3.45 (m, 1H, α -CH₂), 3.07 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, 3'-OH).

¹³C-NMR: (64 MHz, CDCl₃)

δ [ppm] = 169.5 (CO), 168.4 (CO), 159.5 (CF), 144.5 (C_{arom}), 142.4 (C2), 135.3, 134.3, 134.2, 133.8, 133.0, 132.2, 130.1, 128.1, 128.0, 127.3, 123.5 (11 x C_{arom}), 113.3 (C_{arom}), 98.1 (C5), 93.8 (C7), 87.5 (C1'), 85.4 (C_{DMTr}), 84.4 (C4'), 83.5 (C2'), 70.3 (C3'), 69.4 (C α), 63.2 (C5'), 55.3 (OCH₃), 38.0 (C β).

MALDI(+)-MS: m/z 762.9 [M+H]⁺

**3'-O-(2-Cyanoethoxy-N,N-diisopropylamin)phosphin-5'-O-(4,4'-
dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-(β-phthalimidoethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-
1-N-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose**



65

$C_{52}H_{54}F_2N_5O_9P$

961.36 g/mol

In einem ausgeheizten Rundkolben werden unter Argonatmosphäre 100 mg (0.13 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-(β-phthalimidoethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose **64** in 3.5 mL abs. Acetonitril gelöst. Nach Zugabe von 164 μL *sym*-Collidin (1.28 mmol, 8 eq.) sowie 5.5 μL *N*-Methylimidazol (0.07 mmol, 0.5 eq.) wird das Reaktionsgemisch auf 0°C abgekühlt. Man gibt langsam 58 μL (0.23 mmol, 1.8 eq.) 2-Cyanoethyldiisopropylchlorphosphoramidit **44** hinzu und rührt für 45 min bei 0°C. Das Fortschreiten der Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert (CH₂Cl₂/MeOH 97:3). Schließlich lässt man das Reaktionsgemisch für 10 min auf Raumtemp. erwärmen und beendet die Phosphitylierung durch Zugabe weniger mL einer 0.01 M Zitronensäure-Lsg. Es wird drei Mal mit jeweils 10 mL 0.01 M Zitronensäure-Lsg. extrahiert und die wässrige Phase wird zwei Mal gegen Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Extrakte werden über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel wird i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird unter Argon in wenig Dichlormethan aufgenommen und an Kieselgel im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/MeOH (96:4) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute: 69 mg (0.07 mmol, 55 %) beide Diastereomere als leicht gelblicher Schaum.

DC: $R_f = 0.45$ (CH₂Cl₂/MeOH 96:4)

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, Aceton- d_6)

δ [ppm] = 7.97 (s, 1H, H2), 7.44–7.38 (m, 4H, $\text{H}_{\text{phthalimid}}$), 7.34–7.21 (m, 9H, H_{arom}), 6.99 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H7), 6.85–6.80 (m, 4H, H_{arom}), 6.63 (t, $J = 10.0$ Hz, 1H, H5), 6.84 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, H1'), 4.51–4.47 (m, 1H, H3'), 4.40–4.31 (m, 3H, H4', H2', $\alpha\text{-CH}_2$), 4.12 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H, $\alpha\text{-CH}_2$), 3.94–3.85 (m, 3H, H5', H5''), 3.78 (s, 6H, OCH_3), 3.71–3.59 (m, 4H, -CH-CH_3 aus *iPr*), 3.42–3.32 (m, 2H, $\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 3.20–3.15 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 2.71–2.68 (m, 1H, $\beta\text{-CH}_2$), 2.37–2.33 (m, 1H, $\beta\text{-CH}_2$), 1.16 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H, 2 x CH_3 *iPr*), 1.06 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H, 2 x CH_3 *iPr*).

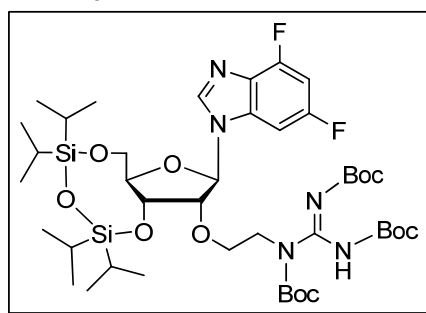
$^{31}\text{P-NMR}$: (121.5 MHz, Aceton- d_6)

δ [ppm] = 151.2, 149.9 (Verhältnis: 1:2)

MALDI(+)-MS: m/z 962.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$

3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(β -*N,N',N''*(tri-*tert*-butyloxycarbonyl)guanidinoethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)-

β -D-ribofuranose



67

$\text{C}_{42}\text{H}_{69}\text{F}_2\text{N}_5\text{O}_{11}\text{Si}_2$

913.45 g/mol

Man löst unter Schutzgasatmosphäre 260 mg (0.45 mmol) 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(β -hydroxyethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **56** in 39 mL abs. THF und versetzt diese Lösung mit 175 mg

(0.68 mmol, 1.5 eq.) Triphenylphosphin und 340 mg (0.9 mmol, 2 eq.) *N,N,N'*-(Tri-*tert*-butyloxycarbonyl)guanidin. Man kühlt das Reaktionsgemisch auf 0°C und gibt portionsweise 121 mg Diethylazodicarboxylat (DEAD, 0.68 mmol, 1.5 eq.) hinzu. Der Reaktionsansatz wird für 2 h in der Mikrowelle unter Rühren bestrahlt (300 W Leistung, 1 bar, 80°C). Anschließend wird überschüssiges *N,N,N'*-(tri-*tert*-butyloxycarbonyl)guanidin abfiltriert und das Filtrat wird mehrfach gegen eine ges. wässr. NaHCO₃-Lsg ausgeschüttelt. Die wässr. Phase wird zweimal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte werden über MgSO₄ getrocknet. Nach Einengen der Lösung wird der verbleibende Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel im Laufmittel CH₂Cl₂/MeOH (98:2) aufgereinigt.

Ausbeute : 334 mg (0.37 mmol, 82 %), farbloser Schaum.

DC: $R_f = 0.55$ (CH₂Cl₂/MeOH 98:2)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃)

δ [ppm] = 8.23 (s, 1H, H2), 7.09 (dd, $J = 8.1$ Hz, $J = 2.0$ Hz, 1H, H7), 6.79 (dt, $J = 10.1$ Hz, $J = 2.1$ Hz, 1H, H5), 5.86 (s, 1H, H1'), 4.48 (q, $J = 4.5$ Hz, 1H, H3'), 4.33–4.29 (m, 1H, H4'), 4.27–3.90 (m, 7H, H2', H5', H5'', α -CH₂, β -CH₂), 1.47–1.41 (m, 27 H, CH₃ aus BOC), 1.10–0.97 (m, 28H, Si-CH₃, Si-*i*Pr).

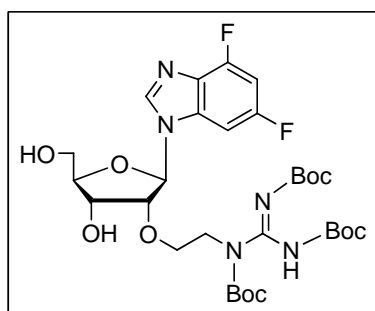
¹³C-NMR: (100.6 MHz, CDCl₃)

δ [ppm] = 159.3 (CF), 155.5 (CF), 153.0 (C_{Guanidin}), 146.6, 145.6, 145.0 (3 x CO Carbamat), 141.1 (C2), 134.2 (C_{arom}), 129.7 (C_{arom}), 98.5 (C5), 93.4 (C7), 89.8 (C1'), 83.9 (C4'), 82.7 (C2'), 81.2 (CCH₃ aus BOC), 70.3 (C α), 69.9 (C3'), 59.6 (C5'), 48.1 (C β), 28.1, 28.0, 27.9, 27.1 (CH₃ BOC) 17.1 (SiCHCH₃), 14.4, 14.2, 13.0, 12.6 (SiCHCH₃).

ESI(+)-MS: m/z 915.6 [M+2H]²⁺

ESI-HRMS: Berechnet für [C₄₂H₆₉F₂N₅O₁₁Si₂+H]⁺: 914.4578, gefunden : 914.4594

1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)-2'-*O*-(β -*N,N,N'*'(tri-*tert*-butyloxycarbonyl)guanidinoethyl)- β -D-ribofuranose



68

$C_{30}H_{43}F_2N_5O_{10}$

671.30 g/mol

Zum simultanen Entschützen der 3',5'-Hydroxyfunktionen wird nach allgemeiner Vorschrift Nr. 2 verfahren. Eingesetzte Mengen: 336 mg (0.37 mmol) 3',5'-*O*-(1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-2'-*O*-(β -*N,N,N'*'(tri-*tert*-butyloxycarbonyl)guanidinoethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **67**. Reaktionsdauer: 90 min. Laufmittelgemisch zur säulenchromatographischen Aufreinigung: $CH_2Cl_2/MeOH$ (95:5 \rightarrow 9:1).

Ausbeute: 186 mg (0.28 mmol, 75 %), farbloser Schaum.

DC: $R_f = 0.37$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1)

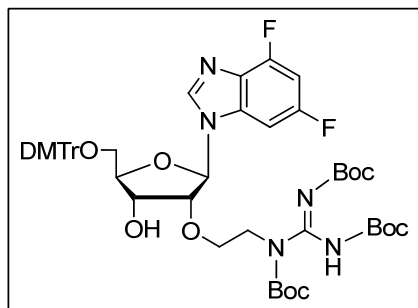
1H -NMR: (250 MHz, Aceton- d_6)

δ [ppm] = 8.19 (s, 1H, H2), 7.15 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1H, H7), 6.89 (dt, $J = 10.1$ Hz, $J = 2.1$ Hz, 1H, H5), 6.01 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, H1'), 4.55 (q, $J = 4.7$ Hz, 1H, H3'), 4.39–4.30 (m, 2H, H2', H4'), 4.15–3.90 (m, 6H, H5', H5'', α - CH_2 , β - CH_2), 2.25 (br s, 2H, 5'-OH, 3'-OH), 1.35–1.28 (m, 27 H, CH_3 aus BOC).

MALDI(+)-MS: m/z 673.8 $[M+2H]^{2+}$, 573.9 $[M-Boc+2H]^{2+}$

ESI-HRMS: Berechnet für $[C_{30}H_{43}F_2N_5O_{10}+Na]^+$: 694.2876, gefunden : 694.2897.

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-(β -*N,N',N''*(tri-*tert*-butyloxycarbonyl)guanidinoethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose



69

$C_{51}H_{61}F_2N_5O_{12}$

973.42 g/mol

186 mg (0.28 mmol) 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)-2'-O-(β -*N,N',N''*(tri-*tert*-butyloxycarbonyl)guanidinoethyl)- β -D-ribofuranose **68** werden gemäß allgemeiner Vorschrift Nr. 1 zum 5'-O-DMTr-blockierten Nucleosid **69** umgesetzt. Weitere Reaktanden: 122 mg (0.36 mmol, 1.3 eq.) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid, 2 mL abs. Pyridin, 67 μ L NEt_3 , Reaktionsdauer: 17 h.

Ausbeute: 150 mg (0.22 mmol, 80 %), leicht orangefarbener Schaum.

DC: $R_f = 0.47$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5)

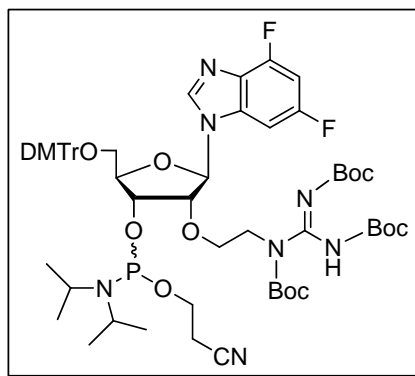
1H -NMR: (250 MHz, $DMSO-d_6$)

δ [ppm] = 8.45 (s, 1H, H2), 7.45 (dd, $J = 8.3$ Hz, $J = 2.1$ Hz, 1H, H7), 7.16–7.33 (m, 10H, H5, H_{arom}), 6.05 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H, H1'), 5.35 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H, 3'-OH), 4.49–4.35 (m, 3H, H2', H3', H4'), 3.79 (s, 6H, 2 x OCH_3), 3.64–3.48 (m, 3H, H5', H5'', α - CH_2), 3.22–3.18 (m, 1H, α - CH_2), 2.98–2.88 (m, 2H, β - CH_2), 1.48–1.22 (m, 27 H, CH_3 aus BOC).

MALDI(+)-MS: m/z 976.5 [$M+3H$] $^{3+}$

ESI-HRMS: Berechnet für [$C_{51}H_{61}F_2N_5O_{12}+Na$] $^+$: 996.4183, gefunden : 996.4182.

3'-O-(2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylamin)phosphin-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-(β-*N,N',N''*(tri-*tert*-butyloxycarbonyl)-guanidinoethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose



70

$C_{60}H_{78}F_2N_7O_{13}P$

1173.54 g/mol

Es werden 140 mg (0.14 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-(β-*N,N',N''*(tri-*tert*-butyloxycarbonyl)guanidinoethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)-β-D-ribofuranose **69** in einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgasatmosphäre in 2.6 mL abs. Acetonitril gelöst. Nach Zugabe von 153 μL *sym*-Collidin (1.15 mmol, 8 eq.), sowie 5.7 μL *N*-Methylimidazol (0.07 mmol, 0.5 eq.) wird das Reaktionsgemisch auf 0°C abgekühlt. Man gibt langsam 58 μL (0.26 mmol, 1.8 eq.) 2-Cyanoethyldiisopropylchlorphosphoramidit **44** hinzu und rührt für 60 min bei 0°C. Das Fortschreiten der Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert (CH₂Cl₂/MeOH 97:3). Schließlich lässt man das Reaktionsgemisch kurz auf Raumtemp. erwärmen und beendet die Phosphitylierung durch Zugabe weniger mL einer 0.01 M Zitronensäure-Lsg. Es wird drei Mal mit jeweils 10 mL 0.01 M Zitronensäure-Lsg. extrahiert und die wässrige Phase wird zwei Mal gegen Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Extrakte werden über MgSO₄ getrocknet das Lösemittel wird i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird unter Argon in wenig Dichlormethan aufgenommen und an Kieselgel im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/MeOH (96:4) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute: 141 mg (0.12 mmol, 86 %) beide Diastereomere als farblosen Schaum

DC: $R_f = 0.44$ (CH₂Cl₂/MeOH 96:4)

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, Aceton- d_6)

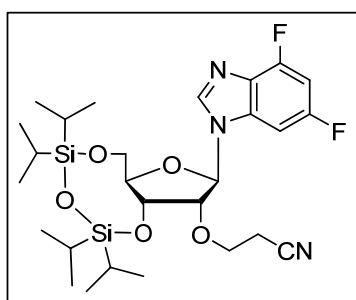
δ [ppm] = 8.21 (s, 1H, H2), 7.35–7.11 (m, 10H, H_{arom} , H7), 6.87–6.69 (m, 5H, H_{arom} , H5), 6.00 (s, 1H, H1'), 4.55–4.53 (m, 1H, H3'), 4.38–4.18 (m, 4H, H2', H4', H5', H5''), 3.67 (s, 6H, OCH_3), 3.64–3.44 (m, 6H, $-\text{CH}-\text{CH}_3$ aus *iPr*, $\alpha\text{-CH}_2$), 3.37–3.25 (m, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 3.20–3.12 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 2.45–2.39 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 1.45–1.33 (s, 27H, CH_3 aus BOC), 1.11 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, 2 x CH_3 *iPr*), 1.04 (d, $J = 6.7$ Hz, 6H, 2 x CH_3 *iPr*).

$^{31}\text{P-NMR}$: (121.5 MHz, Aceton- d_6)

δ [ppm] = 150.2, 149.8 (Verhältnis: 1:1.3)

MALDI(+)-MS: m/z 1193.1 [$\text{M}+\text{Na}-\text{H}$]

3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(β -cyanoethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose



72

$\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_5\text{Si}_2$

581.80 g/mol

In einem ausgeheizten Rundkolben werden unter Argonatmosphäre 980 mg (1.85 mmol) 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **54** und 603 mg Caesiumcarbonat (1.85 mmol, 1 eq.) in 8.7 mL *tert*-Butanol gelöst. Zum Reaktionsgemisch werden nun 2.42 mL (37 mmol, 20 eq.) frisch destilliertes Acrylnitril zugesetzt und man rührt das Gemisch für 2 h bei Raumtemp. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit Dichlormethan verdünnt und über eine

Saugfritte mit wenig Kieselgel abgesaugt. Man wäscht mit Dichlormethan nach und befreit das Filtrat vom Lösungsmittel. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt. Als Eluent verwendet man ein Gemisch aus Dichlormethan/Methanol 98:2. Man erhält **72** als gelblichen, amorphen Feststoff.

Ausbeute: 890 mg (1.53 mmol, 83 %), gelber, amorpher Feststoff

DC: $R_f = 0.53$ (CH₂Cl₂/MeOH 98:2)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃)

δ [ppm] = 8.15 (s, 1H, H2), 6.91 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 1H, H7), 6.70 (dt, $J = 10.1$ Hz, $J = 2.0$ Hz, 1H, H5), 5.81 (s, 1H, H1'), 4.48–4.45 (m, 1H, H3'), 4.23–4.18 (m, 4H, H5', α -CH₂), 4.11–4.09 (m, 1H, H4'), 3.97 (dd, $J = 2.5$ Hz, 13.5 Hz, 1H, H5''), 3.88 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H, H2'), 3.78–3.74 (m, 1H, α -CH₂), 2.64–2.60 (m, 2H, β -CH₂), 1.04–0.90 (m, 28H, Si-CH₃, Si-*i*Pr).

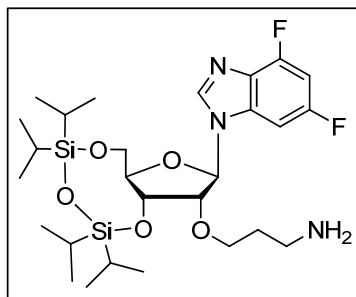
¹³C-NMR: (100.6 MHz, CDCl₃)

δ [ppm] = 158.5 (dd, $J = 243$ Hz, $J = 11$ Hz, CF), 152.6 (dd, $J = 257$ Hz, $J = 15$ Hz, CF), 139.8 (C2), 133.1 (C_{arom}), 128.7 (C_{arom}), 116.6 (CN), 97.6 (C5), 92.2 (dd, C7), 88.7 (C1'), 82.1 (C4'), 80.2 (C2'), 69.2 (C α), 65.6 (C3'), 58.5 (C5'), 18.6 (C β), 16.2 (SiCH₂CH₃), 12.0 (SiCH₂CH₃).

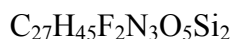
ESI(+)-MS: m/z 581.8 [M]

ESI-HRMS: Berechnet für [C₂₇H₄₁F₂N₃O₅Si₂+H]⁺: 582.2631, gefunden: 582.2637.

3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(γ -aminopropyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose



77



585.83 g/mol

In einem Autoklavenröhrchen ($\varnothing = 1.5$ cm) werden unter Argonatmosphäre 1.07 g (1.84 mmol) 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(β -cyanoethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **72** in 11 mL abs. Methanol gelöst. Es werden zwei Spatelspitzen Raney-Nickel-Katalysator, welcher zuvor gründlich mit Methanol gespült wurde, zugesetzt. Schließlich werden 8 mL einer Ammoniak-gesättigten Methanol-Lösung zugesetzt. Man hydriert das Reaktionsgemisch im Autoklaven bei einem Wasserstoffdruck von 30 bar unter ständigem Rühren bei Raumtemp. für 5 h. Anschließend wird das Reaktionsgemisch über Celite abgesaugt. Man wäscht mehrfach mit Methanol und engt das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockene ein. Zurück bleibt das Produkt **76** als orangefarbenes Öl, welches aufgrund seiner Reinheit nicht weiter aufgereinigt werden muss. Ausbeute: 1.08 g (1.84 mmol, quant.) orangefarbenes Öl.

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3)

δ [ppm] = 8.22 (s, 1H, H2), 6.93 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1H, H7), 6.81 (dt, $J = 10.1$ Hz, $J = 2.1$ Hz, 1H, H5), 5.83 (s, 1H, H1'), 4.52–4.49 (m, 1H, H3'), 4.28–4.13 (m, 2H, H2', H4'), 4.06–4.00 (m, 3H, H5', H5'', α -CH₂), 3.82 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H, α -CH₂), 3.77–3.74 (m, 1H, γ -CH₂), 3.56–3.54 (m, 1H, γ -CH₂), 2.89–2.86 (m, 2H, NH₂), 1.83–1.75 (m, 2H, β -CH₂), 1.11–0.98 (m, 28H, Si-CH₃, Si-*i*Pr).

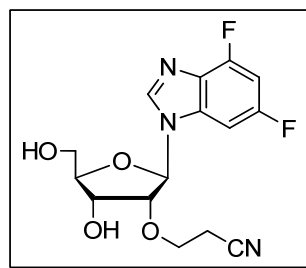
^{13}C -NMR: (100.6 MHz, CDCl_3)

δ [ppm] = 159.3 (dd, $J = 243$ Hz, $J = 11$ Hz, CF), 153.4 (dd, $J = 257$ Hz, $J = 15$ Hz, CF), 141.4 (C2), 134.2 (C_{arom}), 129.7 (C_{arom}), 98.4 (C5), 93.4 (d, C7), 89.8 (C1'), 82.4 (C4'), 81.6 (C2'), 70.0 (C_α), 69.8 (C3'), 59.6 (C5'), 38.4 (C γ), 28.1 (C β), 16.6 (SiCHCH_3), 12.2 (SiCHCH_3).

ESI(+)-MS: m/z 586.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$

ESI-HRMS: Berechnet für $[\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_5\text{Si}_2+\text{H}]^+$: 586.2944, gefunden : 586.2942.

1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(β -cyanoethyl)- β -D-ribofuranose



74

$\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_4$

339.29 g/mol

Man löst in einem ausgeheizten Rundkolben unter Argonatmosphäre 267 mg (0.46 mmol) 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(β -cyanoethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **72** in 4 mL abs. THF. Nun tropft man langsam 276 μL (1.61 mmol) einer Lösung von $\text{NEt}_3 \cdot 3 \text{ HF}$ dazu und rührt das Reaktionsgemisch für 60 min bei Raumtemp. Das Fortschreiten der Reaktion wird durch Dünnschichtchromatographie kontrolliert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5). Anschließend wird die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5 \rightarrow 9:1).

Ausbeute: 141 mg (0.41 mmol, 90 %)

DC: $R_f = 0.33$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1)

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, Aceton- d_6)

δ [ppm] = 8.51 (s, 1H, H2), 7.55 (ddd, $J = 0.7$ Hz, $J = 2.2$ Hz, $J = 9.0$ Hz, 1H, H7), 6.93 (dt, $J = 10.3$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1H, H5), 6.11 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H, H1'), 4.64–4.62 (m, 1H, H3'), 4.53 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H, H4'), 4.37 (br s, 2H, 5'-OH, 3'-OH), 4.23–4.21 (m, 1H, H2'), 4.00–3.94 (m, 1H, α -CH $_2$), 3.93–3.90 (m, 2H, H5', H5''), 3.83–3.77 (m, 1H, α -CH $_2$), 2.76–2.72 (m, 2H, β -CH $_2$).

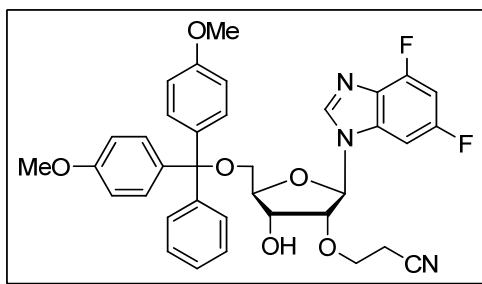
$^{13}\text{C-NMR}$: (100.6 MHz, Aceton- d_6)

δ [ppm] = 159.9 (dd, $J = 239$ Hz, $J = 11$ Hz, CF), 154.1 (dd, $J = 254$ Hz, $J = 15$ Hz, CF), 143.9 (C2), 136.3 (C $_{\text{arom}}$), 130.4 (C $_{\text{arom}}$), 118.9 (CN), 98.6 (C5), 95.8 (dd, C7), 88.9 (C1'), 87.3 (C4'), 83.4 (C2'), 70.5 (C3'), 66.7 (C $_{\alpha}$), 62.3 (C5'), 19.2 (C $_{\beta}$).

ESI(+)-MS: m/z 341.4 [M+2H] $^{2+}$

ESI-HRMS: Berechnet für [C $_{15}$ H $_{15}$ F $_2$ N $_3$ O $_4$ +Na] $^+$: 362.0929, gefunden: 362.0928.

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(β -cyanoethyl)- β -D-ribofuranose



75

C $_{36}$ H $_{33}$ F $_2$ N $_3$ O $_6$

641.66 g/mol

Die Einführung der 5'-DMTr-Schutzgruppe erfolgt nach allgemeiner Vorschrift Nr. 1. Eingesetzte Mengen: 150 mg (0.44 mmol) 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(β -cyanoethyl)- β -D-ribofuranose **74**, 2.2 mL abs. Pyridin, ~ 104 μL NEt $_3$, 210 mg 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (0.59 mmol, 1.4 eq.). Reaktionsdauer: 17 h.

Ausbeute: 242 mg (0.38 mmol, 86 %)

DC: $R_f = 0.39$ (CH₂Cl₂/MeOH 95:5)

¹H-NMR: (400 MHz, Aceton-d₆)

δ [ppm] = 8.34 (s, 1H, H2), 7.45–7.42 (m, 2H, H_{arom}), 7.38 (dd, $J = 2.1$ Hz, $J = 8.8$ Hz, 1H, H7), 7.34–7.20 (m, 7H, H_{arom}), 6.94 (dt, $J = 10.1$ Hz, $J = 2.1$ Hz, 1H, H5), 6.86–6.80 (m, 4H, H_{arom}), 6.14 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H, H1'), 4.66–4.61 (m, 1H, H3'), 4.48–4.46 (m, 1H, H4'), 4.31–4.27 (m, 1H, H2'), 4.08–3.86 (m, 2H, H5',H5''), 3.77 (s, 6H, OCH₃), 3.42 (d, $J = 3.9$ Hz, 2H, α -CH₂), 2.84–2.82 (m, 1H, 3'-OH), 2.88–2.75 (m, 2H, β -CH₂).

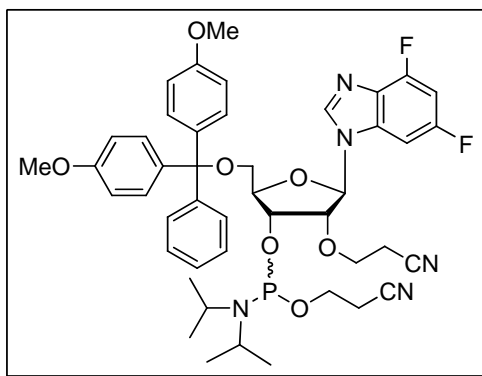
¹³C-NMR: (100.6 MHz, Aceton-d₆)

δ [ppm] = 159.6 (CF), 153.5 (CF), 145.9 (C_{arom}), 143.1 (C2), 136.6 (C_{arom}), 130.9, 129.0, 128.6, 127.6 (4 x C_{arom}), 118.8 (CN), 113.9 (C_{arom}), 98.6 (C5), 95.5 (C7), 88.6 (C1'), 87.2 (C4'), 85.2 (C_{DMTr}), 82.9 (C2'), 70.6 (C3'), 66.6 (C α), 64.2 (C5'), 55.5 (OCH₃), 19.2 (C β).

ESI(-)-MS: m/z 640.7 [M-H]⁻

ESI-HRMS: Berechnet für [C₃₆H₃₃F₂N₃O₆+H]⁺: 642.2415, gefunden : 642.2422.

3'-O-(2-Cyanoethoxy-N,N-diisopropylamin)phosphin-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(β-cyanoethyl)-β-D-ribofuranose



76

$C_{45}H_{50}F_2N_5O_7P$

841.88 g/mol

In einem ausgeheizten Rundkolben werden unter Schutzgasatmosphäre 200 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(β-cyanoethyl)-β-D-ribofuranose (0.31 mmol) **75** in 4.3 mL abs. Acetonitril gelöst. Nachfolgend gibt man 330 μL (2.5 mmol, 8 eq.) *sym*-Collidin sowie 12.3 μL (0.16 mmol, 0.5 eq.) *N*-Methylimidazol hinzu und kühlt die Reaktionsmischung im Eisbad auf 0°C ab. Langsam werden nun 125 μL (0.56 mmol, 1.8 eq.) 2-Cyanoethyldiisopropylchlorphosphoramidit **44** zugespritzt und man lässt die gelbfarbene Reaktionslösung für 80 min bei 0°C rühren. Mittels DC-Kontrolle lässt sich der Reaktionsablauf verfolgen (CH₂Cl₂/MeOH 97:3). Anschließend lässt man die Reaktionsmischung auf Raumtemp. erwärmen und gibt 2 mL 0.01 M Zitronensäure-Lsg. hinzu. Man schüttelt das Reaktionsgemisch zwei Mal gegen 10 mL 0.01 M Zitronensäure-Lsg. aus und wäscht schließlich noch einmal mit einer wässr. ges. NaHCO₃-Lsg. Die wässrige Phase wird noch zwei Mal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer ohne Wasserbad vom Lösemittel befreit. Der Rückstand wird unter Schutzgas in wenige mL Dichlormethan aufgenommen und mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel aufgereinigt. Auf diese Weise erhält man das gewünschte Phosphoramidit **75** als Diastereomengemisch.

Ausbeute: 188 mg (0.22 mmol, 71 %), farbloser Schaum beider Diastereomere

DC: $R_f = 0.62$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 97:3, beide Diastereomere)

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, Aceton- d_6)

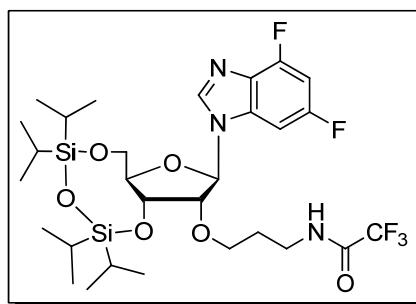
δ [ppm] = 8.33 (s, 1H, H2), 7.47–7.20 (m, 10H, H7, H_{arom}), 6.93 (dt, $J = 10.4$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1H, H5), 6.87–6.81 (m, 4H, H_{arom}), 6.19 (d, $J = 4.8$ Hz 1H, H1'), 4.75–4.71 (m, 1H, H3'), 4.50–4.48 (m, 1H, H4'), 4.41–4.38 (m, 1H, H2'), 4.15–3.99 (m, 2H, H5', H5''), 3.91–3.83 (m, 2H, $\alpha\text{-CH}_2$), 3.77 (s, 6H, O- CH_3), 3.73–3.66 (m, 3H, $\gamma\text{-CH}_2\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 3.53–3.39 (m, 3H, $\gamma\text{-CH}_2\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 2.84–2.72 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 1.25–1.11 (m, 14H, 2*i*Pr).

$^{31}\text{P-NMR}$: (121.5 MHz, Aceton- d_6)

δ [ppm] = 150.1, 149.8 (Verhältnis: 1:1.3)

MALDI(+)-MS: m/z 842.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$

3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(γ -N-trifluoroacetamidopropyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose



79

$\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{F}_5\text{N}_3\text{O}_6\text{Si}_2$

681.84 g/mol

In einem ausgeheizten Kolben werden unter Schutzgasatmosphäre 570 mg 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(γ -aminopropyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **77** (0.97 mmol) in 11 mL abs. Pyridin gelöst und auf 0°C gekühlt. Nun gibt man 180 μL Trifluoressigsäureanhydrid (1.26 mmol, 1.3 eq.) hinzu und

lässt unter ständigem Rühren die Reaktionslösung langsam auf Raumtemp. erwärmen. Das Fortschreiten der Reaktion lässt sich mittels DC-Kontrolle verfolgen, wobei sich noch nicht umgesetztes Edukt mit Ninhydrin-Sprühreagenz anfärben lässt. Nach 6 h Rühren bei Raumtemp. wird die Reaktion durch Zugabe von wenigen Millilitern Methanol gequencht. Die Reaktionsmischung wird zwei Mal mit einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen und die wässrige Phase wird zwei Mal mit Dichlormethan extrahiert. Nach dem Trocknen der vereinigten organischen Extrakte über MgSO_4 wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mehrmals mit Toluol coevaporiert. Zuletzt wird der Rückstand mittels Säulenchromatographie gereinigt; als Eluent verwendet man $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5.

Ausbeute: 496 mg (0.73 mmol, 75 %) leicht gelber Schaum.

DC: $R_f = 0.38$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

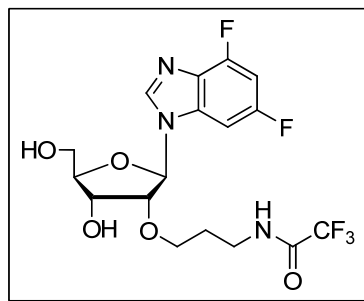
$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3)

δ [ppm] = 8.22 (s, 1H, H2), 7.14 (br s, 1H, NH), 6.91 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1H, H7), 6.82 (dt, $J = 10.1$ Hz, $J = 2.0$ Hz, 1H, H5), 5.84 (s, 1H, H1'), 4.58–4.55 (m, 1H, H3'), 4.30–4.27 (m, 1H, H4'), 4.09–4.06 (m, 1H, H5'), 4.03–3.98 (m, 2H, $\alpha\text{-CH}_2$, H5'), 3.92–3.89 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}_2$), 3.83–3.83 (m, 1H, H2'), 3.78–3.73 (m, 1H, $\gamma\text{-CH}_2$), 3.44–3.40 (m, 1H, $\gamma\text{-CH}_2$), 1.97–1.95 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 1.12–0.99 (m, 28H, Si- CH_3 , Si-*i*Pr).

ESI(+)-MS: m/z 682.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$

ESI-HRMS: Berechnet für $[\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{F}_5\text{N}_3\text{O}_6\text{Si}_2+\text{H}]^+$: 682.2767, gefunden : 682.2762.

1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(γ -N-trifluoracetamidopropyl)- β -D-ribofuranose V15V



80

C₁₇H₁₈F₅N₃O₅

439.33 g/mol

Die Deblockierung wird gemäß der allgemeinen Vorschrift Nr. 2 vollzogen. Es werden 450 mg 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(γ -N-trifluoracetamidopropyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **79** (0.66 mmol) eingesetzt. Als Laufmittelgemisch für die Säulenchromatographie wird CH₂Cl₂/MeOH (9:1) verwendet.

Ausbeute: 211 mg (0.48 mmol, 73 %), farbloser Schaum

DC: R_f = 0.26 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃)

δ [ppm] = 8.49 (s, 1H, H2), 7.45 (br s, 1H, NH), 7.14 (dd, J = 8.1 Hz, J = 1.9 Hz, 1H, H7), 6.83 (dt, J = 10.0 Hz, J = 2.0 Hz, 1H, H5), 5.93 (d, J = 5.4 Hz 1H, H1'), 4.60–4.57 (m, 1H, H3'), 4.28–4.23 (m, 2H, H2', H4'), 4.08–3.90 (m, 2H, H5', H5''), 3.71–3.58 (m, 2H, α -CH₂), 3.43–3.79 (m, 1H, γ -CH₂), 3.02–2.94 (m, 1H, γ -CH₂), 2.31 (br s, 2H, 5'-OH, 3'-OH), 1.84–1.75 (m, 2H, β -CH₂).

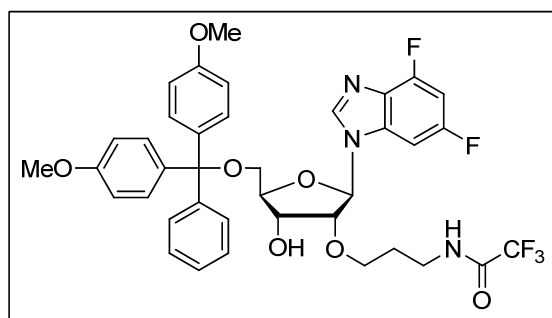
¹³C-NMR: (100.6 MHz, CDCl₃)

δ [ppm] = 161.5 (CO), 158.1 (CF₃), 157.5 (CF), 155.3 (CF), 141.8 (C2), 134.8 (C_{arom}), 128.7 (C_{arom}), 98.8 (C5), 93.8 (C7), 88.2 (C1'), 85.8 (C4'), 83.2 (C2'), 69.7 (C3'), 68.8 (C α), 61.5 (C5'), 37.3, (C γ), 29.2 (C β).

MALDI(-)-MS: m/z 438.1 [M-H]⁻

ESI-HRMS: Berechnet für [C₁₇H₁₈F₅N₃O₅+H]⁺: 462.1065, gefunden : 462.1048.

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(γ -N-trifluoracetamidopropyl)- β -D-ribofuranose



81

$C_{38}H_{36}F_5N_3O_7$

741.70 g/mol

Die Einführung der 5'-DMTr-Schutzgruppe erfolgt analog zur allgemeinen Vorschrift Nr. 1. Eingesetzte Mengen: 200 mg 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(γ -N-trifluor-acetamidopropyl)- β -D-ribofuranose **80** (0.46 mmol), 3.6 mL abs. Pyridin, \sim 135 μ L NEt_3 , 200 mg 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (0.59 mmol, 1.3 eq.). Reaktionsdauer: 17 h.

Ausbeute: 253 mg (0.34 mmol, 74 %), leicht orangefarbener, amorpher Feststoff.

DC: $R_f = 0.46$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5)

1H -NMR: (300 MHz, Aceton- d_6)

δ [ppm] = 8.59–8.57 (m, 1H, NH), 8.32 (s, 1H, H2), 7.45–7.20 (m, 10H, H7, H_{arom}), 6.94 (dt, $J = 10.3$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1H, H5), 6.86–6.81 (m, 4H, H_{arom}), 6.10 (d, $J = 5.1$ Hz 1H, H1'), 4.62–4.58 (m, 1H, H3'), 4.55–4.50 (m, 2H, H2', H4'), 4.30–4.26 (m, 1H, H5'), 3.83–3.72 (m, 9H, O- CH_3 , α - CH_2 , H5''), 3.52–3.46 (m, 1H, α - CH_2), 3.42–3.40 (m, 3H, γ - CH_2 , H2'), 2.79 (br s, 1H, 3'-OH), 1.89–1.84 (m, 2H, β - CH_2).

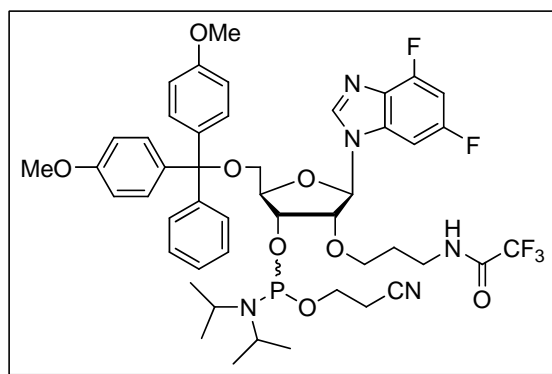
^{13}C -NMR: (100.6 MHz, Aceton- d_6)

δ [ppm] = 161.2 (CO), 159.7 (CF), 157.5 (CF), 153.1, 150.7 (C_{arom}), 145.9 (C2), 143.1 (C_{arom}), 136.6 (C9), 131.0, 129.0, 128.6 (C_{arom}), 113.9 (C_{arom}), 98.6 (C5), 95.5 (C7), 88.6 (C1') 87.3 (C4'), 85.5 (C_{DMTr}), 82.7 (C2'), 70.6 (C3'), 69.2 ($C\alpha$), 64.4 (C5'), 55.5 (O CH_3), 37.8 ($C\gamma$), 29.9 ($C\beta$ im Lösemittelsignal).

ESI(+)-MS: m/z 742.4 $[M+H]^+$

ESI-HRMS: Berechnet für $[C_{38}H_{36}F_5N_3O_7Si_2+H]^+$: 742.2551, gefunden : 742.2548.

3'-O-(2-Cyanoethoxy-N,N-diisopropylamin)phosphin-5'-O-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(γ -N-trifluoracetamidopropyl)- β -D-ribofuranose



82

$C_{47}H_{53}F_5N_5O_8P$

941.92 g/mol

In einem ausgeheizten Rundkolben werden unter Schutzgasatmosphäre 198 mg 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(γ -N-trifluoracetamidopropyl)- β -D-ribofuranose (0.27 mmol) **81** in 4.2 mL abs. Acetonitril gelöst. Nachfolgend gibt man 284 μ L (2.16 mmol, 8 eq.) *sym*-Collidin sowie 10.6 μ L (0.13 mmol, 0.5 eq.) *N*-Methylimidazol hinzu und kühlt die Reaktionsmischung im Eisbad auf 0°C ab. Langsam werden nun 107 μ L (0.49 mmol, 1.8 eq.) 2-Cyanoethyldiisopropylchlorphosphoramidit **44** zugespritzt und man lässt die gelbliche Reaktionslösung für 50 min bei 0°C rühren. Mittels DC-Kontrolle lässt sich der Reaktionsablauf verfolgen ($CH_2Cl_2/MeOH$ 97:3). Anschließend lässt man die Reaktionsmischung auf Raumtemp. erwärmen und gibt 1.5 mL 0.01 M Zitronensäure-Lsg. hinzu. Man schüttelt das Reaktionsgemisch zwei Mal gegen 10 mL 0.01 M Zitronensäure-Lsg. aus und wäscht schließlich noch einmal mit einer wässr. ges. $NaHCO_3$ -Lsg. Die wässrige Phase wird noch zwei Mal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet und am Rotationsverdampfer ohne Wasserbad vom Lösemittel befreit. Der Rückstand wird unter Schutzgas in wenige mL Dichlormethan aufgenommen und mittels

Flash-Chromatographie an Kieselgel aufgereinigt. Auf diese Weise erhält man das gewünschte Phosphoramidit **81** als Diastereomergemisch.

Ausbeute: 155 mg (0.16 mmol, 61 %), farbloser Schaum.

DC: $R_f = 0.62$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 97:3, beide Diastereomere)

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, Aceton- d_6)

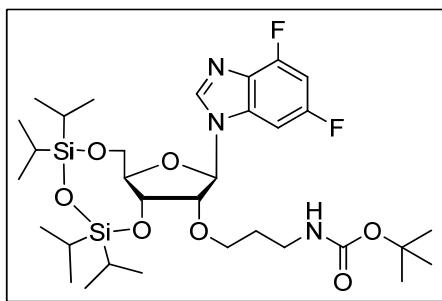
δ [ppm] = 8.36 (br s, 1H, NH), 8.32 (s, 1H, H2), 7.47–7.21 (m, 10H, H7, H_{arom}), 6.97–6.83 (m, 5H, H5, H_{arom}), 6.16 (d, $J = 5.0$ Hz 1H, H1'), 4.74–4.68 (m, 1H, H3'), 4.65–4.61 (m, 1H, H4'), 4.41–4.39 (m, 1H, H2'), 4.05–3.90 (m, 3H, H5', H5'', $\alpha\text{-CH}_2$), 3.78 (s, 6H, O- CH_3), 3.74–3.64 (m, 4H, $\alpha\text{-CH}_2$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 3.42–3.40 (m, 3H, $\gamma\text{-CH}_2$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 1.91–1.87 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 1.24–1.10 (m, 14H, 2*i*Pr).

$^{31}\text{P-NMR}$: (121.5 MHz, Aceton- d_6)

δ [ppm] = 150.2, 149.6. (Verhältnis: 1:3.5)

MALDI(+)-MS: m/z 941.6 [M]

3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(γ -N-tert-butylloxycarbonyl-propyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose



103

$C_{32}H_{53}F_2N_3O_7Si_2$

685.95 g/mol

Variante A:

Zu einer Lösung von 417 mg 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(γ -aminopropyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **77** (0.71 mmol) in 4.3 mL abs. Pyridin gibt man 150 μ L (1.07 mmol, 1.5 eq.) Triethylamin und lässt 5 min bei 0°C unter Argon rühren. Nun gibt man 465 mg (2.14 mmol, 3 eq.) Di-tert-Butyldicarbonat in drei Portionen zu in etwa gleichen Teilen innerhalb von 60 min zur gekühlten Reaktionslösung. Nach beendeter Zugabe lässt man das Reaktionsgemisch langsam auf Raumtemp. erwärmen und rührt für weitere 12 h bei Raumtemp. Die Reaktionskontrolle erfolgt mittels Dünnschichtchromatographie ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5); nicht vollständig umgesetztes Edukt lässt sich mit Hilfe von Ninhydrin-Sprühreagenz anfärben. Man quencht die Reaktion durch Zugabe von wenigen mL einer ges. NaCl-Lsg. und extrahiert die Reaktionslösung drei Mal mit einer ges. wässr. $NaHCO_3$ -Lsg. Die wässrige Phase wird zwei Mal gegen Dichlormethan ausgeschüttelt; die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösemittel wird i. Vak. entfernt. Die Aufreinigung des öligen Rückstandes erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel im Laufmittelgemisch $CH_2Cl_2/MeOH$ (98:2 \rightarrow 95:5).

Ausbeute: 346 mg (0.5 mmol, 71 %), farbloser, amorpher Feststoff.

Variante B:

In einem Autoklavenröhrchen ($\varnothing = 1.5$ cm) werden unter Argonatmosphäre 890 mg (1.53 mmol) 3',5'-*O*-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-*O*-(β -cyanoethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-di-fluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **72** in 10 mL abs. Methanol gelöst. Es werden zwei Spatelspitzen Raney-Nickel - Katalysator, welcher zuvor gründlich mit Methanol gespült wurde, sowie 1.0 g Di-*tert*-Butyldicarbonat (4.59 mmol, 3 eq.) zugesetzt. Man hydriert das Reaktionsgemisch im Autoklaven bei einem Wasserstoffdruck von 30 bar unter ständigem Rühren bei Raumtemp. für 5h. Anschließend wird das Reaktionsgemisch über Celite abgesaugt. Man wäscht mehrfach mit Methanol und Dichlormethan und engt das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockene ein. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel im Laufmittelgemisch $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (98:2 \rightarrow 95:5) aufgereinigt.

Ausbeute: 1.02 g (1.49 mmol, 98 %), farbloser amorpher Feststoff

DC: $R_f = 0.51$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2)

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3)

δ [ppm] = 8.25 (s, 1H, H2), 6.94 (dd, $J = 8.1$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 1H, H7), 6.82 (dt, $J = 10.2$ Hz, $J = 2.1$ Hz, 1H, H5), 5.85 (s, 1H, H1'), 4.96 (br s, 1H, NH), 4.55–4.49 (m, 1H, H3'), 4.30–4.25 (m, 1H, H4'), 4.17–4.14 (m, 1H, H5'), 4.07–4.00 (m, 1H, H5''), 3.98–3.95 (m, 1H, α - CH_2), 3.83–3.75 (m, 2H, H2', α - CH_2), 3.33–3.27 (m, 2H, γ - CH_2), 1.86–1.81 (m, 2H, β - CH_2), 1.43 (s, 9H, CH_3 BOC), 1.11–0.98 (m, 28H, Si- CH_3 , Si-*i*Pr).

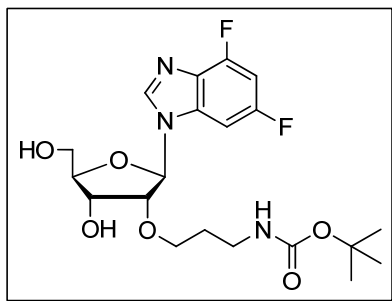
$^{13}\text{C-NMR}$: (75.5 MHz, CDCl_3)

δ [ppm] = 159.4 (CF), 155.9 (CF), 146.7 (CO Carbamat), 141.1 (C2), 134.2 (C_{arom}), 129.7 (C_{arom}), 98.4 (C5), 93.1 (C7), 89.8 (C1'), 85.1 (C4'), 82.5 (C2'), 81.5 ($\underline{\text{C}}\text{CH}_3$ aus BOC), 70.3 (C α), 69.7 (C3'), 59.6 (C5'), 38.4 (C γ), 31.3, 30.3 (C β), 28.4, 27.4 (CH_3 BOC) 17.3 (Si $\underline{\text{C}}\text{HCH}_3$), 13.4, 13.0, 12.5 (SiCH $\underline{\text{C}}\text{H}_3$).

ESI(+)-MS: m/z 685.5 [M]

ESI-HRMS: Berechnet für $[\text{C}_{32}\text{H}_{53}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_7\text{Si}_2+\text{H}]^+$: 686.3468, gefunden : 686.3484.

1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)-2'-*O*-(γ -*N*-*tert*-butyloxycarbonylpropyl)- β -D-ribofuranose

**105**C₂₀H₂₇F₂N₃O₆

443.19 g/mol

Die Abspaltung der Markiewicz-Schutzgruppe erfolgt analog zu allgemeiner Vorschrift Nr. 2. Eingesetzte Mengen: 572 mg 3',5'-*O*-(1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-2'-*O*-(γ -*N*-*tert*-Butyloxycarbonylpropyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **103** (0.84 mmol). Reaktionsdauer: 70 min. Die säulenchromatographische Aufreinigung erfolgt an Kieselgel im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/MeOH (95:5).

Ausbeute: 305 mg (0.69 mmol, 82 %), farbloser Schaum.

DC: R_f = 0.24 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃)

δ [ppm] = 8.51 (s, 1H, H2), 7.17 (dd, J = 8.0 Hz, J = 2.0 Hz, 1H, H7), 6.80 (dt, J = 10.1 Hz, J = 2.0 Hz, 1H, H5), 5.98 (d, J = 6.2 Hz 1H, H1'), 4.89 (br s, 1H, NH), 4.51 (br s, 1H, H3'), 4.34–4.31 (m, 2H, H2', H4'), 4.07–3.91 (m, 2H, H5', H5''), 3.65–3.60 (m, 1H, γ -CH₂), 3.52–3.45 (m, 2H, α -CH₂, γ -CH₂), 3.08–3.04 (m, 1H, α -CH₂), 1.80–1.71 (m, 2H, β -CH₂), 1.45 (s, 9H, CH₃ aus BOC).

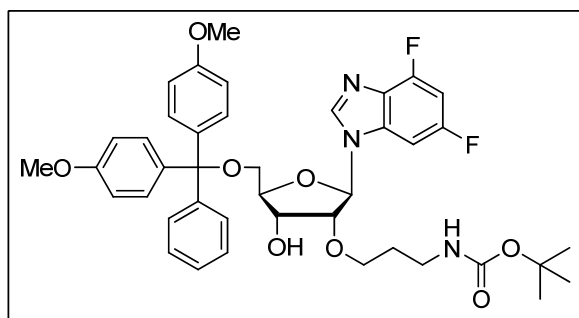
¹³C-NMR: (100.6 MHz, CDCl₃)

δ [ppm] = 159.3 (CF₃), 156.9 (CO), 153.3 (CF), 142.0 (C2), 135.2 (C_{arom}), 128.6 (C_{arom}), 98.5 (C5), 93.9 (C7), 88.1 (C1'), 86.7 (C4'), 83.9 (C2'), 79.8 (CCH₃ aus BOC), 70.1 (C3'), 67.9 (C α), 61.9 (C5'), 36.9 (C γ), 31.1 (C β), 28.4 (CH₃ BOC).

MALDI(+)-MS: m/z 443.9 [M]

ESI-HRMS: Berechnet für $[C_{20}H_{27}F_2N_3O_6+Na]^+$: 466.1766, gefunden: 466.1767.

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(γ -N-tert-Butyloxycarbonylpropyl)- β -D-ribofuranose



106

$C_{41}H_{45}F_2N_3O_8$

745.81 g/mol

Die Einführung der 5'-DMTr-Schutzgruppe erfolgt analog zu Allgemeiner Vorschrift Nr. 1. Eingesetzte Mengen: 273 mg (0.62 mmol) 1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(γ -N-tert-Butyloxycarbonyl-propyl)- β -D-ribofuranose **105**, 4.8 mL abs. Pyridin, ~ 150 μ L NEt_3 , 271 mg 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (0.8 mmol, 1.3 eq.).

Reaktionsdauer: 17 h.

Ausbeute: 363 mg (0.49 mmol, 79 %), leichtgelber, amorpher Feststoff.

DC: $R_f = 0.48$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5)

1H -NMR: (250 MHz, $DMSO-d_6$)

δ [ppm] = 8.48 (s, 1H, H2), 7.46 (dd, $J = 2.0$ Hz, $J = 8.6$ Hz, 1H, H7), 7.15–7.32 (m, 10H, H5, H_{arom}), 6.84–6.78 (m, 4H, H_{arom}), 6.07 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H, H1'), 5.27 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, 3'-OH), 4.40–4.31 (m, 2H, H3', H4'), 4.14–4.12 (m, 1H, H2'), 3.73 (s, 6H, 2 x OCH_3), 3.64–3.47 (m, 2H, H5', H5''), 3.22–3.20 (m, 2H, α - CH_2), 2.99–2.93 (m, 2H, γ - CH_2), 1.63–1.58 (m, 2H, β - CH_2), 1.35 (s, 9H, CH_3 aus BOC).

^{13}C -NMR: (100.6 MHz, Aceton- d_6)

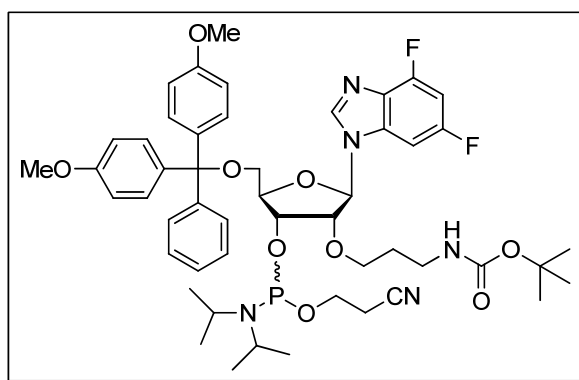
δ [ppm] = 159.6 (CF), 158.0 (CF), 149.4 (CO), 141.2 (C2), 136.6 (C_{arom}), 131.0, 130.1, 129.7, 129.1, 129.0, 128.8, 128.6, 128.3, 127.6, 127.4 (C_{arom}), 114.0, 113.6 (C_{arom}), 98.3 (C5), 95.2 (C7), 88.4 (C1'), 87.3 (C4'), 85.6 (C_{DMTr}), 83.0 (C2'), 81.5,

78.9 ($\underline{C}CH_3$ aus BOC), 70.5 (C3'), 68.8 (C α), 64.5 (C5'), 55.5 (OCH₃), 37.6 (C γ), 31.5 (C β), 30.0 (CH₃ BOC im Lösemittelsignal).

ESI(+)-MS: m/z 746.4 [M+H]⁺ 768.4 [M+Na]⁺

ESI-HRMS: Berechnet für [C₄₁H₄₅F₂N₃O₈+Na]⁺: 768.3108, gefunden: 768.3096.

3'-O-(2-Cyanethoxy-N,N-diisopropylamin)phosphin-5'-O-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(γ -N-tert-butylloxycarbonylpropyl)- β -D-ribofuranose



107

C₅₀H₆₂F₂N₅O₉P

945.03 g/mol

Unter Argonatmosphäre werden in einem ausgeheizten Rundkolben 181 mg (0.24 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(γ -N-tert-Butylloxycarbonylpropyl)- β -D-ribofuranose **106** in 4.5 mL abs. Acetonitril gelöst. Zur orangefarbenen Lösung werden 258 μ L *sym*-Collidin (1.9 mmol, 8 eq.), sowie 9.6 μ L *N*-Methylimidazol (0.12 mmol, 0.5 eq.) zugesetzt und das Reaktionsgemisch wird auf 0°C abgekühlt. Langsam gibt man 98 μ L (0.44 mmol, 1.8 eq.) 2-Cyanoethyl-diisopropylchlorphosphoramidit **44** hinzu und rührt für 60 min bei 0°C. Das Fortschreiten der Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert (CH₂Cl₂/MeOH 96:4). Schließlich lässt man das Reaktionsgemisch kurz auf Raumtemp. erwärmen und beendet die Phosphitylierung durch Zugabe weniger mL 0.01 M Zitronensäure-Lsg. Es wird drei Mal mit jeweils 15 mL 0.01 M Zitronensäure-Lsg. extrahiert und die wässrige Phase wird zwei Mal gegen Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Extrakte werden über MgSO₄

getrocknet und am Rotationsverdampfer ohne Erwärmung bis zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wird unter Argon in wenig Dichlormethan aufgenommen und an Kieselgel im Laufmittelgemisch $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (97:3) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute: 188 mg (0.19 mmol, 81 %), beide Diastereomere als farbloser Schaum.

DC: $R_f = 0.55$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 97:3)

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, Aceton- d_6)

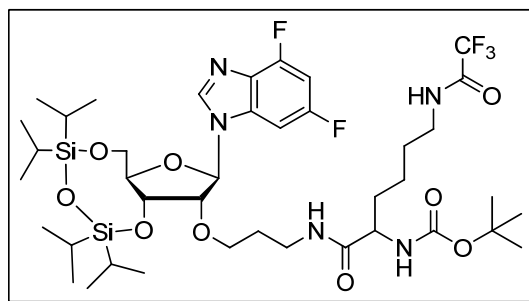
δ [ppm] = 8.21 (s, 1H, H2), 7.33–7.05 (m, 10H, H7, H_{arom}), 6.80 (dt, $J = 2.1$ Hz, $J = 10.5$ Hz, 1H, H5), 6.74–6.69 (m, 4H, H_{arom}), 6.02 (d, $J = 5.8$ Hz 1H, H1'), 5.73 (br s, 1H, NH), 4.59–4.46 (m, 2H, H3', H4'), 4.27–4.25 (m, 1H, H2'), 3.65 (s, 6H, O- CH_3), 3.34–3.29 (m, 3H, H5', H5'', $\alpha\text{-CH}_2$), 3.00–2.96 (m, 2H, $\alpha\text{-CH}_2$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 2.77–2.65 (m, 3H, $\gamma\text{-CH}_2\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 2.50–2.46 (m, 1H, $\gamma\text{-CH}_2$), 1.61–1.58 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 1.25–1.23 (m, 9H, CH_3 BOC), 1.16–0.97 (m, 14H, 2*i*Pr).

$^{31}\text{P-NMR}$: (121.5 MHz, Aceton- d_6)

δ [ppm] = 150.2, 149.6 (Verhältnis: 1:2.2)

MALDI(+)-MS: m/z 945.7 [M]

3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(γ -N-(N_{α} -tert-butylloxycarbonyl- N_{ϵ} -trifluoracetyl-lysynamidopropyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose



89

$C_{40}H_{64}F_5N_5O_9Si_2$

910.13 g/mol

Man legt in einem ausgeheizten Rundkolben unter Argonatmosphäre i. Hochvak. getrocknete 360 mg (0.62 mmol) 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(γ -amino-propyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **77** vor und löst das Edukt in 7.5 mL abs. Dichlormethan. Es werden 211 mg (0.62 mmol, 1 eq.) N_{α} -tert-Butyloxycarbonyl- N_{ϵ} -trifluoracetyllysine sowie 85 mg (0.62 mmol, 1 eq.) HOBt und 96 μ L (0.62 mmol, 1 eq.) DIC zugesetzt und man rührt für 72 h bei Raumtemp. Das Fortschreiten der Reaktion lässt sich mittels Dünnschichtchromatographie im Laufmittel $CH_2Cl_2/MeOH$ 96:4 kontrollieren. Man gibt anschließend wenige mL einer wässr. ges. $NaHCO_3$ -Lsg. zu und schüttelt die Reaktionslösung mehrmals gegen eine wässr. ges. $NaHCO_3$ -Lsg. aus. Die wässr. Phase wird noch zweimal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet und i. Vak. eingeeengt. Der Rückstand wird i. Hochvak. getrocknet. Aufgrund der hohen Reinheit kann das Produkt ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe eingesetzt werden.

Ausbeute: 562 mg (0.62 mmol, quant.), orangefarbener Schaum

DC: $R_f = 0.32$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 96:4)

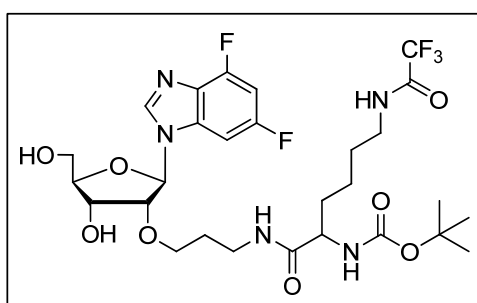
$^1\text{H-NMR}$: (250 MHz, CDCl_3)

δ [ppm] = 8.28 (s, 1H, H2), 7.04 (dd, $J = 8.2$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1H, H7), 6.81 (dt, $J = 10.2$ Hz, $J = 2.1$ Hz, 1H, H5), 6.50 (br s, 1H, NH), 5.91 (s, 1H, H1'), 5.83–5.80 (m, 1H, NH), 5.04 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, $\alpha\text{-CH}_{\text{Lysin}}$), 4.55–4.51 (dd, $J = 4.7$ Hz, 1H, H3'), 4.29–4.24 (m, 1H, H4'), 4.17–4.13 (m, 1H, H2'), 4.08–3.97 (m, 2H, H5', H5''), 3.90–3.77 (m, 2H, $\alpha\text{-CH}_2$), 3.72–3.64 (m, 1H, NH), 3.41–3.35 (m, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$), 2.17–2.13 (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{CH}_3$), 1.87–1.82 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 1.70–1.60 (m, 8H, $\text{-CH}_2\text{-}$), 1.42 (s, 9H, CH_3 BOC), 1.15–0.97 (m, 28H Si- CH_3 , Si- $i\text{Pr}$).

ESI(+)-MS: m/z 909.9 [M]

ESI-HRMS: Berechnet für $[\text{C}_{40}\text{H}_{64}\text{F}_5\text{N}_5\text{O}_9+\text{H}]^+$: 910.4241, gefunden: 910.4242.

1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)-2'-*O*-(γ -*N*-(*N* $_{\alpha}$ -*tert*-Butyloxycarbonyl-*N* $_{\epsilon}$ -trifluoracetyllysineamidopropyl))- β -D-ribofuranose



90

$\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{F}_5\text{N}_5\text{O}_8$

667.62 g/mol

Die Abspaltung der Markiewicz-Schutzgruppe erfolgt analog zu allgemeiner Vorschrift Nr. 2. Eingesetzte Mengen: 525 mg 3',5'-*O*-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-*O*-(γ -*N*-(*N* $_{\alpha}$ -*tert*-butyloxycarbonyl-*N* $_{\epsilon}$ -trifluoracetyllysineamidopropyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **89** (0.58 mmol). Reaktionsdauer: 90 min. Die säulenchromatographische Aufreinigung erfolgt an Kieselgel im Laufmittelgemisch $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1 \rightarrow 7:3).

Ausbeute: 298 mg (0.45 mmol, 77 %), farbloser Schaum.

DC: $R_f = 0.44$ (CH₂Cl₂/MeOH 9:1)

¹H-NMR: (400 MHz, Aceton-d₆)

δ [ppm] = 8.59 (br s, 1H, NH_{Carbamat}), 8.46 (s, 1H, H2), 7.60 (d, $J = 9.0$ Hz, $J = 2.0$ Hz, 1H, H7), 7.50 (br s, 1H, NH), 6.92 (dt, $J = 10.5$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1H, H5), 6.05 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H, H1'), 4.86 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, 3'-OH), 4.56–4.54 (m, 1H, H5'), 4.52–4.50 (m, 1H, H3'), 4.35–4.33 (m, 1H, H2'), 4.19–4.17 (m, 1H, H5'), 4.03–3.97 (m, 1H, α -CH₂), 3.87–3.85 (m, 2H, H4', 5'-OH), 3.66–3.56 (m, 2H, α -CH₂, γ -CH₂), 3.51–3.46 (m, 1H, γ -CH₂), 3.35–3.31 (m, 2H, -CH₂-), 3.18–3.09 (m, 1H, α -CH_{Lysin}), 1.81–1.79 (m, 2H, β -CH₂), 1.67–1.58 (m, 6H, -CH₂-), 1.39 (s, 9H, CH₃ aus BOC).

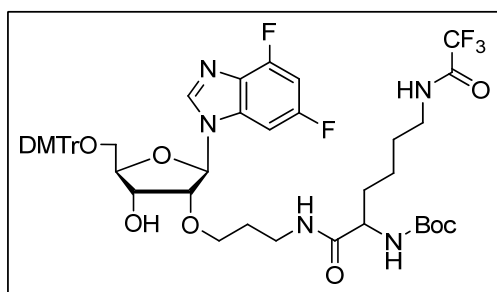
¹³C-NMR: (100.6 MHz, CDCl₃)

δ [ppm] = 173.8 (CO), 165.6 (CO), 159.3 (CF₃), 153.3 (CF), 144.1 (C2), 135.2 (C_{arom}), 128.6 (C_{arom}), 115.8 (CF₃), 98.4 (C5), 96.0 (C7), 88.7 (C1'), 87.4 (C4'), 83.2 (C2'), 81.5 (CCH₃ aus BOC), 70.1 (C3'), 68.3 (C α), 62.6 (C5'), 55.7 (α -CH_{Lysin}), 40.2 (CH₂), 36.3 (C γ), 32.7 (CH₂), 31.3 (C β), 29.2 (CH₂), 28.6 (CH₃ BOC), 23.7 (CH₂).

MALDI(+)-MS: m/z 667.9 [M]

ESI-HRMS: Berechnet für [C₂₈H₃₈F₅N₅O₈+H]⁺: 668.2719, gefunden: 668.2697

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-(γ -N-(N_{α} -*tert*-butyloxycarbonyl- N_{ϵ} -trifluoracetyl-lysynamidopropyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose



91

$C_{49}H_{56}F_5N_5O_{10}$

969.99 g/mol

Zur selektiven Einführen der 5'-DMTr-Schutzgruppe wird nach allgemeiner Vorschrift Nr. 1 verfahren. Eingesetzte Mengen: 158 mg (0.24 mmol) 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)-2'-O-(γ -N-(N_{α} -*tert*-butyloxycarbonyl- N_{ϵ} -trifluoracetyl-lysynamidopropyl))- β -D-ribofuranose **90**. 1.5 mL abs. Pyridin, 56 μ L NEt_3 und 112 mg 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (0.33 mmol, 1.4 eq.). Reaktionsdauer: 17 h.

Ausbeute: 170 mg (0.17 mmol, 71 %), gelblicher, amorpher Feststoff.

DC: $R_f = 0.47$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5)

1H -NMR: (400 MHz, Aceton- d_6)

δ [ppm] = 8.50 (br s, 1H, $NH_{Carbamat}$), 8.35 (s, 1H, H2), 7.55–7.52 (m, 1H, H7), 7.46–7.22 (m, 9H, H_{arom}), 6.98–6.84 (m, 5H, H5, H_{arom}), 6.12 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H, H1'), 6.07 (br s, 1H, NH), 4.84 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H, 3'-OH), 4.54–4.47 (m, 2H, H2', H3'), 4.31–4.29 (m, 1H, H4'), 4.01–3.99 (m, 2H, H2', α - CH_{Lysin}), 3.79 (s, 6H, OCH_3), 3.75–3.72 (m, 1H, α - CH_2), 3.67–3.57 (m, 3H, α - CH_2 , γ - CH_2 , H5'), 3.43–3.30 (m, 5H, H5', - CH_2 -), 3.21–3.16 (m, 1H, γ - CH_2), 1.81–1.73 (m, 2H, β - CH_2), 1.64–1.57 (m, 4H, - CH_2 -), 1.38 (s, 9H, CH_3 aus BOC).

^{13}C -NMR: (100.6 MHz, Aceton- d_6)

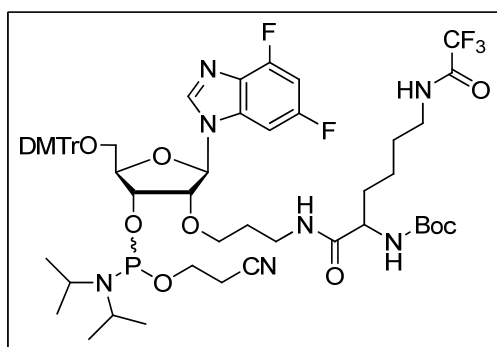
δ [ppm] = 173.7 (CO), 159.6 (CF_3), 150.7 (CF), 145.9 (C_{arom}), 143.2 (C2), 136.6 (C_{arom}), 131.1, 131.0, 129.0, 128.7, 128.6, 124.6 (6 x C_{arom}), 114.0 (CF_3), 98.4 (C5),

96.0 (C7), 88.4 (C1'), 87.3 (C4'), 85.7 (C_{DMTr}), 83.0 (C2'), 79.3 (CCH₃ aus BOC), 70.4 (C3'), 68.6 (C α), 64.6 (C5'), 55.6 (α -CH_{Lysin}), 55.5 (OCH₃), 40.2 (CH₂), 36.4 (C γ), 32.8 (CH₂), 31.3 (C β), 29.0 (CH₃ BOC im Lösemittelsignal), 23.8 (CH₂).

MALDI(+)-MS: m/z 971.3 [M+2H]²⁺

ESI-HRMS: Berechnet für [C₄₉H₅₆F₅N₅O₁₀+H]⁺: 970.4025, gefunden: 970.4039.

**3'-O-(2-Cyanoethoxy-N,N-diisopropylamin)phosphin-5'-O-(4,4'-
dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-(γ -N-(N α -tert-butyloxycarbonyl-N ϵ -
trifluoracetyl-lysinamidopropyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -
D-ribofuranose**



92

C₅₈H₇₃F₅N₇O₁₁P

1169.50 g/mol

Man löst unter Argonatmosphäre in einem ausgeheizten Rundkolben 157 mg (0.16 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-(γ -N-(N α -tert-butyloxycarbonyl-N ϵ -trifluoracetyl-lysinamidopropyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **91** in 2.7 mL abs. Acetonitril. Nach Zugabe von 170 μ L *sym*-Collidin (1.3 mmol, 8 eq.), sowie 6.3 μ L *N*-Methylimidazol (0.08 mmol, 0.5 eq.) wird das Reaktionsgemisch auf 0°C abgekühlt. Man gibt langsam 65 μ L (0.29 mmol, 1.8 eq.) 2-Cyanoethyl-diisopropylchlorphosphoramidit **44** hinzu und rührt für 70 min bei 0°C. Das Fortschreiten der Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert (CH₂Cl₂/MeOH 97:3). Schließlich lässt man das

Reaktionsgemisch kurz auf Raumtemp. erwärmen und beendet die Phosphitylierung durch Zugabe weniger mL einer 0.01 M Zitronensäure-Lsg. Es wird drei Mal mit jeweils 10 mL 0.01 M Zitronensäure-Lsg extrahiert und die wässrige Phase wird zwei Mal gegen Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Extrakte werden über MgSO_4 getrocknet das Lösemittel wird i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird unter Argon in wenig Dichlormethan aufgenommen und an Kieselgel im Laufmittelgemisch $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (96:4) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute: 122 mg (0.10 mmol, 65 %) beide Diastereomere als leicht gelblicher Schaum

DC: $R_f = 0.42$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 96:4)

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, Aceton- d_6)

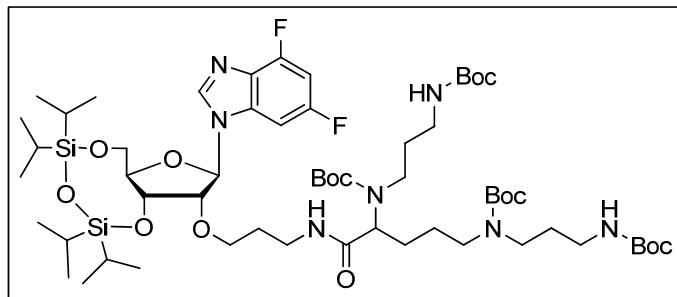
δ [ppm] = 8.37 (br s, 1H, NH), 8.23 (s, 1H, H2), 7.40–7.10 (m, 10H, H_{arom} , H7), 6.77–6.70 (m, 5H, H_{arom} , H5), 6.04 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H, H1'), 5.81 (br s, 2H, NH), 4.56–4.53 (m, 1H, H3'), 4.49–4.46 (m, 1H, H4'), 4.33–4.22 (m, 3H, H2', H5', H5''), 3.66 (s, 6H, OCH_3), 3.60–3.53 (m, 4H, $-\text{CH}-\text{CH}_3$ aus *iPr*), 3.48–3.44 (m, 2H, $\alpha\text{-CH}_2$), 3.37–3.28 (m, 4H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, $-\text{CH}_2-$), 3.20–3.15 (m, 7H, $\gamma\text{-CH}_2$, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, $-\text{CH}_2-$), 2.53–2.51 (m, 1H, $\gamma\text{-CH}_2$), 2.49–2.45 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}_{\text{Lysin}}$), 1.62–1.59 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 1.45–1.43 (m, 4H, $-\text{CH}_2-$), 1.28 (s, 9H, CH_3 aus BOC), 1.15 (d, $J = 6.7$ Hz, 6H, 2 x CH_3 *iPr*), 1.08 (d, $J = 6.7$ Hz, 6H, 2 x CH_3 *iPr*).

$^{31}\text{P-NMR}$: (121.5 MHz, Aceton- d_6)

δ [ppm] = 150.4, 149.8 (Verhältnis: 1:2.1)

MALDI(+)-MS: m/z 1170.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$

3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(γ -N-(N_{α},N_{δ} -bis(*tert*-butyl-carbamoyl)- N_{α},N_{δ} -bis(3-[*tert*-butyl-carbamoyl-amino]propyl)ornithin)-propylamid)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose



94

$C_{58}H_{101}F_2N_7O_{14}Si_2$

1213.69 g/mol

In einem ausgeheizten Rundkolben unter Schutzgasatmosphäre legt man i. Hochvak. getrocknete 427 mg (0.73 mmol) 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(γ -aminopropyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **77** vor und löst das Edukt in 6 mL abs. Dichlormethan. Es werden 472 mg N_{α},N_{δ} -Bis(*tert*-butyl-carbamoyl)- N_{α},N_{δ} -bis(3-[*tert*-butyl-carbamoylamino]propyl)ornithin **93** (0.73 mmol, 1 eq.), sowie 99 mg (0.73 mmol, 1 eq.) HOBt und 113 μ L (0.73 mmol, 1 eq.) DIC zugesetzt und man rührt für 72 h bei Raumtemp. Eine Kontrolle der Reaktion erfolgt durch Dünnschichtchromatographie im Laufmittel $CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5. Nach beendeter Reaktion schüttelt man die Reaktionslösung drei Mal gegen eine ges. wässr. $NaHCO_3$ -Lsg. aus und extrahiert die wässr. Phase zwei Mal mit Dichlormethan. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet. Anschließend wird das Lösemittel i. Vak. entfernt und der Rückstand wird im Hochvak. getrocknet. Aufgrund der hohen Reinheit kann das Produkt ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe eingesetzt werden.

Ausbeute: 883 mg (0.73 mmol, quant.) leicht rötlicher Schaum

DC: $R_f = 0.45$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5)

1H -NMR: (400 MHz, $CDCl_3$)

δ [ppm] = 8.27 (s, 1H, H2), 7.02 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H7), 6.82 (dt, $J = 10.1$ Hz, $J = 2.0$ Hz, 1H, H5), 5.91 (s, 1H, H1'), 5.30 (br s, 1H, NH), 4.55–4.50 (m, 1H, H3'),

4.31–4.28 (m, 1H, H5'), 4.19–4.16 (m, 1H, H4'), 4.08–4.02 (m, 2H, H5'', α -CH₂), 3.90–3.79 (m, 3H, γ -CH₂, H2'), 3.70–3.67 (m, 1H, α -CH₂), 3.43–3.38 (m, 1H, COCH), 3.24–3.08 (m, 8H, -CH₂-), 1.84–1.81 (m, 2H, β -CH₂), 1.69–1.63 (m, 4H, -CH₂-), 1.46–1.43 (m, 36H, 4 x CH₃ aus BOC), 1.15–0.86 (m, 34H, -CH₂-CH₂-CH₂-, Si-CH₃, Si-*i*Pr).

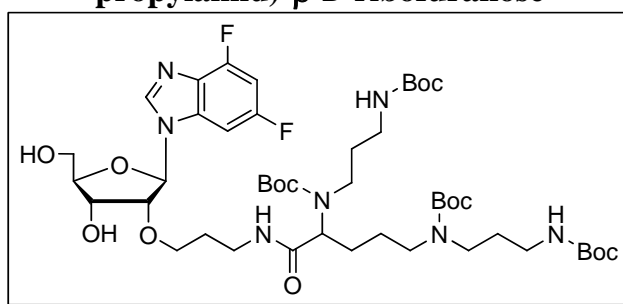
¹³C-NMR: (100.6 MHz, CDCl₃)

δ [ppm] = 171.5 (CO_{Amid}), 157.5 (CF), 156.9, 156.6, 156.4, 156.0 (4 x CO aus BOC), 155.0 (CF), 141.1 (C₂), 135.2 (C_{arom}), 129.9 (C_{arom}), 98.5 (C₅), 93.0 (C₇), 89.8 (C_{1'}), 82.5 (C_{2'}), 81.4 (C_{4'}), 79.7, 79.1 (2x CCH₃ aus BOC), 70.1 (C_{3'}), 69.9 (C α), 59.9 (C_{5'}), 41.1 (C γ), 38.1, 37.5, 37.0 (3 x CH₂), 31.1 (C β), 28.4 (CH₃ BOC), 26.2, 26.0, 25.8, 25.3, 25.0, 23.6 (6 x CH₂), 17.2 (SiCHCH₃), 13.4, 13.0, 12.7 (SiCHCH₃).

MALDI(+)-MS: m/z 1214.4 [M+H]⁺

ESI-HRMS: Berechnet für [C₅₈H₁₀₁F₂N₇O₁₄Si₂+H]⁺: 1214.6991, gefunden: 1214.6982.

1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(γ -N-(N α ,N δ -bis(*tert*-butyl-carbamoyl)-N α ,N δ -bis(3-[*tert*-butyl-carbamoyl-amino]propyl)ornithin)-propylamid)- β -D-ribofuranose



95

C₄₆H₇₅F₂N₇O₁₃

971.54 g/mol

Die simultane 3',5'-Entschützung wird gemäß der allgemeinen Vorschrift Nr. 2 vollzogen. Es werden 405 mg (0.33 mmol) 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(γ -N-(N α ,N δ -bis(*tert*-butylcarbamoyl)-N α ,N δ -bis(3-[*tert*-butylcarbamoylamino]propyl)ornithin)-

propylamid)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **94** umgesetzt. Reaktionsdauer: 70 min. Als Laufmittelgemisch zur säulenchromatographischen Aufreinigung wird CH₂Cl₂/MeOH (9:1) verwendet.

Ausbeute: 259 mg (0.27 mmol, 81 %), farbloser Schaum

DC: R_f = 0.35 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1)

¹H-NMR: (250 MHz, CDCl₃)

δ [ppm] = 8.30 (s, 1H, H2), 7.32–7.28 (m, 1H, H7), 6.79 (dt, $J = 10.1$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1H, H5), 5.95 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H, H1'), 5.30 (br s, 1H, NH), 4.95 (br s, 1H, 3'-OH), 4.80 (br s, 1H, 5'-OH), 4.52–4.49 (m, 1H, H3'), 4.33–4.30 (m, 1H, H4'), 4.25–4.20 (m, 1H, H2'), 3.95 (br s, 2H, H5', H5''), 3.89–3.78 (m, 2H, γ -CH₂), 3.41–3.38 (m, 3H, α -CH₂, COCH), 3.24–3.05 (m, 12H, -CH₂-), 1.72–1.64 (m, 2H, β -CH₂), 1.46–1.43 (m, 36H, 4 x CH₃ aus BOC), 1.15–1.13 (m, 6H, -CH₂-CH₂-CH₂-).

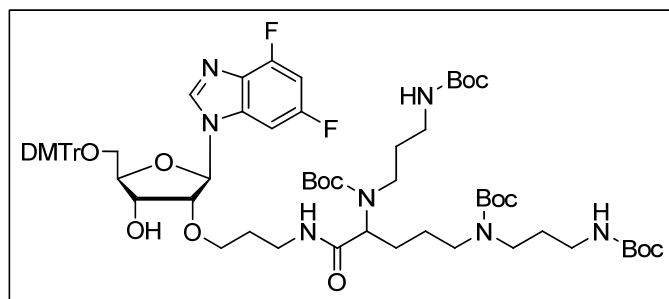
¹³C-NMR: (100.6 MHz, CDCl₃)

δ [ppm] = 172.1 (CO_{Amid}), 158.9 (CF), 156.9, 156.6, 156.5, 156.2 (4 x CO aus BOC), 155.0 (CF), 142.4 (C2), 135.2 (C_{arom}), 129.5 (C_{arom}), 98.8 (C5), 94.7 (C7), 88.0 (C1'), 86.5 (C2'), 83.0 (C4'), 79.9, 79.7, 79.5, 79.2 (4x CCH₃ aus BOC), 69.7 (C3'), 67.8 (C α), 62.3 (C5'), 42.5 (C γ), 38.1, 37.8, 35.7 (3 x CH₂), 31.1 (C β), 28.4 (CH₃ BOC), 26.0, 25.9, 25.7, 25.0, 24.8, 23.6 (6 x CH₂).

MALDI(+)-MS: m/z 972.7 [M+H]⁺

ESI-HRMS: Berechnet für [C₄₆H₇₅F₂N₇O₁₃+H]⁺: 972.5469, gefunden: 972.5460.

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-(γ -N-(N_{α},N_{δ} -bis(*tert*-butyl-carbamoyl)- N_{α},N_{δ} -bis(3-[*tert*-butyl-carbamoyl-amino]propyl)ornithin)-propylamid)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose



96

$C_{67}H_{93}F_2N_7O_{15}$

1273.67 g/mol

Die Einführung der 5'-DMTr-Schutzgruppe erfolgt nach allgemeiner Vorschrift Nr. 1. Eingesetzte Mengen: 250 mg (0.26 mmol) 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(γ -N-(N_{α},N_{δ} -bis(*tert*-butyl-carbamoyl)- N_{α},N_{δ} -bis(3-[*tert*-butyl-carbamoyl-amino]propyl)-ornithin)propylamid)- β -D-ribofuranose **95**, 2.4 mL abs. Pyridin, 66 μ L mL NEt_3 und 114 mg 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (0.34 mmol, 1.3 eq.). Reaktionsdauer: 17 h.

Ausbeute: 278 mg (0.22 mmol, 84 %), farbloser Schaum

DC: $R_f = 0.52$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5)

1H -NMR: (400 MHz, Aceton- d_6)

δ [ppm] = 8.33 (s, 1H, H2), 7.46–7.22 (m, 10H, H7, H_{arom}), 6.95 (dt, $J = 10.2$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 1H, H5), 6.87–6.83 (m, 4H, H_{arom}), 6.12 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H, H1'), 6.03 (br s, 1H, NH), 5.96 (br s, 1H, NH), 4.83 (br s, 1H, 3'-OH), 4.60–4.56 (m, 1H, H3'), 4.52–4.49 (m, 1H, H2'), 4.34–4.31 (m, 1H, H4'), 3.82–3.76 (m, 6H, OCH_3), 3.67–3.61 (m, 2H, γ - CH_2), 3.44–3.42 (m, 2H, H5', H5''), 3.27–3.18 (m, 4H, $-CH_2-$), 3.10–3.06 (m, 3H, α - CH_2 , COCH), 1.79–1.68 (m, 8H, $-CH_2-$), 1.58–1.56 (m, 2H, β - CH_2), 1.45–1.40 (m, 42H, 4 x CH_3 aus BOC, $CH_2-CH_2-CH_2$).

^{13}C -NMR: (100.6 MHz, Aceton- d_6)

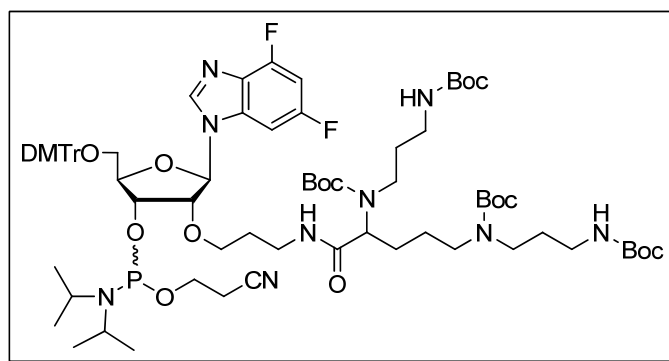
δ [ppm] = 172.4 (CO_{Amid}), 159.7 (CF), 156.7, 156.6, 156.5, 156.2 (4 x CO aus BOC), 155.8 (CF), 150.7 (C_{arom}), 146.0 (C_{arom}), 143.2 (C2), 136.6 (C_{arom}), 131.0,

129.0, 128.7, 127.6, 124.6 (C_{arom}), 114.0 (C_{arom}), 98.6 (C5), 95.8 (C7), 88.7 (C1'), 87.3 (C2'), 85.7 (C_{DMTr}), 83.0 (C4'), 80.5, 79.6, 78.6, 78.5 (4x C_{CH_3} aus BOC), 70.5 (C3'), 68.9 (C_{α}), 64.6 (C5'), 55.5 (OCH_3), 42.2 (C_{γ}), 39.0, 37.6, 36.9 (3 x CH_2), 31.2 (C_{β}), 29.0 (CH_3 BOC im Lösemittelsignal).

MALDI(+)-MS: m/z 1275.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$

ESI-HRMS: Berechnet für $[\text{C}_{67}\text{H}_{93}\text{F}_2\text{N}_7\text{O}_{15}+\text{Na}]^+$: 1296.6596, gefunden: 1296.6591

3'-O-(2-Cyanoethoxy-N,N-diisopropylamin)phosphin-5'-O-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-2'-O-(γ -N-(N_{α},N_{δ} -bis(*tert*-butyl-carbamoyl)- N_{α},N_{δ} -bis(3-[*tert*-butyl-carbamoyl-amino]propyl)ornithin)propylamid)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose



97

$\text{C}_{76}\text{H}_{110}\text{F}_2\text{N}_9\text{O}_{16}\text{P}$

1473.78 g/mol

Man löst unter Argonatmosphäre in einem ausgeheizten Rundkolben 142 mg (0.11 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-(γ -N-(N_{α},N_{δ} -bis(*tert*-butyl-carbamoyl)- N_{α},N_{δ} -bis(3-[*tert*-butyl-carbamoyl-amino]propyl)ornithin)propylamid)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **96** in 2.2 mL abs. Acetonitril. Nach Zugabe von 118 μL *sym*-Collidin (0.9 mmol, 8 eq.), sowie 4.4 μL *N*-Methylimidazol (0.06 mmol, 0.5 eq.) wird das Reaktionsgemisch auf 0°C abgekühlt. Man gibt langsam 45 μL (0.20 mmol, 1.8 eq.) 2-Cyanoethyldiisopropylchlorphosphoramidit **44** hinzu und rührt für 70 min bei 0°C. Das Fortschreiten der Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 97:3). Schließlich lässt man das Reaktionsgemisch kurz auf Raumtemp.

erwärmen und beendet die Phosphitylierung durch Zugabe weniger mL einer 0.01 M Zitronensäure-Lsg. Es wird drei Mal mit jeweils 10 mL 0.01 M Zitronensäure-Lsg. extrahiert und die wässrige Phase wird zwei Mal gegen Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Extrakte werden über MgSO_4 getrocknet das Lösemittel wird i. Vak. entfernt. Der Rückstand wird unter Argon in wenig Dichlormethan aufgenommen und an Kieselgel im Laufmittelgemisch $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (96:4) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute: 105 mg (0.07 mmol, 64 %), beide Diastereomere als farbloser Schaum.

DC: $R_f = 0.62$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 96:4)

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, Aceton- d_6)

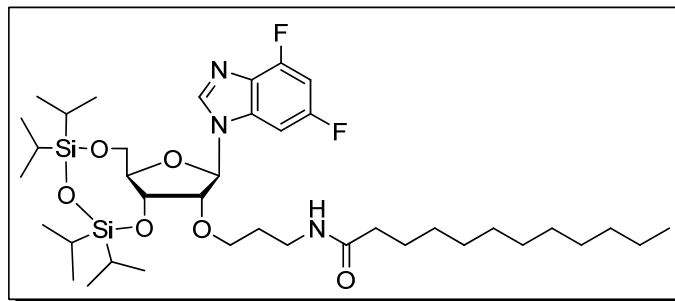
δ [ppm] = 8.35 (s, 1H, H2), 7.44–7.42 (m, 1H, H7), 7.35–7.26 (m, 9H, H_{arom}), 6.95 (dt, $J = 10.4$ Hz, $J = 2.1$ Hz, 1H, H5), 6.88–6.83 (m, 4H, H_{arom}), 6.19 (s, 1H, H1'), 5.98 (br s, 1H, NH), 4.79–4.75 (m, 1H, H3'), 4.70–4.60 (m, 1H, H4'), 4.62–4.59 (m, 1H, H2'), 4.56–4.46 (m, 2H, H5', H5''), 4.40–4.30 (m, 2H, $\gamma\text{-CH}_2$), 3.78 (s, 6H, O- CH_3), 3.63–3.41 (m, 4H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, $\alpha\text{-CH}_2$), 3.27–3.19 (m, 14H, $-\text{CH-CH}_3$ aus *iPr*, $-\text{CH}_2-$), 3.06–3.00 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$, 2.63–2.59 (m, 1H, COCH), 1.75–1.67 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 1.44–1.39 (m, 36H, 4 x CH_3 aus BOC), 1.16 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H, 2 x CH_3 *iPr*), 1.13–1.10 (m, 6H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$), 1.05 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H, 2 x CH_3 *iPr*).

$^{31}\text{P-NMR}$: (121.5 MHz, Aceton- d_6)

δ [ppm] = 150.3, 149.7 (Verhältnis: 1:1.9)

MALDI(+)-MS: m/z 1474.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$

3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(γ -N-(dodecanamido-propyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose



99

$C_{39}H_{67}F_2N_3O_6Si_2$

768.45 g/mol

In einem ausgeheizten Rundkolben unter Argonatmosphäre legt man i. Hochvak. getrocknete 275 mg (0.47 mmol) 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(γ -aminopropyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **77** vor und löst das Edukt in 5 mL abs. Dichlormethan. Es werden 94 mg (0.47 mmol, 1 eq.), Laurinsäure sowie 64 mg (0.47 mmol, 1 eq.) HOBt und 72 μ L (0.47 mmol, 1 eq.) DIC zugesetzt und man rührt für 72 h bei Raumtemp. Das Fortschreiten der Reaktion lässt sich mittels Dünnschichtchromatographie im Laufmittel $CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5 kontrollieren. Man gibt anschließend wenige mL einer wässr. ges. $NaHCO_3$ -Lsg. zu und schüttelt die Reaktionslösung mehrmals gegen eine wässr. ges. $NaHCO_3$ -Lsg. aus. Die wässr. Phase wird noch zweimal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet. Das Lösemittel wird i. Vak. entfernt und der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kiesel im Laufmittelgemisch $CH_2Cl_2/MeOH$ (97:3) aufgereinigt.

Ausbeute: 256 mg (0.33 mmol, 71 %), orangefarbenes Öl

DC: $R_f = 0.36$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 97:3)

1H -NMR: (250 MHz, $CDCl_3$)

δ [ppm] = 8.28 (s, 1H, H2), 6.97 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H, H7), 6.83 (dt, $J = 10.1$ Hz, $J = 2.1$ Hz, 1H, H5), 5.87 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H, H1'), 5.83–5.80 (m, 1H, NH), 4.55–4.51 (m, 1H, H3'), 4.30–4.27 (m, 1H, H4'), 4.15–4.12 (m, 1H, H2'), 4.07–4.03 (m, 1H, H5'), 4.00–3.95 (m, 1H, α - CH_2), 3.84–3.82 (m, 1H, H5''), 3.80–

3.75 (m, 1H, α -CH₂), 3.51–3.38 (m, 2H, γ -CH₂), 2.17–2.13 (m, 2H, -CH₂CH₃), 1.88–1.84 (m, 2H, β -CH₂), 1.64–1.61 (m, 2H, -CH₂-), 1.29–1.25 (m, 19H, 8 x CH₂, CH₃), 1.12–0.96 (m, 28H Si-CH₃, Si-*i*Pr).

¹³C-NMR: (100.6 MHz, Aceton-d₆)

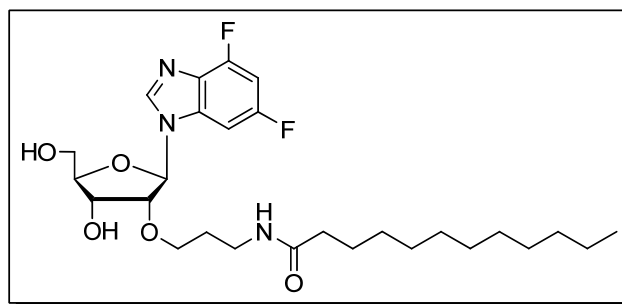
δ [ppm] = 173.1 (CO_{Amid}), 160.0 (dd, $J = 240$ Hz, $J = 11$ Hz, CF), 153.4 (dd, $J = 254$ Hz, $J = 15$ Hz, CF), 142.6 (C₂), 135.8 (C_{arom}), 130.6 (C_{arom}), 98.5 (C₅), 95.1 (C₇), 90.5 (C_{1'}), 83.0 (C_{2'}), 82.5 (C_{4'}), 71.0 (C_{3'}), 70.3 (C α), 61.1 (C_{5'}), 37.0 (C γ), 36.9 (CH₂), 32.7 (CH₃), 31.4 (C β), 29.9 (CH₂ im Lösemittelsignal), 26.5, 23.4 (2 x CH₂), 17.8 (SiCH₂CH₃), 14.4, 14.2, 13.8, 13.5 (SiCH₃).

ESI(+)-MS: m/z 768.6 [M+H]⁺

ESI-HRMS: Berechnet für [C₃₉H₆₇F₂N₃O₆+H]⁺: 768.4614, gefunden: 768.4600.

1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)-2'-*O*-(γ -*N*-(dodecanamidopropyl))-

β -D-ribofuranose



100

C₂₇H₄₁F₂N₃O₅

525.30 g/mol

Die Abspaltung der Markiewicz-Schutzgruppe erfolgt analog zu allgemeiner Vorschrift Nr. 2. Eingesetzte Mengen: 180 mg 3',5'-*O*-(1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-2'-*O*-(γ -*N*-(dodecan-amidopropyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **99** (0.23 mmol). Reaktionsdauer: 60 min. Die säulenchromatographische Aufreinigung erfolgt an Kieselgel im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/MeOH (95:5→9:1).

Ausbeute: 105 mg (0.20 mmol, 87 %), orangefarbenes Öl.

DC: $R_f = 0.27$ (CH₂Cl₂/MeOH 95:5)

¹H-NMR: (250 MHz, CDCl₃)

δ [ppm] = 8.46 (s, 1H, H2), 7.16 (dd, $J = 8.3$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H, H7), 6.79 (dt, $J = 10.1$ Hz, $J = 2.1$ Hz, 1H, H5), 5.95 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H, H1'), 5.92–5.89 (m, 1H, NH), 4.53–4.51 (m, 1H, H3'), 4.33–4.31 (m, 1H, H4'), 4.26–4.23 (m, 1H, H2'), 4.04–3.88 (m, 2H, H5', H5''), 3.76–3.74 (m, 1H, γ -CH₂), 3.58–3.52 (m, 1H, α -CH₂), 3.48–3.44 (m, 1H, α -CH₂), 3.09–3.05 (m, 1H, γ -CH₂), 2.18–2.14 (m, 2H, -CH₂CH₃), 1.77–1.73 (m, 2H, β -CH₂), 1.62–1.58 (m, 2H, -CH₂-), 1.29–1.23 (m, 19H, 8 x CH₂, CH₃).

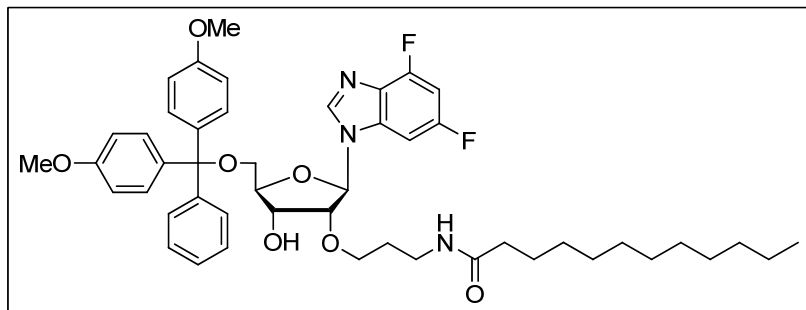
¹³C-NMR: (100.6 MHz, CDCl₃)

δ [ppm] = 174.4 (CO_{Amid}), 158.3 (CF), 154.6 (CF), 142.0 (C2), 135.1 (C_{arom}), 128.8 (C_{arom}), 98.6 (C5), 94.3 (C7), 88.1 (C1'), 86.6 (C4'), 83.7 (C2'), 69.9 (C3'), 68.1 (C α), 62.8 (C5'), 37.0 (C γ), 36.0 (CH₂), 32.0 (CH₃), 30.9 (C β), 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3 (5 x CH₂), 25.7, 22.7, 20.2 (3 x CH₂),

ESI(-)-MS: m/z 524.2 [M-H]⁻

ESI-HRMS: Berechnet für [C₂₇H₄₁F₂N₃O₅+H]⁺: 526.3092, gefunden: 526.3092.

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-(γ -N-(dodecanamidopropyl))-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose



101

$C_{48}H_{59}F_2N_3O_7$

827.43 g/mol

Die Blockierung der 5'-OH-Funktion mit der DMTr-Schutzgruppe erfolgt nach allgemeiner Vorschrift Nr. 1. Eingesetzte Mengen: 80 mg (0.15 mmol) 1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(γ -N-(dodecanamidopropyl))- β -D-ribofuranose **100**, 830 μ L abs. Pyridin, 36 μ L mL NEt_3 und 72 mg 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (0.21 mmol, 1.4 eq.). Reaktionsdauer: 17 h.

Ausbeute: 83 mg (0.10 mmol, 67 %), gelblicher, amorpher Feststoff.

DC: $R_f = 0.39$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 97:3)

1H -NMR: (400 MHz, Aceton- d_6)

δ [ppm] = 8.33 (s, 1H, H2), 7.41 (dd, $J = 8.7$ Hz, $J = 2.1$ Hz, 1H, H7), 7.35–7.22 (m, 9H, H_{arom}), 6.95 (dt, $J = 10.0$ Hz, $J = 2.0$ Hz, 1H, H5), 6.87–6.84 (m, 4H, H_{arom}), 6.10 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H, H1'), 4.92 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H, 2'-OH), 4.56–4.52 (m, 1H, H3'), 4.49–4.46 (m, 1H, H4'), 4.30 (q, $J = 3.7$ Hz, 1H, H2'), 3.79 (s, 6H, OCH_3), 3.73–3.69 (m, 1H, α - CH_2), 3.67–3.57 (m, 2H, α - CH_2 , γ - CH_2), 3.43–3.42 (m, 2H, H5', H5''), 3.16–3.11 (m, 1H, γ - CH_2), 2.17–2.14 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, $-CH_2CH_3$), 1.76–1.70 (m, 2H, β - CH_2), 1.62–1.57 (m, 2H, $-CH_2-$), 1.29–1.26 (m, 19H, 8 x CH_2 , CH_3).

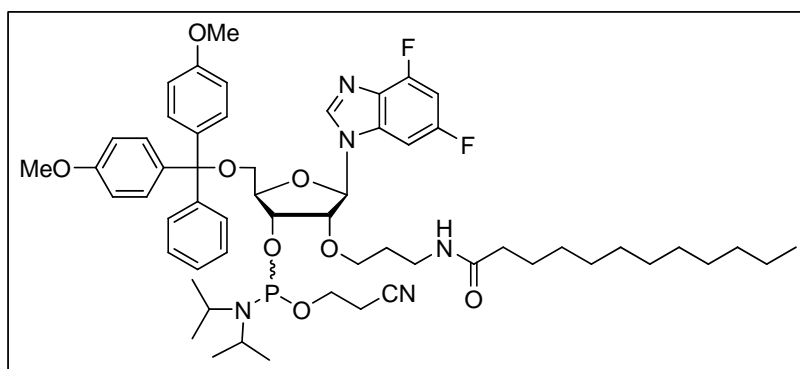
^{13}C -NMR: (100.6 MHz, Aceton- d_6)

δ [ppm] = 174.1 (CO_{Amid}), 159.7 (CF), 153.1 (CF), 145.9 (C_{arom}), 142.0 (C2), 136.6 (C_{arom}), 131.0, 129.0, 128.6, 127.6 (4 x C_{arom}), 113.9 (C_{arom}), 98.5 (C5), 95.5 (C7), 88.4 (C1'), 87.3 (C4'), 85.7 (C_{DMTr}), 83.1 (C2'), 70.4 (C3'), 68.8 (C α), 64.6 (C5'), 55.5 (OCH₃), 36.9 (C γ), 36.3 (CH₂), 32.7 (CH₃), 31.5 (C β), 29.9 (CH₂ im Lösemittelsignal), 26.6, 23.4 (2 x CH₂).

ESI(+)-MS: m/z 828.7 [M+H]⁺

ESI-HRMS: Berechnet für [C₄₈H₅₉F₂N₃O₇+H]⁺: 828.4399, gefunden: 828.4373.

3'-O-(2-Cyanoethoxy-N,N-diisopropylamin)phosphin-5'-O-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-2'-O-(γ -N-(dodecanamidopropyl))-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose



102

C₅₇H₇₆F₂N₅O₈P

1027.54 g/mol

Man löst 124 mg (0.15 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-(γ -N-(dodecanamidopropyl))-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **101** in 2 mL abs. Dichlormethan. Zu dieser leicht gelben Lösung gibt man 19.5 mg (0.17 mmol) 4,5-Dicyanoimidazol und kühlt die Lösung anschließend im Eisbad auf 0°C. Nun werden 71.5 μ L (0.23 mmol, 1.5 eq.) 2-Cyanoethyl-N,N,N',N'-tetraisopropylphosphoramidit **45** zugesetzt und man rührt die nunmehr orangefarbene Lösung für 3 h bei Raumtemp. Nach Zugabe weniger mL Dichlormethan wird die Reaktionslösung dreimal gegen eine wässr. ges. NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird zwei Mal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet. Nach dem Abziehen des

Lösemittels i. Vak. wird der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt. Als Eluent wird CH₂Cl₂/MeOH (96:4) verwendet.

Ausbeute: 97 mg (0.09 mmol, 63 %) beide Diastereomere als leicht gelblicher Schaum

DC: R_f = 0.45 (CH₂Cl₂/MeOH 96:4)

¹H-NMR: (400 MHz, Aceton-d₆)

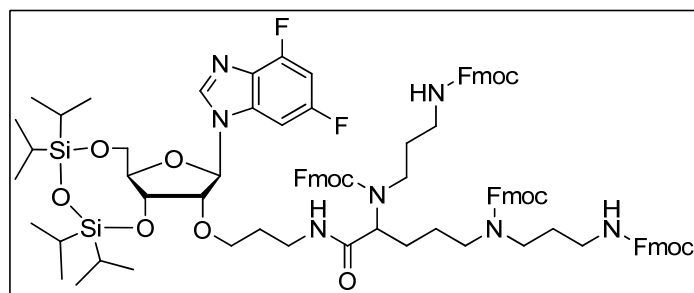
δ [ppm] = 8.24 (s, 1H, H₂), 7.35–7.18 (m, 10H, H_{arom}, H₇), 6.95 (dt, *J* = 10.0 Hz, *J* = 2.0 Hz, 1H, H₅), 6.89–6.72 (m, 4H, H_{arom}), 6.08 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, H_{1'}), 4.57–4.51 (m, 2H, H_{3'}, H_{4'}), 4.31–4.28 (m, 1H, H_{2'}), 3.92–3.84 (m, 2H, H_{5'}, H_{5''}), 3.69 (s, 6H, OCH₃), 3.66–3.63 (m, 4H, -CH-CH₃ aus *i*Pr), 3.51–3.46 (m, 2H, α-CH₂), 3.35–3.32 (m, 2H, -OCH₂CH₂CN), 3.18–3.07 (m, 2H, γ-CH₂), 2.74–2.71 (m, 3H, OCH₂CH₂CN), 2.51 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, -CH₂CH₃), 1.64–1.61 (m, 2H, β-CH₂), 1.50–1.42 (m, 2H, -CH₂-), 1.29–1.26 (m, 19H, 8 x CH₂, CH₃), 1.16 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H, 2 x CH₃ *i*Pr), 1.06 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H, 2 x CH₃ *i*Pr).

³¹P-NMR: (121.5 MHz, Aceton-d₆)

δ [ppm] = 150.2, 149.6 (Verhältnis: 1:2)

ESI(+)-MS: *m/z* 1028.8 [M+H]⁺, 1050.8 [M+Na]⁺

3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(γ -N-(N_{α},N_{δ} -bis(9-*H*-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)- N_{α},N_{δ} -bis(3-[9-*H*-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]-amino]propyl)ornithin)propylamid)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose

**115**C₉₈H₁₀₉F₂N₇O₁₄Si₂

1703.12 g/mol

339 mg (0.58 mmol) 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(γ -aminopropyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **77** werden unter Argonatmosphäre im Rundkolben in 6 mL abs. Dichlormethan gelöst. Es werden 658 mg N_{α},N_{δ} -Bis(9-*H*-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)- N_{α},N_{δ} -bis(3-[9-*H*-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl]propyl)ornithin (0.58 mmol, 1 eq.), sowie 79 mg (0.58 mmol, 1 eq.) HOBt und 90 μ L (0.58 mmol, 1 eq.) DIC zugesetzt und man rührt für 72 h bei Raumtemp. Eine Kontrolle der Reaktion erfolgt durch Dünnschichtchromatographie im Laufmittel CH₂Cl₂/MeOH 95:5. Anschließend wird das Lösemittel i. Vak. entfernt und der Rückstand wird i. Hochvak. getrocknet. Aufgrund der hohen Reinheit kann das Produkt ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe eingesetzt werden.

Ausbeute: 986 mg (0.58 mmol, quant.) leicht gelblicher Schaum

DC: R_f = 0.48 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5)

¹H-NMR: (400 MHz, Aceton-d₆)

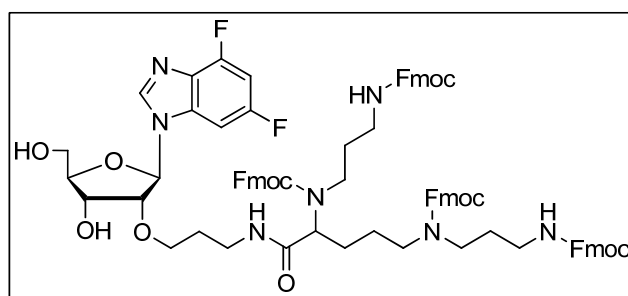
δ [ppm] = 8.47 (s, 1H, H2), 7.82–7.80 (m, 8H, H_{Fmoc}), 7.63–7.61 (m, 8H, H_{Fmoc}), 7.37–7.28 (m, 17H, H_{Fmoc}, H7), 6.91 (dt, $J = 2.0$ Hz, $J = 10.4$ Hz, H5), 6.44 (br s, 1H, NH), 6.26 (br s, 2H, NH), 6.07 (s, 1H, H1'), 5.03 (s, 1H, α -CH_{Sper}), 4.64–4.60

(m, 1H, H3'), 4.49–4.47 (m, 4H, H2', H4', H5', H5''), 4.32–4.08 (m, 4H, Fmoc-CH₂), 3.84–3.76 (m, 2H, γ -CH₂), 3.46–3.44 (m, 1H α -CH₂), 3.25–2.82 (m, 14H, CH₂-Sper, - α -CH₂), 1.78–1.77 (m, 2H, β -CH₂), 1.45–1.33 (s, 27H, CH₃ aus BOC), 1.11–0.99 (m, 28H, Si-CH₃, Si-*i*Pr).

MALDI(+)-MS: m/z 1702.05 [M]

ESI-HRMS: Berechnet für [C₉₈H₁₀₉F₂N₇O₁₄Si₂+Na]⁺: 1724.7437, gefunden : 1724.7433.

1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(γ -N-(N _{α} ,N _{δ} -bis(9-H-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-N _{α} ,N _{δ} -bis(3-[9-H-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl-amino]propyl)ornithin)propylamid)- β -D-ribofuranose



116

C₈₆H₈₃F₂N₇O₁₃

1460.62 g/mol

Unter Argonatmosphäre werden 300 mg (0.18 mmol) 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(γ -N-(N _{α} ,N _{δ} -bis(9-H-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-N _{α} ,N _{δ} -bis(3-[9-H-fluoren-9-yl-methoxycarbonylamino]propyl)ornithin)propylamid)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose **115** in 2 mL abs. THF gelöst. Nun tropft man langsam 107 μ L (0.62 mmol) einer Lösung von NEt₃ • 3 HF dazu und rührt das Reaktionsgemisch für 60 min bei Raumtemp. Das Fortschreiten der Reaktion wird durch Dünnschichtchromatographie kontrolliert. Anschließend wird die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (CH₂Cl₂/MeOH 95:5 \rightarrow 9:1).

Ausbeute: 205 mg (0.14 mmol, 78 %), farbloser Schaum.

DC: $R_f = 0.46$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1)

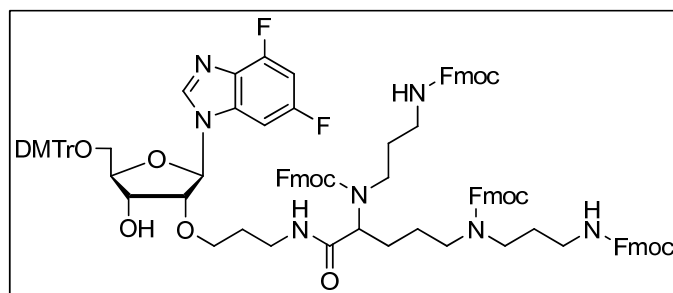
$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, Aceton- d_6)

δ [ppm] = 8.47 (s, 1H, H2), 7.90–7.81 (m, 8H, H_{Fmoc}), 7.64 – 7.59 (m, 8H, H_{Fmoc}), 7.60–7.57 (m, 1H, H7), 7.38–7.34 (m, 8H, H_{Fmoc}), 7.33–7.29 (m, 8H, H_{Fmoc}), 6.92 (dt, $J = 2.4$ Hz, $J = 10.4$ Hz, 1H, H5), 6.49–6.48 (m, 1H, NH), 6.30–6.29 (m, 2H, NH), 6.07 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, H1'), 5.10–5.09 (m, 1H, 5'-OH), 4.71 (s, 1H, 3'-OH), 4.52–4.50 (m, 10H, H3', H5', Fmoc- CH_2), 4.34–4.20 (m, 7H, H2', H4', Fmoc-H9, α - CH_{Sper}), 3.85–2.89 (m, 15H, H5'', α - CH_2 , γ - CH_2 , CH_2 -Sper), 1.65–1.20 (m, 10H, β - CH_2 , CH_2 -Sper).

ESI(+)-MS: m/z 1461.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

ESI-HRMS: Berechnet für $[\text{C}_{86}\text{H}_{83}\text{F}_2\text{N}_7\text{O}_{13}+\text{Na}]^+$: 1482.5915, gefunden : 1482.5907.

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-(γ -N-(N_{α},N_{δ} -bis(9-*H*-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)- N_{α},N_{δ} -bis(3-[9-*H*-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl-amino]propyl)ornithin)propylamid)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)- β -D-ribofuranose



117

$C_{107}H_{101}F_2N_7O_{15}$

1762.98 g/mol

Die Einführung der 5'-DMTr-Schutzgruppe erfolgt analog zur allgemeinen Vorschrift Nr. 1. Eingesetzte Mengen: 179 mg (0.123 mmol) 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluor-1-*N*-benzimidazolyl)-2'-O-(γ -N-(N_{α},N_{δ} -bis(9-*H*-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)- N_{α},N_{δ} -bis(3-[9-*H*-fluoren-9-yl-methoxycarbonyl-amino]propyl)ornithin)propylamid)- β -D-ribofuranose **116**, 54 mg (0.159 mmol, 1.3 eq.) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid, 1.3 mL abs. Pyridin und 29 μ L NEt_3 , Reaktionsdauer : 17 h.

Ausbeute : 166 mg (0.09 mmol, 76 %), leicht orangefarbener Schaum.

DC: $R_f = 0.55$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5)

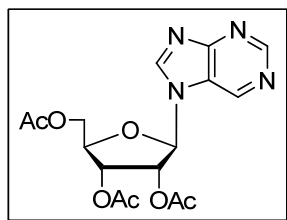
1H -NMR: (400 MHz, Aceton- d_6)

8.37 (s, 1H, H2), 7.81–7.41 (m, 17H, H7, H_{Fmoc}), 7.40–7.17 (m, 25H, H_{Fmoc} , H_{arom}), 7.00–6.81 (dt, $J = 2.2$ Hz, $J = 10.0$ Hz 1H, H5), 6.80–6.78 (m, 4H, H_{arom}), 6.11 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, H1'), 4.57 (s, 1H, 3'-OH), 4.50–4.16 (m, 17H, H3', H5', H5'', H2', H4', H_{Fmoc} , Fmoc- CH_2 , α - CH_{Sper}), 3.74–3.72 (m, 6H, OCH_3), 3.06–2.86 (m, 14H, α - CH_2 , γ - CH_2 , CH_2 - $Sper$), 1.76–1.30 (m, 10H, β - CH_2 , CH_2 - $Sper$).

ESI(+)-MS: m/z 1763.6 $[M+H]^+$

ESI-HRMS: Berechnet für $[C_{107}H_{101}F_2N_7O_{15}+Na]^+$: 1784.7222, gefunden : 1784.7225.

2', 3', 5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(7-*N*-purinyl)- β -D-ribofuranose



39

$C_{16}H_{18}N_4O_7$

378.34 g/mol

1 g (8.3 mmol) Purin werden unter Argonatmosphäre in 40 mL abs. Acetonitril gelöst. Man versetzt die Suspension mit 2.0 mL *N,O*-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid (9.6 mL) und bestrahlt das Gemisch in der Mikrowelle für 15 min (Leistung: 150 W, 80°C, 1 bar). Die homogene Lösung wird nun mit einer Lösung aus 2.64 g (8.3 mmol) 1,2,3,5-Tetra-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose in 10 mL abs. Acetonitril versetzt. Schließlich gibt man 0.85 mL (4.6 mmol) Trimethylsilyltrifluorsulfonat (TMSOTf) hinzu und bestrahlt das Reaktionsgemisch 105 min in der Mikrowelle (150 W, 80°C, 1 bar). Nach dem Abkühlen der Lsg. quencht man die Reaktion durch Zugabe von 8 mL einer wässr. ges. $NaHCO_3$ -Lsg. und man extrahiert drei Mal mit Dichlormethan. Die organische Phase wird über $MgSO_4$ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird in Dichlormethan aufgenommen und säulenchromatographisch an Kieselgel im Laufmittelgemisch $CH_2Cl_2/MeOH$ (99:1 \rightarrow 98:2) aufgereinigt. Man erhält das gewünschte 7*N*-Isomer als sog. *slow*-Isomer als farblosen Schaum.

Ausbeute: 488 mg (1.29 mmol, 16 %), farbloser Schaum.

DC: $R_f = 0.37$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5)

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3)

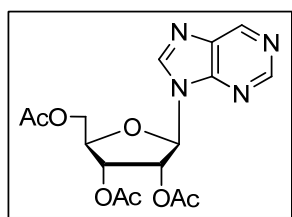
δ [ppm] = 9.20 (d, $J = 11.4$ Hz, 2H, H6, H2), 8.51 (s, 1H, H8), 6.14 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H, H1'), 5.50 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, H2'), 5.39 (t, $J = 5.0$ Hz, H3'), 4.56–4.49 (m, 2H, H5', H5''), 4.42–4.38 (m, 1H, H4'), 2.18 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$), 2.16 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$), 2.11 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ac}$).

$^{13}\text{C-NMR}$: (100.6 MHz, CDCl_3)

δ [ppm] = 170.1, 169.5, 169.4 (3 x CO), 161.5 (C4), 153.7 (C6), 146.0 (C2), 141.0 (C8), 124.0 (C5), 88.2 (C1'), 81.0 (C2'), 73.7 (C3'), 70.0 (C4'), 62.6 (C5'), 20.8, 20.5, 20.4 (3 x $\text{CH}_3\text{-Ac}$).

MALDI(+)-MS: m/z 378.3 [M]

2', 3', 5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(9-*N*-purinyl)- β -D-ribofuranose



39b

$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_7$

378.34 g/mol

Man erhält 2', 3', 5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(9-*N*-purin)- β -D-ribofuranose **39b** als zweites Regioisomer bei der Darstellung von 2',3',4'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(7-*N*-purin)- β -D-ribofuranose **39** gemäß obiger Vorschrift. Es wird als sog. *fast*-Isomer säulenchromatographisch erhalten.

Ausbeute: 2.12 g (5.6 mmol, 68 %) farbloser Schaum

DC: $R_f = 0.42$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3)

δ [ppm] = 9.12–9.15 (m, 1H, H6), 8.95 (s, 1H, H2), 8.23 (s, 1H, H8), 6.21 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, H1'), 5.96–5.93 (m, 1H, H2'), 5.65–5.63 (m, 1H, H3'), 4.42–4.39 (m,

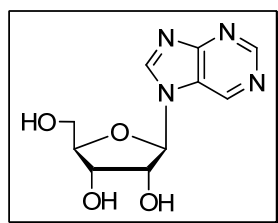
2H, H5',H5''), 4.35–4.31 (m, 1H, H4'), 2.10 (s, 3H, CH₃-Ac), 2.05 (s, 3H, CH₃-Ac), 2.02 (s, 3H, CH₃-Ac).

¹³C-NMR: (100.6 MHz, CDCl₃)

δ [ppm] = 170.3, 169.6, 169.3 (3 x CO), 152.9 (C4), 150.9 (C2), 149.1 (C6), 143.7 (C8), 134.7 (C5), 86.5 (C1'), 80.4 (C2'), 73.1 (C3'), 70.6 (C4'), 63.0 (C5'), 20.7, 20.5, 20.4 (3 x CH₃-Ac).

ESI(+)-MS: *m/z* 378.1 [M]

1'-Desoxy-1'-(7-N-puriny)-β-D-ribofuranose



41

C₁₀H₁₂N₄O₄

252.23 g/mol

1.11 g (2.95 mmol) 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-1'-desoxy-1'-(7-*N*-purin)-β-D-ribofuranose **39** werden unter Argonatmosphäre in 44 mL abs. Methanol gelöst. Man gibt 354 μL einer 5.4 M Natriummethanolat-Lsg (in Methanol) dazu und rührt bei Raumtemp. Nach 45 min lässt sich mittels DC-Kontrolle kein Edukt mehr nachweisen, sodass die Reaktion durch Zugabe von vier Spateln eines schwach sauren Ionenaustauschers (Dowex 50WX8, Korngröße 200 – 400) gestoppt wird. Nach Abfiltration des Ionenaustauschers engt man das Filtrat i. Vak ein und reinigt den Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/MeOH (9:1) auf.

Ausbeute: 670 mg (2.66 mmol, 90 %), farbloser, amorpher Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, Methanol- d_4)

δ [ppm] = 9.38 (s, 1H, H6), 8.95 (s, 1H, H2), 8.84 (s, 1H, H8), 5.98 (d, J = 5.4 Hz, 1H, H1'), 4.43–4.39 (m, 1H, H2'), 4.26–4.23 (m, 1H, H3'), 4.14 (q, J = 2.8 Hz, 1H, H4'), 3.81–3.78 (m, 2H, H5', H5'').

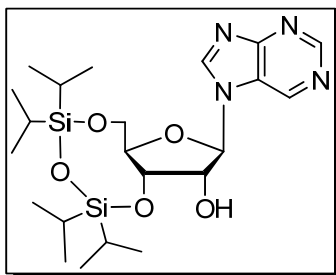
$^{13}\text{C-NMR}$: (100.6 MHz, Methanol- d_4)

δ [ppm] = 161.2 (C4), 153.5 (C6), 145.8 (C2), 141.0 (C8), 123.8 (C5), 88.1 (C1'), 80.9 (C2'), 73.5 (C3'), 70.0 (C4'), 63.1 (C5').

MALDI(+)-MS: m/z 253.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$

ESI-HRMS: Berechnet für $[\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_4+\text{Na}]^+$: 275.0757, gefunden: 275.0755.

3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(7-N-purinyll)- β -D-ribofuranose



55

$\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_5\text{Si}_2$

494.73 g/mol

In einem ausgeheizten Rundkolben werden unter Schutzgasatmosphäre 670 mg 1'-Desoxy-1'-(7-N-purinyll)- β -D-ribofuranose **41** (2.67 mmol) in 8 mL abs. Pyridin gelöst. Nach langsamer Zugabe von 1.0 mL (3.48 mmol, 1.3 eq.) 1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxandichlorid **52** rührt man die Reaktionsmischung für 6 h bei Raumtemp. Hierbei ist die Bildung des ausfallenden Pyridiniumchlorids als farbloser Niederschlag zu beobachten. Die Reaktion wird durch Zugabe von wenigen mL Wasser gestoppt und man wäscht das Reaktionsgemisch drei Mal mit jeweils 10 mL einer ges. NaHCO_3 -Lösung. Die wässrige Phase wird mehrmals Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird mehrmals mit wenig Toluol coevaporiert und schließlich säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt. Als Eluent

wird ein Gemisch aus Dichlormethan/Methanol 98:2 verwendet. Man erhält das Produkt **55** als farblosen Schaum.

Ausbeute: 1.06 g (2.14 mmol, 80 %), farbloser Schaum

DC: $R_f = 0.32$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2)

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3)

δ [ppm] = 9.17 (s, 1H, H6), 9.16 (s, 1H, H2), 8.55 (s, 1H, H8), 6.01 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H1'), 4.58–4.53 (m, 1H, H3'), 4.28–4.25 (m, 1H, H2'), 4.21–4.14 (m, 3H, H4', H5', H5'), 3.30 (br s, 1H, 2'-OH), 1.11–0.99 (m, 28H, Si-CH₃, Si-*i*Pr).

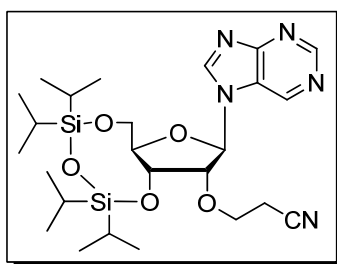
$^{13}\text{C-NMR}$: (100.6 MHz, CDCl_3)

δ [ppm] = 161.4 (C4), 153.4 (C2), 145.8 (C6), 140.7 (C8), 123.9 (C5), 91.2 (C1'), 82.7 (C2'), 75.3 (C4'), 69.7 (C3'), 60.9 (C5'), 17.5, 17.4, 17.3, 17.2, 17.1, 17.0, 16.9, 16.8 (8 x SiCH₃), 13.4, 13.0, 12.9, 12.6 (4 x SiCH₂CH₃).

ESI(+)-MS: m/z 494.3 [M]

ESI-HRMS: Berechnet für $[\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_5\text{Si}_2+\text{Na}]^+$: 517.2279, gefunden: 517.2272.

3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(β -cyanoethyl)-1'-desoxy-1'-(7-N-puriny)- β -D-ribofuranose



73

$\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_5\text{Si}_2$

547.79 g/mol

In einem ausgeheizten Rundkolben werden unter Argonatmosphäre 630 mg (1.27 mmol) 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-1'-desoxy-1'-(7-N-purin)- β -D-ribofuranose **55** und 416 mg Caesiumcarbonat (1.27 mmol, 1 eq.) in 6 mL *tert*-Butanol gelöst. Zum

Reaktionsgemisch werden 1.65 mL (25.4 mmol, 20 eq.) frisch destilliertes Acrylnitril zugesetzt und man rührt für 13 h bei Raumtemp. Anschließend für die Reaktionsmischung mit Dichlormethan verdünnt und über eine Saugfritte mit wenig Kieselgel abgesaugt. Man wäscht mit Dichlormethan nach und befreit das Filtrat vom Lösungsmittel. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt. Als Eluent verwendet man ein Gemisch aus Dichlormethan/Methanol 95:5.

Ausbeute: 560 mg (1.02 mmol, 81 %), gelblicher Schaum

DC: $R_f = 0.39$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3)

δ [ppm] = 9.18–9.17 (m, 2H, H2, H6), 8.55 (s, 1H, H8), 6.01 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H1'), 4.57–4.52 (m, 1H, H3'), 4.34–4.30 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}_2$), 4.27–4.03 (m, 4H, H2', H4', H5', H5''), 3.88–3.82 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}_2$), 2.74–2.63 (m, 2H, $\beta\text{-CH}_2$), 1.11–0.99 (m, 28H, Si- CH_3 , Si-*i*Pr).

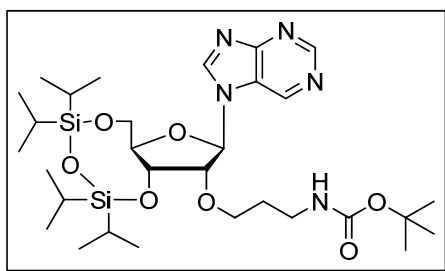
$^{13}\text{C-NMR}$: (100.6 MHz, CDCl_3)

δ [ppm] = 161.4 (C4), 153.7 (C2), 145.4 (C6), 140.5 (C8), 123.8 (C5), 117.5 (CN), 90.1 (C1'), 83.6 (C2'), 81.6 (C3'), 70.1 (C4'), 66.6 (C α), 59.3 (C5'), 19.7 (C β), 17.5, 17.4, 17.3, 17.2, 17.1, 17.0, 16.9, 16.8 (8 x SiCH $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 13.4, 13.0, 12.9, 12.6 (4 x SiCH $\underline{\text{C}}\text{HCH}_3$).

ESI(+)-MS: m/z 548.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$

ESI-HRMS: Berechnet für $[\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_5\text{Si}_2+\text{Na}]^+$: 570.2544, gefunden: 570.2534.

3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(γ -N-tert-butylloxycarbonyl-propyl)-1'-desoxy-1'-(7-N-puriny)- β -D-ribofuranose



104

$C_{30}H_{53}N_5O_7Si_2$

651.94 g/mol

355 mg (0.61 mmol) 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(β -cyanoethyl)-1'-desoxy-1'-(7-N-purin)- β -D-ribofuranose **73** werden in einem Autoklavenröhrchen ($\varnothing = 1.5$ cm) unter Argonatmosphäre in 5 mL abs. Methanol gelöst. Es werden zwei Spatelspitzen Raney-Nickel-Katalysator, welcher zuvor gründlich mit Methanol gespült wurde, sowie 399 mg Di-tert-Butyldicarbonat (1.83 mmol, 3 eq.) zugesetzt. Man hydriert das Reaktionsgemisch im Autoklaven bei einem Wasserstoffdruck von 30 bar unter ständigem Rühren bei Raumtemp. für 5 h. Anschließend wird das Reaktionsgemisch über Celite abgesaugt. Man wäscht mehrfach mit Methanol und Dichlormethan und engt das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockene ein. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an Kieselgel im Laufmittelgemisch $CH_2Cl_2/MeOH$ (97:3 \rightarrow 95:5) aufgereinigt.

Ausbeute: 310 mg (0.4 mmol, 78 %), farbloser Schaum.

DC: $R_f = 0.50$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5)

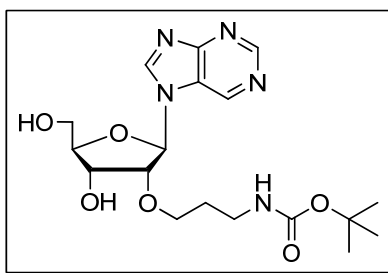
1H -NMR: (400 MHz, $CDCl_3$)

δ [ppm] = 9.15 (s, 1H, H6), 9.11 (s, 1H, H2), 8.64 (s, 1H, H8), 6.06 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H, H1'), 4.56–4.49 (m, 1H, H3'), 4.34–4.20 (m, 2H, H4', H2'), 4.09–3.75 (m, 6H, H5', H5'', α -CH₂, γ -CH₂), 1.84–1.81 (m, 2H, β -CH₂), 1.42 (s, 9H, CH₃ BOC), 1.11–0.97 (m, 28H, Si-CH₃, Si-*i*Pr).

MALDI(+)-MS: m/z 653.8 $[M+2H]^{2+}$

ESI-HRMS: Berechnet für $[C_{30}H_{53}N_5O_7Si_2+Na]^+$: 674.3382, gefunden: 674.3369.

1'-Desoxy-1'-(7-N-purinyl)-2'-O-(γ -N-*tert*-butyloxycarbonylpropyl)- β -D-ribofuranose



108

$C_{18}H_{27}N_5O_6$

409.44 g/mol

Die simultane 3',5'-Entschützung wird gemäß allgemeiner Vorschrift Nr. 2 vollzogen. Es werden 250 mg (0.38 mmol) 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(γ -N-*tert*-butyloxy-carbonylpropyl)-1'-desoxy-1'-(7-N-purin)- β -D-ribofuranose **104** umgesetzt. Reaktionsdauer: 60 min. Als Laufmittelgemisch zur säulenchromatographischen Aufreinigung wird $CH_2Cl_2/MeOH$ (9:1) verwendet.

Ausbeute: 113 mg (0.27 mmol, 72 %), farbloser Schaum.

DC: $R_f = 0.35$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1)

1H -NMR: (400 MHz, $CDCl_3$)

δ [ppm] = 9.31 (s, 1H, H6), 9.06 (s, 1H, H2), 8.74 (s, 1H, H8), 6.07 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, H1'), 4.93 (br s, 1H, 5'-OH), 4.76 (br s, 1H, 3'-OH), 4.58–4.56 (m, 1H, H3'), 4.40–4.39 (m, 1H, H2'), 4.29–4.26 (m, 1H, H4'), 4.06–3.96 (m, 2H, H5', H5''), 3.65–3.61 (m, 1H, α -CH₂), 3.54–3.52 (m, 1H, γ -CH₂), 3.40–3.39 (m, 1H, α -CH₂), 3.05–2.97 (m, 1H, γ -CH₂) 1.76–1.68 (m, 2H, β -CH₂), 1.42 (s, 9H, CH₃ BOC).

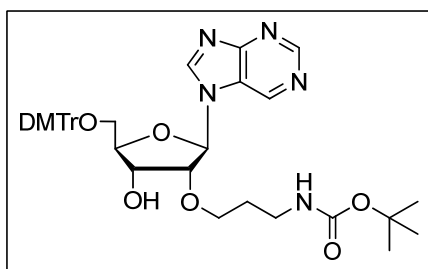
^{13}C -NMR: (100.6 MHz, $CDCl_3$)

δ [ppm] = 160.8 (CO_{Carbamat}), 157.0 (C4), 153.2 (C2), 146.9 (C6), 141.9 (C8), 124.4 (C5), 89.2 (C1'), 87.3 (C2'), 83.9 (CCH₃ aus BOC), 79.9 (C3'), 69.8 (C4'), 67.8 (C α), 61.9 (C5'), 36.8 (C γ), 31.3 (C β), 28.4 (CH₃ BOC).

ESI(-)-MS: m/z 407.2 [M-H]⁻

ESI-HRMS: Berechnet für $[C_{28}H_{17}N_5O_6+Na]^+$: 432.1859, gefunden: 432.1872.

**5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-(γ -N-tert-butyloxycarbonyl-propyl)-
1'-desoxy-1'-(7-N-purinyl)- β -D-ribofuranose**



109

$C_{39}H_{45}N_5O_8$

711.80 g/mol

203 mg (0.49 mmol) 1'-Desoxy-1'-(7-N-purin)- 2'-O-(γ -N-tert-butyloxycarbonyl-propyl)- β -D-ribofuranose **108** werden gemäß allgemeiner Vorschrift Nr. 1 einer 5'-O-DMTr-Blockierung unterworfen. Hierzu werden 215 mg (0.63 mmol, 1.3 eq.), 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid 3 mL abs. Pyridin und 73 μ L mL NEt_3 zugesetzt. Reaktionsdauer: 17 h.

Ausbeute: 288 mg (0.41 mmol, 83 %), leichtgelber, amorpher Feststoff.

DC: $R_f = 0.44$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5)

1H -NMR: (400 MHz, Aceton- d_6)

δ [ppm] = 9.20 (s, 1H, H6), 8.99 (s, 1H, H2), 8.70 (s, 1H, H8), 7.45–7.42 (m, 2H, H_{arom}), 7.34–7.19 (m, 7H, H_{arom}), 6.85–6.82 (m, 4H, H_{arom}), 6.21 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H, H1'), 6.10 (br s, 1H, NH), 4.70–4.68 (m, 1H, 3'-OH), 4.57–4.55 (m, 1H, H4'), 4.51–4.47 (m, 1H, H2'), 4.37–4.33 (m, 1H, H3'), 3.76 (s, 6H, OCH_3), 3.66–3.59 (m, 1H, α - CH_2), 3.52–3.40 (m, 2H, H5', H5''), 3.38–3.29 (m, 1H, γ - CH_2), 3.12–3.05 (m, 1H, α - CH_2), 2.86–2.84 (m, 1H, γ - CH_2) 1.75–1.68 (m, 2H, β - CH_2), 1.39 (s, 9H, CH_3 BOC).

^{13}C -NMR: (100.6 MHz, Aceton- d_6)

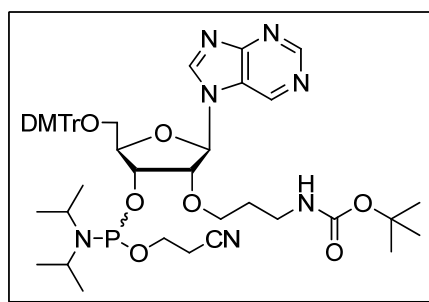
δ [ppm] = 162.3 ($CO_{Carbamat}$), 159.7 (C4), 157.4 (C_{arom}), 153.9 (C2), 147.3 (C6), 145.9 (C_{arom}), 142.6 (C8), 136.6, 136.5 (C_{arom}), 130.9, 128.9, 128.7, 127.6 (C_{arom}), 125.5 (C5), 114.3 (C_{arom}), 89.4 (C1'), 87.4 (C2'), 86.1 (C_{DMTr}), 83.5 (C_{CH_3} aus

BOC), 78.9 (C3'), 70.5 (C4'), 68.9 (C α), 64.5 (C5'), 55.5 (OCH₃), 37.7 (C γ), 31.5 (C β), 29.8 (CH₃ BOC im Lösemittelsignal).

ESI(+)-MS: m/z 712.2 [M]

ESI-HRMS: Berechnet für [C₃₉H₄₅N₅O₈+Na]⁺: 734.3166, gefunden: 734.3139.

3'-O-(2-Cyanoethoxy-N,N-diisopropylamin)phosphin-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-(γ -N-tert-butyloxycarbonyl-propyl)-1'-desoxy-1'-(7-N-puriny)- β -D-ribofuranose



110

C₄₈H₆₂N₇O₉P

912.02 g/mol

Man löst unter Argonatmosphäre 273 mg (0.38 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-(γ -N-tert-butyloxycarbonyl-propyl)-1'-desoxy-1'-(7-N-purin)- β -D-ribofuranose **109** in 7 mL abs. Acetonitril. Nach Zugabe von 415 μ L *sym*-Collidin (3.04 mmol, 8 eq.), sowie 15.5 μ L *N*-Methylimidazol (0.19 mmol, 0.5 eq.) wird das Reaktionsgemisch auf 0°C abgekühlt. Man gibt langsam 157 μ L (0.68 mmol, 1.8 eq.) 2-Cyanoethyldiisopropylchlorphosphoramidit **44** hinzu und rührt für 50 min bei 0°C. Das Fortschreiten der Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert (CH₂Cl₂/MeOH 97:3). Schließlich lässt man das Reaktionsgemisch kurz auf Raumtemp. erwärmen. Es wird drei Mal mit jeweils 10 mL einer ges. wässr. NaHCO₃-Lsg. extrahiert und die wässrige Phase wird zwei Mal gegen Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Extrakte werden über MgSO₄ getrocknet das Lösemittel wird i. Vak. entfernt.

Der Rückstand wird unter Argon in wenig Dichlormethan aufgenommen und an Kieselgel im Laufmittelgemisch CH₂Cl₂/MeOH (96:4) säulenchromatographisch aufgereinigt.

Ausbeute: 266 mg (0.29 mmol, 77 %) beide Diastereomere als farblosen Schaum

DC: R_f = 0.51 (CH₂Cl₂/MeOH 96:4)

¹H-NMR: (400 MHz, Aceton-d₆)

δ [ppm] = 9.10 (s, 1H, H6), 8.88 (s, 1H, H2), 8.59 (s, 1H, H8), 7.50–7.21 (m, 9H, H_{arom}), 6.86–6.83 (m, 4H, H_{arom}), 6.33–6.30 (m, 1H, H1'), 5.87 (br s, 1H, NH), 5.00–4.96 (m, 1H, H4'), 4.94–4.85 (m, 1H, H2'), 4.45–4.39 (m, 1H, H3'), 4.02–3.94 (m, 1H, H5'), 3.84–3.81 (m, 1H, H5''), 3.79 (s, 6H, OCH₃), 3.71–3.68 (m, 2H, -CH-CH₃ aus *i*Pr), 3.57–3.43 (m, 2H, -OCH₂CH₂CN), 3.14–3.11 (m, 2H, OCH₂CH₂CN), 2.84–2.78 (m, 3H, α-CH₂, γ-CH₂), 2.64–2.62 (m, 1H, γ-CH₂), 1.75–1.72 (m, 2H, β-CH₂), 1.38 (s, 27H, CH₃ aus BOC), 1.29–1.15 (m, 12 H, 4 x CH₃ *i*Pr).

³¹P-NMR: (121.5 MHz, Aceton-d₆)

δ [ppm] = 149.8, 149.4 (Verhältnis: 1:1.2)

MALDI(+)-MS: *m/z* 934.9 [M+Na]⁺

Allgemeine Vorschrift zur Durchführung einer Festphasenkupplung an ein RNA-Oligonucleotid

Zur Durchführung der Kupplung eines (geschützten) Carbonsäurederivats an ein RNA-Oligomer mit z.B. folgender Sequenz: 3'-UUC UUX CUU UUC - 5' (mit X = modifiziertes Nucleosid mit 2'-*O*-Aminopropyl - Modifikation) werden zunächst 20 mg HOBt mit wenig Pyridin codestilliert und anschließend für 20 h i. Hochvak. getrocknet. 20 mg (~ 40 μmol) der Kupplungskomponente werden zusammen mit 15 mg HBTU (40 μmol) in einem kleinen Spitzkolben i. Hochvak. für mind. 5 h getrocknet.

Zum getrockneten HOBt gibt man unter Argonatmosphäre 200 μL abs. DMF. Die Kupplungskomponente sowie das HBTU werden unter Argonatmosphäre in einem Gemisch aus 100 μL abs. DMF und 100 μL abs. Dichlormethan gelöst. Das festphasengebundene,

modifizierte Oligonucleotid wird in ein kleines Säulchen mit Fritte (Fa. Alltech) überführt und vorsichtig mit Argon überschichtet. Nun gibt man beide Lösungen (HOBt in DMF sowie die Kupplungskomponente mit HBTU in Dichlormethan/DMF) hinzu und versetzt das heterogene Gemisch zusätzlich mit 15 μ L DIPEA. Man überschichtet vorsichtig mit Argon und verschließt das Säulchen sorgfältig. Das Gemisch wird nun für 72 h im Schüttelinkubator bei ~ 35 °C inkubiert. Anschließend wird die Flüssigkeit über den Hahn abgelassen und das Festphasenmaterial wird mit 10 mL DMF und gleicher Menge Dichlormethan gespült. Nach vorsichtigem Trocknen des Festphasenmaterials durch einen leichten Argonstrom überführt man es in ein 5 mL Röhrchen und verfäht gemäß Standardaufarbeitung für Oligonucleotide (vgl. Kap. 3.2.2).

Kupplung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(γ -N-trifluoracetamidopropyl)- β -D-ribofuranose **80 an LCAA-CPG Festphasenmaterial**

In einem Rundkolben werden unter Argonatmosphäre 1 g LCAA-CPG vorgelegt. Man gibt 200 mg (0.2 mmol) Bernsteinsäureanhydrid, 24 mg (0.2 mmol) DMAP sowie 7 mL abs. Pyridin hinzu und verschließt den Kolben mit einem Septum. Der Reaktionsansatz wird ü. N. im Schüttelinkubator bei Raumtemp. geschüttelt. Anschließend saugt man das Festphasenmaterial über eine Saugfritte ab und wäscht es nacheinander mit ca. 7 mL Pyridin, 15 mL Methanol und schließlich 20 mL Dichlormethan. Das aktivierte CPG-Festphasenmaterial wird i. Vak. getrocknet und bei -20°C gelagert.

Zur Kupplungsreaktion werden 1 g des aktivierten CPG-Materials unter Schutzgas in einem Rundkolben vorgelegt. Nachfolgend werden 74.2 mg (0.1 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1'-desoxy-1'-(4,6-difluor-1-N-benzimidazolyl)-2'-O-(γ -N-trifluoracetamidopropyl)- β -D-ribofuranose **80**, 12 mg (0.1 mmol) DMAP, 155 μ L (0.1 mmol) DIC sowie 7 mL abs. Pyridin zugesetzt. Der mit einem Septum verschlossene Rundkolben wird für 17 h im Schüttelinkubator bei Raumtemp. inkubiert. Danach werden 134 mg (0.5 mmol) Pentachlorphenol zugefügt und man schüttelt das Gemisch für weitere 20 h bei Raumtemp. Anschließend gibt man 5 mL Piperidin zum Reaktionsgemisch und schüttelt für 5 min bei Raumtemp. Nach dem Absaugen des CPG-Materials über eine Saugfritte wäscht man

nacheinander mit ca. 7 mL Pyridin, 15 mL Methanol und schließlich 20 mL Dichlormethan und trocknet das CPG-Material i. Vak. Danach überführt man es erneut in einen Rundkolben und gibt jeweils 5 mL der Synthesizer-Capping Lösungen A und B⁴ dazu und schüttelt für 2 h bei Raumtemp. Das CPG-Material wird über eine Fritte abgesaugt, mit 15 mL Methanol und 25 mL Dichlormethan gewaschen und i. Vak. getrocknet.

Die Beladung des CPG-Materials kann nach der Methode, wie sie in Kap. 3.1.6 beschrieben ist, ermittelt werden.

Ermittelte Beladung: ~ 35 $\mu\text{mol/g}$

5.3 Synthese und Analytik der Oligonucleotide

Die RNA-Synthesen wurden im 1 μmol - Maßstab an einem Synthesizer der Fa. PerSeptive-Biosystems, Modell Expedite 8905 durchgeführt. Zur Synthese der Oligomere wurden 30 mg des ersten Nucleosids als CPG-Material (Fa. ChemGenes, Beladung ~ 40 $\mu\text{mol/g}$) in leere Einweg-Synthesesäulchen (Fa. GlenResearch) gefüllt. Die sonstigen RNA-Amiditbausteine wurden in Konzentrationen von 0.1 M eingesetzt. Nach beendeter Synthese wurde die DMTr-Schutzgruppe des letzten Nucleosidbausteins abgespalten (DMTr-Off Programm). Anschließend wurde das kurzzeitig i. Vak. getrocknete CPG-Material mit dem synthetisierten RNA-Oligomer in ein 5 mL Röhrchen der Fa. Greiner überführt, mit ca. 800 μL eines Ammoniak/Ethanol-Gemisches überschichtet, gevortext und ü. N. bei 40°C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und in ein frisches 5 mL Röhrchen pipettiert. Man engte in der Speed-Vac ü.N. bis zur Trockne ein und gab 300 μL folgendes Gemisches hinzu: 300 μL 1-Methyl-2-pyrrolidon, 150 μL Triethylamin, 200 μL Triethylamin Trihydrofluorid. Nach mehrmaligem Vortexen wurde das Gemisch für 90 min bei 60°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemp. wurden 1.4 mL *n*-Butanol zugesetzt, geschüttelt und für 1 h bei -80°C gestellt. Schließlich wurde in der Zentrifuge die RNA pelletiert (0°C, 12500 rpm, 30 min). Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde das RNA-Pellet in leichtem Argonstrom getrocknet und in 200 μL 1-Methyl-2-pyrrolidon und 200 μL

⁴ CAP A: THF / Acetanhydrid; CAP B: THF / 1-Methylimidazol / Pyridin; Proligo Biochemie GmbH, Hamburg

sterilem Wasser gelöst. Nachfolgend wurde das RNA-Oligomer mittels Anionenaustausch-HPLC gereinigt.

Die Aufreinigung des synthetisierten RNA-Oligonucleotids erfolgte an einer HPLC der Fa. Jasco, Modell 980. Die Trennungen erfolgten an einer semipräparativen AE-Säule der Fa. Dionex, Model NucleoPac PA 100 (Säulendimensionen 250 x 9 mL) mit einer Flussrate von 5 mL/min. Es wurden lineare Gradienten von 0 % bis 70 % Puffer B in Puffer A (in 40 min) verwendet; Puffer A: DEPC-H₂O (pH = 8.0), Puffer B: 1 M LiCl in Puffer A (pH = 8.0).

Die Detektion erfolgte am UV-Detektor (Modell: UV-970, Fa. Jasco) bei $\lambda = 260$ nm.

Sämtliche Produktfraktionen wurden mittels Sephadex PD10 G-25-Säulchen der Fa. GE Healthcare entsalzt.

Zur Bestimmung der RNA-Menge wurde die optische Dichte bei $\lambda = 260$ nm ermittelt. Hierfür wurde die entsalzte RNA-Probe in 1 mL DEPC-Wasser (pH = 8.0) gelöst. 10 μ L dieser Lösung wurden in einer Quarzküvette mit der Schichtdicke $d = 10$ mm mit DEPC-Wasser (pH = 8.0) auf 1 mL Gesamtmenge aufgefüllt. Man ermittelte die Extinktion dieser Lösung an einem UV-Photometer der Fa. Hitachi (Modell I-MA-08/15) und multipliziert den angezeigten Wert mit dem Verdünnungsfaktor (100). Auf diese Weise erhielt man die RNA-Menge der jeweiligen Probe als OD₂₆₀. Für eine exakte Bestimmung der Konzentration lässt sich dieser Wert mit dem molaren Extinktionskoeffizienten umrechnen.

Da der molare Extinktionskoeffizient in erster Linie von der Extinktion der Nucleobase abhängt fanden im Rahmen dieser Arbeit keine Berechnungen der molaren Extinktionskoeffizienten der 2'-O-modifizierten Nucleosid-Bausteine statt; vielmehr wurde als gute Näherung für den 4,6-Difluorbenzimidazol-Baustein der molare Extinktionskoeffizient von Guanosin herangezogen.^[87, 90]

UV-Schmelzkurven wurden an einem UV-/VIS Spektralphotometer der Fa. Jasco mit thermostatisierbarem Küvettenhalter gemessen. Es wurde ein Phosphatpuffer mit folgender Zusammensetzung verwendet: 140 mM Natriumchlorid, 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 10 mM Natriumdihydrogenphosphat gelöst in sterilem DEPC-Wasser, pH = 7.0.

Zur Herstellung von sterilem Wasser wurde 1 L Millipore-Wasser mit 1 mL Diethylpyrocarbonat versetzt und ü. N. stehengelassen. Anschließend wird die Lösung autoklaviert und der pH-Wert wird je nach Bedarf (i. d. Regel. pH = 8.0) eingestellt.

Bei jeder UV-Messung wurde als Referenz eine Küvette mit 1 mL Phosphatpuffer befüllt und als Hintergrundmessung abgeglichen (Background). Zur Messung eines Modifizierten RNA-12mers wurden in eine Quarzküvette mit der Schichtdicke $d = 10$ mm mit 1 mL Phosphat-

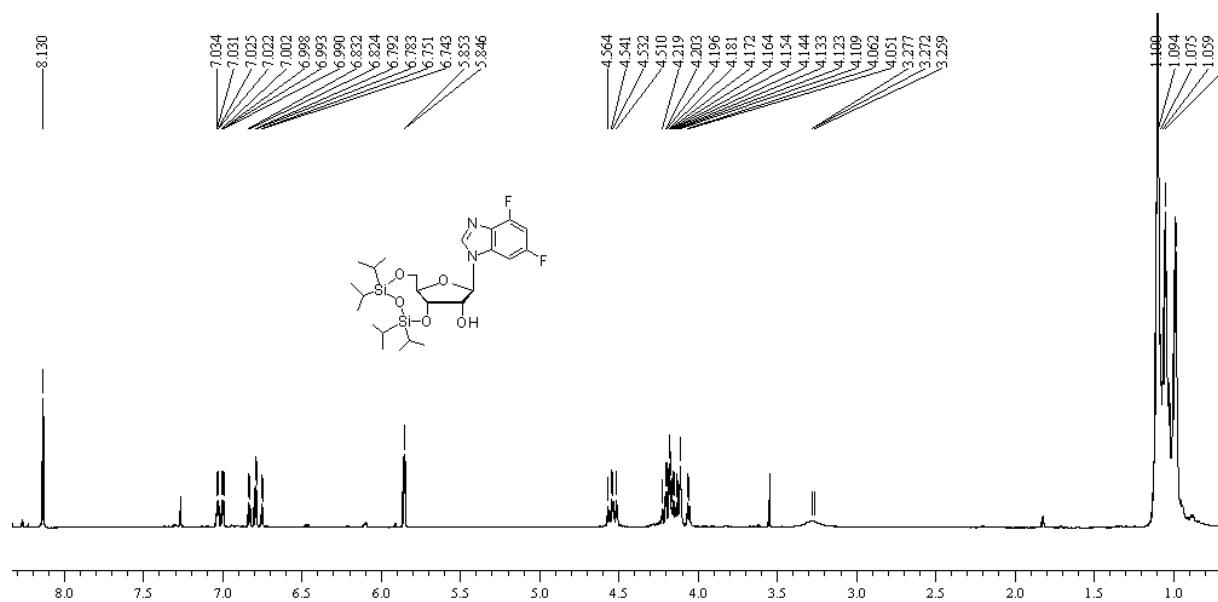
puffer gefüllt. Nach erfolgtem Nullabgleich mit dem Background wurden 0.25 OD₂₆₀ des modifizierten Stranges in die Meßküvette pipettiert; anschließend wurde eine äquivalente Menge des komplementären Gegenstranges (entweder **U1** oder **A1**, vgl. Tab. 1 bzw. 2) dazupipettiert. Nach dem Verschließen der Küvette wurde das Programm zur Duplexbildung gestartet. Hierbei wurden die Proben für 10 min auf 80°C erhitzt und anschließend durch Abkühlen mit 5°C/min renaturiert. Anschließend wurden die renaturierten Proben auf ca. 0°C abgekühlt (hierbei wurde die Probenkammer mit Stickstoff gespült, um eine Kondensation der Luftfeuchtigkeit und dadurch bedingte Meßungenauigkeiten zu vermeiden) und das Messprogramm wurde gestartet. Nun wurden die Proben langsam (0.5°C/min) auf eine Maximaltemperatur von 60°C geheizt, wobei automatisch alle 30 sec die Extinktion der Probe aufgezeichnet wurde. Für sämtliche Proben wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die Aufzeichnungen der CD-Spektren erfolgte an einem Spektropolarimeter der Fa. Jasco (Modell J-710). Dieses war mit einem thermostatisierten Küvettenhalter (Neslab RTE-100) ausgerüstet. Die Messungen erfolgten mit den bereits für die UV-Spektroskopie eingesetzten Proben. Zur Auswertung der Spektren wurde die Software Standard-Analysis Ver. 1.3.3 der Fa. Jasco eingesetzt. Zur Messung der wellenlängenabhängigen Spektren wurden jeweils fünf Spektren im Bereich von 350 nm bis 200 nm akkumuliert. Es wurden folgende Geräteeinstellungen verwendet: resolution: 0.2 nm, scan speed: 50 nm/min, response: 1 sec, band width: 1.0 nm.

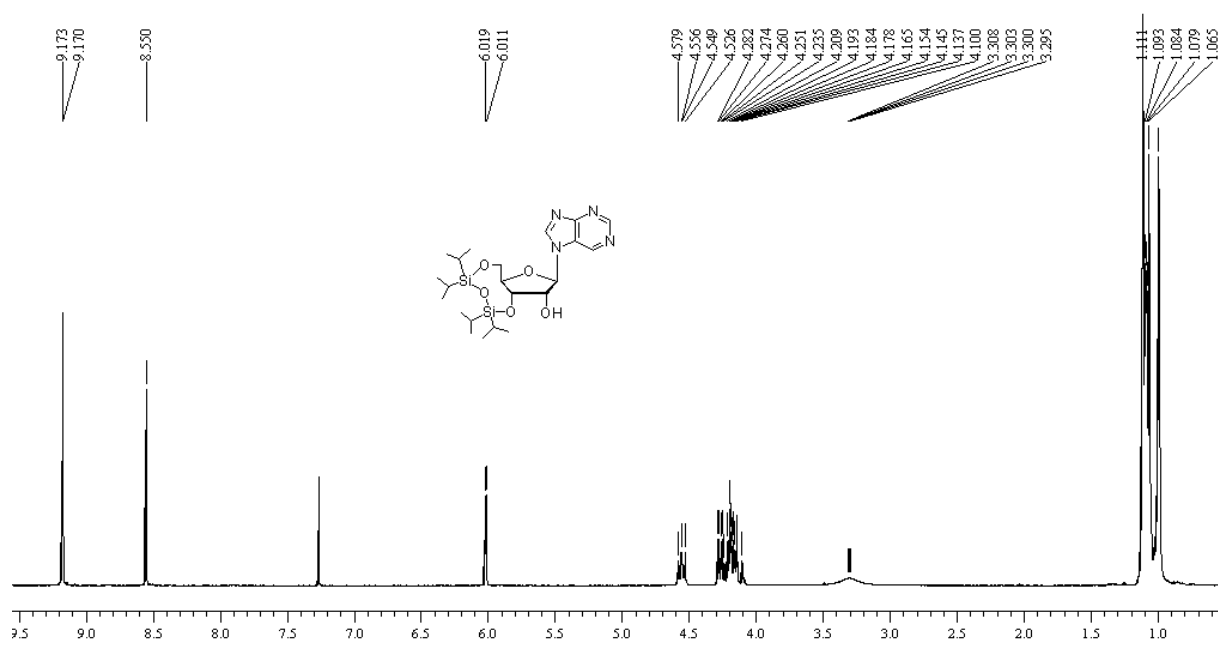
Von den aufgenommenen Spektren wurde jeweils ein Backgroundspektrum, das den verwendeten Phosphatpuffer (s.o.) bei gleicher Temperatur enthielt, subtrahiert. Die erhaltenen Kurven wurden mittels Software geglättet („noise reduction“).

6 Anhang

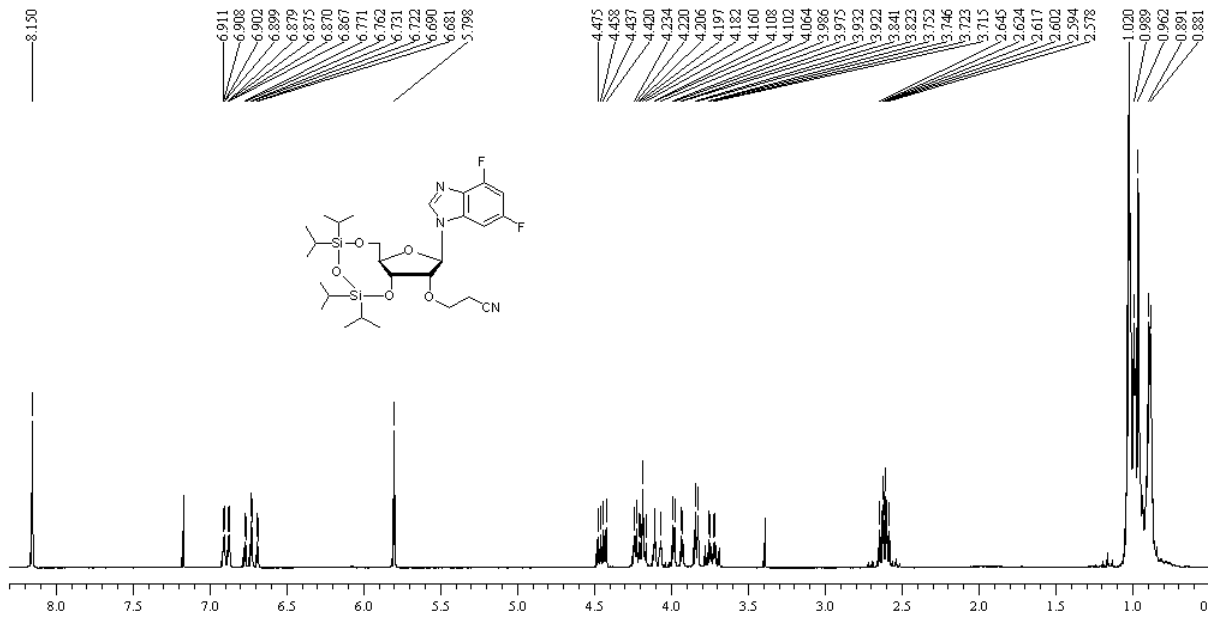
6.1 Spektrenanhang



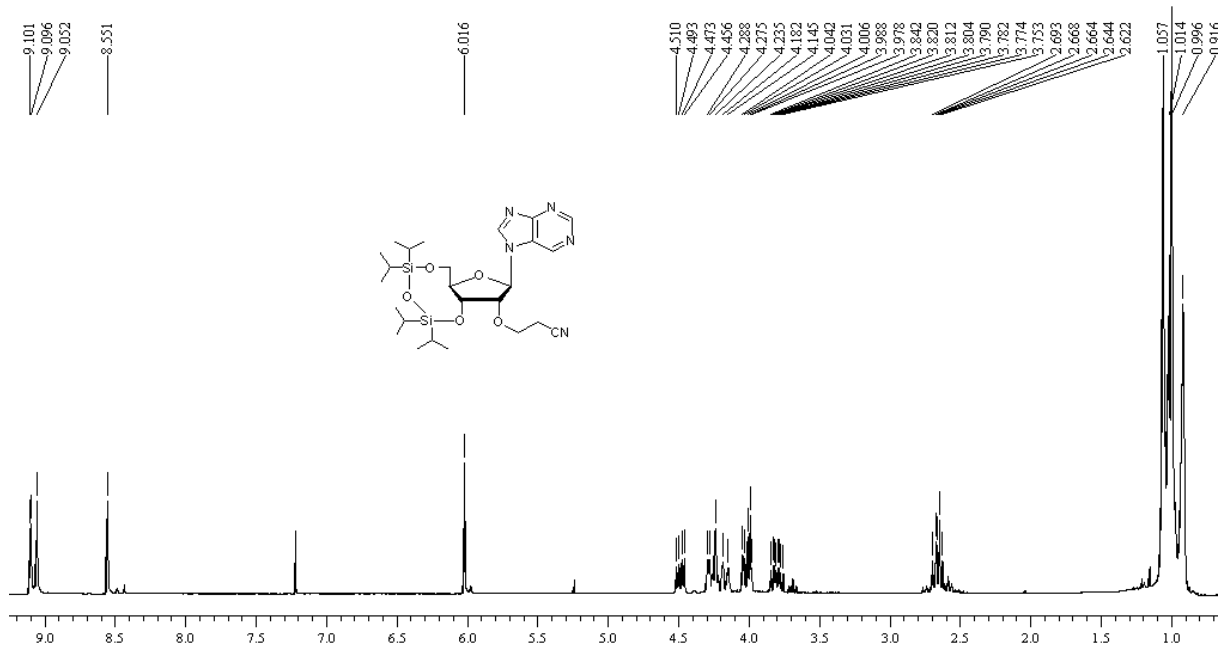
¹H-NMR-Spektrum von **54** (250 MHz, CDCl₃)



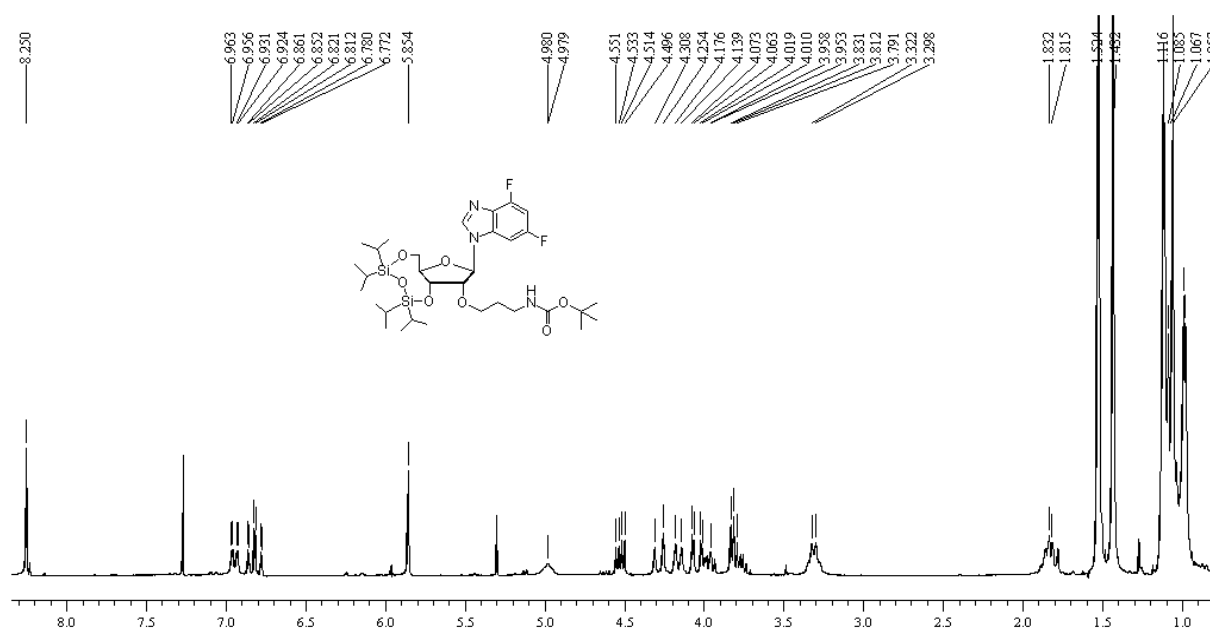
¹H-NMR-Spektrum von **55** (400 MHz, CDCl₃)



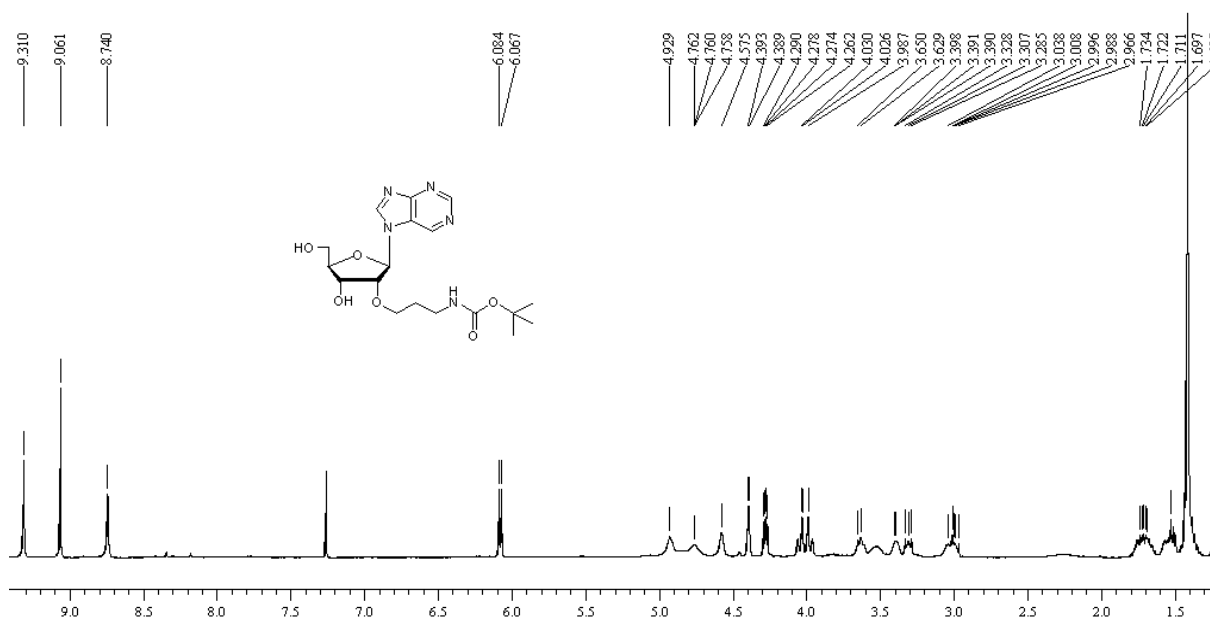
¹H-NMR-Spektrum von **72** (400 MHz, CDCl₃)



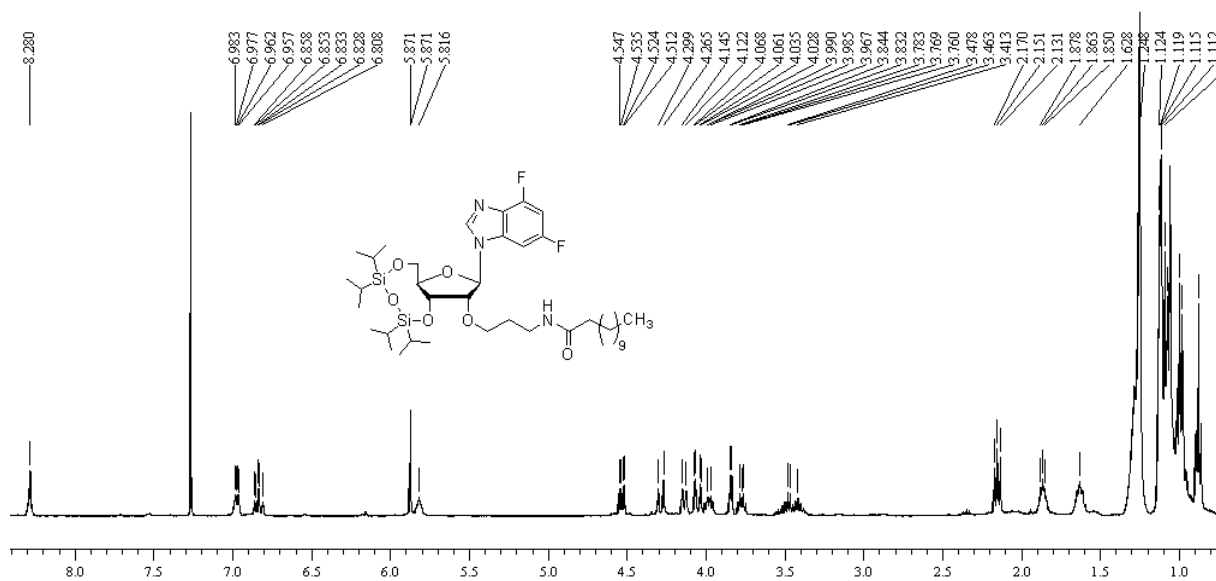
¹H-NMR-Spektrum von **73** (400 MHz, CDCl₃)



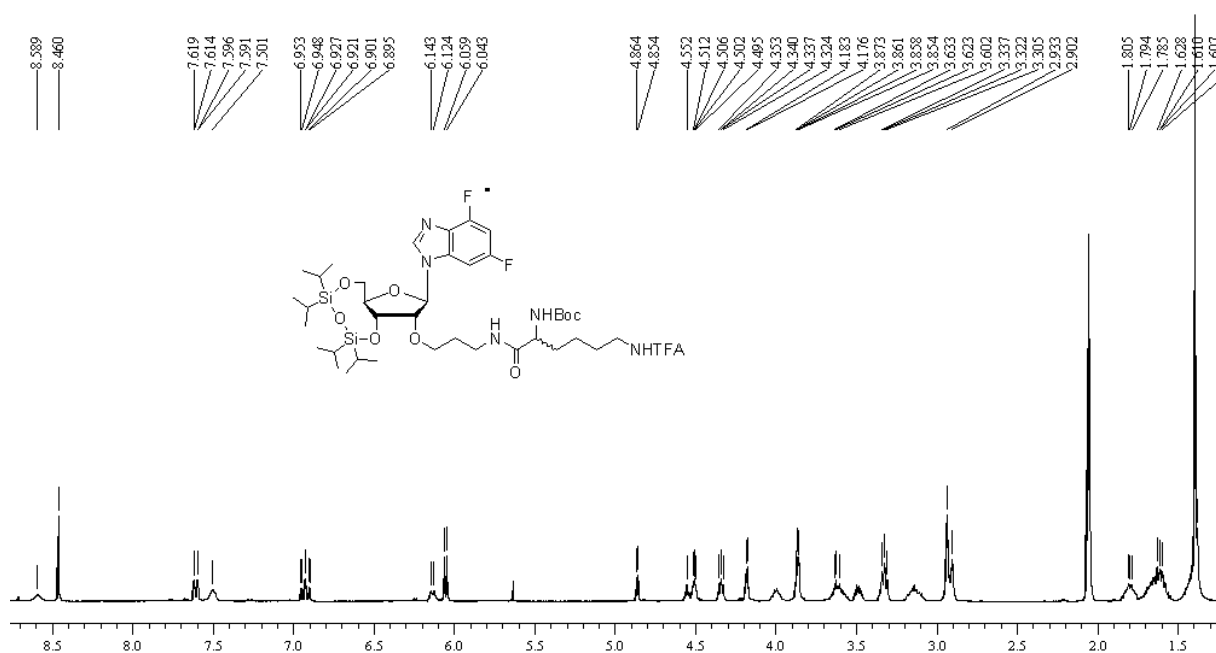
$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **103** (400 MHz, CDCl_3)



$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **108** (400 MHz, CDCl_3)



$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **99** (250 MHz, CDCl_3)



$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **89** (250 MHz, CDCl_3)

6.2 Abkürzungsverzeichnis

Verwendete Abkürzungen:

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ac	Acetyl-
Ac ₂ O	Acetanhydrid
AcOH	Essigsäure
Arg	Arginin
arom.	aromatisch
Bp	Basenpaar
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-
br s	breites Singulett
BSA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)acetamid
°C	Grad Celsius
C	Cytidin
c	Konzentration
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CD	Circularer Dichroismus
CEPA-Cl	2-Cyanoethyl-diisopropylchlorphosphoramidit
CPG	controlled-pore-glass
ca.	circa
d, dd	Dublett, Dublett vom Dublett
δ	chemische Verschiebung
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
dest.	destilliert
DFBi	Difluorbenzimidazol
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid

DIPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTr	4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl-
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dsRNA	doppelsträngige RNA
dt	Dublett von Triplett
ESI-MS	Electrospray-Ionisation-Massenspektrometrie
<i>et al.</i>	et alii
Et	Ethyl-
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
G	Guanosin
g	Gramm
ges.	gesättigt
h	Stunde
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
i. Hochvak.	im Hochvakuum
i. Vak.	im Vakuum
J	Kopplungskonstante
kDa	Kilodalton
konz.	konzentriert
λ	Wellenlänge
LCAA	Long-chain-aminoalkyl
Lsg.	Lösung
Lys	Lysin
M	Molarität
m	multipllett

mRNA	messenger-RNA
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight
Me	Methyl-
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MW	Mikrowellenreaktion
NMR	Nuclear magnetic resonance
nt	Nucleotid
OD	Optische Dichte
ppm	parts per million
q	quartett
quant.	quantitativ
R	Rest
R _f	Retentionsfaktor für Dünnschichtchromatogramme
RP	Reverse phase
R _t	Retentionszeit
Raumtemp.	Raumtemperatur
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonucleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
s	Singulett
Schmp.	Schmelzpunkt
Sdp.	Siedepunkt
SG	Schutzgruppe
siRNA	small-interfering RNA
sog.	so genannte
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
t	Triplett
<i>tert</i>	tertiär

<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl-
THF	Tetrahydrofuran
TiPDS	1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxandichlorid
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	RNA-Interferenz
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl-
T _m	Schmelztemperatur
U	Uridin
UV	Ultraviolett
ü. N.	über Nacht
vgl.	vergleiche
wässr.	wässrig
z.B.	zum Beispiel

6.3 Literaturverzeichnis

- [1] J. Kurreck, *Therapeutic Oligonucleotides*, RSC Publishing, **2008**.
- [2] G. Hartmann, S. Endres, „Therapeutische Oligonucleotide“ *Dtsch Ärztebl* **2003**, *100*, 3102-3108.
- [3] J. Kurreck, „Antisense Technologies: Improvement through novel chemical modifications“ *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1628-1644.
- [4] P. C. Zamecnik, M. L. Stephenson, „Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 280-284.
- [5] S. T. Crooke, „Molecular mechanisms of action of antisense drugs“ *Biochimica Biophysica Acta* **1999**, *1489*, 31-44.
- [6] E. Wickstrom, „Oligodeoxynucleotide stability in subcellular extracts and culture media“ *J. Biochem. Biophys. Methods* **1986**, *13*, 97-102.
- [7] S. Akhtar, M. D. Hughes, A. Khan, J. Double, M. Hussain, Q. Nawaz, M. Bibby, P. Sayyed, „The delivery of antisense therapeutics“ *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, *44*, 3-21.
- [8] A. J. Hudson, N. Normand, J. Ackroyd, S. Akhtar, „Cellular delivery of hammerhead ribozymes conjugated to a transferrin receptor antibody“ *Int. J. Pharm.* **1999**, *182*, 49-58.
- [9] M. Manoharan, „RNA interference and chemically modified siRNAs“ *Nucleic Acids Research Suppl* **2003**, *3*, 115-116.
- [10] F. Eckstein, „Phosphorothioate oligonucleotides“ *Antisense Nucleic Acids Drug Dev.* **2000**, *10*, 297-370.
- [11] J. M. Campbell, T. A. Baco, E. Wickstrom, „Oligodeoxynucleoside phosphorothioate stability in subcellular extracts, culture media, sera and cerebrospinal fluid“ *J. Biochem. Biophys. Methods* **1990**, *20*, 259-267.
- [12] S. T. Crooke, „Progress in antisense technology: the end of the beginning“ *Methods Enzymol.* **2000**, *313*, 3-45.
- [13] A. A. Levin, „A review of issues in the pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate antisense oligonucleotides“ *Biochimica Biophysica Acta* **1999**, *1489*, 69-84.
- [14] T. R. Cech, „RNA as an enzyme“ *Biochem. Int.* **1989**, *18*, 7-14.
- [15] T. R. Cech, „Catalytic RNA: Structure and Mechanism“ *Biochem Soc Trans* **1993**, *21*, 229-234.
- [16] O. C. Uhlenbeck, „A Small Catalytic Oligoribonucleotide“ *Nature* **1987**, *328*, 596-600.
- [17] J. Haseloff, W. L. Gerlach, „Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities“ *Nature* **1988**, *334*, 585-591.
- [18] S. Altman, „RNA enzyme-directed gene therapy“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, *90*, 10898-10900.
- [19] S. Schubert, J. Kurreck, „Ribozyme- and deoxyribozyme strategies for medical application“ *Curr. Drug. Targets* **2004**, *5*, 667-682.
- [20] M. J. Fedor, J. R. Williamson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 399-413.
- [21] G. J. Hannon, „RNA interference“ *Nature* **2002**, *418*, 244-251.
- [22] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, „Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*“ *Nature* **1998**, *391*, 806-811.

- [23] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, „Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells“ *Nature* **2001**, *411*, 494-498.
- [24] O. Voinnet, „RNA silencing as a plant immune system against viruses“ *Trends Genet.* **2001**, *17*, 449-459.
- [25] S. Mondal, „RNA Interference-Towards RNA becoming a medicine“ *Resonance* **2003**, 42-49.
- [26] P. D. Zamore, T. Tuschl, B. A. Sharp, D. P. Bartel, „RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals“ *Cell* **2000**, *101*, 25-33.
- [27] S. M. Elbashir, J. Harborth, T. Tuschl, „RNA interference is mediated by 21 and 22 nt RNAs“ *Genes Dev* **2001**, *15*, 188-200.
- [28] S. M. Hammond, E. Bernstein, D. Beach, G. J. Hannon, „An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells“ *Nature* **2000**, *404*, 293-296.
- [29] J. Martinez, T. Tuschl, „RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease“ *Genes Dev* **2004**, *18*, 975-980.
- [30] T. Tuschl, A. Borkhardt, „Small interfering RNAs: A revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy“ *Mol Interv* **2002**, *2*, 158-167.
- [31] G. Meister, T. Tuschl, „Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA“ *Nature* **2004**, *431*, 343-349.
- [32] T. Tuschl, „RNA interference and small interfering RNAs“ *ChemBioChem* **2001**, *2*, 239-245.
- [33] M. Stevenson, „Therapeutic Potential of RNA Interference“ *N. Engl. J. Med.* **2004**, *351*, 1772-1777.
- [34] J. Kurreck, „RNA-Interferenz als antivirale Strategie“ *Biospektrum* **2007**, *13*, 265-267.
- [35] J. R. Bertrand, M. Pottier, A. Vekris, P. Opolon, A. Meaksimenco, C. Malvy, „Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo“ *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *296*, 1000-1004.
- [36] M. Sioud, „Therapeutic siRNAs“ *Trends Pharm. Sci.* **2004**, *25*, 22-28.
- [37] D. Bumcrot, M. Manoharan, D. W. Y. Sah, „RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs“ *nature chemical biology* **2006**, *2*, 711-719.
- [38] M. Manoharan, „RNA interference and chemically modified small interfering RNAs“ *Curr. Op. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 570-579.
- [39] Y. Dorsett, T. Tuschl, „siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics“ *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 318-329.
- [40] J. Yano, „Antitumor Activity of Small Interfering RNA/Cationic Liposome Complex in Mouse Models of Cancer“ *Clin. Cancer. Res.* **2004**, *10*, 7721-7726.
- [41] C. Wolfrum, S. Shi, K. N. Jayaprakash, M. Jayaraman, G. Wang, R. K. Pandey, K. G. Rajeev, T. Nakayama, K. Chariise, E. Ndungo, T. Zimmermann, V. Koteliansky, M. Manoharan, M. Stoffel, „Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs“ *Nature Biotechnology* **2007**, *25*, 1149-1157.
- [42] I. R. Gilmore, S. P. Fox, A. J. Hollins, S. Akhtar, „Delivery Strategies for siRNA-mediated Gene Silencing“ *Current Drug Delivery* **2006**, *3*, 147-155.
- [43] M. Li, J. J. Rossi, „Approaches for chemically synthesized siRNA and vector-mediated RNAi“ *Methods Mol. Biol.* **2005**, *309*, 261-272.
- [44] J. Soutschek, „Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs“ *Nature* **2004**, *432*, 173-178.

- [45] M. Sioud, „Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization“ *J. Mol. Biology* **2005**, *348*, 1079-1090.
- [46] A. D. Judge, V. Sood, J. R. Shaw, D. Fang, K. McClintock, I. MacLachlan, „Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA“ *Nature Biotechnology* **2005**, *23*, 457-462.
- [47] C. Lorenz, P. Hadwiger, M. John, H. P. Vornlocher, C. Unverzagt, „Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells“ *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4975-4977.
- [48] A. Muratovska, M. R. Eccles, „Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells“ *FEBS Lett.* **2004**, *558*, 63-68.
- [49] A. L. Jackson, J. Burchard, D. Leake, A. Reynolds, J. Schelter, J. Guo, J. M. Johnson, L. Lim, K. Nicholds, W. Marshall, A. Khvorova, P. S. Linsley, „Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing“ *RNA* **2006**, *12*, 1197-1205.
- [50] D. DePaula, M. V. Bentley, R. I. Mahato, „Hydrophobization and bioconjugation for enhanced siRNA delivery and targeting“ *RNA* **2007**, *13*, 431-456.
- [51] D. P. Bartel, „MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function“ *Cell* **2004**, *116*, 281-297.
- [52] B. P. Lewis, C. B. Burge, D. P. Bartel, „Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets“ *Cell* **2005**, *120*, 15-20.
- [53] D. S. Schwarz, „Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex“ *Cell* **2003**, *115*, 199-208.
- [54] J. Harborth, S. M. Elbashir, K. Vandenburgh, H. Manninga, S. A. Scaringe, K. Weber, T. Tuschl, „Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing“ *Antisense Nucleic Acids Drug Dev.* **2003**, *13*, 83-105.
- [55] A. H. S. Hall, J. Wan, E. E. Shaughnessy, B. Ramsay Shaw, K. A. Alexander, „RNA interference using boranophosphate siRNAs: structure–activity relationships“ *Nucleic Acids Research* **2005**, *32*, 5991-6000.
- [56] H. Y. Zhang, Q. Du, C. Wahlestedt, Z. Liang, „RNA Interference with chemically modified siRNA“ *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 893-900.
- [57] M. Amarzguioui, T. Holen, E. Babaie, H. Prydz, „Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA“ *Nucleic Acids Research* **2003**, *31*, 589-595.
- [58] Y. L. Chiu, T. M. Rana, „siRNA function in RNAi: A chemical modification analysis“ *RNA* **2003**, *9*, 1034-1048.
- [59] J. W. Engels, E. Uhlmann, *Chemistry of oligonucleotides*, Taylor & Francis, **2000**.
- [60] M. Manoharan, „2'-Carbohydrate modifications in antisense oligonucleotide therapy: importance of conformation, configuration and conjugation“ *Biochimica Biophysica Acta* **1999**, 117-130.
- [61] T. P. Prakash, M. Manoharan, A. S. Fraser, A. M. Kawasaki, E. A. Lesnik, S. R. Owens, „Zwitterionic oligonucleotides with 2'-O-[3-(N,N-dimethylamino)propyl]-RNA modification: synthesis and properties“ *Tetrahedron Letters* **2000**, *41*, 4855-4859.
- [62] R. Pattanayek, L. Sethaphong, C. Pan, M. Prhave, T. P. Prakash, M. Manoharan, M. Egli, „Structural Rationalization of a Large Difference in RNA Affinity Despite a Small Difference in Chemistry between Two 2'-O-Modified Nucleic Acid Analog“ *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15006-15007.
- [63] H. Hashimoto, M. G. Nelson, C. Switzer, „Formation of Chimeric Duplexes between Zwitterionic and Natural DNA“ *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4194-4195.

- [64] H. Hashimoto, M. G. Nelson, C. Switzer, „Zwitterionic DNA“ *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7128-7134.
- [65] R. H. Griffey, B. P. Monia, L. L. Cummins, S. Freier, M. J. Greig, C. J. Guinasso, E. A. Lesnik, S. M. Manalili, V. Mohan, S. R. Owens, B. R. Ross, H. Sasmor, E. Wancewicz, K. Weiler, P. D. Wheeler, P. D. Cook, „2'-O-Aminopropyl Ribonucleotides: A Zwitterionic Modification that Enhances the Exonuclease Resistance and Biological Activity of Antisense Oligonucleotides“ *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 5100-5109.
- [66] T. P. Prakash, A. Puschl, E. A. Lesnik, V. Mohan, V. Tereshko, M. Egli, M. Manoharan, „2'-O-[2-(Guanidinium)ethyl]-Modified Oligonucleotides: Stabilizing Effect on Duplex and Triplex Structures“ *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1971-1974.
- [67] B. Cuenoud, F. Casset, D. Hüsken, P. Martin, H. E. Moser, „Dual Recognition of Double-Stranded DNA by 2prime-Aminoethoxy-Modified Oligonucleotides“ *Angewandte Chemie Int. Ed.* **1998**, *37*, 1288-1291.
- [68] I. Velikyan, S. Acharya, A. Trifonova, A. Földesi, J. Chattopadhyaya, „The pKa's of 2'-Hydroxyl Group in Nucleosides and Nucleotides“ *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2893-2894.
- [69] T. S. Zatsepin, E. A. Romanova, T. S. Oretskaya, „Synthesis of 2'-O-alkylnucleosides“ *Russian Chemical Reviews* **2002**, *71*, 513-534.
- [70] S. Jin, C. V. Miduturu, D. C. McKinney, S. K. Silvermann, „Synthesis of Amine- and Thiol-Modified Nucleoside Phosphoramidites for Site-Specific Introduction of Biophysical Probes into RNA“ *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4284-4299.
- [71] H. Saneyoshi, M. Sekine, „A General Method for the Synthesis of 2'-O-Cyanoethylated Oligoribonucleotides Having Promising Hybridization Affinity for DNA and RNA and Enhanced Nuclease Resistance“ *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10453-10460.
- [72] E. V. Kazanova, E. M. Zubin, A. V. Kachalova, D. A. Stetsenko, M. J. Gait, T. S. Oretskaya, „Synthesis of oligonucleotides containing amino acid residues in the 2'-position of ribose moiety“ *Russ. Chem. Bull.* **2007**, *56*, 806-814.
- [73] P. Virta, J. Katajisto, T. Niittymäki, H. Lönnberg, „Solid-supported synthesis of oligomeric bioconjugates“ *Tetrahedron* **2003**, *59*, 5137-5174.
- [74] T. P. Prakash, A. M. Kawasaki, E. A. Lesnik, S. R. Owens, M. Manoharan, „2'-O-[2-(Amino)-2-oxoethyl] Oligonucleotides“ *Org. Lett.* **2003**, *5*, 403-406.
- [75] T. P. Prakash, M. Manoharan, A. M. Kawasaki, E. A. Lesnik, S. R. Owens, G. Vasquez, „2'-O-{2-[N,N-(Dialkyl)aminoxy]ethyl}- Modified Antisense Oligonucleotides“ *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3995-3998.
- [76] H. Saneyoshi, K. Tamaki, A. Ohkubo, K. Seio, M. Sekine, „Synthesis and hybridization properties of 2'-O-(tetrazol-5-yl)ethyl-modified oligonucleotides“ *Tetrahedron* **2008**, *64*, 4370-4376.
- [77] S. L. Beaucage, D. E. Bergstrom, D. E. Glick, R. A. Jones, *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, **2003**.
- [78] D. Loakes, „The applications of universal DNA base analogues“ *Nucleic Acids Research* **2001**, *29*, 2437-2447.
- [79] K. M. Guckian, E. Kool, „Hochpräzise Gestaltnachahmung durch ein Difluortoluol-Desoxynucleosid - ein replikationsfähiger Ersatz für Thymidin“ *Angewandte Chemie* **1997**, *109*, 2942-2945.
- [80] D. E. Bergstrom, P. M. Zhang, P. H. Toma, P. C. Andrews, R. Nichols, *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **1993**, *206*, 308.

- [81] D. E. Bergstrom, P. M. Zhang, P. H. Toma, P. C. Andrews, R. Nichols, „Synthesis, Structure, and Deoxyribonucleic Acid Sequencing with a Universal Nucleoside: 1-(2'-Deoxy- β -D-ribofuranosyl)-3-nitropyrrole“ *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1201-1209.
- [82] R. Nichols, P. C. Andrews, P. M. Zhang, D. E. Bergstrom, „A universal nucleoside for use at ambiguous sites in DNA primers“ *Nature* **1994**, *369*, 492-493.
- [83] D. Loakes, D. M. Brown, „5-Nitroindole as an universal base analogue“ *Nucleic Acids Research* **1994**, *22*, 4039-4043.
- [84] F. Seela, W. Bourgeois, H. Rosemeyer, T. Wenzel, „Synthesis of 4-substituted 1H benzimidazole 2'-deoxynucleosides and utility of the 4-nitro compound as universal base“ *Helv. Chim. Act.* **1995**, *79*, 488-498.
- [85] A. Okamoto, K. Tainaka, I. Saito, „A facile incorporation of the aldehyde function into DNA: 3-formylindole nucleoside as an aldehyde-containing universal nucleoside“ *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 4581-4583.
- [86] G. A. Millican, G. A. Mock, M. A. Chauncey, T. P. Patel, M. A. W. Eaton, J. Gunning, S. T. Cutbush, S. Neidle, J. Mann, „Synthesis and biophysical studies of short oligodeoxynucleotides with novel modifications: a possible approach to the problem of mixed base oligodeoxynucleotide synthesis“ *Nucleic Acids Research* **1984**, *12*, 7435-7453.
- [87] J. Parsch, Dissertation, Goethe-Universität (Frankfurt), **2001**.
- [88] A. Somoza, J. Chelliserrykattil, E. Kool, „The roles of hydrogen bonding and sterics in RNA interference“ *Angewandte Chemie Int. Ed.* **2006**, *45*, 4994-4997.
- [89] A. Zivkovic, Dissertation, Goethe-Universität (Frankfurt), **2005**.
- [90] A. Klöpffer, Dissertation, Goethe-Universität (Frankfurt), **2004**.
- [91] J. Bozilovic, Dissertation, Goethe-Universität (Frankfurt), **2008**.
- [92] O. Brake, B. Berkhout, in *Therapeutic Oligonucleotides* (Ed.: J. Kurreck), RSC Publishing, **2008**, pp. 296-310.
- [93] D. Boden, O. Pusch, F. Lee, L. Tucker, B. Ramratnam, „Human Immunodeficiency Virus Type 1 Escape from RNA Interference“ *Journal of Virology* **2003**, *77*, 11531-11535.
- [94] A. T. Das, W. R. Brummelkamp, E. M. Westerhout, M. Vink, M. Madiredjo, R. Bernards, B. Berkhout, „Human Immunodeficiency Virus Type 1 Escapes from RNA Interference-Mediated Inhibition“ *Journal of Virology* **2004**, *78*, 2601-2605.
- [95] A. Zivkovic, J. W. Engels, „RNA recognition by Fluor-Aromatic substituted“ *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2005**, *24*, 1023-1027.
- [96] A. Klöpffer, J. W. Engels, „Synthesis and purification of fluorinated Benzimidazole and Benzene Nucleoside-5'-Triphosphates“ *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2005**, *24*, 651-654.
- [97] J. Parsch, T. J. Lehmann, T. Strube, J. W. Engels, „Fluorine Substituted DNA and RNA“ *Coll. Sympos. Ser.* **2002**, *5*, 245-250.
- [98] J. Parsch, J. W. Engels, „C-F...H-C Hydrogen Bonds in Ribonucleic Acids“ *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5664-5672.
- [99] J. Parsch, J. W. Engels, „Synthesis of Fluorobenzene and Benzimidazole Nucleic-Acid Analogues and Their Influence on Stability of RNA Duplexes“ *Helv. Chim. Act.* **2000**, *83*, 1793-1808.
- [100] A. Klöpffer, J. W. Engels, „Synthesis of 2'-Aminoalkyl-Substituted Fluorinated Nucleobases and Their Influence on the Kinetic Properties of Hammerhead Ribozymes“ *ChemBioChem* **2004**, *5*, 707-716.
- [101] G. C. Finger, „Aromatic Fluorine Compounds. V. 1,3,5-Trifluorobenzene“ *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 153-155.

- [102] K. L. Kirk, L. A. Cohen, „Synthesis of some fluoronitrobenzimidazoles and their reactivities toward peptide nucleophiles“ *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 384-389.
- [103] H. Rosemeyer, „The chemodiversity of purine as constituent of natural products“ *Chemistry & Biodiversity* **2004**, *1*, 361-401.
- [104] H. Vorbrüggen, „A new simplified nucleoside synthesis“ *Chem.Ber.* **1981**, *114*, 1279-1286.
- [105] H. Vorbrüggen, K. Krolkiewicz, B. Bennua, „Nucleoside synthesis with trimethylsilyl triflate and perchlorate as catalysts“ *Chem.Ber.* **1981**, *114*, 1234-1255.
- [106] N. Nikolaus, J. Bozilovic, J. W. Engels, „Microwave-assisted Vorbrüggen Ribosylation reaction“ *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2007**, *26*, 889-892.
- [107] W. K.A., M. P. Kotick, J. J. Fox, „Synthetic Studies on Nucleoside Antibiotics. 1. Synthesis of 1-(4-Amino-4-deoxy- β -D-glucopyranosyl) cytosines and Their Identity with Products derived from Gougerotin“ *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1969**, *17*, 416-418.
- [108] M. J. Gait, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, **1984**.
- [109] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, „Deoxynucleoside phosphoramidites – a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis“ *Tetrahedron Letters* **1981**, *22*, 1859-1862.
- [110] S. L. Beaucage, R. P. Iyer, „Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach“ *Tetrahedron* **1992**, *48*, 2223-2311.
- [111] S. L. Beaucage, R. P. Iyer, „The Synthesis of Modified Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach and their Applications“ *Tetrahedron* **1993**, *49*, 6123-6194.
- [112] N. D. Sinha, J. Biernat, H. Köster, „ β -cyanoethyl N, N-dialkylamino/N-morpholinomonochloro Phosphoramidites, New Phosphitylating Agent Facilitating Ease of Deprotection and Work-Up of Synthesized Oligonucleotides“ *Tetrahedron Letters* **1983**, *24*, 5843-5846.
- [113] F. Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, **1991**.
- [114] M. Smith, D. H. Rammler, I. H. Goldberg, H. G. Khorana, „Specific Synthesis of the C3'-C5' Interribonucleotide Linkage. Syntheses of Uridyl-(3'→5')-Uridine and Uridyl-(3'→5')-Adenosine“ *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 430-440.
- [115] H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch, H. G. Khorana, „The Stepwise Synthesis of Specific Deoxyribopolynucleotides (4).2 Protected Derivatives of Deoxyribonucleosides and New Syntheses of Deoxyribonucleoside-3' Phosphates“ *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3821-3827.
- [116] E. F. Fisher, M. H. Caruthers, „Color coded triarylmethyl protecting groups useful for deoxypolynucleotide synthesis“ *Nucleic Acids Research* **1983**, *11*, 1589-1599.
- [117] K. K. Ogilvie, K. L. Sadana, E. A. Thompson, „The use of silyl groups in protecting the hydroxyl functions of ribonucleosides“ *Tetrahedron Letters* **1974**, *15*, 2861-2863.
- [118] K. K. Ogilvie, S. L. Beaucage, A. L. Schiffman, N. Y. Theriault, K. L. Sadana, „The synthesis of oligoribonucleotides. II. The use of silyl protecting groups in nucleoside and nucleotide chemistry“ *Can. J. Chem.* **1979**, *56*, 2768-2780.
- [119] G. H. Hakimelahi, Z. A. Proba, K. K. Ogilvie, „New catalysts and procedures for the dimethoxytritylation and selective silylation of ribonucleosides“ *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 1106-1113.
- [120] S. J. Jones, C. B. Reese, „Migration of *t*-butyldimethylsilyl protecting groups“ *Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1979**, 2762-2764.
- [121] T. Wu, K. K. Ogilvie, „A study on the alkylsilyl groups in oligoribonucleotide synthesis“ *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4717-4724.
- [122] S. W. J. Wozniak, „Antisense & Nucleic Acids“ *Drug. Rev.* **1997**, *7*.

- [123] R. Kierzek, D.W. Kopp, M. Edmonds, M. H. Caruthers, „Chemical synthesis of branched RNA“ *Nucleic Acids Research* **1986**, *14*, 4751-4760.
- [124] W. T. Markiewicz, „Tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl, a Group for Simultaneous Protection of 3'- and 5'-Hydroxy Functions of Nucleosides“ *J. Chem. Res. (S)* **1979**, 24-25.
- [125] C. Brotschi, A. Häberli, C. J. Leumann, „A stable DNA duplex containing a non-hydrogen-bonding, non-shape-complementary base analogue: interstrand stacking as the stability determining factor“ *Angewandte Chemie* **2001**, *113*, 3101-3103.
- [126] H. Saneyoshi, K. Ando, K. Seio, M. Sekine, „Chemical synthesis of RNA via 2'-O-cyanoethylated intermediates“ *Tetrahedron* **2007**, *63*, 11195-11205.
- [127] Y. Furukawa, K. Kobayashi, Y. Kanai, M. Honjo, „Synthesis of 2'-O-Methyluridine, 2'-O-Methylcytidine and Their Relating Compounds“ *Chem. Pharm. Bull.* **1965**, *13*, 1273-1275.
- [128] A. D. Broom, R. K. Robins, „The Direct Preparation of 2'-O-Methyladenosine from Adenosine“ *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 1145-1146.
- [129] K. Yamauchi, K. Nakamura, M. Kinoshita, „Methylation of pyrimidines, the corresponding nucleosides, and inosine with trimethyloxosulfonium hydroxide“ *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 1593-1595.
- [130] K. Yamauchi, T. Tanabe, M. Kinoshita, „Trimethylsulfonium hydroxide: a new methylating agent“ *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 638-639.
- [131] B. E. Griffin, C. B. Reese, G. F. Stephenson, D. R. Trentham, „Oligoribonucleotide synthesis from nucleoside 2'-benzyl ethers“ *Tetrahedron Letters* **1966**, *7*, 4349-4354.
- [132] R. Schwesinger, *Chimia* **1985**, *39*, 269-270.
- [133] E. Ohtsuka, S. Tanaka, M. Ikehara, „Synthesis of Ribooligonucleotides using a Photosensitive o-Nitrobenzyl Protection for the 2'-Hydroxyl Group“ *Chem. Pharm. Bull.* **1977**, *25*, 949-959.
- [134] J. Yano, L. S. Kan, P. O. P. Ts'o, „A Simple Method of the preparation of 2'-O-Methyladenosine“ *Biochimica Biophysica Acta* **1980**, *629*, 178-183.
- [135] D. Bumcrot, M. Manoharan, V. Koteliansky, D. W. Y. Sah, „RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs“ *nature chemical biology* **2006**, *2*, 711-719.
- [136] D. Odadzic, J. B. Bramsen, R. Smicius, C. Bus, J. Kjems, J. W. Engels, „Synthesis of 2'-O-modified Adenosine Building Blocks and application for RNA Interference“ *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 518-529.
- [137] O. Mitsunobu, J. Kimura, Y. Fujisawa, „Selective Acylation of 5'-Hydroxyl Group of Thymidine“ *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1972**, *45*, 245-247.
- [138] R. Smicius, J. W. Engels, „Preparation of Zwitterionic Ribonucleoside Phosphoramidites for Solid-Phase siRNA Synthesis“ *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4994-5002.
- [139] T. R. Krishna, N. Jayaraman, „Synthesis of Poly(propyl ether imine) Dendrimers and Evaluation of Their Cytotoxic Properties“ *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9694-9704.
- [140] M. Imazawa, F. Eckstein, „Facile synthesis of 2'-amino-2'-deoxyribofuranosylpurines“ *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 2039-2041.
- [141] F. Benseler, D. M. Williams, F. Eckstein, „Synthesis of Suitably-protected Phosphoramidites of 2'-Fluoro-2'-Deoxyguanosine and 2'-Amino-2'-Deoxyguanosine for Incorporation into Oligoribonucleotides“ *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **1992**, *11*, 1333-1351.
- [142] G. Rousselet, C. P., M. Maumy, „Conversion of Nitriles into tertiary Amines“ *Org. Syn. Coll.* **1999**, *76*, 133-136.
- [143] C. Wörner, R. Mülhaupt, „Polynitrile- and Polyamine-Functional

- Poly(trimethylene imine) Dendrimers“ *Angewandte Chemie Int. Ed.* **1993**, *32*, 1306-1308.
- [144] E. M. M. B.-v. d. Berg, E. W. Meijer, „Poly(propylene imine) Dendrimers: Large-Scale Synthesis by Heterogeneously Catalyzed Hydrogenation“ *Angewandte Chemie Int. Ed.* **1993**, *32*, 1308-1311.
- [145] Y. S. Klausner, M. Bodansky, „Coupling Reagents in Peptide Synthesis“ *Synthesis* **1972**, 453-463.
- [146] W. König, R. Geiger, „Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazolen“ *Chem.Ber.* **1970**, *103*, 788-798.
- [147] L. A. Carpino, A. El-Faham, „The Diisopropylcarbodiimide/1-Hydroxy-7-azabenzotriazole System: Segment Coupling and Stepwise Assembly“ *Tetrahedron* **1999**, *55*, 6813-6830.
- [148] L. A. Carpino, „Advantageous applications of azabenzotriazole (triazolopyridine)-based coupling reagents to solid-phase peptide synthesis“ *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1994**, 201-203.
- [149] L. A. Carpino, „Oxidative Reactions of Hydrazines. II. Isophthalimides. New Protective Groups on Nitrogen“ *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 98-101.
- [150] J. P. Behr, „Photohydrolysis of DNA by Polyaminobenzenediazonium Salts“ *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1989**, 101-103.
- [151] C. W. Tabor, H. Tabor, „Polyamines“ *Annu. Rev. Biochem.* **1984**, *53*, 749-790.
- [152] W. H. Braunlin, T. J. Strick, M. T. Record, „Equilibrium dialysis studies of polyamine binding to DNA“ *Biopolymers* **1982**, *21*, 1301-1314.
- [153] B. G. Feuerstein, N. Pattabiraman, L. J. Marton, „Spermine-DNA Interactions: A Theoretical Study“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **1986**, *83*, 5948-5952.
- [154] L. Jovine, S. Djordjevic, D. Rhodes, „The crystal structure of yeast phenylalanine tRNA at 2.0 angstrom resolution: Cleavage by Mg²⁺ in 15-year old crystals“ *J. Mol. Biology* **2000**, *301*, 401-414.
- [155] E. Voirin, J. P. Behr, M. Kotera, „Versatile synthesis of oligodeoxyribonucleotide-oligospermine conjugates“ *Nature protocols* **2007**, *2*, 1360-1367.
- [156] O. A. A. Ahmed, N. Adjimatera, I. S. Blagbrough, „N₄,N₉-Dioleoyl spermine is a novel non-viral lipopolyamine vector for plasmid DNA formulation“ *Pharmaceutical Research* **2005**, *22*, 972-980.
- [157] B. Pons, M. Kotera, G. Zuber, J. P. Behr, „Online Synthesis of Diblock Cationic Oligonucleotides for Enhanced Hybridization to their Complementary Sequence“ *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1173-1176.
- [158] J. Goodchild, „Conjugates of Oligonucleotides and Modified Oligonucleotides: A Review of Their Synthesis and Properties“ *Bioconjugate Chemistry* **1990**, *1*, 165-187.
- [159] R. Eritja, „Solid-Phase Synthesis of Modified Oligonucleotides“ *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* **2007**, *13*, 53-68.
- [160] D. A. Stetsenko, M. J. Gait, „A Convenient Solid-Phase Method for Synthesis of 3'-Conjugates of Oligonucleotides“ *Bioconjugate Chemistry* **2001**, *12*, 576-586.
- [161] L. De Napoli, G. Di Fabio, J. D'Onofrio, D. Montesarchio, „New Nucleoside-Based Polymeric Supports for the Solid Phase Synthesis of Ribose-Modified Nucleoside Analogues“ *Synlett* **2004**, *11*, 1975-1979.
- [162] J. M. Bofill, F. Albericio, „Understanding the Structure/Reactivity of Aminium/Uronium Salts as Coupling Reagents in Peptide Synthesis“ *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 2641-2644.
- [163] H. Koster, „Polymer Support Oligonucleotide Synthesis VI. Use of Inorganic Carriers“ *Tetrahedron Letters* **1972**, 1527-1530.

- [164] M. J. Damha, P. Giannaris, S. V. Zabarylo, „An improved procedure for derivatization of controlled-pore glass beads for solid-phase oligonucleotide synthesis“ *Nucleic Acids Research* **1990**, *18*, 3813-3821.
- [165] R. T. Pon, *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, Vol. 1*, John Wiley & Sons, New York, **2007**.
- [166] M. Ueki, M. Amemiya, „Removal of 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) group with tetrabutylammonium fluoride“ *Tetrahedron Letters* **1987**, *28*, 6617-6620.
- [167] R. B. Merrifield, „Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide“ *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [168] R. L. Letsinger, J. L. Finnan, G. A. Heaver, W. B. Lunsford, „Phosphite coupling procedure for generating internucleotide links“ *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3278-3279.
- [169] R. L. Letsinger, W. B. Lunsford, „Synthesis of thymidine oligonucleotides by phosphite triester intermediates“ *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 3655-3661.
- [170] H. Gao, B. L. Gaffney, R. A. Jones, „A universal allyl linker for solid-phase synthesis“ *Tetrahedron Letters* **1991**, *32*, 5477-5480.
- [171] L. D. Hansen, E. J. Baca, P. Scheiner, *J. Heterocycle Chem.* **1990**, *7*, 991-995.
- [172] B. H. Dahl, J. Nielsen, O. Dahl, „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 Research* **1987**, *15*, 1729-1743.
- [173] J. Stawinski, R. Strömberg, M. Thelin, E. Westman, „Evaluation of the Use of the t-Butyldimethylsilyl Group for 2'-Protection in RNASynthesis via the H-Phosphonate Approach“ *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **1988**, *7*, 779-782.
- [174] R. T. Pon, N. Usman, K. K. Ogilvie, „Derivatization of Controlled Pore Glass Beads for Solid Phase Oligonucleotide Synthesis“ *BioTechniques* **1988**, *6*, 768-775.
- [175] D. Gasparutto, T. Livache, H. Bazin, A. M. Dupla, A. Guy, A. Khorlin, D. Molko, A. Roget, R. Teoule, „Chemical synthesis of a biologically active natural tRNA with its minor bases“ *Nucleic Acids Research* **1992**, *20*, 5159-5166.
- [176] E. Westman, R. Strömberg, „Evaluation of 2'-hydroxyl protection in RNA-synthesis using the H-phosphonate approach“ *Nucleic Acids Research* **1994**, *22*, 2430-2431.
- [177] R. Vinayak, A. Andrus, N. D. Sinha, A. Hampel, „Assay of Ribozyme-Substrate Cleavage by Anion-Exchange High-Performance Liquid Chromatography“ *Anal. Biochemistry* **1995**, *232*, 204-209.
- [178] A. C. Anderson, S. A. Scaringe, B. E. Earp, C. A. Frederick, „HPLC purification of RNA for crystallography and NMR“ *RNA* **1996**, *2*, 110-117.
- [179] F. Lottspeich, J. W. Engels, *Bioanalytik*, 2. Auflage ed., Spektrum Akademischer Verlag, München, **2006**.
- [180] U. Bahr, M. Karas, F. Hillenkamp, „Analysis of Biopolymers by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) Mass Spectrometry“ *Fres. J. Anal. Chem.* **1994**, *348*, 783-791.
- [181] F. Kirpekar, E. Nordhoff, K. Kristiansen, P. Roepstorff, A. Lezius, S. Hahner, M. Karas, F. Hillenkamp, „Matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of enzymatically synthesized RNA up to 150 kDa“ *Nucleic Acids Research* **1994**, *22*, 3866-3870.
- [182] M. C. Fitzgerald, L. M. Smith, „The promise of matrix-assisted laser desorption-ionization (MALDI) mass spectrometry“ *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, *24*, 117-140.
- [183] K. A. Howard, U. L. Rahbek, X. Liu, C. K. Damgaard, S. Z. Glud, M. O. Andersen, M. B. Hovgaard, A. Schmitz, J. R. Nyengaard, F. Besenbacher, J. Kjems, „RNA

- interference in vitro and in vivo using a novel chitosan/siRNA nanoparticle system“ *Mol. Ther.* **2006**, *14*, 476.
- [184] J. D. Puglisi, I. Tinoco, „Absorbance melting curves of RNA“ *Methods Enzymol.* **1989**, *180*, 304-325.
- [185] G. Felsenfeld, S. Z. Hirschman, „A neighbor-interaction analysis of the hypochromism and spectra of DNA“ *J. Mol. Biology* **1965**, *13*, 407-427.
- [186] W. Saenger, *Principles of nucleic acid structure*, Springer Verlag, New York, Berlin, **1984**.
- [187] L. A. Marky, K. J. Breslauer, „Calculating Thermodynamic Data for Transitions of any Molecularity from Equilibrium Melting Curves“ *Biopolymers* **1987**, *26*, 1601-1620.
- [188] T. Xia, S. J., M. E. Burkard, R. Kierzek, S. J. Schroeder, X. Jiao, C. Cox, D. H. Turner, „Thermodynamic Parameters for an Expanded Nearest-Neighbor Model for Formation of RNA Duplexes with Watson-Crick Base Pairs“ *Biochemistry* **1998**, *37*, 14719-14735.
- [189] M. Schweitzer, Dissertation, Goethe-Universität (Frankfurt), **1998**.
- [190] K. Nakanishi, N. Berova, R. W. Woody, *Circular dichroism*, Wiley-VCH, **1994**.
- [191] D. M. Gray, R. L. Ratliff, M. R. Vaughan, „Circular dichroism spectroscopy of DNA“ *Methods Enzymol.* **1992**, *211*, 389-406.
- [192] J. Brahms, „Circular dichroism investigations of the two conformations of polyriboadenylic acid“ *Nature* **1964**, *202*, 797-798.
- [193] J. Brahms, „Optical activity and the conformation of polynucleotide models of nucleic acids“ *J. Mol. Biology* **1965**, *11*, 785-801.
- [194] J. Brahms, J. C. Maurizot, A. M. Michelson, „Conformation and thermodynamic properties of oligocytidylic acids“ *J. Mol. Biology* **1967**, *25*, 456-480.
- [195] J. Brahms, W. F. H. M. Mommaerts, „A study of conformation of nucleic acids in solution by means of circular dichroism“ *J. Mol. Biology* **1964**, *10*, 73-88.
- [196] R. W. Woody, „Circular Dichroism“ *Methods Enzymol.* **1995**, *246*, 34-70.
- [197] T. Müller-Kuller, Dissertation, Goethe-Universität (Frankfurt), **2006**.
- [198] J. Haas, T. Müller-Kuller, S. Klein, J. W. Engels, „RNAi activity of siRNAs modified with 2'-Aminoalkyl-substituted fluorinated nucleobases“ *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2007**, *26*, 865-868.