



Synthese photolabil geschützter Desoxyribonukleoside und  
Anwendung photoaktivierbarer Aptamersequenzen zur  
Regulation von  $\alpha$ -Thrombin

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
**Timo Mack**  
aus Köln

Frankfurt am Main, 2010

(D30)



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

Dekan: Prof. Dr. D. Steinhilber

Erster Gutachter: Prof. Dr. A. Heckel

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

Datum der Disputation: 16. August 2010



*Meinen Eltern*

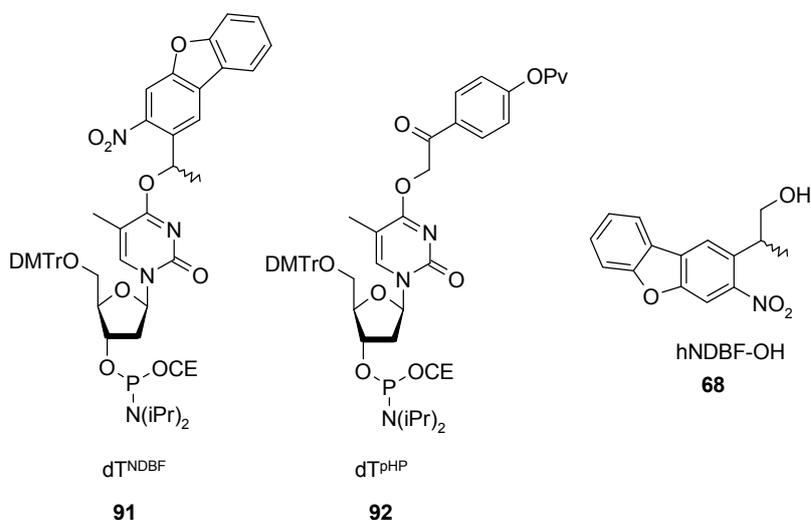


## Zusammenfassung

Innerhalb der letzten 30 Jahre haben sich photoaktivierbare Verbindungen („caged compounds“) zu einem äußerst wertvollen Werkzeug entwickelt. Seit der erstmals publizierten Anwendung von lichtaktivierbarem ATP im Jahre 1978 durch Hoffman *et al.* konnten viele neue Erkenntnisse im Bereich der Physiologie, Molekularbiologie und Biochemie mit Hilfe von photoaktivierbaren Verbindungen gewonnen werden. Hierunter versteht man Substanzen, deren biologische Wirksamkeit temporär inaktiviert ist, jedoch durch Bestrahlung mit Licht wiederhergestellt werden kann. Die Inaktivierung wird durch spezielle, lichtreaktive Chromophore erreicht, sogenannten photolabilen Schutzgruppen („cages“).

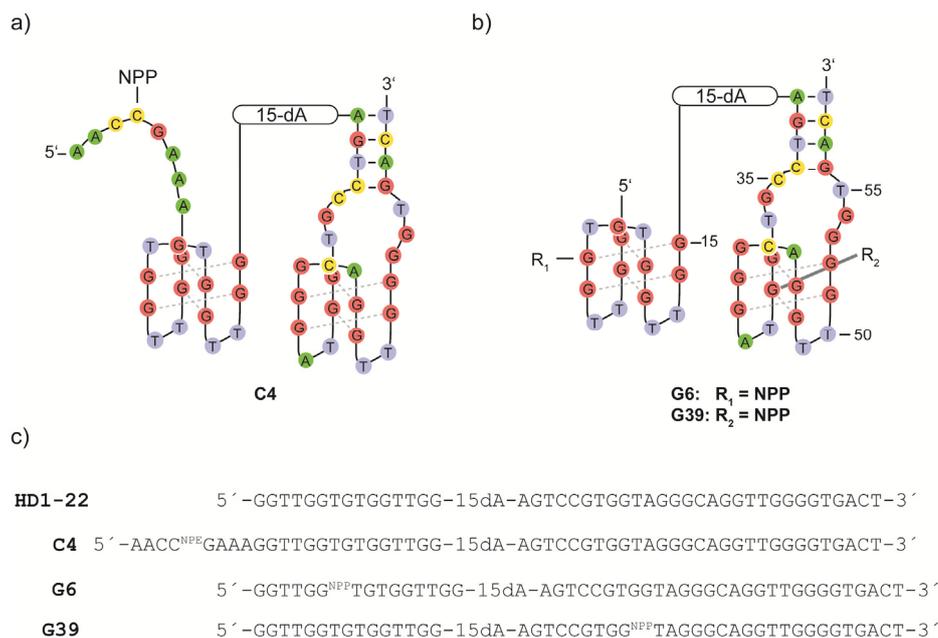
Der Einsatz dieser Technik zur Aktivierung von Nukleinsäuren eröffnet ein weites Feld an Anwendungsmöglichkeiten. So ist auf diese Weise eine orts- und zeitaufgelöste Kontrolle der Aktivität von z.B. Antisense-DNA, siRNA oder Aptameren durch Licht möglich. Hauptsächlich können zwei Vorgehensweisen zur Derivatisierung von Nukleinsäuren mit photolabilen Schutzgruppen unterschieden werden: Zum einen ist hier die Modifizierung des Phosphatrückgrates zu nennen, zum anderen können die Nukleobasen selbst mit photolabilen Schutzgruppen versehen werden. Für viele dieser Anwendungen werden Schutzgruppen auf Basis von Nitrobenzylchromophoren eingesetzt. Es besteht jedoch ein genereller Bedarf an der Adaptierung weiterer photolabiler Schutzgruppen zur chemischen Modifizierung von Nukleobasen.

Während der vorliegenden Doktorarbeit konnten zwei neuartige photolabil geschützte Desoxythymidine **91** und **92** als Phosphoramidite zum Einsatz in der automatisierten DNA-Synthese dargestellt werden. Hierfür wurden jeweils NDBF-OH bzw. pHP-OH in O<sup>4</sup>-Position der Nukleobase eingeführt.



Es konnte gezeigt werden, dass sich die beiden Nucleoside nach ihrem Einbau in DNA mittels UV-Licht entschützen lassen. Die photolabilen Schutzgruppen besaßen jedoch nur eine geringe chemische Stabilität unter verschiedenen basischen Abspaltbedingungen und sind deshalb nicht für die automatisierte DNA-Festphasensynthese unter Standardbedingungen geeignet. Durch Homologisierung der NDBF-Gruppe mit einer zusätzlichen Methyleinheit zu hNDBF-OH **68** wurde eine verbesserte Variante synthetisiert, welche eine ausreichende Basenstabilität und hervorragende photochemische Eigenschaften aufweist. Wie im Arbeitskreis Heckel gezeigt werden konnte, ist mittels in O<sup>6</sup>-Position hNDBF-modifiziertem Desoxyguanosin sowohl die DNA-Festphasensynthese unter Standardbedingungen möglich, als auch die spätere Photolyse dieser Schutzgruppe bei einer Wellenlänge von 420 nm. Hierdurch eröffnet sich zum ersten Mal die Möglichkeit, bei Verwendung von beispielsweise NPP und hNDBF, photolabil geschützte Bereiche in Nucleinsäuren wellenlängenselektiv durch Licht unterschiedlicher Wellenlänge zu aktivieren.

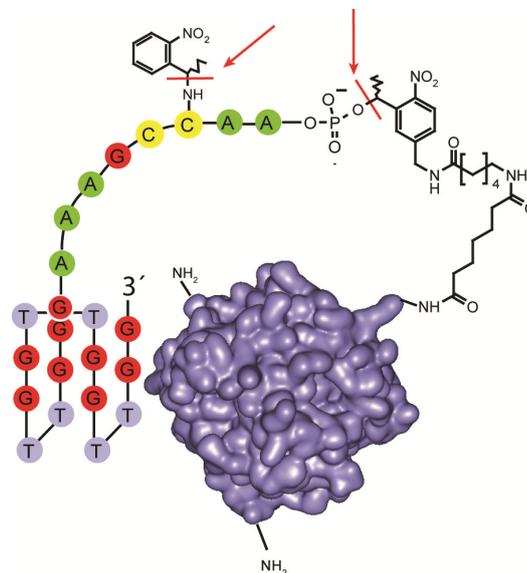
In einem weiteren Projekt wurden erfolgreich photoaktivierbare Varianten des bivalenten Fusionsaptamers HD1-22 getestet. HD1-22 besitzt zwei Aptamerdomänen, welche jeweils an eine der beiden Exosites I bzw. II von  $\alpha$ -Thrombin binden.



Im konkreten Fall konnten wir die Blutgerinnungsaktivität von  $\alpha$ -Thrombin unter Verwendung der photolabil geschützten Aptamersequenz **G6** von vollständig aktiv zu komplett inaktiv modulieren: Vor der UV-Bestrahlung war lediglich die Exosite II durch die HD22-Domäne blockiert. Dies erlaubte keinerlei Bindung des natürlichen Antikoagulans Antithrombin III an  $\alpha$ -Thrombin – weder durch Heparin vermittelt noch ohne Beteiligung von Heparin. Der Zugang zur Exosite I war hingegen nicht eingeschränkt, die Blutgerinnungsaktivität des  $\alpha$ -Thrombins somit durch die Rekrutierung von Fibrinogen an die Exosite I vollständig aktiv und nicht durch Antithrombin

inhibierbar. Durch lichtvermittelte Entschützung der HD1-Domäne konnte nun eine Inaktivierung der Exosite I erfolgen, welche durch die hohe Bindungsaffinität der HD22-Aptamerdomäne stärker ausfiel als bei der ausschließlichen Verwendung eines HD1 Aptamers. Die koagulative Wirkung des  $\alpha$ -Thrombins wurde somit vollständig aufgehoben.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde der Grundstein für die Entwicklung eines kovalenten, lichtaktivierbaren Thrombin-Thrombinaptamer-Reagenzes gelegt. Dieses könnte zur gezielten Thromboembolisierung bei bestimmten malignen Tumorerkrankungen eingesetzt werden, um das entartete Gewebe von der Blut- und damit Nährstoffversorgung abzuschneiden. Zudem könnte so möglicherweise während einer Tumorexzision die Freisetzung von metastasierenden Krebszellen unterbunden werden. Das Reagenz besteht aus der von Heckel *et al.* publizierten „ausschaltbaren“ Variante des HD1-Aptamers. Diese besitzt einen photolabil geschützten Gegenstrang. Solange die Schutzgruppe intakt ist, bindet das Aptamer an die Exosite I von  $\alpha$ -Thrombin und verhindert auf diese Weise die Rekrutierung von Fibrinogen. Wird die Sequenz jedoch mit UV-Licht bestrahlt, so erfolgt die Entschützung des Gegenstrangs und durch die folgende Basenpaarung eine Inaktivierung des HD1 Aptamers. Hieraus resultiert die Freisetzung von aktivem  $\alpha$ -Thrombin, welches direkt zur Ausbildung eines Thrombus führt. Durch die – ebenfalls photospaltbare – kovalente Anbindung des „ausschaltbaren“ HD1 an die Proteinoberfläche werden eine vorzeitige Dissoziation des Aptamers und damit eine vorzeitige Wiederherstellung der Proteinaktivität verhindert.



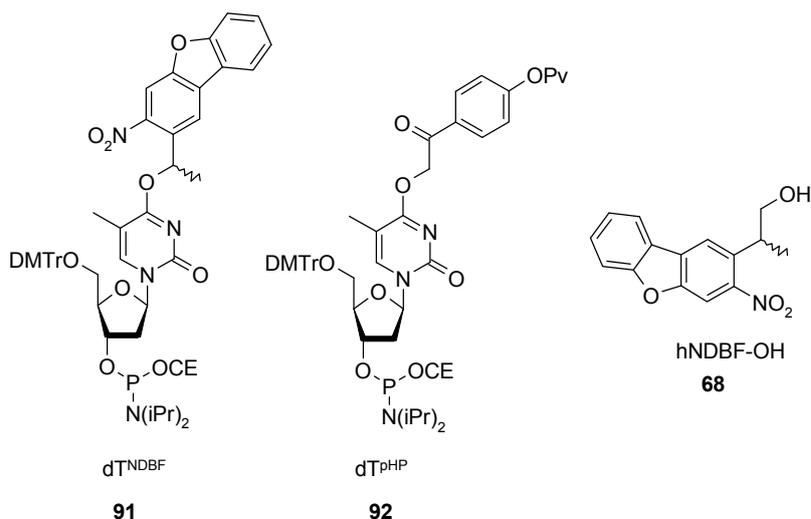


## Abstract

During the past three decades „caged compounds“ have become valuable tools in molecular biology as well as physiology and biochemistry. Starting with the publication of caged ATP by Hoffman *et al.* in 1978 a lot of important applications have been reported and the use of such caged compounds have led to new insights in how things work on cellular level. To achieve „caging“ the biological activity of a substance is masked using a photo-cleavable protecting group. As long as this group is attached to the substance its activity is blocked. Upon irradiation with basically UV-light, the activity is restored through cleavage of the photo-reactive protecting group. Thus, the method allows a spatiotemporal control of the action of biologically active molecules.

The use of this technique for the control of nucleic acid activity opens a broad field of new applications. Using caged variants of, for example, antisense-ODNs, siRNAs or aptamers lets one gain control of their action in time and space. In general, one can distinguish between two different strategies with respect to nucleic acid caging. The simple way is the statistical caging of the phosphate backbone, whereas the more sophisticated way deals with the attachment of the photo-reactive protecting group to a specified nucleobase. In most of the cases, scientists use nitrobenzyl-like chromophores for the latter purpose. Nevertheless, there is an increasing demand in establishing new light-cleavable protecting groups with superior photochemical properties.

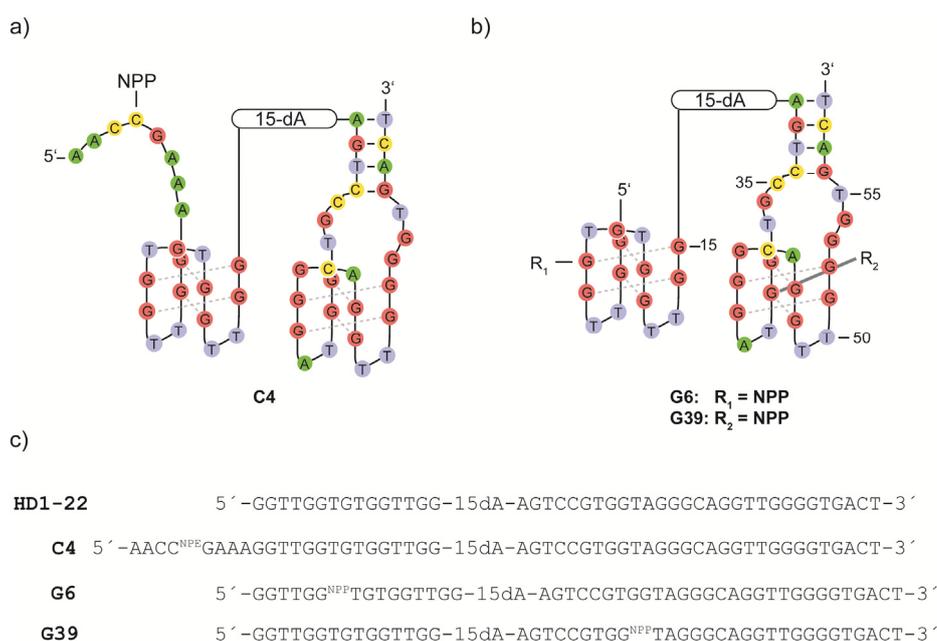
Two new caged deoxythymidine phosphoramidites **91** and **92** have been successfully synthesized during my doctorate. Two NDBF- and pHP-chromophore respectively were used as photo-labile protecting groups and introduced at O<sup>4</sup>-position of thymine.



Both nucleosides have been shown to be suitable in standard solid-phase DNA synthesis on an automated synthesizer and were proven to become uncaged by irradiation with UV-light. Unfortunately, the use is limited due to an elevated base lability of the caging groups during the

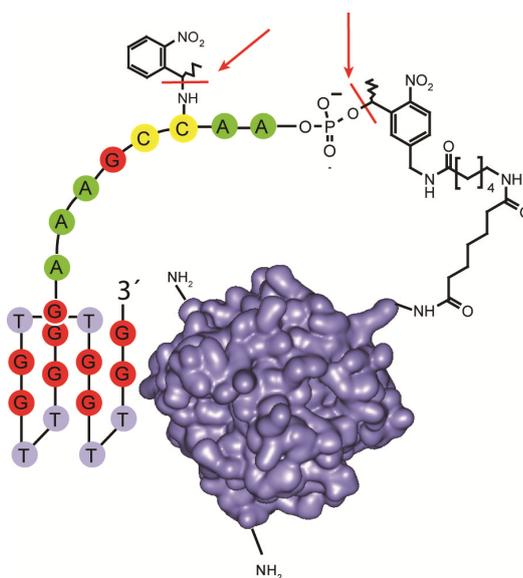
cleavage process from the solid support. By developing the new NDBF-homologue hNDBF **68** the problem of base-lability could be solved. The introduction of an additional methylene moiety increased the base-stability without altering the excellent photochemical properties of the nitrodibenzofurane chromophore. Furthermore, in our group it could be shown, that a deoxyguanosine modified with hNDBF in O<sup>6</sup>-position is stable under automated DNA-synthesis and subsequent basic cleavage conditions. The hNDBF-group was cleaved successfully at 420 nm UV-light irradiation, whereas in contrast for example NPP shows extremely low photo-reactivity at this wavelength. These results suggest that it could be possible for the first time to use a chromophore like NPP, which shows low absorption at wavelengths beyond ~400 nm and hNDBF for protection of different regions of a biologically active nucleic acid and thus their wavelength-selective uncaging.

In a second project, caged variants of the  $\alpha$ -thrombin binding bivalent fusion aptamer HD1-22 were synthesized and successfully used for the differential regulation of protein subdomain activity. HD1-22 consists of two different aptamer regions linked *via* a poly-adenine linker. By caging one of these domains, we could modulate the coagulation activity of  $\alpha$ -thrombin from completely inactive to fully active. Before UV-irradiation, the non caged HD22 domain of Sequence **G6** binds to the protein exosite II, thus inhibiting the binding of heparine. Heparine usually dramatically accelerates the recruitment of antithrombin III, a very potent inactivator of  $\alpha$ -thrombin. Simultaneous caging of the HD1 region allowed no binding of the aptamer to exosite I. Therefore, the coagulatory protease activity and processing of fibrinogen into fibrin was fully switched on. However, irradiation with UV-light led to uncaging of the HD1 domain, resulting in its binding and inhibition of  $\alpha$ -thrombin's exosite I. This means, that it was no longer possible for fibrinogen to bind to the exosite I – the coagulatory activity was therefore completely switched off upon irradiation.



In a third project, the way for the development of a covalent, light-activatable thrombin/thrombin aptamer reagent (TTA) could be paved. By using the already published „off-switchable“ variant of HD1 and a photo-reactive linker it was possible to create a covalent and light-cleavable complex of the aptamer bound to exosite I and presumably lysine residues on the surface of  $\alpha$ -thrombin. The covalent connection prevents the HD1 from dissociation which otherwise would result in an unwanted release of active  $\alpha$ -thrombin. Upon light-irradiation two things happen: first, the NPE-group is cleaved from the antisense region of the HD1 resulting in base-pairing and depletion of the active conformation. Second, the covalent linker is cleaved as well, which allows dissociation of the inactivated aptamer and release of active  $\alpha$ -thrombin.

It is suggested, that such a TTA complex can be used by physicians for thromboembolization during tumor excision and thereby prevent metastatic cancer cells from entering the blood stream. Additionally, a systemic application of the TTA reagent as a prodrug and subsequent irradiation of the capillary vessels around – for example – light-accessible skin cancer could induce the formation of blood clots which cuts off the tumor from essential nutrient supply.





# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Nitrobenzylartige photolabile Schutzgruppen	2
1.2	Die Nitrodibenzofurangruppe	5
1.3	Die <i>p</i> -Hydroxyphenacylschutzgruppe	5
1.4	Cumarine als photolabile Schutzgruppen	6
1.5	Photoaktivierbare Nukleinsäuren	8
1.6	Aptamere als therapeutische Oligonukleotide	15
1.7	Chemische Festphasensynthese von Desoxynukleinsäuren	20
<b>2</b>	<b>Motivation und Zielsetzung</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>Allgemeiner Teil</b>	<b>31</b>
3.1	Neuartige photoaktivierbare Desoxyribonukleoside für die automatisierte DNA-Festphasensynthese	
3.1.1	Synthese der photoreaktiven Schutzgruppen	31
3.1.1.1	Synthese von 1-(2-Nitrophenyl)ethanol (NPE-OH)	31
3.1.1.2	Synthese von 2-(2-Nitrophenylethyl)propanol (NPP-OH)	31
3.1.1.3	Synthese der <i>p</i> -Hydroxyphenacylschutzgruppe (pHP-OH)	32
3.1.1.4	Synthese der Bromhydroxycumarinschutzgruppe (Bhc-OH)	33
3.1.1.5	Synthese der Nitrodibenzofuranschutzgruppen (NDBF-OH, hNDBF-OH)	35
3.1.2	Die „convertible nucleoside“ – Strategie	41
3.1.2.1	Untersuchungen zur Anwendbarkeit der „convertible nucleoside“-Strategie	47
3.1.3	Konventionelle Synthese modifizierter Desoxynukleoside	52
3.1.3.1	Synthese von NDBF-geschütztem Desoxythymidin	55
3.1.3.2	Synthese von pHP-geschütztem Desoxythymidin	56
3.1.3.3	Synthese von Bhc-geschütztem Desoxythymidin und Desoxyguanosin	58
3.1.4	DNA-Oligonukleotidsynthese mit pHP- und NDBF-geschütztem Desoxythymidin und Desoxyguanosin	61
3.1.5	DNA-Oligonukleotidsynthese mit hNDBF-geschütztem Desoxyguanosin	67
3.2	Regulation der Aktivität von Proteindomänen durch ein photoaktivierbares bivalentes DNA-Aptamer	
3.2.1	Lichtaktivierbare $\alpha$ -Thrombin bindende Aptamere	70
3.2.2	Für Mutationen sensitive Nukleobasen in HD22	76
3.2.3	Experimente mit dem photoaktivierbaren bivalenten Fusionsaptamer HD1-22	79
3.3	Ein kovalentes Aptamer-Thrombin-Reagenz zur photodynamischen Thrombookklusion	
3.3.1	Einleitung	82
3.3.2	Ein photospaltbarer Linker für die Verknüpfung von $\alpha$ -Thrombin und ausschaltbarem HD1-Aptamer	85
3.3.2.1	Synthese eines photospaltbaren Linkers	85

---

3.3.2.2	Kupplungsversuche der aminomodifizierten Aptamersequenz mit dem photoreaktiven Linker	92
3.3.2.3	„Non-traceless“ Verknüpfung zwischen Aptamer-DNA und $\alpha$ -Thrombin	96
<b>4</b>	<b>Ausblick</b>	<b>105</b>
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>107</b>
5.1	Materialien und Reagenzien	107
5.2	Synthesevorschriften	109
5.3	Synthese der photoaktivierbaren Aptamere	154
5.4	Biologische Aktivitätstests	156
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>159</b>
6.1	Spektren	159
6.2	Abkürzungsverzeichnis	162
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>165</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>173</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>175</b>

# 1 Einleitung

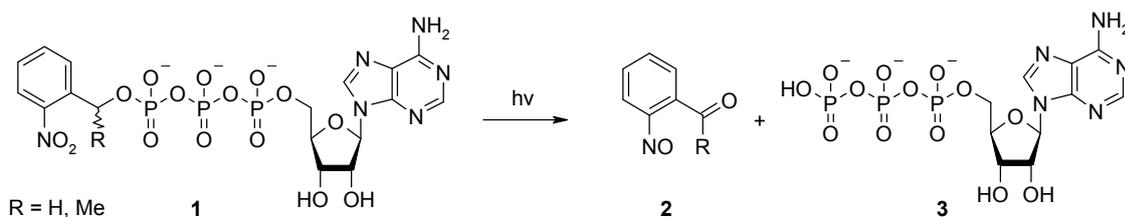
Innerhalb der letzten 30 Jahre haben sich photoaktivierbare Verbindungen („caged compounds“) zu einem wertvollen Werkzeug auf vielen Gebieten der Physiologie, Molekularbiologie und Biochemie entwickelt. Ursprünglich als orthogonale Schutzgruppen für die organische Synthese gedacht,<sup>[1]</sup> stellen photolabile Schutzgruppen heutzutage nützliche Instrumente für die Aufklärung physiologischer Vorgänge auf zellulärer Ebene dar.<sup>[2-4]</sup> Unter photoaktivierbaren Biomolekülen versteht man Substanzen, deren biologische Wirksamkeit temporär inaktiviert ist, jedoch durch Bestrahlung mit Licht wiederhergestellt werden kann. Die Inaktivierung wird durch spezielle, lichtreaktive Chromophore erreicht, sogenannte photolabile Schutzgruppen („cages“). Der englische Begriff – 1978 von J. Hoffman geprägt<sup>[5]</sup> – ist hierbei etwas unglücklich gewählt, suggeriert er doch, dass sich das Wirkmolekül in einer Art Käfig eingeschlossen befindet, welcher durch Licht geöffnet werden kann. Dies trifft jedoch nur selten zu, wie bei photoaktivierbaren Chelatkomplexen, welche zur Freisetzung von Calcium-<sup>[6,7]</sup> oder Magnesiumionen verwendet werden.<sup>[8]</sup> Vielmehr wird in den meisten Fällen das Wirkmolekül kovalent an die Schutzgruppe gebunden – diese blockiert dann die Aktivität des biologisch wirksamen Moleküls beispielsweise durch direkte sterische Hinderung. Die spätere Aktivierung durch Abspaltung der Schutzgruppe erfolgt irreversibel.

Licht ist für die Manipulation biologisch aktiver Moleküle ein nahezu ideales Auslösesignal. Es ist orthogonal, d.h. es beeinflusst normalerweise nicht die Funktion biologischer Proben. Zudem sind wichtige Modellorganismen wie *C. elegans* oder *D. rerio* während ihrer Lebenszeit oder zumindest in frühen Entwicklungsstadien transparent. Somit sind so gut wie alle Kompartimente dieser Organismen für Licht zugänglich. Bei Wahl der richtigen Wellenlänge ist Licht für biologisches Gewebe unschädlich, dies ist ein Grund für die bevorzugte Entwicklung von photolabilen Schutzgruppen, die sich mit möglichst langwelligem UV-A Licht abspalten lassen. Durch die Verwendung von (konfokalen) Lasermikroskopen steht eine Technologie zur Verfügung, mit welcher Proben sowohl bestrahlt und somit entschützt als auch gleichzeitig analysiert werden können. Der große Vorteil hierbei ist die erzielte räumliche und zeitliche Auflösung – durch Femtosekundenpulse und entsprechende Fokussierung sind Volumina im Femtoliterbereich adressierbar.<sup>[3]</sup> Es ist auf diese Weise möglich, durch photolabile Schutzgruppen temporär inaktivierte Moleküle durch Diffusion systemisch anzureichern und dann durch einen Laserpuls eine Aktivierung und damit einen abrupten Konzentrationssprung des nun aktiven Wirkmoleküls innerhalb eines exakt definierten Volumens zu erreichen.

An eine gute photolabile Schutzgruppe werden folgende Anforderungen gestellt: Sie darf das inaktivierte Wirkmolekül in seiner biologischen Umgebung nicht zusätzlich negativ beeinflussen, beispielsweise hinsichtlich seiner Löslichkeit. Zudem sollte sie einen hohen Absorptionskoeffizienten  $\epsilon$  und mit Hinblick auf die Bindungsspaltung eine große Quantenausbeute  $\Phi$  aufweisen. Die eigentliche Entschützung sollte mit einer schnellen Kinetik geschehen und möglichst zu einer vollständigen Freisetzung der aktiven Spezies führen. Zuletzt ist es vorteilhaft, wenn die bei der Photolyse entstehenden Nebenprodukte selbst kein Licht im Bereich der ursprünglichen Anregungswellenlänge absorbieren und zudem nicht toxisch für den untersuchten Organismus sind. Da keine Schutzgruppe alle diese Voraussetzungen erfüllt, ist es von großem Interesse, eine breite Palette an Verbindungen zur Verfügung zu haben, um je nach Anwendungszweck die geeignete photolabile Schutzgruppe wählen zu können. Im Folgenden soll deshalb eine Auswahl an bedeutenden Chromophoren mit einigen Anwendungsbeispielen vorgestellt werden.

### 1.1 Nitrobenzylartige photolabile Schutzgruppen

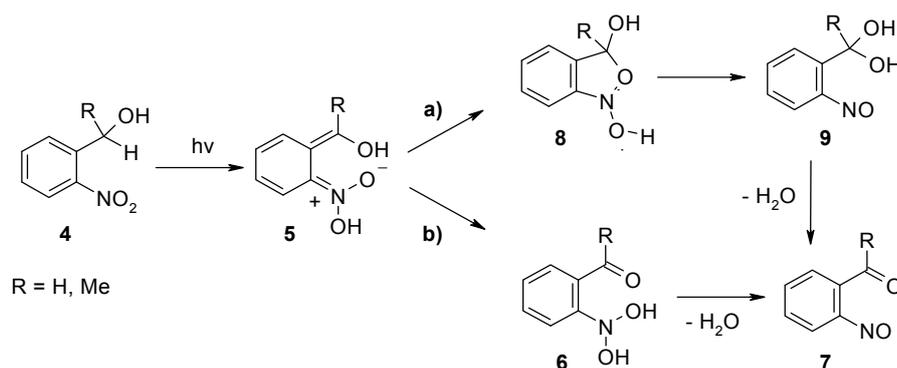
Die mit Abstand am häufigsten verwendeten photolabilen Schutzgruppen basieren auf dem Nitrobenzylchromophor. Seit der Einführung von photoaktivierbarem ATP durch Kaplan *et al.* 1978<sup>[5]</sup> werden diese in mehr als 80 Prozent<sup>[3]</sup> aller Veröffentlichungen auf diesem Gebiet genutzt. Kaplan verwendete das photolabil geschützte ATP **1** zur Untersuchung der ATP-abhängigen Natrium-Kalium-Pumpe in der Zellmembran roter Blutkörperchen.



**Abbildung 1:** Von Kaplan *et al.*<sup>[5]</sup> 1978 verwendetes photoaktivierbares ATP **1**. Durch UV-Bestrahlung werden das biologisch wirksame ATP **3** sowie das Photolyseprodukt der Schutzgruppe **2** freigesetzt.

Bereits ein Jahr zuvor publizierten Engels und Schlaeger ein Derivat des cAMP, welches am Phosphatrest mit einer Nitrobenzylgruppe modifiziert worden war, und zeigten, dass die Nitrobenzylgruppe durch UV-Licht abgespalten werden kann.<sup>[9]</sup> Jedoch lag der Fokus dieser Arbeit nicht auf der Anwendung von photoaktivierbaren Wirkmolekülen, weswegen die Arbeit von Kaplan *et al.* gemeinhin als Pionierarbeit gilt. Nucleosidtriphosphate wie der Energielieferant ATP, die sekundären Botenstoffe cAMP und  $\text{Ca}^{2+}$ , sowie der Neurotransmitter Glutamat gehören zu den am häufigsten photolabil geschützten Wirkmolekülen.

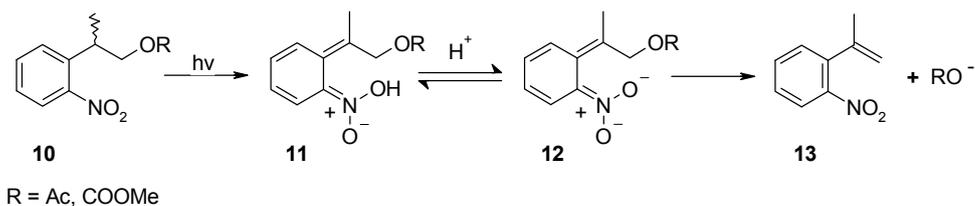
Der Mechanismus der Photolysereaktion von *o*-Nitrobenzyl- (NB) oder *o*-Nitrophenylethyl- (NPE) geschützten Verbindungen entspricht einer NORRISH-Typ-II-Reaktion und ist mittlerweile umfassend untersucht worden (siehe Abbildung 2).<sup>[10,11]</sup> Initiiert wird die Bindungsspaltung bei Nitrobenzylalkoholen **4** durch die lichtabhängige Bildung der *aci*-Nitrovariante **5** über eine 1,5-Umlagerung des benzylichen Protons an die angeregte Nitrogruppe mit einer Geschwindigkeitskonstante von  $k \approx 10^{12} \text{ s}^{-1}$ . Wie Wirz *et al.*<sup>[11]</sup> zeigen konnten, besitzt dieses Intermediat nun zwei verschiedene Möglichkeiten weiter zu reagieren. Weg a) führt zur Bildung des Benzisoxazolidins **8** und schließlich, gefolgt von Ringöffnung und Eliminierung, zur Ausbildung der Nitrosokomponente **7**. Diese Reaktionsfolge ist vorherrschend in neutralen wässrigen Lösungen. Unter stark alkalischen oder sehr sauren Bedingungen sowie in Hexan oder Acetonitril verläuft der Zerfall von **5** nach Weg b) über eine weitere Protonenwanderung zu dem Nitrosohydrat **6** und anschließender Eliminierung zu **7**. Handelt es sich bei der Abgangsgruppe nicht wie hier um  $\text{H}_2\text{O}$ , sondern beispielsweise um einen Alkohol oder Phosphatrest, so ist der Zerfall über Weg b) selbstverständlich nicht möglich.



**Abbildung 2:** Mechanismus der Photolysereaktion von NB/NPE-Alkohol.<sup>[11]</sup> Eingeleitet wird die Reaktionsfolge durch Ausbildung der *aci*-Nitrokomponente **5**, welche je nach Reaktionsbedingung einen der beiden möglichen Wege **a)** oder **b)** nimmt. Im vorliegenden Fall kommt es zu Freisetzung von  $\text{H}_2\text{O}$ .

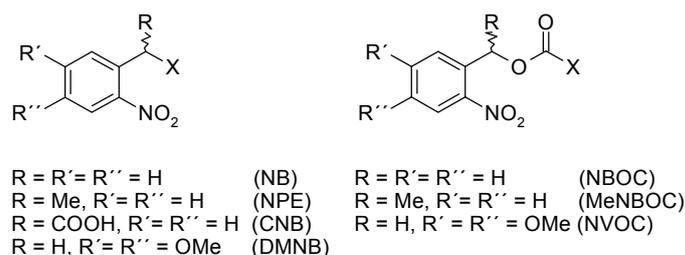
Die nitrobenzylartigen Schutzgruppen können u.a. zur Schützung von Alkoholen, Aminen, Carboxylaten, Thiolen und Carbonylverbindungen verwendet werden. Ein Nachteil dieser Schutzgruppen ist jedoch die Entstehung des sehr reaktiven und toxischen Nitrosoderivates **7**.

Pfleiderer *et al.*<sup>[12]</sup> haben eine Variante der NPE-Gruppe vorgestellt, bei welcher eine zusätzliche Methylengruppe am benzylicen Kohlenstoff eingeführt wurde. Diese 2-(2-Nitrophenyl)ethylgruppe (NPP) zeigt nahezu eine Verdopplung der Photolysegeschwindigkeit im Vergleich zu NPE. Zudem entsteht als Nebenprodukt der Photospaltung das Nitrostyren **13**, welches weniger reaktiv als die Nitrosoverbindung **7** ist. Die NPP-Gruppe eignet sich zur Schützung von guten Abgangsgruppen wie Carboxylaten oder Carbamaten – nur bei diesen kann eine Freisetzung der photoaktivierbaren Verbindung *via*  $\beta$ -Eliminierung erfolgen.<sup>[13]</sup>



**Abbildung 3:** Mechanismus der Photolyse einer NPP-geschützten Carbonylverbindung.<sup>[13]</sup> Wie bei der NB/NPE-Gruppe leitet die intramolekulare Protonierung der angeregten Nitrogruppe zur *aci*-Nitrosopezies **11** den Zerfall ein. Ist „R“ eine schlechte Abgangsgruppe, so kommt es ausgehend von **11** zum Zerfall in ein zykliches Benzisoxazolidin, welches ohne Freisetzung der Abgangsgruppe RO<sup>-</sup> zu einer Nitrosoverbindung weiterreagiert (nicht gezeigt).

Die photochemischen Eigenschaften einer photolabilen Schutzgruppe können durch verschiedenste Substituenten beeinflusst werden. Es existieren mittlerweile eine ganze Reihe nitrobenzylartiger Schutzgruppen unterschiedlicher Eigenschaften. Eine kleine Auswahl ist in der folgenden Abbildung 4 dargestellt.

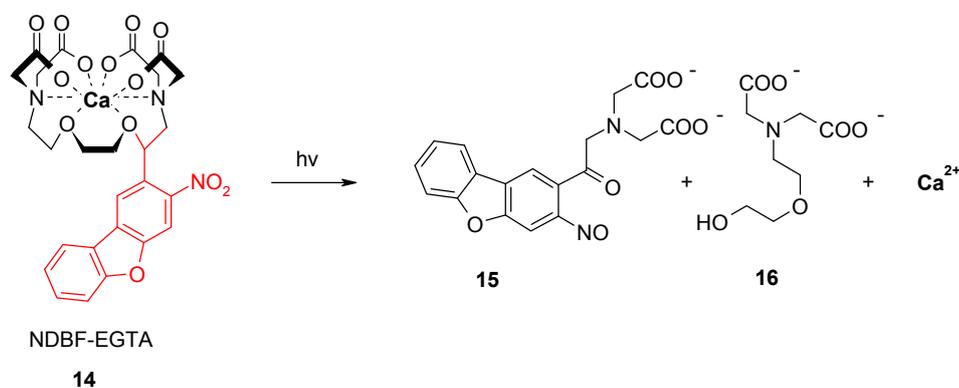


**Abbildung 4:** Strukturformeln einiger gebräuchlicher *o*-Nitrobenzenderivate (X = Abgangsgruppe).

Die beiden zusätzlichen Methoxysubstituenten der DMNB-Gruppe beispielsweise verschieben im Vergleich zu NB das Absorptionsmaximum in einen Bereich von 360 nm, sind allerdings auch für eine verringerte Quantenausbeute verantwortlich.<sup>[6]</sup> CNB wird vor allem zur gezielten Freisetzung von Glutamat genutzt und zeigt hier eine schnellere Kinetik der Photolysereaktion als bei Verwendung von NB oder NPE.<sup>[14]</sup>

## 1.2 Die Nitrodibenzofurangruppe

Auch die Nitrodibenzofuranschutzgruppe (NDBF) lässt sich als ein Derivat der NPE-Schutzgruppe auffassen. Sie wurde 2006 von Momotake *et al.*<sup>[7]</sup> in Verbindung mit einem Calciumchelator eingeführt und zeigte hierbei überragende photochemische Eigenschaften. Die Quantenausbeute der Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wurde mit 0.7 bestimmt, der Absorptionskoeffizient des NDBF-EGTA Komplexes **14** betrug  $18400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bei 330 nm. Die Photolysereaktion verlief mit 16-160fach höherer Geschwindigkeit als vergleichbare Reaktionen mit *o*-NB oder DMNB geschützten Effektormolekülen. Besonders interessant macht die NDBF-Gruppe zudem ihr vergleichsweise hoher 2-Photonen-Wirkungsquerschnitt von 0.6 GM bei 710 nm. Somit ist NDBF ein guter Kandidat für photolabile Schutzgruppen der nächsten Generation, welche eine 2-Photonen-Photolyse *in vivo* ermöglichen.



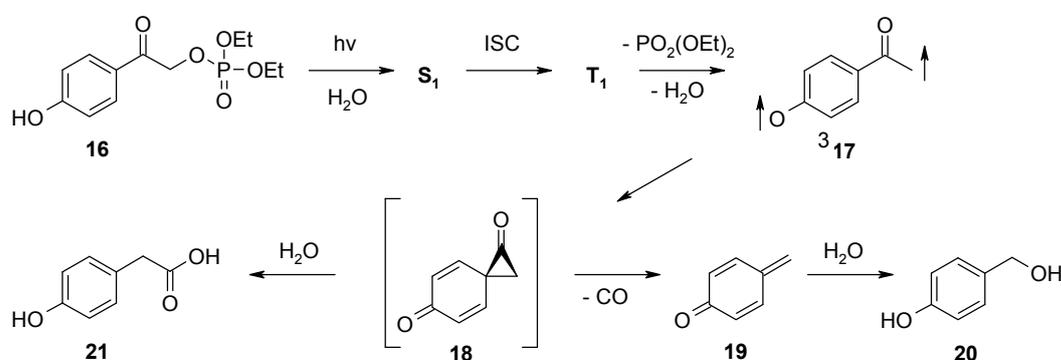
**Abbildung 5:** NDBF (rot) als photolabile Schutzgruppe für EGTA. Durch Photolyse wird der achtzählige Chelatligand **14** zerstört und die Nebenprodukte der Photolyse **15** und **16** sowie das gebundene Calciumion als Effektor freigesetzt.<sup>[7]</sup>

## 1.3 Die *p*-Hydroxyphenacylschutzgruppe

Eine ebenfalls relativ neue photolabile Schutzgruppe ist die *p*-Hydroxyphenacylgruppe (pHP), welche 1996 von Givens *et al.*<sup>[15]</sup> zur Schützung von ATP sowie zur Freisetzung des Neurotransmitters GABA und kleiner Peptide<sup>[16]</sup> verwendet wurde. Ihre Vorteile sind eine gute Wasserlöslichkeit und die Ungiftigkeit sowohl der pHP-Gruppe selbst als auch deren Photolyseprodukt *p*-Hydroxyphenyl-essigsäure. Ausgehend von *p*-Hydroxyacetophenon ist pHP zudem einfach synthetisch zugänglich. Die Photolyse verläuft mit Quantenausbeuten im Bereich von 0.1-0.4 und ist mit der Freisetzung von  $10^8$ - $10^9$  Molekülen pro Sekunde sehr schnell.<sup>[3]</sup> Das Absorptionsmaximum der unmodifizierten pHP-Gruppe liegt bei 320 nm, kann aber durch Substitution des Phenylrestes durch Methoxysubstituenten in *ortho*-Position zur phenolischen Hydroxygruppe in den Bereich von 350-370 nm verschoben

werden.<sup>[17]</sup> Allerdings resultiert aus dieser Veränderung des photoreaktiven Systems eine deutliche Abnahme der Quantenausbeute.

Der Mechanismus verläuft nach einer Photo-FAVORSKII-Reaktion über das Spirodion **18**.<sup>[18]</sup> Zu Beginn erfolgt die lichtabhängige Anregung des Photosystems in einen Singulettzustand, aus welchem das System schnell und quantitativ in einen Triplettzustand übergeht. Hieraus erfolgt die Freisetzung des Substrats (z.B. Diethylphosphat, siehe Abbildung 6) unter Ausbildung des primären Photoproduktes **17**. Dieses geht höchstwahrscheinlich in das experimentell bislang nicht nachgewiesene Spiroderivat **18** über. Für die Existenz einer solchen Spiroverbindung als Zwischenprodukt spricht die Entstehung des *p*-Hydroxybenzylalkohols **20** über das *p*-Chinonmethid **19**. Das Hauptprodukt der Photolyse ist *p*-Hydroxyphenylelessigsäure **21**, welche im Bereich der ursprünglichen Anregungswellenlänge transparent ist.



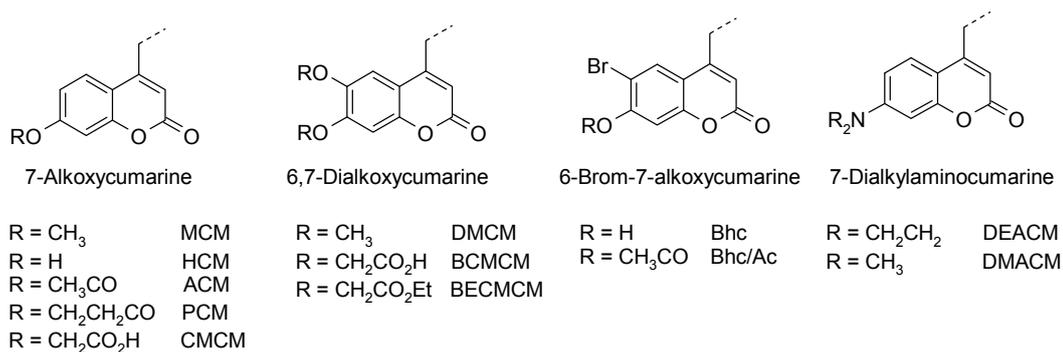
**Abbildung 6:** Experimentell weitgehend bestätigter Mechanismus der Photolyse von pHP-geschütztem Diethylphosphat **16** nach Givens *et al.*<sup>[18]</sup>

Ein weiterer Vorteil der pHP-Gruppe – wie auch der Cumarine (s.u.) – ist zudem, dass sie, im Gegensatz zu vielen Nitrobenzylschutzgruppen, kein Stereozentrum besitzt und somit bei Schützung von chiralen Molekülen keine weiteren Stereoisomere gebildet werden.

## 1.4 Cumarine als photolabile Schutzgruppen

1984 berichteten Givens und Matuszewski zum ersten Mal von einem photosensitiven 4-Methylcumarinyl-geschützten Phosphatester zur Fluoreszenzmarkierung von Nucleophilen wie Piperidin und einigen Aminosäuren.<sup>[19]</sup> Seitdem wurden auf dem Cumarinsystem basierende Schutzgruppen zur lichtinduzierten Freisetzung von Carboxylaten, Aminen, Alkoholen, Phenolen und Carbonylverbindungen eingesetzt.<sup>[3,20,21]</sup> Cumarine zeigen eine gute Wasserlöslichkeit und ihre Verbindungen sind wenig hydrolyseempfindlich. Zudem sind sie häufig membrangängig. Ihr großer Vorteil ist die Justierbarkeit des Absorptionsmaximums durch die Wahl geeigneter Substituenten (siehe Abbildung 7). So zeigt MCM die größte Absorption bei 310 nm, während Elektronen-

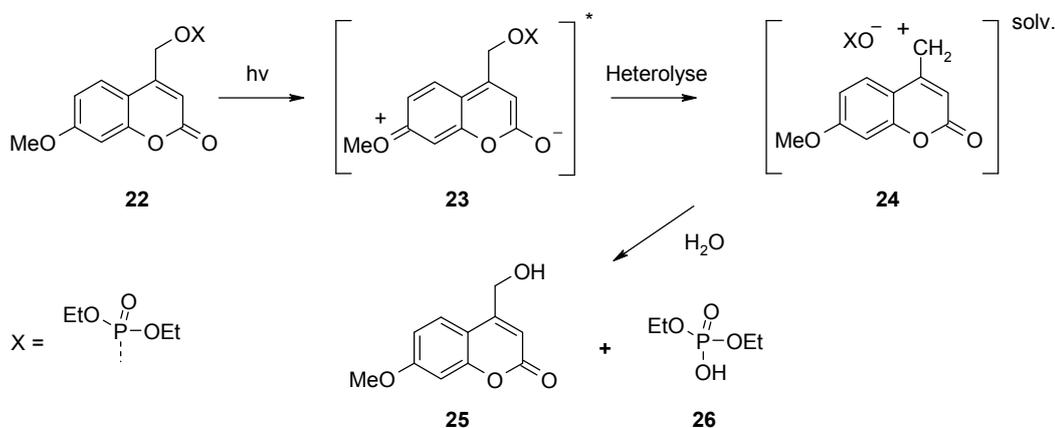
donatoren an C6 oder C7 das Absorptionsmaximum in Richtung höherer Wellenlänge verschieben. Die größte Rotverschiebung mit  $\sim 450$  nm besitzen die aminosubstituierten Varianten wie DEACM, welche in der Gruppe von V. Hagen entwickelt wurden.<sup>[22]</sup> Hingegen zeigt T. Furuta Bhc von allen cumarinartigen photolabilen Schutzgruppen den größten 2-Photonenwirkungsquerschnitt von 1 GM bei 740 nm, dieser liegt um zwei Größenordnungen über dem der 2-Nitrobenzylschutzgruppen<sup>[23]</sup> und ist immerhin fast doppelt so hoch wie bei NDBF. Dies macht Bhc neben NDBF ebenfalls zu einem guten Chromophor für die 2-Photonenentschützung.



**Abbildung 7:** Strukturen einiger 4-MethylcumarinyI-Schutzgruppen.<sup>[3]</sup>

Die Quantenausbeuten der Photolyse von Bhc bzw. der 7-Diethylaminocumarine liegen bei 0.1-0.3 mit molaren Absorptionskoeffizienten  $\epsilon_{\max}$  im Bereich von 13000-16000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. Die Freisetzungsgeschwindigkeit des Effektors liegt im Falle von DEACM-geschützten zyklischen Nucleosiden bei 10<sup>9</sup> Molekülen pro Sekunde.<sup>[3]</sup>

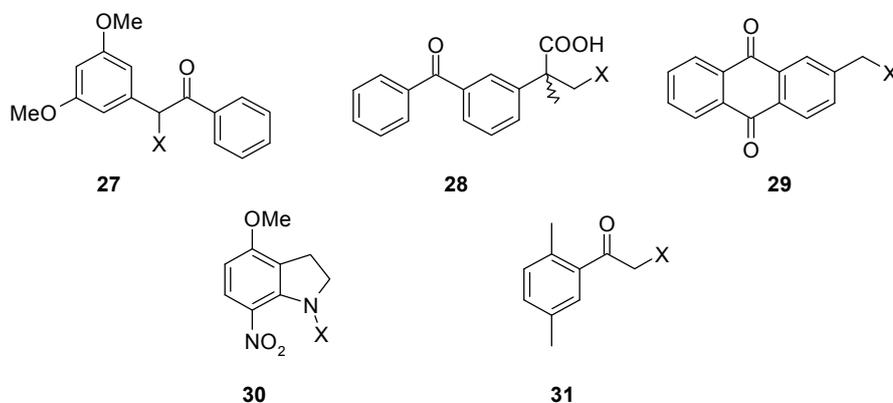
Die Photolyse der Cumarinderivate verläuft, wie in Abbildung 8 gezeigt wird, über einen ionischen Mechanismus,<sup>[24]</sup> für einige photolabil geschützte Amine wurde allerdings auch ein Radikalmechanismus postuliert.<sup>[25]</sup>



**Abbildung 8:** Mechanismus der Photolyse von MCM-geschütztem Diethylphosphat.<sup>[3]</sup>

Nach der Anregung des Photosystems **22** in einen Singulettzustand **23** erfolgt die heterolytische Bindungsspaltung in zwei Ionenpaare **24**. Diese sind zunächst von Lösungsmittelmolekülen solvatisiert. Die Ionen können beispielsweise von einem Wassermolekül abgefangen werden, was zur Bildung von Cumarinalkohol **25** und Freisetzung des Effektormoleküls Diethylphosphat **26** führt.

Neben den hier vorgestellten Chromophoren gibt es noch eine Vielzahl an weiteren photolabilen Schutzgruppen, welche jedoch bisher keine breite Anwendung erfahren haben. Hierzu zählen u.a. 3',5'-Dimethoxybenzoin **27**,<sup>[26]</sup> Ketoprofen **28**,<sup>[27]</sup> Anthrachinon-2-ylmethoxycarbonyl (Aqmoc) **29**,<sup>[28]</sup> 4-Methoxy-7-nitroindolin (MNI) **30**<sup>[29]</sup> und 2,5-Dimethylphenacyl **31**<sup>[30]</sup> (siehe Abbildung 9). Einen Überblick, auch über die „exotischeren“ Schutzgruppen, bietet ein Übersichtsartikel von Heckel und Mayer.<sup>[4]</sup>



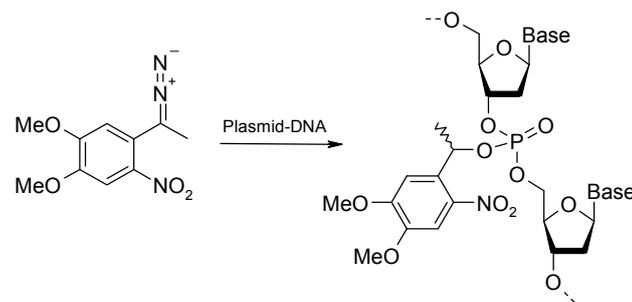
**Abbildung 9:** Strukturformel weiterer photolabiler Schutzgruppen (X = Abgangsgruppe, evtl. mit Carbamat- oder Carbonatmodifizierung).

## 1.5 Photoaktivierbare Nukleinsäuren

Nukleinsäuren erfüllen neben der Speicherung und Replikation der genetischen Information eine Vielzahl an weiteren Aufgaben in biologischen Systemen. Methoden, welche es erlauben die Aktivität von Nukleinsäuren zu modulieren, sind wichtige Werkzeuge u.a. für die Aufklärung deren Funktion. So kann beispielsweise die Genexpression auf mRNA-Ebene über eine Vielzahl verschiedener Methoden wie RNAi,<sup>[31]</sup> microRNA<sup>[32]</sup> oder Antisensetechnik<sup>[33]</sup> beeinflusst werden. Auf Proteinebene kann eine Regulation über Aptamere<sup>[34]</sup> bzw. RNA/DNA-Decoys<sup>[35]</sup> erfolgen. Zudem dienen Nukleinsäuren auch als Basis für sogenannte Genchips auf Microarraybasis, sie erlauben ein schnelles Screening der Expressionsmuster einer Vielzahl von Genen.<sup>[36]</sup> Möchte man nun die Aktivität der – vielfach therapeutisch anwendbaren – Nukleinsäuren durch Licht beeinflussen, so erfordert dies deren Modifizierung mit einer geeigneten photoreaktiven Schutzgruppe. Hierzu bieten sich prinzipiell zwei unterschiedliche Strategien an. Zum einen können die Nukleinsäuren statistisch photolabil

geschützt werden, was bedeutet, dass die genaue Natur der photoaktivierbaren Variante in Anzahl und Lokalisation der photolabilen Schutzgruppen nicht unbedingt bekannt ist. Zum anderen kann die Schützung ortsspezifisch erfolgen, beispielsweise ausschließlich am Phosphatrückgrat, der Zuckereinheit oder der Nukleobase. Letztere Variante bietet eine klar definierte Kontrolle über die Wirkungsweise der Schutzgruppe (z.B. Störung der Watson-Crick Basenpaarung), ist allerdings synthetisch aufwändiger als die statistische Methode.

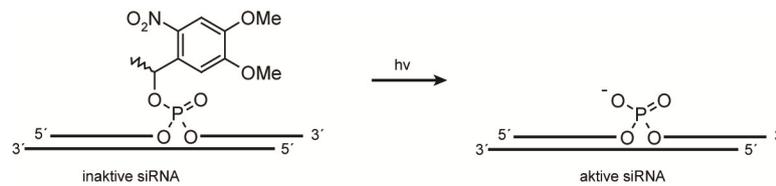
Die Pionierarbeit auf dem Gebiet der statistischen, photolabilen Schützung des Phosphatrückgrates leisteten Haselton *et al.* im Jahre 1999.<sup>[37]</sup> Für GFP- bzw. Luciferase-kodierende Plasmide wurden unter benzylierenden Bedingungen mit Diazo-DMNPE umgesetzt (siehe Abbildung 10), wobei vermutlich hauptsächlich eine Modifizierung der Phosphatgruppen stattfand. Anschließend erfolgte die Injektion der auf diese Weise inaktivierten Plasmide in Rattenhaut. Die Bestrahlung mit UV-Licht führte zu einer Aktivierung der Transkription der Plasmide, wobei jedoch deren vollständige Aktivität nicht wiederhergestellt werden konnte.



**Abbildung 10:** Photoaktivierbares DNA-Plasmid nach Haselton *et al.*<sup>[37]</sup>

Auf ganz ähnliche Weise gelang Okamoto<sup>[38]</sup> die Schützung von GFP-mRNA mit Diazo-Bhc durch Inkubation der beiden Komponenten in DMSO. Hierbei reagierten pro 1 kb mRNA etwa 30 Phosphatreste mit Diazo-Bhc. Die Injektion der photoaktivierbaren mRNA in Zebrafischembryonen erlaubte die UV-Licht kontrollierte Expression von GFP. Es konnte gezeigt werden, dass sich die mRNA, wird sie im Ein-Zellen-Stadium injiziert, systemisch im späteren Embryo verteilt. Durch Laserfokussierung konnte sie gezielt in einem 100  $\mu\text{m}$  durchmessendem Kompartiment aktiviert werden.

Friedman *et al.*<sup>[39]</sup> verwendeten ebenfalls DMNPE zur statistischen Schützung von siRNA (siehe Abbildung 11). Als Modellsystem diente Friedman die GFP-Expression in HeLa-Zellen. Ihre Idee war es, die Wechselwirkung der siRNA mit RISC aufgrund des sterischen Anspruchs der photolabilen Schutzgruppe zu blockieren. Somit kann zunächst kein Abbau der Ziel-mRNA erfolgen. Erst durch UV-Bestrahlung und damit einhergehender Abspaltung der blockierenden photolabilen Schutzgruppe wird die siRNA und damit RISC aktiviert.



**Abbildung 11:** Schematische Darstellung DMNPE-geschützter siRNA nach Friedman *et al.*<sup>[39]</sup>

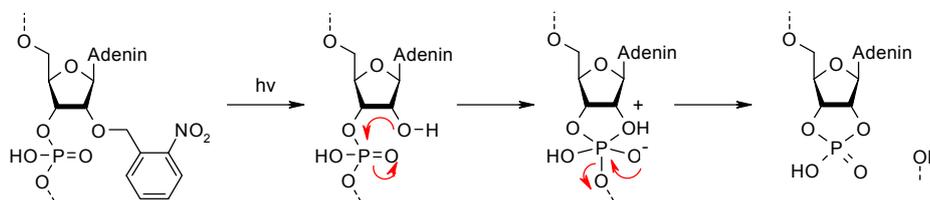
Dieses Experiment zeigte einige Grenzen der statistischen Schätzung. War die siRNA im Mittel mit 1.4 DMNPE-Gruppen geschützt, so besaß sie noch eine Restaktivität von ungefähr 40 %. Dies deutet darauf hin, dass die DMNPE-Schutzgruppe bei einigen Sequenzen an Positionen eingebaut wurde, welche die Erkennung durch RISC nicht unterbinden bzw. dass Sequenzen ohne jegliche photolabile Schutzgruppe vorhanden waren. Hingegen führte die Verwendung von mehr Schutzgruppen zwar zu einer vollständigen Inaktivierung der siRNA, jedoch konnte deren Aktivität durch Bestrahlung nicht vollständig wiederhergestellt werden bzw. es wurde eine Lichtintensität notwendig, welche bereits phototoxische Effekte verursachte.

Einen identischen Ansatz wie Friedman *et al.* nutzten Monroe *et al.*<sup>[40]</sup> kürzlich für die Anwendung photoaktivierbarer 2'-fluorierter siRNA zur Regulierung der GFP-Expression in Zebrafischembryonen.

Der Vorteil der statistischen Schätzung ist ihr geringer synthetischer Aufwand. So genügt es, die entsprechende Nukleinsäure mit einem – häufig kommerziell erhältlichen – reaktiven Vorläufer der photolabilen Schutzgruppe zu inkubieren, um die entsprechende photoaktivierbare Variante zu erhalten. Die große Schwäche jedoch ist, wie schon erwähnt, dass man keinerlei Kontrolle über die Anzahl der eingebauten Schutzgruppen erhält und zudem nicht sicher sein kann, auch wirklich strategisch wichtige Positionen innerhalb der Nukleinsäuresequenz zu modifizieren. Die exakte Struktur der photolabil geschützten Spezies ist somit häufig unbekannt. Hieraus resultiert entweder eine biologische Restaktivität oder aber eine nur unvollständige Wiederherstellung der Nukleinsäureaktivität nach Bestrahlung mit Licht.

Weitaus eleganter, wenn auch aufwändiger, ist die ortsspezifische Einführung einer photolabilen Schutzgruppe. MacMillan *et al.*<sup>[41]</sup> verwendeten bereits 1998 2'-modifizierte RNA als Substrat für ein Hammerhead-Ribozym. Ribozyme sind katalytisch aktive Ribonukleinsäuren und beispielsweise Bestandteile der Ribosomen oder des Spliceosoms, welches für die Prozessierung von prä-mRNA durch Entfernung der Introns verantwortlich ist. Die Substrat-RNA wird dabei durch Watson-Crick Basenpaarung an komplementäre Bereiche des Ribozyms gebunden. Hierdurch kommt es an einem definierten Nukleotid der Substrat-RNA zu einem nukleophilen Angriff der 2'-Hydroxygruppe an den 3'-Phosphordiester, was letztendlich über die Bildung eines zyklischen Zwischenproduktes zu einer Spaltung der Substrat-RNA an dieser Position führt (siehe Abbildung 12). MacMillan führte nun an eben dieser 2'-Hydroxygruppe eine photoreaktive Nitrobenzylgruppe ein und erreichte somit, dass

die Substrat-RNA aufgrund des temporären Verlustes der freien 2'-OH-Gruppe nicht mehr gespalten werden konnte. Durch Photolyse wurde die 2'-Hydroxygruppe wieder freigesetzt, was zu einer Ribozym-katalysierten Spaltung der Substrat-RNA an dem vorher geschützten Nukleotid führte.

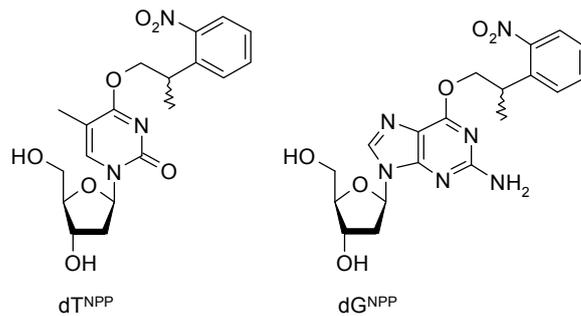


**Abbildung 12:** Die Nitrobenzylschutzgruppe blockiert die intramolekulare Hydrolyse des 3'-Phosphordiesters. Erst durch Bestrahlung mit UV-Licht und die hierdurch bedingte Abspaltung der Schutzgruppe wird die RNA gespalten.<sup>[41]</sup>

Pitsch *et al.* erweiterten kurze Zeit später das Repertoire um die kanonischen [1-(2-Nitrophenyl)-ethoxy]methyl-2'-OH photolabil geschützten Ribonukleotide und zeigten deren Anwendbarkeit in der automatisierte RNA-Festphasensynthese zur Darstellung lichtaktivierbarer RNA als Substrat für ein Ribozym.<sup>[42]</sup>

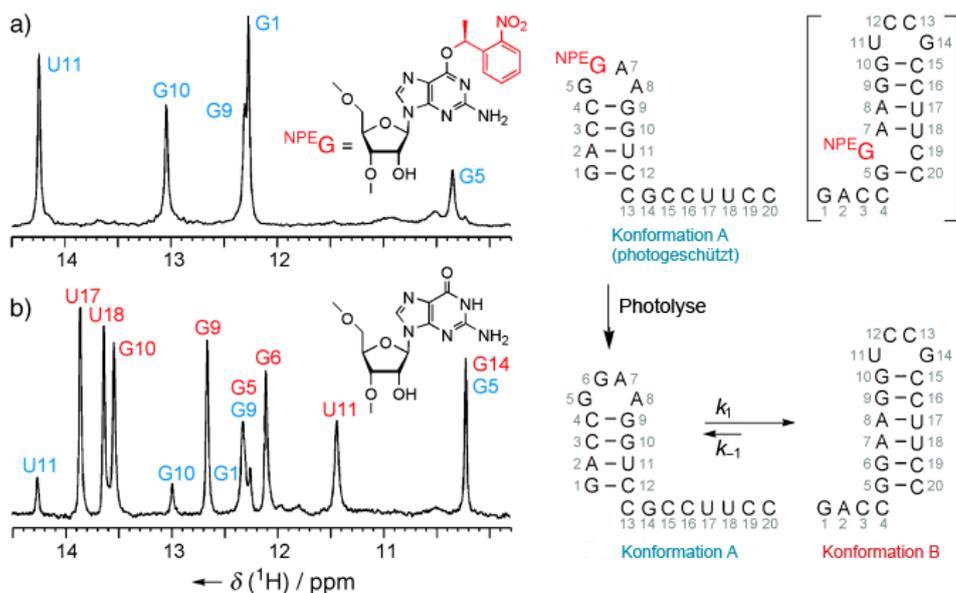
Kröck und Heckel berichteten 2005 zum ersten Mal von der Anwendung eines Nucleosids, welches an der Nucleobase photolabil geschützt war.<sup>[43]</sup> Sie konnten zeigen, dass die Einführung von NPP an der O<sup>4</sup>-Position von Desoxythymidin (dT<sup>NPP</sup>) temporär die Watson-Crick Basenpaarung verhindern kann. Somit können Prozesse wie beispielsweise die Transkription, welche auf die Basenpaarung komplementärer Nucleinsäurestränge in einer Promotorregion angewiesen ist, mit UV-Licht kontrolliert werden. Kröck und Heckel synthetisierten hierfür DNA-Sequenzen, in die sie eine verschiedene Anzahl an dT<sup>NPP</sup> einbauten. Diese DNA diente als kodierender Strang für ein DNA-Templat, das eine T7-Promotorregion besaß. Eine einzige photolabile Schutzgruppe reichte hierbei aus, um die Transkription zu inhibieren. Die Schutzgruppe verursachte eine lokale Störung der Duplexstruktur in der Promotorregion, diese konnte deshalb von der T7-Polymerase nicht erkannt werden. Erst nach Bestrahlung wurde das Transkriptionsprodukt durch T7-Polymerase gebildet.

Noch im selben Jahr publizierten Heckel und Mayer<sup>[44]</sup> ein Modellsystem, welches auf einem photoaktivierbaren  $\alpha$ -Thrombin-Aptamer beruhte. Aufgrund der sterischen Hinderung durch eine photolabile Schutzgruppe konnte das Aptamer seine antikoagulatorische Wirkung nicht mehr entfalten. Bestrahlung mit UV-Licht führte zur Photolyse und Wiederherstellung der Aptameraktivität (siehe Kapitel 3.2.1). In einer weiteren Veröffentlichung stellten<sup>[45]</sup> sie ein NPP-geschütztes Desoxyguanosin (dG<sup>NPP</sup>) vor, welches ebenfalls in die Sequenz des  $\alpha$ -Thrombin-Aptamers eingebaut wurde und auf diese Weise die Ausbildung der aktiven G-Quadruplexstruktur reversibel inhibierte.



**Abbildung 13:** Strukturformeln der photoaktivierbaren Desoxythymidin- und Desoxyguanosinderivate nach Heckel *et al.* Die Modifizierung durch die NPP-Gruppe erfolgte hierbei an den Nukleobasen, somit kann keine Watson-Crick Basenpaarung mehr erfolgen.<sup>[43,45]</sup>

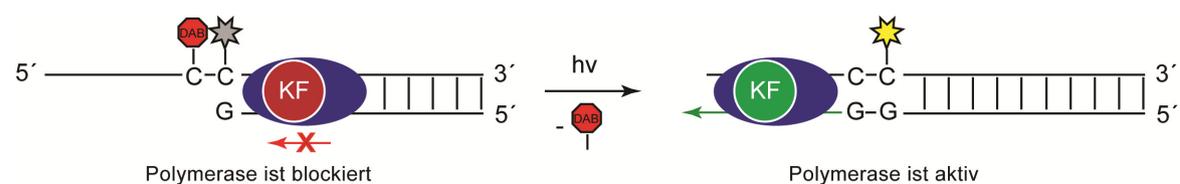
Ungefähr zur gleichen Zeit verwendeten Pitsch und Schwalbe ein an der Nukleobase NPE-geschütztes Guanosin ( $G^{NPE}$ ) für Untersuchungen zur RNA-Faltungskinetik mittels NMR-Spektroskopie.<sup>[46]</sup> Hierzu bauten sie  $G^{NPE}$  in eine 20mer RNA-Sequenz ein. Die untersuchte RNA liegt normalerweise in zwei unterschiedlichen Faltungsformen A und B vor, welche miteinander in einem temperaturabhängigen Gleichgewicht stehen. Durch die NPE-Gruppe wird in Konformation B eine Fehlpaarung erzeugt, welche diese thermodynamisch benachteiligt. Aus diesem Grund liegt die photolabil geschützte Sequenz ausschließlich in der Konformation A vor (siehe Abbildung 14), deren Iminoprotonensignale das NMR-Spektrum a) zeigt. Die Photolyse der NPE-Gruppe bewirkt, dass die thermodynamische Blockade durch die Schutzgruppe aufgehoben wird und die RNA sich umfaltet. Dies wird durch das Auftauchen der entsprechenden Iminoprotonensignale im NMR-Spektrum b) angezeigt. Mit diesem Experiment ließen sich diverse thermodynamische und kinetische Parameter der Konformationsänderung bestimmen.



**Abbildung 14:** RNA-Faltungsexperiment mit NPE-geschützter RNA nach Pitsch und Schwalbe.<sup>[46]</sup> Durch sterische Hinderung ist die RNA in der Konformation A „gefangen“ – auch wenn diese eigentlich die thermodynamisch benachteiligte Sekundärstruktur darstellt. Erst nach Photolyse kann sich das eigentliche Gleichgewicht wieder einstellen.

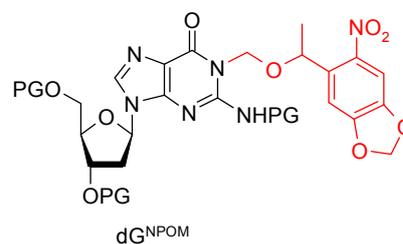
Silverman *et al.*<sup>[47]</sup> synthetisierten 2005 die übrigen NPE-geschützten kanonischen RNA-Nukleotide und zeigten die Auswirkung von C<sup>NPE</sup> auf die Tertiärstruktur einer 160mer RNA-Sequenz.

Die Arbeitsgruppe um I. Dmochowski nutzte ein photoaktivierbares Desoxycytidin für Experimente zur Primerverlängerung durch das Klenowfragment der DNA Polymerase I.<sup>[48]</sup> Hierbei erfolgte die Modifizierung des Nukleotids derart, dass die photospaltbare NPE-Gruppe zwischen einem DABSYL-Quencher und der N<sup>4</sup>-Position von Cytosin eingebaut war. Es wurde ein Templat für eine Primerverlängerung synthetisiert, in welchem das photoaktivierbare Desoxycytidin direkt zu einem fluoreszenzmarkierten Nukleotid benachbart war, somit wurde die Fluoreszenz des Fluorophors durch DABSYL gequencht. Aufgrund des sterischen Anspruchs der photoreaktiven Modifikation wurde die Polymeraseaktivität des Klenowfragments blockiert. Erst durch Belichtung erfolgte die Abspaltung dieses Hindernisses und die Wiederaufnahme der Polymeraseaktivität. Zudem ermöglichte der Verlust des Quenchers es, die Menge an verlängerter Primersequenz durch Fluoreszenzmessung zu quantifizieren. Auf diese Weise könnte die lichtabhängige Induzierung der Genexpression *in vivo* ermöglicht werden.



**Abbildung 15:** Lichtinduzierte Kontrolle der Polymeraseaktivität über ein photoaktivierbares und mit einem Quencher versehenes Desoxycytidin nach Dmochowski *et al.* (DAB = DABSYL; KF = Klenowfragment).<sup>[48]</sup>

Die Arbeitsgruppe um A. Deiters präsentierte 2006 die NPOM-Schutzgruppe<sup>[49]</sup> und demonstrierte 2008 ihre Anwendung mit N<sup>3</sup>-geschütztem Desoxyguanosin.<sup>[50]</sup> Sie verwendeten das Nucleosid in einem DNA-Ribozym mit Peroxidaseaktivität und konnten zeigen, dass diese hierdurch lichtabhängig von vollständig inaktiv zu komplett aktiv moduliert werden konnte.



**Abbildung 16:** Von Deiters *et al.* entwickeltes dGNPOM – basierend auf einer modifizierten DMNPE-Schutzgruppe. Die Verknüpfung über einen Oxymethyllinker an N<sup>3</sup> führt durch Belichtung allerdings zur Abspaltung eines Formaldehydmoleküls (PG = Schutzgruppe).<sup>[49]</sup>

In einer weiteren Publikation erlaubte der Einbau von NPOM-geschütztem Desoxythymidin in eine Antisense-DNA die lichtgesteuerte Kontrolle der Antisenseaktivität. Als Modellsystem diente hierbei die Expression von *Renilla* Luciferase in murinen Fibroblasten.<sup>[51]</sup>

Bereits 2007 verbesserten Mikat und Heckel<sup>[52]</sup> die Technik photoaktivierbarer siRNA. Im Gegensatz zu Friedman *et al.* verwendeten sie hierzu die ortsspezifische Schützung eines einzelnen Nukleotides innerhalb des RNA-Stranges und erreichten ein wesentlich verbessertes Aus/An-Verhalten als bei einer statistischen Schützung des Phosphatrückgrates. Sie ersetzten in zentraler Position (Nukleotid 10/11) einer 21mer siRNA ein Ribonukleotid durch dG<sup>NPP</sup> und konnten somit zeigen, dass der resultierende siRNA/mRNA Doppelstrang nicht von RISC abgebaut werden kann. Als Modellsystem diente hierbei die Expression von eGFP in HeLa-Zellen. Der RNAi-Mechanismus war so lange blockiert, bis eine Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht erfolgte. Dies induzierte die Photolyse der Schutzgruppe und es erfolgte ein Abbau der mRNA durch RISC, was sich durch die Abnahme der eGFP-Fluoreszenz beobachten ließ.

Komiyama *et al.*<sup>[53]</sup> nutzten u.a. dT<sup>NPP</sup> und dT<sup>NPOM</sup> für die ortsspezifische Terminierung der Polymerase-Kettenreaktion. Auch hier diente die Schutzgruppe kurz vor dem jeweiligen 3'-Ende des Primerstranges als „Stopper“, so dass als PCR-Produkt doppelsträngige DNA-Sequenzen mit sogenannten „sticky ends“ zur direkten Ligation in ein Vektorplasmid erhalten wurden. Dieses Verfahren verzichtet also auf die Verwendung von Restriktionsenzymen zur Herstellung der „sticky ends“. Ganz ähnlich verfahren Deiters *et al.*<sup>[54]</sup> 2009 bei der Entwicklung eines Mutageneseprotokolls, welches photoaktivierbare Primer verwendet und Restriktionsenzyme ebenfalls überflüssig macht.

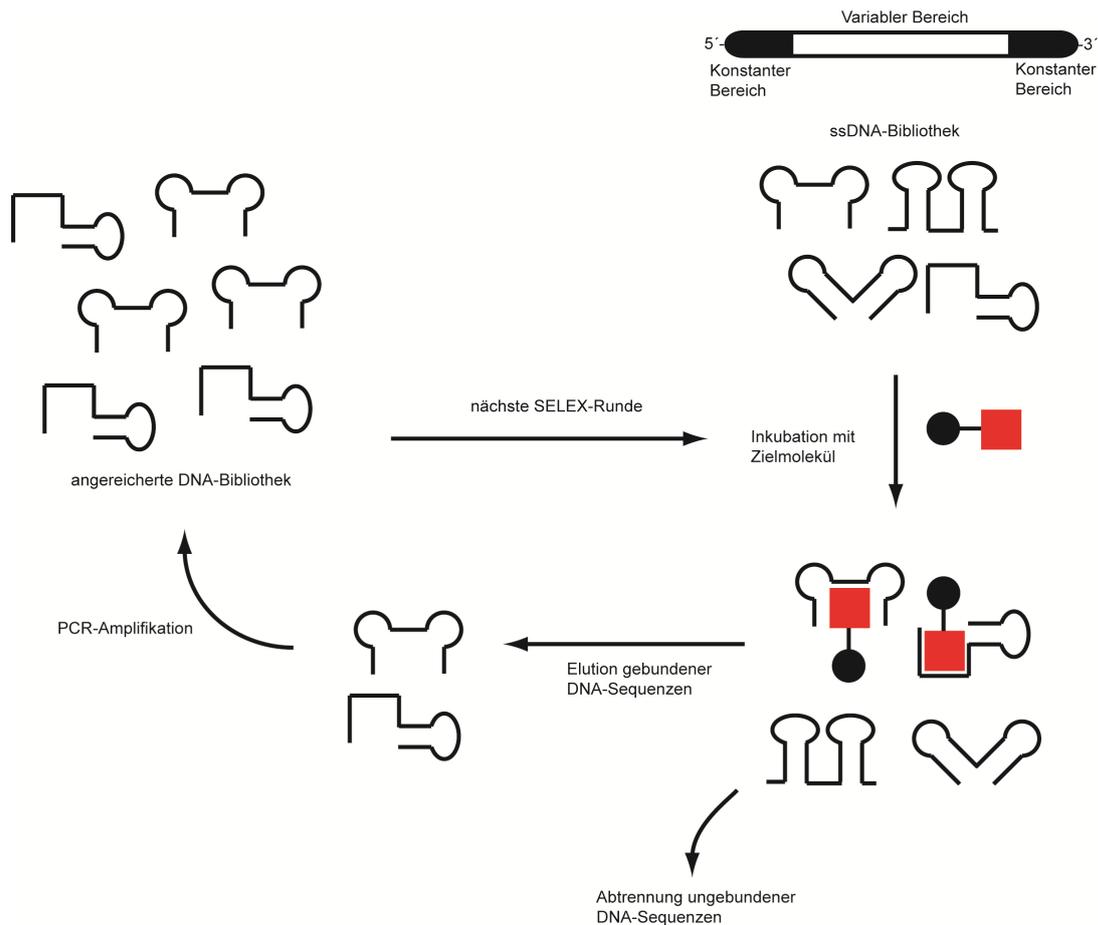
Eine weitere elegante Methode neben der beschriebenen Schützung des Phosphatrückgrates bzw. der Nukleobasen ist die Induzierung von Strangbrüchen durch Licht.<sup>[55]</sup> Das Prinzip sei an einer kürzlich veröffentlichten Arbeit von Dmochowski *et al.*<sup>[56]</sup> illustriert. Diese publizierten 2008 eine photoaktivierbare Antisensesequenz zur Regulierung der Genexpression in menschlichen Leukämiezellen. Hierzu verwendeten sie einen photospaltbaren Linker, über den ein phosphorothiolierter Antisensestrang und ein komplementärer Sensestrang miteinander verknüpft wurden. Der Antisensestrang war somit mit dem Sensestrang über eine Haarnadelstruktur hybridisiert und zeigte wenig Affinität zur Ziel-mRNA. Belichtung verursachte nun eine Spaltung des Linkers und Freisetzung der asDNA, welche zu einem Abbau der Ziel-mRNA durch RNase-H führte. Hierbei konnte jedoch nur die halbe Aktivität im Vergleich zur unmodifizierten Kontroll-asDNA erzielt werden.

## 1.6 Aptamere als therapeutische Oligonukleotide

Aptamere sind kleine einzelsträngige Nucleinsäuren, welche mit hoher Affinität und Spezifität an ihre Zielmoleküle binden. Dies können sowohl sogenannte „kleine Moleküle“ sein, als auch ganze Proteine oder Zelltypen.<sup>[57,58]</sup> Aptamere besitzen eine wohldefinierte, dreidimensionale aktive Konformation, hierzu zählen u.a. Haarnadelstrukturen, Pseudoknoten oder G-Quadruplexe.<sup>[59]</sup>

Die Selektion von Aptameren gegen ein bestimmtes Zielmolekül kann *in vitro* durch den sogenannten SELEX-Prozess („Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment“) erfolgen.<sup>[60]</sup> Entwickelt wurde diese Methodik von Tuerk und Gold im Jahr 1990 für die Selektion eines RNA-Aptamers, das an die T4-DNA-Polymerase bindet.<sup>[61]</sup> Zeitgleich beschrieben Ellington und Szostak ebenfalls RNA-Sequenzen, die spezifisch organische Farbstoffmoleküle erkennen und bezeichneten diese RNAs als „Aptamere“ (lat. „aptus“ = passend und griech. „meros“ = der Teil).<sup>[62]</sup>

Ausgangspunkt des SELEX-Prozesses ist eine kombinatorische ssDNA-Bibliothek, welche typischerweise  $10^{14}$ - $10^{16}$  unterschiedliche Sequenzen enthält. Die Sequenzen bestehen beispielsweise aus einer ~40 nt Zufallsregion – hier wurden während der chemischen Festphasensynthese an jeder Position die vier kanonischen Basen mit gleicher Wahrscheinlichkeit eingebaut – und je einer konstanten Region am 3'- bzw. 5'- Ende, an welcher sich Primer für die Vervielfältigung der Nucleinsäuresequenz anlagern können. Die konstanten Bereiche enthalten häufig Restriktionsschnittstellen für die spätere Klonierung der selektierten Aptamere. Im Falle der Selektion von RNA-Aptameren muss in der konstanten Region am 5'- Ende noch eine Promotersequenz für die Transkription des DNA-Templates in RNA vorhanden sein. Zur Selektion eines DNA-Aptamers erfolgt eine Inkubation der Nucleinsäurebibliothek mit dem Zielmolekül, beispielsweise einem Protein. Anschließend werden die nicht gebundenen Sequenzen von den Protein-gebundenen Sequenzen abgetrennt, im einfachsten Fall durch Affinitätschromatographie oder Filtration über Nitrocellulosepapier. Die Protein-gebundene DNA wird durch Waschschriffe eluiert und mittels PCR vervielfältigt. Die auf diese Weise erhaltene Nucleinsäurebibliothek ist nun mit spezifisch an das Protein bindenden DNA-Sequenzen angereichert und wird in einer nächsten Runde wieder mit dem Zielprotein inkubiert. Durch ansteigende Stringenz des Waschschriffes werden nach 8-12 Runden diejenigen Sequenzen der ursprünglichen Bibliothek isoliert, welche hochspezifisch und hochaffin an das Protein binden – häufig mit Dissoziationskonstanten im niedrigen nano- oder gar picomolaren Bereich. Ein Sequenzvergleich führt zu gemeinsamen Konsensusmotiven, auf welche die Aptamersequenzen reduziert werden können. Heutzutage können die einzelnen Schritte vollautomatisch mit Hilfe von Syntheserobotern durchgeführt werden.<sup>[63]</sup>

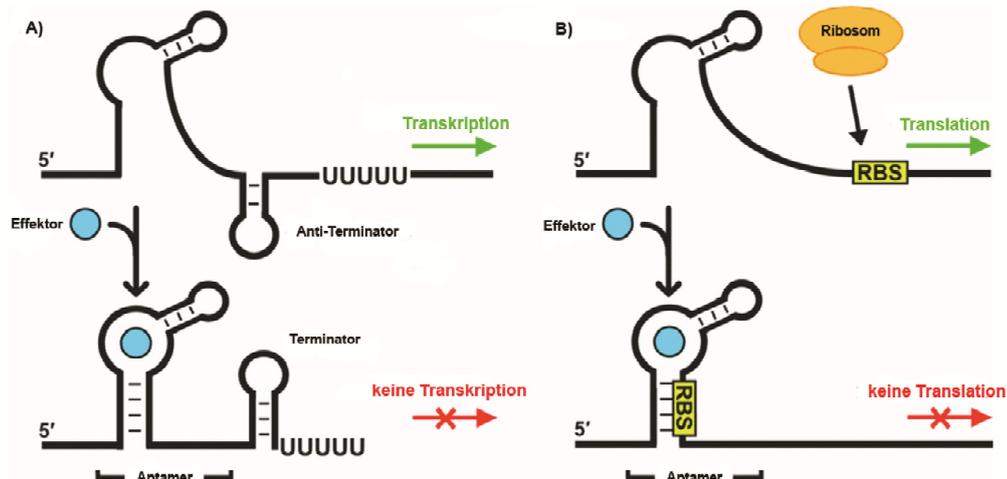


**Abbildung 17:** Vereinfachte Darstellung des SELEX-Prozesses zur Gewinnung eines DNA-Aptamers.

Aptamere für diagnostische und therapeutische Anwendungen stehen in direkter Konkurrenz zu Antikörpern. Aptamere bieten gegenüber letzteren jedoch einige Vorteile. Die Selektion eines Aptamers kann gegen nahezu jedes denkbare Zielmolekül erfolgen, hierzu zählen auch Toxine und Strukturen, welche nicht immunogen und deshalb für die Adressierung durch Antikörper nicht geeignet sind. Zudem erfolgt der SELEX-Prozess *in vitro*, während Antikörper im Tierorganismus entwickelt werden müssen. Aptamere sind nicht toxisch und rufen auch keine Immunantwort hervor. Die chemische Synthese einer einmal identifizierten Aptamersequenz garantiert eine gleichbleibende Qualität und Wirkung des Aptamers. Hingegen variiert bei Antikörpern häufig die Qualität verschiedener Produktionschargen. Antikörper sind zudem nicht temperaturresistent und besitzen eine begrenzte Haltbarkeit.<sup>[64]</sup>

Ein Nachteil der Aptamertechnologie ist die Unwägbarkeit des Erfolges eines SELEX-Prozesses gegen ein bestimmtes Zielprotein *a priori*. Dessen Struktur bestimmt darüber, ob die Selektion eines Aptamers erfolgreich sein kann. So sind Proteine, welche unter physiologischen Bedingungen positiv geladen sind generell gute Kandidaten, während sich eine SELEX bei Proteinen mit einem pI-Wert kleiner als 7 schwierig gestaltet.<sup>[58]</sup>

In der Natur sind Aptamersequenzen u.a. Bestandteil von sogenannten Riboswitches. Riboswitches zählen zu den regulatorischen RNAs und befinden sich meist in den untranslatierten Bereichen (UTRs) von prokaryotischer mRNA. Durch die Bindung eines Effektormoleküls und die dadurch induzierte Konformationsänderung kontrollieren sie beispielsweise die Translation oder auch Transkription ihrer mRNA.<sup>[65]</sup> Interessanterweise erfolgte erstmals die artifizielle Konstruktion von Riboswitches, bevor die natürlich vorkommenden Pendanten entdeckt wurden.<sup>[66]</sup> Das Prinzip eines Riboswitches ist anhand von Transkription und Translation in Abbildung 18 veranschaulicht.



**Abbildung 18:** A) In Abwesenheit des Effektormoleküls kann die Transkription des Gens erfolgen. Wird der Effektor hingegen gebunden, dann bildet sich eine Terminatorstruktur, welche die Anlagerung der Polymerase für die Transkription blockiert. B) In Abwesenheit des Effektormoleküls ist die Ribosomen-Bindungsstelle (RBS) für das Ribosom zugänglich, somit erfolgt die Translation des Gens. Durch Bindung des Effektors durch die Aptamerdomäne kommt es zu einer Konformationsänderung des Riboswitches, woraufhin die RBS nicht mehr zugänglich ist. Somit kann auch keine Translation erfolgen.<sup>[67]</sup>

Riboswitches fungieren oft im Sinne einer negativen Rückkopplung, da der Effektor – beispielsweise Vitamin B<sub>12</sub><sup>[68]</sup>, Thiaminpyrophosphat (TPP), Flavinmononukleotid (FMN)<sup>[69]</sup> oder Purine<sup>[70]</sup> – häufig das Stoffwechselprodukt des Proteins ist, dessen Synthese der Riboswitch moduliert.

Aptamerdomänen sind zudem seit den 1980er Jahren als Teil von retroviraler RNA bekannt. Das HI-Virus besitzt zum Beispiel ein „*trans*-activation response“ (TAR) Element als Bestandteil seiner mRNA. TAR bindet mit hoher Affinität das virale Tat-Protein – dies führt zu einer Beschleunigung der Virusreplikation durch die Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren wie Cyclin T1. Hierbei ist Tat sowohl für die RNA-Polymerase-II vermittelte Transkription der viralen Gene notwendig, als auch für die reverse Transkription der viralen RNA in provirale DNA.<sup>[71]</sup> Sullenger *et al.*<sup>[72]</sup> konnten 1990 zeigen, dass die Überexpression der TAR-Sequenz in CD4<sup>+</sup> T-Zellen die HIV-Tat vermittelte Virusreplikation *in vitro* inhibieren kann. Hierbei fungierten die exprimierten TAR-Sequenzen als Köder („decoys“) für Tat und fingen das Protein ab, bevor es mit der TAR-Domäne auf der viralen RNA interagieren konnte. Dieses Beispiel illustriert, welches großes therapeutisches Potential Aptamere besitzen. Bis heute wurden eine Vielzahl von Aptameren gegen therapeutisch relevante Zielmoleküle selektiert,<sup>[73]</sup> hierzu zählen HIV-1 Reverse-Transkriptase,<sup>[74]</sup> der Erreger der Schlafkrankheit,<sup>[75]</sup>

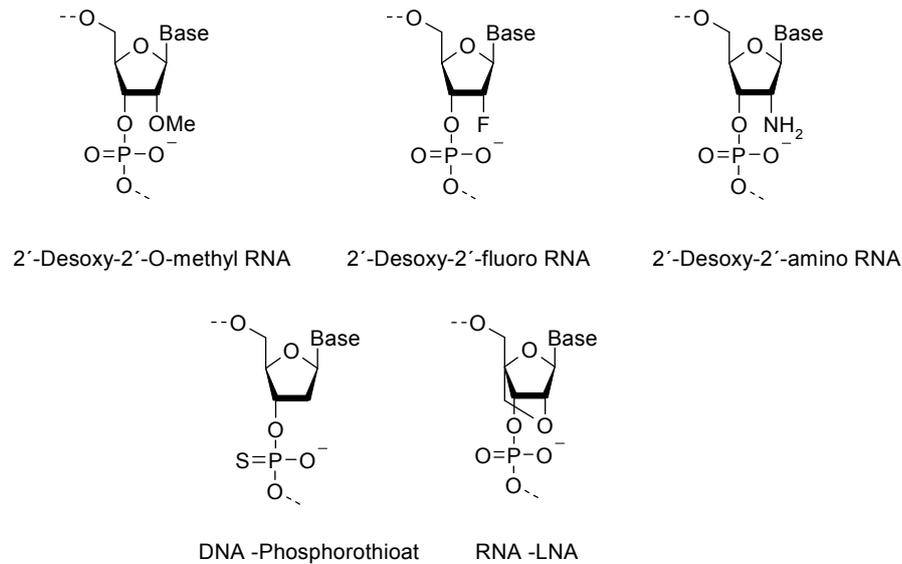
Blutgerinnungsfaktoren wie  $\alpha$ -Thrombin<sup>[76]</sup> oder der von-Willebrand Faktor,<sup>[77]</sup> Wachstumsfaktoren<sup>[78]</sup> und Immunmodulatoren wie Interferon- $\gamma$ .<sup>[79]</sup>

Da Nukleinsäuren aufgrund ihrer hohen negativen Ladung kaum membrangängig sind und somit nicht in Zellen internalisiert werden, eignen sich Aptamere hauptsächlich bei der Adressierung extrazellulärer Proteine als Therapeutikum. Hierbei ist es vorteilhaft, dass Nukleinsäuren während ihrer chemischen Synthese mit diversen Modifikationen versehen werden können, um ihre Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit zu verbessern.<sup>[80]</sup> Ein großes Problem bei der therapeutischen Anwendung von Oligonukleotiden – und hier im besonderen von Ribonukleinsäuren – ist deren geringe Halbwertszeit im Serum, bedingt durch Nukleaseverdau. Um eine weitgehende Nukleaseresistenz zu erreichen, erfolgt bei *in vivo* angewandten Ribonukleinsäuren wie siRNAs häufig der Einbau von 2'-Fluoro-, 2'-Amino-, oder 2'-O-Methylnukleotiden. Möglich ist auch eine Modifikation des Phosphatrückgrates, wie beispielsweise bei Antisense-DNA.<sup>[33]</sup> Die am weitesten verbreitete Modifikation ist dabei der Ersatz der verbrückenden Phosphatgruppen durch Phosphorothioate (siehe Abbildung 19).

Es ist allerdings zu beachten, dass der vollständige Austausch der 2'-Hydroxygruppe durch 2'-O-Methylgruppen zur Änderung der aktiven Nukleinsäurekonformation (d.h. Änderung der Helixstruktur) führen kann, während andererseits eine Fluormodifikation keine negativen Auswirkungen zeigt. Durch die Modifikationen kann der Wirkmechanismus zudem generell beeinflusst werden. So bildet 2'-modifizierte siRNA unter Umständen keine A-Helix mehr aus, welche essentiell für ihre Erkennung durch den aktivierten RISC ist.<sup>[81]</sup> Phosphorothioat-modifizierte asDNA/mRNA-Duplexe werden von RNase-H nicht mehr abgebaut. Deshalb erfolgt die Modifizierung oft nur bei den ersten Nukleotiden am 3'- bzw. 5'- Ende. Zudem zeigen einige Modifikationen zytotoxische Eigenschaften.

Im Falle von RNA-Aptameren können 2'-modifizierte Nukleotide bereits zur SELEX verwendet werden, es sind Mutanten der T7-Polymerasen verfügbar, welche eine Inkorporation von 2'-Fluoro und 2'-O-Methylnukleotiden erlauben.<sup>[82]</sup> Von Nachteil ist jedoch, dass die modifizierten Nukleinsäuren nicht als Templat für die reverse Transkription während des SELEX-Prozesses geeignet sind.

Ein noch recht neues Konzept basiert auf „Locked Nucleic Acids“ (LNAs).<sup>[83]</sup> LNA-Nukleotide bestehen aus Riboseeinheiten, in welchen der 2'-Sauerstoff mit dem 4'-Kohlenstoffatom über eine Methyleneinheit verbrückt ist. Der Zucker ist somit fixiert und der 3'-Kohlenstoff befindet sich einer 3'-*endo* Konformation. Diese Bausteine können wie gewöhnliche Nukleoside in der Festphasensynthese eingesetzt werden. Der Vorteil der LNAs ist u.a. ihre vollständige Resistenz gegenüber Nukleasen.<sup>[84]</sup> Kürzlich zeigten Wengel und Vester auch ihre Kompatibilität mit der PCR-Technik.<sup>[85]</sup> Somit erscheint es möglich, LNAs im SELEX-Prozess zur Entwicklung von Aptameren einzusetzen.<sup>[86]</sup>



**Abbildung 19:** Einige gängige Modifikationen zur Erhöhung der Nukleaseresistenz von Nukleinsäuren.

Spiegelmer stellen eine weitere interessante Klasse von Nukleinsäuren mit therapeutischem Potential dar.<sup>[87]</sup> Bei ihnen ist D-Ribose gegen L-Ribose ausgetauscht. Aufgrund dieser chiralen Inversion werden Spiegelmer ebenfalls nicht von Nukleasen erkannt. Für die Selektion eines Spiegelmer-Aptamers werden chemisch synthetisierte Protein(domänen) aus unnatürlichen D-Aminosäuren verwendet, die Nukleinsäurebibliothek des SELEX-Prozesses besteht hingegen aus natürlichen D-Ribonukleinsäuren. Hat man nun ein D-Aptamer selektiert, welches an das unnatürliche Protein bindet, so bindet das entsprechende L-Aptamer aus L-Ribonukleotiden an das natürlich vorkommende Protein aus L-Aminosäuren. Die Anwendung dieses Konzeptes ist insofern limitiert, dass die Synthese des D-Peptides zur Selektion nur in begrenztem Umfang erfolgen kann.

Aufgrund ihrer meist geringen Größe werden Aptamere relativ schnell renal ausgeschieden. Um die Zirkulationsdauer im Blutkreislauf zu erhöhen, können sie beispielsweise mit Polyethylenglycolen modifiziert werden.<sup>[88]</sup>

Als erstes und bisher einziges therapeutisches Aptamer wurde Pegaptanib (Macugen®, *Pfizer*) 2004 von der FDA zur Anwendung am Menschen zugelassen.<sup>[89]</sup> Es handelt sich um ein 27mer RNA-Aptamer. Durch den Einbau von 2'-Desoxy-2'-Fluoropyrimidinen, 2'-O-Methylmodifikationen und einem inversen 3'-3'-dT Capping ist es resistent gegenüber dem Abbau durch Nukleasen. Zudem erfolgte die Einführung einer 40 kDa Polyethylenglycolkette am 5'-Ende, um eine schnelle Ausscheidung über die Niere zu verhindern. Pegaptanib bindet an die 165 AS Isoform des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und verhindert so dessen Wirkung als Signalmolekül in der Angiogenese. Pegaptanib wird deshalb zur Behandlung der feuchten Form der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) eingesetzt, die Applikation erfolgt hierbei intravitreal in sechswöchigem Abstand.

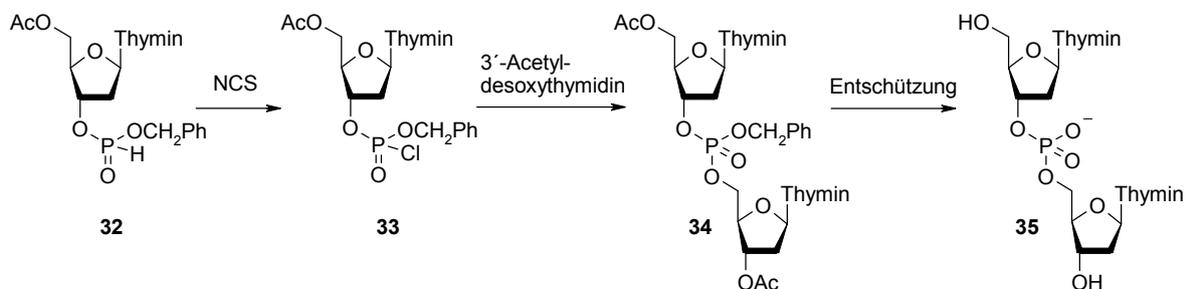
Leider kann das Aptamer den Krankheitsfortschritt nur stoppen und einmal verloren gegangene Sehkraft nicht wieder herstellen. Zudem ist die Therapie im Vergleich mit den ebenfalls zur AMD-Behandlung zugelassenen Antikörpern Ranibizumab und Bevacizumab erheblich teurer. Die folgende Tabelle 1 gibt einen Überblick über weitere Aptamere, welche sich zurzeit in klinischen Studien befinden.

Aptamer	Zielmolekül	Indikation
NOX-B11	Ghrelin	Adipositas
E-10030	Platelet-Derived-Growth-Factor (PDGF)	AMD
NU172	Thrombin	Koronararterien-Bypass Operation
ARC1779	von-Willebrand Faktor	Akutes Koronarsyndrom
AS1411	Nukleolin	Akute myeloische Leukämie
REG1	Christmas-Faktor	Koronararterien-Bypass Operation

**Tabelle 1:** Übersicht über Aptamere, welche sich zurzeit in der klinischen oder vorklinischen Prüfung befinden.<sup>[58]</sup>

## 1.7 Chemische Festphasensynthese von Desoxynukleinsäuren

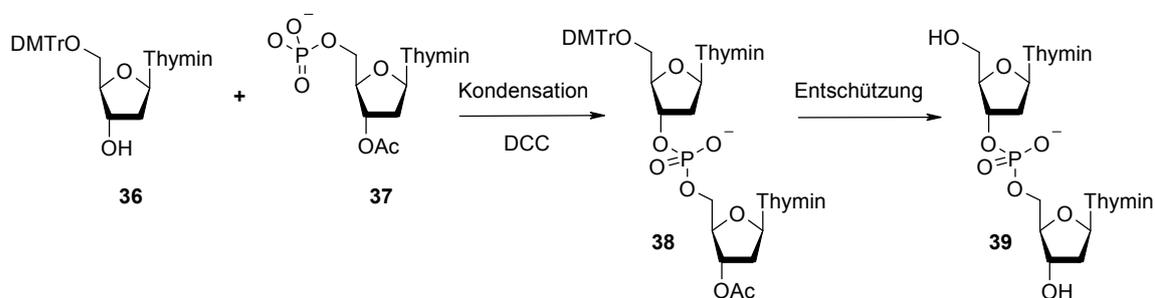
Die chemische Synthese von Nukleinsäuren war für lange Zeit eine große Herausforderung für den organischen Chemiker. So war zum Beispiel unklar, ob die Phosphatgruppe die Nukleoside 3' → 5' oder 2' → 5' miteinander verbindet. Nach der Aufklärung der Struktur der DNA durch Watson und Crick im Jahre 1953<sup>[90]</sup> gelang im Laboratorium von A. Todd an der Cambridge Universität die erstmalige Synthese einer natürlichen 3' → 5' Internukleotidverknüpfung zwischen zwei Desoxythymidinen.<sup>[91]</sup> Hierzu wurde das Phosphonat **32** mit *N*-Chlorsuccinimid aktiviert und das resultierende Phosphorchloridat **33** mit 3'-acetylgeschütztem Desoxythymidin zur Reaktion gebracht. Aus dem entstandenen Phosphotriester **34** erhielt man durch Entschützung das d(TpT)-Dinukleotid **35**.



**Abbildung 20:** Syntheseweg zur ersten Darstellung eines Desoxythymidindinukleotides durch Todd *et al.*<sup>[91]</sup>

Diese Reaktion zur Darstellung der Phosphatverknüpfung wurde später zur Phosphortriestermethode weiterentwickelt. Es zeigte sich aber bereits die Notwendigkeit, dass wichtige Funktionalitäten vorübergehend mit Schutzgruppen versehen werden müssen. Letsinger *et al.*<sup>[92,93]</sup> führten Mitte der 1960er Jahre die Cyanoethylgruppe zur Schützung der Phosphatgruppe bei Experimenten zur Synthese von Dinukleotiden auf Festphasenmaterial ein. Diese erwies sich jedoch als zu labil unter den Bedingungen der Phosphortriestermethode in flüssiger Phase. Heutzutage ist sie hingegen die Schutzgruppe der Wahl in der automatisierten Festphasensynthese.

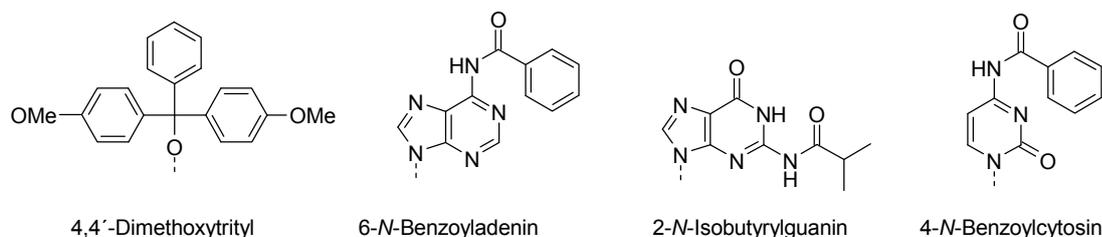
1956 veröffentlichten Khorana *et al.*<sup>[94,95]</sup> eine grundverschiedene Vorgehensweise, welche die Kondensation eines 5'-DMTr-geschützten Nukleosids **36** mit einem 3'-acetylgeschützten Mononukleotid **37** beinhaltet. Als Kondensationsreagenz dienten beispielsweise DCC oder *p*-TsCl. Der entstandene Phosphodiester **38** wurde durch Entschützung in d(TpT) **39** überführt.



**Abbildung 21:** Phosphodiestermethode nach Khorana *et al.*<sup>[94,95]</sup>

Diese Phosphordiestermethode wurde weiter verbessert, unter anderem durch die Verwendung verschiedenster Kupplungsreagenzien, und bereits in den 1960er Jahren für den schritt- bzw. blockweisen Aufbau von kleinen Oligonukleotiden adaptiert. Hierbei betragen die isolierten Ausbeuten etwa 50-70 % pro Reaktionsschritt.<sup>[96]</sup> Auch die Synthese von RNA-Oligonukleotiden war mit dieser Methode bereits möglich. Es resultierten allerdings Nebenreaktionen aus den geladenen, ungeschützten Phosphatgruppen, welche umso stärker in Erscheinung traten, je länger das Oligomer wurde.

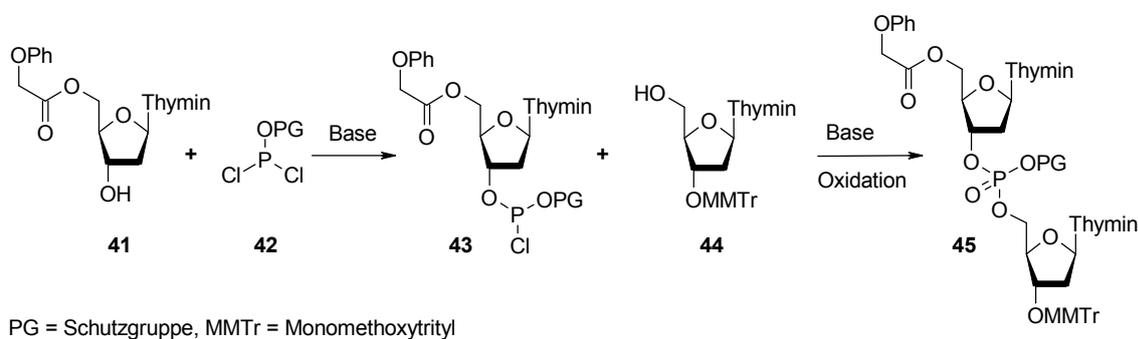
Der große Verdienst Khoranas lag unter anderem in der Einführung von Schutzgruppen für die 5'-Hydroxyfunktion, sowie den exozyklischen Aminogruppen der Nucleobasen, wie sie bis heute standardmäßig in der automatisierten Festphasensynthese verwendet werden. Hierzu zählen die 4,4-Dimethoxytritylgruppe sowie die Acetylschutzgruppen für Adenin, Cytosin und Guanin (s. Abbildung 22). Sie sind essentiell, um unerwünschte Nebenreaktionen der nukleophilen exozyklischen Aminofunktionalitäten der Nucleobasen während der Reaktionsfolge zu verhindern. Mit der Synthese von DNA-Oligomeren leisteten Khorana und seine Mitarbeiter zudem einen entscheidenden Beitrag zur Entschlüsselung des genetischen Codes.<sup>[97]</sup>



**Abbildung 22:** Schutzgruppen für 5'-Hydroxygruppe und Nucleobasen nach Khorana.

In den 1970er Jahren wurden einige Fortschritte zur Verbesserung der Phosphortriestermethode erzielt. So erfolgte die Einführung von Phosphorylierungsreagenzien, welche der Überführung der 5'-geschützten Desoxynucleoside in die aktivierten Phosphate dienen und auf Imidazol, Triazol und Tetrazol basieren. Das von Reese *et al.*<sup>[98]</sup> vorgestellte Kupplungsreagenz MSNT war hierbei lange Zeit das Standardreagenz, sowohl bei der Synthese in flüssiger Phase, als auch später in der Festphasensynthese von Nucleinsäuren.

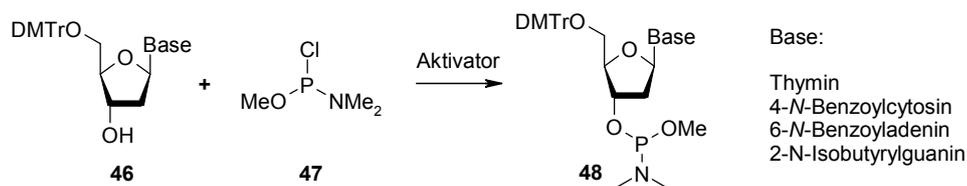
Letsinger und Lunsford berichteten 1976 von der Verwendung dreiwertiger Phosphorspezies, welche sich als viel reaktiver als die fünfwertigen Acylierungsmittel erwiesen.<sup>[99]</sup> Sie setzten 5'-geschütztes Desoxythymidin **41** bei  $-78^{\circ}\text{C}$  mit einem Phosphordichloridit **42** zum reaktiven Intermediat **43** um, welches dann mit 3'-MMTr-geschütztem Desoxythymidin **44** reagierte. Anschließend erfolgte die Oxidation des P(III) zum P(V) mit wässriger Iodlösung zum geschützten Dinucleotid **45**.



**Abbildung 23:** Die Phosphitriestermethode nach Letsinger und Lunsford.<sup>[99]</sup>

Die Bedeutung der Phosphite wurde von Beaucage und Caruthers<sup>[100]</sup> erkannt. Sie verbesserten die Methode, indem sie das hydrolyseempfindliche Phosphorochloridit **43** durch ein sogenanntes Phosphoramidit **48** ersetzen. Die Phosphoramidite der vier kanonischen Basen wurden von ihnen sowohl für Kupplungen mit 3'-geschützten Nucleosiden in flüssiger Phase als auch mit, an Kieselgel gebundenem und geschütztem, Desoxyguanosin verwendet. Als Aktivator für die Amidite eignete sich 1*H*-Tetrazol, die Umsätze zu den gewünschten Dinucleotiden erfolgten quantitativ. Zur Verbesserung der Stabilität wurde die *N,N*-Dimethylamino-Gruppe später durch *N,N*-Diisopropylamin ersetzt – dies macht die Amidite weitgehend hydrolyseresistent, so dass ihre Aufbewahrung als Feststoff und, für eine begrenzte Zeit, in Lösung erfolgen kann. Zudem ist die gefahrlose Aufreinigung mit leicht saurem Kieselgel möglich. Die Darstellung dieser Amidite gelang aus dem

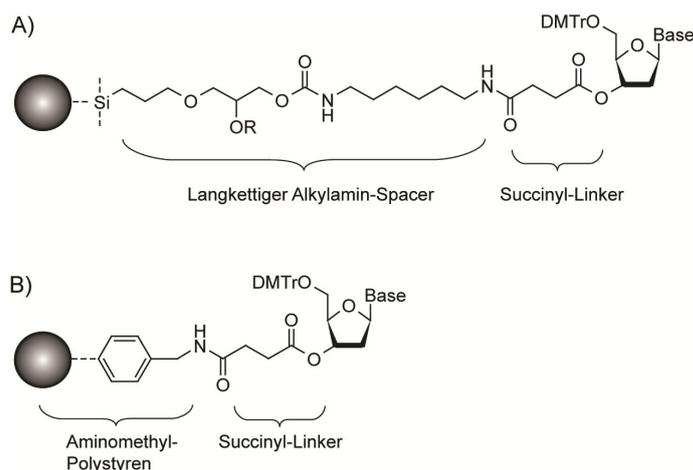
geschützten Nucleosid **46** durch Reaktion der freien 3'-Hydroxygruppe mit dem Phosphitylierungsreagenz **47**.



**Abbildung 24:** Die ersten Phosphoramidite von Beaucage und Caruthers und das verwendete Phosphitylierungsmittel **47**.<sup>[100]</sup>

Die Adaptierung der Festphasensynthese nach MERRIFIELD<sup>[101]</sup> für die Synthese von Oligonucleotiden – hier sei im Besonderen auf die Arbeiten von Letsinger *et al.*<sup>[92]</sup> verwiesen – in Kombination mit der sehr effizienten Phosphoramiditchemie führten zu der automatisierten Oligonucleotidfestphasensynthese, wie sie heutzutage routinemäßig angewandt wird. Diese Entwicklung bedeutet eine Verkürzung der Synthesedauer eines DNA-20mers von etwa zwei Jahren zu Beginn der Phosphordiestermethode auf heute 100 Minuten!<sup>[102,103]</sup>

Die automatisierte DNA-Synthese ist ein repetitives Verfahren, bei welchem die gewünschte Nucleotidsequenz durch schrittweise Kondensation der einzelnen Nucleotide an das wachsende Oligomer erhalten wird. Die Synthese erfolgt auf der festen Phase, hierfür werden routinemäßig sogenanntes „controlled pore glass“<sup>[104]</sup> (CPG) oder aber stark quervernetztes Polystyrenharz<sup>[105]</sup> (PS) verwendet. CPG ist mit unterschiedlichen Porengrößen erhältlich, welche je nach Länge des zu synthetisierenden Oligonucleotides gewählt werden (meist 500 oder 1000 Å, für Oligomere von 50-60 bzw. 100-150 Nucleotide). Diese Materialien besitzen keinerlei Quellvermögen, vielmehr sind die Bindungsstellen für die Synthesereagenzien permanent zugänglich. Über einen „spacer“ und „linker arm“ ist das erste Nucleosid mit seiner 3'-Hydroxygruppe an das Festphasenmaterial gebunden (siehe Abbildung 25). Die chemische Synthese erfolgt also – im Gegensatz zu der natürlichen DNA-Synthese durch Polymerasen – in 3' → 5' Richtung.



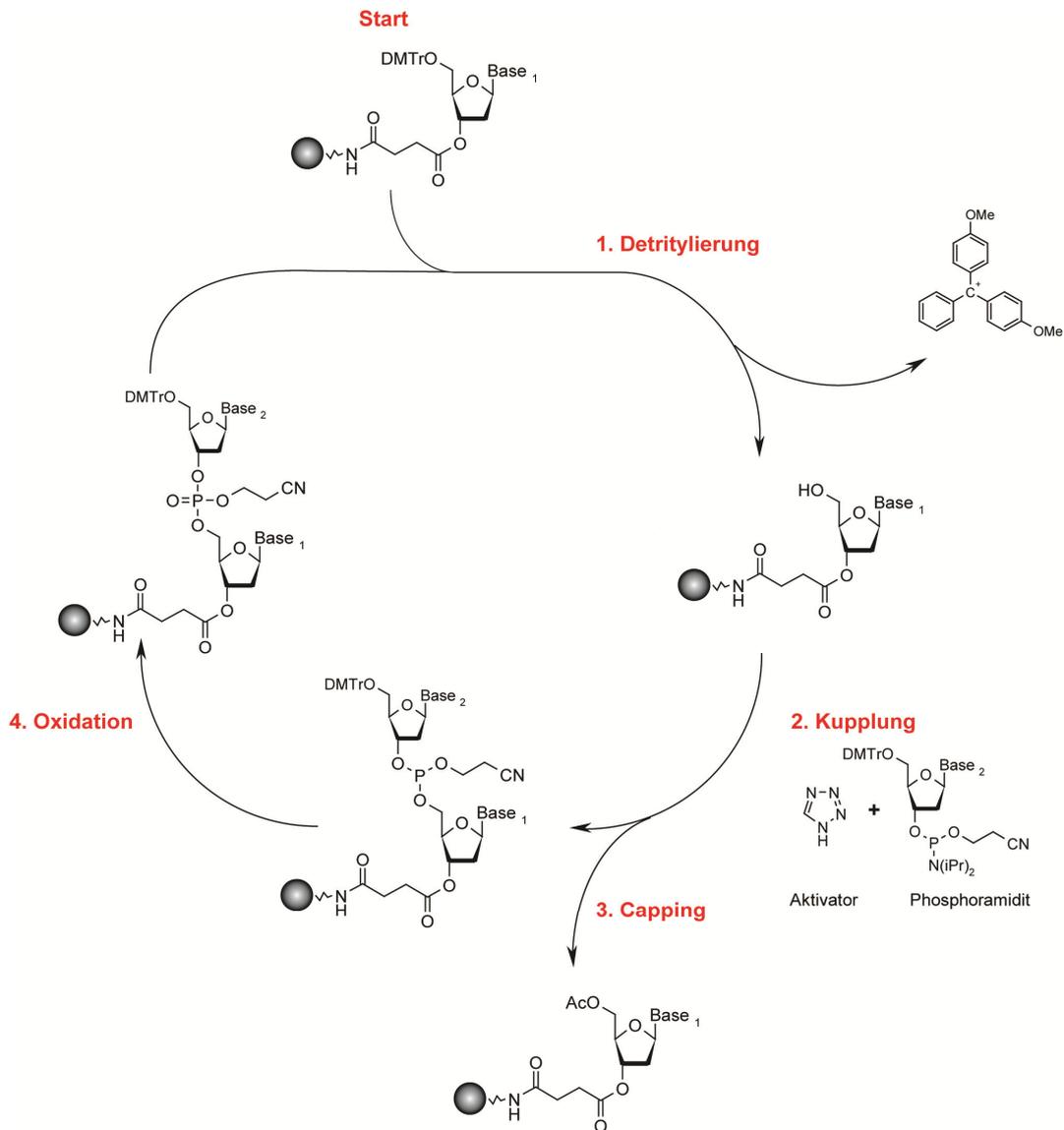
**Abbildung 25:** Struktur von zwei häufig zur Oligonukleotidfestphasensynthese genutzten Linkern. A) CPG-Material, derivatisiert mit einem langkettigen Alkylamin-Spacer („long-chain alkylamin spacer“, LCAA) und basenlabilem Succinyl-Linker. B) Polystyren-Material, ebenfalls mit Succinyl-Linker (nach: *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, John Wiley & Sons, Vol.1, Kapitel 3.1.6).

Der erste Schritt der automatisierten Oligonukleotidsynthese (siehe Abbildung 26) besteht in der Entschützung der 5'-Hydroxygruppe des an das Festphasenmaterial gebundenen ersten Nucleosids. Hierfür wird eine organische Säure wie Trichloressigsäure in Dichlormethan verwendet. Das hierbei gebildete, leuchtend orange 4,4'-Dimethoxytritylkation kann durch eine photometrische Konzentrationsbestimmung oder auch Leitfähigkeitsmessung direkt dazu verwendet werden, die Ausbeute der Kupplungsreaktion zu ermitteln.

Als nächstes erfolgt die Reaktion der freien 5'-Hydroxygruppe mit dem aktivierten Phosphoramidit des Folgenucleotids. Hierzu muss das Amidit durch einen Katalysator aktiviert werden. Am weitesten verbreitet ist die Verwendung von schwach saurem 1*H*-Tetrazol.<sup>[106]</sup> Zunächst wird die *N,N*-Diisopropylamingruppe durch die schwache Säure reversibel protoniert. Anschließend erfolgt ihre nukleophile Substitution durch das Tetrazolid. Das entstandene Phosphorotetrazolid fungiert als die eigentliche aktive Spezies und reagiert rasch und nahezu quantitativ mit der freien 5'-Hydroxygruppe ab. Neben 1*H*-Tetrazol sind noch eine Reihe weiterer Verbindungen als Aktivator geeignet, insbesondere zur Synthese von Oligoribonucleinsäuren kann auf 5-Ethylthio-1*H*-Tetrazol (ETT) oder 5-Benzylthio-1*H*-Tetrazol (BTT) zurückgegriffen werden.<sup>[42,107]</sup> Die Azidität des Aktivators darf allerdings nicht zu groß sein, ansonsten erfolgt zu einem erheblichen Anteil die Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe des Phosphoramidits, was zu unerwünschten Nebenprodukten führt. Die Kupplungsdauer beträgt etwa fünf Minuten für die DNA- und 10 min für die RNA-Synthese.

Nach erfolgter Kupplung wird ein sogenanntes „Capping“ durchgeführt. 5'-Hydroxygruppen, welche im Kupplungsschritt nicht abreagiert haben, werden mit einer Acetylschutzgruppe modifiziert. Dies verhindert die Verlängerung dieser (*n*-1)-Oligomere. Werden für die Nucleobasen ultramilde Schutzgruppen verwendet, so besteht in diesem Schritt die Gefahr der Umacylierung. Diese kann allerdings durch die Verwendung anderer Säureanhydride als „Capping“-Reagenz, wie beispielsweise Phenoxyacetanhydrid, umgangen werden.

Der letzte Schritt besteht in der Oxidation der neugebildeten Phosphittriesterverbindung zum Phosphortriester. Während die Oxidation bei Verwendung anderer Syntheseverfahren erst ganz am Schluss der Oligonukleotidsynthese erfolgt, ist die Durchführung dieses Schrittes bei der Phosphoramiditmethode in jedem Zyklus essentiell. Der Triester würde ansonsten bei der im Säuren durchgeführten Detritylierung gespalten werden.

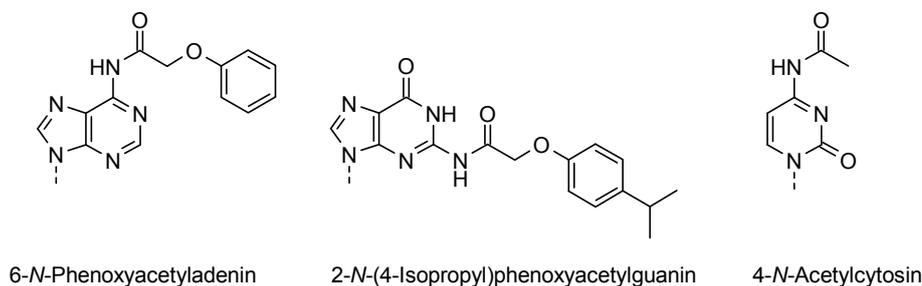


**Abbildung 26:** Reaktionsfolge der Festphasensynthese von DNA. Als Reagenzien werden im Einzelnen verwendet: 1. Detritylierung: Trichloressigsäure/Dichlormethan; 2. Kupplung: 1H-Tetrazol/Acetonitril; 3. Capping: Acetanhydrid/2,6-Lutidin/1-Methylimidazol/THF; 4. Oxidation: I<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O/Pyridin/THF.

Die obigen Schritte werden bis zur vollständigen Synthese des gewünschten Oligonukleotides mit den Phosphoramiditen der kanonischen Nucleotide wiederholt. Dabei erfolgt jeder Kupplungsschritt in Ausbeuten von 98,5-99,5 %, wobei die Phosphoramidite in etwa 50-fachem Überschuss eingesetzt werden. Die Ausbeute variiert mit der Ansatzgröße und der Verwendung modifizierter Phosphoramidite, grundsätzlich sind die Kopplungsausbeuten bei der Synthese von

Oligoribonukleinsäuren aufgrund des sterischen Anspruches der geschützten 2'-Hydroxygruppen niedriger. Mit der Phosphoramiditmethode können heutzutage standardmäßig DNA-Oligomere mit einer Länge von etwa 150-200 Nukleotiden synthetisiert werden.

Die Isolierung des fertigen Oligonukleotides erfolgt durch eine basische Abspaltung von der festen Phase und Abspaltung der Schutzgruppen. Hierzu wird das Festphasenmaterial beispielsweise in konzentriertem wässrigem Ammoniak oder einer Mischung aus Ammoniak und Methylamin (AMA) für einige Stunden bei erhöhter Temperatur inkubiert. Während dieser Zeit geschieht zunächst die Abspaltung der Sequenz vom Festphasenmaterial durch aminolytische Spaltung des Succinyllinkers. Zudem wird der Phosphortriester durch  $\beta$ -Eliminierung der Cyanoethylschutzgruppe entschützt. Die Entschützung der Nukleobasen ist der eigentliche zeitlimitierende Faktor, zudem sind die lange Inkubationsdauer bzw. hohen Temperaturen ungünstige Bedingungen für modifizierte Nukleobasen. Mittlerweile wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen alternative Schutzgruppen zur automatisierten Oligonukleotidsynthese eingeführt. Hervorzuheben sind die sogenannten „ultramilden“ Schutzgruppen, welche von Schulhof *et al.*<sup>[108]</sup> Ende der 1980er Jahre vorgestellt wurden und deren Struktur in Abbildung 27 gezeigt ist. Sie besitzen eine auf wenige Minuten verkürzte Halbwertszeit der Entschützung bei Verwendung von konzentriertem Ammoniak bei Raumtemperatur.



**Abbildung 27:** „Ultramild“ geschützte Nukleobasen nach Schulhof *et al.*<sup>[108]</sup>

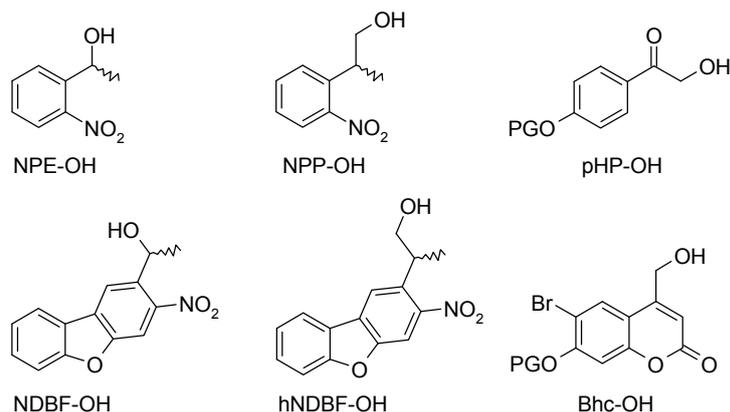
Ein „Trick“ der Festphasensynthese sei an dieser Stelle noch hervorgehoben. Nach der Kupplung des letzten Nukleotides kann die DMTr-Schutzgruppe auf der 5'-Hydroxyfunktion verbleiben. Dieser sogenannte „Trityl-On“-Modus liefert somit nach der basischen Abspaltung ein DMTr-geschütztes Oligonukleotid, welches sich aufgrund des Polaritätsunterschiedes mittel RP-HPLC sehr gut von den Abbruchsequenzen abtrennen lässt. Erst nach dieser Aufreinigung erfolgt die Abspaltung der Tritylschutzgruppe durch kurze Inkubation der DNA in einer schwachen Säure (z.B. Essigsäure).

## 2 Motivation und Zielsetzung

Die Verfügbarkeit von photoaktivierbaren Nucleinsäuren eröffnet ein weites Feld an Anwendungsmöglichkeiten, sowohl für die Grundlagenforschung an biologischen Systemen als auch für diagnostische und therapeutische Zwecke in der Medizin. So werden Nucleinsäuren in Funktionsverluststrategien („loss-of-function strategies“) eingesetzt, um gezielt Gene bzw. Genprodukte wie mRNA oder Proteine auszuschalten. Zu diesen Strategien zählt die Verwendung von siRNA, Aptameren, Antisense-DNA oder der direkte genetische Knock-Out mittels Inaktivierungsvektoren.<sup>[57,109]</sup> Durch die photolabile Schützung der Nucleinsäuren, welche für diese Strategien verwendet werden, kann eine orts- und zeitaufgelöste Kontrolle ihrer Aktivität erreicht werden.

Im Arbeitskreis Heckel wurde bereits erfolgreich die Anwendbarkeit von photoaktivierbarer siRNA und Aptameren gezeigt.<sup>[44,52,110]</sup> Jedoch kristallisierten sich einige Probleme bei der Verwendung der NPP- und NPE-Schutzgruppen heraus. In einigen Fällen konnte die biologische Aktivität der Nucleinsäure nicht vollständig wiederhergestellt werden.<sup>[43]</sup> Ursache hierfür war eine sequenzabhängige, unvollständige Entschützung der verwendeten NPP-Schutzgruppe. Erst in alkalischem Puffer bei pH 11 wurde durch Bestrahlung die Aktivität vollständig wiederhergestellt. Zudem bilden sich bei der lichtinduzierten Abspaltung der NPE-Gruppe wie bereits erwähnt (siehe Kapitel 1.1) zellschädigende Nitrosoverbindungen. Insofern besteht ein generelles Interesse, weitere Chromophore in Hinblick auf ihre Anwendbarkeit als photolabile Schutzgruppen für Nucleinsäuren zu untersuchen.

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollten neue photolabile Schutzgruppen für den Einsatz in der automatisierten DNA-Synthese etabliert werden. Zunächst sollte die Verwendung vielversprechender Chromophore (Abbildung 28) im Rahmen einer „convertible nucleoside“-Strategie (siehe Kapitel 3.1.2) überprüft werden. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass nicht für jede verwendete Schutzgruppe ein entsprechender Nucleosidvorläufer mittels aufwendiger Schutzgruppenstrategie synthetisiert werden muss. Stattdessen erfolgt der Einbau eines reaktiven Platzhalters in den Nucleinsäurestrang, welcher postsynthetisch – also nach der automatisierten Festphasensynthese – durch das gewünschte Chromophor ersetzt wird. Durch die Darstellung der photolabilen Schutzgruppen als deren Alkohole steht zudem weiterhin der konventionelle Weg über eine Synthese der entsprechend photolabil geschützten Phosphoramidite offen.



**Abbildung 28:** Zielmoleküle zur Verwendung in der „convertible nucleoside“-Strategie (PG = Schutzgruppe).

Für die pHP-Gruppe sprechen die leichte synthetische Zugänglichkeit, eine gute Wasserlöslichkeit, die biologische Unbedenklichkeit ihres Abspaltproduktes und die hohe Photolysegeschwindigkeit. Das Bhc-Chromophor wurde stellvertretend für eine Reihe von cumarinartigen Schutzgruppen ausgewählt. Es besitzt einen hohen Absorptionskoeffizienten,<sup>[23]</sup> die Quantenausbeute der Photolyse zählt zu den höchsten unter den Cumarinschutzgruppen.<sup>[21]</sup> Die Bhc-Schutzgruppe wurde von Furuta *et al.* bereits erfolgreich zur Schützung der N-4 Position von Desoxycytidin angewandt.<sup>[111]</sup> Ellies-Davies *et al.* publizierten im Jahre 2005 die NDBF-Schutzgruppe als eine neue, hoch effiziente photolabile Schutzgruppe mit – im Vergleich zu anderen Nitrobenzylschutzgruppen – bemerkenswert guten Photolyseeigenschaften.<sup>[112]</sup> Zudem ist sie – wie auch die Bhc-Gruppe – für die 2-Photonen-Photolyse geeignet.

Im weiteren Verlauf der Dissertation sollten die bestehenden Systeme, welche auf photoreaktiven  $\alpha$ -Thrombin-Aptameren beruhen und von Heckel und Mayer 2005<sup>[44]</sup> bzw. 2006<sup>[110]</sup> publiziert wurden, verbessert und weiterentwickelt werden. Mayer *et al.*<sup>[113]</sup> zeigten, dass die Wirkung des HD1 Aptamers durch die Verwendung des bivalenten HD1-22 Aptamers signifikant gesteigert werden kann. Durch photolabile Schützung der einzelnen Aptamerdomänen sollte es nun möglich sein, gezielt die Exosite I bzw. II des  $\alpha$ -Thrombins zu adressieren und somit die Aktivität beider Aptamerdomänen – und damit auch die Aktivität der beiden Bindungsdomänen des Enzyms – zu modulieren.

Das dritte Ziel dieser Arbeit war die Synthese eines Aptamer-basierten Thrombinreagenzes. Durch die kovalente Anbindung einer ausschaltbaren Variante des HD1-Aptamers an  $\alpha$ -Thrombin über einen ebenfalls photospaltbaren Linker wäre es möglich, den so erhaltenen Komplex als Wirkstoff zur gezielten orts- und zeitaufgelösten Initiierung der Blutgerinnung einzusetzen. Der Linker kann beispielsweise eine Aktivesterfunktionalität besitzen – somit sollte es möglich sein, eine kovalente peptidische Verknüpfung des Aptamers mit einer Lysinseitenkette auf der Oberfläche von  $\alpha$ -Thrombin zu erreichen. Idealerweise erfolgt diese kovalente Anbindung erst dann, wenn das Aptamer

bereits an die Exosite I gebunden hat. Somit wäre sichergestellt, dass das Aptamer seine inhibierende Wirkung ausüben kann.

Durch Bestrahlung mit UV-Licht würde nun zweierlei geschehen: Es kommt zum einen zu einer Spaltung des Linkers und zum anderen zu einer Konformationsänderung des Aptamers durch die nun freigesetzte Antisenseregion. Das Aptamer ist damit inaktiviert und kann gleichzeitig, durch das Brechen der kovalenten Verbindung, vom  $\alpha$ -Thrombin wegdiffundieren. Auf diese Weise könnte man das aktivierte  $\alpha$ -Thrombin an UV-Licht durchlässigen Stellen (z.B. Hautoberfläche oder Augapfel) eines Organismus' in den Kapillargefäßen freisetzen, was zu der augenblicklichen licht-induzierten Thrombookklusion führen würde. Mit dieser Technik könnte es zukünftig eventuell gelingen, Tumorgewebe minimalinvasiv von der Blut- und damit Nährstoffversorgung abzuschneiden. Ebenso könnte verhindert werden, dass während der Exzision eines Tumors metastasierende Zellen in den Blutkreislauf gelangen.



## 3 Allgemeiner Teil

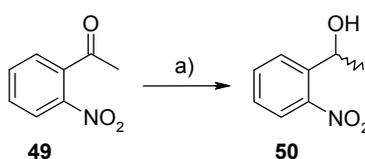
### 3.1 Neuartige photoaktivierbare Desoxyribonukleoside für die automatisierte DNA-Festphasensynthese

#### 3.1.1 Synthese der photoreaktiven Schutzgruppen

Im Rahmen dieser Dissertation sollten neben den im Arbeitskreis Heckel bereits etablierten photolabilen Schutzgruppen NPE-OH **50** und NPP-OH **52** weitere vielversprechende photoreaktive Schutzgruppen eingeführt werden. Um die bereits bestehenden Reaktionen zur Modifizierung der Nucleobasen beibehalten zu können erfolgte die Synthese der Chromophore als deren Alkohole. Die einzelnen Synthesen sind im Folgenden aufgeführt.

##### 3.1.1.1 Synthese von 1-(2-Nitrophenyl)ethanol (NPE-OH)

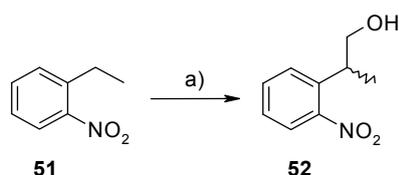
1-(2-Nitrophenyl)ethanol **50** wurde nach Hoffman *et al.*<sup>[114]</sup> durch Reduktion von 2-Nitroacetophenon **49** synthetisiert. Die Reduktion des Ketons erfolgte durch NaBH<sub>4</sub> in wässrigem 1,4-Dioxan (siehe Abbildung 29). Man erhielt den gewünschten Alkohol **50** als Racemat in 92 % Ausbeute.



**Abbildung 29:** Synthese von NPE-OH **50**. a) 3 eq NaBH<sub>4</sub>, 1,4-Dioxan/H<sub>2</sub>O 2:3, 4°C, 3.5 h.

##### 3.1.1.2 Synthese von 2-(2-Nitrophenylethyl)propanol (NPP-OH)

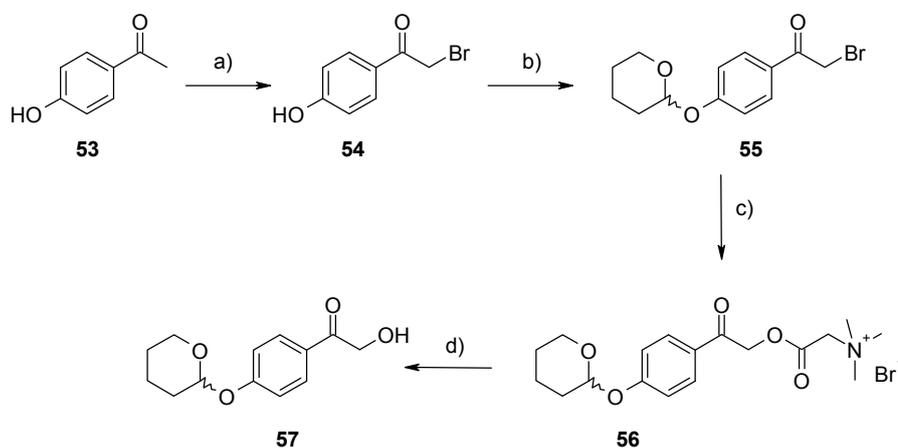
Die Darstellung von NPP-OH **52** erfolgte nach Watanabe *et al.*<sup>[115]</sup> aus 2-Nitroethylbenzen **51** durch Hydroxymethylierung mittels Paraformaldehyd und Triton B als starker Base. Die Reaktion verläuft hierbei über eine Deprotonierung der CH<sub>2</sub>-aziden benzylic Position des 2-Nitroethylbensens **51** und anschließendem nukleophilen Angriff an der elektrophilen Carbonylfunktionalität des Paraformaldehyds. Man erhielt die gewünschte Verbindung als Racemat in 78 % Ausbeute.



**Abbildung 30:** Synthese von NPP-OH **52**. a) 0.4 eq Paraformaldehyd, 1 eq  $\text{BnN}(\text{CH}_3)_3\text{OH}$ , DMSO,  $80^\circ\text{C}$ , 3 h.

### 3.1.1.3 Synthese der *p*-Hydroxyphenacylschutzgruppe (pHP-OH)

Die Synthese der pHP-Schutzgruppe sollte, wie in der Diplomarbeit von M. Buffl<sup>[160]</sup> beschrieben, als Tetrahydropyranylderivat **57** erfolgen. Wie später noch ausführlicher dargestellt wird, soll die nukleophile Verknüpfung mit Nukleotiden im Rahmen einer „convertible nucleoside“-Strategie (siehe hierzu Kapitel 3.1.2) über die Hydroxygruppe am C2-Atom des Acetophenons erfolgen. Um Nebenreaktionen der phenolischen OH-Gruppe zu verhindern, wird eine THP-Schutzgruppe an dieser Funktionalität eingeführt. Die THP-Gruppe hat sich als stabil gegenüber nicht-nukleophilen Basen wie beispielsweise DBU oder DIPEA erwiesen. So kann der Oligonukleotidstrang nach erfolgter Festphasensynthese noch auf dem Trägermaterial („on-bead“) mit der THP-pHP-Schutzgruppe derivatisiert werden, die THP-Schutzgruppe wird anschließend unter sauren Bedingungen zusammen mit der 5'-DMTr-Gruppe entfernt. Des Weiteren besteht die Option, die THP-pHP-Gruppe konventionell in das gewünschte Nucleosid einzuführen.<sup>[116]</sup> In der folgenden Abbildung 31 ist die Syntheseroute gezeigt.



**Abbildung 31:** Synthese der THP-pHP-Schutzgruppe. a) 2 eq  $\text{CuBr}_2$ , 4:3  $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$ ,  $80^\circ\text{C}$ , 22 h; b) 1.5 eq 3,4-Dihydro-2H-pyran, 0.1 eq *p*-TsOH, 0.1 eq Pyridin, RT, 2 d; c) 1 eq Betain, EtOH,  $80^\circ\text{C}$ , 3 h; d) 1 eq  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , RT, 2 h.

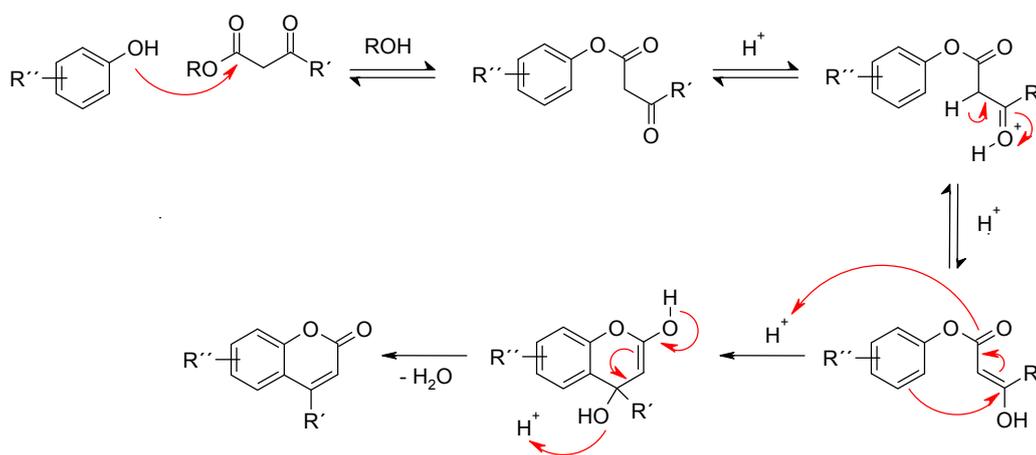
Im ersten Schritt wurde *p*-Hydroxyacetophenon **53** mit  $\text{CuBr}_2$  an der C2-Position bromiert.<sup>[17]</sup> Die Ausbeute lag bei 67 %. Es folgte die Einführung der THP-Schutzgruppe mit 3,4-Dihydro-2H-pyran. Die Reaktion wird durch *in situ* erzeugtes Pyridiniumtosylat katalysiert und führte in einer Ausbeute von 72 % zum gewünschten Produkt **54**. Die Hydrolyse dieses  $\alpha$ -Bromacetophenonderivates erfolgte

über den Umweg des Betainadduktes **56**. So wird sichergestellt, dass die Hydroxygruppe unter sehr milden Hydrolysebedingungen gezielt an C2 eingeführt werden kann und es nicht zu Nebenreaktionen durch tautomere Effekte zwischen der Carbonylgruppe und der neu eingeführten OH-Funktionalität kommt. Das Betainaddukt **56** entstand durch dreistündiges Erhitzen des Bromides **55** mit Betain in Ethanol bei 80°C und wurde unaufgereinigt weiterverwendet. Die Hydrolyse erfolgte anschließend durch die Verwendung einer wässrigen K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung bei Raumtemperatur innerhalb von zwei Stunden. Der Alkohol **57** wurde in 65 % Ausbeute über zwei Stufen erhalten.

#### 3.1.1.4 Synthese der Bromhydroxycumarinschutzgruppe (Bhc-OH)

Cumarine (Benzo- $\alpha$ -pyrone) sind als Naturstoffe weit verbreitet<sup>[117]</sup> und werden u.a. als Duftstoffe in der Kosmetikindustrie, als Antikoagulantien in der Medizin<sup>[118]</sup> und als Fluoreszenzfarbstoffe<sup>[119]</sup> in der biologischen Forschung verwendet. Ihre Eignung als photolabile Schutzgruppen wurde bereits in der Einleitung diskutiert (siehe Kapitel 1.4).

Synthetisch zugänglich ist das Cumarinringgerüst durch eine Vielzahl an Reaktionen, beispielsweise durch PERKIN-,<sup>[120]</sup> KNOEVENAGEL-,<sup>[121]</sup> WITTIG- oder REFORMATZKI-Reaktion.<sup>[122]</sup> Zur Darstellung substituierter Cumarine ist die gebräuchteste und sicherlich am breitesten anwendbare Reaktion die PECHMANN-Kondensation (siehe Abbildung 32).<sup>[123]</sup> Hierbei reagiert ein Phenol oder Resorcinol unter Säurekatalyse mit einem  $\beta$ -Ketoester. Katalytisch können sowohl Protonensäuren wie H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> als auch Lewis-Säuren wie AlCl<sub>3</sub> oder BiCl<sub>3</sub><sup>[124]</sup> verwendet werden.

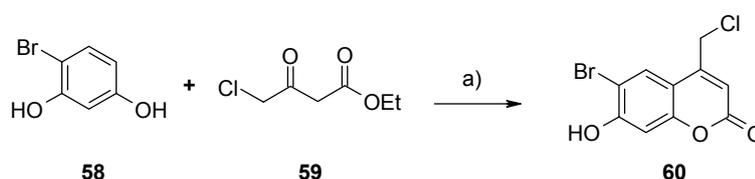


**Abbildung 32:** Mechanismus der Pechmannkondensation zur Darstellung substituierter Cumarine unter Verwendung einer Protonensäure.

Neben den 7-Alkoxy- und 7-Dialkylaminocumarinen zeigt besonders das 6-Brom-7-hydroxycumarin (Bhc) gute photochemische Eigenschaften. Hervorzuheben sind hier die relativ hohe Rotverschiebung des Absorptionsmaximums (375 nm bei pH 7), bedingt durch die Absenkung des

$pK_s$ -Wertes durch den Halogensubstituenten an C6 Position, sowie der hohe Extinktionskoeffizient von bis zu  $19000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Interessant wird das Chromophor jedoch vor allem durch seine Eignung für die Entschätzung mittels 2-Photonentechnik, dies ist auch der Grund warum sie im Rahmen dieser Dissertation ausgewählt wurde.

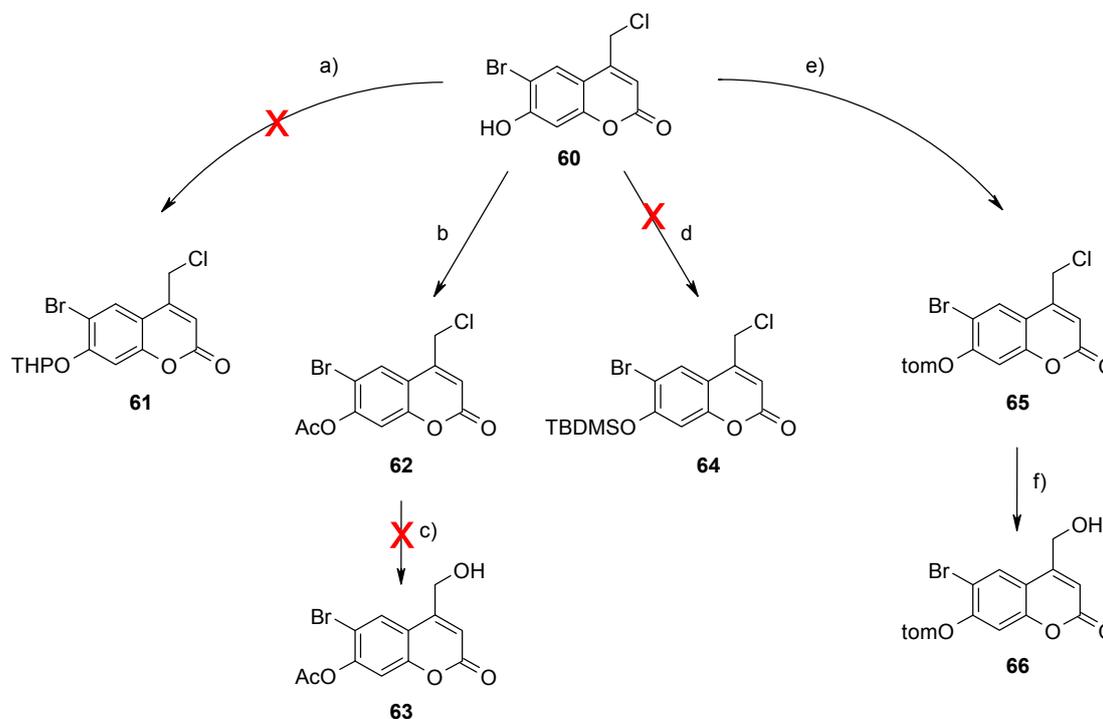
Die Synthese des Halogenids **60** der Bhc-Gruppe erfolgte ausgehend von 4-Bromresorcinol **58** und 4-Chloracetessigsäureethylester **59** (siehe Abbildung 33) analog zu der 1999 von Furuta *et al.* publizierten Methode.<sup>[23]</sup> Als Reaktionsmedium diente konzentrierte Schwefelsäure; die Ausbeute lag bei maximal 30 %, die publizierte Ausbeute von knapp 60 % konnte nicht erzielt werden. Ursächlich hierfür war die schwierige Aufarbeitung der Reaktionslösung, um einen wirklich sauberen Reinstoff zu erhalten musste das Rohprodukt mehrfach aus Aceton umgefällt werden.



**Abbildung 33:** Darstellung von 6-Brom-4-chlormethyl-7-hydroxycoumarin. a) 1 eq 4-Bromresorcinol, 1.5 eq 4-Chloracetessigsäureethylester,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , RT, 6 d.

Auch bei der Bhc-Gruppe sollte die Anknüpfung an ein Nukleotid über eine Alkoholfunktionalität erfolgen. Um diese zu erhalten, erfolgt eigentlich im nächsten Schritt die Hydrolyse des Chlorids **60** zum entsprechenden Alkohol. Um jedoch Nebenreaktionen der nukleophilen phenolischen Hydroxygruppe bei der späteren postsynthetischen Modifizierung der Oligonukleotide zu unterbinden, musste diese zuvor durch eine Schutzgruppe maskiert werden. Es wurde nunächst versucht, die THP-Gruppe zu verwenden, welche sich bereits bei der Synthese der pHP-Gruppe als geeignete Schutzgruppe zur Maskierung der phenolischen OH-Gruppe erwiesen hat. Die Synthese unter Standardbedingungen war jedoch nicht erfolgreich. Als nächstes wurde eine Acetylschätzung in Erwägung gezogen. Die Schätzung zu Verbindung **62** gelang auch, es stellte sich aber heraus, dass diese Schutzgruppe unter den Hydrolysebedingungen zu Verbindung **63** nicht stabil war. Parallel hierzu wurde als weitere Alternative eine TBDMS-Schätzung versucht. Die TBDMS-Schutzgruppe findet normalerweise breite Anwendung in der transienten Schätzung der Hydroxygruppen der (Desoxy)riboseeinheit während der Modifizierung von Nukleosiden, sowie der automatisierten RNA-Festphasensynthese. Sie bietet als Silylschutzgruppe den Vorteil, dass sie sowohl gegenüber basischen als auch sauren Reaktionsbedingungen weitgehend beständig ist und orthogonal mittels fluoridhaltiger Reagenzien (z.B. Tetrabutylammoniumfluorid) abgespalten werden kann. Aber auch deren Einführung gelang nicht, ein möglicher Grund könnte ihr recht großer sterischer Anspruch sein. Letztendlich führte die Verwendung der von Pitsch *et al.*<sup>[125]</sup> zur Ribonukleosidsynthese eingeführten tom-Schutzgruppe zum Ziel. Bei dieser handelt es sich ebenfalls um eine Silylschutzgruppe, allerdings ist sie aufgrund einer zusätzlichen Methyleneinheit sterisch weniger

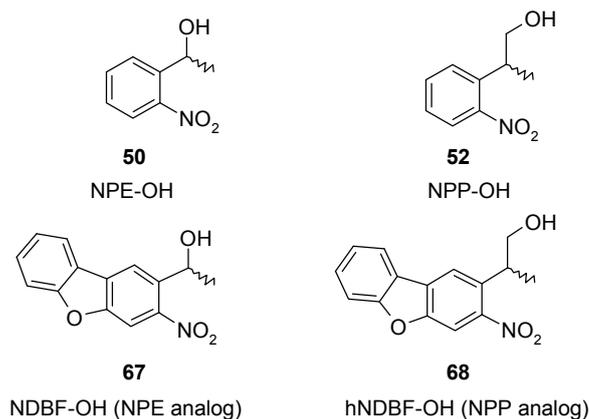
anspruchsvoll als die TBDMS-Gruppe. Hierzu wurde Verbindung **60** in Chloroform unter Verwendung einer Hilfsbase mit tom-Cl versetzt und kurz zum Sieden erhitzt. Man erhielt das geschützte Cumarin **65** in 67 % Ausbeute, welches im Anschluss in siedender 1 M wässriger  $K_2CO_3$ -Lösung zum Alkohol **66** hydrolysiert wurde, die Ausbeute betrug 52 %. Die Reaktionsbedingungen sind jeweils in Abbildung 34 zusammengefasst.



**Abbildung 34:** Schützung der phenolischen Hydroxygruppe an Bhc. a) 1.5 eq 3,4-Dihydro-2H-pyran, 0.1 eq *p*-TsOH, 0.1 eq Pyridin, THF, RT, 2 d; b) 2.5 eq Ac<sub>2</sub>O, Pyridin, RT, 4 h; c) H<sub>2</sub>O, 100°C, 16 h; d) 3 eq TBDMS-Cl, 6 eq Imidazol, THF, RT, 48 h; e) 2 eq tom-Cl, 3 eq DIPEA, CHCl<sub>3</sub>, 75°C, 1 h; f) 1 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 100°C, 9 h.

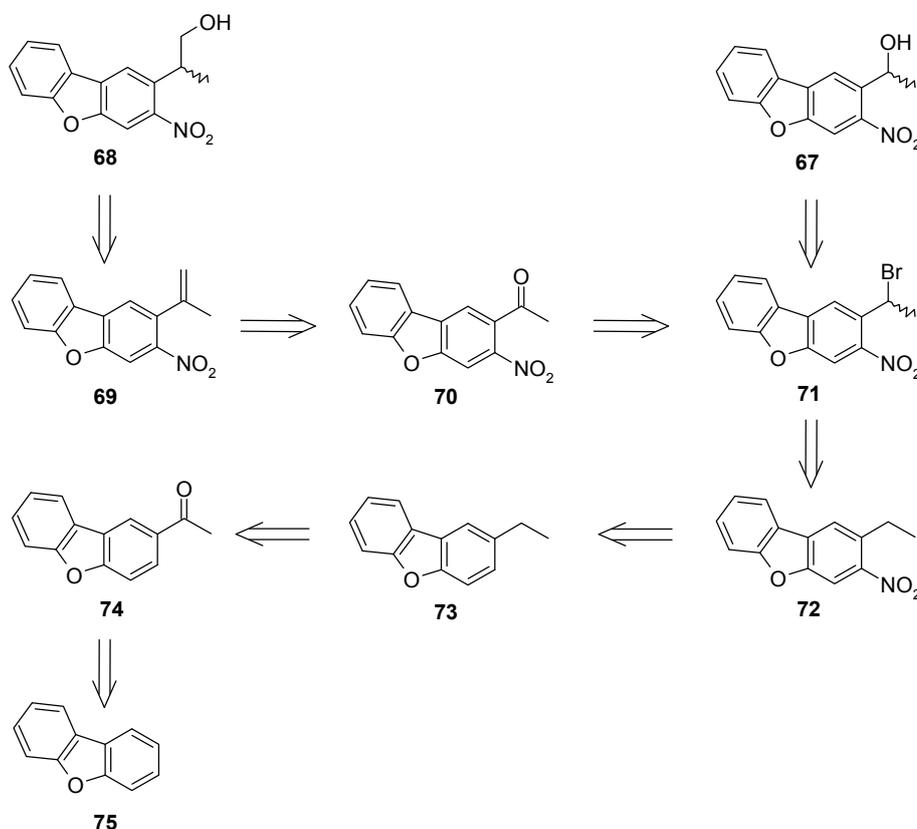
### 3.1.1.5 Synthese der Nitrodibenzofuranschutzgruppen (NDBF-OH, hNDBF-OH)

Dibenzofuran ist ein zyklischer aromatischer Ether dessen polychlorierte Derivate traurige Berühmtheit als weitverbreitete und persistente, dioxinartige Umweltgifte erlangt haben. Wie Ellies-Davies *et al.* 2006<sup>[7]</sup> zeigten, kann ein modifiziertes Dibenzofuran als hocheffizientes Chromophor zur Photospaltung eines Calciumchelators verwendet werden und weist bemerkenswert gute Photolyseeigenschaften auf, welche sogar die der Cumarine übertreffen. Aus diesem Grund sollte eine NPP und NPE analoge Variante des Dibenzofurans als photolabile Schutzgruppe getestet werden (siehe Abbildung 35), in der Hoffnung, dass sie ebenfalls eine gute Photochemie zeigen.



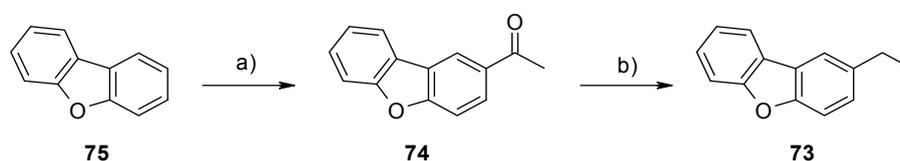
**Abbildung 35:** Vergleich der beiden neuartigen Nitrodibenzofuranschutzgruppen mit NPE-OH und NPP-OH.

Die Synthese lehnt sich weitgehend an die publizierten Reaktionsschritte von Ellis-Davis *et al.* an. Die retrosynthetische Zerlegung der Zielmoleküle ist in Abbildung 36 gezeigt. Folgende Syntheseschritte führen zu den gewünschten Zielmolekülen: Ausgehend von Dibenzofuran **75** erfolgt eine FRIEDEL-CRAFTS-Acylierung zum 2-Acetyldibenzofuran **74**. Um eine regioselektive Nitrierung zu erreichen, muss die Acetylgruppe zu einer Ethyleinheit reduziert werden, dies geschieht mittels CLEMMENSEN-Reduktion im Sauren. Man erhält 2-Ethylidibenzofuran **73**, welches im nächsten Schritt in 3-Position zu **72** nitriert wird.



**Abbildung 36:** Retrosynthetische Zerlegung der beiden Zielmoleküle **67** und **68**.

Es folgt die radikalische Bromierung der Ethylgruppe in benzylicher Position zu Verbindung **71**. Die Hydrolyse liefert dann Zielmolekül **67** – die NPE-analoge Variante des Nitrodibenzofuran-chromophors. Das Bromid **71** kann in einem weiteren Schritt mittels KORNBLUM-Reaktion zum Keton **70** transformiert werden, aus welchem nach erfolgreicher WITTIG-Reaktion die ungesättigte Variante **69** hervorgeht. Anschließend liefert eine Hydroborierung und oxidative Aufarbeitung das NPP-analoge Nitrodibenzofuranderivat **68**. Die Darstellung des 2-Ethylidibenzofurans **73** erfolgte nach Borsche *et al.*<sup>[126]</sup> Hierzu wurde eine FRIEDEL-CRAFTS-Acylierung zu **74** mit Acetylchlorid und  $\text{AlCl}_3$  in Schwefelkohlenstoff mit 75 % Ausbeute durchgeführt und anschließend das Keton mit einer CLEMMENSEN-Reaktion reduziert (siehe Abbildung 37). Dabei wurde das 2-Acetyldibenzofuran **74** mit Zinkamalgam<sup>[127]</sup> in Salzsäure mehrere Tage erhitzt. Die Säure wird bei der Reduktion sukzessive verbraucht, um Nebenreaktionen zu unterdrücken muss etwa alle sechs Stunden eine erneute Zugabe von konzentrierter HCl erfolgen.

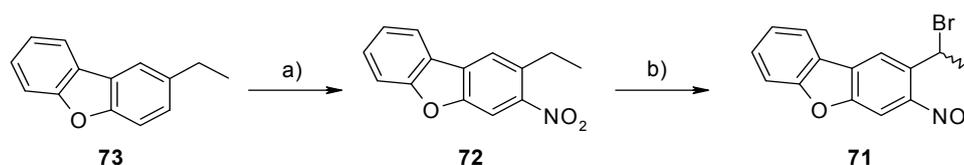


**Abbildung 37:** Reaktionsablauf zu 2-Ethylidibenzofuran. a) 1.1 eq Acetylchlorid, 1.2 eq  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{CS}_2$ , 2 h,  $55^\circ\text{C}$ ; b) 10 eq  $\text{Zn(Hg)}$ , HCl, 40 h,  $120^\circ\text{C}$ .

Die Ausbeute der Reduktion betrug 64 %. Im NMR-Spektrum zeigte sich, dass die Acetylierung nicht vollständig regioselektiv verläuft. Nach Vergleich der Integrale der Protonensignale im  $^1\text{H-NMR}$  wurden etwa 10-15 % des 3-Regioisomers gebildet. Dieses konnte jedoch spätestens bei der Aufreinigung nach der Bromierung zu Verbindung **71** abgetrennt werden.

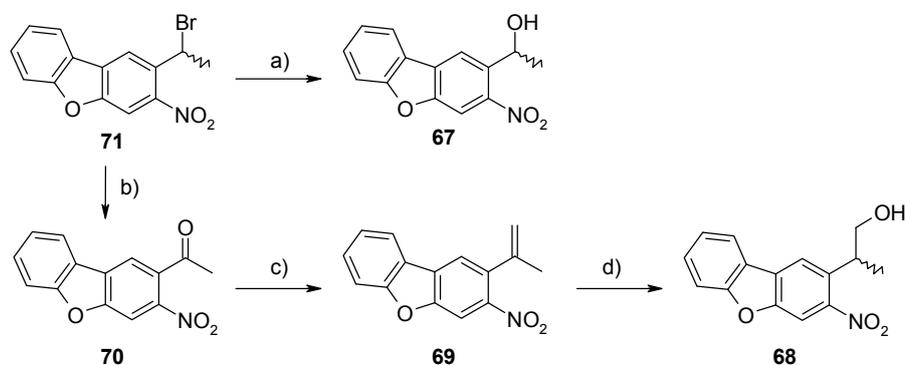
Obwohl Clemmensen die Reaktion vor mehr als 90 Jahren publizierte,<sup>[128]</sup> ist der Mechanismus immer noch ungeklärt. Gesichert scheint lediglich zu sein, dass die Reaktion über eine Zink-Carbenspezies verläuft,<sup>[129]</sup> welche im Zuge einer Ein-Elektronen-Übertragung gebildet wird. Zudem treten als Intermediate keine Alkohole auf, da diese, als Substrat eingesetzt, nicht reduziert werden.<sup>[130]</sup>

Im nächsten Schritt erfolgte die Nitrierung zu Verbindung **72** mit Salpetersäure in Eisessig unter einstündigem Erhitzen auf  $100^\circ\text{C}$  mit 64 % Ausbeute. Versuche, das vorher genannte Nebenprodukt durch Umkristallisieren abzutrennen, schlugen fehl – immerhin erhielt man durch Umkristallisation in Methanol saubere gelbe Kristallnadeln.



**Abbildung 38:** Darstellung des bromsubstituierten Ethylnitrodibenzofurans **71**. a)  $\text{HNO}_3$ , AcOH,  $100^\circ\text{C}$ , 1 h. b) 1.5 eq NBS,  $\text{CCl}_4$ , kat. Dibenzoylperoxid,  $100^\circ\text{C}$ , 4 h.

Die Bromierung erfolgte radikalisch unter Verwendung von *N*-Bromsuccinimid in Tetrachlorkohlenstoff und Dibenzoylperoxid als Radikalstarter mit einer Ausbeute von 85 %. Versuche, den karzinogenen und ozonschädigenden Tetrachlorkohlenstoff durch Chloroform oder Dichlormethan zu ersetzen führten leider nicht zum Erfolg. In beiden Fällen lief die Reaktion gar nicht bzw. nur sehr unvollständig ab. Die Bromierung findet aufgrund des Radikalmechanismus' nahezu ausschließlich an der benzylicchen Position statt – nur hier wird das Radikal durch mesomere Wechselwirkung mit dem Phenylrest stabilisiert, die Dissoziationsenthalpie der benzylicchen C-H Bindung ist im Vergleich zur C-H Bindung der terminalen CH<sub>3</sub>-Gruppe des Ethylrestes herabgesetzt. Um zu dem NPE-analogen Derivat der NDBF-Gruppe zu gelangen, wurde das Bromid **71** mit Silbernitrat unter Lichtausschluss in Wasser/Tetrahydrofuran umgesetzt (siehe Abbildung 39). Die Ausbeute betrug moderate 58 %.



**Abbildung 39:** Finale Reaktionsfolge zu NDBF-OH **67** und hNDBF-OH **68**. a) 1 eq AgNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O/THF, RT, 3.5 h; b) 1.1 eq NaHCO<sub>3</sub>, DMSO, 70°C, 4 h; c) 1.3 eq PPh<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Br, 1.3 eq NaHDMS, THF, 0°C → RT, 80°C, 3 h; d) 1. 1.2 eq BH<sub>3</sub>\*DMS, THF, 3 h, 2. NaOH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, RT, 0.5 h.

Gleichzeitig eignet sich das Bromid **71** auch als Zwischenstufe auf dem Weg zum hNDBF-OH **68**. Mittels KORNBLUM-Reaktion erfolgte die Oxidation zum Keton **70**. Hierbei dient Dimethylsulfoxid sowohl als Lösungs- wie auch als Oxidationsmittel. Zusätzlich wird NaHCO<sub>3</sub> als Base zugesetzt und die Reaktionsmischung für einige Stunden auf 70°C erhitzt. Die Ausbeute der Reaktion betrug 73 %. Ein möglicher Mechanismus der KORNBLUM-Oxidation ist in Abbildung 40 gezeigt.<sup>[131]</sup> Aus dem Halogenid **71** bildet sich durch nukleophilen Angriff des DMSO-Sauerstoffes ein Alkoxysulfoniumsalz **76**. Die zugesetzte Base abstrahiert das Proton in benzylicchen Position, woraufhin es zur Formierung der Carbonylfunktionalität kommt. Als Nebenprodukt entsteht Dimethylsulfid als reduzierte Form des Dimethylsulfoxids.

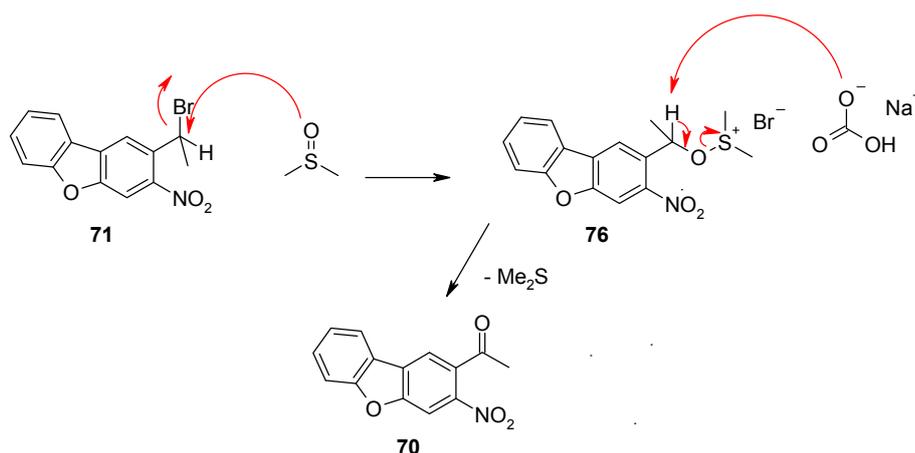


Abbildung 40: Mechanismus der KORNBLUM-Reaktion zum Keton **70**.<sup>[131]</sup>

Für die folgende C-C Bindungsknüpfung zur ungesättigten Verbindung **69** wurde neben der WITTIG-Reaktion auch das sogenannte LOMBARDO-Reagenz<sup>[132]</sup> getestet, welches Ketone in Methylengruppen überführt. Hierzu wurden 4 Äquivalente Zinkpulver bei  $-40^{\circ}\text{C}$  unter Argonatmosphäre in Dichlormethan suspendiert. Dann wurden 1.4 Äquivalente  $\text{CH}_2\text{Br}_2$  zugefügt und in der Kälte langsam  $\text{TiCl}_4$  zugetropft. Anschließend ließ man für drei Tage bei  $4^{\circ}\text{C}$  unter Schutzgas rühren. 2.5 Äquivalente der erhaltenen grauen Suspension wurden mit dem Keton **70** in Dichlormethan zur Reaktion gebracht. Das Startmaterial wurde zwar komplett umgesetzt, jedoch nicht zum gewünschten Produkt.

Die WITTIG-Reaktion (siehe Abbildung 39) mit Methyltriphenylphosphoniumbromid als WITTIG-Reagenz, welches mit *n*-Butyllithium deprotoniert und in THF mit dem NDBF-Derivat **70** umgesetzt wurde, lieferte eine Ausbeute von 40 %. Es wurde ebenfalls getestet, ob die Ausbeute durch Anwendung der salzfreien Variante noch gesteigert werden kann. Anstelle des Lithiumorganyls als Base wurde NaHMDS verwendet. Ebenso wurde ein größerer Ansatz getestet, die Deprotonierung des WITTIG-Reagenz' und Zugabe des Ketons **70** erfolgte hier bei  $-78^{\circ}\text{C}$ . Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

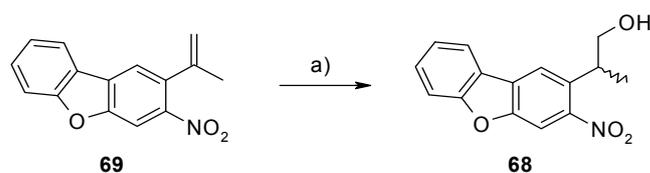
Base	Temperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Ansatzgröße [mmol]	Ausbeute [%]
<i>n</i> -BuLi	4	2	40
NaHMDS	4	2	42.7
NaHMDS	-78	38	11.4

**Tabelle 2:** Vergleich unterschiedlicher Reaktionsbedingungen der WITTIG-Reaktion. Die Temperaturangabe bezieht sich sowohl auf die Zugabe der Base zum WITTIG-Reagenz, als auch die anschließende Zugabe des Ketons. Es wurde bei dieser Temperatur nach beendeter Zugabe noch etwa eine halbe Stunde gerührt. Anschließend erfolgte jedes Mal ein Erhitzen auf  $80^{\circ}\text{C}$  für maximal 5 Stunden.

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist machte es bezüglich der Ausbeute keinen großen Unterschied, ob *n*-BuLi oder NaHMDS als Base verwendet werden. Jedoch erfolgte ein dramatischer Einbruch der Ausbeute, sobald der Reaktionsansatz vergrößert und die Temperatur auf  $-78^{\circ}\text{C}$  abgesenkt wurde.

Hier besteht für die Zukunft noch Optimierungsbedarf, denn auch die 40 % Produkt, welche bei den kleineren Ansätzen erreicht wurden, sind im Hinblick auf eine 7-stufige Synthese unbefriedigend. Aufgrund der leichteren Aufarbeitung ist die Verwendung von NaHDMS zu bevorzugen, wurde das Lithiumorganyl als Base benutzt dauerte die Phasentrennung bei der wässrigen Aufarbeitung der Reaktion im Scheidetrichter sehr lange.

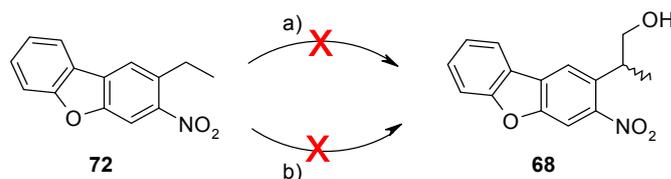
Im letzten Syntheseschritt erfolgte die Umsetzung von Verbindung **69** zum Zielmolekül **68**. Die primäre Alkoholfunktionalität wurde mittels Hydroborierung und anschließender Oxidation des Borans eingeführt (siehe Abbildung 41). Hierbei wird die Hydroxygruppe formal anti-Markownikow addiert.



**Abbildung 41:** Hydroborierung von Verbindung **69** zu hNDBF-OH **68**. a) 1. 1.2 eq  $\text{BH}_3 \cdot \text{DMS}$ , THF, RT, 16 h  
2.  $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{O}_2$ , RT, 30 min.

Die ungesättigte Verbindung **69** wurde mit einem Boran-Dimethylsulfid-Komplex in THF umgesetzt, anschließend erfolgte *in situ* die Oxidation des intermediären Borsäurealkylesters mit  $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{O}_2$  zum hNDBF-Alkohol **68**. Die Ausbeute lag hierbei bei 31 % – auch das ist kein befriedigender Wert, welcher noch Optimierungspotential bietet.

Es sei noch angeführt, dass ursprünglich ein anderer Syntheseschritt auf dem Weg zur Darstellung des hNDBF-OH **68** geplant war. In Analogie zur Synthese des NPP-Alkohols **52**, welcher durch eine Hydroxymethylierung erhalten wird (siehe oben), sollte 2-Ethyl-3-nitrodibenzofuran **72** direkt zum Zielmolekül **68** umgesetzt werden (siehe Abbildung 42).



**Abbildung 42:** Ursprünglicher Plan, Verbindung **68** durch Hydroxymethylierung direkt in hNDBF zu überführen. a) 0.4 eq Paraformaldehyd, 1 eq  $\text{BnN}(\text{CH}_3)_3\text{OH}$ , DMSO, 2.5 h,  $90^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ ; b) 0.4 eq Paraformaldehyd, 1 eq LDA, THF, 3 h,  $0^\circ\text{C} \rightarrow 75^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ .

Es wurden zum einen dieselben Reaktionsbedingungen wie zur Darstellung von NPP-OH verwendet. Zum anderen wurde LDA als starke Base zur Deprotonierung der benzylicen C-H Bindung eingesetzt. In beiden Fällen fand jedoch keine Reaktion statt, vielmehr wurde das Edukt quantitativ zurückgewonnen. Hier zeigte sich, dass die Hydroxymethylierung nur mit relativ elektronenarmen aromatischen Systemen wie beispielsweise dem 2-Nitroethylbenzen **51** durchgeführt werden kann.

Das Dibenzofuransystem scheint zu elektronenreich zu sein, um einen ausreichenden Elektronenzug auf die benzyliche C-H Bindung ausüben und diese somit für die aldolartige Addition an Formaldehyd aktivieren zu können. Der „Elektronenreichtum“ wird auch durch die unterschiedliche chemische Verschiebung im  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum deutlich – das entsprechende Quartett der beiden Benzylprotonen des Dibenzofuranderivates **72** ist im Vergleich zum 2-Nitroethylbenzen um 0.3 ppm hochfeldverschoben.

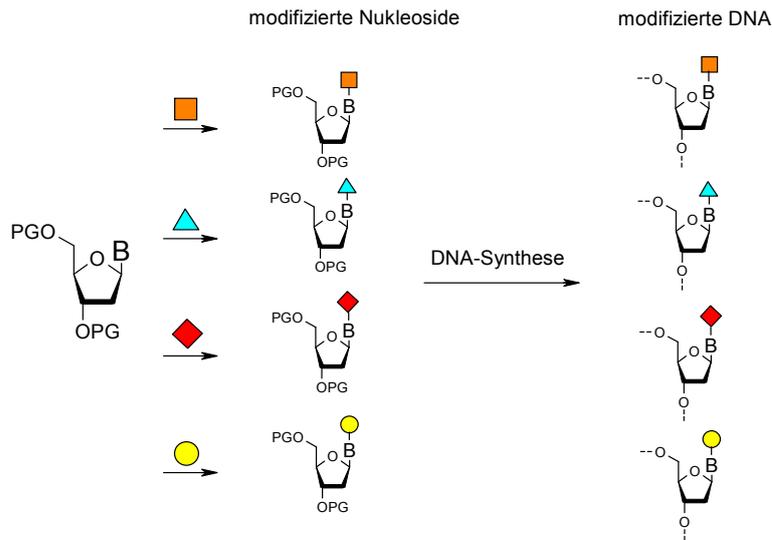
### 3.1.2 Die „convertible nucleoside“ – Strategie

Möchte man synthetische Oligonukleotide chemisch an definierten Basenpositionen modifizieren, so bieten sich einem prinzipiell zwei verschiedene Möglichkeiten: 1. Das betreffende Nukleosid wird vor Einbau in den Oligonukleotidstrang modifiziert; 2. Das betreffende Nukleosid wird an der zu modifizierenden Position chemisch aktiviert, in den Oligonukleotidstrang eingebaut und nach beendeter DNA/RNA-Synthese an der aktivierten Position (also ortsspezifisch) entsprechend modifiziert. Obwohl der Weg nach Variante 1 weniger aufwendig erscheint, weist er doch einige große Nachteile auf. Angenommen, man möchte in eine DNA-Sequenz je eine von vier unterschiedlichen Schutzgruppen einbauen. Dann müsste man nach Variante 1 je ein Nukleosidmonomer – modifiziert mit der entsprechenden photolabilen Schutzgruppe – synthetisieren. Dies bedeutet einen erheblichen synthetischen Aufwand, da die Modifizierung jedes einzelnen Nukleosidmonomers mit aufwendiger Schutzgruppenchemie verbunden ist. Es sei weiter angenommen, dass fünf Syntheseschritte pro Monomer notwendig sind, dann würde sich dies bei vier Monomeren zu zwanzig Syntheseschritten summieren! Man spricht hier von einer divergenten Synthesestrategie.

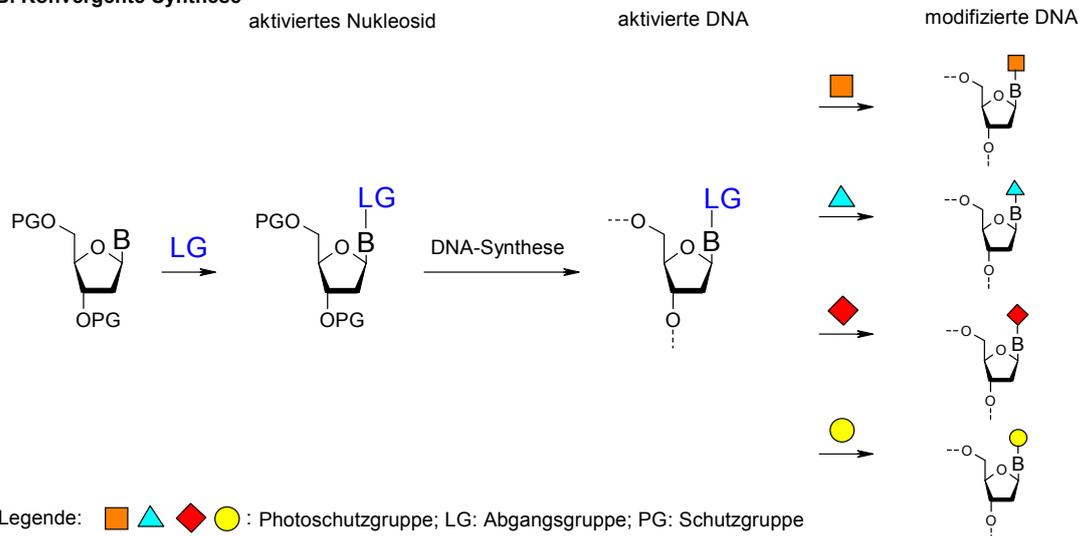
Des Weiteren ist es nahezu unmöglich, komplexe, hoch funktionalisierte Modifikationen – wie beispielsweise Peptide – in das Nukleosid einzuführen und dieses Nukleosid dann unter den sauren, nukleophilen und oxidierenden Bedingungen einer DNA/RNA-Festphasensynthese zu verwenden. Komplexe Modifikationen würden dies sicherlich nicht unbeschadet überstehen.

Bei Variante 2 fällt hingegen nur einmal die Modifizierung des Nukleosidmonomers an, nämlich mit einer Abgangsgruppe, welche die entsprechende Position in der Nukleobase für die Substitution durch die entsprechende photolabile Schutzgruppe aktiviert. Mit diesem aktivierten Nukleosidbaustein – dem sogenannten „convertible nucleoside“ – wird dann durch DNA/RNA-Festphasensynthese die gewünschte Oligonukleotidsequenz aufgebaut, welche nun mit der aktivierten Nukleobase versehen ist. In einem postsynthetischen Schritt kann die Abgangsgruppe in einer Substitutionsreaktion durch die jeweilige photolabile Schutzgruppe ersetzt werden. Hierzu muss das Oligonukleotid nicht vom Festphasenmaterial abgespalten werden, die Substitution erfolgt „on-bead“.

## A. Divergente Synthese



## B. Konvergente Synthese

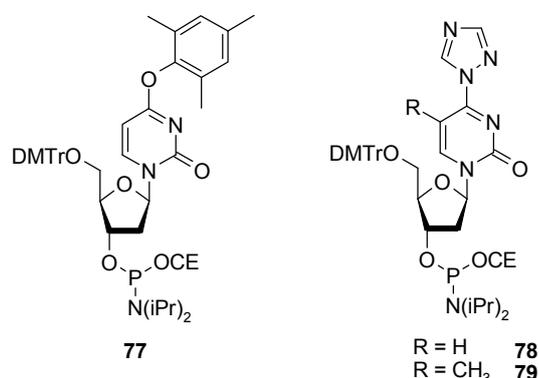


**Abbildung 43:** Vergleich der konventionellen Synthesestrategie für modifizierte Oligonucleotide (**A**) mit der „convertible nucleoside“-Strategie (**B**). Zu beachten ist, dass im letzten Fall nur eine einzige Nucleotidsequenz synthetisiert werden muss, welche anschließend nach der Festphasensynthese (postsynthetisch) modifiziert werden kann.

Im Hinblick auf das einzelne zu modifizierende Nucleosid entspricht diese Vorgehensweise einer konvergenten Synthese, welche eine deutliche Vereinfachung der Darstellung von modifizierten Oligonucleotiden bedeutet. Die beiden Wege sind in Abbildung 43 schematisch dargestellt.

Beschrieben wurde die Strategie erstmals von MacMillan im Jahre 1990,<sup>[133]</sup> er verwendete das mit einem Phenolether aktivierte Phosphoramidit **77** als Nucleosid in einer DNA-Synthese und substituierte das Cytosin in 4-Position mit einfachen Alkylaminen. Allerdings nutzten bereits Webb und Matteucci 1986<sup>[134]</sup> ein von Huynh-Dinh *et al.*<sup>[135]</sup> vorgestelltes Triazolderivat **78** des Desoxyuridins sowie Desoxythimidins **79** (siehe Abbildung 44) in DNA-Hybridisierungs- und Quervernetzungsexperimenten im Sinne eines „convertible nucleoside“, allerdings ohne das Prinzip

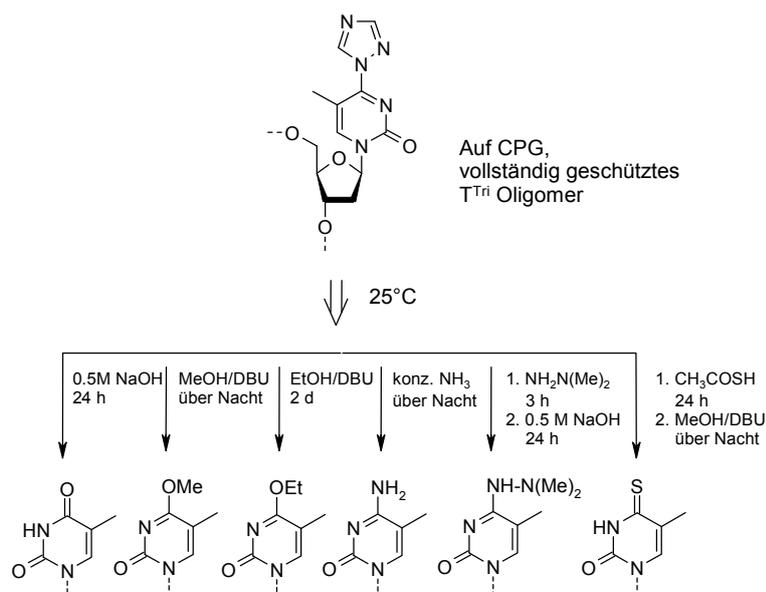
konzeptionell weiterzuentwickeln. Diese Art der Triazolmodifikation an 4-Position von Pyrimidinbasen wurde von Reese *et al.*<sup>[136]</sup> bereits im Jahre 1984 publiziert.



**Abbildung 44:** Die ersten „convertible nucleosides“.<sup>[133,135,136]</sup>

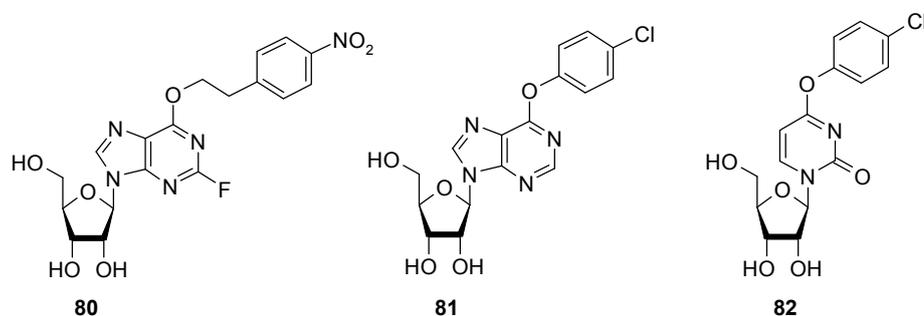
MacMillan formulierte die Ansprüche, welche an ein „convertible nucleoside“ gestellt werden müssen. Zuerst sollte es unter den Bedingungen der automatisierten DNA/RNA-Synthese stabil sein. Es muss schnell – am besten innerhalb von 24 Stunden – in die gewünschte Modifikation überführt werden können, wobei auch hier nur Reaktionsbedingungen zum Einsatz kommen können, welche der Oligonukleotidsequenz nicht schaden. Des Weiteren sollte die Modifikation an einer sterisch wenig anspruchsvollen Stelle erfolgen. Im obigen Fall der aktivierten Nucleoside **77**, **78** und **79** würde eine Modifikation in die große Furche der DNA ragen, und somit die eigentliche DNA-Helixstruktur vermutlich nicht negativ beeinflussen. Und zu guter Letzt sollte die Aktivierung an einer Position der Nucleobase stattfinden und nicht an 3'-oder 5'-Position der (Desoxy)riboseeinheit, um auch Modifikationen innerhalb eines Oligonukleotids zu erreichen und nicht nur an dessen Enden.

Mehr oder weniger zeitgleich mit MacMillan *et al.* veröffentlichten Xu *et al.*<sup>[137]</sup> eine Testreihe, in welcher sie ein triazolmodifiziertes Dodecamer einsetzten (siehe Abbildung 45). Postsynthetisch wurde der Oligonukleotidstrang mit diversen O-, N-, und S-Nucleophilen inkubiert, so gelang u.a. die Einführung von Methyl- und Ethylresten, sowie Dimethylhydrazin und Schwefel in Position-4 von Desoxythymidin. In diesem Experiment zeigte sich, dass Kombinationen wie MeOH/DBU oder auch EtOH/DBU ausreichend nucleophil waren um sowohl das Triazol zu substituieren, als auch die exozyklischen Schutzgruppen auf den Nucleobasen, sowie die Cyanoethylschutzgruppe der Phosphordiester zu entfernen und das Oligomer von Festphasenmaterial abzuspalten – zumindest wenn die Schützung an Guanin und Adenin mit Phenoxyacetyl, die an Cytosin mit Isobutyrylgruppen erfolgt.



**Abbildung 45:** Substitution des triazolaktivierten Desoxythymidins durch einfache Nucleophile auf dem Trägermaterial („on-bead“) nach Xu *et al.*<sup>[137]</sup>

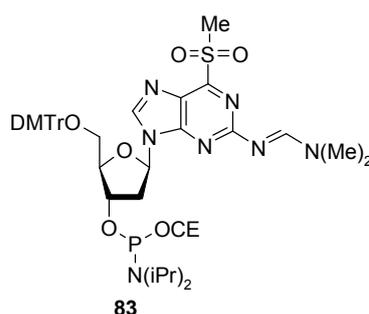
Das Konzept der „convertible nucleosides“ wurde 1997 von Allerson *et al.* auf RNA-Oligomere übertragen.<sup>[138]</sup> Aufgrund der Instabilität von 2'-O-Silyl-geschützter RNA gegenüber wässrigen, alkalischen Lösungen musste der experimentelle Aufbau jedoch angepasst werden. So wurde es notwendig, neue Abgangsgruppen zur Aktivierung von Guanin, Adenin und Uridin zu testen. Dies führte zur Synthese zu der in Abbildung 46 gezeigten Vorläufernucleoside. Sie erwiesen sich als reaktiv genug bei der Verwendung von weniger basischen methanolischen Aminlösungen als Nucleophile. Zu beachten ist hier, dass es sich bei Verbindung **80** nicht etwa um ein an 6-Position aktiviertes Inosin handelt, sondern vielmehr um einen an 2-Position aktivierten Guanosinvorläufer. Der 4-Nitroethylphenylrest dient lediglich als Schutzgruppe für das O<sup>6</sup>. Mit diesem Nucleosid ist es somit möglich, eine Modifikation vorzunehmen, welche die kleine Furche der RNA adressiert, hierbei dient Fluorid als Abgangsgruppe.



**Abbildung 46:** Aktivierte RNA-Vorläufernucleoside nach Allerson *et al.*<sup>[138]</sup>

Die beiden übrigen Nucleoside **81** und **82** sind an Position-6 bzw. -4 mit einer 4-Chlorphenylgruppe aktiviert. Bei den postsynthetischen Substitutionstests ergaben sich für kleine, lineare Amine und Diamine wie Methylamin, 1,2-Diaminoethan oder Aminoethanol so gut wie quantitative Umsetzungen, bei Verwendung des sterisch anspruchsvolleren Benzylamins sank die Ausbeute jedoch bei allen drei verwendeten Nucleosiden auf 65-80 %.

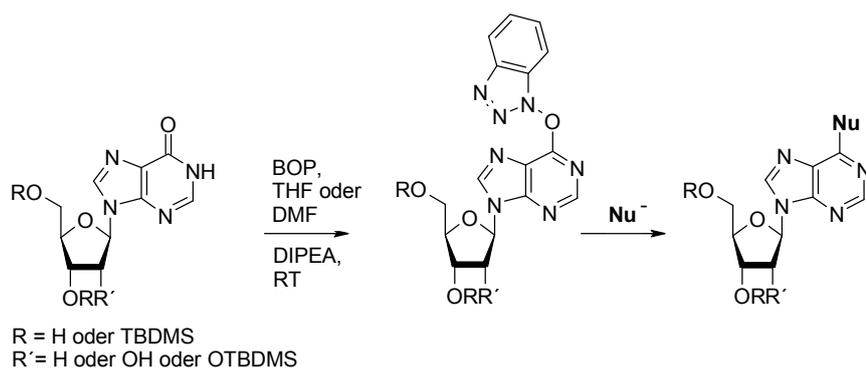
Für DNA-Reparaturstudien mittels O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) verwendeten Shibata *et al.*<sup>[139]</sup> 2006 einen weiteren Desoxyguanosinvorläufer **83**, welcher an 6-Position mit einer Methylsulfonylgruppe aktiviert wurde.



**Abbildung 47:** Mit Methylsulfonyl aktiviertes Desoxyguanosin.<sup>[139]</sup>

Auf diese Weise konnten modifizierte Oligonucleotide mit O<sup>6</sup>-Alkylguanosin hergestellt werden, wobei es sich bei den Alkylsubstituenten bereits um relativ schwach nukleophile primäre Alkohole wie Benzylalkohol und 4-Bromthienol handelte. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden bereits verschiedenste Aktivierungsgruppen für Guanosin verwendet, wie beispielsweise Methylsulfoxid,<sup>[140]</sup> 2,4-Dinitrophenylthiol<sup>[141]</sup> und Chlorid.<sup>[142]</sup> Keine dieser Modifikationen wurde jedoch zur Einführung von anspruchsvollen O-Nucleophilen, sondern nur von stärker nukleophilen Aminen und Thiolen genutzt.

Eine sehr umfangreiche Studie führten Bae *et al.* im Jahre 2007<sup>[143]</sup> mit O<sup>6</sup>-(Benzotriazol-1-yl)inosinen durch. Sie setzten hierzu sowohl silylgeschütztes als auch ungeschütztes (Desoxy)inosin mit BOP zu den entsprechenden C-6 Benzotriazolen um (siehe Abbildung 48). BOP ist als sehr effizientes Kondensationsreagenz in der automatisierten Peptidsynthese weitverbreitet,<sup>[144]</sup> hat allerdings den Nachteil, dass als Nebenprodukt der Kupplungsreaktion stark karzinogenes Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPT) entsteht.



**Abbildung 48:** Von Bae *et al.*<sup>[143]</sup> entwickelte Aktivierung von Inosinen mit HOBt (Nu = Nukleophil).

Die Umsetzung der aktivierten Nucleoside erfolgte mit unterschiedlichen Aminen, Alkoholen sowie Benzylthiol. Bei den niederen Alkoholen dienten diese auch gleichzeitig als Lösungsmittel, ansonsten wurde DME eingesetzt und bei der Verwendung von *p*-Toluidin Ethanol. Es zeigte sich, dass die Zugabe einer nicht nukleophilen Base (hier meist  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ) in so gut wie jedem Fall notwendig ist, um überhaupt eine Umsetzung zu erhalten – selbst bei relativ guten Nucleophilen wie dem Benzylthiol, diversen Phenolen oder *p*-Toluidin. Die Ausbeuten lagen bei 52-95 %, teilweise musste allerdings auf Temperaturen bis  $105^\circ\text{C}$  erhitzt werden. Zum Abschluss der Studie wurde auch das entsprechende *O*-(Benzotriazol-1-yl)desoxyinosinphosphoramidit hergestellt und in der automatisierten DNA-Festphasensynthese eingesetzt. Leider wurde nur Morpholin als N-Nucleophil getestet – immerhin jedoch zeigte sich eine quantitative Umsetzung, es traten keinerlei Nebenprodukte, wie beispielsweise das mit Ammoniak modifizierte Oligomer, auf.

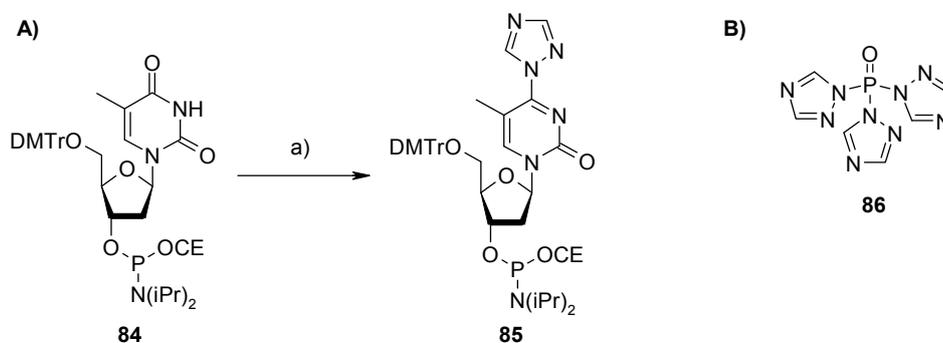
Zusammenfassend bleibt an dieser Stelle zu sagen, dass die „convertible nucleoside“-Strategie grundsätzlich eine geeignete Methode zur ortsspezifischen Modifizierung von Oligonucleotiden darstellt. So wurde sie u.a. eingesetzt zur Entwicklung von DNA-Affinitätschromatographie,<sup>[145]</sup> für Quervernetzungen mittels Disulfidbrücken,<sup>[146]</sup> für  $^{15}\text{N}$ -Spinmarkierungsexperimente,<sup>[147]</sup> für Hybridisierungsstudien<sup>[148]</sup> und Studien zur DNA-Reparatur durch Alkyltransferasen,<sup>[149]</sup> sowie für Photoquervernetzung.<sup>[150]</sup> Gleichzeitig unterliegt sie aber auch gewissen Limitierungen, welche eine breite Anwendbarkeit bisher verhindern. So gelingt die postsynthetische Einführung nur bei relativ kleinen, sterisch wenig anspruchsvollen N- und S-Nucleophile in exzellenten Ausbeuten. O-Nucleophile reagieren gut als Phenole oder aber als einfache primäre Alkohole wie Methanol, Ethanol und auch Benzylalkohol.

Die Frage, ob diese Methode auf die Einführung der in Abbildung 28 gezeigten photoreaktiven Alkohole in aktivierte DNA übertragbar ist, war zu Beginn dieser Arbeit also vollkommen offen. Zudem bestand das Ziel grundsätzlich nicht darin, neue Methoden zur „convertible nucleoside“-Strategie zu entwickeln, sondern mit möglichst wenig Synthesaufwand eine große Diversität an mit

unterschiedlichen photolabile Schutzgruppen versehenen Oligonukleotiden zu erzeugen. Mit einer konvergenten Strategie sollte somit eine Vereinfachung – sowohl in zeitlicher als auch in synthetischer Hinsicht – des bisher beschrittenen Weges zur Synthese von modifizierter DNA erfolgen. Hierzu ist auch anzumerken, dass die eigentliche Substitutionsreaktion an der aktivierten Nukleobase nur dann als erfolgreich zu betrachten ist, wenn sie mit nahezu quantitativen Ausbeuten verläuft. Die chemische Synthese langer Oligonukleotide ist, bedingt durch Kopplungseffizienzen von 99-99.5 %, mit einem nicht vernachlässigbaren Ausbeuteverlust behaftet. Wenn zu diesem Ausbeuteverlust nun auch noch eine geringe Effizienz der Substitutionsreaktion hinzukäme, dann wäre die Synthese nicht mehr ökonomisch zu betreiben. Zum Vergleich: Werden die DNA-Bausteine schon als photolabil geschützte Nucleoside in der Oligonukleotidsynthese eingesetzt, so zeigen diese die gleiche Kupplungseffizienz wie kommerziell erworbene Phosphoramidite.

### 3.1.2.1 Untersuchungen zur Anwendbarkeit der „convertible nucleoside“-Strategie

Zu Beginn der Untersuchung stellte sich die Frage, welches „convertible nucleoside“ verwendet werden sollte. Die Wahl fiel auf das triazolaktivierte Desoxythymidin **85**. Ausschlaggebend für die Entscheidung ist dessen hohe Reaktivität und einfache Synthese, welche durch Verwendung des Reese-Reagenzes<sup>[136]</sup> in einem Schritt, ausgehend vom kommerziell erhältlichen Desoxythymidinphosphoramidit, gelingt (siehe Abbildung 49).



**Abbildung 49:** A) Darstellung des „convertible nucleoside“ **85** nach Webb *et al.*<sup>[134]</sup> a) 1. 13 eq POCl<sub>3</sub>, 60 eq 1,2,4-Triazol, 70 eq NEt<sub>3</sub>, MeCN, 4°C, 45 min; 2. 1 eq dT-Phosphoramidit, RT, 30 min. B) Struktur des *in situ* gebildeten Reese-Reagenz', welches als Überträger der Triazoleinheit fungiert.

Zur *in situ* Generierung des Triazolierungsreagenzes **86** wurde 1,2,4-Triazol bei 0°C unter Argonatmosphäre in Acetonitril suspendiert und langsam mit Phosphorylchlorid, gefolgt von NEt<sub>3</sub>, versetzt. Dann erfolgte die Zugabe von Desoxythymidinphosphoramidit bei Raumtemperatur. Die Umsetzung war bereits nach eineinhalb Stunden vollständig, das Produkt zeigte sich im DC als zwei intensiv blau fluoreszierende Flecken.

Als Testsequenz diente ein Tridecamer, welches ausschließlich aus Desoxythymidin bestand, zentral wurde das dT<sup>Tri</sup> **85** eingebaut (siehe Abbildung 50). Thymin benötigt als einzige kanonische Nucleobase während der automatisierten DNA-Synthese keine exozyklischen Schutzgruppen. Dies vereinfacht später die Interpretation der analytischen Spektren, da so keine Artefakte auftreten können, welche aus einer unvollständigen Entschützung der Nucleobasen resultieren. Die Synthese wurde unter Standardbedingungen im „Trityl-On“ Modus auf ABI LV200 Polystyren durchgeführt und lieferte laut Tritylmonitor eine Ausbeute von 75 %. Hierbei zeigte das dT<sup>Tri</sup>-Phosphoramidit die gleiche Kopplungseffizienz wie die kommerziell erworbene, unmodifizierte Desoxythymidinphosphoramidit.



**Abbildung 50:** Testsequenz **TMP36** für die Substitutionsexperimente.

Um zu überprüfen, ob die Triazolmodifikation die Festphasensynthese überstanden hat und für Nucleophile zugänglich ist, wurde ein Abspaltexperiment mit konz. Ammoniak bzw. Methylamin durchgeführt. Hierzu wurde eine Spatelspitze des Festphasenmaterials mit je 200  $\mu$ L konz. Ammoniak bzw. 40 %igem Methylamin (in Wasser/Methanol 1:1) sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 60°C für eine Stunde inkubiert. Es wurde kurz zentrifugiert, der Überstand abgenommen und dieser in der Vakuumzentrifuge zur Trockene eingengt. Das resultierende Pellet wurde in 1 M TEAA-Puffer pH 7 aufgenommen und mittels HPLC/MS analysiert. Hierbei zeigte sich, wie zu erwarten war, eine vollständige Substitution der Triazolgruppe durch Ammoniak bzw. Methylamin (siehe Tabelle 3). Es traten unabhängig von der Inkubationstemperatur keine weiteren Nebenprodukte auf.

Sequenz	erwartete Masse [amu]	gefundene Masse [amu]
5'-DMTr-TTT TTT T <sup>NH<sub>2</sub></sup> TTT TTT- 3'	4193.9	4193.4
5'-DMTr-TTT TTT T <sup>NH(CH<sub>3</sub>)</sup> TTT TTT-3'	4207.9	4207.7

**Tabelle 3:** Substitutionsprodukte aus **TMP36** und Ammoniak bzw. Methylamin.

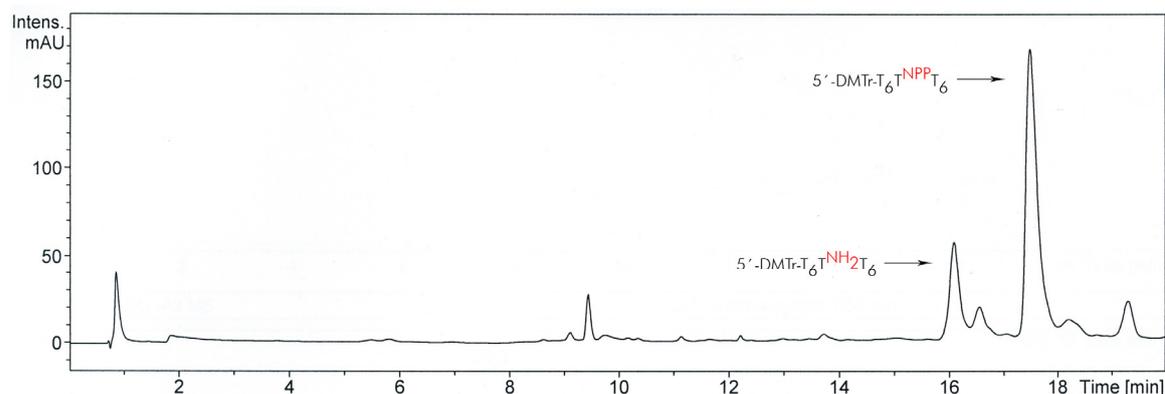
Nach diesem positiven Ergebnis wurde als erste photoreaktive Schutzgruppe der NPP-Alkohol **52** als Nucleophil getestet. Analog zu den in der Literatur beschriebenen Reaktionsbedingungen<sup>[137]</sup> wurde der Alkohol in verschiedenen Lösungsmitteln gelöst und mit DBU als nicht-nucleophiler Base versetzt.

Je eine Spatelspitze des Festphasenmaterials **TMP36** wurde mit diesen Lösungen für sechzehn Stunden bei Raumtemperatur bzw. 60°C inkubiert. Die genauen Reaktionsbedingungen sind aus Tabelle 4 ersichtlich. Aufgrund der Flüchtigkeit des Acetonitrils wurde dessen Volumen erhöht, die Gesamtkonzentration an Alkohol (~ 1.6 M) aber beibehalten.

Nr.	Lösungsmittel	V <sub>LM</sub> [μL]	T [°C]	V <sub>NPP-OH</sub> [μL]	V <sub>DBU</sub> [μL]
1	DMSO	20	RT	5	1
2	DMSO	20	60	5	1
3	MeCN	100	RT	25	5
4	MeCN	100	60	25	5
5	DMF	20	RT	5	1
6	DMF	20	60	5	1

**Tabelle 4:** Reaktionsbedingungen von NPP-OH mit Sequenz **TMP36**.

Nach beendeter Reaktionszeit wurden die Reaktionsansätze mit 200 μL konzentriertem Ammoniak versetzt und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Der Überstand wurde nach kurzer Zentrifugation abgenommen und in der Vakuumzentrifuge zur Trockene eingengt. Anschließend erfolgte die Wiederauflösung der Pellets in 100 μL 1 M TEAA-Puffer, der überschüssige NPP-Alkohol wurde durch dreifache Etherextraktion (je 500 μL Et<sub>2</sub>O) entfernt und die so erhaltene Probenlösung mittels HPLC/MS analysiert. Die folgende Abbildung 51 zeigt das RP-HPLC Chromatogramm für die Reaktion in DMF bei Raumtemperatur.



**Abbildung 51:** RP-HPLC Chromatogramm des Eintrags 5 aus Tabelle 4. Es sind ein prominenter Peak bei 17.5 min, sowie ein Nebenprodukt bei 16.2 min zu erkennen.

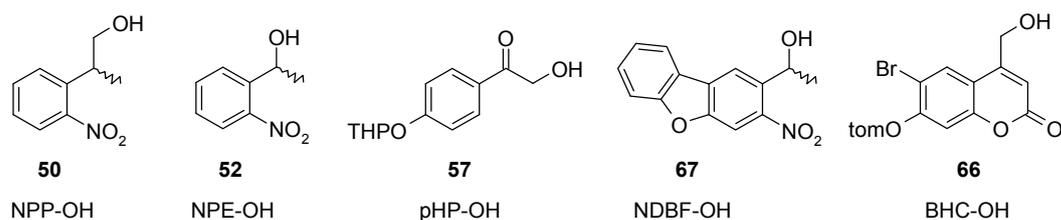
Zu erkennen ist ein prominenter Peak bei 17.5 min, dessen Masse mit 4357.7 amu bestimmt wurde. Dies entspricht dem gewünschten Tridecamer DMTr-T<sub>6</sub>T<sup>NPP</sup>T<sub>6</sub> dessen berechnete Masse 4358.1 amu beträgt. Die Masse des kleineren Peaks bei 16.2 min beträgt 4194.6 amu, welche mit der berechneten Masse für das Aminolyseprodukt DMTr-T<sub>6</sub>T<sup>NH<sub>2</sub></sup>T<sub>6</sub> von 4193.9 amu übereinstimmt. Das Verhältnis der Integrale ist ungefähr 4:1 – entsprechend einer Ausbeute von ca. 80 % für das NPP-OH

Substitutionsprodukt. Die Chromatogramme der Ansätze **1**, **2** und **6** aus Tabelle 4 zeigten ein ähnliches Ergebnis, hingegen war bei der Verwendung von Acetonitril als Lösungsmittel kein Umsatz zum gewünschten Produkt erkennbar. Des Weiteren machte es keinerlei Unterschied, ob die Reaktion bei Raumtemperatur oder 60°C durchgeführt wurde.

In einem weiteren Experiment wurde überprüft, ob die Kombination aus NPP-OH und DBU in DMF oder DMSO ausreichend nukleophil ist, um die DNA-Sequenz von dem Festphasenmaterial abzuspalten zu können. Hierzu wurde der Überstand nach beendeter Inkubationszeit abgenommen, bevor die Zugabe des eigentlichen Abspaltreagenzes (NH<sub>3</sub> oder MeNH<sub>2</sub>) erfolgte. Dieser Überstand wurde dann in der Vakuumzentrifuge eingengt, in 1 M TEAA-Puffer aufgelöst und auf der RP-HPLC analysiert. Es zeigten sich jedoch keinerlei Signale, welche auf ein Oligonukleotid hinwiesen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Abspaltung tatsächlich erst bei der Zugabe von konzentrierter Ammoniaklösung bzw. Methylamin erfolgt.

Als nächstes erfolgte die Synthese der triazolaktivierten 15mer Aptamersequenz 5'-GGT T<sup>Tri</sup>GG TGT GGT TGG -3' (**TMP53**). Im Arbeitskreis Heckel wurde diese Sequenz als an T4 photolabil geschützte NPP-Variante erfolgreich zur Regulation der Aktivität von  $\alpha$ -Thrombin<sup>[44]</sup> eingesetzt (siehe Kapitel 3.2.1). Nun sollte sie als Modell- und direkte Vergleichssequenz für die neu entwickelten Schutzgruppen dienen. Die Synthese verlief laut Tritylmonitor in 83 % Ausbeute auf ABI LV200 Polystyren im „Trityl-On“ Modus. Der Substitutionstest auf vorhandene Aktivität der Triazolabgangsgruppe wurde mit konz. Ammoniak bzw. 40 %igem Methylamin wie oben beschrieben auch mit der Sequenz **TMP53** mit positivem Ergebnis wiederholt.

Nach den ermutigenden Ergebnissen mit der Testsequenz **TMP36** wurden nun alle zu diesem Zeitpunkt verfügbaren Alkohole aus Abbildung 52 (die Synthese des hNDBF **68** war zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen) in einer Substitutionsreaktion mit der aktivierten Aptamersequenz **TMP53** inkubiert.



**Abbildung 52:** Für den Substitutionstest mit Aptamersequenz **TMP53** verwendete photolabile Schutzgruppen.

Je eine Spatelspitze des Festphasenmaterials von Sequenz **TMP53** wurde mit den Alkoholen als 0.5 M Lösung in DMF unter Zugabe von DBU sowohl bei Raumtemperatur, als auch bei 60°C, über Nacht inkubiert (siehe Tabelle 5). Anschließend erfolgte die Zugabe von 100  $\mu$ L NH<sub>3</sub> (33 %ig) zur Abspaltung der Sequenz von der Festphase, zur Entschützung der Nukleobasen und der Phosphorsäureester des Phosphatrückgrates. Die Inkubationsdauer betrug sechs Stunden bei Raumtemperatur. Die Proben wurden in der Vakuumzentrifuge bei 30°C fast bis zur Trockene

eingengt und mit 1 M TEAA-Puffer auf 100  $\mu\text{L}$  verdünnt. Es folgte die dreimalige Etherextraktion mit je 500  $\mu\text{L}$ , die Proben, welche den Bhc-Alkohol enthielten wurden zusätzlich mit 1 mL Chloroform extrahiert. Die Analyse erfolgte mittels RP-HPLC.

Nr.	Nukleophil (0.5 M in DMF)	Reaktionsbedingungen
1	20 $\mu\text{L}$ NPP-OH	1 $\mu\text{L}$ DBU, RT, über Nacht
2	20 $\mu\text{L}$ NPE-OH	1 $\mu\text{L}$ DBU, RT, über Nacht
3	20 $\mu\text{L}$ pHP-OH	1 $\mu\text{L}$ DBU, RT, über Nacht
4	20 $\mu\text{L}$ NBDF-OH	1 $\mu\text{L}$ DBU, RT, über Nacht
5	20 $\mu\text{L}$ Bhc-OH	1 $\mu\text{L}$ DBU, RT, über Nacht
6	20 $\mu\text{L}$ NPP-OH	1 $\mu\text{L}$ DBU, 60°C, über Nacht
7	20 $\mu\text{L}$ NPE-OH	1 $\mu\text{L}$ DBU, 60°C, über Nacht
8	20 $\mu\text{L}$ pHP-OH	1 $\mu\text{L}$ DBU, 60°C, über Nacht
9	20 $\mu\text{L}$ NBDF-OH	1 $\mu\text{L}$ DBU, 60°C, über Nacht
10	20 $\mu\text{L}$ Bhc-OH	1 $\mu\text{L}$ DBU, 60°C, über Nacht

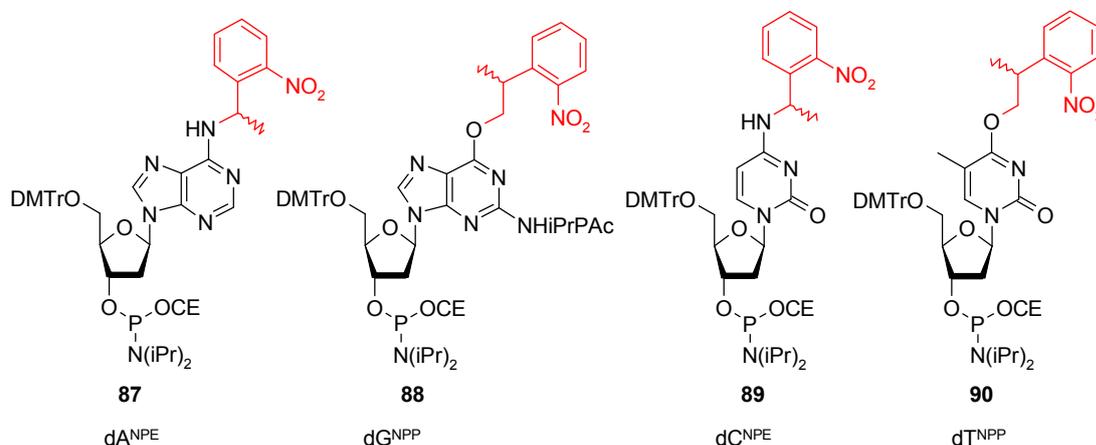
**Tabelle 5:** Reaktionsbedingungen für die Substitutionsreaktion mit Aptamersequenz **TMP53** und den Schutzgruppen aus Abbildung 52.

Die Ergebnisse waren unbefriedigend. Zwar zeigte sich bei Verwendung des NPP-OH ein ähnlich guter Umsatz zum gewünschten Substitutionsprodukt wie schon in dem vorhergehendem Experiment mit der Testsequenz **TMP36**, alle übrigen Reaktionen waren jedoch nicht erfolgreich. Grundsätzlich war in den Chromatogrammen eine Vielzahl von Signalen vorhanden, von denen keines prominent erschien und die HPLC/MS-Analyse ausgewählter Reaktionsansätze lieferte ebenfalls kein eindeutiges Ergebnis. Vielmehr hatten sich einige Nebenprodukte gebildet, ein Hauptprodukt mit der berechneten Masse war nicht aufzufinden. Das Experiment wurde mit dem gleichen negativen Ergebnis wiederholt.

Zu diesem Zeitpunkt wurde offensichtlich, dass die „convertible nucleoside“-Methode nicht ohne Weiteres auf eine Vielzahl strukturell doch recht unterschiedlicher O-Nukleophile übertragbar war. Vielmehr müssen für jede einzelne photolabile Schutzgruppe die optimalen Reaktionsbedingungen gefunden werden, was eine schnelle und breite Anwendbarkeit verhindert. Aus diesem Grund wurden die Bemühungen auf diesem Gebiet erst einmal eingestellt und es erfolgte die Synthese der photolabil geschützten Nukleobasen nach der konventionellen Methode *via* transient geschützten Mononukleosiden.

### 3.1.3 Konventionelle Synthese modifizierter Desoxynukleoside

Die vom Arbeitskreis Heckel routinemäßig eingesetzten photoaktivierbaren DNA-Nukleoside sind in Abbildung 53 dargestellt.<sup>[43,45,110,151]</sup>

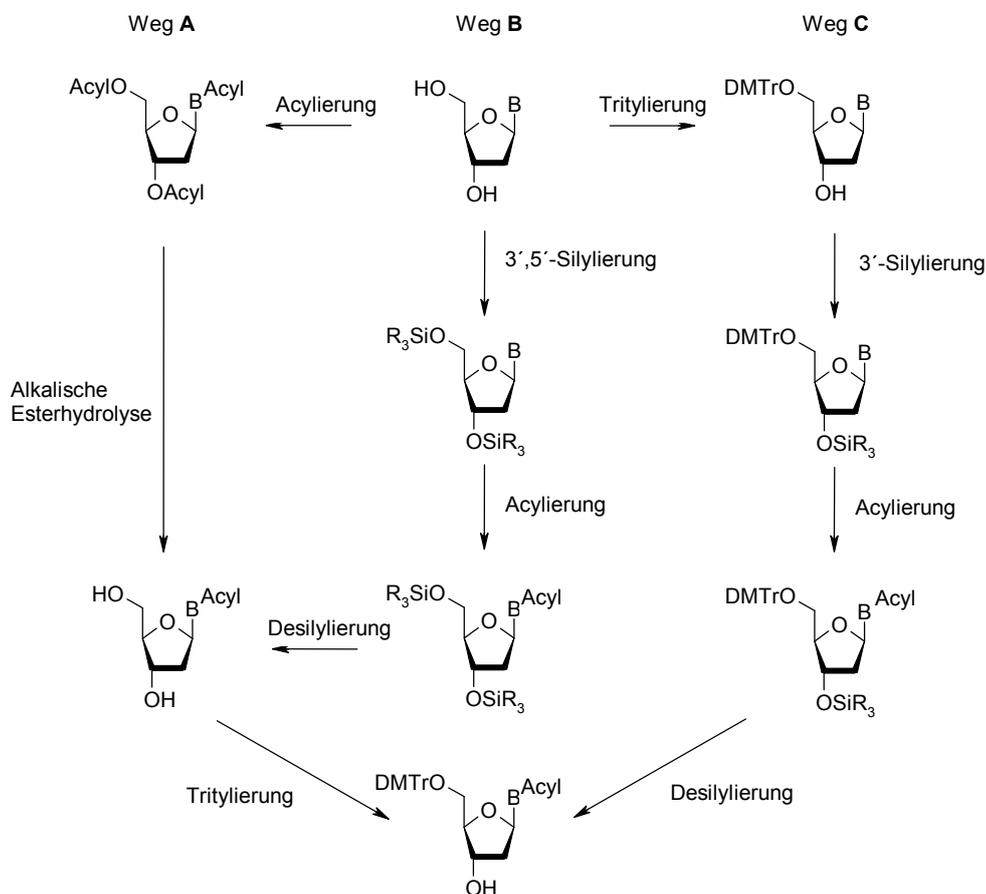


**Abbildung 53:** Strukturformeln der vier kanonischen DNA-Phosphoramidite, jeweils in N<sup>4</sup>/O<sup>4</sup>- bzw. N<sup>6</sup>/O<sup>6</sup>-Position mit photosplaltbarer NPE/NPP-Gruppe (rot) geschützt.

Der prinzipielle sukzessive Aufbau dieser Strukturen, ausgehend von den entsprechenden ungeschützten Nucleosiden, soll im Folgenden kurz skizziert werden. Die photoaktivierbaren Nucleoside werden unter den Standardbedingungen der DNA-Festphasensynthese mittels Phosphoramiditmethode<sup>[103,152]</sup> eingesetzt, hierfür müssen sie an der 5'-OH Position mit einer säurelabilen Schutzgruppe versehen werden. Schon relativ früh in der Entwicklung der chemischen Oligonucleotidsynthese kristallisierte sich die DMTr-Gruppe als dazu am besten geeignete Schutzgruppe heraus.<sup>[95,153]</sup> Prinzipiell führen nach Fritz *et al.*<sup>[154]</sup> drei verschiedene Wege zu basengeschützten, 5'-tritylierten Nucleosiden (siehe Abbildung 54). Der klassische Weg **A** nach Khorana startet mit der Acylierung sämtlicher Hydroxy- und Aminofunktionalitäten. Es folgt die selektive Entschützung der OH-Gruppen unter stark alkalischen Bedingungen und schlussendlich wird die 5'-OH Gruppe mit DMTr versehen. Diese Strategie wird mittlerweile kaum noch angewendet, sie bietet zu wenig Flexibilität in Bezug auf die Schutzgruppen für die exozyklischen Aminofunktionalitäten. In unserem Fall verwenden wir beispielsweise für das Desoxyguanosinderivat **88** die sehr basenlabile *i*-PrPac-Gruppe, welche nach der Khorana Methode ebenfalls wieder abgespalten werden würde.

Die elegantere Methode ist in Weg **B** gezeigt. Man startet mit der vorübergehenden, selektiven Silylschutzung. Dann erfolgt die Schutzung der Nucleobase und nach erfolgter Desilylierung die Einführung der DMTr-Gruppe. Dieser Weg bietet durch die Verwendung von Silylschutzgruppen einen großen Vorteil: sie sind orthogonal mit fluoridhaltigen Reagenzien abspaltbar. Dies bedeutet, dass an den Nucleobasen auch basen- oder säurelabile Modifizierungen vorgenommen werden

können. Im vorliegenden Fall erfolgt die Alkylierung mit der photolabilen Schutzgruppe durch eine MITSUNOBU-Reaktion, die Silylschutzgruppen haben sich hierbei als stabil gegenüber den dabei verwendeten Reaktionsbedingungen erwiesen.<sup>[155]</sup>



**Abbildung 54:** Die 3 grundsätzlichen Synthesewege zu N-geschützten 5'-DMTr-Desoxynucleosiden nach Fritz et al.<sup>[154]</sup> (siehe auch *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, John Wiley & Sons, Vol.1, Kapitel 2.3.3)

Der dritte Syntheseweg **C** beginnt im Gegensatz zu den anderen beiden Methoden mit der Tritylierung der 5'-OH Gruppe, gefolgt von 3'-OH Silylierung und Acylierung der exocyclischen Aminofunktion. Die Entschützung von 3'-OH erfolgt im letzten Schritt. Diese Synthesefolge ist anwendbar, wenn das Nucleosid keinen sauren Bedingungen unterworfen wird, welche andernfalls zu einer Entschützung der 5'-OH Gruppe führen würden. Mit einzubeziehen in die Entscheidung zwischen Route **B** und **C** sind sicherlich auch die Verfügbarkeit und Kosten der entsprechenden Schutzgruppenreagenzien.

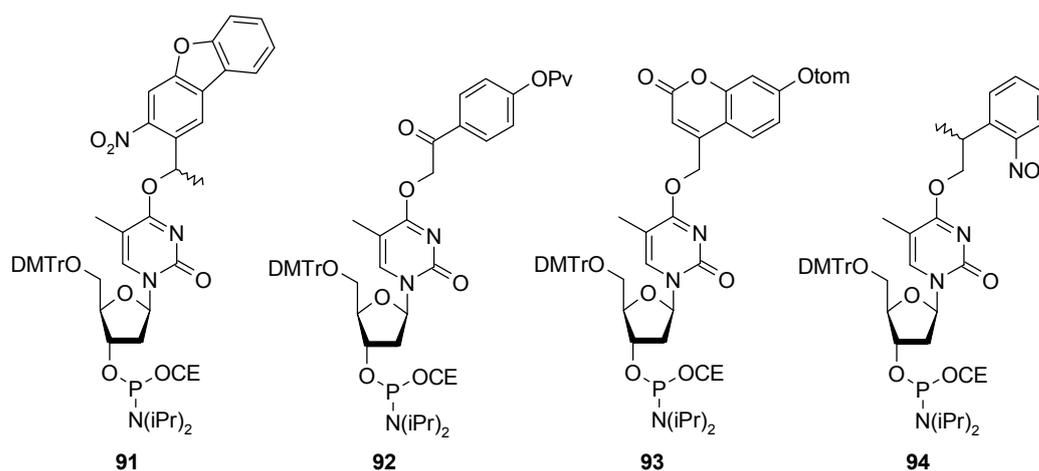
Für die Alkylierung der Nucleobasen in O<sup>4</sup>- bzw. O<sup>6</sup>-Position eignet sich eine Vielzahl an Reaktionen, es haben sich allerdings zwei Standardvarianten im Arbeitskreis Heckel etabliert. So erfolgt die O<sup>6</sup>-Modifizierung von Desoxyguanosin analog zu Silverman *et al.*<sup>[147]</sup> durch eine MITSUNOBU-Reaktion.<sup>[156]</sup> Hier reagiert die Enolform des Guanins als azide Komponente.

Für die Aktivierung der O<sup>4</sup>-Position von Desoxythymidin, Desoxycytidin und der O<sup>6</sup>-Position von Desoxyadenosin kann man aromatische Sulfonsäurechloride oder Triazole<sup>[157]</sup> verwenden. (siehe

Abschnitt 3.1.2). Sulfonylierte Varianten von Nucleobasen treten u.a. als unerwünschte Nebenprodukte bei der Synthese von Oligonucleotiden nach der Phosphortriestermethode auf, da hierbei Sulfonylchloride als Kondensationsreagenzien für die Ausbildung der Internucleotidverbindung genutzt werden.<sup>[103,158]</sup> Die sulfonylierten Nucleobasen fungieren als Elektrophile in einer Ar-S<sub>N</sub>-Reaktion und diese Reaktivität macht man sich zur Einführung von Nucleophilen zu Nutze.

Es wurden zwei Nucleoside – Desoxythymidin und Desoxyguanosin – zur Modifizierung ausgewählt. Folgende Überlegungen waren hierfür ausschlaggebend: Thymin besitzt keine nucleophilen exocyclischen Aminofunktionalitäten und muss somit nicht geschützt werden. Dies bedeutet, dass der Syntheseweg bei Desoxythymidin am kürzesten ist. Hingegen zeigt photolabil geschütztes Desoxyguanosin eine beträchtlich höhere chemische Stabilität. Bei Verwendung der Nucleoside aus Abbildung 53 in der automatisierten DNA-Festphasensynthese entstehen bei den DNA-Sequenzen mit photoaktivierbarem Desoxyguanosin so gut wie keine unerwünschten Nebenprodukte, welche aus der ungewollten Abspaltung der photolabilen Schutzgruppe während der Oligonucleotidsynthese und nachfolgender Aufreinigung resultieren können.

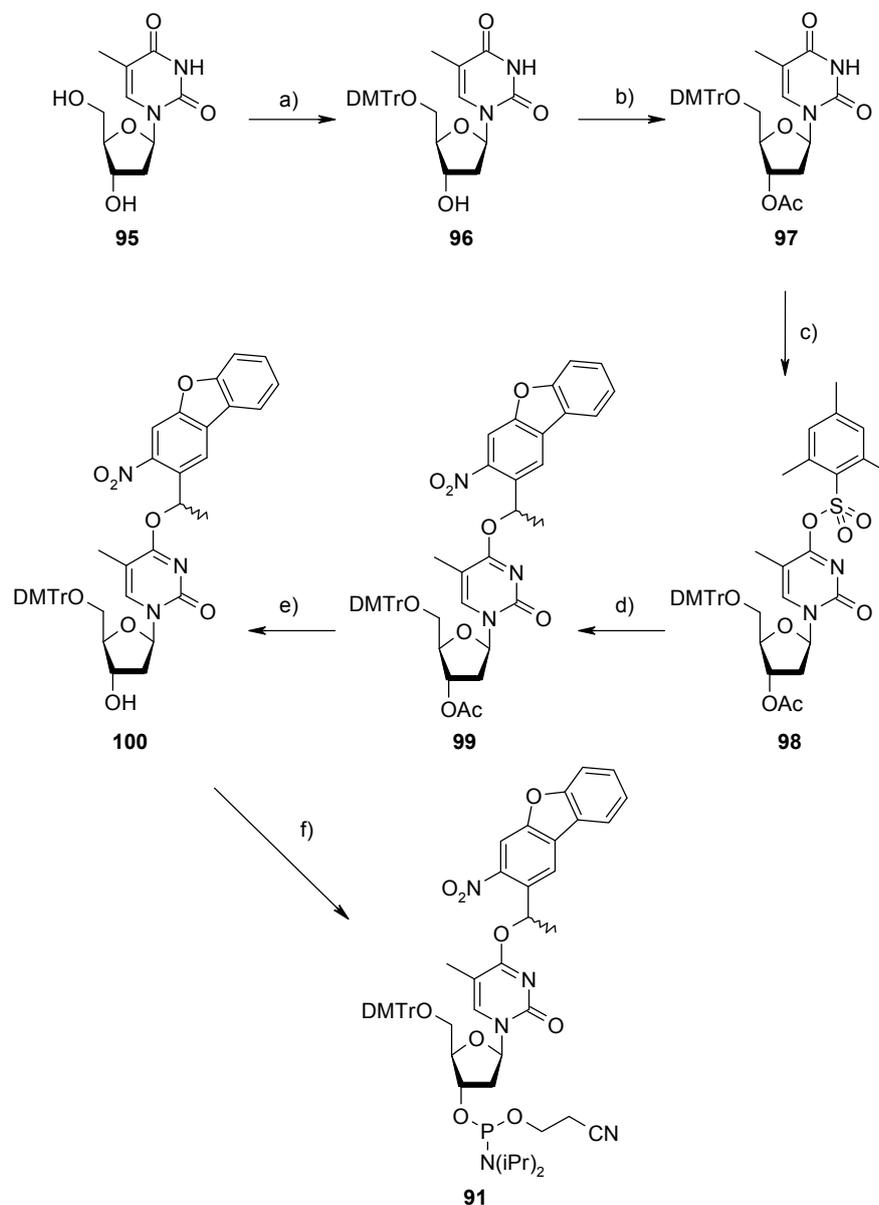
Die Synthese der photolabil geschützten Desoxyguanosinderivate wurde von M. Buff durchgeführt,<sup>[159]</sup> somit ergaben sich als Zielstrukturen die Desoxythymidinderivate **91**, **92** und **93** (siehe Abbildung 55). Das NPP-geschützte Desoxythymidin **94** sollte als „Referenznucleosid“ zum späteren Vergleich der photochemischen Eigenschaften verwendet werden. Seine Darstellung erfolgte nach Heckel und Kröck.<sup>[43]</sup>



**Abbildung 55:** Photoaktivierbare Desoxythymidinderivate als Zielmoleküle. Das NPP-geschützte Desoxythymidin **94** sollte bei der späteren Oligonucleotidsynthese als Vergleichssubstanz dienen.

## 3.1.3.1 Synthese von NDBF-geschütztem Desoxythymidin

Für die Darstellung von **91** wurde Syntheseroute **C** (siehe Abbildung 54) gewählt. Mit dieser Strategie wurden bereits gute Erfahrungen in der Synthese von NPP-geschütztem Desoxythymidin gemacht.<sup>[43]</sup>



**Abbildung 56:** Synthese des NDBF-geschützten Desoxythymidins. a) 1.3 eq DMTr-Cl, Pyridin, RT, 4 h; b) Ac<sub>2</sub>O, 0.1 eq DMAP, Pyridin, RT, 2 h; c) 1.5 eq Mesitylen-2-sulfonylchlorid, 0.1 eq DMAP, 5 eq NEt<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 3 h; d) 1.7 eq NDBF-OH **67**, 1.7 eq NEt<sub>3</sub>, 0.08 eq DMAP, RT, 5 d; e) MeNH<sub>2</sub>, RT, 3 h; f) 2 eq 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit, 5 eq DIPEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 12 h.

Hierzu wurde Desoxythymidin **95** mit DMTr-Cl in Pyridin am 5'-OH in quantitativer Ausbeute zu **96** trityliert. Anschließend erfolgte die Acetylschützung der 3'-Hydroxyfunktion zu Verbindung **97** in 93 % Ausbeute mit Acetanhydrid in Pyridin unter Zugabe einer katalytischen Menge DMAP. Als Aktivierungsreagenz diente 2-Mesitylensulfonylchlorid, welches mit **97** in Dichlormethan umgesetzt wurde. Das O<sup>4</sup>-sulfonylierte Derivat **98** konnte isoliert werden und wurde in 76 % Ausbeute erhalten.

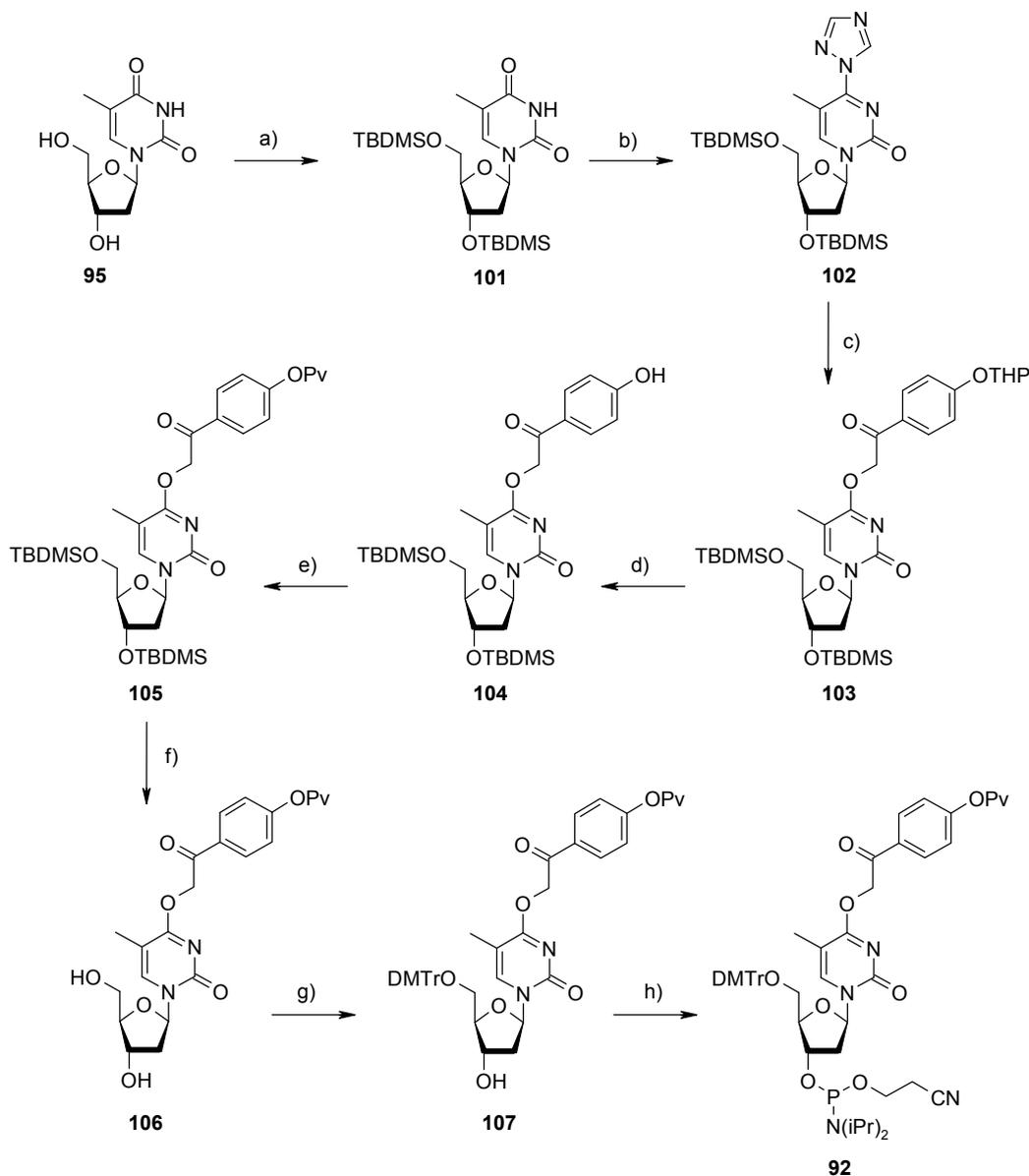
Zur Substitution mit NDBF-OH wurde das aktivierte Nucleosid **98** in Dichlormethan gelöst und mit dem entsprechenden NDBF-Alkohol **67** quantitativ zu **99** umgesetzt. Die Reaktionsdauer betrug hierbei fünf Tage bei Raumtemperatur. Der vorletzte Schritt bestand in der Deacetylierung der 3'-OH Gruppe von Verbindung **99** zu **100** mit ethanolischem Methylamin in 52 % Ausbeute. Bei diesem Schritt zeigte sich bereits eine gewisse Labilität des NDBF-Desoxythymidins gegenüber starken Basen. Wurde die Entschützungsdauer zu lange ausgedehnt, z.B. über Nacht, dann erschienen bei der dünnschichtchromatographischen Analyse bereits signifikante Mengen an Zersetzungsprodukt bis hin zum vollständigen Verlust des gewünschten Produktes. Umso wichtiger erschien es, auch Desoxyguanosin an O<sup>6</sup>-Position zu modifizieren, in der Hoffnung, dass dieses Nucleosidderivat gegenüber basischen Bedingungen stabiler ist. Die Phosphitylierung zur Darstellung des Phosphoramidits **91** für die DNA-Festphasensynthese erfolgte mit 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit in Dichlormethan und Zugabe von DIPEA aus Verbindung **100** mit einer Ausbeute von 75 %.

### 3.1.3.2 Synthese von pHP-geschütztem Desoxythymidin

Die Synthese von **92** erfolgte nach Route **B** (siehe Abbildung 54) mit der transienten Schützung der 3'- und 5'-Hydroxygruppe durch TBDMS. Die Verwendung der Silylschutzgruppe anstelle der direkten Tritylierung ist notwendig, da die THP-Schutzgruppe an phenolischer Position unter sauren Reaktionsbedingungen abgespalten und durch eine säurestabile Schutzgruppe ersetzt werden muss. Nur so kann das Nucleosid in der automatisierten DNA-Festphasensynthese eingesetzt werden. Die bereits eingeführte THP-Gruppe würde andernfalls unter den sauren Bedingungen der Detritylierung mit 3 %-iger Trichloressigsäure ebenfalls abgespalten, was in der Freisetzung der Phenolgruppe resultieren würde. Dies wiederum hätte eine unerwünschte Kettenverlängerung an dieser nukleophilen Position zur Folge. Vorarbeiten zur Darstellung von pHP-geschütztem Desoxythymidin wurden bereits von M. Buff in seiner Diplomarbeit geleistet.<sup>[160]</sup>

Die Einführung der TBDMS-Schutzgruppe zu **101** gelang in quantitativer Ausbeute analog zu Behr *et al.*<sup>[161]</sup> Hierzu wurde Desoxythymidin **95** in Pyridin mit TBDMS-Cl umgesetzt, Imidazol diente als Aktivator. Es hatte sich herausgestellt, dass die Substitutionsreaktion nach Sulfonylaktivierung an O<sup>4</sup>-Position nicht erfolgreich war,<sup>[160]</sup> im Gegenzug aber die Substitution bei Verwendung von 1,2,4-Triazol gelang. Deshalb wurde nach einer Vorschrift von Quinn *et al.*<sup>[157]</sup> das TBDMS-geschützte Desoxythymidin mit quantitativer Ausbeute mittels Reese-Reagenz in das triazolylierte Derivat **102** überführt. Die anschließende Substitution durch den THP-pHP-Alkohol **57** erfolgte in Acetonitril unter Zusatz von DBU in 48 % Ausbeute. Der nächste Schritt bestand nun in der erwähnten THP-Entschützung der pHP-Gruppe. Das Nucleosid **103** wurde hierzu in einer MeOH/THF Mischung mit *p*-Toluensulfonsäure versetzt, man erhielt das entschützte Derivat **104** in 51 % Ausbeute. Als

geeignete Schutzgruppe für die phenolische Hydroxyfunktionalität hat sich die säurestabile Pivaloylgruppe erwiesen.



**Abbildung 57:** Synthese des pHP-geschützten Desoxythymidins. a) 5 eq TBDMS-Cl, 7 eq Imidazol, DMF, RT, 1.5 h; b) 1.5 eq POCl<sub>3</sub>, 20 eq 1,2,4-Triazol, 20 eq NEt<sub>3</sub>, MeCN, 4°C, 1h; 2. **101**, MeCN, 4°C, 1h; c) 2 eq THP-pHP Alkohol **57**, 2 eq DBU, MeCN, RT, 2 h; d) 1.5 eq *p*-TsOH, 3:1 THF/MeOH, RT, 20 min; e) 2.3 eq PvCl, Pyridin, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 16 h; f) 3 eq TBAF, AcOH, THF, RT, 16 h; g) 1.1 eq DMTr-Cl, Pyridin, 4°C → RT, 16 h; h) 2 eq 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit, 5 eq DIPEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 12 h.

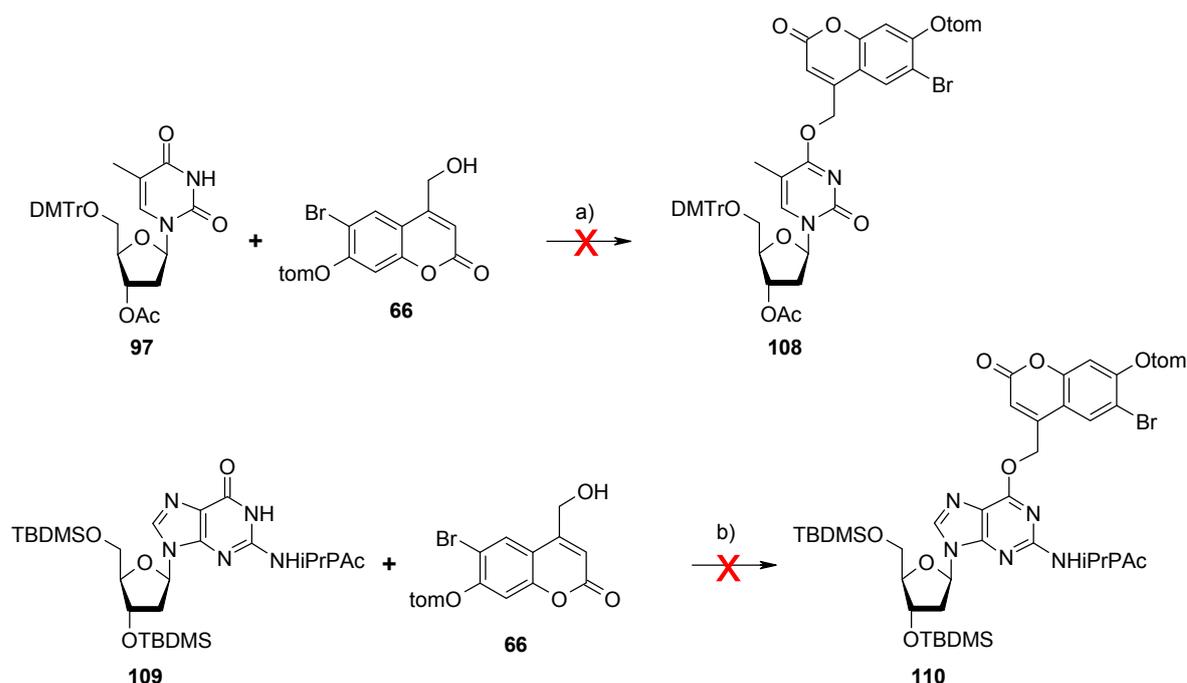
Die Darstellung von Verbindung **105** gelang in 75 % Ausbeute. Die Reaktion wurde mit Pivaloylchlorid in Dichlormethan unter Zugabe von Pyridin durchgeführt. Der hier gewählte Umweg über Verwendung der THP-Schutzgruppe und anschließender erneuter Schützung des Phenols scheint auf den ersten Blick nicht elegant zu sein. Er ist aber notwendig, da die Pivaloylgruppe unter den basischen Reaktionsbedingungen, welche für die Substitutionsreaktion zu Nucleosid **103** verwendet werden, nicht stabil ist und deshalb nicht bereits von Anfang an verwendet werden kann.

Zur Entfernung der Silylschutzgruppen wurde Nucleosid **105** in THF mit Eisessig versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 M TBAF in THF. Die Verwendung der Essigsäure sorgt durch Protonierung für eine verringerte Nucleophilie der Fluoridionen.<sup>[162]</sup> Dies sollte einen eventuellen nucleophilen Angriff auf die Pivaloylgruppe verhindern. Die obligatorische Schützung der 5'-OH Gruppe von Verbindung **106** mittels DMTr wurde in Pyridin mit DMTr-Cl durchgeführt, die Ausbeute betrug 68 %. Durch Phosphitylierung wurde das vollständig geschützte Nucleosid **107** in Dichlormethan mit 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit und DIPEA in 60 % Ausbeute zum Phosphoramidit **92** umgesetzt.

### 3.1.3.3 Synthese von Bhc-geschütztem Desoxythymidin und Desoxyguanosin

Bislang existiert in der Literatur nur ein Beispiel, in welchem Nucleoside an ihrer Nucleobase mit einer Cumarinschutzgruppe versehen wurden.<sup>[111]</sup> Die Modifikation erfolgte hier an N<sup>4</sup>- bzw. N<sup>6</sup>-Position von Desoxycytidin und Desoxyadenosin mit Hilfe eines Carbamatlinkers. Die Ausbeuten lagen im Bereich von 3-8 %. Die so modifizierten Nucleoside wurden des Weiteren nicht in der automatisierten DNA-Festphasensynthese eingesetzt, ihre photochemischen Eigenschaften somit nur auf Monomerebene untersucht. Es erscheint auch fraglich, ob der Carbamatlinker hinsichtlich der Bedingungen einer Festphasensynthese von Oligonucleotiden beständig sein kann – die Standardprotokolle zur basischen Abspaltung und Entschützung jedenfalls wären hier ungeeignet. Silverman *et al.* verwendeten zur photolabilen Schützung von Pyrimidinen mit NPE-OH eine MITSUNOBU-Reaktion.<sup>[47]</sup> In Anlehnung an diese Vorschrift wurde geschütztes Desoxythymidin **97** mit dem tom-geschützten Bhc-Alkohol **66** unter Zugabe von Triphenylphosphin und DIAD in THF zur Reaktion gebracht (siehe Abbildung 58). Die Reaktion zu dem gewünscht Produkt **108** war jedoch nicht erfolgreich.

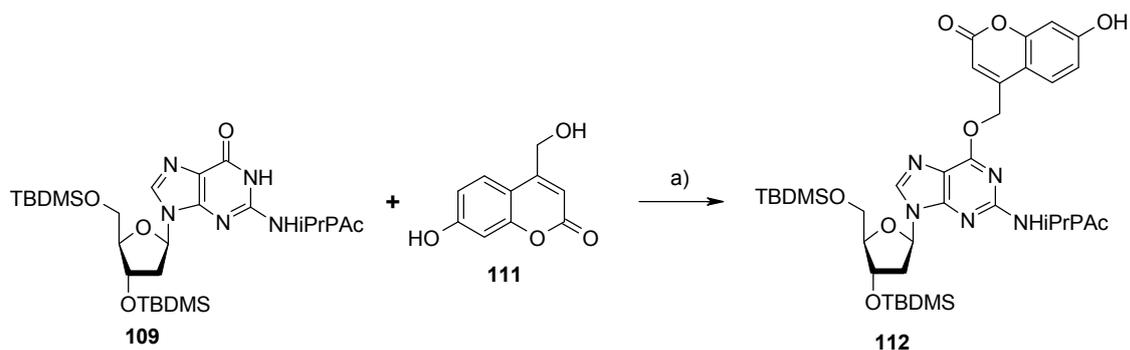
In einem weiteren Ansatz wurde versucht, den Bhc-OH **66** mit geschütztem Desoxyguanosin **109** unter den gleichen Reaktionsbedingungen umzusetzen, welche auch für die O<sup>6</sup>-Modifizierung mit NPP-OH verwendet werden.<sup>[45]</sup> Vollständig geschütztes Desoxyguanosin **109** wurde in THF unter Eisbadkühlung vorgelegt und mit PPh<sub>3</sub> und DEAD versetzt. Nach ca. 20 min Rühren erfolgte die Zugabe des Alkohols **66**. Die Gesamtreaktionsdauer betrug zwölf Stunden. Auch in diesem Fall konnte kein Produkt erhalten werden (siehe folgende Abbildung 58).



**Abbildung 58:** Experimente zur Einführung von Bhc-OH **66** über eine MITSUNOBU-Reaktion. a) 1.1 eq Cumarin **66**, 1.5 eq PPh<sub>3</sub>, 1.5 eq DIAD, THF, 4°C → RT, 16 h; b) 1.1 eq Cumarin **66**, 1.6 eq PPh<sub>3</sub>, 1.6 eq DEAD, THF, 4°C → RT, 16 h.

Sterische Gründe könnten ein Grund für das Nicht-Gelingen der Reaktionen gewesen sein. Um den sterischen Anspruch des Cumarins zu reduzieren, wurde kommerziell erhältliches 7-Acetoxy-4-brommethylcumarin zum entsprechenden Alkohol **111** hydrolysiert und als „Testcumarin“ eingesetzt. Es besitzt weder eine 6-Bromsubstitution noch eine ausladende Schutzgruppe in phenolischer Position. Somit sind die sterischen Ansprüche geringer, es sind allerdings auch die elektronischen Eigenschaften des Moleküls verändert.

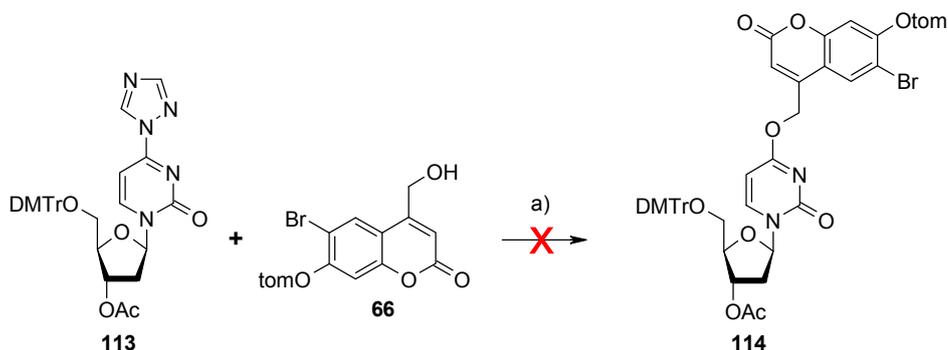
Die Hydrolyse erfolgte durch Erhitzen in Wasser. Es stellte sich heraus, dass die Acetylgruppe bei der Reaktion ebenfalls abgespalten wurde, dennoch wurde der Alkohol im folgenden Experiment eingesetzt. Die Reaktion erfolgte erneut mit vollständig geschütztem Desoxyguanosin **109** unter identischen Reaktionsbedingungen (siehe oben). Es konnte erfolgreich eine Produktfraktion in einer Ausbeute von 8% erhalten werden (siehe Abbildung 59). Die Isolierung erwies sich als sehr aufwendig, die Verbindung zeigte während der säulenchromatographischen Aufreinigung ein inkonsistentes Laufverhalten. Die Analyse der <sup>1</sup>H-NMR Daten führt zu der Schlussfolgerung, dass die Substitution am C6 des Guanins wie gewünscht über die aliphatische OH-Gruppe des Cumarins erfolgt ist und nicht, wie zu befürchten war, über die phenolische. Wird deuteriertes DMSO als Lösungsmittel für das NMR-Experiment verwendet, so erscheint das Protonensignal der phenolischen OH-Gruppe bei einer Verschiebung von 10.6 ppm.



**Abbildung 59:** Erfolgreiche Modifizierung von Desoxyguanosin durch 7-Hydroxy-4-hydroxymethyl-cumarin. a) 1.5 eq Cumarin **111**, 1.5 eq PPh<sub>3</sub>, 1.5 eq DEAD, THF, RT, 48 h.

In einem letzten Experiment wurde versucht, Bhc-OH **66** mit einem triazolaktivierten Desoxyuridinderivat **113** umzusetzen. Dieses Desoxyuridin dient eigentlich als Vorläufer zur Synthese von NPE-geschütztem Desoxycytidin. Uracil besitzt im Gegensatz zu Thymin keine 5-Methylgruppe und ist somit für Substitutionen an C-6 sterisch weniger gehindert als letzteres.

Cumarin **66** wurde in DMF vorgelegt und die Lösung dann mit DBU versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe des triazolaktivierten Desoxycytidins **113**. Die Reaktion wurde für fünf Tage gerührt. Auch dieser Ansatz war nicht erfolgreich.

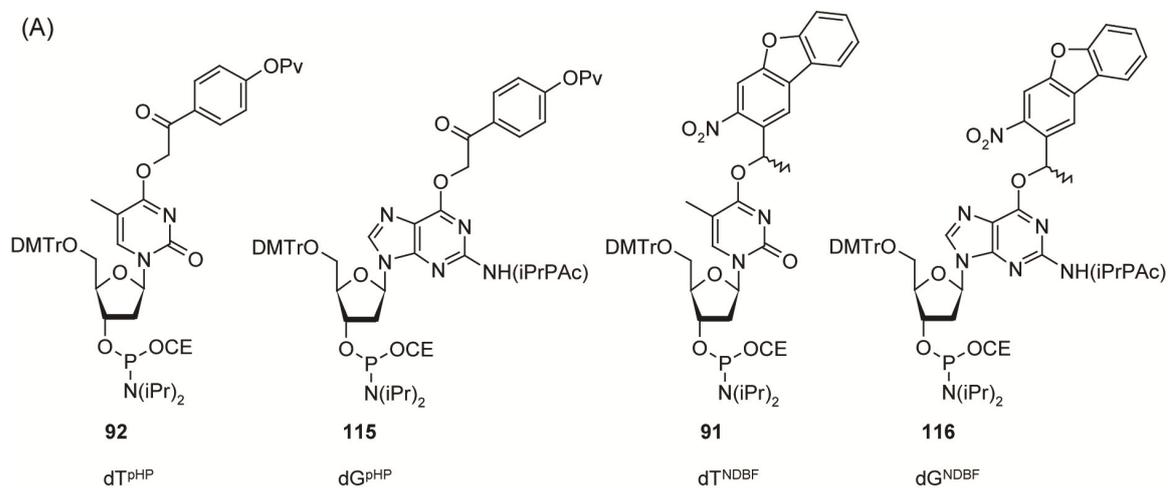


**Abbildung 60:** Experiment zur Einführung von Bhc-OH **66** über ein triazolaktiviertes Desoxycytidin **113**. a) 1.4 eq Cumarin, 1.4 eq DBU, DMF, RT, 5 d.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die generelle Modifizierung – zumindest von Desoxyguanosin – durch eine Cumarinschutzgruppe *via* MITSUNOBU-Reaktion gelingen kann. Die Gründe, warum Bhc-OH nicht wie gewünscht reagiert, sind nicht direkt ersichtlich. Möglicherweise liegt die Ursache in der elektronischen Natur der Verbindung, bedingt durch die Brommodifikation. Bis jetzt wurden noch keine weiteren Versuche unternommen, Bhc-OH doch noch zur Reaktion zu bringen. Eventuell gelingt die Reaktion durch Verwendung einer anderen phenolischen Schutzgruppe. Auch der Verzicht auf die Schützung der Hydroxyfunktion kann nach den Ergebnissen der Reaktion mit dem Cumarinderivat **111** in Erwägung gezogen werden. Hier fand die Substitution bei ungeschützter phenolischer OH-Funktionalität über die aliphatische OH-Gruppe statt.

### 3.1.4 DNA-Oligonukleotidsynthese mit pHP- und NDBF-geschütztem Desoxythymidin und Desoxyguanosin

Die Synthese der neuartigen photoaktivierbaren Derivate von Desoxythymidin und -guanosin erfolgte als deren Phosphoramidite (siehe Abbildung 61). Somit können sie in der automatisierten DNA-Festphasensynthese verwendet werden. Um ihre Stabilität unter Festphasensynthesebedingungen, sowie die duplexdestabilisierenden und photochemischen Eigenschaften der neuen Schutzgruppen zu testen, sollten diese in eine 25mer DNA-Sequenz eingebaut werden. Die Sequenz wurde so gewählt, dass ihr Schmelzpunkt bei ungefähr 80°C liegt – was durch einen hohen G/C-Basenteil erreicht wird – und das sie nicht selbstkomplementär ist. Somit besteht nicht die Gefahr, dass unerwünschte Sekundärstrukturen ausgebildet werden, welche die Ergebnisse verfälschen würden.



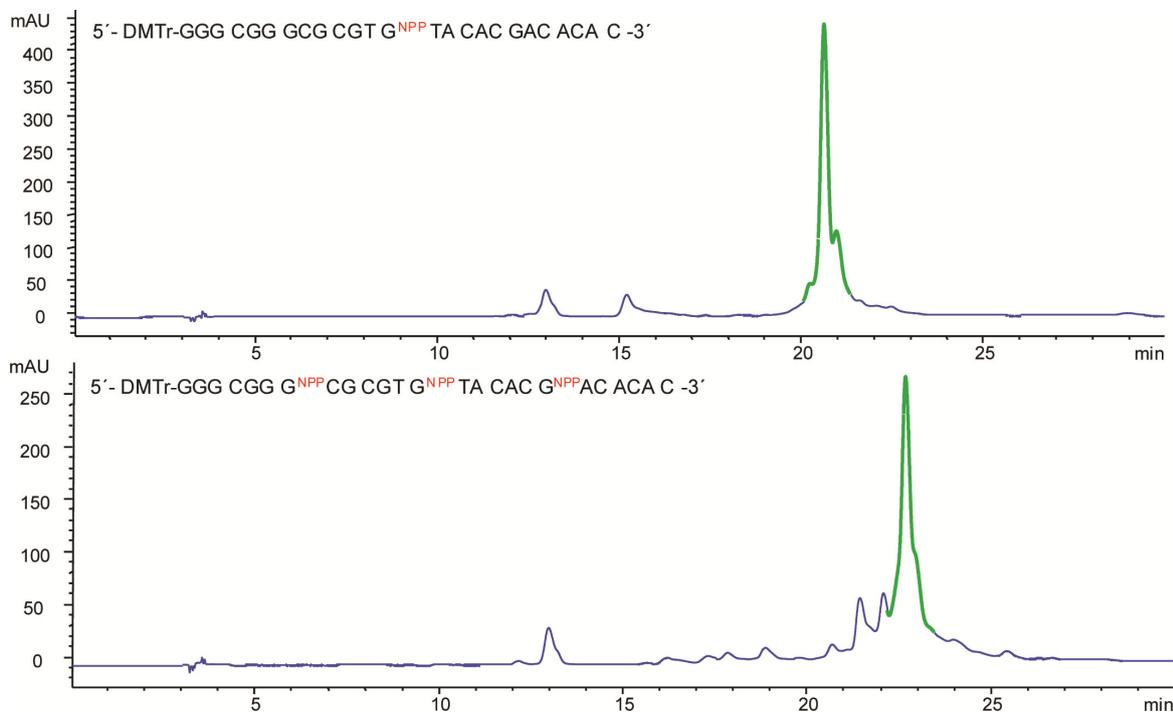
(B)



**Abbildung 61:** (A) Struktur der neuartigen Nucleoside. Die modifizierten Desoxyguanosine **115** und **116** wurden von M. Buff synthetisiert. (B) Testsequenz für geplante Schmelzpunktbestimmung und Entschützungsexperimente (X = Position der photolabil geschützten Nucleotide).

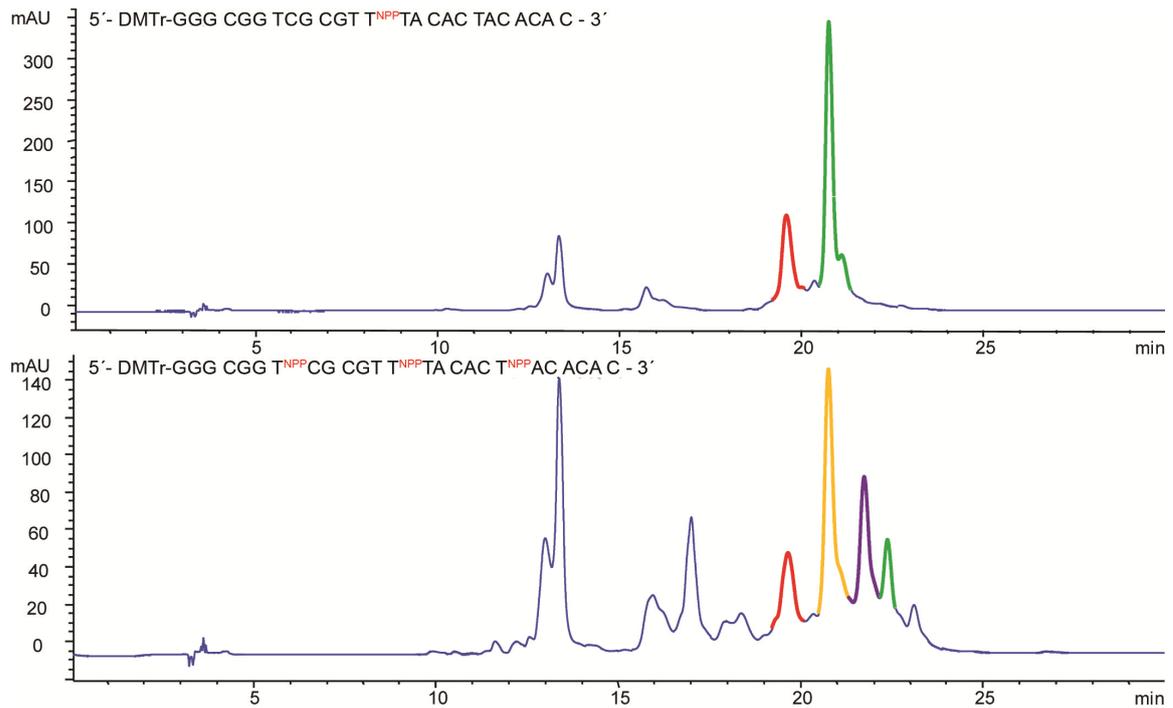
Um die neuen photolabilen Schutzgruppen mit der bereits etablierten NPP-Gruppe vergleichen zu können, sollten dT<sup>NPP</sup> und dG<sup>NPP</sup> als Referenz verwendet werden. Ihre Darstellung erfolgte nach Heckel *et al.*<sup>[43,45]</sup> Der Einbau der Nucleoside in die DNA-Sequenz erfolgte sowohl jeweils in der mittleren Position, als auch zwei weiteren Positionen mit jeweils 5 Nucleotiden Abstand zur mittleren Position. Die entsprechenden Stellen sind in Abbildung 61 gekennzeichnet. Somit ergaben sich insgesamt zwölf 25mer Sequenzen.

Die Synthesen wurde unter Standardbedingungen auf ABI LV200 Polystyrensäulen im „DMTr-On“ Modus durchgeführt. Für die analytischen Tests wurde jeweils eine Spatelspitze Festphasenmaterial mit konzentriertem wässrigem Ammoniak versetzt, die Inkubationsdauer betrug fünf Stunden bei Raumtemperatur. Die Analyse des Abspaltproduktes erfolgte mittels RP-HPLC.



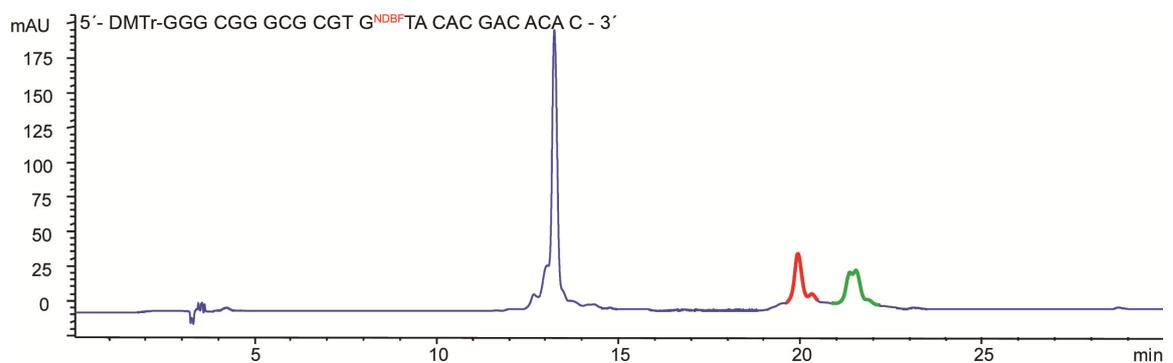
**Abbildung 62:** RP-HPLC-Chromatogramme der dG<sup>NPP</sup>-Sequenzen. Die Signale (grün) entsprechen den Vollängenprodukten. Gut zu erkennen ist die höhere Retentionszeit der 3-fach photolabil geschützten Sequenz im Vergleich zur 1-fach geschützten Sequenz.

Die Chromatogramme aus Abbildung 62 zeigen jeweils eine ideale DNA-Synthese. Es sind kaum Abbruchsequenzen zu erkennen (im Bereich von 14-15 min), sondern ausschließlich die gewünschten Vollängenprodukte. Im Vergleich hierzu zeigt die folgende Abbildung 63 die Chromatogramme der DNA-Synthese mit dT<sup>NPP</sup>. Hier wird die bereits weiter oben erwähnte geringere Stabilität der NPP-Schutzgruppe auf Desoxythymidin deutlich. So konnte im Falle der dreifach photolabil geschützten Sequenz so gut wie kein Vollängenprodukt erhalten werden.



**Abbildung 63:** RP-HPLC-Chromatogramme der dT<sup>NPP</sup>-Sequenzen. Deutlich zu erkennen ist die Labilität der NPP-Schutzgruppe im Falle von Desoxythymidin. In grün sind wieder die Vollängenprodukte gezeigt, in rot die DNA-Stränge, welche keine photolabile Schutzgruppe mehr besitzen. Das violette Signal entspricht der Sequenz mit noch zwei Schutzgruppen, das orange Signal entstammt der Sequenz mit einer Schutzgruppe. Auffallend ist im unteren Chromatogramm auch die hohe Anzahl an Abbruchsequenzen (12-14 min) und Nebenprodukten (15-19 min).

Die NDBF- und vor allem die pHP-Gruppe waren unter den verwendeten Abspaltbedingungen leider nicht stabil, dies gilt insbesondere für die geschützten Desoxythymidine. Es traten in den Chromatogrammen fast ausschließlich die Signale auf, welche der Sequenz ohne photolabile Schutzgruppe entsprechen. Exemplarisch sei hier (Abbildung 64) die Analyse der einfach photolabil geschützten dG-Sequenz gezeigt, in welcher immerhin ein ungefähres 1:1 Verhältnis zwischen Vollängenprodukt und Sequenz ohne NDBF erkennbar ist.



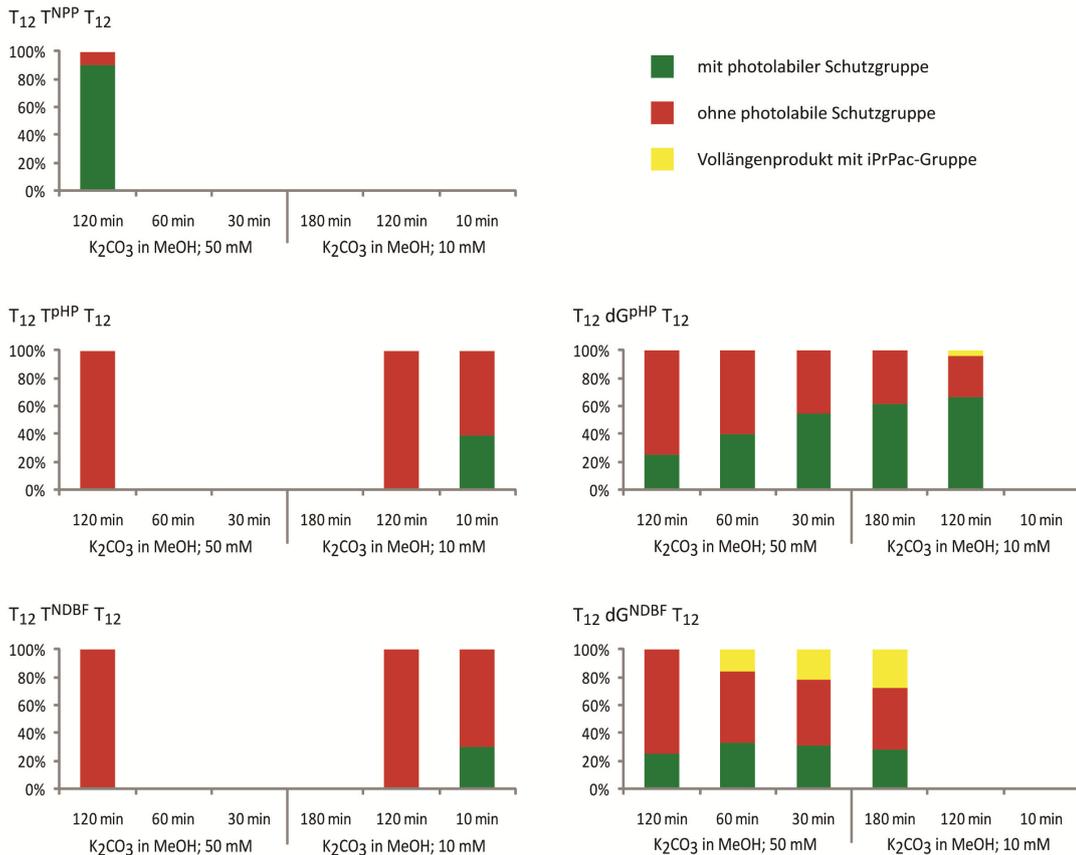
**Abbildung 64:** RP-HPLC-Chromatogramm der NDBF-geschützten dG-Sequenz. In grün ist das Signal des Vollängenprodukts erkennbar, das rote Signal entspricht der Sequenz ohne NDBF. Bei ~14.2 min erscheint eine große Menge an Abbruchsequenzen.

Ein ähnliches Ergebnis wurde bei der Verwendung von 40 % Methylamin in Wasser/Ethanol 1:1 als Abspaltungsreagenz erzielt. Methylamin ist ein stärkeres Nukleophil als Ammoniak, somit kann bei dessen Verwendung die Reaktionsdauer auf zwei Stunden bei Raumtemperatur reduziert werden. Eine weitere, recht milde Variante, stellt die Verwendung einer 3:1 Mischung von Methanol und Ammoniak dar. Auch dieses Reagenz wurde ausprobiert, die Inkubationsdauer betrug vier Stunden bei Raumtemperatur. Unerklärlicherweise erfolgte in diesem Fall keine Abspaltung der Oligonukleotide von dem Polystyrenträgerharz.

Die Testsequenz war nicht dazu geeignet, um noch mildere Abspaltbedingungen testen zu können. Die von uns standardmäßig verwendeten dA<sup>Bz</sup>, dC<sup>Ac</sup> und dG<sup>dmf</sup> Nukleoside benötigen zur vollständigen Entschützung der Nucleobasen bereits mit konzentriertem Ammoniak eine Reaktionsdauer von mindestens drei Stunden bei Raumtemperatur, die Spaltung des Festphasenlinkers ist in einer Stunde vollständig.<sup>[163]</sup> Deswegen wurde die Testsequenz radikal vereinfacht und eine 25mer-dT Sequenz für die weiteren Experimente verwendet. Somit war der limitierende Faktor nicht mehr die Entschützung der Nucleobasen, sondern nur noch die Abspaltung des Oligonukleotids vom Festphasenmaterial.

Weitere Experimente sollten mit einer 50 mM methanolischen Kaliumcarbonatlösung als Abspaltreagenz erfolgen. Dieses Reagenz wird bei der „ultramild Strategie“ verwendet und ist in der Lage, ultramild geschützte Nucleobasen in vier Stunden bei Raumtemperatur zu entschützen. Die Verhältnisse von Sequenz mit photolabiler Schutzgruppe zur Sequenz mit abgespaltener Schutzgruppe wurden durch Integration der Signalfächen aus den HPLC-Chromatogrammen ermittelt. Zunächst erfolgte der Test mit einem einfach dG<sup>NDBF</sup> und dG<sup>pHP</sup> modifiziertem 25mer mit Inkubationszeiten von 30, 60 und 120 Minuten bei Raumtemperatur. Die Ergebnisse sind in Abbildung 65 gezeigt. Bei Verwendung des dG<sup>NDBF</sup> waren bereits nach 30 min Inkubationsdauer nur noch 31 % des Oligonukleotides mit Schutzgruppe intakt, der Wert stagnierte nach 120 min bei 25 %. Im Gegensatz dazu erwies sich das dG<sup>pHP</sup> als stabiler. Nach 30 min war bei 55 % der Sequenz die photolabile Schutzgruppe noch vorhanden. Nach 120 min Inkubationsdauer war der Prozentsatz an intaktem Oligonukleotid aber ebenfalls auf 25 % gesunken. Interessanterweise zeigte sich bei der dG<sup>NDBF</sup>-Sequenz ein signifikant höherer Anteil an Vollängenprodukt, bei welchem die *i*-PrPAC-Schutzgruppe am Guanin noch nicht abgespalten war.

Selbiges Experiment wurde auch mit den beiden modifizierten Desoxythymidinnucleosiden durchgeführt. Hier zeigte sich erneut die relative Instabilität von photolabil geschütztem Desoxythymidin im Vergleich mit Desoxyguanosin. Es musste auf ein noch geringer konzentriertes Abspaltreagenz von 10 mM Kaliumcarbonat in Methanol zurückgegriffen werden, um überhaupt photoaktivierbare Oligonukleotide erhalten zu können. Wie aus Abbildung 65 ersichtlich ist, konnten nach einer Inkubationsdauer von 10 min 30 % NDBF- geschützte bzw. 40 % pHP-geschützte DNA-Sequenz isoliert werden, wohingegen in beiden Fällen nach 120 min kein Produkt mit Schutzgruppe mehr vorhanden war.

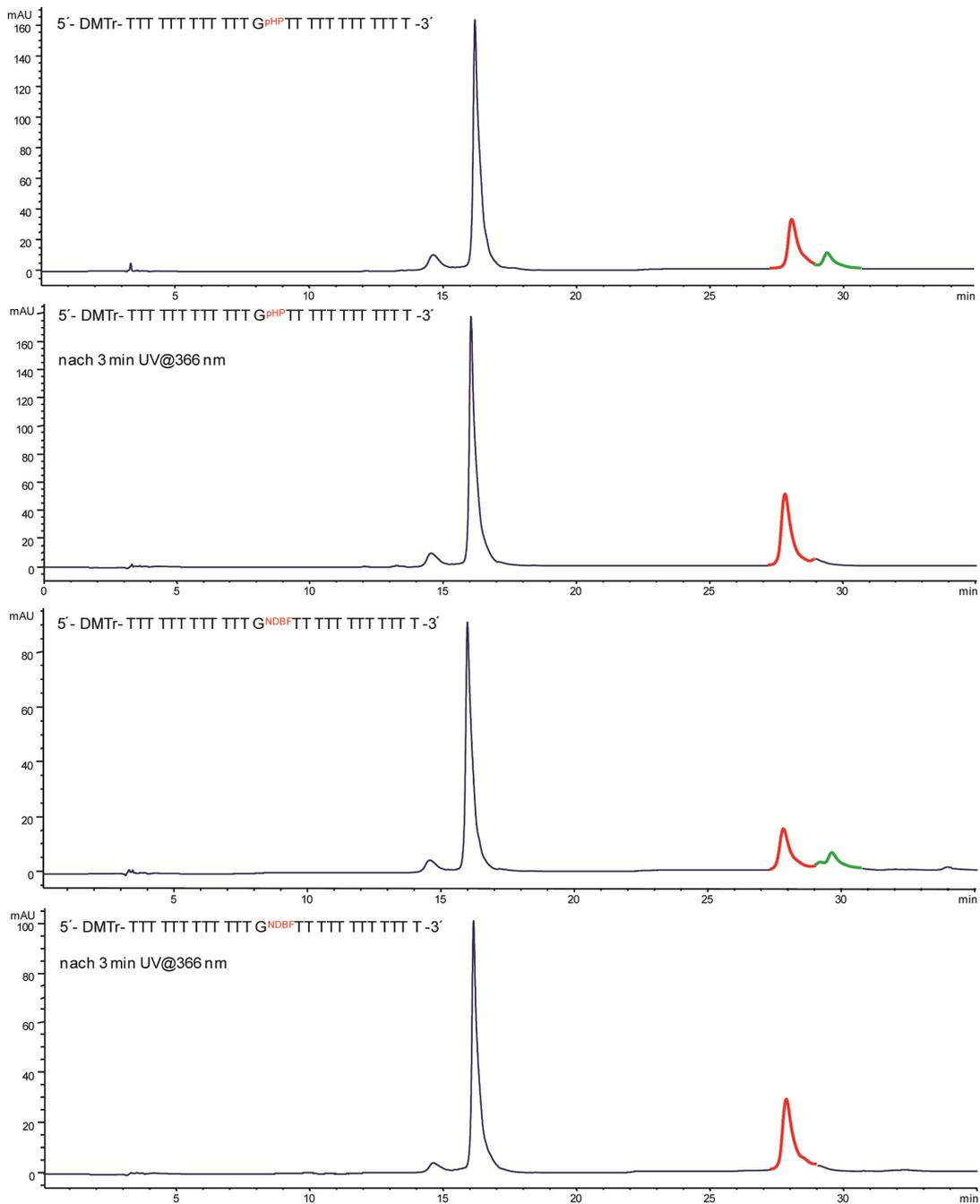


**Abbildung 65:** Stabilität der NDBF- bzw. pHP-geschützten Testsequenzen unter verschiedenen Abspaltbedingungen bei Raumtemperatur. Zum Vergleich dient ein NPP-geschütztes poly-dT-25mer.

Anzumerken ist an dieser Stelle noch, dass bei Verwendung der bereits etablierten Nucleoside dT<sup>NPP</sup> und dGN<sup>NPP</sup> mit 50 mM Kaliumcarbonat in Methanol auch nach 120 min Inkubationsdauer die gewünschten photolabil geschützten Oligonucleotide zu mindestens 90 % erhalten wurden. Zudem zeigte sich, dass sich die *i*-PrPac-geschützte exozyklische Aminofunktion des dGN<sup>NPP</sup> mit diesem milden Abspaltreagenz vollständig entschützen lässt.

In einem letzten Experiment wurde versucht, die Oligonucleotide mit 10 mM Kaliumcarbonat in Methanol präparativ vom Festphasenmaterial abzuspalten. Die Inkubationsdauer betrug zehn Minuten bei Raumtemperatur. Bei den Oligonucleotiden, welche photolabil geschütztes Desoxyguanosin enthielten, konnte das Verhältnis von Oligonucleotid mit photolabiler Schutzgruppe zu Oligonucleotid ohne Schutzgruppe noch einmal verbessert werden – es betrug bei dGN<sup>NDBF</sup> letztendlich 1:1, bei dGN<sup>NPP</sup> sogar 7:3 – allerdings war hier die *i*-PrPac Entschützung des dGN<sup>NDBF</sup> unvollständig. Es konnte generell nur eine sehr geringe Menge DNA vom Trägermaterial abgespalten werden. Selbst bei erneuter Inkubation mit dem Abspaltreagenz erhielt man letztendlich eine Gesamtmenge von 0.5-1 nmol – wohlgermerkt bei 200 nmol Ansatzgröße. Mit konzentriertem Ammoniak erfolgte auch die Abspaltung der restlichen DNA. Es gibt also Besetzungsstellen auf der Polystyrenoberfläche des Festphasenmaterials, welche für das milde Abspaltreagenz zugänglich sind, allerdings scheint es nicht tiefer in die Kavitäten des Polystyrens vordringen zu können.

In der folgenden Abbildung 66 sind beispielhaft die RP-HPLC Chromatogramme der dG<sup>pHP</sup> und dG<sup>NDBF</sup> modifizierten 15mer-dT Sequenzen nach dreiminütiger Belichtung mit UV-Licht gezeigt. Man erkennt, dass sich die photolablen Schutzgruppen komplett abspalten lassen.



**Abbildung 66:** Belichtungsexperiment mit den dG<sup>pHP</sup> und dG<sup>NDBF</sup> modifizierten 15mer-poly-dT Sequenzen. Nach einer Belichtungsdauer von 3 min ist die photolabil geschützte Sequenz (grün) vollständig verschwunden. Das rot markierte Signal entspricht der Sequenz ohne Schutzgruppe.

Zur Zwischenbilanz lässt sich sagen, dass erfolgreich NDBF- und pHP-geschütztes Desoxythymidin sowie Desoxyguanosin synthetisiert werden konnte. Ebenso zeigten sich die beiden Schutzgruppen mit UV-Licht vollständig von der Nukleobase abspaltbar. Jedoch sind diese Nucleoside leider nicht für die Standardsynthese von DNA geeignet. Sie erwiesen sich in den Abspalttests als zu labil, wobei pHP etwas stabiler zu sein scheint. Auch der allgemeine Trend, dass photolabil geschütztes Desoxythymidin instabiler ist als das entsprechende Desoxyguanosin ließ sich bestätigen. Selbst bei Verwendung von so genannten „ultramilden“ Bedingungen zeigte sich bereits nach wenigen Minuten ein hoher Prozentsatz an Oligonukleotiden ohne photolabile Schutzgruppe. Für die Synthese von Sequenzen mit allen vier kanonischen Nucleotiden sind jedoch selbst unter ultramilden Bedingungen Inkubationszeiten von vier Stunden mit 50 mM Kaliumcarbonat in Methanol notwendig. Über die Ursachen der Labilität kann hier nur spekuliert werden. Möglich ist, dass zumindest die NDBF-Gruppe eine gute Abgangsgruppen in einer  $S_N$ -Reaktion ist, Angriffspunkt eines Nucleophils könnte im Besonderen das benzyliche Kohlenstoffatom sein. Durch eine Homologisierung müsste es möglich sein, die reaktive benzyliche Position zu entschärfen. Somit erschien die Darstellung eines NPP-analogen Dibenzofuranderivates zwingend erforderlich zu sein.

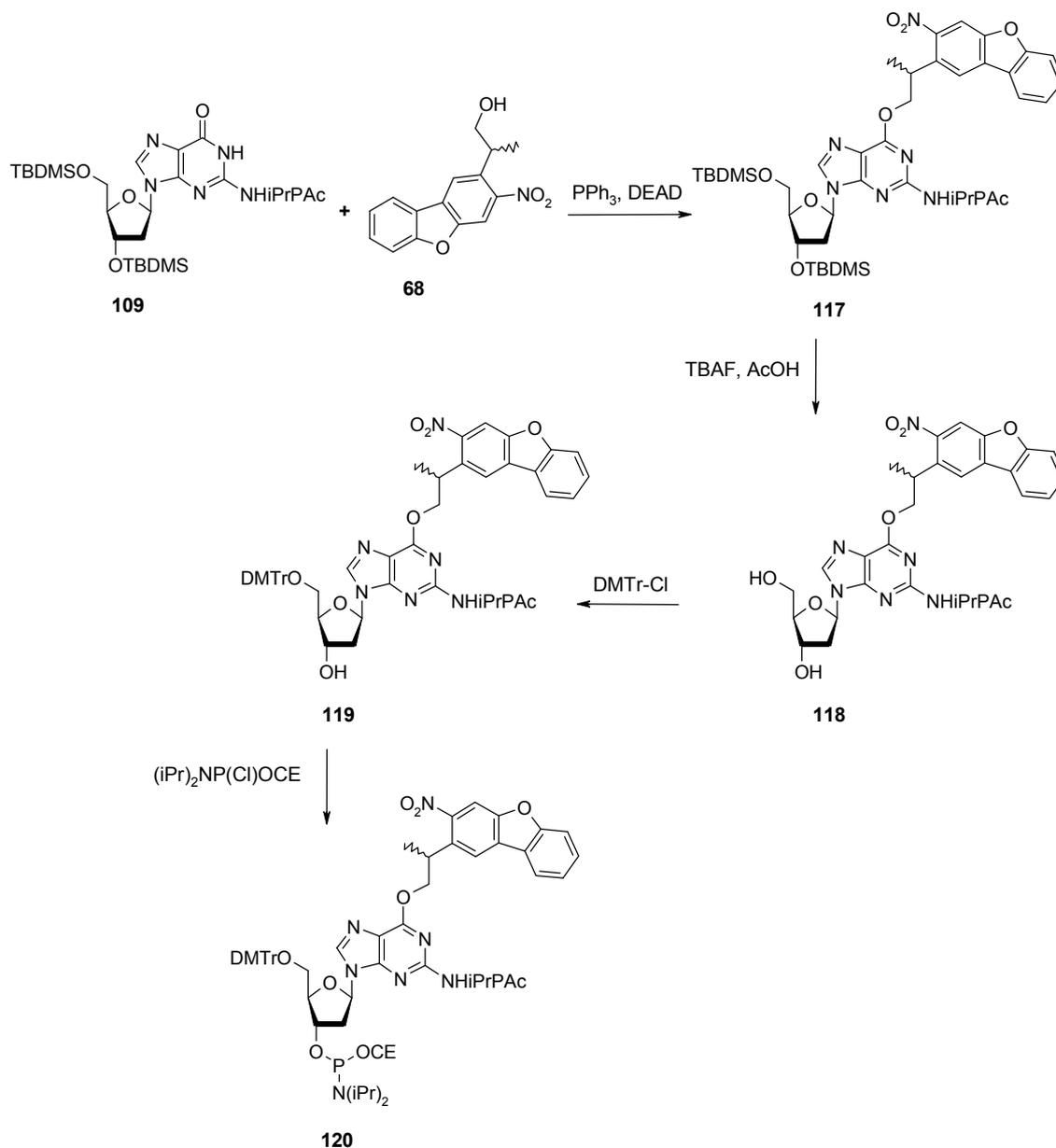
Nach anfänglichen Schwierigkeiten gelang die Synthese des hNDBF (h = „homolog“) **68** wie in Abschnitt 3.1.1.5 beschrieben. Diese Schutzgruppe wurde von C. Özcohan in seiner Diplomarbeit<sup>[164]</sup> photochemisch charakterisiert – die Ergebnisse seien im Folgenden kurz vorgestellt.

### 3.1.5 DNA-Oligonukleotidsynthese mit hNDBF-geschütztem Desoxyguanosin

Die Synthese des hNDBF-geschützten Desoxyguanosins erfolgte analog Weg **B** (Abbildung 54) durch TBDMS-Schätzung der glykosidischen OH-Gruppen. Zur Schätzung der exozyklischen Aminofunktion wurde ebenfalls auf die *i*-PrPac-Gruppe<sup>[165]</sup> zurückgegriffen. Die Modifizierung mit hNDBF-OH **68** wurde durch eine MITSUNOBU-Reaktion erreicht. Nach Desilylierung, Tritylierung und Phosphoramidierung wurde das dG<sup>hNDBF</sup>-Phosphoramidit in einer Gesamtausbeute von ca. 43 % – ausgehend von silylgeschütztem Desoxyguanosin – erhalten (siehe Abbildung 67). Das Phosphoramit **120** wurde in der automatisierten DNA-Festphasensynthese unter Standardbedingungen eingesetzt. Die Ausbeute der 15mer Testsequenz 5'-GCA TAA AG<sup>hNDBF</sup>A AAG GTG -3' betrug 43 %. Die Schmelzpunktanalyse mit einem entsprechenden komplementären Gegenstrang ergab, dass die neue hNDBF-Gruppe die DNA-Doppelhelix genauso effizient destabilisiert wie die bereits etablierte NPP-Gruppe. Die Schmelzpunktabsenkung betrug etwa 10°C im Vergleich zu dem unmodifizierten DNA-Doppelstrang.

Für die spektroskopischen Untersuchungen und den Vergleich mit anderen photolabilen Schutzgruppen wurde obige DNA-Sequenz sowohl mit hNDBF-, als auch mit NPE-, NPP- und NPOM-geschützten Nucleosiden versehen. 2006 stellten Deiters *et al.*<sup>[49,166]</sup> NPOM als neuartige

photolabile Schutzgruppe vor, sie zeigt eine hohe Photolyseeffizienz sowie einen sehr guten Absorptionskoeffizienten bei 365 nm und sollte deshalb ebenfalls als Vergleich dienen.



**Abbildung 67:** Syntheseweg zum  $\text{dG}^{\text{hNDBF}}$ -Phosphoramidit **120**.<sup>[164]</sup>

Ein photochemisches System wird charakterisiert durch den Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  – er ist ein Maß für die Absorptionsfähigkeit des Chromophors und damit ein intrinsischer Faktor – und die Quantenausbeute  $\Phi$ . Sie beschreibt das Verhältnis von absorbierten Photonen zu tatsächlich umgesetzten Molekülen, was in unserem Fall der Anzahl an gespaltenen kovalenten Bindungen entspricht. Im Idealfall führt ein absorbiertes Photon auch direkt zu einer photochemischen Reaktion, z.B. einer Bindungsspaltung. Die Quantenausbeute  $\Phi$  hätte dann den Wert 1. Sie ist abhängig von der Beschaffenheit des Gesamtsystems und damit auch abhängig von dem verwendeten

Lösungsmittel. Die Effizienz eines photochemischen Systems ergibt sich aus dem Produkt von Absorptionskoeffizient und Quantenausbeute  $\epsilon \cdot \Phi$ .

Es wurden die Extinktionskoeffizienten in einem Wellenlängenbereich von 200-500 nm ermittelt, in Tabelle 6 sind die sehr interessanten Ergebnisse für Wellenlängen von 366 nm und 405 nm aufgeführt. Es zeigte sich, dass hNDBF hier den mit Abstand höchsten Extinktionskoeffizienten aller verglichenen Schutzgruppen besitzt, er liegt bei 360 nm 1/3 über dem von NPOM, bei 405 nm ist er sogar mehr als doppelt so groß. Viel bemerkenswerter ist jedoch, dass hNDBF bei 405 nm noch UV-Licht absorbiert, während die Schutzgruppen NPP und NPE überhaupt keine Extinktion mehr zeigen. In praktischer Konsequenz bedeutet dies, dass sich hNDBF durch Einstrahlen von Licht mit einer Wellenlänge von 405 nm wellenlängenselektiv zur NPE/NPP Schutzgruppe entschützen lassen sollte.

	dG <sup>hNDBF</sup>	dG <sup>NPP</sup>	dT <sup>NPP</sup>	dC <sup>NPE</sup>	dT <sup>NPOM</sup>	unmodifiziert
$\epsilon_{360}$ [M <sup>-1</sup> /cm <sup>-1</sup> ]	7575	475	325	475	4950	25
$\epsilon_{405}$ [M <sup>-1</sup> /cm <sup>-1</sup> ]	4675	25	50	25	1725	25

**Tabelle 6:** Vergleich der Extinktionskoeffizienten eines mit verschiedenen photolabilen Schutzgruppen modifizierten DNA-Oligonukleotides bei 360 und 405 nm.<sup>[164]</sup>

RP-HPLC Analysen ergaben zudem eine sehr schnelle und auch vollständige Photolyse. Besonderes letzteres ist ein Problem bei der Verwendung von NPE/NPP. Um ein eindeutiges Aus/An-Verhalten einer photoaktivierbaren Verbindung zu erhalten, ist eine vollständige Entschützung in möglichst kurzer Zeit Voraussetzung.

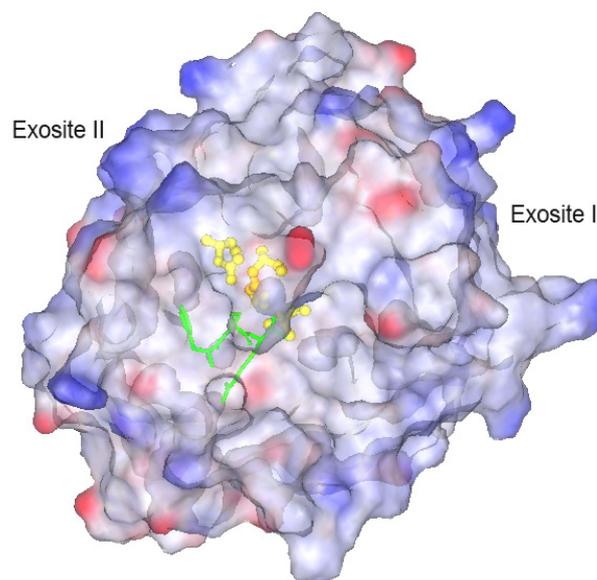
Komplettiert wurde die Studie durch die actinometrische Ermittlung der Quantenausbeute der Photoreaktion. Diese ist bei einem isolierten photolabil geschützten Mononukleosid erfahrungsgemäß höher, als wenn dieses Nukleosid Bestandteil einer Oligonukleotidsequenz ist. Das dG<sup>hNDBF</sup>-Derivat **119** weist hier einen Wert für  $\Phi$  von 0.097 auf, wohingegen die Photolyse der dG<sup>hNDBF</sup> modifizierten DNA-Sequenz im Vergleich eine auf ein Drittel reduzierte Quanteneffizienz zeigt. Die höchste Quantenausbeute mit  $\Phi = 0.191$  konnte für die dT<sup>NPP</sup> geschützte DNA-Sequenz ermittelt werden. Interessanterweise zeigte jedoch die NPOM-modifizierte DNA die schlechteste Quantenausbeute, wobei hier nur gut jedes 160ste absorbierte Photon zu einer Abspaltung der NPOM-Gruppe führte ( $\Phi = 0.006$ ).

Führt man diese Ergebnisse zusammen, so ergibt sich aus der photochemischen Gesamteffizienz ( $\epsilon \cdot \Phi$ ) von 248 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> dass die neue hNDBF-Schutzgruppe 4-8 mal effektiver ist, als obige nitrobenzylartigen Schutzgruppen.

## 3.2 Regulation der Aktivität von Proteindomänen durch ein photoaktivierbares bivalentes DNA-Aptamer

### 3.2.1 Lichtaktivierbare $\alpha$ -Thrombin bindende Aptamere

$\alpha$ -Thrombin (Faktor IIa) ist eine multifunktionale 37 kDa Serinprotease aus der Familie der Chymotrypsine und das finale Schlüsselenzym der Hämostase.<sup>[167]</sup> Neben der Aktivierung diverser Blutgerinnungsfaktoren – welche über einen positiven Rückkopplungsmechanismus zu einer weiteren autokatalytischen Freisetzung von  $\alpha$ -Thrombin aus Prothrombin führen – ist es verantwortlich für die Prozessierung des Fibrinogens zum polymeren Fibrin und ermöglicht hierdurch erst die Bildung eines Blutgerinnsels (roter Thrombus).<sup>[168]</sup>  $\alpha$ -Thrombin besteht aus zwei Untereinheiten, einer leichten und einer schweren Kette, welche über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind und besitzt zwei elektropositive Exosites. Die Exosite I ist unter anderem die Bindungsstelle für Fibrinogen, während Heparin an die Exosite II bindet und für die schnelle Rekrutierung von Serpinen wie Antithrombin III (AT) und dem Heparin-Cofaktor II (HCII) verantwortlich ist, welche das katalytische Zentrum blockieren und die Proteaseaktivität des  $\alpha$ -Thrombins somit inhibieren.<sup>[169]</sup>



**Abbildung 68:** Oberflächenstruktur von  $\alpha$ -Thrombin (Eintrag 1PPB der RCSB ProteinDataBank) mit den beiden Exositen I und II. Die halbtransparente Darstellung zeigt die katalytische Triade (gelb) des aktiven Zentrums sowie einen Inhibitor (PPack<sup>[170]</sup>, grün). Das Farbschema ist so gewählt, dass elektropositive Bereiche in blau erscheinen, elektronegative hingegen in rot.

Thromboembolische Erkrankungen sind die Haupttodesursache in den Industrienationen,<sup>[171]</sup> die gezielte Beeinflussung des hämostatischen Systems stellt somit eine der wichtigsten therapeutischen Anwendungen dar. Grundsätzlich kann man hierfür drei verschiedene Gruppen von Pharmazeutika unterscheiden: Thrombozytenaggregationshemmer, Thrombolytika und Antikoagulantien.<sup>[172]</sup> So

werden Antikoagulantien eingesetzt, um nach Operationen das Thrombose- und Embolierisiko zu verringern. Auch bei diversen koronaren Herzerkrankungen, bei denen ein erhöhtes Embolierisiko besteht, ist die Behandlung mit Gerinnungshemmern indiziert. Ein Angriffspunkt zur Regulation der Blutgerinnung ist das  $\alpha$ -Thrombin. Dessen koagulatorische Wirkung kann sowohl durch Blockierung des aktiven Zentrums und/oder der Exosite I inaktiviert werden.

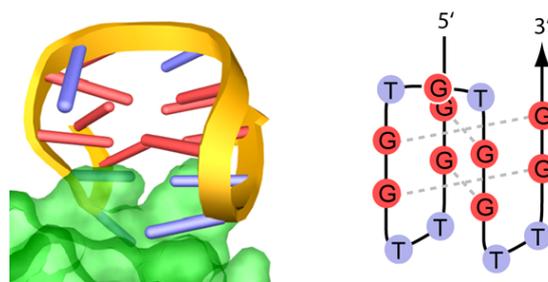
Eine breite Anwendung als Antikoagulantien erfahren die Heparine – Glucosaminglykane unterschiedlicher molarer Masse (3-30 kDa), welche aus Schwefelsäureestern von *D*-Glucosamin und den Uronsäuren *D*-Glucuronsäure bzw. *D*-Iduronsäure bestehen. Durch die Sulfatreste ist Heparin das am stärksten geladene Polymer im Säugetiergewebe.<sup>[173]</sup> Die negativen Sulfatreste ermöglichen eine starke Wechselwirkung mit den elektropositiven Bereichen des  $\alpha$ -Thrombins und anderer Gerinnungsfaktoren. Heparine rekrutieren AT aus dem Blutplasma, die Inhibierung von  $\alpha$ -Thrombin durch AT wird somit enorm beschleunigt. Man unterscheidet die unfraktionierten Heparine (UFH) und die niedermolekularen Heparine (NMH) mit einem Molekulargewicht von etwa 5 kDa, was 16-20 Monosaccharideinheiten entspricht: Im Gegensatz zu UFH binden NMH fast ausschließlich an den Gerinnungsfaktor Xa, nicht an  $\alpha$ -Thrombin. Sie haben nach subkutaner Gabe eine Bioverfügbarkeit von 90 % und einen vorhersagbaren und reproduzierbaren gerinnungshemmenden Effekt.<sup>[174]</sup> Zudem ist keine laborabhängige Einstellung der Dosierung – wie bei UFH – erforderlich. Komplikationen, die bei der Verwendung von Heparinen auftreten, sind vor allem ein erhöhtes Blutungsrisiko und die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT-II), bei der es zu einem Abfall der Thrombozytenzahl kommt. Ursache hierfür ist die Bildung von Antikörpern gegen Heparin/Protein-Komplexe im Plasma. Die Gefahr einer HIT ist bei UFH größer als bei NMH und nimmt generell mit längerer Behandlungsdauer zu.<sup>[175]</sup> Heparin wird in der „low dose“ Prophylaxe nach operativen Eingriffen eingesetzt, bei denen generell die Gefahr einer tiefen Beinvenenthrombose (TVT) besteht. So beträgt die Inzidenz der TVT beispielsweise nach Hüft- oder Oberschenkelfrakturen zwischen 45 und 75 %.<sup>[176]</sup> Die große Gefahr ist hierbei die Ablösung des Gerinnsels und Ausbildung einer Lungenembolie, welche zum Tod führen kann. Eine „high dose“ Behandlung ist bei akutem thrombotischen Verschluss einer Vene, bei Myokardinfarkt und Lungenembolie indiziert.

Der wirksamste direkte Thrombininhibitor mit einer Inhibitionskonstante von nur 27 fM ist das Hirudin, eine 65 AS langes Polypeptid aus *Hirudo medicinalis*, welches bivalent sowohl mit der Exosite I als auch mit dem aktiven Zentrum interagiert und die Proteaseaktivität auf diese Weise ausschaltet.<sup>[177]</sup> Rekombinantes Hirudin wird bei Patienten mit HIT und zur Prophylaxe bei Thrombosen der tiefen Beinvenen eingesetzt.<sup>[178]</sup> Aufgrund des sehr engen therapeutischen Fensters besteht bei der Anwendung von Hirudin wie auch Heparin die Gefahr einer stark erhöhten Blutungsneigung, was deren breite Anwendungsmöglichkeiten einschränkt.

Eine weitere Wirkstoffklasse mit antikoagulatorischem Effekt stellen Derivate des 4-Hydroxycumarins dar. Bei diesen handelt es sich um Vitamin-K Antagonisten und somit um indirekte Antikoagulantien. Sie hemmen in der Leber die Vitamin K abhängige Synthese diverser Gerinnungs-

faktoren.<sup>[118,172]</sup> Ihre Wirkung setzt im Gegensatz zu den direkten Antikoagulantien wie Heparin erst nach einer gewissen Latenzzeit ein, welche abhängig von der plasmatischen Halbwertszeit der entsprechenden Gerinnungsfaktoren ist. Cumarinderivate wie Warfarin oder Phenprocoumon (Marcumar®) werden deshalb nur zur Prophylaxe eingesetzt. Der Nachteil dieser Substanzen ist, dass sich die Dosisberechnung aufgrund vielfältiger Faktoren wie Arzneimittelwechselwirkungen oder genetischer Polymorphismen schwierig gestaltet und aufwendige Patientenbeobachtungen notwendig macht.

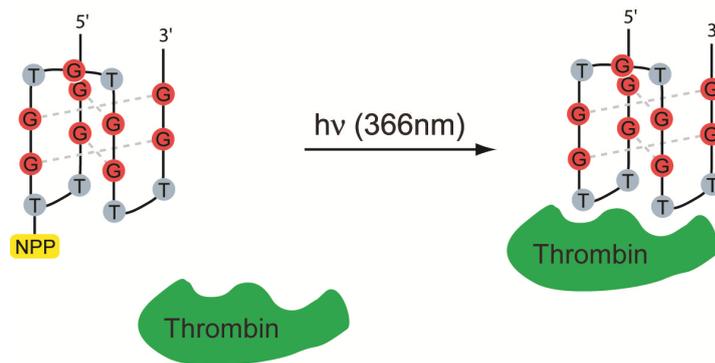
Aufgrund einiger therapeutischer Nachteile heutiger Antikoagulantien besteht ein stetes Interesse in der Entwicklung und Erforschung neuer Verbindungsklassen.<sup>[179]</sup> Antikoagulatorisch wirkende Aptamere stellen hierbei eine einzigartige Alternative dar. Eines der am besten untersuchten Aptamere ist das HD1, welches 1992 von Bock *et al.*<sup>[176]</sup> selektiert wurde. Es handelt sich hierbei um ein einzelsträngiges DNA-15mer mit der palindromischen Sequenz 5'-GGT TGG TGT GGT TGG-3', welches sehr spezifisch und mit hoher Affinität über ionische Wechselwirkungen an die Exosite I von  $\alpha$ -Thrombin, aber auch Prothrombin,<sup>[180]</sup> bindet. Die aktive Konformation des Aptamers besteht aus einer zweilagigen G-Quadruplexstruktur,<sup>[181]</sup> wie schematisch in Abbildung 69 gezeigt ist. Es stellte sich heraus, dass HD1 sowohl freies als auch an Fibrin gebundenes  $\alpha$ -Thrombin inhibiert – im Gegensatz zu Heparin, welches nur in der Lage ist, an freies  $\alpha$ -Thrombin zu binden.<sup>[182]</sup> Das Aptamer wurde in diversen Tiermodellstudien und auch in einer Phase-I Patientenstudie getestet (ARC183, Archemix Corp.). Es zeigten sich ein schneller Wirkungseintritt sowie eine rasche Clearance. Jedoch wurde eine zu hohe Aptamerkonzentration benötigt, um die gewünschte antikoagulatorische Wirkstärke zu erreichen, woraus ein suboptimales Dosis-Wirkungs-Profil resultierte.<sup>[183]</sup>



**Abbildung 69:** Links: Ausschnitt des Kristallstrukturmodells (Eintrag 1HAO der RCSB ProteinDataBank) von HD1, gebunden an die Thrombinoberfläche. Rechts: Schematische Darstellung der HD1 G-Quadruplexstruktur.

Rusconi *et al.*<sup>[184]</sup> selektierten 2002 ein Aptamer, genannt 9.3t, welches ebenfalls in der Lage ist, die Blutgerinnung zu inhibieren. Hierbei handelt es sich um einen RNA-Liganden, der gezielt an den Gerinnungsfaktor IX (Christmas-Faktor) bindet. Der Faktor IX ist wie  $\alpha$ -Thrombin eine Serinprotease und verantwortlich für die Aktivierung des Faktor X (Stuart-Prower-Faktor). Ein Mangel an Faktor IX führt zur sogenannten Hämophilie B.

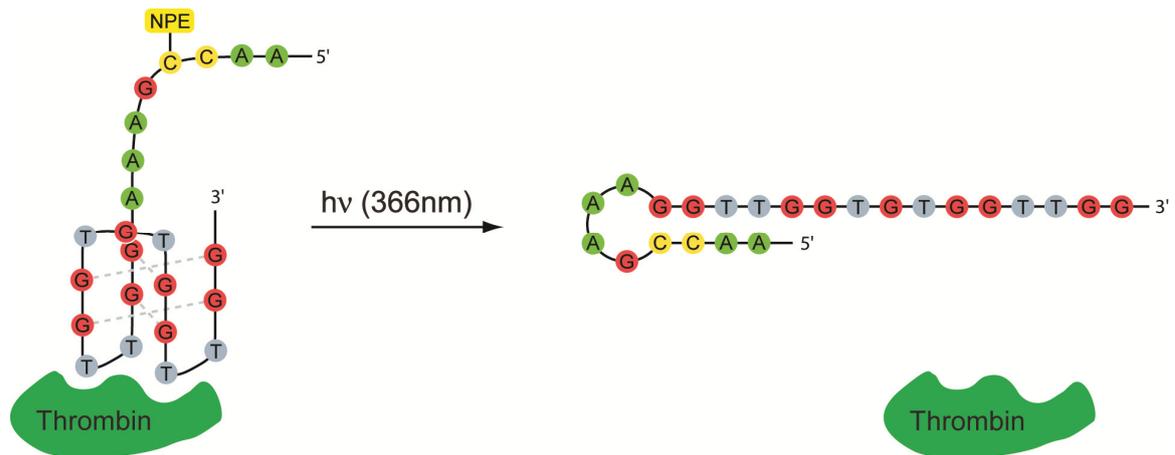




**Abbildung 71:** Die Interaktion des HD1-Aptamers mit der Thrombinoberfläche wird durch die NPP-Gruppe verhindert. UV-Licht spaltet die Schutzgruppe ab, HD1 kann wieder an  $\alpha$ -Thrombin binden.<sup>[44]</sup>

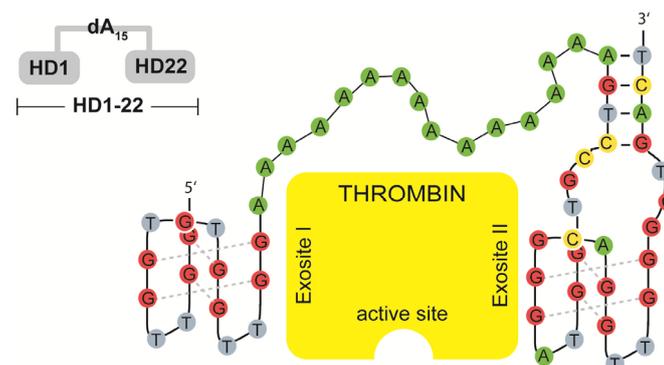
Diese Studie zeigte bereits einen Nachteil dieser Schutzgruppentechnik. So konnte die vollständige Aktivität des Aptamers unter physiologischen Bedingungen nicht wieder hergestellt werden. Vielmehr scheint sich ein bisher nicht identifiziertes Nebenprodukt der Photoreaktion zu bilden, welches nicht weiter reagiert. Der überragende Vorteil der Methode hingegen besteht in der zeitlichen und orts aufgelösten Kontrolle der Aptameraktivität. In letzter Konsequenz bedeutet dies, dass ein solches photoaktivierbares Aptamer systemisch verabreicht werden kann, aber nur in den Kompartimenten eines Organismus' aktiv wird, welche mit UV-Licht bestrahlt werden. Durch Verwendung von modernen Fluoreszenzmikroskopen und UV-Lasern sind hier Volumina im Femtoliterbereich zugänglich.<sup>[187,188]</sup>

Der nächste logische Schritt in der Entwicklung photoreaktiver Aptamere war die Synthese einer HD1-Varinante mit „eingebauter“ Antidotaktivität.<sup>[110]</sup> Wird die 15mer Aptamersequenz an ihrem 5'-Ende mit einer komplementären Antisensesequenz verlängert, so resultiert aus der Watson-Crick Basenpaarung eine Konformationsänderung und damit Inaktivierung des HD1 – identisch mit der Technik zur Inaktivierung des 9.3t RNA-Aptamers (s. oben) – mit dem Unterschied, dass die Antisensesequenz nicht mehr als zweite Nukleinsäuresequenz zugegeben werden muss. Versieht man den Gegenstrang an strategischer Position nun mit einer photolabilen Schutzgruppe, so wird die Watson-Crick Basenpaarung unterbunden. Das HD1-Aptamer ist also aktiv und besitzt einen photoaktivierbaren Antisensestrang. Erst bei Einstrahlung von UV-Licht wird durch Abspaltung der Schutzgruppe der Gegenstrang freigesetzt und es kommt zur Umfaltung in eine inaktive Konformation. Das Aptamer besitzt also einen „Aus“-Schalter welcher durch UV-Licht umgelegt wird (siehe Abbildung 72).



**Abbildung 72:** Das HD1-Aptamer mit eingebautem „Aus“-Schalter. Der komplementäre Gegenstrang ist mit einer NPE-Gruppe modifiziert, welche die Watson-Crick Basenpaarung verhindert. Durch UV-Licht wird die Schutzgruppe entfernt und der Gegenstrang aktiviert – resultierend in einer Konformationsänderung des Aptamers von der aktiven G-Quadruplexstruktur in eine inaktive Haarnadelstruktur.<sup>[110]</sup>

Wie bereits erwähnt, wurden die klinischen Studien mit HD1 aufgrund eines nicht optimalen Dosis-Wirkungs-Profiles gestoppt. Ursache hierfür ist die moderate Bindungsaffinität des Aptamers mit einer  $K_D$  von  $\sim 120$  nM. Die Affinität eines Aptamers, beispielsweise durch Mutagenese, zu erhöhen ist ein recht zeitaufwändiges Unterfangen mit unbestimmtem Ergebnis. Eine elegante Alternative hierzu stellten Mayer *et al.*<sup>[113]</sup> 2007 vor. Sie kombinierten HD1 mit einem weiteren – HD22 genannten – Aptamer,<sup>[189]</sup> welches mit einer um den Faktor 10 höheren Affinität als HD1 an  $\alpha$ -Thrombin bindet, mit dem Unterschied, dass es die Exosite II adressiert. Die Verknüpfung der beiden Aptamere erfolgte durch einen poly-dA Linker (siehe Abbildung 73).



**Abbildung 73:** Schematische Darstellung des HD1-22 Fusionsaptamers. Durch Verknüpfung von zwei Aptamerdomänen mit Hilfe eines Nukleotidlinker wird eine vielfach höhere Bindungsaffinität des Fusionsaptamers im Vergleich zu den einzelnen Aptameren erreicht.<sup>[113]</sup>

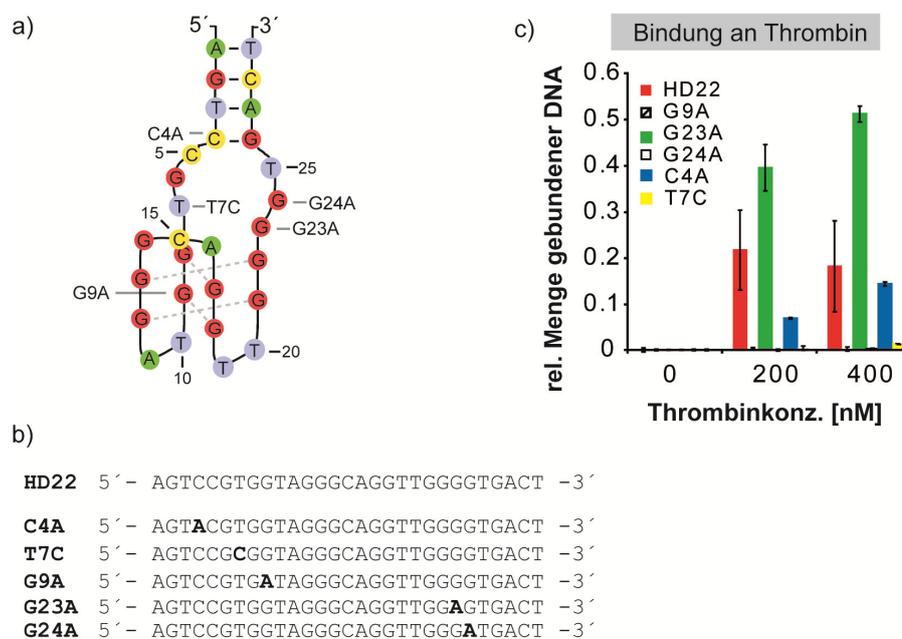
Die Blutgerinnungstests mit dem resultierenden Fusionsaptamer HD1-22 ergaben eine 30fach höhere antikoagulatorische Wirksamkeit im Vergleich zum HD1 Aptamer. Interessanterweise zeigte sich, dass die Modifizierung mit einem 15mer-dA Linker am 5' bzw. 3'-Ende von HD22 bzw. HD1 deren jeweilige Bindungsaffinität bereits verdoppelte, was sich wahrscheinlich auf elektrostatische

Wechselwirkungen zwischen dem negativ geladenen Phosphatrückgrat und elektropositiven Bereichen der  $\alpha$ -Thrombinoberfläche zurückführen lässt.

Während dieser Doktorarbeit sollte geprüft werden, ob und wie sich die temporäre photolabile Schützung einer der beiden Aptamerdomänen des Fusionsaptamers HD1-22 auf die Gerinnungsaktivität des  $\alpha$ -Thrombins auswirkt. Für das einzelne Aptamer HD1 konnte bereits eine kontrollierte Modulation seiner antikoagulativen Aktivität gezeigt werden (siehe oben). Wäre dieses Prinzip auch auf das Fusionsaptamer anwendbar, so hätte man ein Werkzeug in der Hand, mit welchem gezielt unterschiedliche Proteindomänen blockiert werden können. Dies könnte generell nützlich sein, um die Funktion von Proteinunterdomänen gezielt zu beeinflussen und somit neue Erkenntnisse über deren Wirkungsweise zu gewinnen.

### 3.2.2 Für Mutationen sensitive Nucleobasen in HD22

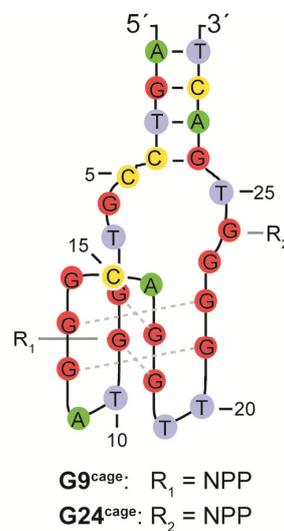
Zu Beginn mussten die Positionen in der Oligonukleotidsequenz von HD22 gefunden werden, deren Mutationen die Aktivität des HD22 Aptamers negativ beeinflussen. An diesen Positionen sollte der Einbau der photolabil geschützten Nucleoside erfolgen und somit eine temporäre Punktmutation erzeugt werden. Die Mutationsstudien wurden im Arbeitskreis unseres Kooperationspartners Prof. Dr. G. Mayer (LIMES, Universität Bonn) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Filterbindungsstudien sind in folgender Abbildung 74 dargestellt.



**Abbildung 74:** a) Schematische Darstellung des HD22 Aptamers. Die Positionen der Mutationsanalyse sind entsprechend beschriftet. b) HD22 Sequenz im Vergleich mit den Sequenzen mit dA bzw. dC Punktmutationen (schwarz hervorgehoben). c) Diagramm zur Konzentrationsabhängigkeit der an  $\alpha$ -Thrombin gebundenen Menge Aptamersequenz.

Einige Nukleotide sowohl innerhalb des G-Quadruplex als auch der *Hinge*-Region wurden ausgewählt und durch Desoxyadenosin bzw. Desoxycytidin ersetzt. Im Ergebnis ist für die Sequenzen **T7C**, **G9A** und **G24A** keinerlei Bindung an  $\alpha$ -Thrombin mehr vorhanden. Somit wurde bestätigt, dass sowohl die G-Quadruplex-, als auch die *Hinge*-Region, wie vermutet, essentiell für die Bindungsfähigkeit des HD22 Aptamers sind. Die Mutation an Position C4 lieferte eine DNA, welche etwas schlechter als die ursprüngliche bindet, während sich die Bindungsaffinität bei der **G23A** Mutante sogar noch erhöhte.

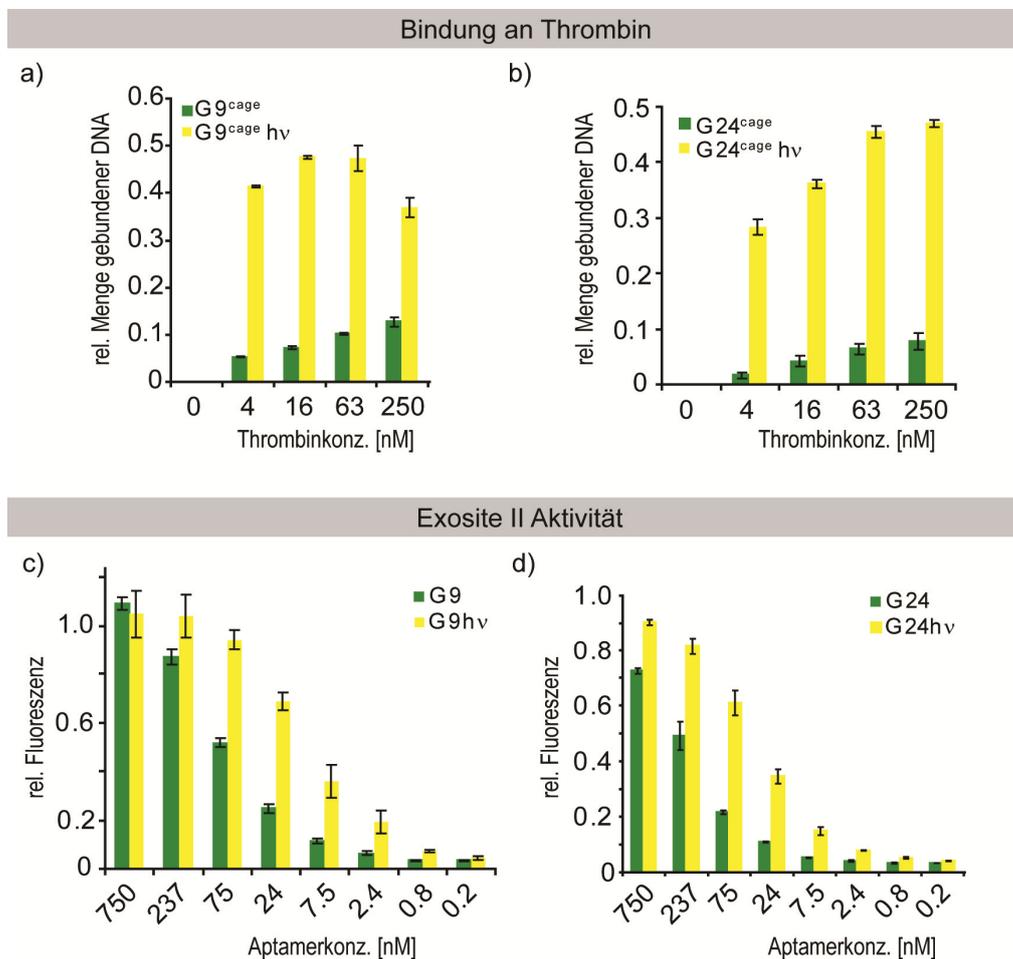
Es wurde entschieden, die Positionen G9 und G24 mit einer NPP-Schutzgruppe zu versehen, der Hauptgrund liegt auch hier in der Stabilität des dG<sup>NPP</sup>-Nucleosids während der automatisierten DNA-Festphasensynthese.



**Abbildung 75:** Schematische Darstellung der photolabil geschützten Positionen in der HD22 Sequenz.

Die Synthese aller hier aufgeführten photoaktivierbaren Sequenzen erfolgte unter Standardbedingungen, anschließend wurde die DNA mittels RP-HPLC gereinigt und Entschützungsversuche durch dreiminütige UV-Bestrahlung bei 366 nm durchgeführt. Die resultierenden HPLC-Spektren sind im Spektrenanhang aufgeführt. Um die lichtabhängige Aktivierung des Aptamers zu zeigen wurden Filterbindungsstudien durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung 76 a) und b) graphisch dargestellt sind. Sie zeigen eindeutig die Photoregulierbarkeit der Aptameraktivität für die Sequenzen **G9<sup>cage</sup>** und **G24<sup>cage</sup>**. Des Weiteren wurden diese beiden photoaktivierbaren Aptamere in Kooperation mit Dr. J. Müller (Universitätsklinikum Bonn) in Thrombinaktivitätsstudien getestet. Hierfür wird photoaktivierbares Aptamer in unterschiedlichen Konzentrationen zusammen mit humanem  $\alpha$ -Thrombin, Heparin und AT inkubiert. Heparin bindet an die Exosite II und beschleunigt so die Inhibierung von  $\alpha$ -Thrombin durch AT. Das Aptamer

konkurriert nun mit Heparin um die Exosite II und kann es ab einer gewissen Konzentration verdrängen – vorausgesetzt es wurde vorher mittels UV-Licht die photolabile Schutzgruppe abgespalten. Solange Heparin, und damit AT, gebunden sind, ist auch die proteolytische Aktivität des  $\alpha$ -Thrombins blockiert. Wird der natürliche Inhibitor aber durch HD22 verdrängt, so ist das katalytische Zentrum für Substrate wieder zugänglich. Der Verdrängungsprozess kann beobachtet werden, indem als Substrat ein fluorogenes Peptid zugegeben wird. Bei der Proteolyse wird ein Fluorophor aktiviert und freigesetzt, welches durch Fluoreszenzmessung detektiert und quantifiziert werden kann. Die Ergebnisse dieser fluorogenen Tests zeigt Abbildung 76 c) und d). Beide Sequenzen zeigen in einem mittleren Konzentrationsbereich eine lichtabhängige Verdrängung von Heparin. Bei sehr hohen Konzentrationen des Aptamers von bis zu 750 nM kann allerdings auch die noch photolabil geschützte Sequenz die proteolytische Aktivität von  $\alpha$ -Thrombin wiederherstellen.

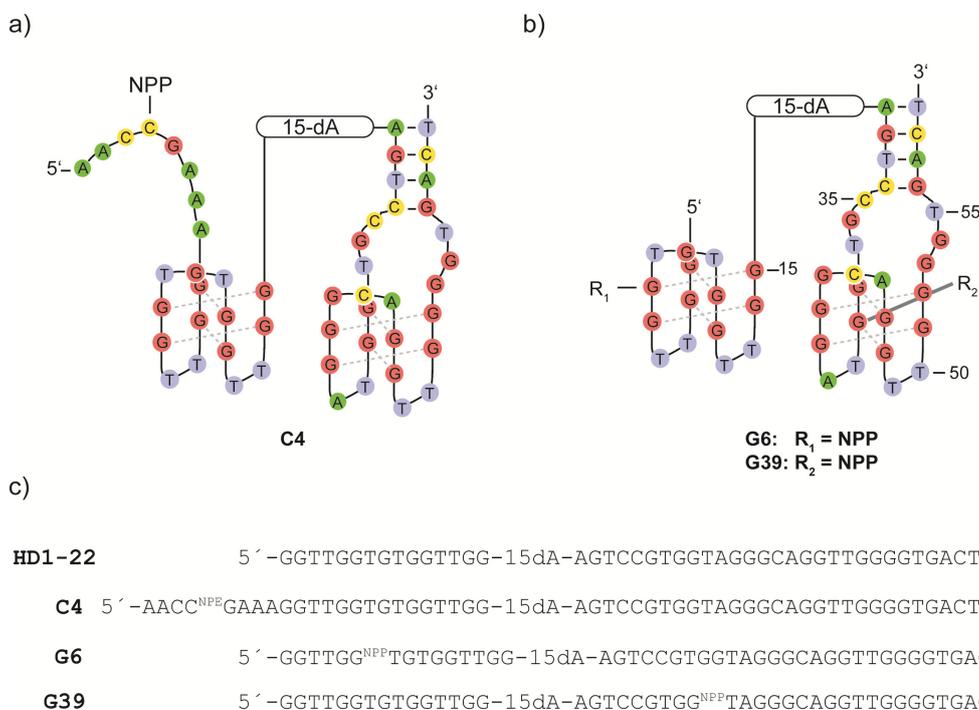


**Abbildung 76:** a) und b) zeigen die Ergebnisse der Filterbindungsstudien für die Sequenzen G9<sup>cage</sup> und G24<sup>cage</sup>. Es ist eindeutig erkennbar, dass die photoaktivierbaren Sequenzen nur sehr schwach an  $\alpha$ -Thrombin binden (grüne Balken), nach Belichtung steigt die Bindungsaffinität rapide an (gelbe Balken). Die Diagramme c) und d) stellen die Ergebnisse des fluorogenen Aktivitätstests dar. Die Zunahme der Fluoreszenz bei den belichteten Proben (gelbe Balken) zeigt die Verdrängung des Heparins und damit des AT von der Exosite II. Im Gegensatz dazu ist die proteolytische Aktivität bei Inkubation mit den photoaktivierbaren Sequenzen ohne UV-Bestrahlung über einen weiten Konzentrationsbereich deutlich geringer (grüne Balken). Zur Normalisierung der Messwerte diente HD22 als Referenz.

### 3.2.3 Experimente mit dem photoaktivierbaren bivalenten Fusionsaptamer HD1-22

Mit Hilfe dieser Ergebnisse wurden nun die Sequenzen der bivalenten photoaktivierbaren Varianten des HD1-22 Fusionsaptamers festgelegt. Sie sind in Abbildung 77 gezeigt. Hierbei entspricht die Sequenz **G39** des HD1-22 dem photoaktivierbaren HD22 **G9<sup>cage</sup>**, welches ein etwas besseres Schaltverhalten als **G24<sup>cage</sup>** zeigte.

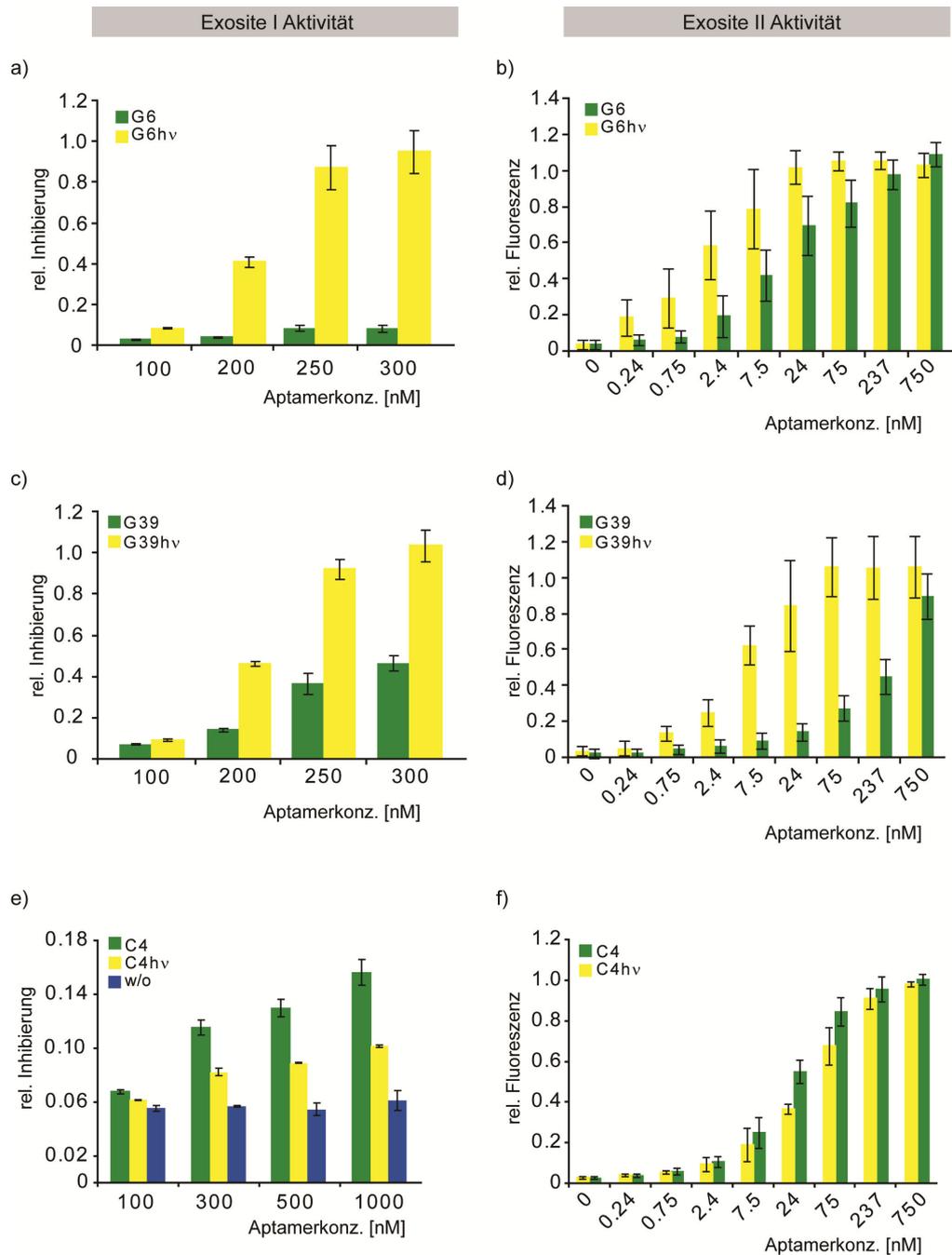
Bei der Sequenz **G6** ist die HD1-Domäne durch eine photolabile Schutzgruppe inaktiviert, wohingegen bei Sequenz **C4** die HD1-Domäne aktiv ist, mittels photoaktivierbarem Gegenstrang allerdings ausgeschaltet werden kann. Mit diesen drei Sequenzen sollte die selektive Kontrolle der beiden  $\alpha$ -Thrombin Exosites I und II durch UV-Licht als exogener Auslöser möglich sein. Die Darstellung der dG<sup>NPP</sup> und dC<sup>NPE</sup> Nucleoside erfolgte analog den publizierten Verfahren,<sup>[45,110]</sup> die einzelnen Synthesestufen sind im Experimentellen Teil aufgeführt.



**Abbildung 77:** Schematische Darstellung und Sequenzen der photolabil geschützten HD1-22 Derivate C4, G6 und G39.

Um die selektive Inhibierung bzw. Aktivität der einzelnen Exosites zu zeigen, wurde, wie oben beschrieben, zum einen ein Fluoreszenztest durchgeführt. Zum anderen wurde die Exosite I-Aktivität durch einen Gerinnungstest ermittelt. Hierzu wurde  $\alpha$ -Thrombin mit verschiedenen Konzentrationen an Aptamer versetzt. Dann erfolgte die Zugabe von Fibrinogen und anschließend die Bestimmung der Gerinnungszeit mittels eines Koagulometers. Anhand der Abbildung 78 a) ist zu erkennen, dass die Belichtung der Sequenz **G6** einen deutlichen Einfluss auf die Blutgerinnungszeit hat.

Hingegen zeigt sich nur eine geringe Beeinflussung der Exosite II-Aktivität (Abbildung 78 b)). Wie erwartet ist der Effekt bei Sequenz **G39** genau umgekehrt: Hier ist die Exosite II-Aktivität deutlich lichtabhängig (Abbildung 78 c)).



**Abbildung 78:** Graphische Darstellung der Ergebnisse der Exosite I (a, c, e) bzw. Exosite II (b, d, f) Aktivitätstests mit zunehmender Erhöhung der Aptamerkonzentration vor (grüne Balken) und nach (gelbe Balken) UV-Bestrahlung. Die Normalisierung erfolgte unter Verwendung der Sättigungswerte von HD1-22 (a-d, f) bzw. HD1 (e) als Referenz.

Zwar zeigt Abbildung 78 c) auch eine Verlängerung der Blutgerinnungszeit nach Bestrahlung der Sequenz **G39**. Diese scheinbare Unregelmäßigkeit lässt sich jedoch leicht erklären, wenn man sich die Bindungsaffinitäten der beiden Aptamerdomänen vergegenwärtigt. Die HD1-Domäne bindet mit

einer  $K_D$  von  $\sim 120$  nM viel schwächer an Exosite I als die HD22-Domäne an Exosite II ( $K_D$ :  $\sim 12$  nM), wohingegen das Fusionsaptamer HD1-22 in seiner Gesamtheit die stärkste Affinität zu  $\alpha$ -Thrombin aufweist ( $K_D$ :  $\sim 5$  nM).<sup>[113]</sup> Wird nun die zuvor photolabil geschützte Aptamerdomäne HD22 des Fusionsaptamers durch UV-Bestrahlung aktiviert, so erhöht sich die Affinität des gesamten Aptamers um den Faktor 10. Dies erklärt den beobachteten Anstieg der Exosite I-Inhibierung in Abbildung 78 c). Es handelt sich also um einen rein synergistischen Effekt. Dieser ist auch sichtbar bei Entschützung der Sequenz **G6** in Abbildung 78 b) – allerdings ist der Effekt hier deutlich geringer, da die Bindungsaffinität des Aptamers durch Aktivierung der HD1-Domäne nur um den Faktor 2 gesteigert wird.

Bei der HD1-22 Variante **C4** mit photoaktivierbarer 5'-Erweiterung zur selektiven Desaktivierung der HD1-Aptamerdomäne zeigt sich so gut wie keine lichtabhängige Wirkung auf die Aktivität der Exosite II. Der geringe Abfall der proteolytischen Aktivität bei den belichteten Testansätzen erklärt sich ebenfalls aus der geringeren Bindungsaffinität bei Verlust der HD1-Aptameraktivität. Die Exosite I-Aktivität hingegen ist eindeutig lichtabhängig, auch wenn die Sequenz **C4** sich deutlich weniger affin als das unmodifizierte Aptamer HD1-22 zeigt. Dieser Effekt wurde schon bei der früheren Studie mit dem ausschaltbaren HD1 Aptamer beobachtet.<sup>[110]</sup> Hier scheint es unerwünschte Wechselwirkungen durch die 5'-Erweiterung zu geben, welche die Bindungsstärke der HD1-Domäne deutlich herabsetzen.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Photoschützung rational entwickelter Fusionsaptamere die exogene Kontrolle über die einzelnen Aptamerdomänen und somit über die Aktivität von Proteinsubdomänen zulässt. Im konkreten Fall konnten wir die Blutgerinnungsaktivität von  $\alpha$ -Thrombin unter Verwendung der Aptamersequenz **G6** von vollständig aktiv zu komplett inaktiv modulieren. Vor der UV-Bestrahlung war hier lediglich die Exosite II durch die HD22-Domäne blockiert. Dies erlaubte keinerlei Bindung des natürlichen Antikoagulans AT an  $\alpha$ -Thrombin – weder durch Heparin vermittelt noch ohne Beteiligung von Heparin. Der Zugang zur Exosite I war hingegen nicht eingeschränkt, die Blutgerinnungsaktivität des  $\alpha$ -Thrombins war durch die Rekrutierung von Fibrinogen an die Exosite I vollständig aktiv. Durch Entschützung der HD1-Domäne konnte nun eine Inaktivierung der Exosite I erfolgen, welche durch die hohe Bindungsaffinität der HD22-Aptamerdomäne stärker ausfiel als bei der ausschließlichen Verwendung des HD1 Aptamers. Die koagulative Wirkung des  $\alpha$ -Thrombins wurde somit vollständig aufgehoben.

### 3.3 Ein kovalentes Aptamer-Thrombin-Reagenz zur photodynamischen Thrombookklusion

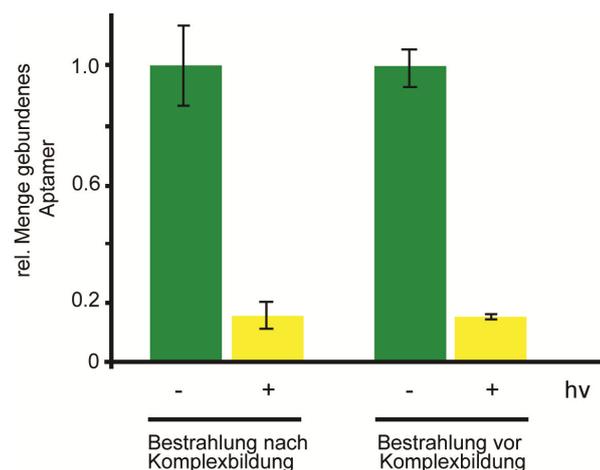
#### 3.3.1 Einleitung

Als Angiogenese bezeichnet man im engeren Sinn die Gefäßneubildung von Kapillargefäßen aus bereits bestehendem Endothelgewebe. Im Gegensatz hierzu nennt man die Gefäßneubildung aus undifferenzierten Stammzellen Vaskulagenese. Zunehmend wird Angiogenese aber auch als Überbegriff für sämtliches Gefäßwachstum verwendet. Die Angiogenese dient dem Organismus als Reparaturfunktion für zerstörte oder blockierte Blutgefäße z.B. bei der Wundheilung. Leider nutzen auch solide Tumore den Mechanismus der Kapillarneubildung für ihre Nährstoffversorgung und damit für ihr fortschreitendes Wachstum. Hierfür sondern Tumorzellen diverse angiogenetische Wachstumsfaktoren ab, unter anderem VEGF, welches an endotheliale Rezeptoren bindet und damit eine Signalkaskade in Gang setzt. Diese führt zu einem Wachstum des Endothelgewebes und zur Ausbildung neuer Blutgefäße.<sup>[190]</sup> Neben VEGF sind noch weitere proliferationsfördernde Faktoren wie der Fibroblast Growth Factor (FGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF) oder Interleukin-8 bekannt. Wachstumsfaktoren sind somit ein viel versprechendes Ziel für therapeutische Ansätze zur Krebsbekämpfung.<sup>[191]</sup> So ist seit Anfang 2005 Bevacizumab als VEGF-bindender monoklonaler Antikörper zur Behandlung des kolorektalen Adenokarzinoms zugelassen. Die Blockierung des VEGF durch den Antikörper führt zu einer Unterbrechung der Gefäßneubildung; bereits neu gewachsenes, aber noch unreifes Endothelgewebe stirbt ab. Eine Vielzahl von weiteren Inhibitoren der Angiogenese werden zur Zeit in klinischen Studien getestet.<sup>[192]</sup>

Ein weiterer Ansatz, Tumore von der Blut- und Nährstoffversorgung abzuschneiden, besteht in der direkten Verlegung der Blutgefäße. Im Rahmen einer transarteriellen Embolisierung werden über einen Katheter kleine Partikel zur Verstopfung des Blutgefäßes appliziert. Hierbei handelt es sich beispielsweise um Kügelchen aus polymerbeschichtetem Hydrogel unterschiedlicher Größe (Embozene™ Microsphere, *Celona BioSciences*). Sie werden nicht nur zur Atrophisierung bestimmter Krebsarten eingesetzt, sondern auch zur Behandlung von Myomen des Uterus.<sup>[193]</sup> Bei der sogenannten Chemoembolisation (TACE) erfolgt zusätzlich die Gabe von Chemotherapeutika wie Mitomycin, Cisplatin oder 5-Fluordesoxythymidin. Diese Methode wird erfolgreich zur Behandlung von Krebserkrankungen der Leber eingesetzt, die fast ausschließlich über arterielle Gefäße versorgt werden.<sup>[194]</sup> Besteht bei der chirurgischen Entfernung eines von Krebs befallenen Organs die Gefahr einer hämatogenen Metastasierung, so kann eine Thromboembolisation präoperativ erfolgen. Damit ein Gefäß(teil)verschluss auch gezielt erfolgen kann, muss eine sorgfältige Sondierung der Blutgefäße mittels Katheter erfolgen. Dennoch besteht die Gefahr, dass Gefäßanastomosen übersehen werden und es zur Gefäßembolisation von gesundem Gewebe kommt.

Die Nutzung der Hämostase zur Erzeugung von thrombotischen Verschlüssen von Blutgefäßen, die Tumorgewebe versorgen, kann hier eine verbesserte Strategie darstellen. Durch eine exogene Kontrolle der Gerinnungsaktivität mittels Lichtbestrahlung könnte man die bisherigen interventionellen Eingriffe ergänzen oder sogar ersetzen. Der Embolisator wird als lichtaktivierbarer Vorläufer systemisch appliziert und unter Verwendung einer Lichtmaske orts- und zeitaufgelöst aktiviert. Dies könnte vor allem interessant werden, sobald photolabile Schutzgruppen mit hohem 2-Photonen-Wirkungsquerschnitt verfügbar sind. Das zur 2-Photonen-Photolyse verwendete längerwellige IR-Licht besitzt eine deutlich höhere Eindringtiefe in Gewebe als UV-Licht. Die folgende Thromboembolisierung könnte somit homogen in allen Gefäßbereichen induziert werden.

Wie von Heckel und Mayer<sup>[110]</sup> in Vorarbeiten gezeigt, konnte bereits ein Antikoagulans mit eingebautem, lichtaktivierbarem Antidot auf Aptamerbasis realisiert werden (siehe Kapitel 3.2.1). Durch die lichtinduzierte Freisetzung des Gegenstrangs wird die aktive Konformation des Aptamers aufgehoben. Wie eine Filterbindungsstudie ergeben hat, kann dies auch geschehen, wenn das Aptamer bereits an  $\alpha$ -Thrombin gebunden hat (siehe Abbildung 79).

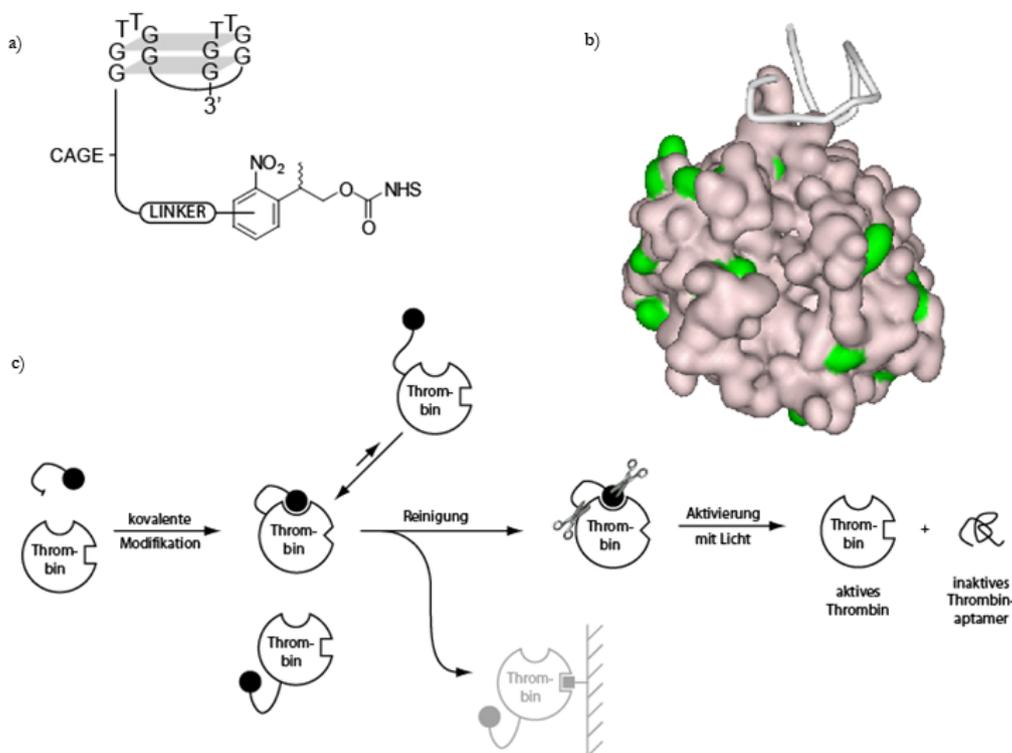


**Abbildung 79:** Nachweis der Aptameraktivität der ausschaltbaren Aptamervariante vor und nach Komplexbildung (Filterbindungsstudie). Das radioaktiv markierte Aptamer bindet nach Bestrahlung mit UV-Licht nicht mehr an  $\alpha$ -Thrombin, unabhängig davon, wann die Komplexbildung erfolgte.

Es sollte somit möglich sein, einen Thrombin-Thrombinaptamer-Komplex (TTA-Komplex) zur Induktion von Thrombosen einzusetzen, wobei das  $\alpha$ -Thrombin nach Lichtbestrahlung durch die Inaktivierung des Aptamers aus dem Komplex freigesetzt wird.

Da die Bindung zwischen Aptamer und Protein in dem TTA-Komplex allein auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruht, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es bei einer *in vivo* Anwendung aufgrund des Verdünnungseffekts zu einer spontanen Freisetzung des  $\alpha$ -Thrombins kommt. Hieraus würde dann eine systemische Gerinnungsaktivierung mit fatalen Folgen für den Organismus resultieren.

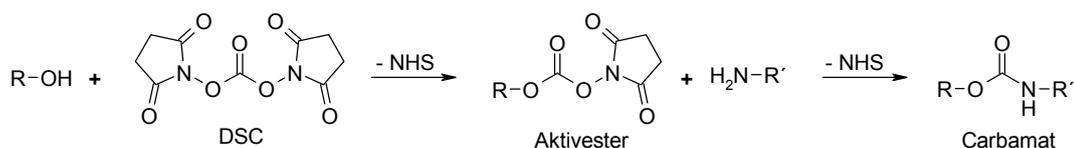
Diese Gefahr könnte ausgeschlossen werden, wenn es gelänge, einen kovalenten TTA-Komplex zu entwickeln (siehe Abbildung 80). Hierzu wird ein ebenfalls photospaltbarer Linker benötigt, welcher an das 5'-Ende des Aptamers angefügt wird. Der Linker muss eine funktionelle Gruppe enthalten, welche mit den nukleophilen Seitenketten der Lysinreste an der Oberfläche von  $\alpha$ -Thrombin eine kovalente Verknüpfung bilden kann. Zudem sollte im Idealfall die kovalente Verknüpfung zwischen Aptamer und Protein derart gestaltet sein, dass nach der lichtinduzierten Spaltung des Linkers keine Modifikationen – die zu einer Aktivitätsverminderung des Enzyms führen könnten – auf der Proteinoberfläche zurückbleiben. Diese „traceless“ Verknüpfung kann beispielsweise durch Verwendung eines Carbamats erreicht werden, bei dessen Zerfall der Lysinrest und Kohlenstoffdioxid freigesetzt werden.



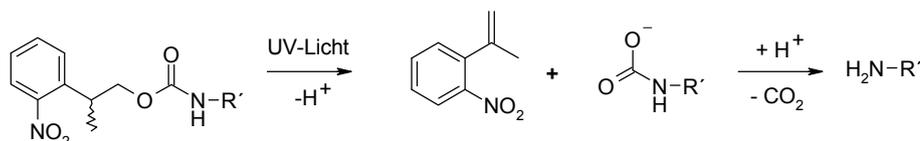
**Abbildung 80:** a) Schematische Darstellung des ausschalbaren HD1-Aptamers mit photoaktivierbarem Gegenstrang und photospaltbarem Linker. Die Verknüpfung über den NHS-Ester mit Lysin-Seitenketten führt zu einem Carbamat, welches „traceless“ spaltbar ist. b) Darstellung des  $\alpha$ -Thrombins mit angelagertem HD1-Aptamer, die nukleophilen Lysinreste sind in grün dargestellt. c) Schematische Darstellung der kovalenten Modifizierung von  $\alpha$ -Thrombin. Ist das Aptamer nicht an Exosite I gebunden, so kann das noch aktive  $\alpha$ -Thrombin über eine Affinitätschromatographie mit festphasengebundenem HD1-Wildtyp abgetrennt werden. Bestrahlung mit UV-Licht führt zu einer Inaktivierung des HD1, sowie dessen Abspaltung vom Protein.

Eine „traceless“ Verbindung zu erhalten ist keineswegs trivial. Der photospaltbare Linker soll idealerweise schon am Ende der DNA-Festphasensynthese an die Aptamersequenz angeknüpft werden. Anschließend erfolgen die Abspaltung vom Trägermaterial und die Darstellung des Aktivesters aus einem entsprechenden Vorläuferreagenz wie Disuccinimidylcarbonat (DSC). Bei DSC handelt sich um einen sogenannten „zero carbon“ homobifunktionalen Linker.<sup>[195]</sup> Dies bedeutet,

dass bei dessen Spaltung keinerlei Restmodifikation an den beiden vorher verbundenen Molekülen zurückbleibt. Der Reaktionsweg sei zur Verdeutlichung in folgender Abbildung 81 gezeigt.



Für R = NPP und R' = Lysinseitenkette:



**Abbildung 81:** Veranschaulichung der Aktivierung eines Alkohols mit DSC und anschließende Reaktion mit einem primären Amin. In unserem Fall handelt es sich bei diesem um eine Lysinseitenkette auf der Oberfläche des  $\alpha$ -Thrombins. Wird eine photoreaktive Gruppe (stellvertretend für einen photospaltbaren Linker) verwendet, so zerfällt das Carbamat nach UV-Belichtung in Kohlenstoffdioxid und das primäre Amin (=  $\alpha$ -Thrombin) wird unverändert freigesetzt.

Die Reaktion des photolabilen Linkers am 5'-Ende der Aptamersequenz mit DSC muss in einem wässrigen Reaktionspuffer geschehen, nur hierin ist die Aptamer-DNA hinreichend löslich. Es ist fraglich, ob die Hydroxygruppe am Linkerende in einem wässrigen Puffer ausreichend nukleophil sein kann, oder ob letztendlich die Hydrolyse des DSC überwiegt. Auch die Anbindung an das  $\alpha$ -Thrombin muss in einem nativen Puffer erfolgen, welcher das Protein nicht denaturieren darf. Gleichzeitig gilt es, ein pH-Optimum zu finden, in welchem die Lysinreste an der Oberfläche überwiegend deprotoniert vorliegen. Nur dann kommen sie für eine nukleophile Reaktion mit dem Aktivester in Frage. Primäre Amine besitzen einen  $\text{pK}_s$ -Wert von 9-10, in diesem Bereich sollte somit auch der pH-Wert des Reaktionspuffers liegen. Gleichzeitig konkurriert mit der erwünschten Carbamatbildung aber auch eine Hydrolyse des NHS-Aktivesters, die Hydrolysehalbwertszeit dürfte hier bei etwa 10-20 min liegen.<sup>[196]</sup> Diese Punkte werden im übernächsten Kapitel noch ausführlicher aufgegriffen werden, zuerst soll näher auf Design und Darstellung des photospaltbaren Linkers eingegangen werden.

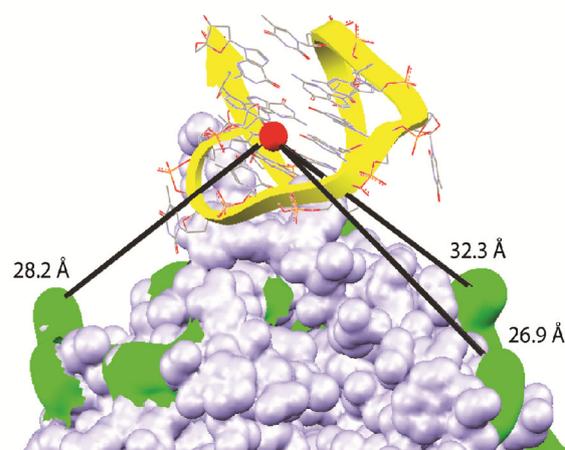
### 3.3.2 Ein photospaltbarer Linker für die Verknüpfung von $\alpha$ -Thrombin und ausschaltbarem HD1-Aptamer

#### 3.3.2.1 Synthese eines photospaltbaren Linkers

Photospaltbare Linker werden auf vielen Gebieten der Chemie und Biologie eingesetzt, hauptsächlich in der Festphasensynthese<sup>[197]</sup>, aber auch zur DNA-Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden<sup>[198]</sup> oder in der „Tag Mass“ MALDI-Massenspektrometrie.<sup>[199]</sup> Der prinzipielle

Aufbau eines solchen Linkers ist in allen Fällen gleich: ein bifunktionelles photospaltbares Chromophor (z.B. NPE/NPP) wird als zentrales Element eingesetzt, um zwei Substrate miteinander zu verbinden. Photolyse führt dann zur Spaltung der Verbindung der beiden Substrate untereinander, hierdurch kommt es dann wieder zu deren Freisetzung.

Wichtig für das vorliegende Projekt war es, im Vorhinein die richtige Länge des Linkers zu bestimmen. Die Verknüpfung sollte über das 5'-Ende der Aptamersequenz erfolgen, auf diese Weise kann der Linker als Phosphoramidit während der automatisierten DNA-Festphasensynthese eingesetzt werden. Mit Hilfe der verfügbaren Kristallstruktur (Eintrag 1HAO der RCSB ProteinDataBank) kann *in silico* die Distanz der 5'-OH Gruppe der Aptamersequenz zu den Aminogruppen der Lysinreste auf der Oberfläche des  $\alpha$ -Thrombins bestimmt werden.

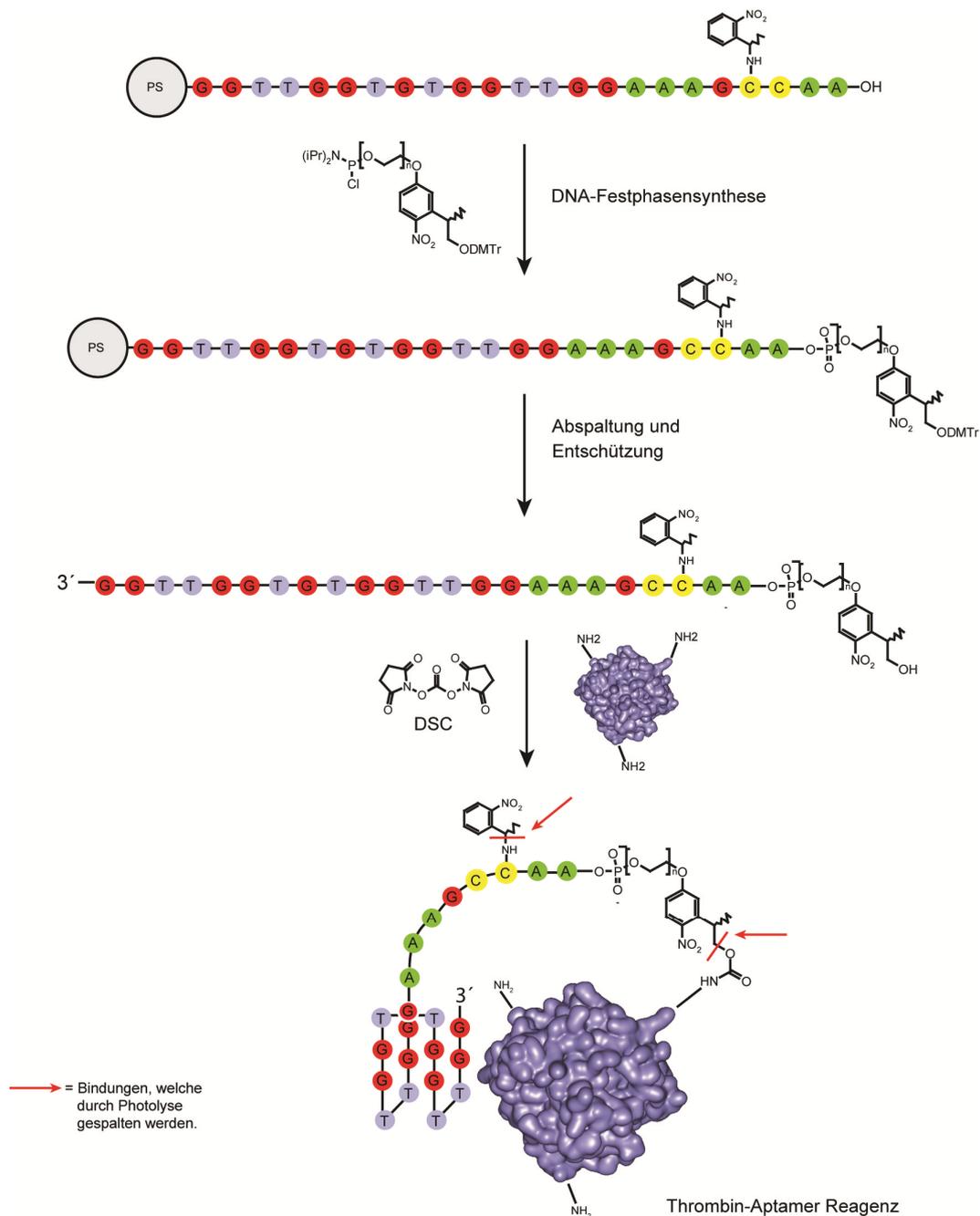


**Abbildung 82:** Ausschnitt aus der Kristallstruktur des Thrombin-gebundenen Aptamers HD1 (Eintrag 1HAO der RCSB ProteinDataBank, dargestellt mit Accelrys DS Visualizer). In Rot hervorgehoben ist die terminale 5'-OH Gruppe der Aptamersequenz, die Abstände zu drei Lysinresten (grün) sind als schwarze Linien eingezeichnet.

In Abbildung 82 sind die Abstände des terminalen 5'-OH zu den am nächsten liegenden Lysinresten dargestellt. Es ergeben sich Distanzen zwischen  $\sim 26$ - $32$  Å, dies entspricht der Länge eines Alkans mit 22-27 C-Atomen ( $sp^3$ -hybridisiert, 154 pm Bindungslänge). Berücksichtigt man nun noch die Antisenseerweiterung von 8 Nukleotiden mit einem Abstand der Phosphoratom der verbrückenden Phosphate von jeweils durchschnittlich 5-7 Å, so wird klar, dass an die Linkerlänge keine besonderen Ansprüche gestellt werden müssen. Bereits die 5'-Erweiterung durch die zusätzlichen Gegenstrangnukleoside lassen die Lysinreste in direkte Nähe zu dem DNA-Aptamer kommen. Dennoch sollte ein relativ großer Linker eingesetzt werden, um möglichst viele Lysinreste erreichen zu können. Durch die Verwendung eines (Poly)ethylenglycolspacers wäre die Linkerlänge leicht anpassbar.

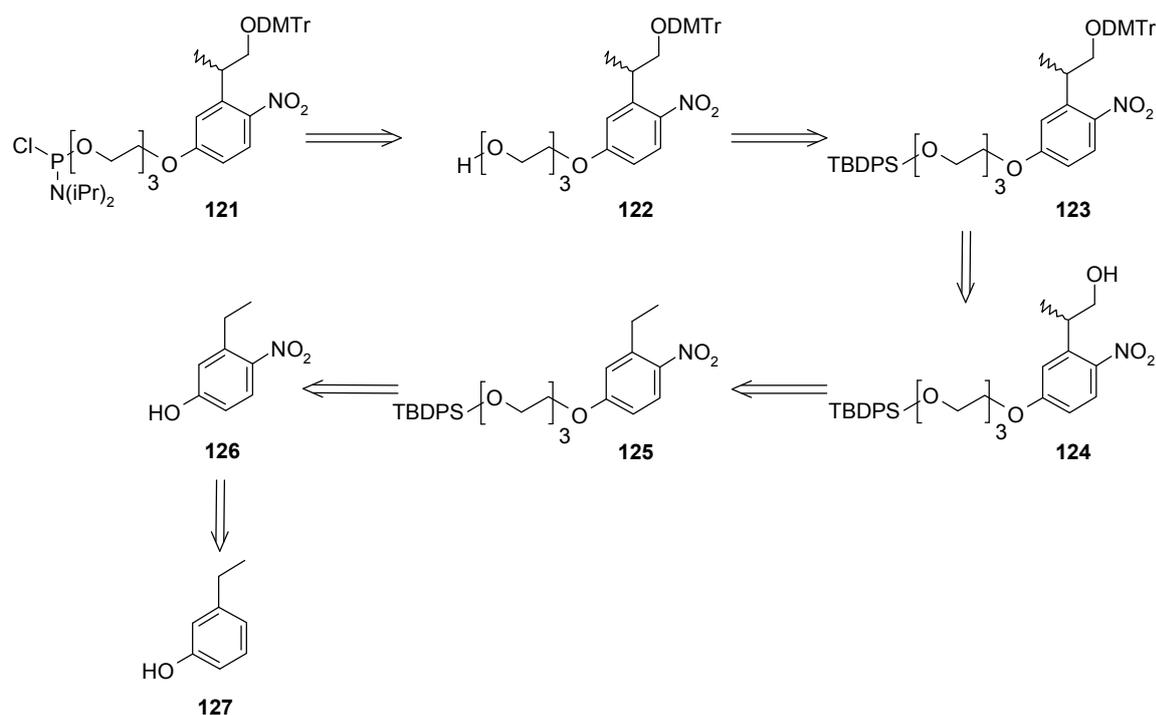
Der erste Entwurf zur Synthese eines photospaltbaren Linkers und dessen Anwendung zur Darstellung des kovalenten TTA-Reagenzes ist in der folgenden Abbildung 83 dargestellt. Basierend

auf der NPP-Schutzgruppe sollte über einen Phenolether die Einführung eines (Poly)ethylenglycol-spacer beliebiger Länge ermöglicht werden. Die Darstellung als Phosphoramidit und DMTr-Schutzung der OH-Gruppe ermöglicht die direkte Verwendung in der automatisierten DNA-Festphasensynthese. Die Abspaltung der DNA-Sequenz von der festen Phase liefert eine freie OH-Gruppe am 5'-Ende, über diese sollte dann die Verknüpfung mit  $\alpha$ -Thrombin durch die Verwendung von DSC erfolgen. Letztendlich erhält man das kovalente TTA-Reagenz.



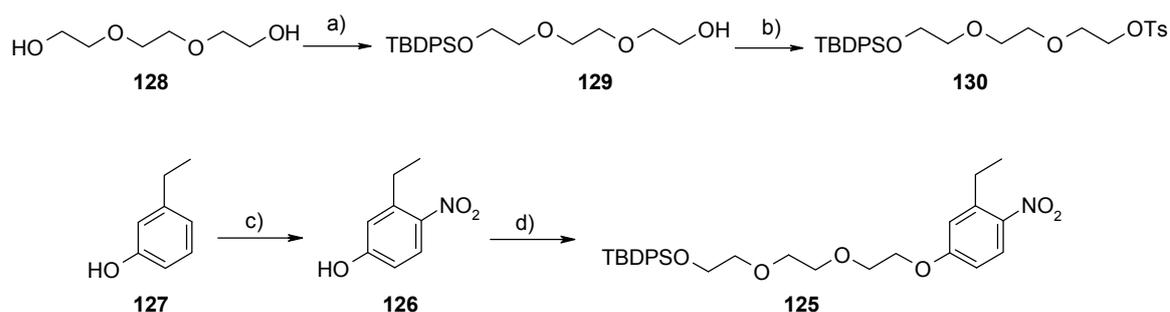
**Abbildung 83:** Schematische Darstellung (nicht maßstabsgerecht) des ursprünglichen Syntheseweges der ausschaltbaren HD1-Sequenz, versehen mit einem photospaltbaren Linker und über ein Carbamat mit  $\alpha$ -Thrombin kovalent verbunden (PS = Polystyren). Mit einem roten Pfeil bzw. Strich sind die beiden Bindungen gekennzeichnet, welche durch UV-Bestrahlung gespalten werden können und zu einer Freisetzung des Proteins sowie Zerstörung der aktiven Aptamerkonformation führen.

Die retrosynthetische Zerlegung des ursprünglich angedachten photospaltbaren Linkers **121** zeigt Abbildung 84. Die Darstellung sollte ausgehend von 3-Ethylphenol **127** erfolgen. Nach regioselektiver Nitrierung in *para*-Position zu Verbindung **126** wird der Phenolether **125** durch nukleophile Substitution aus einem TBDPS-geschützten Tosylat des Triethylglycols aufgebaut. Durch Hydroxymethylierung an der benzylicen Position erhält man das NPP-analoge Chromophor **124**. Es erfolgt die Titylierung der OH-Gruppe zu **123**, gefolgt von der Desilylierung der Triethylglycoleinheit, resultierend in **122**. Der finale Schritt besteht in der Phosphoramiditierung.



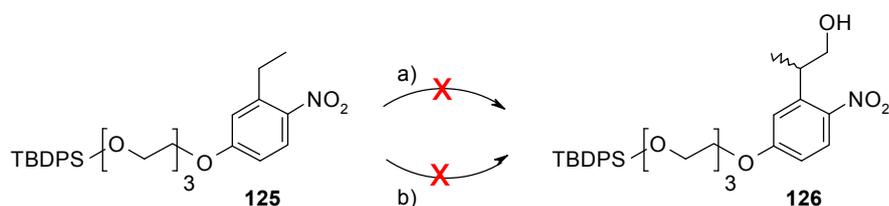
**Abbildung 84:** Retrosynthetische Zerlegung des ursprünglich geplanten photospaltbaren Linkers **121**. Es sei an dieser Stelle schon einmal vorweg genommen, dass die Hydroxymethylierung zu **124** als Schlüsselreaktion nicht erfolgreich war.

Kommerziell erhältliches 3-Ethylphenol **127** wurde analog zu Thompson *et al.*<sup>[200]</sup> mit  $\text{NaNO}_2/\text{NaNO}_3$  und  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in Dichlormethan nitriert. Die Ausbeute betrug 37 %. Triethylglycol **128** wurde mit TBDPS-Cl nach Nemoto *et al.*<sup>[201]</sup> mit 72 % Ausbeute silylgeschützt. Die weitere Umsetzung von **129** mit *p*-Toluensulfonylchlorid unter Pyridinkatalyse in Dichlormethan ergab die elektrophile Glycoleinheit **130** mit einer Ausbeute von 77 %. Anschließend erfolgte die nukleophile Substitution des Tosylats durch die phenolische Hydroxygruppe des 3-Ethyl-4-nitrophenols **126** unter Zugabe von  $\text{K}_2\text{CO}_3$  in DMF mit einer Ausbeute von 88 % (siehe Abbildung 85). Ein vorhergehender Versuch, die nukleophile Substitution unter FINKELSTEIN-Bedingungen in Aceton unter Zugabe von Natriumiodid durchzuführen, gelang nicht.



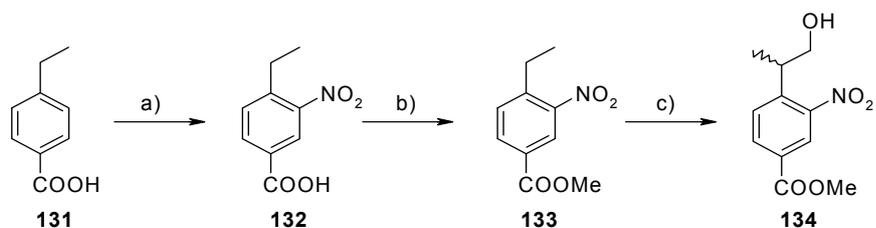
**Abbildung 85:** a) 0.2 eq TBDPS-Cl, 1.1 eq NEt<sub>3</sub>, DMAP kat., CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 4°C → RT, 16 h; b) 1.1 eq *p*-TsCl, Pyridin, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 4°C → RT, 16 h; c) 1.1 eq NaNO<sub>3</sub>, NaNO<sub>2</sub> kat., 3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 3 d; d) 1.5 eq **130**, 5 eq K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, 100°C, 5 h.

Die entscheidende Schlüsselreaktion war nun erneut die Hydroxymethylierung des Nitroaromaten **125** in benzylicher Position. Es wurden zwei verschiedene Ansätze getestet. Zum einen der klassische Weg mit Paraformaldehyd und Triton B in DMSO bei 90°C. Nach dreistündiger Reaktionsdauer zeigte die DC-Analyse jedoch keinerlei Umsatz. In einem zweiten Versuch wurde als Base *t*-BuOK verwendet, die Reaktion erfolgte ebenfalls in DMSO. Auch diese Bemühungen waren nicht erfolgreich. Ähnlich wie bei der Darstellung des NPP-analogen hNDBF-OH (siehe Kapitel 3.1.1.5) schien auch in diesem Fall der phenolische Nitroaromat zu elektronenreich für eine Hydroxymethylierung unter aldolartigen Bedingungen zu sein.



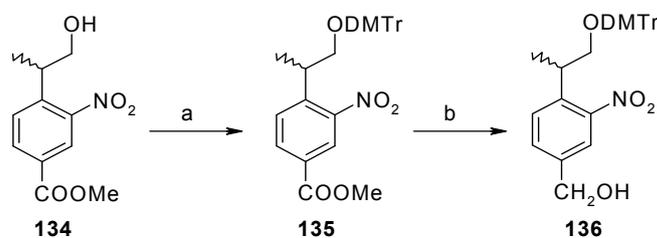
**Abbildung 86:** Reaktionen zur Hydroxymethylierung von **125**. a) 0.4 eq Paraformaldehyd, 1 eq BnN(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>OH, DMSO, 3 h, 90°C → RT; b) 1.5 eq Paraformaldehyd, 0.1 eq *t*-BuOK/*t*-BuOH, DMSO, 5 h, 90°C → RT.

In einer sehr umfangreichen Studie zur Synthese einer Vielzahl an NPP-Derivaten zeigten Pfeleiderer et al. 2004<sup>[202]</sup> auch die Darstellung einer substituierten Ethylnitrobenzoesäure **133**, welche erfolgreich in einer Hydroxymethylierung reagierte. In Anlehnung hieran wurde das Design des Linkers dahingehend abgeändert, dass eben dieses Derivat als Ausgangsverbindung fungieren konnte. Der Syntheseweg ist in folgender Abbildung 87 gezeigt.



**Abbildung 87:** Syntheseweg zum NPP-Derivat **134** nach Pfeleiderer et al.<sup>[202]</sup> a) HNO<sub>3</sub> (1.48 g/cm<sup>3</sup>), 1 h, 4°C → RT in 16 h; b) MeOH, konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4h, 80°C; c) 1.5 eq Paraformaldehyd, 0.1 eq *t*-BuOK/*t*-BuOH, DMSO, 3 h, 80°C → RT.

Die Nitrierung von 4-Ethylbenzoesäure **131** zu **132** erfolgte mit 90 %iger Salpetersäure bei Raumtemperatur in fast quantitativer Ausbeute.<sup>[203]</sup> In diesem Schritt ist die Einhaltung der richtigen Säurekonzentration essentiell, die Verwendung von rauchender Salpetersäure führte zur Mehrfachnitrierung. Anschließend wurde die Säuregruppe verestert, um bei der nachfolgenden Hydroxymethylierung Nebenreaktionen bzw. die Neutralisierung des basischen Katalysators zu verhindern. Die Reaktion zu Verbindung **133** wurde unter Schwefelsäurekatalyse in siedendem Methanol durchgeführt, die Ausbeute betrug 98.5 %. Zur Hydroxymethylierung wurde *t*-BuOK in katalytischen Mengen eingesetzt, was zu dem gewünschten Zwischenprodukt **134** in 55 % Ausbeute führte. Die Schützung der Hydroxygruppe zu **135** erfolgte mit DMTr-Cl in Pyridin unter Zugabe katalytischer Mengen DMAP in 96 % Ausbeute. Um weiterhin die PEG-Gruppe *via* nukleophiler Substitution einführen zu können, wurde der Carbonsäuremethylester **135** nach Bianco *et al.*<sup>[204]</sup> mit NaBH<sub>4</sub> in 1,4-Dioxan/H<sub>2</sub>O mit einer Ausbeute von 77 % zum Benzylalkohol **136** reduziert (siehe Abbildung 88).



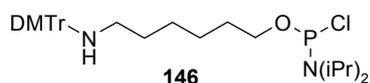
**Abbildung 88:** Tritylierung und Reduktion des NPP-Derivats **134**. a) 1.1 eq DMTr-Cl, 0.1 eq DMAP, Pyridin, RT, 24 h; b) 10 eq NaBH<sub>4</sub>, 1,4-Dioxan/H<sub>2</sub>O (1:1 v/v), RT, 24 h.

Die folgende Reaktion zu **137** mit Triethylglycol **130** in DMF unter Zugabe von K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> war nicht erfolgreich. Auch der Versuch, den Benzylalkohol **136** mit Natriumhydrid in THF *in situ* zu deprotonieren und anschließend mit dem Triethylglycolelektrophil **130** umzusetzen, gelang nicht. Zudem zeigte sich, dass die DMTr-Schutzgruppe unter den gegebenen Reaktionsbedingungen nicht stabil war. Sie wurde bei Verbindung **140** durch die TBDMS-Gruppe ersetzt, welche ebenfalls für die automatisierte DNA-Festphasensynthese geeignet ist. In einem weiteren Ansatz wurde versucht, den Benzylalkohol **136/141** mittels *p*-Toluensulfonylchlorid in eine Abgangsgruppe zu überführen und dann mit dem nukleophilen Triethylglycolderivat **129** umzusetzen – ebenfalls ohne Erfolg. Auch eine APPEL-Reaktion zum Benzylbromid **139/143**, welches als Elektrophil fungieren sollte, misslang (siehe Abbildung 89).



Um zu überprüfen, ob der Linker **145** photospaltbar ist, erfolgte ein Belichtungstest in Methanol. Zusätzlich wurde ein weiterer DC-Streifen in alkalischer Ninhydrinlösung inkubiert und anschließend mit einem Heißluftfön leicht erwärmt. Es zeigte sich keine Verfärbung des Linkerflecks, was darauf schließen lässt, dass keine freien Aminogruppen vorhanden waren. Somit erfolgte die Kondensation chemoselektiv zum Amid, es bildete sich kein Esterprodukt. Die Darstellung des entsprechenden Phosphoramidits aus dem Vorläufer **145** war jedoch nicht erfolgreich. Zwar zeigte sich ein Umsatz auf dem DC, allerdings konnte das Produkt nicht isoliert werden.

Die Synthesestrategie wurde nun dahingehend abgeändert, dass zunächst eine 5'-Aminoerweiterung während der der DNA-Synthese eingeführt und die Sequenz anschließend postsynthetisch mit dem photospaltaren Linker **144** durch eine Kondensationsreaktion modifiziert wurde. Das DMTr-geschützte C6-Aminomodifizierungsreagens ist als Phosphoramidit kommerziell erhältlich, seine Struktur ist in Abbildung 91 gezeigt.



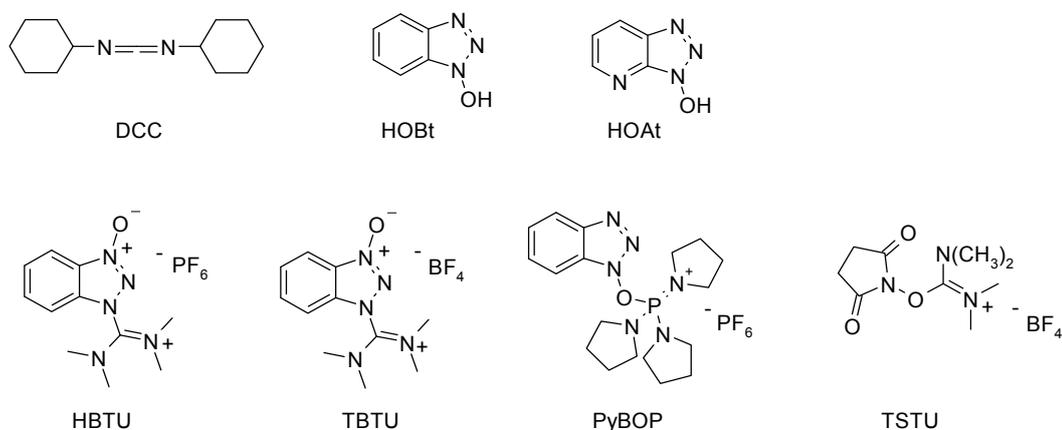
**Abbildung 91:** Struktur des Phosphoramidits zur Aminomodifizierung des 5'- Endes von DNA.

Die Synthese der Zielsequenz 5'- H<sub>2</sub>NC<sub>6</sub>H<sub>12</sub>-AAC C<sup>NPE</sup>GA AAG GTT GGT GTG GTT GG -3' (**TMP138**) erfolgte weitgehend unter Standardbedingungen im „DMTr-Off“ Modus. Allerdings wurde im finalen Kupplungsschritt auf das „Capping“ verzichtet. Somit sollte die Gefahr einer zusätzlichen Acetylierung der Aminomodifikation ausgeschlossen werden. Sicherheitshalber erfolgte deshalb auch das Waschen des Festphasenmaterials mit Diethylamin direkt nach der beendeten Festphasensynthese. Damit sollte sichergestellt werden, dass die Aminofunktionalität auf jeden Fall unprotoniert vorliegt und somit als Nukleophil reagieren kann. Es wurden zwei 10 mL Einwegspritzen, von denen eine mit 3 mL einer 10 %igen Lösung von Diethylamin in Acetonitril gefüllt war, jeweils mit den beiden Lueranschlüssen der Synthesäule verbunden. Durch Hin- und Herdrücken der Lösung wurde das Festphasenmaterial über einen Zeitraum von 5 Minuten gespült. Anschließend erfolgte ein Neutralwaschen mit 5 mL Acetonitril und Trocknen mit Druckluft.

### 3.3.2.2 Kupplungsversuche der aminomodifizierten Aptamersequenz mit dem photoreaktiven Linker

Als Kupplungsreagenzien stehen heutzutage eine Vielzahl an Verbindungen zur Verfügung.<sup>[205]</sup> Das seit über 55 Jahren bekannte DCC<sup>[206]</sup> und seine moderneren Derivate wie DIC und EDC<sup>[207]</sup> werden meist in Kombination mit Additiven eingesetzt. Besonders weit verbreitet sind hier die Benzotriazole HOBt<sup>[208]</sup> und HOAt.<sup>[209]</sup> Sie bilden aus der bereits durch das Carbodiimid aktivierten Carbonsäure einen sekundären Aktivester und verhindern so unter anderem die Entstehung von Nebenprodukten

wie *N*-Acyl Harnstoffen. Gleichzeitig unterdrücken sie die Epimerisierung des chiralen Zentrums am  $\alpha$ -Kohlenstoff. Die Verhinderung der Epimerisierung durch die Bildung von Oxazolin-Zwischenprodukten ist in der chemischen Synthese von natürlichen Aminosäuren von elementarer Bedeutung. Moderne Kupplungsreagenzien basieren auf Uronium- oder Phosphoniumsalzen, genannt seien hier HATU und TBTU<sup>[210]</sup> als Vertreter der Uroniumverbindungen und PyBOP<sup>[211]</sup> als Phosphoniumreagenz. Bei deren Anwendung ist die Zugabe einer nicht-nukleophilen Base zur initialen Deprotonierung des Carbonsäureduktes essentiell. Der Nachteil bei der Verwendung von Uroniumsalzen liegt in der Bildung von Guanidiniumnebenprodukten, dies tritt bei den Phosphoniumsalzen nicht auf.



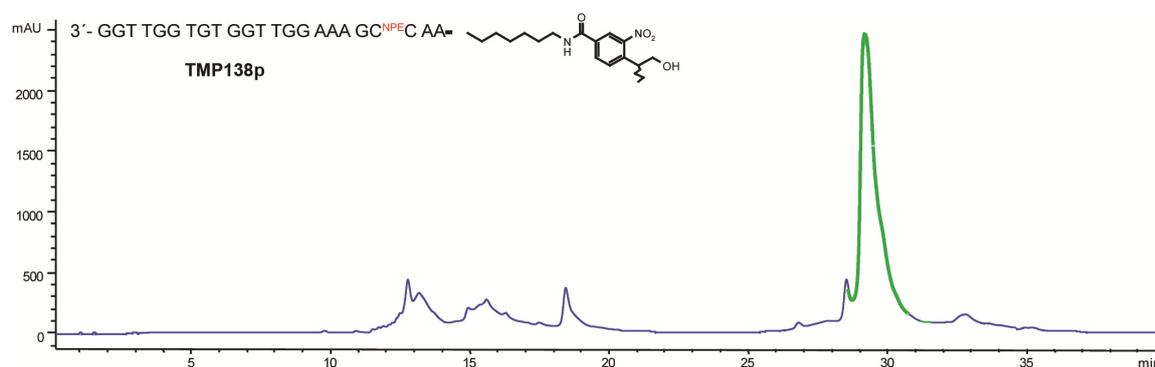
**Abbildung 92:** Strukturen einiger Kondensationsreagenzien zur Darstellung von Amidbindungen. Die Uroniumsalze wie HBTU kristallisieren als *N*-Isomere.<sup>[212]</sup>

Erste Versuche zur Kondensation von **TMP138** mit dem Linker **144** erfolgten mit HBTU in DMF als Lösungsmittel. Es wurden Stocklösungen von HBTU, Carbonsäure **144** und DIPEA in DMF angesetzt, jeweils mit einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/mL}$ . Je 2  $\mu\text{L}$  HBTU und Carbonsäure sowie 4  $\mu\text{L}$  der DIPEA-Lösung wurden in 7  $\mu\text{L}$  DMF vorgelegt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe dieser Reaktionslösung zu 2 nmol der amino-modifizierten Aptamersequenz **TMP138**. Zu den Zeitpunkten  $t = 0, 0,5, 9$  und 22 Stunden wurde ein Aliquot entnommen und HPLC/MS analysiert. Es zeigte sich jedoch keinerlei Umsatz. Auch eine Anhebung der Temperatur auf 60°C für mehrere Stunden führte zu keinem Ergebnis. Ein weiteres Experiment wurde mit 5 Äquivalenten obiger Reagenzien unter Zugabe von ebenfalls 5 Äquivalenten HOBT durchgeführt – auch dies nicht erfolgreich.

Des Weiteren wurde *in situ* versucht unter Verwendung von TSTU<sup>[213]</sup> einen NHS-Aktivester der Carbonsäure **144** herzustellen. Zur Säure, gelöst in DMSO, erfolgte die Zugabe von äquimolaren Mengen an TSTU. Man ließ 30 Minuten bei Raumtemperatur rühren, die DC-Analyse zeigte eine Umsetzung des Edukts. Zu 1 nmol der Aptamersequenz **TMP138** in  $\text{H}_2\text{O}$  wurden 2,5 Äquivalente dieser Lösung pipettiert und durch Zugabe entsprechender Mengen an  $\text{H}_2\text{O}$  bzw. DMSO erfolgte in drei verschiedenen Ansätzen die Einstellung eines Lösungsmittelverhältnis von 2:1, 1:1 und 1:2 Teilen

H<sub>2</sub>O zu DMSO. Die Inkubationsdauer betrug 20 Stunden bei Raumtemperatur. Die HPLC Analyse zeigte jedoch keinen Umsatz.

Eine alternative Vorgehensweise bestand in der heterogenen Reaktion der Aptamersequenz, gebunden an die Festphase, und dem photoreaktiven Linker **144**. Zu einer Spatelspitze des Festphasenmaterials von **TMP138** erfolgte die Zugabe von je 100 µL einer 0.1 M DMF-Lösung von PyBOP bzw. Carbonsäure **144**, sowie 50 µL DIPEA. Die Inkubationszeit betrug 72 Stunden bei Raumtemperatur. Dann wurde kurz zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Festphasenmaterial dreimal mit je 100 µL DMF gewaschen. Die Abspaltung und Entschützung der DNA-Sequenz erfolgte mit 33 %igem Ammoniak in zwölf Stunden bei Raumtemperatur. Das Ergebnis der Reaktion zeigt folgendes Chromatogramm (Abbildung 93).



**Abbildung 93:** RP-HPLC-Chromatogramm von **TMP138p** als Resultat des Kupplungsexperimentes von **TMP138** mit **144** unter Verwendung von PyBOP als Kondensationsreagenz. Das grün eingefärbte Signal bei ~29 min entspricht dem gewünschten und bereits desilylierten Produkt.

Die HPLC/MS Analyse lieferte eine Masse von 7734.8 amu, dies entspricht dem gewünschten Produkt (berechnete Masse: 7733.4 amu). Zudem wurde die TBDMS-Schutzgruppe bereits von dem konzentrierten Ammoniak abgespalten, ein zusätzlicher Entschützungsschritt war somit nicht notwendig. Mit diesem Resultat konnten die ersten Experimente zur Aktivierung mit DSC durchgeführt werden.

Um eine Hydrolyse von DSC in wässrigem Puffer zu vermeiden, wurde versucht, die mit dem photoreaktiven Linker modifizierte Aptamer-DNA **TMP138p** in DMF in Lösung zu bringen. Normalerweise ist DNA aufgrund des anionischen Phosphatgerüsts zu polar für die meisten organischen Lösungsmittel. Die Verwendung von Triethylammoniumpuffer während der RP-HPLC Aufreinigung führt zu einer Anlagerung von Triethylammoniumionen an die Phosphatreste. Hierdurch ist die DNA bereits gut löslich in DMSO. Mit Hilfe von lipophilen Gegenionen kann die Polarität noch stärker abgeschwächt werden. Verwendet man beispielsweise Hexadecyltrimethylammoniumsalze, so ist es möglich, DNA aus Wasser umzufällen und in organischen Lösungsmitteln wie DMF zu solvatisieren. Hierbei handelt es sich um eine gängige Methode, welche zum Beispiel zur Fluoreszenzmarkierung von aminomodifizierter DNA mit einem NHS-Ester des entsprechenden

Fluorophors genutzt wird (siehe auch *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, Kapitel 4.10.9, John Wiley & Sons*).

Zu 4-5 nmol modifizierter DNA **TMP138p** in 100  $\mu\text{L}$  deionisiertem Wasser wurde 1 mL von 4 %igem  $\text{LiClO}_4$  in Aceton gegeben, anschließend erfolgte gründliches Vortexen und fünf Minuten Zentrifugation bei 4000 rcf. Das entstandene Pellet wurde zweimal mit je 200  $\mu\text{L}$  Aceton gewaschen und an der Luft getrocknet. Wiederauflösen in 30  $\mu\text{L}$  deionisiertem Wasser und Zugabe eine 8 %igen Lösung von Hexadecyltrimethylammoniumbromid lieferte nach erneutem Vortexen und Zentrifugieren ein Pellet, welches in der Vakuumzentrifuge getrocknet und dann in 200  $\mu\text{L}$  wasserfreiem DMF gelöst wurde.

Die folgende Tabelle 7 zeigt die vier unterschiedlichen Testansätze mit der umgefällten DNA. Die Inkubationsdauer betrug 24 Stunden bei Raumtemperatur. Nach beendeter Reaktionsdauer wurden die Ansätze mit einer G25-Säule (Illustra MicroSpin™ G25, GE Healthcare) gereinigt und auf der RP-HPLC analysiert. Bei keiner der Reaktionen zeigte sich eine eindeutige Umsetzung.

Nr.	DNA (20 pmol/ $\mu\text{L}$ )	DSC (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	DMAP (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	DIPEA
1	20 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$	-	-
2	20 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	-
3	20 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$	-	5 $\mu\text{L}$
4	20 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$

**Tabelle 7:** Testansätze zur Aktivierung der modifizierten Aptamer-DNA **TMP13**. Die Edukte wurden in wasserfreiem DMF gelöst.

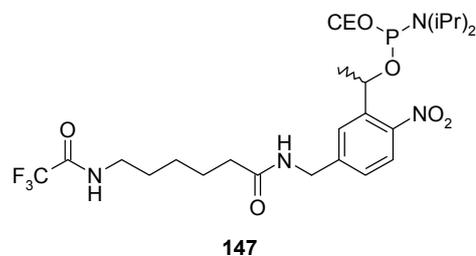
Es stellte sich weiter heraus, dass die Umfällung nicht gut funktioniert. So wurden in einem Testansatz 20  $\mu\text{L}$  der in DMF gelösten Aptamer-DNA mittels G25-Säule gereinigt und das Filtrat anschließend auf der RP-HPLC untersucht. Das Chromatogramm zeigte keinen einheitlichen Peak, sondern vielmehr eine Vielzahl unterschiedlicher Spezies und war insgesamt recht uneinheitlich. Zudem konnte nur eine geringe Menge der auf die G25-Säule aufgetragenen DNA wiedergewonnen werden.

Da die modifizierte Aptamersequenz auch ohne Austausch der Gegenionen zumindest in DMSO löslich ist, wurden 3 nmol der DNA in 100  $\mu\text{L}$  wasserfreiem DMSO gelöst. Zu 50  $\mu\text{L}$  dieser Lösung erfolgte die Zugabe von 20  $\mu\text{L}$  DSC (10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , in DMSO) und 10  $\mu\text{L}$  DMAP (10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , in DMSO). Es wurde bei Raumtemperatur geschüttelt und in Abständen von je 2-4 Stunden Aliquots RP-HPLC analysiert – ohne Erfolg. Zwar traten nach wenigen Stunden Reaktionszeit neue Spezies im Chromatogramm auf, diese waren jedoch nur von schwacher Intensität. Nach 24 Stunden war das Chromatogramm identisch mit der Kontrolle bei  $t = 0$ . Auch die Zugabe von DIPEA änderte an diesem Ergebnis nichts. Wohlgermerkt wurde hier in allen Fällen in wasserfreier Lösung gearbeitet, dass bedeutet eine Hydrolyse des DSC kam als Konkurrenzreaktion nicht in Frage.

Aufgrund der vielen Ungewissheiten wurde die Synthesestrategie erneut geändert. Die ursprünglich geplante „traceless“ Verknüpfung zwischen Aptamer-DNA und  $\alpha$ -Thrombin erhielt nun nicht mehr die höchste Priorität. Somit eröffnete sich ein neuer Weg, welcher letztendlich auch zum Erfolg führen sollte.

### 3.3.2.3 „Non-traceless“ Verknüpfung zwischen Aptamer-DNA und $\alpha$ -Thrombin

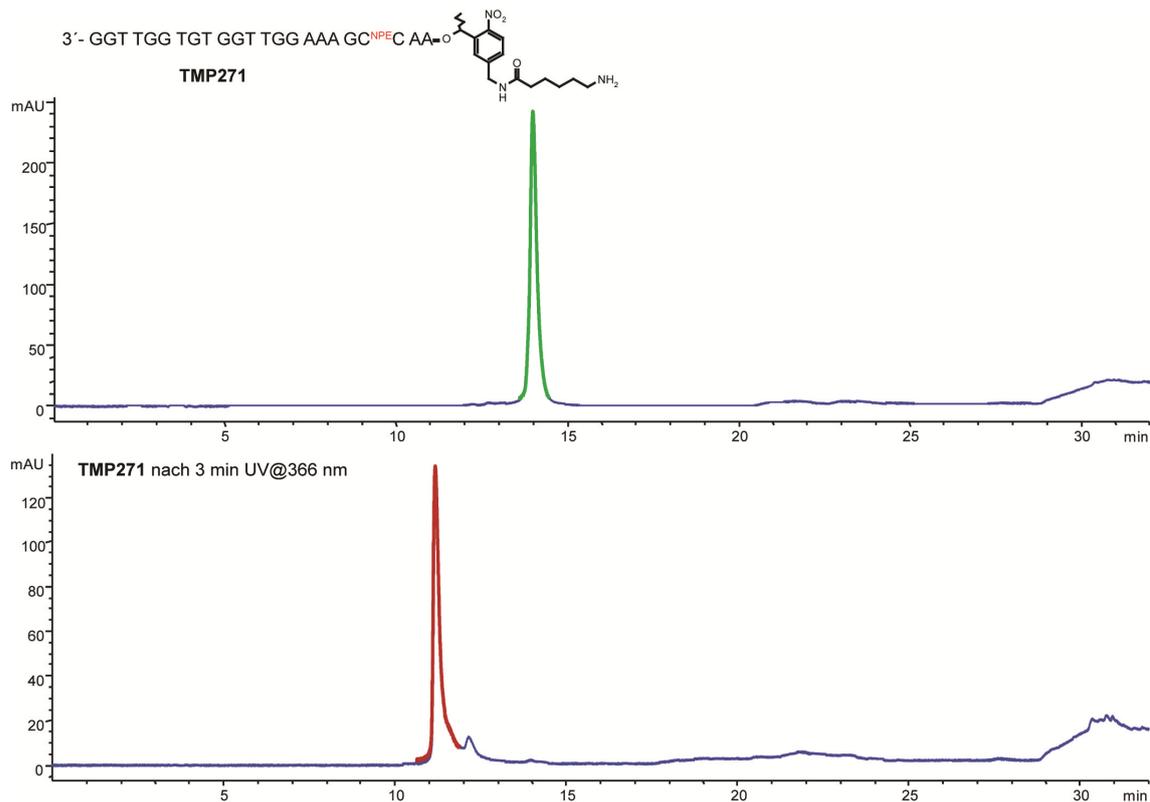
Im Jahre 1998 publizierten Olejnik *et al.*<sup>[214]</sup> einen photospaltbaren Linker, welcher als Phosphoramidit direkt in der automatisierten DNA-Festphasensynthese eingesetzt werden kann (siehe Abbildung 94). Er besitzt eine Aminoerweiterung, die mit TFA geschützt ist. Die basenlabile TFA-Schutzgruppe kann unter den gängigen DNA-Abspaltbedingungen mit Ammoniak oder Methylamin entfernt werden. Über die freie Aminofunktionalität erfolgt dann die Anbindung von beispielsweise Fluorophoren<sup>[215]</sup> oder Peptiden.<sup>[216]</sup>



**Abbildung 94:** Struktur des photospaltbaren Linkers mit terminaler Aminofunktionalität. Der Linker ist kommerziell erhältlich (*Link Technologies Ltd.*).

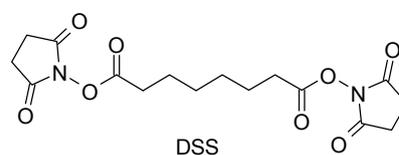
Nachteilig ist, dass es sich nicht um einen „traceless“ Linker handelt. Die Photolyse erfolgt später an der benzylic Position des NPE-Chromophors. Somit wird das DNA-Aptamer mit einer 5'-Phosphatgruppe freigesetzt, allerdings verbleibt das restliche Produkt der Photospaltung samt „Spacer“ am  $\alpha$ -Thrombin und es besteht die Gefahr, dass die Aktivität des Enzym hierdurch negativ beeinflusst wird.

Die DNA-Synthese mit diesem Phosphoramidit erfolgte ebenfalls unter Ausschluss des letzten „Capping“-Schritts, die Sequenz **TMP271** ist in Abbildung 95 gezeigt. Die Abspaltung von der festen Phase und Entschützung wurde mit konzentriertem Ammoniak bei 16 Stunden Inkubationsdauer und Raumtemperatur durchgeführt. Die Chromatogramme nach RP-HPLC Reinigung und UV-Belichtung lassen eindeutig eine saubere Photolysereaktion erkennen. Eine ESI-Massanalyse ergab für das Vollängenprodukt eine Masse von 7719.6 amu, berechnet waren 7719.9 amu. Die Retentionszeit der Sequenz nach erfolgter Photolyse von ungefähr 11.2 Minuten stimmte mit einer nicht modifizierten Kontrollsequenz gut überein. Die Ausbeuten an isolierter Aptamersequenz lagen durchgehend bei 80-90 nmol (200 nmol Synthese).



**Abbildung 95:** Chromatogramme der RP-HPLC gereinigten Sequenz **TMP271** vor (grün) und nach (rot) Belichtung mit UV-Licht. Es zeigt sich eine saubere Photolysereaktion, welche mit einer Verschiebung der Retentionszeit vom ~14 min zu ~11.2 min verbunden ist.

Zur Anknüpfung an das  $\alpha$ -Thrombin sollte anstelle von DSC diesmal DSS verwendet werden. Hierbei handelt es sich um einen homobifunktionalen Linker, welcher über zwei NHS-Funktionalitäten verfügt (siehe Abbildung 96). Ruth *et al.*<sup>[217]</sup> und andere Forschungsgruppen<sup>[218]</sup> verwendeten DSS zur Herstellung von Konjugaten aus Oligonukleotiden und Alkalischer Phosphatase für DNA-Hybridisierungstests. Das entsprechende Protokoll zur Konjugation sollte auf unser System übertragen werden.



**Abbildung 96:** Molekülstruktur des homobifunktionalen Linker DSS.

Zunächst erfolgte die Kupplung von DSS mit **TMP271** in wässrigem 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>-Konjugationspuffer. Der pH-Wert des Puffers liegt bei 8.5-9. Dies garantiert, dass die nukleophile primäre Aminogruppe der Aptamersequenz unprotoniert vorliegt. Zudem wurde DSS in einem großen Überschuss von 50-200 Äquivalenten eingesetzt und die Reaktionszeit in dem basischen Puffer möglichst kurz gehalten, um eine weitere Hydrolyse des aktivierten Oligonukleotides zu

verhindern. Erste Experimente zeigten, dass bereits eine Reaktionsdauer von zwei Minuten für eine vollständige Reaktion der Aminogruppe mit dem DSS ausreichend ist. Hierzu wurden 2  $\mu\text{L}$  einer 0.1 mM Lösung von **TMP271** in  $\text{H}_2\text{O}$  mit 5  $\mu\text{L}$  Konjugationspuffer für fünf Minuten vorinkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 10  $\mu\text{L}$  DSS (10 mg/mL, in wasserfreiem DMSO). Für eine saubere Reaktion sollte diese Lösung jeweils frisch angesetzt werden. Man ließ zwei Minuten reagieren und neutralisierte durch Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  PBS-Puffer pH 7.4 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Durch die Absenkung des pH-Wertes wird die Halbwertszeit der Hydrolyse von ungefähr zehn Minuten (pH 8-9) auf mehrere Stunden erhöht.<sup>[196]</sup> Anschließend wurde der Reaktionsansatz über eine G-25 Filtrationssäule (equilibriert mit PBS-Puffer pH 7.4) aufgereinigt. Die folgenden RP-HPLC Chromatogramme zeigen die Aptamersequenz nach beendeter Reaktion.

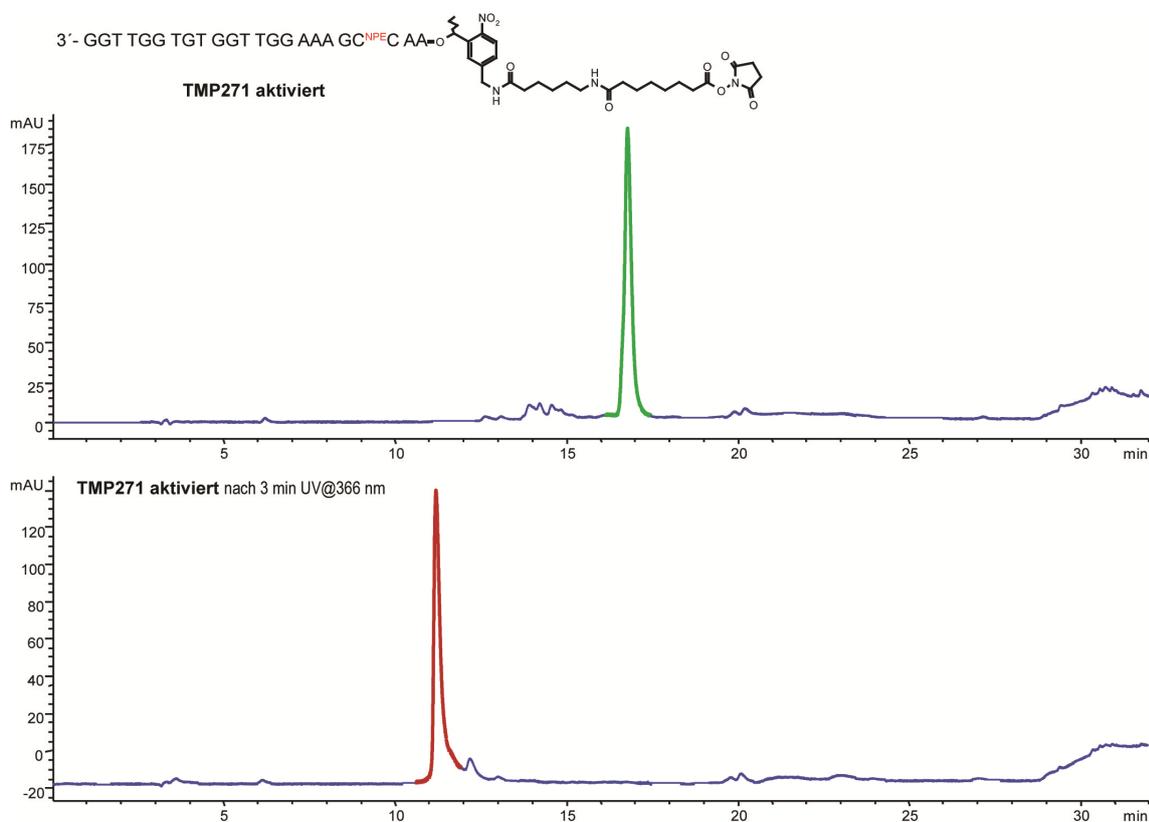


Abbildung 97: Chromatogramme der Sequenz **TMP271** nach Reaktion mit DSS (grün) und nach Belichtung mit UV-Licht (rot). Die Retentionszeit hat sich durch die Aktivierung mit DSS von  $\sim 14$  min nach 16.8 min verschoben, dies wurde für die Einführung des hydrophoben DSS auch erwartet. Nach UV-Belichtung zeigt sich das gleiche Produkt, wie in Abbildung 95 mit einer Retentionszeit von 11.2 min.

Eine HPLC-MS Analyse der aktivierten **TMP271** Sequenz lieferte eine Molekülmasse von 7875.13 amu. Berechnet waren 7973.21 amu. Die ermittelte Masse stimmt mit dem Hydrolyseprodukt – also der entsprechenden Carbonsäure – der DSS-aktivierten Aptamersequenz überein. Trotz einiger Bemühungen wie schneller Probenaufarbeitung bei  $4^\circ\text{C}$  gelang es nicht, massenspektrometrisch den NHS-Aktivester nachzuweisen.

Es war aber wahrscheinlich, dass die Hydrolyse erst im Massenspektrometer erfolgte, da hier eine wässrige Lösung der Aptamersequenz als Analyt dient und bei der Einengung im Stickstoffstrom („dry gas“) teilweise Temperaturen von 200°C erreicht werden.

Somit schloss sich an obiges Protokoll direkt die Verknüpfung des aktivierten **TMP271** an  $\alpha$ -Thrombin an. Hierzu wurde humanes  $\alpha$ -Thrombin mit PBS-Puffer pH 7.4 auf eine Konzentration von 27  $\mu$ M verdünnt. Um Glycerinreste zu entfernen wurde diese Stammlösung durch eine P6- Säule (Bio-Spin P6, *Bio-Rad*, equilibriert mit PBS-Puffer pH 7.4) filtriert. Die Aktivierung der Aptamersequenz **TMP271** erfolgte unmittelbar vor der Inkubation mit dem Protein. Als Negativkontrollen dienten Reaktionsansätze, in welchen DSS oder Aptamer-DNA fehlten. Die Reaktionsbedingungen sind in folgender Tabelle 8 aufgeführt.

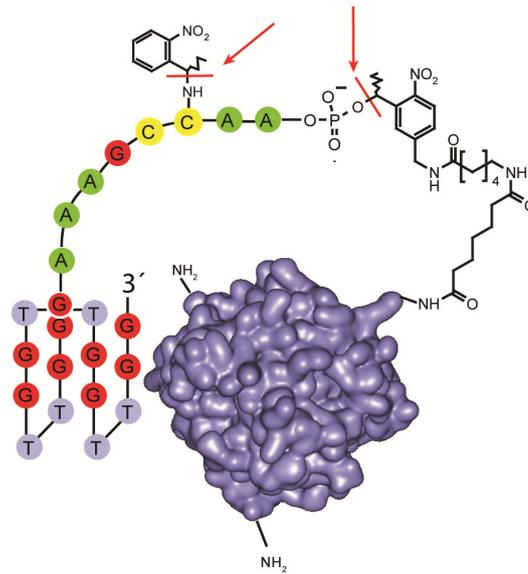
Ansatz	(A) Aptamer ohne DSS	(B) Aptamer mit DSS	(C) DSS ohne Aptamer
<b>TMP271</b> (1 $\mu$ M in H <sub>2</sub> O)	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	-
<b>Konjugationspuffer</b> (0.1 M NaHCO <sub>3</sub> , pH 8.5)	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
<b>DSS</b> (10 mg/mL, in DMSO)	-	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
<b>H<sub>2</sub>O</b>	10 $\mu$ L	-	2 $\mu$ L
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>17 <math>\mu</math>L</b>	<b>17 <math>\mu</math>L</b>	<b>17 <math>\mu</math>L</b>

**Tabelle 8:** Reaktionsansätze zur Aktivierung von TMP271 mit DSS. Die Experimente (A) und (C) dienen als Negativkontrolle.

Die Inkubationsdauer betrug jeweils zwei Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte ein Verdünnen mit 33  $\mu$ L PBS-Puffer pH 7.4 auf 50  $\mu$ L Gesamtvolumen und die Aufreinigung bei 4°C über eine G-25 Zentrifugationssäule (zwei Minuten bei 3000 rpm). Danach wurde die Restkonzentration an Aptamer-DNA in den Lösungen photometrisch ermittelt, wobei sich Konzentrationswerte zwischen 19-23  $\mu$ M ergaben. Dies bedeutete, dass die ursprüngliche Konzentration von 2 nmol Aptamer-DNA in 50  $\mu$ L Lösung durch die Aufarbeitung halbiert hatte.

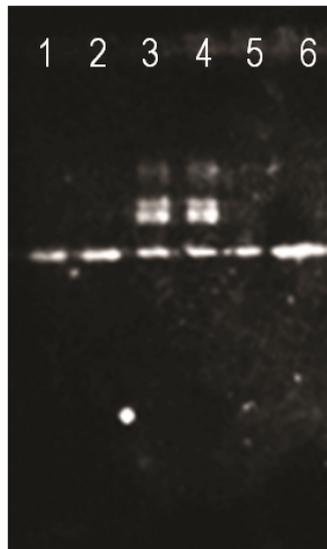
Die Reaktion mit  $\alpha$ -Thrombin erfolgte in PBS-Puffer pH 7.4, wobei das Äquivalentverhältnis zwischen Aptamer-DNA und Protein 10:1 betrug. Hierzu wurden 5  $\mu$ L 10-fach PBS-Puffer pH 7.4, je 25  $\mu$ L der aufgereinigten Ansätze (A), (B) oder (C) aus Tabelle 8 und 1.85  $\mu$ L der  $\alpha$ -Thrombin Stammlösung (27  $\mu$ M) mit H<sub>2</sub>O auf 50  $\mu$ L Gesamtvolumen aufgefüllt. Man inkubierte für zehn Minuten bei Raumtemperatur und filtrierte die Ansätze anschließend über eine P-30-Säule (Bio-Spin P30, *Bio-Rad*, equilibriert mit PBS-Puffer pH 7.4).

Nach dieser Kupplungsreaktion sollte die Aptamersequenz wie in folgender Abbildung 98 gezeigt über einen DSS-Linker kovalent an  $\alpha$ -Thrombin gebunden sein.



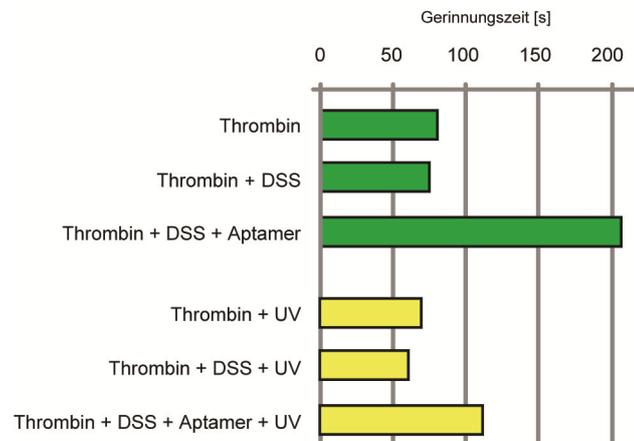
**Abbildung 98:** Schematische Darstellung (nicht maßstabsgerecht) des aktuellen TTA-Reagenzes. Mit einem roten Pfeil bzw. Strich sind die beiden Bindung gekennzeichnet, welche durch UV-Bestrahlung gespalten werden können und zu einer Freisetzung des Proteins sowie Zerstörung der aktiven Aptamerkonformation führen. Erkennbar ist der große Molekülteil, welcher nach Photolyse an die Thrombinoberfläche gebunden bleibt.

In Zusammenarbeit mit Anna Hall und Franziska Pfeiffer im Arbeitskreis von Prof. Dr. Günter Mayer (LIMES, Universität Bonn) sowie Dr. Jens Müller (Universitätsklinikum Bonn) wurden erste analytische Experimente sowie Blutgerinnungstests durchgeführt. Abbildung 99 zeigt eine gelelektrophoretische Auftrennung der Reaktionsansätze nach der Inkubation mit  $\alpha$ -Thrombin.



**Abbildung 99:** Agarose-Gelelektrophorese nach Reaktion der Ansätze (A), (B) und (C) aus Tabelle 8. Bahn 1: (A) Aptamer ohne DSS; Bahn 2: (C) DSS ohne Aptamer; Bahn 3 und 4: (B) Aptamer und DSS; Bahn 5 und 6: (B) nach UV-Belichtung.

Das Ergebnis der Gelelektrophorese lässt darauf schließen, dass sich nur bei Verwendung von Aptamer und DSS Komplexe mit dem  $\alpha$ -Thrombin bilden (kürzere Laufstrecke, Bahn-3 und -4), allerdings sind diese nicht einheitlich. Nach Belichtung ergibt sich das gleiche Bild wie bei den Negativkontrollen auf Bahn-1 und -2. Die Komplexe zerfallen also unter UV-Licht. Leider gelang bis jetzt keine massenspektrometrische Analyse der einzelnen Banden, welche auf eine eindeutige Zusammensetzung der Aptamer/Thrombin-Komplexe schließen lassen konnte. Ein erster Blutgerinnungstest lieferte ebenfalls ein grundsätzlich positives Ergebnis (Abbildung 100). So ist die Gerinnungszeit ausschließlich dann verlängert – und zwar um das Vierfache – wenn die Vorinkubation der aminomodifizierten Aptamersequenz mit DSS erfolgte und anschließend die Reaktion mit  $\alpha$ -Thrombin. Die Inkubation von Thrombin mit dem Ansatz (C) aus Tabelle 8 (Thrombin + DSS) hat keinen Effekt auf die antikoagulatorische Wirkung. Leider ist auch ersichtlich, dass nach UV-Belichtung nicht mehr die komplette Aktivität des  $\alpha$ -Thrombins hergestellt werden konnte. Die Ursache hierfür liegt möglicherweise in einer Mehrfachmodifizierung des  $\alpha$ -Thrombins, so dass sich nicht ausschließlich definierte 1:1 Komplexe aus Aptamer und Protein bilden. Dies lässt bereits die Gelelektrophorese aus Abbildung 99 erkennen. Wahrscheinlich bleiben so nach Photolyse die Spaltprodukte an für die Substratbindung wichtigen Positionen auf der Oberfläche des  $\alpha$ -Thrombins zurück, und schwächen so die Gerinnungsaktivität ab. Ein wichtiger Punkt scheint also die Darstellung definierter 1:1 Komplexe zu sein.

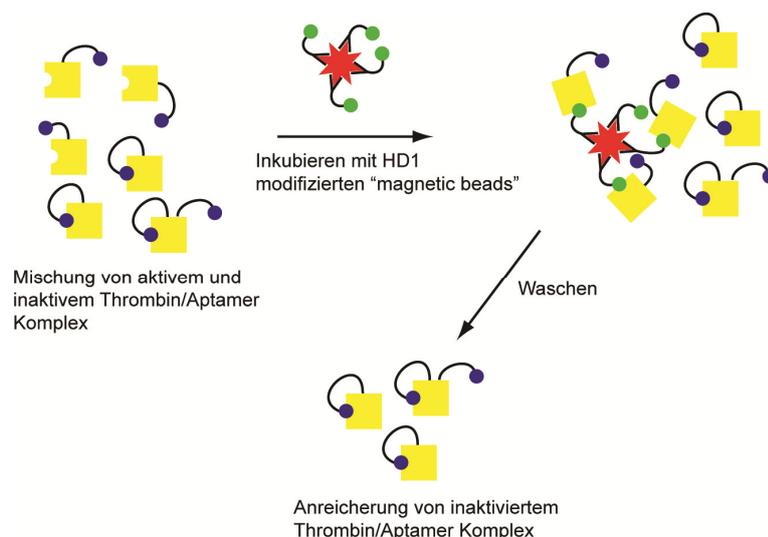


**Abbildung 100:** Erste Ergebnisse des Blutgerinnungstestes. Man erkennt die verlängerte Gerinnungszeit für die Reaktion von  $\alpha$ -Thrombin mit der DSS-aktivierten Aptamer-DNA (3. grüner Balken von oben). Leider gelingt es durch UV-Belichtung nicht, die komplette Aktivität des Proteins wiederherzustellen.

Es stellte sich nun die Frage, auf welche Weise die Komplexbildung mit Hinblick auf eine bessere Homogenität oder gar Ausbildung reiner 1:1 Aptamer/Thrombin Komplexe gesteuert werden kann. Für den Fall, dass die Anlagerung der aktiven Aptamerkonformation an die Exosite I sehr viel schneller erfolgt als die kovalente Kupplungsreaktion zwischen Aptamer und Lysinseitenketten, sollte es möglich sein, ein Konzentrationsverhältnis zu finden, welches zu fast reinen 1:1 Komplexen führt.

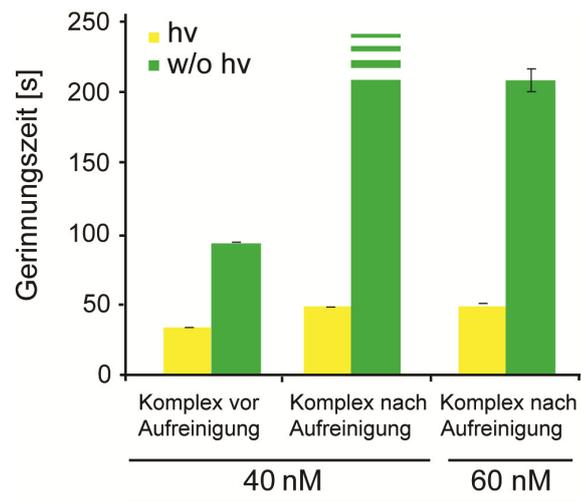
In einem weiteren Experiment wurde deshalb ermittelt, welche Auswirkung die Änderung des Äquivalentverhältnisses von DSS-aktivierter Aptamersequenz und  $\alpha$ -Thrombin auf die Ausbildung des kovalenten Komplexes hat. Hierzu wurde die Konzentration des Proteins von 1  $\mu\text{M}$  auf 2 bzw. 4  $\mu\text{M}$  erhöht, was einem Aptamer/Thrombin Verhältnis von 1:5 bzw. 1:2.5 entspricht. Die Ergebnisse zeigten, dass der große Überschuss an aktivierter Aptamersequenz für die Komplexbildung essentiell ist. Somit hat sich die Hoffnung auf eine reine Aptamer-templatierte Reaktion nicht bestätigt.

Um den Komplex weiter aufzureinigen und homogener zu gestalten, wurde eine Affinitätschromatographie durchgeführt. Das Aptamer HD1 wurde über einen Biotin/Streptavidin Anker an „magnetic beads“ immobilisiert. Somit war es möglich, die kovalenten Aptamer/Thrombin-Komplexe, an welchen die Aptamersequenz nicht korrekt an die Exosite gebunden und das  $\alpha$ -Thrombin somit noch antikoagulatorisch aktiv war, zu entfernen. Diejenigen Komplexe, bei denen die Exosite I unbesetzt ist, binden an das immobilisierte HD1-Aptamer und verbleiben auf den „magnetic beads“. Dieser Schritt ist schematisch in folgender Abbildung 101 dargestellt.



**Abbildung 101:** Schematische Darstellung der Aufreinigung des Aptamer/Thrombin-Komplexes mittels Affinitätschromatographie. „magnetic beads“ werden mit Wildtyp-HD1 modifiziert, auf diese Weise können die Komplexe entfernt werden, bei denen die ausschaltbare Aptamersequenz nicht korrekt an die Exosite I gebunden ist. Somit findet eine Anreicherung des gewünschten kovalenten Komplexes mit inaktiviertem  $\alpha$ -Thrombin statt.

Die Blutgerinnungstests mit einer Probe des Aptamer/Thrombin Komplexes nach Anreicherung bestätigten die Effektivität der Affinitätschromatographie. So ist Abbildung 102 zu entnehmen, dass die Blutgerinnungszeit durch diese Aufreinigung mindestens um das doppelte verlängert wurde. Eine Probe mit einer Komplexkonzentration von 40 nM zeigte keinerlei Koagulation nach Ablauf des Messzeitraumes von 200 Sekunden. Erst durch Erhöhung der Konzentration auf 60 nM gerann die Probe innerhalb dieses Zeitraumes.



**Abbildung 102:** Vergleich der Gerinnungszeiten mit einer Probe des Aptamer/Thrombin Komplexes vor (grüne Balken) und nach (gelbe Balken) Aufreinigung durch Affinitätschromatographie. Der unterbrochene Balken kennzeichnet eine Probe die innerhalb des Messzeitraumes nicht geronnen war.



## 4 Ausblick

Mit der Darstellung der hNDBF-Schutzgruppe **68** eröffnet sich unter anderem die Möglichkeit, Oligonukleotidsequenzen wellenlängenselektiv unter Verwendung von Licht unterschiedlicher Wellenlängen zu entschützen. Wie C. Özcoban in seiner Diplomarbeit<sup>[164]</sup> zeigen konnte, besitzt diese Schutzgruppe im Bereich von 405 nm noch ein beträchtliches Absorptionsvermögen, wohingegen die klassischen photolabilen Schutzgruppen hier keine Absorption mehr zeigen (siehe Tabelle 6). Als „proof of principle“ – Experiment könnte man beispielsweise das bivalente Aptamer HD1-22 (siehe Kapitel 3.2.3) als Modellsystem verwenden. Wird eine der beiden Aptamerdomänen mit einer NPP- und die andere mit der hNDBF-Schutzgruppe versehen, so könnte man zeigen, dass es möglich ist, durch einen ersten Lichtimpuls der Wellenlänge 405 nm erst die hNDBF-geschützte Domäne zu aktivieren und anschließend orthogonal mit einem zweiten Lichtimpuls bei 366 nm die NPP-Schutzgruppe abzuspalten. Die so erhaltene Blockade der  $\alpha$ -Thrombin Exosites I und II kann mit den entsprechenden Aktivitätsassays beobachtet werden (Gerinnungs- bzw. Fluoreszenztest, siehe Kapitel 3.2.3).

Des Weiteren ist das Nitrodibenzofuranchromophor nach Ellies-Davis *et al.*<sup>[7]</sup> für eine 2-Photonenentschützung geeignet. Dieses von M. Göppert-Mayer<sup>[219]</sup> 1931 postulierte und einhergehend mit der Entwicklung der Masertechnik 1961 von Kaiser und Garrett<sup>[220]</sup> experimentell bestätigte Prinzip erlaubt die Absorption von zwei Photonen gleicher Energie zur Überführung von Atomen und Molekülen in einen angeregten Zustand. Für unsere photolabile Schutzgruppe bedeutet dies, dass die Photolyse nicht nur durch ein Photon mit 366 nm induziert werden kann, sondern ebenso durch zwei Photonen der doppelten Wellenlänge, welche gleichzeitig vom Photosystem absorbiert werden. Dies setzt eine hinreichend große Photonendichte der Lichtquelle und einen entsprechenden 2-Photonenwirkungsquerschnitt des anzuregenden Teilchens voraus.<sup>[188]</sup> Zum einen wäre diese Methode eine weitere Möglichkeit, hNDBF orthogonal zu anderen photolabilen Schutzgruppen zu entschützen, zum anderen ist hier die Verwendung von IR- anstelle von UV-Licht vorteilhaft für die Untersuchung biologischer Systeme, da es weniger zellschädigend ist und zudem eine größere Eindringtiefe in Gewebe besitzt. Hinzu kommt, dass die Absorptionswahrscheinlichkeit proportional zum Quadrat der Lichtintensität ist. Da nur im Laserfokus die Photonendichte groß genug ist kann eine dreidimensionale Auflösung erreicht werden kann.

Zur Weiterentwicklung des TTA-Reagenzes (siehe Abbildung 98) sollte das Hauptaugenmerk in einer kontrollierbaren Darstellung eines 1:1 Aptamer/Thrombin Komplexes sowie einem besseren Aus/An Verhalten liegen. Bisher scheint der Komplex noch sehr inhomogen zu sein, auch wenn die Aufreinigung mittel Affinitätschromatographie bereits eine beträchtliche Verbesserung ergab. Wie Heckel et al.<sup>[151]</sup> erst kürzlich zeigen konnten, beträgt die Aktivität des ausschaltbaren HD1-Aptamers im Vergleich zum Wildtyp-HD1 nur etwa 14 %. Grundsätzlich scheinen Erweiterungen am 5'-Ende der Aptamer-DNA dessen Aktivität herabzusetzen. Im Gegensatz hierzu zeigten Sequenzen, bei denen 3'-Erweiterungen erfolgten – im Besonderen bei Hinzufügen von 3'-abasischen Modifizierungen – eine erhöhte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-HD1. Diese höhere Aktivität einer 3'-erweiterten Aptamersequenz zu  $\alpha$ -Thrombin könnte man nun zur Verbesserung des TTA-Komplexes benutzen. Hierzu würde die photoaktivierbare Antisenseerweiterung sowie die kovalente Anbindung über das 3'-Ende erfolgen, was mit entsprechendem aminomodifiziertem Festphasenmaterial möglich sein dürfte.

Die sehr elegante Methode, über eine postsynthetische Modifizierung einer, mit einem „convertible nucleotide“ versehenen, Oligonukleotidsequenz unterschiedliche Schutzgruppen einführen zu können, könnte ebenfalls noch tiefergehend untersucht werden. Um die Nukleophilie der photolabilen Schutzgruppen zu erhöhen, kann die Synthese der entsprechenden Amine anstelle der Alkohole erfolgen. Zwar ist bekannt, dass die Photolyse der Kohlenstoff-Stickstoffbindung häufig unvollständig bzw. mit geringer Effizienz verläuft. Die Experimente im Arbeitskreis Heckel haben jedoch gezeigt, dass mittels NPE-NH<sub>2</sub> in N<sup>4</sup>-Position photolabil geschütztes Desoxycytidin sich sehr gut lichtinduziert entschützen lässt. Es könnte also mit den Aminen gelingen, allgemeine Reaktionsbedingungen zur postsynthetischen Photoschätzung an den Nukleobasen Cytosin und Adenin zu bestimmen. Eine weitere Möglichkeit bestünde in der Verwendung anderer aktivierter „convertible nucleosides“, welche eventuell besser reagieren.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Materialien und Reagenzien

**Lösungsmittel und Reagenzien.** Alle kommerziell erworbenen Chemikalien wurden wie vom Hersteller (hauptsächlich *Sigma-Aldrich Corporation*, *Acros Organics*) geliefert ohne weitere Reinigung verwendet. Reagenzien und Festphasenmaterial zur DNA/RNA Synthese lieferten *Mallinckrodt Baker Inc.*, *Chemgenes Corporation*, *Link Technologies Ltd*, *Applied Biosystems*, sowie *Azco Biotech Inc.* Unmodifizierte Oligonukleotide wurden von *Ella Biotech GmbH* bezogen. Wasserfreie Lösungsmittel wurden über 4 Å Molekularsieb gelagert und für alle Reaktionen unter Argonatmosphäre verwendet. Für sämtliche wässrigen Lösungen bzw. Puffer wurde MilliQ-Wasser aus einem Milli-Q Plus Gerät (*Millipore Corp.*) mit Filterkartuschen der *Siemens AG* verwendet.

**NMR-Spektroskopie.** Zur Aufnahme von NMR-Spektren wurden Geräte der Firma *Bruker Corporation* verwendet: AM250 ( $^1\text{H}$ : 250 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 62.5 MHz), AM/ARX300 ( $^1\text{H}$ : 300 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 75 MHz,  $^{31}\text{P}$ : 121 MHz), AM/AV400 ( $^1\text{H}$ : 400 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz). Die NMR-Experimente sind mit der verwendeten Messfrequenz gekennzeichnet. Gemessen wurde bei Raumtemperatur ( $\sim 293\text{ K}$ ). Als Lösungsmittel dienten deuteriertes DMSO, Aceton, Chloroform, Acetonitril und Methanol; jeweils mit einem Deuterierungsgrad von  $\geq 99.8\%$ . Die Kalibrierung der Spektren erfolgte bei  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR intern nach der relativen Verschiebung des Lösungsmittelsignals,<sup>[221]</sup> für die  $^{31}\text{P}$ -Experimente wurde 85 %ige Phosphorsäure als externer Standard verwendet. Zur Bezeichnung der Multipletts wurden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, sep = Septett, m = unbestimmtes Multiplett, bs = breites Singulett. Die chemische Verschiebung  $\delta$  ist in *parts per million* [ppm], Kopplungskonstanten  $J$  sind in [Hz] angegeben. Die  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren wurden Protonen-Breitband entkoppelt (cpd, *composite pulse decoupling*) aufgenommen.

**Massenspektrometrie.** ESI-Massenspektren von Oligonukleotiden wurden an einem micrOTOF-Q Gerät der Firma *Bruker Corporation* im Negativmodus aufgenommen. Für (hochaufgelöste) Massenbestimmungen von kleinen Molekülen wurden entweder obiges Gerät mit ESI-Quelle, ein MAT 95 XL Sektorfeldgerät der Firma *Thermo Finnigan* mit EI-Quelle oder ein Voyager-DE MALDI-Spektrometer der Firma *Applied Biosystems* verwendet. Als Matrix für die MALDI-Experimente diente 2,5-Dihydroxybenzoesäure.

**Elementaranalyse.** Es wurden ein VarioEL V2.8 oder ein Vario Micro Cube der *Elementar Analysensysteme GmbH* verwendet. Die Angabe der Elementarzusammensetzung erfolgt in Prozent.

**Dünnschichtchromatographie.** Zur Reaktions- und Reinheitskontrolle wurden DC-Kieselgelplatten 60 mit Fluoreszenzindikator (254 nm) der Firma *Merck KGaA* verwendet. Die Detektion erfolgte mit UV-Licht der Wellenlängen 254 und/oder 365 nm. Des Weiteren erfolgte die Anfärbung von Substanzflecken mit Anisaldehydreagenz (10 mL *p*-Anisaldehyd, 5 ml Eisessig, 15 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 420 mL Ethanol); DMTr-geschützte Nukleosidderivate ließen sich besonders gut durch Eintauchen der DC-Platte in ein Ce/Mo Färbereagenz (2.5 g Cer(IV)sulfat, 6.25 g Ammoniumheptamolybdat, 225 mL Wasser, 25 mL konz. Schwefelsäure) und anschließendem Erwärmen mittels Heißluftpistole visualisieren.

**Präparative Säulenchromatographie.** Die Reinigung der meisten Verbindungen erfolgte nach dem Prinzip der Flash-Chromatographie.<sup>[222]</sup> Hierzu wurde als stationäre Phase Kieselgel 60 mit einer Korngröße von 40-63 µm der Firmen *Macherey-Nagel GmbH & Co. KG* oder *Merck KGaA* verwendet.

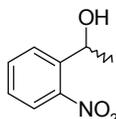
**HPLC.** Agilent Technologies Serie 1200, mit quaternärer Pumpe, Autosampler, Säulenofen, Fraktionensammler und Multi-Wavelength Detektor.

**UV-Belichtung.** Zur Belichtung wurden die photogeschützten Oligonukleotide mit einer finalen Konzentration von 10-50 µM in 0.1 M TEAA-Lösung pH 7.4 gelöst. Als UV-Quelle dienten 3 UV-LEDs (*NICHIA Corp.* Model NCCU033(I), welche mit einer Stromstärke von 0.5 A betrieben wurden. Die Belichtungsdauer betrug 3 min.

**Oligonukleotidsynthese (generelle Prozedur).** Hierzu wurde ein ABI 392 RNA/DNA Synthesizer der Firma *Applied Biosystems* verwendet. Die Synthese der DNA-Aptamersequenzen erfolgte auf ABI LV200 Polystyren Säulen. Die exozyklischen Basenfunktionalitäten der standardmäßig verwendeten Desoxynukleosidphosphoramidite waren mit folgenden Schutzgruppen geschützt: dA<sup>Bz</sup>, dG<sup>dmf</sup>, dC<sup>Ac</sup>. Die Konzentration der Amidite in Acetonitril betrug 0.1 M. Als Aktivatorlösung diente 0.25 M 5-Ethylthiotetrazol in Acetonitril. Die Detritylierung erfolgte mit 3 % Trichloressigsäure in Dichlormethan. Als Reagenz zur Schützung der nicht abreagierten 5'-OH Gruppen diente eine Mischung aus CapA-Lösung (10 % Essigsäureanhydrid und 10 % 2,6-Lutidin in THF) und CapB-Lösung (16 % 1-Methylimidazol in THF). Zur Oxidation wurde eine iodhaltige Lösung (3 % Iod, 2 % Wasser und 20 % Pyridin in THF) verwendet. Nach beendeter Synthese wurde das Festphasenmaterial in der Säule mit einem Argonstrom getrocknet. Als Synthesesyklus diente der LV200 394-8 Zyklus des AK Heckel, hierbei verbleibt die aktivierte Amiditlösung 5 min auf der festen Phase.

## 5.2 Synthesevorschriften

### Darstellung von 1-(2-Nitrophenyl)ethanol (NPE-OH) (50)

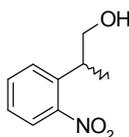


167.17 g/mol

Die Verbindung wurde nach Literaturvorschrift dargestellt.<sup>[5]</sup> 5 g (30 mmol) 2-Nitroacetophenon werden in 75 mL H<sub>2</sub>O/1,4-Dioxan (3:2 v/v) unter Eisbadkühlung vorgelegt. Man gibt langsam 3.5 g (92 mmol) NaBH<sub>4</sub> spatelweise hinzu – dabei kommt es zu einer starken Gasentwicklung und die anfänglich dunkelgelbe Lösung wird gallertartig. Nach 1.5 h wird das Eisbad entfernt und für weitere 2 h bei RT gerührt. Anschließend wird am Rotationsverdampfer eingeengt und der Rückstand in 150 mL H<sub>2</sub>O aufgenommen. Es wird für 0.5 h gerührt, dann extrahiert man die wässrige Phase mit insgesamt 200 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, trocknet über MgSO<sub>4</sub> und entfernt das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Man erhält 4.6 g (27.7 mmol, 91.7 %) einer gelben Flüssigkeit.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.53 (3H, dd,  $J_1 = 6.4, J_2 = 1.6$ , CH<sub>3</sub>), 2.76 (1H, bs, OH), 5.37 (1H, m, CH), 7.38 (1H, m, CH<sub>ar</sub>), 7.61 (1H, m, CH<sub>ar</sub>), 7.83 (2H, m, CH<sub>ar</sub>); R<sub>f</sub> (Chloroform): 0.19

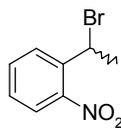
### Darstellung von 2-(2-Nitrophenyl)propan-1-ol (NPP-OH) (52)



181.19 g/mol

Die Verbindung wird nach Literaturvorschrift dargestellt.<sup>[115]</sup> 81 mL (0.6 mol) 2-Ethylnitrobenzen werden zusammen mit 7.4 g (246 mmol) Paraformaldehyd und 7.2 mL Triton B (40 %ig in Methanol) in 80 mL DMSO gelöst. Man erhitzt unter Rückflusskühlung für 5 h bei 90°C. Man destilliert im Vakuum und erhält das Produkt (1 mbar, Kopftemperatur: 115°C) als klare gelbe Flüssigkeit. Die Ausbeute beträgt 34.9 g (192 mmol, 78 %).

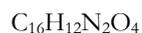
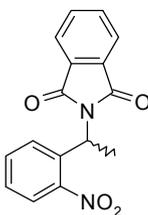
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.07 (3H, d,  $J_1 = 6.8$ , CH<sub>3</sub>), 1.30 (1H, bs, OH), 3.20-3.34 (1H, m, CH), 3.50-3.58 (2H, CH<sub>2</sub>), 7.06-7.13 (1H, m, CH<sub>ar</sub>), 7.21-7.26 (1H, m, CH<sub>ar</sub>), 7.28-7.25 (1H, m, CH<sub>ar</sub>), 7.46-7.51 (1H, m, CH<sub>ar</sub>)

**Darstellung von (1-Bromethyl)-2-nitrobenzen (148)**

230.06 g/mol

10 g (66 mmol) 2-Ethylnitrobenzen, 17.7 g (99 mmol) NBS und 0.24 g (1 mmol) Dibenzoylperoxid werden in 100 mL Tetrachlormethan gelöst und für 7 h bei 90°C unter Rückflusskühlung erhitzt. Man lässt auf RT kommen, filtriert das ausgefallene NHS ab und entfernt das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 19:1 v/v). Man erhält 14.8 g (64 mmol, 97 %) gelbes Öl.

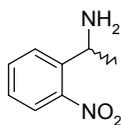
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 2.07$  (3H, d,  $J_1 = 6.8$ ,  $\text{CH}_3$ ), 5.80 (1H, q,  $J_1 = 6.8$ , CH), 7.43 (1H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.63 (1H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.82 (1H, dd,  $J_1 = 8.2$ ,  $J_2 = 1.3$ ,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ); 7.88 (1H, dd,  $J_1 = 8.0$ ,  $J_2 = 1.3$ ,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ),  $R_f$  (Cyclohexan/Aceton 19:1 v/v): 0.41

**Darstellung von *N*-[1-(2-Nitrophenylethyl)]phthalimid (149)**

296.29 g/mol

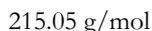
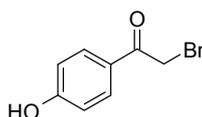
14.8 g (64 mmol) **148** werden zusammen mit 11.9 g (64 mmol) Kaliumphthalimid in 50 mL DMF suspendiert. Es wird für 1 h bei 150°C unter Rückflusskühlung erhitzt, anschließend lässt man auf RT kommen. Man gibt die Reaktionslösung zu 400 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und wäscht die organische Phase mit insgesamt 900 mL Wasser sowie 250 mL ges. NaCl. Man entfernt das Lösungsmittel und reinigt das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch auf ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Die Ausbeute beträgt 12.3 g (41 mmol, 65 %) eines schwach rosa Feststoffs.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.97$  (3H, d,  $J_1 = 7.2$ ,  $\text{CH}_3$ ), 6.08 (1H, q,  $J_1 = 7.2$ , CH), 7.42 (1H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.61 (1H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.68-7.83 (5H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ); 7.92 (1H, dd,  $J_1 = 7.9$ ,  $J_2 = 1.4$ ,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ),  $R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 0.68

**Darstellung von 1-(2-Nitrophenyl)ethylamin (NPE-NH<sub>2</sub>) (150)**

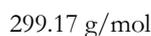
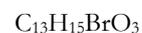
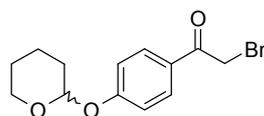
Die Darstellung erfolgt nach Literaturvorschrift.<sup>[47]</sup> 1.75 g (5.9 mmol) **149** werden in 30 mL EtOH bei 50°C suspendiert. Man lässt auf RT kommen und gibt 1 mL 40-50 %iges Hydrazinhydrat (5.9 mmol) hinzu. Man erhitzt unter Rückflusskühlung auf 80°C, nach etwa 10 min beginnt ein weißer Feststoff auszufallen. Mit fortlaufendem Erhitzen löst sich dieser wieder auf. Nach 1 h lässt man auf RT kommen und filtriert den Feststoff ab. Das Filtrat wird mit Et<sub>2</sub>O verdünnt und mit H<sub>2</sub>O und ges. NaCl gewaschen. Es wird über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Als Produkt erhält man 0.64 g (3.8 mmol, 65,2 %) einer dunkelgelben Flüssigkeit.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 1.30 (3H, d, *J*<sub>1</sub> = 6.6, CH<sub>3</sub>), 2.03 (2H, bs, NH<sub>2</sub>), 4.31 (1H, q, *J*<sub>1</sub> = 6.5, CH), 7.43 (1H, m, CH<sub>ar</sub>), 7.68 (1H, m, CH<sub>ar</sub>), 7.78 (1H, dd, *J*<sub>1</sub> = 8.1, *J*<sub>2</sub> = 1.1, CH<sub>ar</sub>), 7.90 (1H, dd, *J*<sub>1</sub> = 7.9, *J*<sub>2</sub> = 1.3, CH<sub>ar</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, cpd, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 25.3, 45.9, 123.3, 127.5, 128.1, 132.9, 142.8, 148.7; R<sub>f</sub> (3% Methanol in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> v/v): 0.28

**Darstellung von 2-Brom-4'-hydroxyacetophenon (54)**

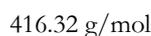
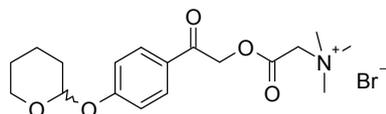
Die Darstellung erfolgte nach Literaturangaben.<sup>[17]</sup> 10 g (73 mmol) *p*-Hydroxyacetophenon gelöst in 80 mL CHCl<sub>3</sub> werden zu einer Suspension von 33 g (147 mmol) CuBr<sub>2</sub> in 60 mL EtOAc gegeben. Es wird für 22 h bei 80°C unter Rückflusskühlung erhitzt. Man lässt auf RT kommen, filtriert ab und wäscht den Filtrückstand mit EtOAc. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt, anschließend erfolgt die säulenchromatographische Aufreinigung (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Ethylacetat 20:1 v/v). Die Ausbeute beträgt 10.5 g (48.9 mmol, 67 %) eines leicht rosa Feststoffes.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 4.82 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 6.91 (2H, d, *J*<sub>1</sub> = 8.9, CH<sub>ar</sub>), 7.92 (2H, d, *J*<sub>1</sub> = 8.9, CH<sub>ar</sub>), 10.56 (1H, s, OH), <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, cpd, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 33.9, 115.9, 125.8, 131.9, 163.1, 190.3; R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Ethylacetat 20:1 v/v): 0.58

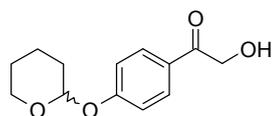
**Darstellung von 1-(4-Tetrahydropyranylphenyl)-2-bromethanon (55)**

0.48 g (2.5 mmol) *p*-TsOH werden in 150 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. Man fügt 200  $\mu\text{L}$  (2.5 mmol) Pyridin hinzu. Nach vollständiger Auflösung der Sulfonsäure werden 5.4 g (25 mmol) **54** und 3.4 mL (37.5 mmol) 3,4-Dihydro-2H-pyran zugefügt. Die Suspension wird für 2 d gerührt. Anschließend entfernt man das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer und reinigt den Rückstand säulenchromatographisch auf (Cyclohexan/Ethylacetat 9:1 + 1 %  $\text{NEt}_3$  v/v). Es werden 5.4 g (18 mmol, 72 %) weißer Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.52-2.03 (6H, m,  $\text{CH}_2$  THP), 3.60-3.65 (1H, m,  $\text{CH}_2$  THP), 3.80-3.87 (1H, m,  $\text{CH}_2$  THP), 4.40 (2H, s,  $\text{CH}_2$ ), 5.53 (1H, t,  $J_1$  = 3.1, CH THP), 7.11 (2H, d,  $J_1$  = 8.9,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.95 (2H, d,  $J_1$  = 8.9,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, cpd,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 18.4, 25.0, 30.1, 30.8, 62.1, 96.1, 116.3, 127.5, 131.2, 161.7, 190.1;  $R_f$  (Cyclohexan/Ethylacetat 9:1 v/v): 0.35

**Darstellung von Trimethyl-{2-oxo-2-[4(tetrahydropyran-2-yloxy)phenyl]ethoxycarbonyl-methyl}-ammoniumbromid (56)**

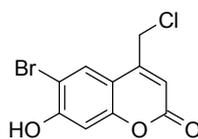
5.3 g (17.7 mmol) **55** werden in 60 mL EtOH suspendiert. 2.1 g (17.7 mmol) Betain werden in 60 mL heißem EtOH gelöst und zu der Suspension gegeben. Dann wird für 3 h auf 80°C erhitzt und man lässt auf RT kommen. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt, man erhält einen weißen Schaum. Das Produkt wird unaufgereinigt weiterverwendet.

**Darstellung von 2-Hydroxy-1-[4-tetrahydropyran-2-yloxy]phenyl]ethanon (pHP-OH) (57)**

236.27 g/mol

Verbindung **56** wird in 100 mL H<sub>2</sub>O suspendiert. Man löst 2.5 g (17.7 mmol) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 50 mL H<sub>2</sub>O und gibt die Lösung zu dem Betain. Die Suspension nimmt eine schwach gelbe Farbe an und dickt zunehmend ein. Man lässt für 2 h rühren und extrahiert anschließend mit EtOAc. Die organische Phase wird über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, anschließend erfolgt eine säulenchromatographische Aufreinigung (Cyclohexan/Ethylacetat 3:2 v/v + 1% NEt<sub>3</sub>). Als Produkt erhält man 2.7 g (11.6 mmol, 65 %) eines weißen Feststoffes.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 1.53-1.97 (6H, m, CH<sub>2</sub> THP), 3.58-3.64 (1H, m, CH<sub>2</sub> THP), 3.72-3.78 (1H, m, CH<sub>2</sub> THP), 4.77 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 5.00 (1H, s, OH), 5.66 (1H, m, CH THP), 7.15 (2H, d, J<sub>1</sub> = 8.9, CH<sub>ar</sub>), 7.93 (2H, d, J<sub>1</sub> = 8.9, CH<sub>ar</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, cpd, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 18.8, 25.0, 30.0, 62.0, 65.4, 95.9, 116.5, 128.5, 130.1, 160.9, 198.0; R<sub>f</sub>(Cyclohexan/Ethylacetat 3:2 v/v): 0.44

**Darstellung von 6-Brom-4-chlormethyl-7-hydroxycumarin (60)**

289.51 g/mol

Die Verbindung wird nach Literaturangaben dargestellt.<sup>[23]</sup> 4.3 g (22.5 mmol) 4-Bromresorcinol und 4.6 mL (33.8 mmol) 4-Chloracetessigsäureethylester werden mit 23 mL konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versetzt. Es wird 6 d gerührt, anschließend wird die Reaktionslösung mittel Pasteurpipette zu 150 mL Eiswasser gegeben. Die Suspension wird in Zentrifugationsbehälter gefüllt und mit 3000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und man wäscht den Rückstand bis zur Farblosigkeit mit kaltem H<sub>2</sub>O. Man nimmt den beigen Feststoff in MeOH oder Aceton auf. Zur weiteren Aufreinigung kann diese Lösung nun erneut in Eiswasser gegeben werden. Alternativ entfernt man das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Man erhält 2 g (6.9 mmol, 30 %) weißen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{d}_4\text{-MeOH}$ ):  $\delta = 4.82$  (2H, d,  $J_1 = 0.9$ ,  $\text{CH}_2$ ), 6.42 (1H, s, CH), 6.86 (1H, s,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.95 (1H, s,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, cpd,  $\text{d}_4\text{-MeOH}$ ):  $\delta = 42.0$ , 104.4, 108.0, 112.5, 113.1, 130.2, 152.0, 155.9, 159.3, 162.5;  $R_f$  (Cyclohexan/Ethylacetat 3:2 v/v): 0.42; MS (ESI+): berechnet für  $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{BrClO}_3$ : 289.5, gefunden: 289.9

### Darstellung von 6-Brom-4-chlormethyl-7-(triisopropylsilyloxymethoxy)cumarin (65)



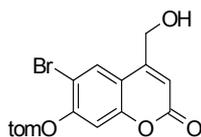
$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{BrClO}_4\text{Si}$

445.82 g/mol

1 g (3.5 mmol) **60** werden in 15 mL Chloroform suspendiert. Es werden 1.8 mL (10.5 mmol) DIPEA zugegeben, die anfänglich farblose Suspension wird gelb und klart auf. Dann gibt man 0.95 mL (6.9 mmol) tom-Cl hinzu. Es wird für 1 h bei  $75^\circ\text{C}$  unter Rückflusskühlung erhitzt, anschließend lässt man auf RT kommen. Die Lösung wird mit EtOAc verdünnt und mit ges.  $\text{NaHCO}_3$  sowie  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Die wässrige Waschphase wird nochmals mit EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Man entfernt das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer und reinigt das Rohprodukt säulenchromatographisch auf (Gradient Cyclohexan/Ethylacetat 9:1  $\rightarrow$  1:1 v/v). Man erhält 1.1 g (2.3 mmol, 67 %) weißen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{d}_6\text{-Aceton}$ ):  $\delta = 1.08$  (3H, s,  $\text{CH}_3$  *i*-Pr), 1.10 (6H, s,  $\text{CH}_3$  *i*-Pr), 1.13-1.27 (3H, m, CH *i*-Pr), 4.99 (2H, d,  $J_1 = 0.9$ ,  $\text{CH}_2$ ), 5.72 (2H, s,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 6.53 (1H, s, CH), 7.25 (1H, s,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 8.07 (1H, s,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, cpd,  $\text{d}_6\text{-Aceton}$ ):  $\delta = 12.5$ , 18.1, 42.0, 89.2, 104.1, 108.4, 113.6, 114.5, 129.8, 150.7, 155.6, 157.4, 160.2;  $R_f$  (Cyclohexan/Ethylacetat 9:1 v/v): 0.22; HRMS (ESI+): berechnet für  $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{BrClO}_4\text{Si}$ : 474.0629, gefunden: 474.0625

### Darstellung von 6-Brom-4-hydroxymethyl-7-(triisopropylsilyloxymethoxy)cumarin (Bhc-OH) (66)



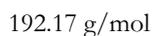
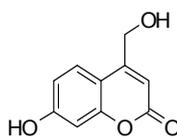
$\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{BrO}_5\text{Si}$

456.09 g/mol

0.3 g (0.67 mmol) **65** werden in 30 mL 1 M  $K_2CO_3$  für 7 h bei 110°C unter Rückflusskühlung erhitzt. Man entfernt das Wasser am Rotationsverdampfer und nimmt den Rückstand in 30 mL heißem EtOH auf. Es wird abfiltriert, das Filtrat wird im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und anschließend säulenchromatographisch aufgereinigt ( $CH_2Cl_2$ /Methanol 19:1 v/v). Man erhält 160 mg (0.35 mmol, 52.2 %) schwach gelben Feststoff.

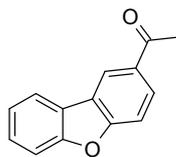
$^1H$ -NMR (300 MHz,  $d_6$ -Aceton):  $\delta$  = 1.08 (3H, s,  $CH_3$  *i*-Pr), 1.10 (6H, s,  $CH_3$  *i*-Pr), 1.14-1.25 (3H, m, CH *i*-Pr), 5.30 (2H, d,  $J_1$  = 2.5,  $CH_2$ ), 5.62 (2H, s,  $OCH_2O$ ), 5.83 (1H, t,  $J_1$  = 2.5, CH), 6.87 (1H, s,  $CH_{ar}$ ), 9.16 (1H, s,  $CH_{ar}$ );  $^{13}C$ -NMR (75 MHz, cpd,  $d_6$ -Aceton):  $\delta$  = 12.5, 18.1, 78.4, 88.9, 98.1, 104.0, 105.5, 118.3, 134.1, 153.8, 158.8, 167.5, 169.4;  $R_f$  (Chloroform/Methanol 19:1 v/v): 0.57; HRMS (ESI+): berechnet für  $C_{18}H_{23}BrO_5Si$ : 456.0968, gefunden: 456.0976

### Darstellung von 7-Hydroxy-4-hydroxymethylcumarin (**111**)



0.49 g (1.64 mmol) 7-Acetoxy-4-bromomethylcumarin werden in 30 mL  $H_2O$  für 8 h bei 100°C erhitzt. Man lässt auf RT abkühlen und extrahiert mit EtOAc, wäscht die organische Phase mit ges. NaCl und trocknet über  $MgSO_4$ . Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt, es folgt eine säulenchromatographische Aufreinigung (Cyclohexan/Ethylacetat 1:5 v/v). Man erhält 0.37 g (1.58 mmol, 96 %) weißen Feststoff.

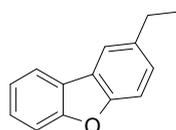
$^1H$ -NMR (300 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  = 4.69 (2H, m,  $CH_2$ ), 6.23 (1H, s, CH), 6.71-6.79 (2H, m,  $CH_{ar}$ ), 7.51 (1H, d,  $J_1$  = 8.7,  $CH_{ar}$ ), 10.5 (1H, OH);  $^{13}C$ -NMR (75 MHz, cpd,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  = 59.0, 102.3, 106.5, 109.5, 112.8, 125.4, 154.8, 156.7, 160.6, 160.9;  $R_f$  (Cyclohexan/Ethylacetat 1:5 v/v): 0.53; HRMS (ESI-): berechnet für  $C_{10}H_7O_4$ : 191.0344, gefunden: 191.0289

**Darstellung von 2-Acetyldibenzofuran (74)**

$C_{14}H_{10}O_2$   
210.23 g/mol

Die Darstellung erfolgte nach Literaturvorschrift.<sup>[126]</sup> 9.5 g (71.3 mmol)  $AlCl_3$  werden fein gepulvert in 20 mL  $CS_2$  vorgelegt. Man tropft zügig 4.6 mL (5.1 g, 65.4 mmol) Acetylchlorid hinzu und rührt 15 min bei RT. 10 g (59.5 mmol) Dibenzofuran werden unter Volumenzunahme in 20 mL  $CS_2$  gelöst und langsam in 5 mL-Portionen zugegeben. Es kommt zu einer Erwärmung der Suspension, lokal siedet das  $CS_2$ . Nach beendeter Zugabe wird 30 min bei RT gerührt und anschließend für 2 h bei 55 °C Ölbadtemperatur unter Intensivkühlung erhitzt. Man lässt die Reaktionsmischung über Nacht auf RT abkühlen. Es wird mit 200 mL Eiswasser gequenchet, die rote organische Phase wird abgetrennt und man extrahiert mit insgesamt 300 mL Ethylacetat. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 0.5 M NaOH und  $H_2O$  gewaschen. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Cyclohexan/Ethylacetat 10:1 v/v) liefert 9.3 g (44.4 mmol, 74.7 %) eines weißen Feststoffes. Das NMR-Spektrum zeigt etwa 10% Verunreinigung mit 3-Acetyldibenzofuran.

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 2.72 (1H, s,  $CH_3$ ), 7.39 (1H, m, H-7), 7.50 (1H, m, H-8), 7.60 (2H, m, H-3, H-6), 8.00 (1H, m, H-9), 8.11 (1H, dd,  $J_1$  = 8.6,  $J_2$  = 1.8, H-3), 8.59 (1H, dd,  $J_1$  = 1.8,  $J_2$  = 0.5, H-1);  $^{13}C$ -NMR (100 MHz, cpd,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 26.9, 111.7, 112.1, 121.1, 121.7, 123.5, 123.9, 124.7, 128.1, 128.1, 132.6, 157.0, 155.0, 197.4;  $R_f$  (Cyclohexan/Ethylacetat 10:1 v/v): 0.31; HRMS (ESI+): berechnet für  $C_{14}H_{10}O_2$ : 210.0681, gefunden: 210.0685

**Darstellung von 2-Ethyldibenzofuran (73)**

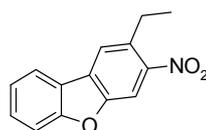
$C_{14}H_{12}O$   
196.25 g/mol

Zur Darstellung des Zinkamalgams werden 45 g (687 mmol) Zinkpulver und 4 g (14.7 mmol)  $HgCl_2$  mit 2.5 mL konz. HCl in 60 mL  $H_2O$  geschüttelt. Man dekantiert die saure Lösung vom Amalgam ab und wäscht dieses anschließend mit  $H_2O$ .<sup>[127]</sup> Die weitere Darstellung erfolgte nach

Literaturvorschrift.<sup>[126]</sup> Zu dem amalgamierten Zink gibt man vorsichtig 35 mL H<sub>2</sub>O und 75 mL konz. HCl. Dann fügt man 14.4 g (68.7 mmol) **74** hinzu und erhitzt unter Rückflusskühlung bei 120 °C Ölbadtemperatur für insgesamt 40 h. Nach 16, 24 und 36 h werden jeweils 50 mL konz. HCl zur Reaktionsmischung zugefügt. Man lässt auf RT abkühlen und extrahiert die wässrige Phase mit insgesamt 300 mL Diethylether. Es wird mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Mittels Vakuumdestillation (0.4 mbar) erhält man 8.6 g (43.8 mmol, 63.9 %) Produkt bei 91 °C Kopf- und 145 °C Ölbadtemperatur als klares, stark lichtbrechendes Öl. Das NMR-Spektrum zeigt etwa 10% Verunreinigung mit 3-Ethyl-2-nitrodibenzofuran.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.36 (3H, t, *J*<sub>1</sub> = 7.7, CH<sub>3</sub>), 2.84 (2H, q, *J*<sub>1</sub> = 7.7, CH<sub>2</sub>), 7.32 (2H, m, H-7, H-8), 7.45 (2H, m, H-4, H-6), 7.56 (1H, m, H-9), 7.78 (1H, d, *J*<sub>1</sub> = 0.9, H-1), 7.94 (1H, d, *J*<sub>1</sub> = 7.8, H-3); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, cpd, CDCl<sub>3</sub>): δ = 16.4, 29.0, 111.4, 111.8, 119.5, 120.7, 122.5, 122.6, 122.7, 127.0, 127.3, 138.9, 154.7, 156.56; HRMS (ESI+): berechnet für C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O: 196,0888, gefunden: 196.0886

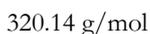
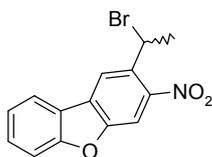
### Darstellung von 2-Ethyl-3-nitrodibenzofuran (72)



C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>  
241.25 g/mol

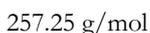
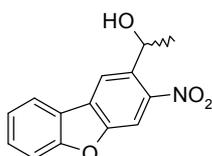
Die Darstellung erfolgte nach Literaturvorschrift.<sup>[223]</sup> 42.3 g (215.9 mmol) **73** werden in 210 mL Eisessig vorgelegt. Man tropft bei RT zügig 27.1 mL (647.7 mmol) rauchende Salpetersäure hinzu, hierbei erwärmt sich die Reaktionslösung. Es wird unter Rückflusskühlung 1 h bei 100 °C erhitzt, anschließend lässt man auf RT abkühlen. Die rote Reaktionslösung wird in kaltes Wasser gegossen und man extrahiert mit Diethylether. Die vereinigten organischen Phasen werden mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Gradient: 0-2% Ethylacetat in Cyclohexan v/v) liefert 33.7 g (139.4 mmol, 64.5 %) eines gelben Feststoffes, welcher aus Methanol umkristallisiert werden kann (gelbe Nadeln). Das NMR-Spektrum zeigt etwa 10% Verunreinigung mit 3-Ethyl-2-nitrodibenzofuran.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.39 (3H, t, *J*<sub>1</sub> = 7.5, CH<sub>3</sub>), 3.10 (2H, q, *J*<sub>1</sub> = 7.5, CH<sub>2</sub>), 7.42 (1H, m, H-8), 7.59 (2H, m, H-7, H-5), 7.90 (1H, s, H-1), 8.00 (1H, m, H-9), 8.15 (1H, s, H-4); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, cpd, CDCl<sub>3</sub>): δ = 15.6, 26.8, 108.8, 112.3, 121.7, 122.4, 122.7, 123.7, 128.9, 129.3, 134.2, 147.8, 153.5, 158.4; R<sub>f</sub> (Cyclohexan/Ethylacetat 97:3 v/v): 0.4; HRMS (ESI+): berechnet für C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>: 241.0739, gefunden: 241.0744

**Darstellung von 1-Brom-1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethan (71)**

Die Darstellung erfolgte nach Literaturvorschrift.<sup>[7]</sup> 33.7 g (139.9 mmol) **72**, 37.4 g (209.2 mmol) NBS und 0.66 g (2.7 mmol) Dibenzoylperoxid werden in 1.3 L  $\text{CCl}_4$  suspendiert und für 22 h unter Rückflusskühlung auf 100 °C erhitzt. Dabei klärt sich die Suspension langsam auf und es bildet sich ein weißer Niederschlag. Der Reaktionsverlauf wird mittels DC überprüft. Nach Abkühlen auf RT wird das kristalline Succinimid abfiltriert. Man wäscht die organische Lösung mit ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung, trocknet über  $\text{MgSO}_4$  und entfernt das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:2 v/v), man erhält einen gelben Feststoff (38.05 g, 118.9 mmol, 85 %).

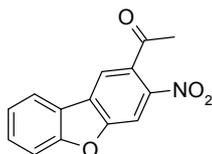
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 2.21 (3H, d,  $J_1$  = 6.8,  $\text{CH}_3$ ), 6.00 (1H, q,  $J_1$  = 6.8, CH), 7.45 (1H, m, H-8), 7.56-7.66 (2H, m, H-7, H-5), 8.07 (1H, m, H-9), 8.08 (1H, s, H-1), 8.43 (1H, s, H-4);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, cpd,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 27.9, 42.8, 108.6, 112.4, 121.6, 121.9, 122.4, 124.1, 129.2, 129.8, 133.2, 146.2, 154.2, 158.5;  $R_f$  (Cyclohexan/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  2:1 v/v): 0.48; HRMS (ESI+): berechnet für  $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{BrNO}_3$ : 320.9824, gefunden: 320.9830 ( $^{81}\text{Br}$  Isotopenpeak)

**Darstellung von 1-(3-Nitrodibenzofuran-2-yl)ethanol (NDBF-OH) (67)**

1.6 g (5 mmol) **71** werden in 30 mL THF gelöst, anschließend gibt man 0.85 g (5 mmol)  $\text{AgNO}_3$  gelöst in 30 mL  $\text{H}_2\text{O}$  hinzu. Unter Lichtausschluss wird für 3.5 h gerührt. Es wird mit Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Cyclohexan/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  2:1 v/v) liefert 0.75 g (2.9 mmol, 58.3 %) eines gelben Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.67 (3H, d,  $J_1$  = 6.4,  $\text{CH}_3$ ), 5.58 (1H, q,  $J_1$  = 6.3, CH), 7.42 (1H, dd,  $J_1$  = 7.0,  $J_2$  = 1.3, H-8), 7.55-7.64 (2H, m, H-7, H-5), 8.03 (1H, dd,  $J_1$  = 7.7,  $J_2$  = 0.7, H-9), 8.14 (1H, s, H-1), 8.40 (1H, s, H-4);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, cpd,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 24.9, 66.0, 108.5, 112.4, 119.3, 121.9, 122.7, 123.9, 129.4, 129.6, 136.6, 146.4, 154.0, 158.5;  $R_f$  (Ethylacetat/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:2 v/v): 0.6; HRMS (ESI+): berechnet für  $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_4$ : 257.0688, gefunden: 257.0688

### Darstellung von 1-(3-Nitrodibenzofuran-2-yl)ethanon (70)



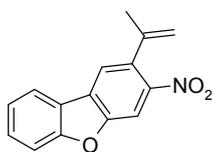
$\text{C}_{14}\text{H}_9\text{NO}_4$

255.23 g/mol

Die Darstellung erfolgte nach Literaturvorschrift.<sup>[7]</sup> 3.6 g **71** und 1 g (12 mmol)  $\text{NaHCO}_3$  werden in 100 mL DMSO gelöst und bei 70 °C unter Rückflusskühlung für 4 h erhitzt. Hierbei färbt sich die anfänglich gelbe Lösung braun. Der Reaktionsverlauf wird mittels DC kontrolliert (Cyclohexan/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:2 v/v). Man gießt die Reaktionslösung auf 220 mL Eiswasser und filtriert den ausgefallenen Feststoff ab. Der Filterkuchen wird mit kaltem Wasser gewaschen und anschließend im Hochvakuum getrocknet. Man erhält 2.1 g (8.2 mmol, 73.3 %) Produkt als gelben Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 2.63 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 7.47 (1H, m, H-8), 7.59-7.70 (2H, m, H-7, H-5), 7.99 (1H, s, H-1), 8.14 (1H, d,  $J_1$  = 7.9, H-9), 8.30 (1H, s, H-4);  $R_f$  (Cyclohexan/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:2 v/v): 0.24

### Darstellung von 2-Propenyl-3-nitrodibenzofuran (69)



$\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}_3$

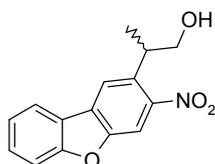
253.26 g/mol

Unter Argonatmosphäre werden 0.9 g (2.5 mmol) Methyltriphenylphosphoniumbromid in 10 ml wasserfreiem THF suspendiert. Unter Eisbadkühlung gibt man tropfenweise 2.5 mL (2.5 mmol)  $\text{NaHMDS}$  (1M in THF) zu und rührt anschließend 15 min bei RT. Zu der gelben Suspension werden nun unter Eisbadkühlung 0.5 g (1.9 mmol) **70** zugegeben. Es wird 30 min bei RT gerührt und anschließend 3 h unter Rückflusskühlung bei 80 °C erhitzt. Man lässt über Nacht auf RT kommen und quencht die Reaktionslösung mit  $\text{H}_2\text{O}$ . Anschließend wird mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert und die

vereinigten organischen Phasen über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Säulenchromatographische Aufreinigung (Cyclohexan/Ethylacetat 9:1 v/v) liefert 212 mg (0.8 mmol, 42.1 %) eines dunklen Öls.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 2.17$  (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 5.02 (1H, s,  $\text{CH}_2$ ), 5.25 (1H, m,  $\text{CH}_2$ ), 7.42 (1H, m, H-8), 7.54-7.65 (2H, m, H-6, H-7), 7.85 (1H, s, H-1), 7.99 (1H, d,  $J_1 = 7.5$ , H-9), 8.14 (1H, s, H-4);  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, cpd,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 24.0$ , 108.5, 112.4, 115.6, 121.8, 122.1, 122.7, 123.9, 128.6, 129.5, 134.8, 143.6, 146.8, 154.2, 158.5;  $R_f$  (Cyclohexan/Ethylacetat 9:1 v/v): 0.6; MS(ESI+): 253.7  $[\text{M}+\text{H}]^+$

### Darstellung von 2-(3-Nitrodibenzofuran-2-yl)propan-1-ol (hNDBF-OH) (68)



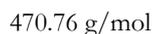
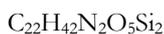
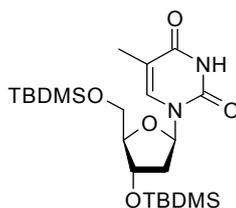
$\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}_4$

271.18 g/mol

Unter Argonatmosphäre werden 3.9 g (15.4 mmol) **69** in 100 mL wasserfreiem THF vorgelegt. Man kühlt im Eisbad ab und gibt dann via Kanüle 1.75 mL (18.4 mmol)  $\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{S}$  hinzu. Es wird über Nacht bei RT gerührt. Der Reaktionsverlauf wird mittels DC überprüft (Cyclohexan/Ethylacetat 9:1) und man gibt so oft Boranreagenz hinzu, bis kein Edukt mehr vorhanden ist. Es werden vorsichtig unter Eisbadkühlung (Schaumbildung) erst 64 mL NaOH (10 %ig) und anschließend 3.2 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 %ig) zugegeben. Man lässt 30 min bei RT rühren und extrahiert anschließend mit Ethylacetat, wäscht die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung und trocknet über  $\text{MgSO}_4$ . Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v), man erhält 1.3 g (4.8 mmol, 31.1 %) eines gelben Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.44$  (3H, d,  $J_1 = 6.9$ ,  $\text{CH}_3$ ), 1.74 (1H, bs, OH), 3.66 (1H, tq,  $J_1 = 6.7$ , CH), 3.86 (2H, d,  $J_1 = 6.3$ ,  $\text{CH}_2$ ), 7.38-7.44 (1H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.53-7.62 (2H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 8.0-8.02 (3H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, cpd,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 18.3, 36.6, 68.3, 108.4, 112.3, 119.9, 121.7, 122.7, 123.8, 128.6, 129.3, 133.3, 149.2, 153.5, 158.3;  $R_f$  (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v): 0.57; HRMS (ESI+): berechnet für  $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{Na}$ : 294.0737, gefunden: 294.0736

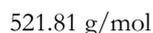
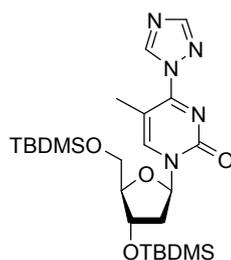
### Darstellung von 3'-5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)thymidin-2'-desoxythymidin (**101**)



10 g (41 mmol) 2'-Desoxythymidin, 19.8 g (291 mmol) Imidazol und 25 g (165 mmol) TBDMS-Cl werden unter Argonatmosphäre in 25 mL wasserfreiem DMF gelöst. Man lässt 1.5 h rühren, anschließend quencht man mit 100 mL EtOH. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird in EtOAc aufgenommen und nacheinander mit H<sub>2</sub>O, 1 M HCl, ges. NaHCO<sub>3</sub> und ges. NaCl gewaschen. Man trocknet die organische Phase über MgSO<sub>4</sub> und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Man erhält 19.4 g (41 mmol, quantitativ) weißen Feststoff.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.08 (6H, s, CH<sub>3</sub> TBDMS), 0.11 (6H, s, CH<sub>3</sub> TBDMS), 0.89 (9H, s, *t*-Bu), 0.93 (9H, s, *t*-Bu), 1.91 (3H, s, CH<sub>3</sub> C-5), 1.99 (1H, m, H-2'), 2.25 (1H, m, H-2'), 3.76 (1H, m, H-5'), 3.87 (1H, m, H-5'), 3.93 (1H, m, H-4'), 4.41 (1H, m, H-3'), 6.32 (1H, m, H-1'), 7.46 (1H, s, H-6), 8.33 (1H, s, NH)

### Darstellung von 4-(1,2,4-Triazol-1-yl)-3'-5'-bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxythymidin (**102**)

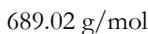
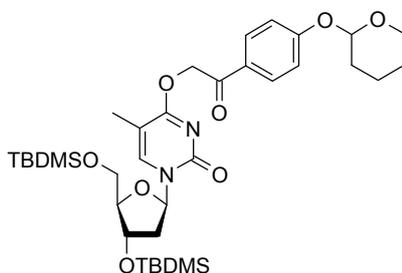


Die Darstellung erfolgte nach Literaturvorschrift.<sup>[157]</sup> 31 g (448 mmol) 1,2,4-Triazol werden unter Argonatmosphäre in 400 mL MeCN suspendiert und im Eisbad auf 4°C gekühlt. Man gibt 10.2 mL (112 mmol) POCl<sub>3</sub> langsam via Kanüle hinzu, hierbei bildet sich ein schneeweißer Niederschlag. Nach beendeter Zugabe erfolgt das Zutropfen von 63 mL (448 mmol) NEt<sub>3</sub>. Es wird für 1 h gerührt. Nun werden 10.6 g (22.5 mmol) **101** in 150 mL MeCN gelöst und über einen Zeitraum von 1 h kontinuierlich zugetropft. Man lässt für eine weitere Stunde rühren, anschließend wird der

Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer eingengt und in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. Man wäscht mit ges.  $\text{NaHCO}_3$  und ges.  $\text{NaCl}$  und trocknet die organische Phase über  $\text{MgSO}_4$ . Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und man erhält 11.7 g (22.4 mmol, quantitativ) gelben Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.05\text{-}0.1$  (12H, 4s,  $\text{CH}_3$  TBDMS), 0.88-0.89 (18H, 2s,  $\text{CH}_3$  *t*-Bu), 2.02-2.08 (1H, m, H-2'), 2.42 (3H, d,  $J_1 = 0.6$ ,  $\text{CH}_3$ ), 2.62 (1H, m, H-2'), 3.78 (1H, m, H-5'), 3.94 (1H, m, H-5'), 4.04 (1H, m, H-3'), 4.38 (1H, m, H-4'), 6.26 (1H, t,  $J_1 = 6.3$ , H-1'), 8.08 (1H, s,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 8.23 (1H, d,  $J_1 = 0.6$ , H-6), 9.26 (1H, s,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ );  $R_f$  (Cyclohexan/Aceton): 0.5

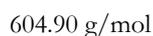
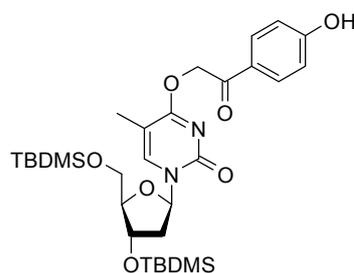
### Darstellung von 3'-5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-O<sup>4</sup>-[2-(4-tetrahydropyran-2-yloxyphenyl)ethan-2-onyl]-2'-desoxythymidin (103)



Die Darstellung des pHP-geschützten Desoxythymidins **103** erfolgte wie in der Diplomarbeit von M. Buff beschrieben.<sup>[160]</sup> 3.3 g (6.3 mmol) **102** werden unter Argonatmosphäre zusammen mit 3 g (12.7 mmol) **57** in 70 mL MeCN gelöst. Man gibt 1.9 mL (12.7 mmol) DBU hinzu und lässt die gelbe Lösung für 2 h rühren. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (Chloroform/Ethylacetat 9:1 + 1%  $\text{NEt}_3$  v/v) aufgereinigt. Man erhält 2.1 g (3 mmol, 47.6 %) hellgelben Nukleosidschaum.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 0.06\text{-}0.13$  (12H, 4s,  $\text{CH}_3$  TBDMS), 0.88-0.95 (18H, 2s,  $\text{CH}_3$  *t*-Bu), 1.49-1.91 (6H, m,  $\text{CH}_2$  THP), 1.96-2.05 (1H, m, H-2'), 2.06 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 2.41-2.48 (1H, m, H-2'), 3.59-3.98 (5H, m, H-4', H-5',  $\text{CH}_2$  THP), 4.38 (1H, H-3'), 5.52 (1H, m, CH THP), 5.57-5.80 (2H, m,  $\text{CH}_2$  PHP), 6.29 (1H, t,  $J_1 = 6.2$ , H-1'), 7.09 (2H, d,  $J_1 = 8.8$ ,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.82 (1H, s, H-6), 7.89 (2H, d,  $J_1 = 8.8$ ,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ );  $R_f$  (Chloroform/Ethylacetat + 1 %  $\text{NEt}_3$  v/v): 0.49

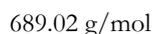
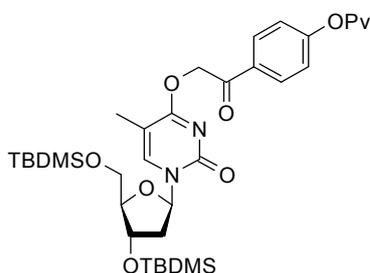
**Darstellung von 3'-5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-O<sup>4</sup>-[2-(hydroxyphenyl)ethan-2-onyl]-2'-desoxythymidin (104)**



1.34 g (1.95 mmol) **103** werden in 28 mL THF/MeOH 3:1 v/v gelöst. Man gibt 0.55 g (2.9 mmol) *p*-TsOH hinzu und lässt für 20 min rühren. Anschließend wird die Reaktion mit ges. NaCl versetzt. Es wird mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaHCO<sub>3</sub> gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Man entfernt das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Es erfolgt eine säulenchromatographische Aufreinigung (Chloroform/Ethylacetat 4:1 v/v) welche 0.64 g (1 mmol, 51 %) hellgelben Nucleosidschaum liefert.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.06-0.14 (12H, 4s, CH<sub>3</sub> TBDMS), 0.88-0.94 (18H, 2s, CH<sub>3</sub> *t*-Bu), 1.99-2.09 (1H, m, H-2'), 2.09 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 2.42-2.50 (1H, m, H-2'), 3.76-4.00 (3H, m, H-4', H-5'), 4.39 (1H, H-3'), 5.48-5.67 (2H, m, CH<sub>2</sub> PHP), 6.29 (1H, t, *J*<sub>1</sub> = 8.3, H-1'), 6.76 (2H, d, *J*<sub>1</sub> = 11.2, CH<sub>ar</sub>), 7.49 (2H, d, *J*<sub>1</sub> = 11.2, CH<sub>ar</sub>), 7.92 (1H, s, H-6); R<sub>f</sub> (Chloroform/Ethylacetat v/v): 0.42

**Darstellung von 3'-5'-Bis-O-(*tert*butyldimethylsilyl)-O<sup>4</sup>-[2-(4-Pivaloylphenyl)-ethan-2-onyl]-2'-desoxythymidin (105)**

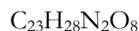
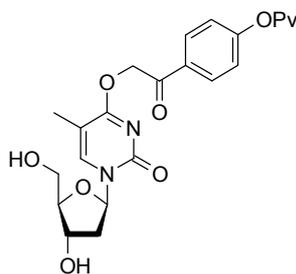


2.4 g (4 mmol) **104** werden unter Argonatmosphäre in 10 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> vorgelegt. Man fügt 1 mL Pyridin und 1 mL (9 mmol) Pivaloylchlorid hinzu. Es wird für 16 h gerührt, anschließend verdünnt man die Reaktionslösung mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, wäscht mit H<sub>2</sub>O sowie ges. NaCl und trocknet über MgSO<sub>4</sub>.

Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (5 % Ethylacetat in Chloroform v/v) erhält man 2.1 g (3 mmol, 75 %) weißen Nukleosidschaum.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.06-0.14 (12H, 4s,  $\text{CH}_3$  TBDMS), 0.88-0.93 (18H, 2s,  $\text{CH}_3$  *t*-Bu), 1.37 (9H, s,  $\text{CH}_3$  *t*-Bu Pv); 1.91-2.07 (1H, m, H-2'), 2.07 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 2.41-2.49 (1H, m, H-2'), 3.75-3.98 (3H, m, H-4', H-5'), 4.38 (1H, H-3'), 5.61-5.82 (2H, m,  $\text{CH}_2$  PHP), 6.29 (1H, t,  $J_1$  = 8.4, H-1'), 7.19 (2H, d,  $J_1$  = 11.6,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.83 (1H, s, H-6), 7.98 (2H, d,  $J_1$  = 11.6,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ );  $R_f$  (5 % Ethylacetat in Chloroform v/v): 0.37; HRMS (ESI+): berechnet für  $\text{C}_{35}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{O}_8\text{Si}_2$ : 689.3648, gefunden: 689.3658

### Darstellung von **O<sup>4</sup>-[2-(4-Pivaloylphenyl)-ethan-2-onyl]-2'-desoxythymidin (106)**

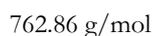
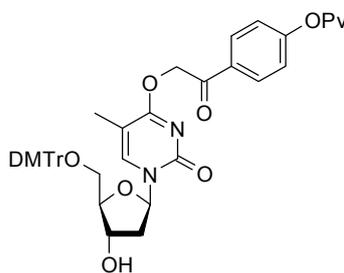


460.49 g/mol

1 g (1.5 mmol) **105** werden in 5 mL THF vorgelegt. Man gibt 1 mL Eisessig hinzu, rührt für 10 min bei RT und versetzt die Lösung anschließend mit 5 mL (5 mmol) 1 M TBAF in THF. Es wird über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Gradient: 5-10 % MeOH in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  v/v). Man erhält 0.68 g (1.5 mmol, quantitativ) weißen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$  (250 MHz,  $\text{d}_4$ -MeOH):  $\delta$  = 1.37 (9H, s,  $\text{CH}_3$  *t*-Bu), 2.09 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 2.09-2.21 (1H, m, H-2'), 2.36-2.45 (1H, m, H-2'), 3.8 (2H, m, H-5'), 3.96 (1H, m, H-3'), 4.38 (1H, m, H-4'), 5.8 (2H, m,  $\text{CH}_2$  pHP), 6.21 (1H, t,  $J_1$  = 6.3, H-1'), 7.25 (2H, d,  $J_1$  = 8.7,  $\text{CH}_{\text{ar}}$  pHP), 8.07 (2H, d,  $J_1$  = 7.9,  $\text{CH}_{\text{ar}}$  pHP), 8.23 (1H, s, H-6);  $^{13}\text{C-NMR}$  (62.5 MHz, cpd,  $\text{d}_4$ -MeOH)  $\delta$  = 12.2, 27.4, 40.2, 42.3, 62.5, 69.6, 71.6, 88.1, 89.2, 106.5, 123.3, 130.7, 133.2, 142.9, 157.0, 157.8, 170.9, 177.9, 193.3;  $R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1 v/v): 0.62; HRMS (ESI+): berechnet für  $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}$ : 483.1738, gefunden: 483.1739

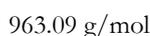
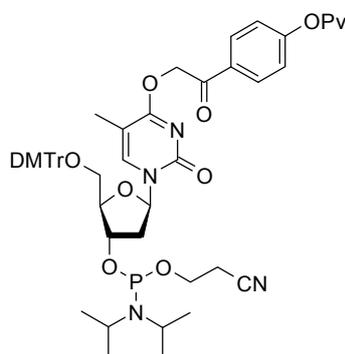
Darstellung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-O<sup>4</sup>-[2-(4-pivaloylphenyl)-ethan-2-onyl]-2'-desoxythymidin (107)



0.63 g (1.4 mmol) **106** werden unter Argonatmosphäre in 20 mL wasserfreiem Pyridin gelöst. Die Lösung wird im Eisbad abgekühlt, dann gibt man 0.55 g (1.6 mmol) DMTr-Cl hinzu und lässt unter Rühren über Nacht auf RT kommen. Man quencht die Reaktion mit EtOH und entfernt das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Der Rückstand wird in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> aufgenommen und mit 5 %iger Zitronensäure und ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen. Man trocknet über MgSO<sub>4</sub>, entfernt das Lösungsmittel und reinigt das Rohprodukt säulenchromatographisch (Gradient: 1-4 % MeOH in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> + 1% NEt<sub>3</sub> v/v) auf. Isoliert werden 0.72 g (0.95 mmol, 67.8 %) Produkt als weißer Nukleosidschaum.

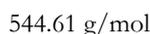
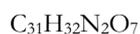
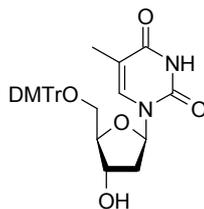
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, d<sub>4</sub>-MeOH): δ = 1.37 (9H, s, CH<sub>3</sub> *t*-Bu), 1.62 (3H, d, *J*<sub>1</sub> = 0.7, CH<sub>3</sub>), 2.24-2.53 (2H, m, H-2'), 3.51 (2H, m, H-5'), 3.78 (6H, s, OCH<sub>3</sub> DMTr), 4.08 (1H, m, H-4'), 4.51 (1H, m, H-3'), 5.78 (2H, m, CH<sub>2</sub> pHP), 6.22 (1H, t, *J*<sub>1</sub> = 6.2, H-1'), 6.88 (4H, d, *J*<sub>1</sub> = 8.7, CH<sub>ar</sub> DMTr), 7.23-7.45 (11H, m, CH<sub>ar</sub> pHP, DMTr), 8.06 (2H, d, *J*<sub>1</sub> = 8.8, CH<sub>ar</sub> pHP), 8.10 (1H, s, H-6); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, cpd, d<sub>4</sub>-MeOH) δ = 10.7, 27.4, 40.2, 42.6, 55.8, 64.4, 72.1, 88.1, 88.2, 88.2, 106.5, 114.3, 123.3, 128.1, 129.0, 129.4, 130.7, 131.4, 133.2, 136.9, 137.0, 142.3, 146.0, 157.0, 157.7, 160.3, 160.4, 171.5, 177.8, 193.5; R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 98:2 v/v): 0.29; HRMS (ESI): berechnet für C<sub>44</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>: 761.3080, gefunden: 761.3060

**Darstellung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-O<sup>4</sup>-[2-(4-pivaloylphenyl)-ethan-2-onyl]-2'-desoxythymidin-3'-O-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)phosphoramidit (dT<sup>pHP</sup>) (92)**



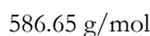
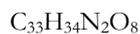
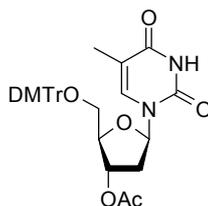
Unter Argonatmosphäre werden zu 0.12 g (0.16 mmol) **107** gelöst in 10 mL wasserfreiem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  0.14 mL (0.8 mmol) DIPEA gegeben. Nachdem 15 min bei RT gerührt wurde gibt man 70  $\mu\text{L}$  (0.32 mmol) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit hinzu und lässt über Nacht bei RT rühren. Der Reaktionsverlauf wird mittels DC kontrolliert (Cyclohexan/Aceton 1:1), wenn notwendig werden weitere Äquivalente an Base und Amidierungsreagenz zugeben bis kein Edukt mehr vorhanden ist. Die Reaktion wird mit ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gequench und die wässrige Phase mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert. Die organische Phase wird mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Aceton 2:1 + 1 %  $\text{NEt}_3$  v/v). Man erhält 90 mg (0.09 mmol, 60.3 %) weißen Nukleosidschaum.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta = 0.97$ -1.14 (12H, m,  $\text{CH}_3$  *i*-Pr), 1.33 (9H, s,  $\text{CH}_3$  *t*-Bu), 1.6 (3H, 2s,  $\text{CH}_3$ ), 2.28-2.45 (2H, m, H-2'), 2.64 (1H, t,  $J_1 = 5.8$ ,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ), 2.75 (1H, t,  $J_1 = 5.8$ ,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ), 3.26-3.29 (2H, m, H-5'), 3.46-3.72 (4H, m,  $\text{OCH}_2$ , CH *i*-Pr), 3.74 (6H, 2s,  $\text{OCH}_3$  DMTr), 4.05-4.11 (1H, m, H-4'), 4.55 (1H, m, H-3'), 5.80 (2H, m,  $\text{CH}_2$  pHP), 6.15 (1H, m, H-1'), 6.88-6.93 (4H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$  DMTr), 7.23-7.42 (11H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$  pHP, DMTr), 7.91-7.94 (1H, 2s, H-6), 8.06 (2H, d,  $J_1 = 8.7$ ,  $\text{CH}_{\text{ar}}$  pHP);  $^{31}\text{P-NMR}$  (161 MHz, cpd,  $d_6$ -DMSO)  $\delta = 147.3$ , 147.6;  $R_f$ (Cyclohexan/Aceton 1:1 v/v): 0.74

**Darstellung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-desoxythymidin (96)**

4 g (16.5 mmol) 2'-Desoxythymidin werden in 80 mL Pyridin gelöst, man gibt 7.1 g DMTr-Cl (21 mmol) unter Argonstrom hinzu. Die gelbe Reaktionslösung lässt man für 4 h rühren, dann quencht man mit 20 mL Ethanol und lässt weitere 15 min rühren. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 300 ml EtOAc aufgenommen. Anschließend wäscht man die organische Phase mit 300 mL ges.  $\text{NaHCO}_3$  sowie 300 mL ges.  $\text{NaCl}$ . Man trocknet die Lösung über  $\text{MgSO}_4$  und entfernt das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Als Produkt erhält man 9 g (16.5 mmol, quantitativ) gelben Nukleosidschaum, welcher unaufgereinigt weiterverwendet wird.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta = 1.45$  (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 2.09 – 2.32 (2H, m, H-2'), 3.14 – 3.26 (2H, m, H-5'), 3.74 (6H, s,  $\text{OCH}_3$  DMTr), 3.90 (1H, m, H-4'), 4.33 (1H, m, H-3'), 5.38 (1H, d,  $J_1 = 8.2$ , OH), 6.21 (1H, t,  $J_1 = 6.8$ , H-1'), 6.80 – 6.90 (4H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.24 – 7.41 (9H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.52 (m, 1 H, H-6), 11.34 (s, 1 H, NH);  $R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Methanol}$  19:1 v/v): 0.37

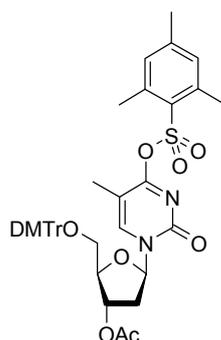
**Darstellung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-desoxy-3'-acetylthymidin (97)**

9 g (16.5 mmol) **96** und 0.2 g DMAP (1.65 mmol) werden unter Argonatmosphäre in 60 ml abs. Pyridin gelöst. Man gibt 2.34 mL Essigsäureanhydrid (24.8 mmol) hinzu und lässt die gelbe Lösung für 2 h rühren. Anschließend wird mit 2 mL MeOH gequencht und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  aufgenommen und mit 5 %-iger Zitronensäure,  $\text{H}_2\text{O}$  und ges.  $\text{NaHCO}_3$  gewaschen. Man trocknet über  $\text{MgSO}_4$  und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt (2%

Methanol in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 + 1\% \text{NEt}_3$  v/v). Man erhält 8.8 g (15.4 mmol, 93,3 %) schwach rosa Nukleosidschaum.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta = 1.44$  (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 2.00 (3H, s,  $\text{CH}_3$  Acetyl), 2.30 – 2.40 (2H, m, H-2'), 3.40 – 3.50 (2H, m, H-5'), 3.75 (6H, s,  $\text{OCH}_3$  DMTr), 4.05 (1H, m, H-4'), 5.43 (1H, m, H-3'), 6.25 (1H, m, H-1'), 6.80 – 6.90 (4H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.30 – 7.40 (9H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.60 (m, 1 H, H-6), 11.40 (s, 1 H, NH);  $R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /Methanol 98:2 v/v + 1 %  $\text{NEt}_3$ ): 0.26

**Darstellung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-O<sup>4</sup>-(2,4,6-trimethylbenzonsulfonyloxy)-2'-desoxy-3'-acetylthymidin (98)**



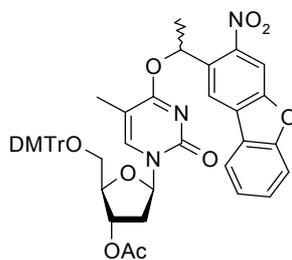
$\text{C}_{42}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{S}$

768.89 g/mol

2 g (3.4 mmol) **97** werden zusammen mit 40 mg (0.34 mmol) DMAP und 2.4 mL  $\text{NEt}_3$  (17 mmol) unter Argonatmosphäre in 5 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. Man gibt 1.1 g (5.1 mmol) Mesitylsulfonylchlorid hinzu und lässt für 3 h rühren. Anschließend wird die rote Lösung mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  verdünnt, mit ges.  $\text{NaHCO}_3$  gewaschen und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /Ethylacetat 9:1 + 1 %  $\text{NEt}_3$  v/v) aufgereinigt. Man erhält 2 g (2.6 mmol, 76.5 %) rosa Nukleosidschaum.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta = 1.60$  (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 2.00 (3H, s,  $\text{CH}_3$  Acetyl), 2.30 (3H, s,  $\text{CH}_3$  Mesityl), 2.47 (2H, m, H-2'), 2.60 (6H, s,  $\text{CH}_3$  Mesityl), 3.30 – 3.40 (2H, m, H-5'), 3.75 (6H, s,  $\text{OCH}_3$  DMTr), 4.15 (1H, m, H-4'), 5.35 (1H, m, H-3'), 6.05 (1H, m, H-1'), 6.80 – 6.90 (4H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.30 – 7.40 (11H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.60 (m, 1 H, H-6);  $R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /Ethylacetat 9:1): 0.50

Darstellung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-O<sup>4</sup>-[1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethyl]-2'-desoxy-3'-acetylthymidin (99)



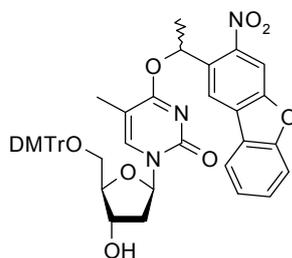
C<sub>47</sub>H<sub>44</sub>N<sub>3</sub>O<sub>11</sub>

826.87 g/mol

1.15 g (1.8 mmol) **98**, 0.77 g (3 mmol) 1-(3-Nitrodibenzofuran-2-yl)ethanol und 0.42 mL NEt<sub>3</sub> (3 mmol) werden unter Argonatmosphäre in 20 mL wasserfreiem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. Man fügt 18 mg (0.15 mmol) DMAP hinzu und lässt 5 d bei RT rühren. Die Reaktionsmischung wird mit ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Man entfernt das CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> am Rotationsverdampfer und reinigt das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Ethylacetat 9:1 + 1 % NEt<sub>3</sub> v/v) auf. Es werden 1 g (1.2 mmol, 80 %) weißer Nukleosidschaum erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>3</sub>-MeCN): δ = 1.71 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.97 (3H, d, J<sub>1</sub> = 6.4, CH<sub>3</sub> DBF), 1.97-1.99 (3H, 2s, CH<sub>3</sub> Ac), 2.28-2.50 (2H, m, H-2'), 3.26-3.35 (2H, m, H-5'), 3.73 (6H, m, OCH<sub>3</sub> DMTr), 4.07 (1H, m, H-4'), 5.22-5.33 (1H, m, H-3'), 6.10-6.17 (1H, m, H-1'), 6.67 (1H, m, CH DBF), 6.81-6.84 (4H, m, CH<sub>ar</sub> DMTr), 7.15-7.42 (10H, m, CH<sub>ar</sub> DMTr, DBF), 7.54-7.62 (2H, m, CH<sub>ar</sub> DBF), 7.76 (1H, 2s, H-6), 8.07 (1H, m, CH<sub>ar</sub> DBF), 8.15 (1H, s, CH<sub>ar</sub> DBF), 8.33 (1H, 2s, CH<sub>ar</sub> DBF); <sup>13</sup>C-NMR (62.5 MHz, cpd, d<sub>4</sub>-MeCN) δ = 12.2, 21.1, 22.5, 25.6, 39.1, 39.2, 55.9, 64.4, 65.9, 71.1, 71.2, 75.7, 85.0, 86.9, 87.0, 87.6, 105.2, 109.2, 112.9, 112.9, 114.1, 120.6, 120.7, 123.1, 123.2, 123.3, 124.8, 124.9, 127.9, 128.0, 128.9, 129.0, 129.9, 130.6, 131.0, 131.0, 134.0, 136.5, 136.5, 136.6, 136.7, 141.4, 141.4, 145.8, 145.8, 147.8, 147.8, 154.8, 155.7, 155.7, 159.1, 159.8, 170.3, 171.2, 171.2; R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Ethylacetat 9:1 + 1 % NEt<sub>3</sub> v/v): 0.35; HRMS (MALDI): berechnet für C<sub>47</sub>H<sub>44</sub>N<sub>3</sub>O<sub>11</sub>: 826.2976, gefunden: 826.2980

**Darstellung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-O<sup>4</sup>-[1-(3-nitrodibenzofuran-2-yl)ethyl]thymidin (100)**



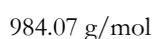
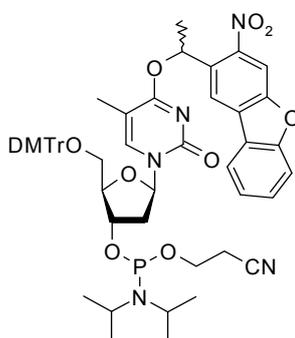
$C_{45}H_{41}N_3O_{10}$

783.82 g/mol

Zu 0.8 g (1 mmol) **99** werden 4 mL  $MeNH_2$  (40 %ig in EtOH) gegeben, man lässt 3 h bei RT rühren. Man entfernt das EtOH am Rotationsverdampfer und reinigt das Rohprodukt säulenchromatographisch (Gradient Ethylacetat in  $CH_2Cl_2$  1:9  $\rightarrow$  1:1 + 1 %  $NEt_3$  v/v) auf. Man erhält 0.41 g (0.52 mmol, 52 %) grünen Nucleosidschaum.

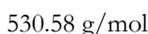
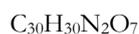
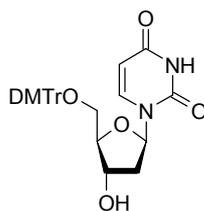
$^1H$ -NMR (250 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  = 1.67 (3H, 2s,  $CH_3$ ), 1.80 (3H, d,  $J_1$  = 6.4,  $CH_3$  DBF), 2.02-2.32 (2H, m, H-2'), 3.20 (2H, m, H-5'), 3.72 (6H, s,  $OCH_3$  DMTr), 3.90 (1H, m, H-3'), 4.20-4.32 (1H, m, H-4'), 5.30 (1H, m, OH), 6.11 (1H, 2t,  $J_1$  = 5.3, H-1'), 6.60 (1H, q,  $J_1$  = 6.4, CH DBF), 6.86-6.90 (4H, m,  $CH_{ar}$  DMTr), 7.18-7.37 (9H, m,  $CH_{ar}$  DMTr), 7.45-7.54 (1H, m,  $CH_{ar}$  DBF), 7.66 (1H, m,  $CH_{ar}$  DBF), 7.78-7.82 (2H, m, H-6,  $CH_{ar}$  DBF), 8.34-8.38 (1H, m,  $CH_{ar}$  DBF), 8.43 (1H, 2s,  $CH_{ar}$  DBF), 8.53-8.57 (1H, 2s,  $CH_{ar}$  DBF);  $^{13}C$ -NMR (75 MHz, cpd,  $d_6$ -DMSO)  $\delta$  = 11.4, 14.0, 21.7, 21.8, 55.0, 63.4, 69.7, 69.8, 70.1, 70.2, 85.4, 85.6, 85.8, 85.9, 85.9, 103.2, 103.2, 108.4, 112.1, 113.2, 119.9, 120.0, 121.9, 121.9, 122.7, 124.0, 126.7, 127.6, 127.8, 128.3, 129.7, 129.8, 132.1, 132.1, 135.2, 135.2, 135.4, 135.4, 140.8, 144.6, 144.7, 146.6, 146.7, 153.3, 154.0, 154.0, 157.6, 158.1, 168.5;  $R_f$  ( $CH_2Cl_2$ /Ethylacetat 4:1 + 1 %  $NEt_3$  v/v): 0.25; HRMS (ESI+): berechnet für  $C_{51}H_{57}N_4O_{10}$ : 885.4069, gefunden: 885.4073 (+ $HNEt_3$  Addukt)

**Darstellung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-O<sup>4</sup>-[1-(3-nitrodibenzofuran-1-yl)ethyl]thymidin-3'-O-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)phosphoramidit (**dT<sup>NDBF</sup>**) (**91**)**



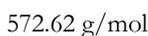
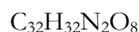
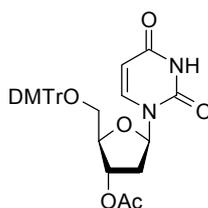
Unter Argonatmosphäre werden zu 90 mg (0.12 mmol) **100** gelöst in 8 mL wasserfreiem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  0.1 mL (0.58 mmol) DIPEA gegeben. Nachdem 15 min bei RT gerührt wurde gibt man 51  $\mu\text{L}$  (0.23 mmol) 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit hinzu und lässt über Nacht bei RT rühren. Der Reaktionsverlauf wird mittels DC kontrolliert (Cyclohexan/Aceton 1:1 v/v), wenn notwendig werden weitere Äquivalente an Base und Amidierungsreagenz zugeben bis kein Edukt mehr vorhanden ist. Die Reaktion wird mit ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung gequenchet, die wässrige Phase extrahiert man mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , die organische Phase wird mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Aceton 2:1 + 1 %  $\text{NEt}_3$  v/v). Man erhält 88 mg (0.09 mmol, 75 %) weißen Nukleosidschaum.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta = 0.93$ -1.16 (12H, m,  $\text{CH}_3$  *i*-Pr), 1.67 (3H, m,  $\text{CH}_3$ ), 1.80 (3H, d,  $J_1 = 6.3$ ,  $\text{CH}_3$  DBF), 2.16-2.42 (2H, m, H-2'), 2.58-2.80 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ), 3.20 (2H, m, H-5'), 3.42-3.70 (4H, m,  $\text{OCH}_2$ , CH *i*-Pr), 3.72 (6H, m,  $\text{OCH}_3$  DMTr), 4.00-4.07 (1H, m, H-3'), 4.40-4.56 (1H, m, H-4'), 6.03-6.15 (1H, m, H-1'), 6.59 (1H, m, CH DBF), 6.84-6.89 (4H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$  DMTr), 7.14-7.39 (9H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$  DMTr), 7.47-7.54 (1H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$  DBF), 7.64 (1H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$  DBF), 7.79-7.85 (2H, m, H-6,  $\text{CH}_{\text{ar}}$  DBF), 8.34-8.39 (1H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$  DBF), 8.44 (1H, 2s,  $\text{CH}_{\text{ar}}$  DBF), 8.54-8.57 (1H, 2s,  $\text{CH}_{\text{ar}}$  DBF);  $^{31}\text{P-NMR}$  (121 MHz, cpd,  $d_6$ -DMSO)  $\delta = 147.3$ , 147.4, 147.6, 147.6;  $R_f$  (Cyclohexan/Aceton 1:1 + 1 %  $\text{NEt}_3$  v/v): 0.6

**Darstellung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-desoxyuridin (151)**

Die Darstellung erfolgte nach Literaturvorschrift.<sup>[224]</sup> 5 g (22 mmol) 2'-Desoxyuridin werden unter Argonatmosphäre in 160 mL Pyridin gelöst. Man gibt 8.9 g (26.5 mmol) DMTr-Cl hinzu und lässt für 3 h rühren. Dann wird mit 25 mL EtOH gequench und man entfernt das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Der Rückstand wird in 300 mL EtOAc aufgenommen, die organische Phase mit insgesamt 600 ml ges.  $\text{NaHCO}_3$  sowie 300 mL ges.  $\text{NaCl}$  gewaschen und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Unter kräftigem Rühren werden 500 mL Hexan zugegeben, hierbei fällt das Produkt als heller Niederschlag aus. Man filtriert ab und trocknet den Filtrerrückstand im Vakuum. Man erhält 11.3 g (21.3 mmol, 96,8 %) weißen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta = 2.18$  (2H, m, H-2'), 3.15-3.25 (2H, m, H-5'), 3.73 (6H, s,  $\text{OCH}_3$  DMTr), 3.87 (1H, m, H-4'), 4.28 (1H, m, H-3'), 5.32 (1H, d,  $J_1 = 4.8$ , H-5), 5.37 (1H, dd,  $J_1 = 8.1$ ,  $J_2 = 2.3$ , 3'-OH), 6.14 (1H, t,  $J_1 = 6.5$ , H-1'), 6.87-6.90 (4H, m, CHar), 7.22-7.38 (9H, m, CHar), 7.63 (1H, d,  $J_1 = 8.2$ , H-6), 11.3 (1H, d,  $J_1 = 2.0$ , NH);  $R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /Methanol 19:1 + 1 %  $\text{NEt}_3$  v/v): 0.25

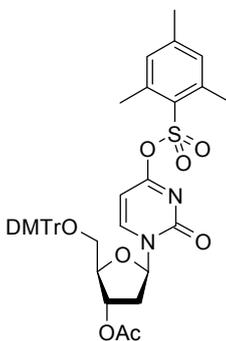
**Darstellung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-2'-desoxy-3'-acetyluridin (152)**

Die Synthese erfolgte nach Literaturangaben.<sup>[110]</sup> 10.3 g (19.3 mmol) **151** und 0.24 g (2 mmol) DMAP werden in 60 mL Pyridin gelöst. Man fügt 2.7 mL (29 mmol) Essigsäureanhydrid hinzu und lässt für 3 h rühren. Die Reaktion wird mit 2 mL MeOH gequench, anschließend entfernt man das Lösungsmittel im Vakuum. Der Rückstand wird in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  aufgenommen, mit 5%iger Zitronensäure,  $\text{H}_2\text{O}$  und ges.  $\text{NaHCO}_3$  gewaschen und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel

wird am Rotationsverdampfer entfernt und man erhält 11.6 g (19.3 mmol, quantitativ) hellgelben Nukleosidschaum.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  = 2.04 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 2.29-2.47 (2H, m, H-2'), 3.20-3.37 (2H, m, H-5'), 3.73 (6H, s,  $\text{OCH}_3$  DMTr), 4.07 (1H, m, H-4'), 5.25 (1H, m, H-3'), 5.45 (1H, d,  $J_1$  = 8.0, H-5), 6.15 (1H, m, H-1'), 6.88-7.39 (13H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.63 (1H, d,  $J_1$  = 8.0, H-6), 11.38 (1H, s, NH);  $R_f$  (2% Methanol in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  + 1 %  $\text{NEt}_3$  v/v): 0.24

**Darstellung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-O<sup>4</sup>-(2,4,6-trimethylbenzensusfonyloxy)-2'-desoxy-3'-O-acetyluridin (153)**



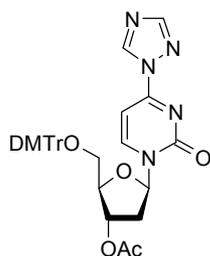
$\text{C}_{41}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{S}$

756.88 g/mol

1 g (1.8 mmol) **152** und 0.23 g (0.17 mmol) DMAP werden in 10 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  unter Argonatmosphäre gelöst. Anschließend fügt man 1.2 ml  $\text{NEt}_3$  (8.7 mmol) sowie 0.5 g (2.3 mmol) 2-Mesitylsulfonylchlorid hinzu. Es wird für 2 h gerührt. Die rote Lösung wird mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  verdünnt, mit ges.  $\text{NaHCO}_3$  gewaschen und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Man entfernt das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Gradient: 0-2 % MeOH in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  + 1 %  $\text{NEt}_3$  v/v). Als Produkt erhält man 0.75 g (1 mmol, 56 %) hellgelben Nukleosidschaum.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 2.06 (3H, s,  $\text{CH}_3$  Acetyl), 2.31 (3H, s,  $\text{CH}_3$  Mesityl), 2.23-2.42 (2H, m, H-2'), 2.73 (6H, s,  $\text{CH}_3$  Mesityl), 3.44 (2H, m, H-5'), 3.80 (6H, 2s,  $\text{OCH}_3$  DMTr), 4.23 (1H, m, H-4'), 5.33 (1H, m, H-3'), 5.47 (1H, d,  $J_1$  = 7.2, H-5), 6.14 (1H, t,  $J_1$  = 6.4, H-1'), 6.81-6.85 (4H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.00 (2H, s,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.21-7.34 (9H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 8.19 (1H, d,  $J_1$  = 7.2, H-6);  $R_f$  (2% Methanol in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  + 1 %  $\text{NEt}_3$  v/v): 0.6

**Darstellung von 4-Desoxy-4-(1,2,4-triazol-1-yl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxy-3'-O-acetyluridin (113)**



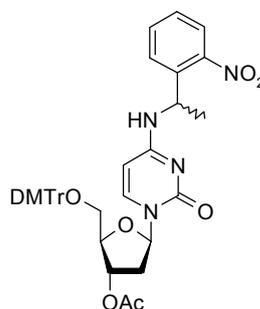
$C_{34}N_{34}N_5O_7$

624.68 g/mol

3.7 g (54 mmol) 1,2,4-Triazol werden unter Eisbadkühlung in 80 mL MeCN suspendiert. Man gibt unter starkem Rühren langsam 1.3 mL (14 mmol) POCl<sub>3</sub> mittels Kanüle hinzu, gefolgt von der tropfenweisen Zugabe von 7.5 mL (54 mmol) NEt<sub>3</sub>. Es bildet sich ein rein weißer Niederschlag. Es wird für 30 min bei 4°C gerührt, dann werden über einen Zeitraum von 20 min 3.1 g (5.4 mmol) des geschützten Uridins **152**, gelöst in 13 mL MeCN, langsam hinzu getropft. Man lässt für 16 h bei RT rühren. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Aceton 1:1 + 1 % NEt<sub>3</sub> v/v). Man erhält einen hellgelben Nukleosidschaum.

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 2.05 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 2.38-2.68 (2H, m, H-2'), 3.28-3.36 (2H, m, H-5'), 3.70 (6H, 2s, OCH<sub>3</sub>), 4.25 (1H, m, H-3'), 5.25 (1H, m, H-4'), 6.13 (1H, t, J<sub>1</sub> = 6.4, H-1'), 6.78 (1H, d, J<sub>1</sub> = 7.2, H-5), 6.86-7.34 (13H, m, CH<sub>ar</sub>), 8.38-8.43 (2H, m, H-4, CH<sub>ar</sub> Triazol), 9.45 (1H, s, CH<sub>ar</sub> Triazol); R<sub>f</sub>(Cyclohexan/Aceton 1:1 + 1 % NEt<sub>3</sub> v/v): 0.41 (blaue Fluoreszenz bei 366 nm)

**Darstellung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-N<sup>4</sup>-(1-(2-nitrophenyl)ethyl)-2'-desoxy-3'-acetylcytidin (154)**



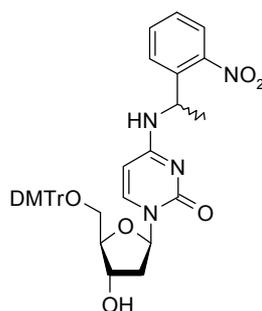
$C_{40}N_{40}N_4O_9$

720.79 g/mol

0.75 g (1 mmol) des aktivierten **153** werden unter Argonatmosphäre in 7 mL DMF gelöst. Über eine Kanüle werden 0.42 g (2.5 mmol) **150**, gelöst in 5 mL DMF, zugegeben. Man erhitzt unter Rückflusskühlung für 45 min auf 90°C. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> aufgenommen und mit 5 %iger Zitronensäure, H<sub>2</sub>O sowie ges. NaHCO<sub>3</sub> gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, dann entfernt man das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer und reinigt den Rückstand säulenchromatographisch auf (Ethylacetat + 1 % NEt<sub>3</sub> v/v). Man erhält 0.45 g (0.63 mmol, 62 %) hellgelben Nucleosidschaum.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 1.49 (3H, d, J<sub>1</sub> = 6.6, CH<sub>3</sub> NPE), 2.02 (3H, s, CH<sub>3</sub> Acetyl), 2.13-2.31 (2H, m, H-2'), 3.19-3.32 (2H, m H-5'), 3.75 (6H, s, OCH<sub>3</sub>), 4.05 (1H, m, H-4'), 5.20 (1H, m, H-3'), 5.52 (1H, m, CH NPE), 5.69 (1H, d, J<sub>1</sub> = 7.7, H-6), 6.09 (1H, m, H-1'), 6.87-7.38 (13H, m, CH<sub>ar</sub>), 7.47-7.76 (4H, CH<sub>ar</sub>), 7.93 (1H, d, J<sub>1</sub> = 7.8, H-5), 8.41 (1H, m, NH); R<sub>f</sub> (Ethylacetat + 1 % NEt<sub>3</sub> v/v): 0.17

### Darstellung von 3'-5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-N<sup>4</sup>-(1-(2-nitrophenyl)ethyl)-2'-desoxycytidin (155)



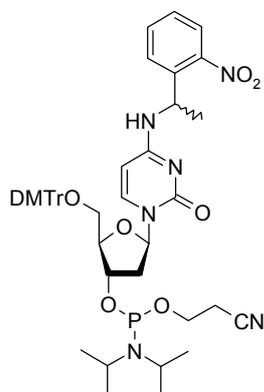
C<sub>38</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>

678.75 g/mol

0.43 g (0.59 mmol) **154** werden in 5 mL 33 % MeNH<sub>2</sub> in EtOH gelöst. Man lässt für 1 h rühren, anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Man reinigt säulenchromatographisch auf (2 % MeOH in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> + 1 % NEt<sub>3</sub> v/v) und erhält 0.4 g (0.59 mmol, quantitativ) hellgelben Nucleosidschaum.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 1.49 (3H, d, J<sub>1</sub> = 6.6, CH<sub>3</sub> NPE), 1.92-2.20 (2H, m, H-2'), 3.16-3.21 (2H, m H-5'), 3.75 (6H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.85 (1H, m, H-4'), 4.18-4.27 (1H, m, H-3'), 5.27 (1H, m, 3'-OH), 5.50 (1H, m, CH NPE), 5.65 (1H, m, H-6), 6.07 (1H, m, H-1'), 6.87-7.38 (13H, m, CH<sub>ar</sub>), 7.46-7.76 (4H, CH<sub>ar</sub>), 7.93 (1H, m, H-5), 8.35 (1H, m, NH); R<sub>f</sub> (4 % Methanol in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> + 1 % NEt<sub>3</sub> v/v): 0.16

**Darstellung von 3'-5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-N<sup>4</sup>-(1-(2-nitrophenyl)ethyl)-2'-desoxycytidin-3'-O-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)phosphoramidit (dC<sup>NPE</sup>) (156)**

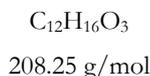
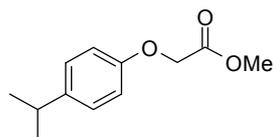


C<sub>47</sub>H<sub>55</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>P

878.97 g/mol

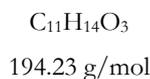
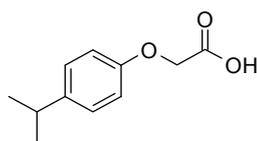
0.13 g (0.19 mmol) **155** werden in 4 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. Man gibt 146 µL (0.85 mmol) DIPEA hinzu, lässt für 10 min rühren und versetzt die Lösung dann mit 85 µL (0.38 mmol) 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit. Nachdem 1.5 h gerührt wurde verdünnt man mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und wäscht die organische Phase mit ges. NaHCO<sub>3</sub>. Es wird über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Man reinigt das Rohprodukt säulenchromatographisch auf (Cyclohexan/Aceton 2:1 + 1 % NEt<sub>3</sub> v/v). Die erzielte Ausbeute beträgt 115 mg (0.13 mmol, 68 %) an farblosem Nukleosidschaum.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 1.17 (6H, d, J<sub>1</sub> = 6.8, CH<sub>3</sub> *i*-Pr), 1.19 (6H, d, J<sub>1</sub> = 6.8, CH<sub>3</sub> *i*-Pr), 1.48 (3H, d, J<sub>1</sub> = 6.8, CH<sub>3</sub>), 2.06-2.37 (2H, m, H-2'), 2.63 (1H, t, J<sub>1</sub> = 5.8, CH<sub>2</sub>CN), 2.89 (1H, t, J<sub>1</sub> = 5.8, CH<sub>2</sub>CN), 3.24 (2H, m, H-5'), 3.39-3.60 (4H, m, CH *i*-Pr, OCH<sub>2</sub>), 3.74 (6H, 2s, OCH<sub>3</sub> DMTr), 3.96-4.09 (2H, m, H-4'), 4.47 (2H, m, H-3'), 5.51 (1H, m, CH NPE), 5.65-5.69 (1H, m, H-6), 6.03-6.13 (1H, m, H-1'), 6.86-6.91 (4H, m, CH<sub>ar</sub>), 7.22-7.36 (9H, m, CH<sub>ar</sub>), 7.50-7.75 (4H, m, CH<sub>ar</sub>), 7.93 (1H, m, H-5), 8.38 (1H, m, NH); <sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, cpd, d<sub>6</sub>-DMSO) δ = 148.5, 148.5, 148.9; R<sub>f</sub> (Cyclohexan/Aceton 1:1 + 1 % NEt<sub>3</sub> v/v): 0.38

**Darstellung von 2-(4-Isopropylphenoxy)essigsäuremethylester (157)**

Die Darstellung der *i*-PrPac-Schutzgruppe erfolgte nach Literaturangaben.<sup>[225]</sup> 5.9 g (147 mmol) NaH (60 %ig, phlegmatisiert) werden unter Argonatmosphäre in 120 mL THF suspendiert. Zu dieser Suspension tropft man vorsichtig 20 g (147 mmol) 4-Isopropylphenol gelöst in 160 mL THF. Die Suspension klärt auf, man lässt noch für 1.5 h rühren. Anschließend wird im Eisbad auf 4°C gekühlt und man gibt 14.4 mL (147 mmol) 2-Bromessigsäuremethylester tropfenweise hinzu. Es wird für 16 h gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und man nimmt den Rückstand in 150 mL H<sub>2</sub>O auf. Es wird mit Et<sub>2</sub>O extrahiert bis die organische Phase farblos bleibt und die vereinigten organischen Extrakte werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Man entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Das Rohprodukt wird mittels Vakuumdestillation aufgereinigt (6.5 mbar, Kopftemperatur: 130°C). Man erhält 29.6 g (142 mmol, 97 %) einer klaren Flüssigkeit.

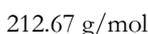
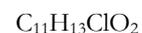
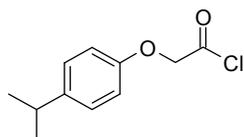
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.21 (6H, d, *J*<sub>1</sub> = 6.9, *i*-Pr), 2.85 (1H, sep, *J*<sub>1</sub> = 6.9, CH), 3.79 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4.60 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 6.83 (2H, d, *J*<sub>1</sub> = 8.6, CH<sub>ar</sub>), 7.14 (2H, d, *J*<sub>1</sub> = 8.5, CH<sub>ar</sub>)

**Darstellung von 2-(4-Isopropylphenoxy)essigsäure (158)**

4 g (170 mmol) LiOH werden in 200 mL H<sub>2</sub>O gelöst und zu 29.5 g (141 mmol) **157** in 300 ml 1,4-Dioxan gegeben. Man lässt für 13 h rühren und entfernt anschließend das Dioxan am Rotationsverdampfer. Der wässrige Rückstand wird mit 100 mL halbkonzentrierter HCl auf pH 1 gebracht, man extrahiert mit EtOAc und trocknet über MgSO<sub>4</sub>. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhält man 27.1 g (139.6 mmol, 98.4 %) eines voluminösen weißen Feststoffes.

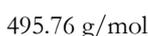
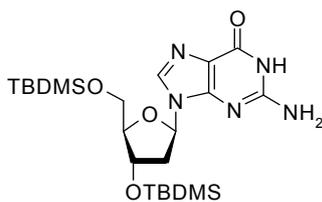
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ = 1.16 (6H, d, *J*<sub>1</sub> = 6.9, *i*-Pr), 2.82 (1H, sep, *J*<sub>1</sub> = 6.9, CH), 4.62 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 6.81 (2H, m, CH<sub>ar</sub>), 7.14 (2H, m, CH<sub>ar</sub>)

## Darstellung von 2-(4-Isopropylphenoxy)essigsäurechlorid (159)



5 g (25.7 mmol) **158** werden in 50 mL  $\text{SOCl}_2$  bei  $90^\circ\text{C}$  unter Rückflusskühlung für 16 h erhitzt. Man destilliert das überschüssige  $\text{SOCl}_2$  bei Normaldruck ab und erhält das Produkt durch Vakuumdestillation (1.2 mbar, Kopftemperatur:  $91^\circ\text{C}$ ). Die Ausbeute beträgt 5 g (23.5 mmol, 91.2 %) an einer schwach gelben Flüssigkeit.

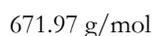
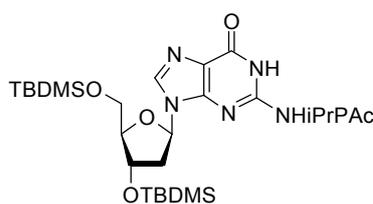
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta = 1.22$  (6H, d,  $J_1 = 6.9$ , *i*Pr), 2.87 (1H, sep,  $J_1 = 6.9$ , CH), 4.92 (2H, s,  $\text{CH}_2$ ), 6.83 (2H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.17 (2H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ )

Darstellung von 3'-5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-2'-desoxyguanosin (160)

Die Darstellung erfolgte nach Literaturangaben.<sup>[161]</sup> 5 g (18.6 mmol) 2'-Desoxyguanosin werden unter Argonatmosphäre zusammen mit 10.6 g (70.6 mmol) TBDMS-Cl und 8.3 g (122.5 mmol) Imidazol in 40 mL DMF gelöst. Man lässt für 36 h rühren und quencht die Reaktion anschließend mit 50 mL EtOH. Die Reaktionslösung wird im Eisbad gekühlt, hierbei fällt ein weißer Feststoff aus. Diesen filtriert man ab, wäscht mit kaltem EtOH und suspendiert ihn in EtOH. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Man erhält 6.1 g (12.3 mmol, 67 %) weißen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta = 0.04$ -0.10 (12H, 3s,  $\text{CH}_3$  *t*-Bu), 0.88 (18H, d,  $J_1 = 6.8$ , CH *t*-Bu), 2.21-2.26 (1H, m, H-2'), 2.64 (1H, m, H-2'), 3.61-3.71 (2H, H-5'), 3.80 (1H, m, H-4'), 4.48 (1H, m, H-3'), 6.10 (1H, m, H-1'), 6.47 (2H, s,  $\text{NH}_2$ ), 7.88 (1H, s, H-8), 10.60 (1H, s, NH);  $R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /Methanol 9:1 v/v): 0.59

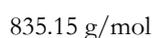
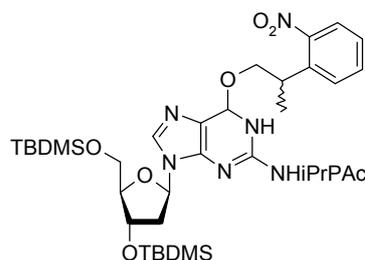
**Darstellung von 3'-5'- Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-N<sup>2</sup>-(4-isopropylphenoxyacetyl)-2'-desoxyguanosin (109)**



3 g (6 mmol) **160** werden unter Argonatmosphäre in 40 mL Pyridin gelöst und im Eisbad gekühlt. Zu der Lösung werden bei 4°C 1.9 g (9 mmol) **159** zugetropft. Anschließend lässt man 2 h unter Eisbadkühlung rühren, gefolgt von einer weiteren Stunde Rühren bei RT. Man stoppt die Reaktion mit 120 mL MeOH und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Säulenchromatographische Aufreinigung (Gradient Cyclohexan/Aceton 3:1 → 2:1 v/v) liefert 2.2 g (3.3 mmol, 54 %) hellgelben Feststoff.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0.05-0.09 (12H, 3s, CH<sub>3</sub> TBDMS), 0.88-0.90 (18H, 2s, *t*-Bu), 1.22 (6H, d, *J*<sub>1</sub> = 6.9, CH<sub>3</sub> *i*-Pr), 2.32-2.52 (2H, m, H-2'), 2.88 (1H, sep, *J*<sub>1</sub> = 6.9, CH *i*-Pr), 3.76 (2H, m, H-5'), 3.87 (1H, m, H-4'), 4.49 (1H, m, H-3'), 4.66 (2H, s, OCH<sub>2</sub>), 6.28 (1H, t, *J*<sub>1</sub> = 6.5, H-1'), 6.93 (2H, d, *J*<sub>1</sub> = 8.6, CH<sub>ar</sub>), 7.22 (2H, d, *J*<sub>1</sub> = 8.6, CH<sub>ar</sub>), 7.99 (1H, s, H-8), 9.06 (1H, s, NH), 11.75 (1H, bs, NH); R<sub>f</sub>(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Methanol 19:1 v/v): 0.33

**Darstellung von 3'-5'- Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-N<sup>2</sup>-(4-isopropylphenoxyacetyl)-O<sup>6</sup>-[2-(2-nitrophenyl)propyl]-2'-desoxyguanosin (161)**

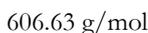
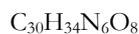
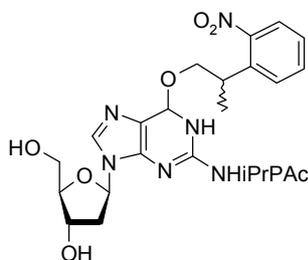


2 g (3 mmol) **160** werden unter Argonatmosphäre zusammen mit 0.8 g (4.5 mmol) **52** und 1.2 g (4.5 mmol) PPh<sub>3</sub> in 15 mL THF vorgelegt. Hierzu gibt man langsam via Kanüle 2 mL (4.5 mmol) 40 %ig DEAD in Toluol und lässt nach beendeter Zugabe für 16 h rühren. Die gelbe Lösung wird mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> verdünnt, mit H<sub>2</sub>O sowie mit ges. NaCl gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das

Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Gradient Cyclohexan/Ethylacetat 3:1 → 1:1 v/v). Man erhält 1.7 g (2 mmol, 69 %) gelben Nucleosidschaum.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.04-0.14 (12H, 3s,  $\text{CH}_3$  TBDMS), 0.91 (18H, 2s, *t*-Bu), 1.24 (6H, d,  $J_1$  = 6.9,  $\text{CH}_3$  *i*-Pr), 1.49-1.54 (3H, 2d,  $J_1$  = 7.0,  $\text{CH}_3$  NPP), 2.39-2.72 (2H, m, H-2'), 2.88 (1H, sep,  $J_1$  = 6.9, CH *i*-Pr), 3.74-3.89 (2H, m, H-5'), 3.95-4.04 (2H, m, H-4', CH NPP), 4.58-4.68 (5H, m, H-3',  $\text{CH}_2$  NPP,  $\text{OCH}_2$ ), 6.38-6.46 (1H, 2t,  $J_1$  = 6.5, H-1'), 6.96 (2H, d,  $J_1$  = 8.7,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.19 (2H, d,  $J_1$  = 8.7,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.53 (1H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.62 (1H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.62 (1H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.73 (1H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 8.12-8.12 (1H, 2s, H-8), 8.85 (1H, bs, NH);  $R_f$ (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v): 0.37

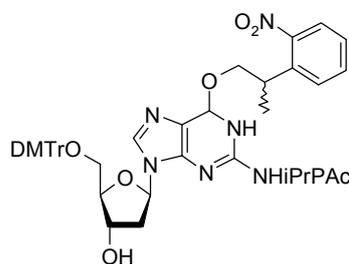
**Darstellung von N<sup>2</sup>-(4-isopropylphenoxyacetyl)-O<sup>6</sup>-[2-(2-nitrophenyl)propyl]-2'-desoxyguanosin (162)**



0.5 g (0.6 mmol) **161** werden in 15 mL THF gelöst. Man kühlt im Eisbad ab und fügt dann 0.2 mL (3.6 mmol) Eisessig, gefolgt von 1.8 mL (1.8 mmol) 1 M TBAF in THF hinzu. Es wird für 24 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und man reinigt das Rohprodukt säulenchromatographisch auf (1-8 % Methanol in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  v/v). Die Ausbeute beträgt 0.36 g (0.59 mmol, 99 %) eines gelben Nucleosidschaumes.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.22 (6H, d,  $J_1$  = 6.9,  $\text{CH}_3$  *i*-Pr), 1.48-1.50 (3H, 2d,  $J_1$  = 7.0,  $\text{CH}_3$  NPP), 2.37-2.45 (1H, m, H-2'), 2.88 (1H, sep,  $J_1$  = 6.9, CH *i*-Pr), 2.94-3.03 (1H, m, H-2'), 3.80-4.02 (3H, m, H-5', H-4), 4.14 (1H, m, CH NPP), 4.61-4.84 (4H, m,  $\text{CH}_2$  NPP,  $\text{OCH}_2$ ), 4.96 (1H, m, H-3'), 6.35 (1H, t,  $J_1$  = 6.7, H-1'), 6.96 (2H, d,  $J_1$  = 8.7,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.18 (2H, d,  $J_1$  = 8.7,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.33 (1H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.53 (1H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.61 (1H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.72 (1H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 8.03 (1H, 2s, H-8), 9.04 (1H, m, NH);  $R_f$ ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /Methanol 9:1 v/v): 0.32

**Darstellung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-N<sup>2</sup>-(4-isopropylphenoxyacetyl)-O<sup>6</sup>-[2-(2-nitrophenyl)propyl]-2'-desoxyguanosin (163)**



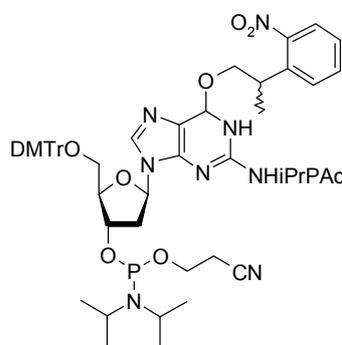
$C_{51}H_{52}N_6O_{10}$

908.99 g/mol

0.25 g (0.4 mmol) **162** werden unter Argonatmosphäre in 8 mL Pyridin gelöst. Man gibt 0.17 g (0.5 mmol) DMTr-Cl hinzu und lässt für 16 h rühren. Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 mL MeOH gestoppt, man entfernt das Lösungsmittel im Vakuum und reinigt den Rückstand säulenchromatographisch auf (1 % Methanol in  $CH_2Cl_2$  + 1 %  $NEt_3$  v/v). Man erhält 0.32 g (0.35 mmol, 87 %) gelben Nukleosidschaum.

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 1.22 (6H, d,  $J_1$  = 6.9,  $CH_3$  *i*-Pr), 1.47-1.51 (3H, 2d,  $J_1$  = 7.0,  $CH_3$  NPP), 2.58-2.75 (2H, m, H-2'), 2.87 (1H, sep,  $J_1$  = 6.9, CH *i*-Pr), 3.30-3.45 (2H, m, H-5'), 3.74 (6H, s,  $OCH_3$  DMTr), 3.95-4.05 (1H, m, CH NPP), 4.23 (1H, m, H-4'), 4.53-4.87 (5H, m, H-3',  $CH_2$  NPP,  $OCH_2$ ), 6.65 (1H, t,  $J_1$  = 6.7, H-1'), 6.75-6.80 (4H, m,  $CH_{ar}$ ), 6.95 (2H, d,  $J_1$  = 8.7,  $CH_{ar}$ ), 7.13-7.42 (12H, m,  $CH_{ar}$ ), 7.53 (1H, m,  $CH_{ar}$ ), 7.61 (1H, m,  $CH_{ar}$ ), 7.72 (1H, m,  $CH_{ar}$ ), 8.03 (1H, 2s, H-8), 8.93 (1H, m, NH);  $R_f$  (5 % Methanol in  $CH_2Cl_2$  + 1 %  $NEt_3$  v/v): 0.29

**Darstellung von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-N<sup>2</sup>-(4-isopropylphenoxyacetyl)-O<sup>6</sup>-[2-(2-nitrophenyl)propyl]-2'-desoxyguanosin-3'-O-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)phosphoramidit (dG<sup>NPP</sup>) (88)**



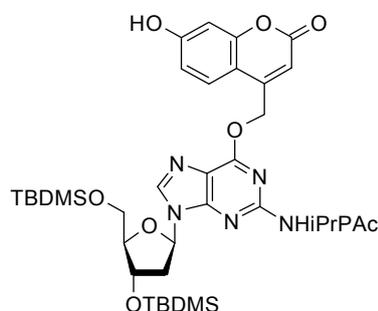
$C_{60}H_{69}N_8O_{11}P$

1109.21 g/mol

0.1 g (0.1 mmol) **163** werden unter Argonatmosphäre in 2 mL THF gelöst. Man gibt 66  $\mu\text{L}$  (0.39 mmol) DIPEA hinzu. Es wird 10 min gerührt, anschließend versetzt man die Lösung mit 49  $\mu\text{L}$  (0.22 mmol) 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit und lässt für weitere 1.5 h Rühren. Dann wird mit ges.  $\text{NaHCO}_3$  gequenchet und mit EtOAc extrahiert. Man wäscht die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl und trocknet über  $\text{MgSO}_4$ . Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und man reinigt das Rohprodukt säulenchromatographisch auf (Gradient Cyclohexan/Ethylacetat 4:1  $\rightarrow$  1:4 + 1 %  $\text{NEt}_3$  v/v). Die Ausbeute beträgt 99 mg (0.09 mmol, 81 %) eines hellgelben Nucleosidschaumes.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.08-1.20 (12H, m,  $\text{CH}_3$  N(*i*-Pr) $_2$ ), 1.24 (6H, d,  $J_1$  = 6.9,  $\text{CH}_3$  *i*-Pr), 1.50-1.53 (3H, 2d,  $J_1$  = 7.0,  $\text{CH}_3$  NPP), 2.45 (1H, t,  $J_1$  = 6.4,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ), 2.57-2.86 (2H, m, H-2'), 2.62 (1H, t,  $J_1$  = 6.4,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ), 2.89 (1H, sep,  $J_1$  = 6.9, CH *i*-Pr), 3.30-3.45 (2H, m, H-5'), 3.53-3.64 (2H, m, CH N(*i*-Pr) $_2$ ), 3.64-3.89 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{OP}$ ), 3.76 (6H, s,  $\text{OCH}_3$  DMTr), 3.95-4.05 (1H, m, CH NPP), 4.24-4.31 (1H, m, H-4'), 4.66-4.86 (5H, m, H-3',  $\text{CH}_2$  NPP,  $\text{OCH}_2$ ), 6.40 (1H, t,  $J_1$  = 6.7, H-1'), 6.74-6.80 (4H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 6.96 (2H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.14-7.40 (11H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.53 (1H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.63 (1H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.74 (1H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 8.01 (1H, 2s, H-8), 8.76 (1H, m, NH);  $^{31}\text{P-NMR}$  (162 MHz, cpd,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 151.8;  $R_f$ (Cyclohexan/Ethylacetat 1:4 + 1 %  $\text{NEt}_3$  v/v): 0.29

#### Darstellung von 3'-5'- Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-N<sup>2</sup>-(4-isopropylphenoxyacetyl)-O<sup>6</sup>-[7-hydroxycumarin-4-ylmethyl]-2'-desoxyguanosin (**112**)



$\text{C}_{43}\text{H}_{59}\text{N}_5\text{O}_9\text{Si}_2$

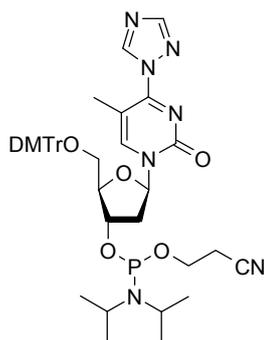
846.15 g/mol

0.7 g (1.58 mmol) TBDMS-geschütztes Guanosin **109** werden mit 0.27 g (1.05 mmol) Cumarin **111** und 0.42 g (1.58 mmol)  $\text{PPh}_3$  unter Argonatmosphäre in 10 mL THF suspendiert. Es folgt die Zugabe von 0.7 mL (1.58 mmol) DEAD. Die nun klare gelbe Lösung lässt man 48 h rühren und quenchet anschließend mit  $\text{H}_2\text{O}$ . Es wird mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert und die organische Phase über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Es folgt die säulenchromatographische Aufreinigung (Gradient Cyclohexan/Ethylacetat 1:1  $\rightarrow$  1:2 v/v). Man erhält 0.1 g (0.12 mmol, 7.5 %) hellen Nucleosidschaum.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.08-0.11 (12H, 2s,  $\text{CH}_3$  TBDMS), 0.88-0.91 (18H, 2s, *t*-Bu), 1.24 (6H, d,  $J_1$  = 6.9,  $\text{CH}_3$  *i*-Pr), 2.46-2.68 (2H, m, H-2'), 2.88 (1H, sep,  $J_1$  = 6.9, CH *i*-Pr), 3.66-3.93 (2H,

m, H-5'), 4.02 (1H, m, H-4'), 4.60-4.81 (3H, m, H-3', CH<sub>2</sub>), 5.70 (2H, m, CH<sub>2</sub> Cumarin), 6.41 (1H, CH Cumarin), 6.48 (1H, t,  $J_1 = 6.1$ , H-1'), 6.65 (1H, m, CH<sub>ar</sub> Cumarin), 6.75 (1H, m, CH<sub>ar</sub> Cumarin), 6.95 (2H, d,  $J_1 = 8.6$ , CH<sub>ar</sub>), 7.20 (2H, d,  $J_1 = 8.6$ , CH<sub>ar</sub>), 7.35 (1H, d,  $J_1 = 8.7$ , CH<sub>ar</sub> Cumarin), 8.37 (1H, s, H-8), 9.01 (1H, bs, NH);  $R_f$  (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v): 0.28; HRMS (ESI-): berechnet für C<sub>43</sub>H<sub>59</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>Si<sub>2</sub>: 844.3779, gefunden: 844.3804

**Darstellung von 4-Desoxy-4-(1,2,4-triazol-1-yl)-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2'-desoxythymidin-3'-O-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)phosphoramidit (78)**



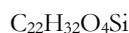
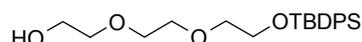
C<sub>42</sub>H<sub>52</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>P

781.90 g/mol

Die Verbindung wurde nach Literaturangaben dargestellt.<sup>[134]</sup> 1.4 g (20 mmol) 1,2,4-Triazol werden bei 4°C in MeCN suspendiert. Man gibt unter starkem Rühren langsam 0.4 mL (4.3 mmol) POCl<sub>3</sub> mittels Kanüle hinzu, gefolgt von der tropfenweisen Zugabe von 3 mL NEt<sub>3</sub> (21.6 mmol). Es bildet sich ein rein weißer Niederschlag. Es wird für 40 min unter Eisbadkühlung gerührt, dann werden über einen Zeitraum von 25 min 0.25 g (0.34 mmol) Desoxythymidinphosphoramidit, gelöst in 5 mL MeCN, langsam hinzu getropft. Man lässt für 1.5 h unter Eisbadkühlung rühren. Dann wird die Reaktion mit ges. NaHCO<sub>3</sub> gequench und mit CHCl<sub>3</sub> extrahiert. Die organische Phase wird mit ges NaCl und H<sub>2</sub>O gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und man erhält 0.26 g (0.33 g, 97 %) weißen Nukleosidschaum.

<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, cpd, CDCl<sub>3</sub>) δ = 149.4, 150.1;  $R_f$  (Chloroform/Aceton 5:1 v/v): 0.38 + 0.54 (starke blaue Fluoreszenz bei 366 nm)

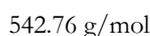
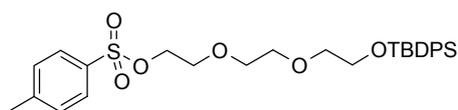
### Darstellung von 2-{2-[2-(*tert*-Butyldiphenylsiloxy)-ethoxy]-ethoxy}ethanol (**129**)



Die Verbindung wurde analog zu einer Literaturvorschrift dargestellt.<sup>[201]</sup> 12.9 mL (96 mmol) Triethylenglycol werden unter Argonatmosphäre mit 15 mL (108 mmol) Triethylamin und einer Spatelspitze DMAP in 100 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  unter Eisbadkühlung vorgelegt. Man gibt langsam 5 mL (19.3 mmol) TBDPS-Cl über eine Dauer von 15 min via Kanüle hinzu. Es wird 30 min bei  $4^\circ\text{C}$  gerührt, man lässt über Nacht auf RT kommen. Anschließend wird die organische Phase mit je 100 mL 10% HCl, ges.  $\text{NaHCO}_3$  und ges. NaCl gewaschen und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1 v/v) aufgereinigt. Man erhält 5.4 g (13.9 mmol, 72 %) einer schwach gelben Flüssigkeit.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.05$  (9H, s,  $\text{CH}_3$ ), 2.31 (1H, s, OH), 3.59-3.84 (12H, m,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 7.35-7.43 (6H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.67-7.71 (4H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, cpd,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 19.2, 21.7, 26.8, 61.9, 63.5, 70.6, 70.9, 72.5, 127.7, 129.7, 133.7, 135.6$ ;  $R_f$  (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1 v/v): 0.36; Elem. Anal. berechnet für  $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{Si}$ : C 68.0 H 8.3 O 16.47 Si 7.23, gefunden: C 68.08 H 8.25

### Darstellung von Toluen-4-sulfonsäure-2-{2-[2-(*tert*-butyldiphenylsiloxy)-ethoxy]-ethoxy}ethylester (**130**)

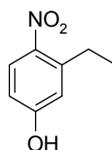


5.1 g (13.1 mmol) **129** werden zusammen mit 2.5 g (14.4 mmol) *p*-Toluensulfonylchlorid unter Argonatmosphäre und Eisbadkühlung in 20 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  vorgelegt. Man gibt 2.3 ml Pyridin hinzu, lässt einige Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  rühren und anschließend über Nacht auf RT kommen. Es wird mit 50 ml 1 M HCl gequench, man wäscht die organische Phase mit  $\text{H}_2\text{O}$  und ges. NaCl und trocknet über  $\text{MgSO}_4$ . Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1 v/v) liefert 5.4 g (10 mmol, 76.6 %) einer klaren, farblosen Flüssigkeit.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.05$  (9H, s,  $\text{CH}_3$ ), 2.42 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 3.54-3.84 (10H, m,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.14 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{O}^p\text{T}$ s), 7.29-7.42 (8H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.67-7.71 (4H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.79 (2H,

d,  $J_1 = 8.3$ , CH<sub>ar</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, cpd, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 19.2, 21.7, 26.8, 63.4, 68.8, 69.3, 70.7, 70.8, 72.5, 127.7, 128.0, 129.7, 129.8, 133.0, 133.7, 135.6, 144.7$ ; R<sub>f</sub> (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1 v/v): 0.25; HRMS (ESI+): berechnet für C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>O<sub>6</sub>SSi: 485.1454, gefunden: 485.1454 [M-*t*Bu]<sup>+</sup>

### Darstellung von 3-Ethyl-4-nitrophenol (126)

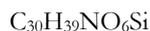
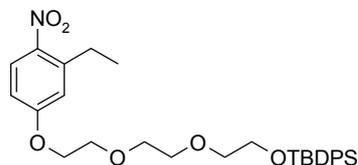


167.16 g/mol

Die Verbindung wurde nach Literaturvorschrift dargestellt.<sup>[226]</sup> 5 g (40 mmol) 3-Ethylphenol werden in 100 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und anschließend zu 3.4 g (44 mmol) NaNO<sub>3</sub> in 50 mL 3M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gegeben. Zu der farblosen Suspension werden 5-6 Kristalle NaNO<sub>2</sub> gegeben, es tritt eine augenblickliche Orangefärbung ein. Man rührt 3 d bei RT und extrahiert anschließend mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Man wäscht die organische Phase mit ges. NaCl und trocknet über MgSO<sub>4</sub>. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Cyclohexan/Ethylacetat 10:1 v/v) liefert 2.5 g (15 mmol, 37 %) Produkt als rote Nadeln.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 1.27$  (3H, t,  $J_1 = 7.4$ , CH<sub>3</sub>), 2.96 (2H, q,  $J_1 = 7.4$ , CH<sub>2</sub>), 5.94 (1H, bs, OH), 6.73-6.79 (2H, m, CH<sub>ar</sub>), 7.99 (1H, d,  $J_1 = 8.8$ , CH<sub>ar</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, cpd, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta = 14.6, 27.0, 113.5, 117.3, 128.0, 141.9, 143.1, 159.9$ ; R<sub>f</sub> (Cyclohexan/Ethylacetat 1:1 v/v): 0.56; HRMS (ESI+): berechnet für C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>: 167.0582, gefunden: 167.0587

### Darstellung von 3-Ethyl-4-nitrophenyl-2-{2-[2-(*tert*-butyldiphenylsiloxy)ethoxy]ethoxy}-ethylether (125)



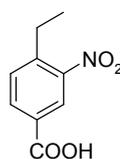
537.72 g/mol

2.5 g (4.5 mmol) **130** werden zusammen mit 1.6 g NaCO<sub>3</sub> (15 mmol) vorgelegt. Hierzu gibt man 0.5 g (3 mmol) **126** gelöst in 12 ml DMF. Es wird bei 100°C für 5 h erhitzt, die anfänglich orange Lösung färbt sich zunehmend braun. Man lässt über Nacht auf RT kommen. Man gibt 100 mL H<sub>2</sub>O hinzu und extrahiert mit Et<sub>2</sub>O. Es wird über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotations-

verdampfer entfernt. Man reinigt säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1 v/v) auf und erhält 1.4 g (2.7 mmol, 88.4 %) eines orange Öls.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.05$  (9H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1.27 (3H, t,  $J_1 = 7.6$ ,  $\text{CH}_3$ ), 2.96 (2H, q,  $J_1 = 7.6$ ,  $\text{CH}_2$ ), 3.61-3.89 (10H, m,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.16-4.18 (2H, m,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 6.76-6.82 (2H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.35-7.42 (6H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.68-7.71 (4H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.99 (1H, d,  $J_1 = 9.1$ ,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, cpd,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 14.8$ , 19.3, 26.8, 26.9, 63.5, 68.0, 69.5, 70.7, 70.8, 72.6, 112.0, 116.8, 127.6, 127.7, 129.7, 133.7, 135.7, 142.2, 142.5, 162.4;  $R_f$  (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1 v/v): 0.48; HRMS (ESI+): berechnet für  $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{NO}_6\text{Si}$ : 480.1842, gefunden: 480.1839  $[\text{M-}t\text{Bu}]^+$

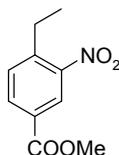
### Darstellung von 4-Ethyl-3-nitrobenzoesäure (132)



195.17 g/mol

Die Darstellung erfolgte nach Literaturvorschrift.<sup>[203]</sup> 40 mL rauchende Salpetersäure werden im Eisbad vorgelegt. Man gibt langsam 5 g (33 mmol) 4-Ethylbenzoesäure hinzu. Die orange Lösung wird für 1 h im Eisbad gerührt, anschließend lässt man über Nacht auf RT kommen. Es wird mit 200 mL Eiswasser gequench, dabei entsteht ein heller Niederschlag. Dieser wird abfiltriert und anschließend in Toluol aufgenommen. Man koevaporiert am Rotationsverdampfer bis zur Trockene und erhält 6.2 g (31.6 mmol, 95.8 %) eines schwach gelben Feststoffes.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta = 1.22$  (3H, t,  $J_1 = 7.4$ ,  $\text{CH}_3$ ), 2.88 (2H, q,  $J_1 = 7.4$ ,  $\text{CH}_2$ ), 7.66 (1H, d,  $J_1 = 8.0$ ,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 8.14 (1H, dd,  $J_1 = 8.0$ ,  $J_2 = 1.7$ ,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 8.35 (1H, d,  $J_1 = 1.7$ ,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, cpd,  $d_6$ -DMSO)  $\delta = 15.0$ , 25.7, 125.3, 130.5, 132.3, 133.8, 143.0, 149.3, 165.9; HRMS (ESI+): berechnet für  $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_4$ : 195.0531, gefunden: 195.0534

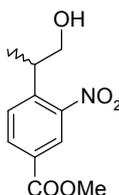
**Darstellung von Methyl-4-ethyl-3-nitrobenzoat (133)**

$$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_4$$

$$209.20 \text{ g/mol}$$

Die Verbindung wurde nach Literaturvorschrift dargestellt.<sup>[202]</sup> 11.6 g (59.2 mmol) **132** werden in 70 mL MeOH suspendiert und mit 3 mL konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  versetzt. Es wird unter Rückflusskühlung für 24 h bei  $80^\circ\text{C}$  erhitzt. Man lässt auf RT kommen und verdünnt die Reaktionslösung mit 100 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Es wird mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert und anschließend die organische Phase wird mit ges.  $\text{NaHCO}_3$  gewaschen. Man trocknet über  $\text{MgSO}_4$  und entfernt das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Die Ausbeute beträgt 12.2 g (58.3 mmol, 98.5 %) eines hellgelben Öls.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.29$  (3H, t,  $J_1 = 7.5$ ,  $\text{CH}_3$ ), 2.95 (2H, q,  $J_1 = 7.5$ ,  $\text{CH}_2$ ), 3.94 (3H, s,  $\text{COOMe}$ ), 7.45 (1H, d,  $J_1 = 8.0$ ,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 8.15 (1H, dd,  $J_1 = 8.0$ ,  $J_2 = 1.7$ ,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 8.49 (1H, d,  $J_1 = 1.7$ ,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, cpd,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 14.6$ , 26.3, 52.6, 125.7, 129.3, 131.4, 133.4, 143.7, 149.5, 165.1; MS (ESI+): berechnet für  $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_4$ : 209.1, gefunden: 209.1

**Darstellung von Methyl-4-(2-hydroxy-1-methylethyl)-3-nitrobenzoat (134)**

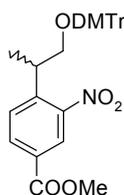
$$\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_5$$

$$239.23 \text{ g/mol}$$

Die Verbindung wurde nach Literaturvorschrift dargestellt.<sup>[202]</sup> 3 g (14.3 mmol) **133** werden mit 0.64 g (21.4 mmol) Paraformaldehyd in 33 mL DMSO suspendiert. Dann fügt man 4.7 mL *t*-BuOH und zuletzt 0.19 g *t*-BuOK hinzu, nach der Zugabe des Alkoholats färbt sich die Lösung dunkelrot. Es wird 15 min bei RT gerührt gefolgt von Erhitzen für 3 h bei  $80^\circ\text{C}$ . Nach Aufklaren der Lösung lässt man auf RT kommen und quencht mit 100 mL 0.5 M HCl. Es wird mit EtOAc extrahiert und die organische Phase nach Waschen mit ges. NaCl über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Cyclohexan/Ethylacetat 3:2 v/v) erhält man 1.9 g (7.9 mmol, 55 %) gelbes Öl.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.33$  (3H, d,  $J_1 = 6.9$ ,  $\text{CH}_3$ ), 2.5 (1H, s, OH), 3.54 (1H, m, CH), 3.78 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 3.93 (3H, s,  $\text{COOMe}$ ), 7.58 (1H, d,  $J_1 = 8.2$ ,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 8.17 (1H, dd,  $J_1 = 8.2$ ,  $J_2 = 1.5$ ,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 8.35 (1H, d,  $J_1 = 1.6$ ,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, cpd,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 17.5$ , 36.8, 52.8, 67.5, 125.3, 128.8, 129.6, 133.2, 143.3, 150.7, 165.1;  $R_f$ (Cyclohexan/Ethylacetat 7:3 v/v): 0.23

### Darstellung von Methyl-4-[2-(4,4'-dimethoxytrityloxy)-1-methylethyl]-3-nitrobenzoat (135)

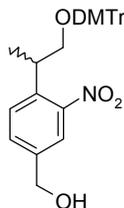


$\text{C}_{32}\text{H}_{31}\text{NO}_7$   
541.59 g/mol

1.85 g (7.7 mmol) **134** werden in 30 mL trockenem Pyridin unter Argonatmosphäre vorgelegt. Man gibt 2.9 g (8.5 mmol) DMTr-Cl und 90 mg (0.8 mmol) DMAP hinzu. Die orange Lösung wird 24 h gerührt, anschließend quencht man mit 30 mL MeOH und entfernt das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat 7:3 v/v + 1 %  $\text{NEt}_3$ ) aufgereinigt. Man erhält 4 g (7.4 mmol, 96 %) weißen Schaum.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{d}_4\text{-MeOH}$ ):  $\delta = 1.25$  (3H, d,  $J_1 = 6.9$ ,  $\text{CH}_3$ ), 3.26 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 3.57 (1H, m, CH), 3.74 (6H, 2s, OMe), 3.93 (3H, s,  $\text{COOMe}$ ), 6.74-6.78 (4H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.08-7.24 (9H, m,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.48 (1H, d,  $J_1 = 8.3$ ,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 8.10 (1H, dd,  $J_1 = 8.2$ ,  $J_2 = 1.8$ ,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 8.31 (1H, d,  $J_1 = 1.8$ ,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz, cpd,  $\text{d}_4\text{-MeOH}$ )  $\delta = 18.0$ , 36.1, 53.1, 55.7, 69.3, 87.4, 125.6, 127.7, 128.7, 129.1, 130.4, 130.5, 130.6, 131.1, 133.6, 137.1, 137.1, 145.0, 146.3, 152.2, 160.0, 166.4;  $R_f$  (Cyclohexan/Ethylacetat 7:3 v/v): 0.43; HRMS (ESI+): berechnet für  $\text{C}_{32}\text{H}_{31}\text{NO}_7$ : 541.2101, gefunden: 541.2105

### Darstellung von 4-[2-(4,4'-dimethoxytrityloxy)-1-methylethyl]-3-nitrobenzylalkohol (136)

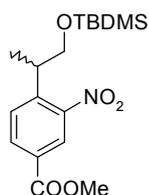


$\text{C}_{31}\text{H}_{31}\text{NO}_6$   
513.58 g/mol

Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an eine Literaturvorschrift.<sup>[204]</sup> 4.5 g (8.3 mmol) **135** werden in 90 mL 1,4-Dioxan gelöst, dann gibt man 30 mL H<sub>2</sub>O hinzu. Zu der klaren Lösung werden spatelweise 3.2 g (83 mmol) NaBH<sub>4</sub> gegeben. Man lässt für 4 d unter Lichtausschluss rühren und extrahiert anschließend mit EtOAc. Die organische Phase wird mit ges. NaCl gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Die Aufreinigung erfolgt säulenchromatographisch (Cyclohexan/Ethylacetat 3:2 v/v + 1 % NEt<sub>3</sub>), man erhält 3.3 g (6.4 mmol, 77 %) weißen Schaum.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>4</sub>-MeOH):  $\delta$  = 1.23 (3H, d,  $J_1$  = 6.9, CH<sub>3</sub>), 3.19 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 3.56 (1H, m, CH), 3.73 (6H, 2s, OMe), 4.65 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 6.74-6.78 (4H, m, CH<sub>ar</sub>), 7.08-7.24 (9H, m, CH<sub>ar</sub>), 7.34 (1H, d,  $J_1$  = 8.0, CH<sub>ar</sub>), 7.51 (1H, dd,  $J_1$  = 8.2,  $J_2$  = 1.4, CH<sub>ar</sub>), 7.73 (1H, m, CH<sub>ar</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, cpd, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 18.4, 28.0, 35.5, 55.7, 63.8, 69.6, 87.2, 114.0, 122.6, 127.6, 128.7, 129.2, 129.7, 131.2, 131.5, 137.3, 138.4, 142.8, 146.5, 152.3, 160.0; R<sub>f</sub> (Cyclohexan/Ethylacetat 3:2 v/v): 0.4; HRMS (ESI<sup>+</sup>): berechnet für C<sub>31</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>6</sub>: 513.2151, gefunden: 541.2146

#### Darstellung von Methyl-4-[2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-1-methylethyl]-3-nitrobenzoat (**140**)

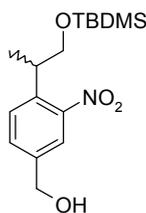


C<sub>17</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>5</sub>Si

353.49 g/mol

0.5 g (2.1 mmol) **134** werden mit 0.95 g (6.3 mmol) TBDMS-Cl und 0.86 g (12.6 mmol) Imidazol unter Argonatmosphäre in 10 mL DMF gelöst. Es wird für 2.5 h gerührt, anschließend verdünnt man die Reaktionslösung mit 30 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und wäscht die organische Phase mit H<sub>2</sub>O und ges. NaCl. Nach Trocknen über MgSO<sub>4</sub> wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1 v/v) liefert 0.68 g (1.9 mmol, 90 %) gelbes Öl.

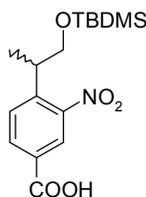
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = -0.08 (3H, s, SiMe), -0.06 (3H, s, SiMe), 0.8 (9H, s, *t*-Bu), 1.33 (3H, d,  $J_1$  = 7.1, CH<sub>3</sub>), 3.52 (1H, m, CH), 3.73 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 3.94 (1H, s, COOMe), 7.59 (1H, d,  $J_1$  = 8.3, CH<sub>ar</sub>), 8.16 (1H, dd,  $J_1$  = 8.2,  $J_2$  = 1.6, CH<sub>ar</sub>), 8.35 (1H, d,  $J_1$  = 1.6, CH<sub>ar</sub>); R<sub>f</sub> (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1 v/v): 0.76; HRMS (ESI<sup>+</sup>): berechnet für C<sub>17</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>5</sub>SiNa: 376.1556, gefunden: 376.1551

Darstellung von 4-[2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-1-methylethyl]-3-nitrobenzylalkohol (**141**)C<sub>16</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>4</sub>Si

325.48 g/mol

Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an eine Literaturvorschrift.<sup>[204]</sup> 0.68 g (1.9 mmol) **140** werden in 25 mL 1,4-Dioxan gelöst, dann gibt man 10 mL H<sub>2</sub>O hinzu. Zu der klaren Lösung werden spatelweise 0.71 g (19 mmol) NaBH<sub>4</sub> gegeben. Man lässt für 20 h unter Lichtausschluss rühren und extrahiert anschließend mit EtOAc. Die organische Phase wird mit ges. NaCl gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt. Man erhält 0.61 g (1.9 mmol, quantitativ) gelbes Öl.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = -0.06 (3H, s, SiMe), -0.04 (3H, s, SiMe), 0.82 (9H, s, *t*-Bu), 1.31 (3H, d, *J*<sub>1</sub> = 7.1, CH<sub>3</sub>), 3.45 (1H, m, CH), 3.70 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 4.74 (1H, s, CH<sub>2</sub>), 7.46-7.52 (2H, m, CH<sub>ar</sub>), 7.72 (1H, m, CH<sub>ar</sub>); R<sub>f</sub>(Cyclohexan/Ethylacetat 7:3 v/v): 0.53

Darstellung von 4-[2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-1-methylethyl]-3-nitrobenzoesäure (**144**)C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>5</sub>Si

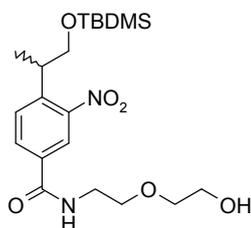
339.46 g/mol

2.9 g (8.3 mmol) **140** werden in 50 mL EtOH vorgelegt. Dann gibt man zu der Lösung 50 mL 1 M NaOH und lässt für 2.5 h rühren. Die gelbe Lösung wird mit 1 M HCl angesäuert, anschließend extrahiert man mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Die organische Phase wird mit ges. NaCl gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Gradient Cyclohexan/Ethylacetat 3:2 → 2:3 v/v). Man erhält 2.5 g (7.4 mmol, 89 %) grauen Feststoff.

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = -0.06 (3H, s, SiMe), -0.04 (3H, s, SiMe), 0.80 (9H, s, *t*-Bu), 1.31 (3H, d, *J*<sub>1</sub> = 6.8, CH<sub>3</sub>), 3.55 (1H, m, CH), 3.75 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 7.64 (1H, d, *J*<sub>1</sub> = 8.3, CH<sub>ar</sub>), 8.23 (1H, dd, *J*<sub>1</sub> = 8.3, *J*<sub>2</sub> = 1.7, CH<sub>ar</sub>), 8.43 (1H, d, *J*<sub>1</sub> = 1.7, CH<sub>ar</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, cpd, CDCl<sub>3</sub>) δ = -5.7, -

5.8, 17.2, 18.3, 36.7, 67.6, 125.6, 128.3, 129.6, 133.0, 144.9, 150.9, 170.0;  $R_f$  (Cyclohexan/Ethylacetat 4:1 v/v): 0.61; HRMS (ESI+): berechnet für  $C_{16}H_{25}NO_5SiNa$ : 362.1399, gefunden: 362.1397

**Darstellung von 4-[2-(*tert*Butyldimethylsilyloxy)-1-methylethyl]-N-[2-(2-hydroxyethoxy)ethyl]-3-nitrobenzamid (145)**

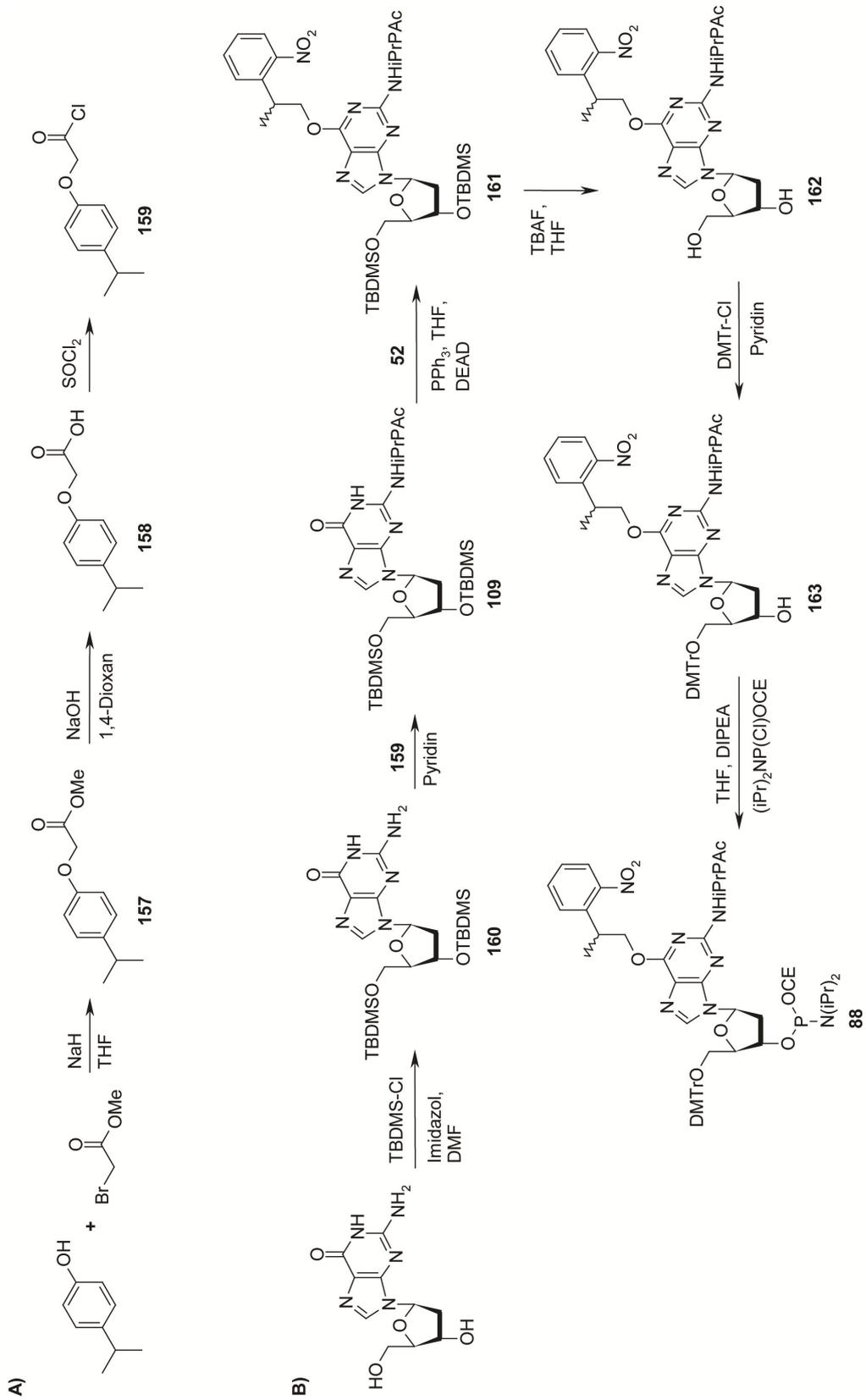


$C_{20}H_{34}N_2O_6Si$

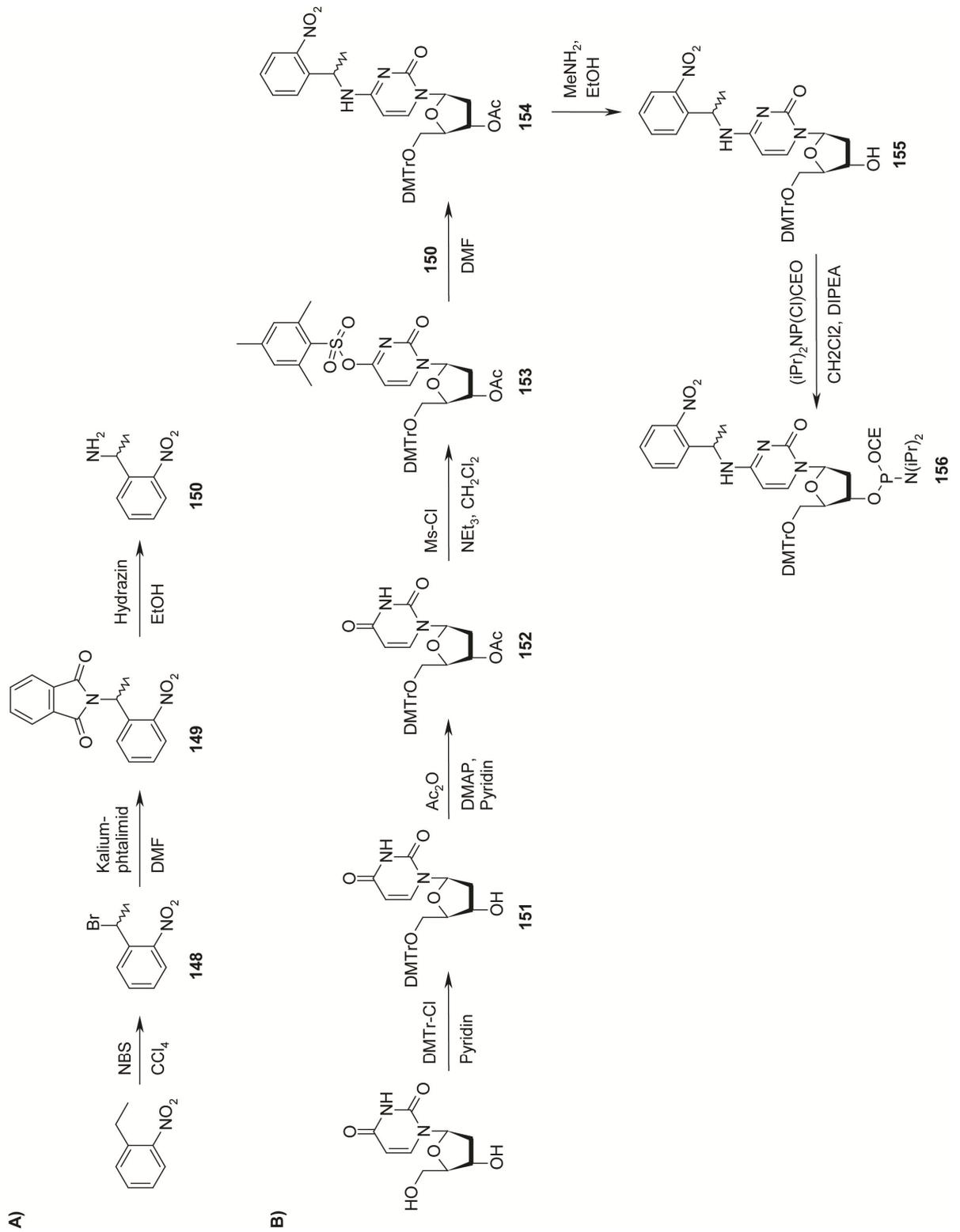
426.58 g/mol

1.2 mL (11.8 mmol) 2-(2-Aminoethoxy)ethanol werden zusammen mit 45 mg (0.36 mmol) DMAP vorgelegt. 0.4 g (1.2 mmol) **144** werden in 5 mL  $CH_2Cl_2$  gelöst, dann fügt man unter Eisbadkühlung 0.27 g (1.3 mmol) DCC hinzu. Man lässt für 5 min bei 4°C rühren und gibt dann langsam und ebenfalls unter Eisbadkühlung den Aktivester via Kanüle zum Amin. Es wird 15 min bei 4°C gerührt, anschließend lässt man auf RT kommen und lässt weitere 16 h rühren. Es wird filtriert und der Filtrerrückstand mit  $CH_2Cl_2$  gewaschen. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Säulenchromatographische Aufreinigung (Cyclohexan/Ethylacetat 2:3 v/v) liefert 0.33 g (0.77 mmol, 65 %) weißen Feststoff.

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $d_4$ -MeOH):  $\delta$  = -0.04 (3H, s, SiMe), -0.03 (3H, s, SiMe), 0.81 (9H, s, *t*-Bu), 1.34 (3H, d,  $J_1$  = 7.0,  $CH_3$ ), 3.47 (1H, m, CH), 3.58-3.71 (8H, m,  $CH_2$ ), 3.78 (2H, m,  $CH_2$ ), 7.71 (1H, d,  $J_1$  = 8.2,  $CH_{ar}$ ), 8.08 (1H, dd,  $J_1$  = 8.1,  $J_2$  = 1.8,  $CH_{ar}$ ), 8.43 (1H, d,  $J_1$  = 1.8,  $CH_{ar}$ );  $^{13}C$ -NMR (75 MHz, cpd,  $d_4$ -MeOH)  $\delta$  = -5.5, -5.4, 17.4, 19.0, 26.1, 26.3, 26.8, 34.8, 37.9, 41.2, 62.2, 69.0, 70.5, 73.2, 123.6, 130.3, 131.7, 134.7, 143.0, 152.4, 167.7;  $R_f$  (Cyclohexan/Ethylacetat 2:3 v/v): 0.31; HRMS (ESI+): berechnet für  $C_{20}H_{34}N_2O_6SiNa$ : 449.2083, gefunden: 449.2071

Übersicht der Darstellung von dG<sup>NPP</sup>

Übersicht der Darstellung von dC<sup>NPE</sup>



### 5.3 Synthese der photoaktivierbaren Aptamere

Die Synthese erfolgte mit den weiter oben aufgeführten Reagenzien und Synthesebedingungen. Die photolabil geschützten Phosphoramidite wurden in einer Konzentration von 0.1 M in wasserfreiem ( $\leq 33$  ppm  $\text{H}_2\text{O}$ ) eingesetzt. Nach erfolgter Synthese wird die Synthesäule im Argonstrom getrocknet. Man überführt das PS-Festphasenmaterial in ein 1.5 mL Eppendorfgefäß und versetzt es mit  $\sim 1$  mL wässriger Ammoniaklösung (33%). Das Festphasenmaterial wird entweder bei RT für  $\sim 16$  h oder bei  $65^\circ\text{C}$  für 4 h inkubiert. Anschließend erfolgt eine Spinfiltration mit Ultrafree<sup>®</sup>-MC Zentrifugationsfilter (*Millipore Corp.*) mit  $22\ \mu\text{m}$  Porengröße. Das Filtrat wird in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, *Eppendorf AG*) bei RT bis zur Trockene eingengt und anschließend in  $200\ \mu\text{L}$  MilliQ-Wasser aufgenommen. Anschließend erfolgt eine RP-HPLC Aufreinigung (0.1 M TEAA pH 7.4/Acetonitril, Gradient: 0'-2' 5 % MeCN, 2'-27' 5-46 % MeCN, Nucleosil 100-5 C18 250x4.6 mm Säule, *CS-Chromatographie Service GmbH*) zur Abtrennung des tritylierten Vollängenproduktes von den Abbruchsequenzen. Die Produktfraktion wird an der Vakuumzentrifuge vom Laufmittel befreit und anschließend zur Abspaltung der Tritylgruppe für  $\sim 20$  min mit Essigsäure (80%) versetzt. Die Essigsäure entfernt man ebenfalls mittels Vakuumzentrifugation. Die DNA wird nun erneut RP-HPLC aufgereinigt (Bedingungen siehe oben) und getrocknet.

Zur Quantifizierung der erhaltenen DNA wird die Extinktion bei einer Wellenlänge  $\lambda$  von 260 nm mittels UV-Spektrometrie bestimmt (Evolution 300, *Thermo Fisher Scientific Inc.*). Hierfür gilt das *Lambert-Beersche* Gesetz:

$$c = \frac{OD_{260}}{d \times \varepsilon}$$

mit  $c$  = Konzentration der DNA [mol/L]

$OD_{260}$  = Extinktion bei 260 nm

$\varepsilon$  = Extinktionskoeffizient in [ $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]

$d$  = Schichtdicke [cm]

Für die Berechnung des Gesamtextinktionskoeffizienten der DNA-Oligomere wurden folgende Extinktionskoeffizienten der einzelnen DNA-Basen herangezogen:

Base	dA	dG	dC	dT
Extinktionskoeffizient [ $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	15400	13700	9000	10000

**Tabelle 9:** Extinktionskoeffizienten der DNA-Mononukelotide.

Die isolierten Ausbeuten an sauberer DNA betragen typischerweise 30-50 % (30-60mer, 200 nmol Ansatz)).

#### Sequenzen des bivalenten photoaktivierbaren Aptamers HD1-22

C4: 5'- AAC C<sup>NPE</sup>GA AAG GTT GGT GTG GTT GG – 15dA – AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTG GGG TGA CT -3'

G6: 5'- GGT TGG<sup>NPP</sup> TGT GGT TGG – 15dA – AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTG GGG TGA CT -3'

G39: 5'- GGT TGG TGT GGT TGG – 15dA – AGT CCG TGG<sup>NPP</sup> TAG GGC AGG TTG GGG TGA CT -3'

#### Sequenzen des photoaktivierbaren Aptamers HD22

G9: 5'- AGT CCG TGG<sup>NPP</sup> TAG GGC AGG TTG GGG TGA CT -3'

G24: 5'- AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTG GGG<sup>NPP</sup> TGA CT -3'

Aptamersequenz	erwartete Masse [Da]	gemessene Masse [Da]
C4	21194.7	21193.5
G6	18735.1	18734.0
G39	18735.1	18733.5
G9	9249.0	9248.5
G24	9249.0	9248.8

**Tabelle 10:** Molekülmassen der photoaktivierbaren HD22 und HD1-22 Aptamersequenzen.

## 5.4 Biologische Aktivitätstests

Folgende Assays wurden von unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Günter Mayer (LIMES, Universität Bonn) bzw. Dr. Jens Müller (Universitätsklinikum Bonn) durchgeführt:

**Filterbindungsstudien.** Die einzelsträngigen DNA-Sequenzen werden am 5'-Ende mit  $^{32}\text{P}$ -Phosphat modifiziert. Hierzu verwendet man  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP mit einer T4 PNK (*Stratagene Inc.*). Die Inkubationszeit beträgt 45 min bei 37°C in PNK-Puffer (*Stratagene Inc.*). Anschließend wird die Reaktionsmischung auf eine G-25 Microspin Säule (*Amersham Biosciences GmbH*) aufgetragen, um überschüssiges  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP zu entfernen. Die Reinheit der radioaktiv markierten Sequenzen wird auf 12 %igen Polyamidgelen analysiert. Für die Bindungsstudie werden die Sequenzen mit einer finalen Konzentration von 0.5 nM mit zunehmenden Mengen an menschlichem  $\alpha$ -Thrombin (*Cell Systems GmbH*) für 30 min bei 37°C inkubiert. Als Reaktionsmedium verwendet man PBS-Puffer pH 7.4, versetzt mit 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  BSA (*Calbiochem-Novabiochem GmbH*), 10  $\mu\text{M}$  tRNA aus *E. coli* (*Sigma-Aldrich Corp.*) und 3 mM  $\text{MgCl}_2$ . Nach beendeter Reaktionszeit filtriert man die Reaktionsmischung durch Nitrocellulosemembrane (*Schleicher&Schüll GmbH*) mit 45  $\mu\text{m}$  Porengröße und wäscht diese mit 0.8 mL PBS/3 mM  $\text{MgCl}_2$ . Zur Quantifizierung der gebundenen Aptamersequenzen wird ein Phosphorimager FUJIFILM FLA-3000 mit AIDA Imagequant Software verwendet. Die Dissoziationskonstanten werden mit *Origin* bestimmt unter Verwendung der „logistic fit function“ und unter der Annahme einer 1:1 Bindungsstöchiometrie. Alle Bestimmungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

**Thrombin-Aktivitätsassay.** Die Inhibierung des  $\alpha$ -Thrombins durch die Aptamersequenzen wurde mit einem Coagulometer KC10 (*Amelung GmbH*) unter Verwendung eines Thrombin basierten Blugerinnungsassays bestimmt. Hierzu wird menschliches  $\alpha$ -Thrombin mit einem Assaypuffer (PBS pH 7.4, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  BSA) auf eine finale Konzentration von 10 NIH-Einheiten pro mL verdünnt. Diese Lösung wird mit definierten Mengen an Aptamersequenz versetzt und 100  $\mu\text{L}$  hiervon werden in vorgewärmte KC10-Küvetten pipettiert. Nach einer Inkubationsdauer von 4 min bei 37°C werden 50  $\mu\text{L}$  einer 10 mg/mL Lösung von menschlichem Fibrinogen (*Haemocompletan*<sup>®</sup>, *Aventis Behring GmbH*) zugefügt und die Gerinnungszeit bestimmt. Jedes Experiment wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt.

**Thrombin-Inhibierungsassay.** Der Einfluss der Aptamere auf die durch Heparin vermittelte Inhibierung des  $\alpha$ -Thrombins durch Antithrombin wurde mit einem Fluoreszenzassay ermittelt. Die Bestimmung wird in 96-Well Microtiterplatten (*Nunc Thermo-Fisher Scientific Inc.*) durchgeführt. Humanes  $\alpha$ -Thrombin (2.5 NIH Einheiten pro mL, *CellSystems GmbH*) und unfraktioniertes Heparin (UFH, 0.01 Einheiten pro mL, *Liquemin*<sup>®</sup>, *Roche GmbH*) werden mit unterschiedlichen

---

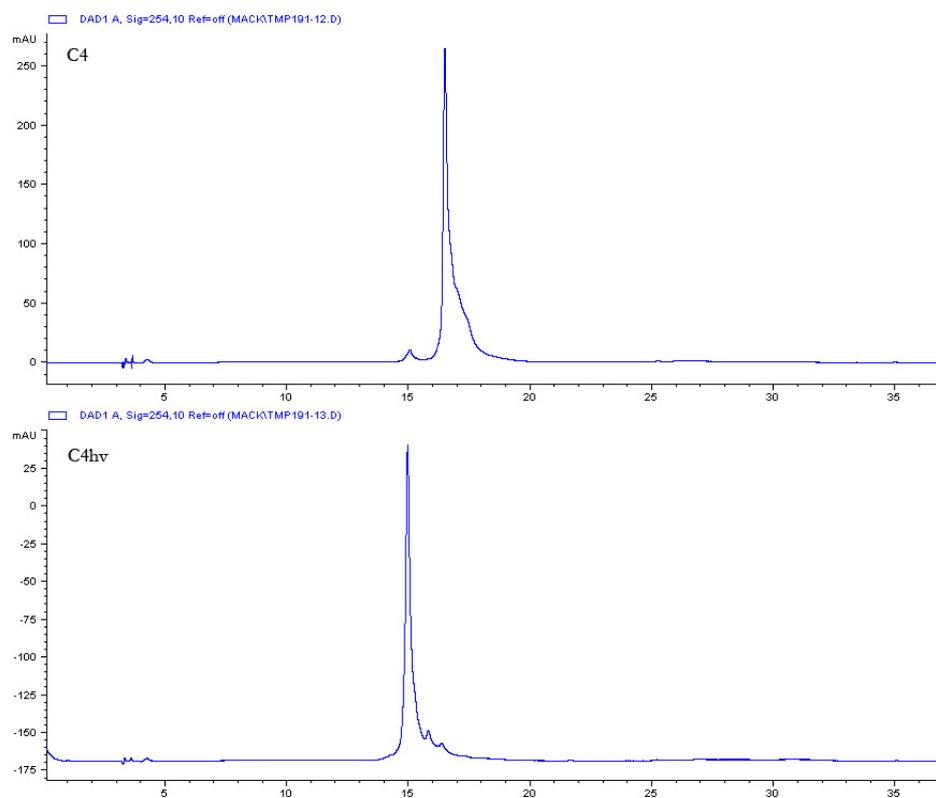
Konzentrationen an Aptamer (0-1.5  $\mu\text{M}$ ) in Assaypuffer inkubiert. Die Inkubationsdauer beträgt 5 min bei RT und einem Gesamtvolumen von 40  $\mu\text{L}$ . Nach beendeter Inkubationszeit wird die Lösung mit 40  $\mu\text{L}$  einer Mischung des Fluoreszenz-Peptidsubstrates Z-Gly-Gly-Arg-AMC (200  $\mu\text{M}$ ) und Antithrombin (0.032 Einheiten pro mL, Kybernin<sup>®</sup>, *CSL Bebring GmbH*) in Assaypuffer versetzt. Die Kinetik der Hydrolyse des Fluoreszenzsubstrates durch  $\alpha$ -Thrombin wurde bei RT mit einem Ascent Fluoroscan Plate-Reader (*Thermo-Fisher Scientific Inc.*) bestimmt. Jede Bestimmung wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt.



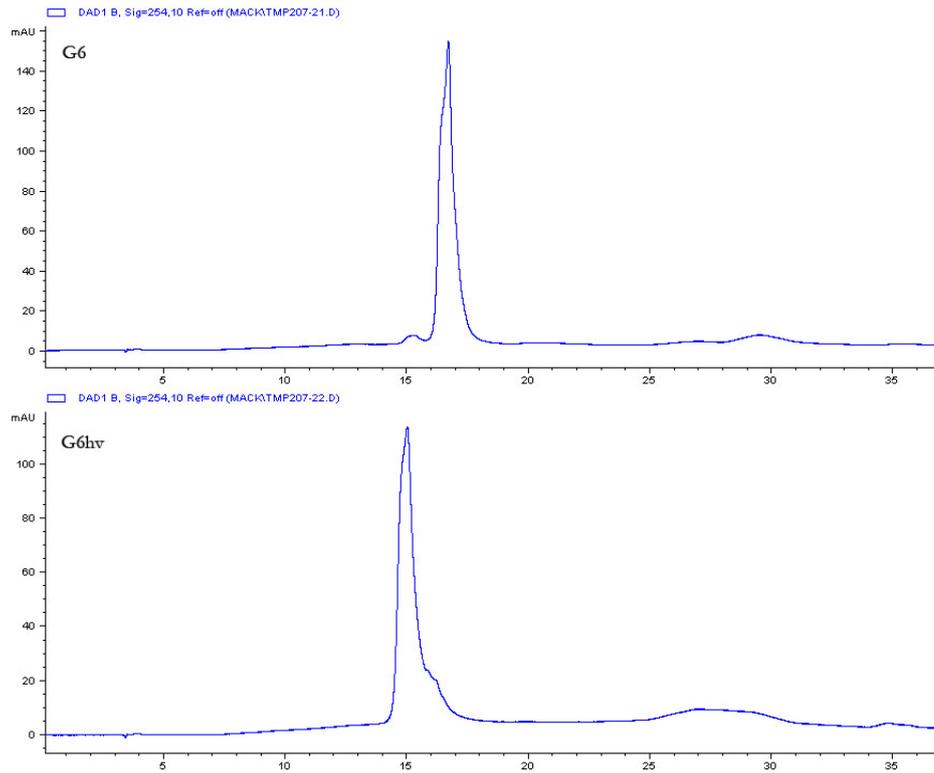
## 6 Anhang

### 6.1 Spektren

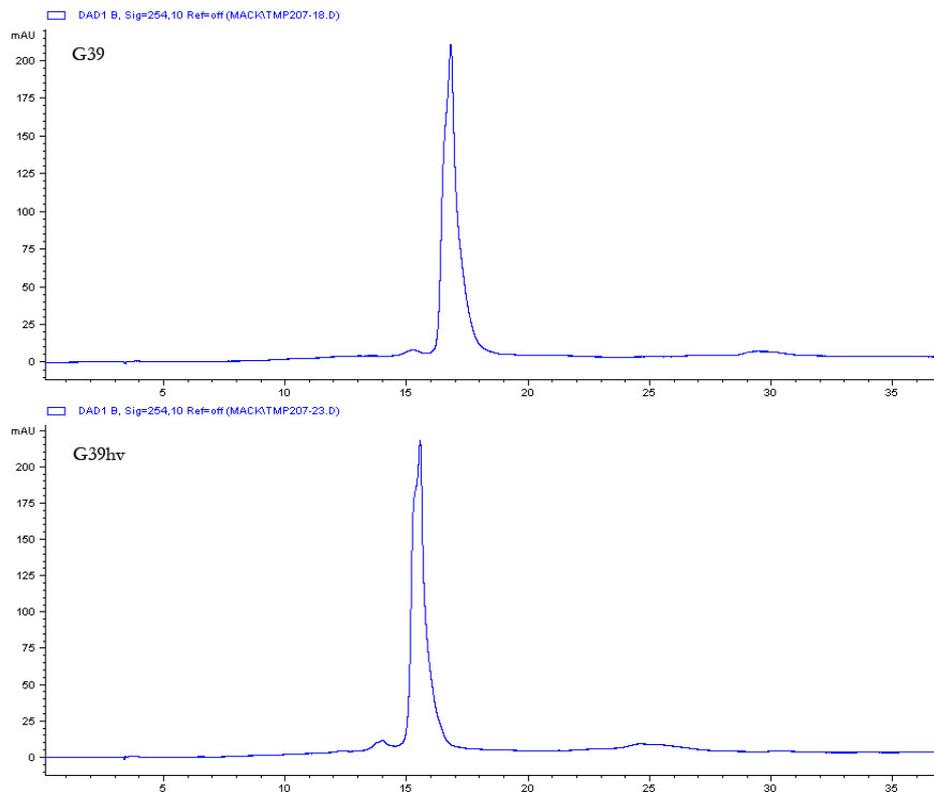
HPLC-Chromatogramme:



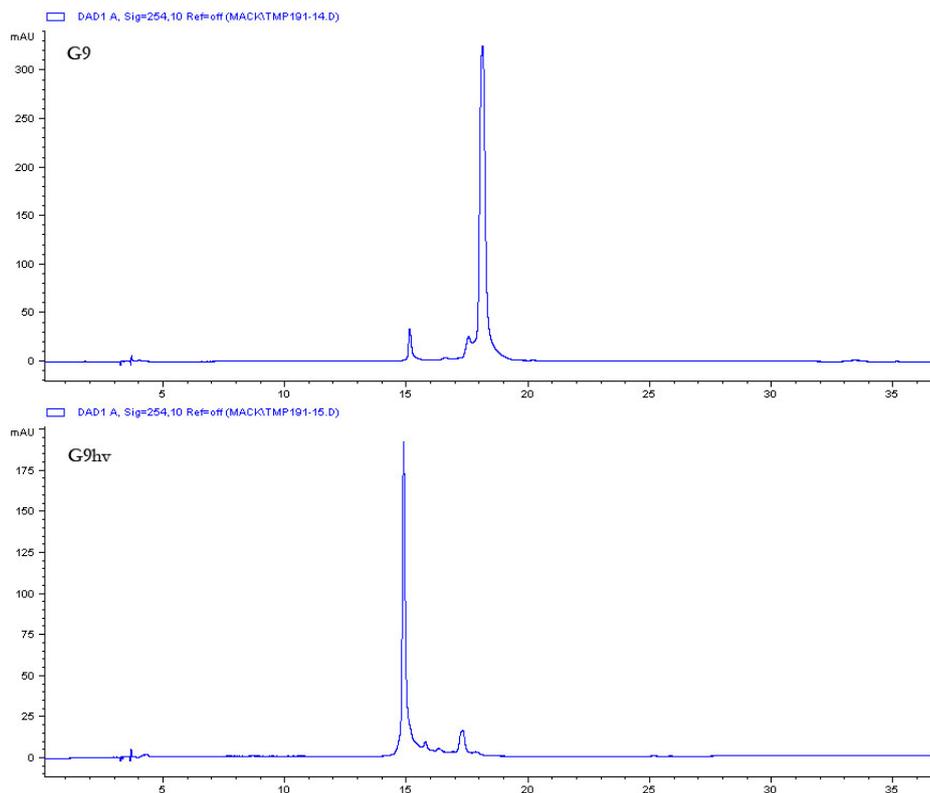
**Abbildung 103:** HPLC-Chromatogramme der C4-Aptamersequenz vor und nach dem Belichten. Gradient: 0'-2' 5 % MeCN (Puffer A), 2'-37' 5-40 % MeCN, jeweils in 0.1 M TEAA pH 7.4 (Puffer B).



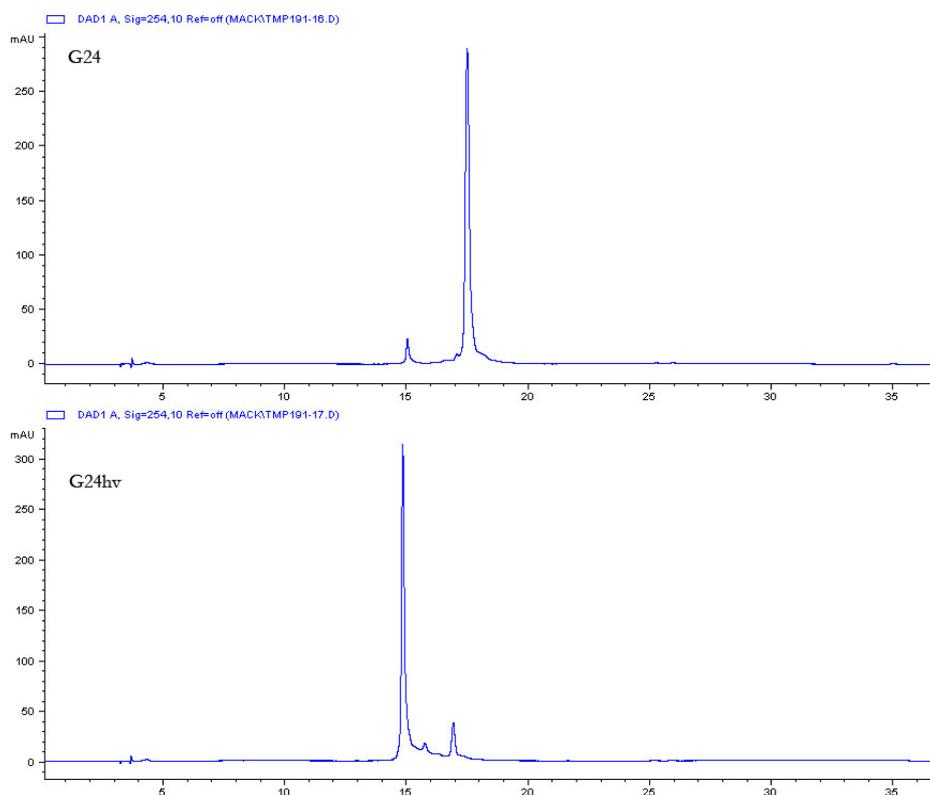
**Abbildung 104:** HPLC-Chromatogramme der **G6**-Aptamersequenz vor und nach dem Belichten. Gradient: 0'-2' 5 % MeCN (Puffer A), 2'-37' 5-40 % MeCN, jeweils in 0.1 M TEAA pH 7.4 (Puffer B).



**Abbildung 105:** HPLC-Chromatogramme der **G39**-Aptamersequenz vor und nach dem Belichten. Gradient: 0'-2' 5 % MeCN (Puffer A), 2'-37' 5-40 % MeCN, jeweils in 0.1 M TEAA pH 7.4 (Puffer B).



**Abbildung 106:** HPLC-Chromatogramme der **G9**-Aptamersequenz vor und nach dem Belichten. Gradient: 0'-2' 5 % MeCN (Puffer A), 2'-37' 5-40 % MeCN, jeweils in 0.1 M TEAA pH 7.4 (Puffer B).



**Abbildung 107:** HPLC-Chromatogramme der **G24**-Aptamersequenz vor und nach dem Belichten. Gradient: 0'-2' 5 % MeCN (Puffer A), 2'-37' 5-40 % MeCN, jeweils in 0.1 M TEAA pH 7.4 (Puffer B).

## 6.2 Abkürzungsverzeichnis

AMA	Ammoniak-Methylamin
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
AMP	Adenosinmonophosphat
ar	aromatisch
AS	Antisense
asDNA	antisenseDNA
AT	Antithrombin
ATP	Adenosintriphosphat
Bhc	6-Brom-7-hydroxy-4-methylcumarin
Bn	Benzyl
BOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat
BTT	5-Benzylthio-1 <i>H</i> -triazol
Bz	Benzoyl
CPG	controlled-pore glass
cpd	composite pulse decoupling
DABSYL	4- <i>N,N</i> -dimethylaminoazobenzon-4'-sulfonyl
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DEAD	Diethylazodicarboxylat
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMAP	4- <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMNPE	(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)ethan
DMS	Dimethylsulfid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTr	4,4'-Dimethoxytriphenylmethan
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSC	<i>N,N'</i> -Disuccinimidylcarbonat
dsDNA	double-stranded DNA
EDC	3-(Ethyliminomethylenamino)- <i>N,N</i> -dimethylpropyl-1-amin
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
eq	Äquivalent(e)
ETT	5-Ethylthio-1 <i>H</i> -tetrazol

---

FMN	Flavinmononukleotid
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
ges.	gesättigt
GFP	green fluorescent protein
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HCII	Heparin-Cofaktor II
HMPT	Hexamethylphosphorsäuretriamid
hNDBF	2-(3-Nitrodibenzofuran-2-yl)propyl
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	high pressure liquid chromatography
kat.	katalytische Menge
konz.	konzentriert
LCAA	long-chain aminoalkyl
LDA	Lithium- <i>N,N</i> -diisopropylamid
LNA	locked nucleic acid
MGMT	O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MNI	4-Methoxy-7-nitroindolinyl
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
MSNT	1-(2-Mesitylsulfonyl)-3-nitro-1 <i>H</i> -1,2,4-triazol
NaHMDS	Natriumhexamethyldisilazan
NB	Nitronbenzyl
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NDBF	1-(3-Nitrodibenzofuran-2-yl)ethyl
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMH	niedermolekulares Heparin
NMR	nuclear magnetic resonance
NPE	1-(2-Nitrophenyl)ethyl
NPP	2-(2-Nitrophenyl)propyl
nt	Nukleotid
ODN	oligodeoxynucleotide
PCR	polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglycol
pHP	<i>p</i> -Hydroxyphenacyl
ppm	parts per million
PS	Polystyren

---

PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tripyrrolidinphosphoniumhexafluorophosphat
RBS	ribosom binding-site
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-interference
RP	reversed phase
RT	Raumtemperatur
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment
siRNA	small-interfering RNA
ssDNA	single-stranded DNA
TAR	<i>trans</i> -activation response element
Tat	Trans-Activator of Transcription
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluorborat
TBDMS	<i>t</i> -Butyldimethylsilyl
TBDPS	<i>t</i> -Butyldiphenylsilyl
TEAA	Triethylammoniumacetat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
tom	[(Triisopropylsilyl)oxy]methyl
TPP	Thiaminpyrophosphat
Ts	<i>p</i> -Toluensulfonyl
TTA	Thrombin-Thrombinaptamer
TVT	Tiefe Venenthrombose
UFH	unfraktioniertes Heparin
UTR	Untranslated Region
UV	Ultraviolett
VEGF	vascular endothelial growth factor
v/v	Volumenverhältnis

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] J. A. Barltrop, P. Schofield, *Tetrahedron Lett.* **1962**, 697–699.
- [2] a) A. P. Pelliccioli, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 441–458. b) H.-M. Lee, D. R. Larson, D. S. Lawrence, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 409–427.
- [3] M. Goeldner (Ed.) *Dynamic studies in biology. Phototriggers, photoswitches and caged biomolecules*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [4] G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5020–5042.
- [5] J. H. Kaplan, B. Forbush, J. F. Hoffman, *Biochemistry* **1978**, *17*, 1929–1935.
- [6] S. R. Adams, J. P. Y. Kao, G. Gryniewicz, A. Minta, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3212–3220.
- [7] A. Momotake, N. Lindegger, E. Niggli, R. J. Barsotti, G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Meth.* **2006**, *3*, 35–40.
- [8] J. H. Kaplan, G. C. Ellis-Davies, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1988**, *85*, 6571–6575.
- [9] J. Engels, E. J. Schlaeger, *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 907–911.
- [10] Markus Alexander Schwörer, *Dissertation*, Universität Basel, **2004**.
- [11] M. Gaplovsky, Y. V. Il'ichev, Y. Kamdzhilov, S. V. Kombarova, M. Mac, M. A. Schworer, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4*, 33–42.
- [12] A. Hasan, K.-P. Stengele, H. Giegrich, P. Cornwell, K. R. Isham, R. A. Sachleben, W. Pfeleiderer, R. S. Foote, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 4247–4264.
- [13] S. Walbert, W. Pfeleiderer, U. E. Steiner, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 1601–1611.
- [14] R. Wieboldt, K. R. Gee, L. Niu, D. Ramesh, B. K. Carpenter, G. P. Hess, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 8752–8756.
- [15] R. S. Givens, C.-H. Park, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6259–6262.
- [16] R. S. Givens, A. Jung, C. Park, J. Weber, W. Bartlett, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8369–8370.
- [17] P. G. Conrad, R. S. Givens, J. F. W. Weber, K. Kandler, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1545–1547.
- [18] R. S. Givens, D. Heger, B. Hellrung, Y. Kamdzhilov, M. Mac, P. G. Conrad, E. Cope, J. I. Lee, J. F. Mata-Segreda, R. L. Schowen et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3307–3309.
- [19] R. S. Givens, B. Matuszewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6860–6861.
- [20] a) M. Lu, O. D. Fedoryak, B. R. Moister, T. M. Dore, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2119–2122. b) V. Hagen, B. Dekowski, N. Kotzur, R. Lechler, B. Wiesner, B. Briand, M. Beyermann, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1621–1627.
- [21] A. Z. Suzuki, T. Watanabe, M. Kawamoto, K. Nishiyama, H. Yamashita, M. Ishii, M. Iwamura, T. Furuta, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4867–4870.
- [22] a) V. Hagen, J. Bendig, S. Frings, T. Eckardt, S. Helm, D. Reuter, U. B. Kaupp, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1046–1048. b) V. Hagen, B. Dekowski, V. Nache, R. Schmidt, D. Geißler, D. Lorenz, J. Eichhorst, S. Keller, H. Kaneko, K. Benndorf et al., *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 8099–8104.
- [23] T. Furuta, S. S. H. Wang, J. L. Dantzker, T. M. Dore, W. J. Bybee, E. M. Callaway, W. Denk, R. Y. Tsien, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 1193–1200.
- [24] B. Schade, V. Hagen, R. Schmidt, R. Herbrich, E. Krause, T. Eckardt, J. Bendig, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9109–9117.

- [25] R. O. Schoenleber, B. Giese, *Synlett* **2003**, *2003*, 501–504.
- [26] Y. Shi, J. E. T. Corrie, P. Wan, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8278–8279.
- [27] M. Lukeman, J. C. Scaiano, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7698–7699.
- [28] T. Furuta, Y. Hirayama, M. Iwamura, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1809–1812.
- [29] G. Papageorgiou, A. Barth, J. E. Corrie, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4*, 216–220.
- [30] P. Klan, M. Zabadal, D. Heger, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1569–1571.
- [31] Y. Dorsett, T. Tuschl, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 318–329.
- [32] D. P. Bartel, *Cell* **2004**, *116*, 281–297.
- [33] S. T. Stanley T. Croke, *Curr. Mol. Med.* **2004**, *4*, 465–487.
- [34] D. S. Wilson, J. W. Szostak, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 611–647.
- [35] Y. S. Cho-Chung, Y. G. Park, Y. N. Lee, *Curr. Opin. Mol. Ther.* **1999**, *1*, 386–392.
- [36] M. C. Pirrung, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1326–1341.
- [37] W. T. Monroe, M. M. McQuain, M. S. Chang, J. S. Alexander, F. R. Haselton, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20895–20900.
- [38] H. Ando, T. Furuta, R. Y. Tsien, H. Okamoto, *Nat. Genet.* **2001**, *28*, 317–325.
- [39] S. Shah, S. Rangarajan, S. H. Friedman, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1352–1356.
- [40] R. A. Blidner, K. R. Svoboda, R. P. Hammer, W. T. Monroe, *Mol. Biosyst.* **2008**, *4*, 431–440.
- [41] S. G. Chaulk, A. M. Macmillan, *Nucl. Acids Res.* **1998**, *26*, 3173–3178.
- [42] S. Pitsch, P. A. Weiss, X. Wu, D. Ackermann, T. Honegger, *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1753–1761.
- [43] L. Kröck, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 471–473.
- [44] A. Heckel, G. Mayer, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 822–823.
- [45] G. Mayer, L. Kröck, V. Mikat, M. Engeser, A. Heckel, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1966–1970.
- [46] P. Wenter, B. Fürtig, A. Hainard, H. Schwalbe, S. Pitsch, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2600–2603.
- [47] C. Höbartner, S. K. Silverman, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7471–7475.
- [48] X. Tang, J. L. Richards, A. E. Peritz, I. J. Dmochowski, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 5303–5306.
- [49] L. Hrvoje, A. Deiters, *Synthesis* **2006**, 2147–2150.
- [50] H. Lusic, M. O. Lively, A. Deiters, *Molecular BioSystems* **2008**, *4*, 508–511.
- [51] D. D. Young, H. Lusic, M. O. Lively, J. A. Yoder, A. Deiters, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2937–2940.
- [52] V. Mikat, A. Heckel, *RNA* **2007**, *13*, 2341–2347.
- [53] a) K. Tanaka, A. Kuzuya, M. Komiyama, *Chem. Lett.* **2008**, *37*, 584–585. b) A. Kuzuya, F. Okada, M. Komiyama, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1924–1929.
- [54] D. D. Young, H. Lusic, M. O. Lively, A. Deiters, *Nucl. Acids Res.* **2009**, *37*, e58.
- [55] P. Ordoukhanian, J.-S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9570–9571.
- [56] X. Tang, J. Swaminathan, A. M. Gewirtz, I. J. Dmochowski, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 559–569.
- [57] M. Famulok, J. S. Hartig, G. Mayer, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3715–3743.
- [58] Günter Mayer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2672–2689.
- [59] D. H. J. Bunka, P. G. Stockley, *Nat. Rev. Micro.* **2006**, *4*, 588–596.
- [60] R. Stoltenburg, C. Reinemann, B. Strehlitz, *Biomol. Eng.* **2007**, *24*, 381–403.
- [61] C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505–510.
- [62] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818–822.
- [63] J. Colin Cox, Peter Rudolph, Andrew D. Ellington, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *14*, 845–850.
- [64] H. Ulrich, C. A. Trujillo, A. A. Nery, J. M. Alves, P. Majumder, R. R. Resende, A. H. Martins, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2006**, *9*, 619–632.
- [65] W. C. Winkler, R. R. Breaker, *Annu. Rev. Microbiol.* **2005**, *59*, 487–517.

- [66] a) G. Werstuck, M. R. Green, *Science* **1998**, 282, 296–298. b) B. Suess, J. E. Weigand, *RNA Biol.* **2008**, 5, 24–29.
- [67] J. N. Kim, R. R. Breaker, *Biol. Cell* **2008**, 100, 1–11.
- [68] A. Nahvi, J. E. Barrick, R. R. Breaker, *Nucl. Acids Res.* **2004**, 32, 143–150.
- [69] A. S. Mironov, I. Gusarov, R. Rafikov, Le Lopez, K. Shatalin, R. A. Kreneva, D. A. Perumov, E. Nudler, *Cell* **2002**, 111, 747–756.
- [70] J. Noeske, C. Richter, M. A. Grundl, H. R. Nasiri, H. Schwalbe, J. Wöhnert, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2005**, 102, 1372–1377.
- [71] D. Harrich, C. Ulich, L. F. Garcia-Martinez, R. B. Gaynor, *EMBO J* **1997**, 16, 1224–1235.
- [72] B. A. Sullenger, H. F. Gallardo, G. E. Ungers, E. Gilboa, *Cell* **1990**, 63, 601–608.
- [73] S. M. Nimjee, C. P. Rusconi, B. A. Sullenger, *Annu. Rev. Med.* **2005**, 56, 555–583.
- [74] C. Tuerk, S. MacDougall, L. Gold, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1992**, 89, 6988–6992.
- [75] H. Ulrich, M. H. Magdesian, M. J. Alves, W. Colli, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 20756–20762.
- [76] L. E. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, J. J. Toole, *Nature* **1992**, 355, 564–66.
- [77] J. C. Gilbert, T. DeFeo-Fraulini, R. M. Hutabarat, C. J. Horvath, P. G. Merlino, H. N. Marsh, J. M. Healy, S. BouFakhreddine, T. V. Holohan, R. G. Schaub, *Circulation* **2007**, 116, 2678–2686.
- [78] a) J. Ruckman, L. S. Green, J. Beeson, S. Waugh, W. L. Gillette, D. D. Henninger, L. Claesson-Welsh, N. Janjic, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 20556–20567. b) R. R. White, S. Shan, C. P. Rusconi, G. Shetty, M. W. Dewhirst, C. D. Kontos, B. A. Sullenger, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2003**, 100, 5028–5033.
- [79] M. F. Kubik, C. Bell, T. Fitzwater, Watson, SR, D. M. Tasset, *J. Immunol.* **1997**, 159, 259–267.
- [80] L. M. Alvarez-Salas, *Curr. Med. Chem.* **2008**, 8, 1379–1404.
- [81] Y.-L. Chiu, T. M. Rana, *RNA* **2003**, 9, 1034–1048.
- [82] a) Y. Huang, F. Eckstein, R. Padilla, R. Sousa, *Biochemistry* **1997**, 36, 8231–8242. b) J. Chelliserrykattil, A. D. Ellington, *Nat. Biotech.* **2004**, 22, 1155–1160.
- [83] B. Vester, J. Wengel, *Biochemistry* **2004**, 43, 13233–13241.
- [84] M. Frieden, H. F. Hansen, T. Koch, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2003**, 22, 1041–1043.
- [85] R. N. Veedu, B. Vester, J. Wengel, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 8124–8125.
- [86] R. N. Veedu, J. Wengel, *Molecular BioSystems* **2009**, 5, 787–792.
- [87] a) S. Kluzmann, A. Nolte, R. Bald, V. A. Erdmann, J. P. Furste, *Nat. Biotech.* **1996**, 14, 1112–1115. b) A. Vater, S. Klussmann, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2003**, 6, 253–261.
- [88] J. M. Healy, S. D. Lewis, M. Kurz, R. M. Boomer, K. M. Thompson, C. Wilson, T. G. McCauley, *Pharm. Res.* **2004**, 21, 2234–2246.
- [89] E. W. M. Ng, D. T. Shima, P. Calias, E. T. Cunningham, D. R. Guyer, A. P. Adamis, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, 5, 123–132.
- [90] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737–738.
- [91] A. M. Michelson, A. R. Todd, *J. Chem. Soc.* **1955**, 2632–2638.
- [92] R. L. Letsinger, V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 3526–3527.
- [93] R. L. Letsinger, K. K. Ogilvie, P. S. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 3360–3365.
- [94] H. G. Khorana, G. M. Tener, J. G. Moffatt, E. H. Pol, *Chem. Ind.* **1956**, 1523.
- [95] P. T. Gilham, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 6212–6222.
- [96] a) T. M. Jacob, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 2971–2981. b) H. Kossel, M. W. Moon, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 2148–2154.
- [97] H. G. Khorana, *Pure Appl. Chem.* **1968**, 17, 349–382.
- [98] S. S. Jones, B. Rayner, C. B. Reese, A. Ubasawa, M. Ubasawa, *Tetrahedron* **1980**, 36, 3075–85.

- [99] R. L. Letsinger, W. B. Lunsford, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 3655–3661.
- [100] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859–1862.
- [101] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [102] a) M. H. Caruthers, *Science* **1985**, *230*, 281–285. b) C. B. Reese, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8893–8920.
- [103] S. L. Beaucage, R. P. Iyer, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 2223–2311.
- [104] R. T. Pon, N. Usman, K. K. Ogilvie, *BioTechniques* **1988**, *6*, 768–775.
- [105] C. McCollum, A. Andrus, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4069–4072.
- [106] H. Seliger, K. C. Gupta, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1985**, *24*, 685–687.
- [107] Y. Hayakawa, R. Kawai, A. Hirata, J.-I. Sugimoto, M. Kataoka, A. Sakakura, M. Hirose, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8165–8176.
- [108] J. C. Schulhof, D. Molko, R. Teoule, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 397–416.
- [109] K. S. Lavery, T. H. King, *Current Opinion in Drug Discovery & Development* **2003**, *6*, 561–569.
- [110] A. Heckel, M. C. R. Buff, M.-S. L. Raddatz, J. Müller, B. Pöttsch, G. Mayer, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6900–6902.
- [111] T. Furuta, T. Watanabe, S. Tanabe, J. Sakyō, C. Matsuba, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4717–4720.
- [112] G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Meth.* **2007**, *4*, 619–628.
- [113] J. Müller, B. Wulffen, B. Pöttsch, G. Mayer, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2223–2226.
- [114] B. Forbush, J. H. Kaplan, J. F. Hoffman, *Biochemistry* **1978**, *17*, 3667–3676.
- [115] Y. Tsuji, S. Kotachi, K. T. Huh, Y. Watanabe, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 580–584.
- [116] L. H. K. Kröck, *Diplomarbeit*, Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn, **2004**.
- [117] R. O’Kennedy, R. D. Thornes, *Coumarins. Biology, applications, and mode of action*, Wiley, Chichester, **1997**.
- [118] J. Oldenburg, H. Seidel, B. Pöttsch, M. Watzka, *Hämostaseologie* **2008**, 44–50.
- [119] P. S. Mukherjee, T. H. Karnes, *Biomed. Chromatogr.* **1996**, *10*, 193–204.
- [120] X. Zhang, Z. Sui, *Synthesis* **2006**, *2006*, 2568–2572.
- [121] D. L. Chizhov, V. Y. Sosnovskikh, M. V. Pryadeina, Y. V. Burgart, V. I. Saloutin, V. N. Charushin, *Synlett* **2008**, *2008*, 281–285.
- [122] D. C. Dittmer, Q. Li, D. V. Avilov, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4682–4686.
- [123] H. v. Pechmann, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1884**, *17*, 929–936.
- [124] S. K. De, R. A. Gibbs, *Synthesis* **2005**, *2005*, 1231–1233.
- [125] S. Pitsch, P. A. Weiss, J. Luzi, A. Stutza, X. Wua, *Helvetica Chimica Acta* **2001**, *84*, 3773–3795.
- [126] W. Borsche, B. Schacke, *Ber. Dtsch. Chem. Ges. (A and B Series)* **1923**, *56*, 2498–2508.
- [127] L.-F. Tietze, T. Eicher, *Reaktionen und Synthesen im organisch-chemischen Praktikum und Forschungslaboratorium. 142 Syntheseschemata*, Thieme; Wiley-VCH, Weinheim, **2001**.
- [128] E. Clemmensen, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1914**, *47*, 51–63.
- [129] J. Burdon, R. C. Price, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1986**, 893–894.
- [130] J. H. Brewster, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 6364–6368.
- [131] W. W. Epstein, F. W. Sweat, *Chem. Rev.* **1967**, *67*, 247–260.
- [132] a) L. Lombardo, *Tetrahedron Letters* **1982**, *23*, 4293–4296. b) H. R. Chand, *Synlett* **2009**, 2545–2546.
- [133] A. M. Macmillan, G. L. Verdine, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5931–5933.
- [134] T. R. Webb, M. D. Matteucci, *Nucl. Acids Res.* **1986**, *14*, 7661–7674.
- [135] T. Huynh-Dinh, N. Duchange, M. M. Zakin, A. Lemarchand, J. Igolen, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1985**, *82*, 7510–7514.
- [136] C. B. Reese, P. A. Skone, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1984**, 1263–1271.
- [137] Y. Z. Xu, Q. Zheng, P. F. Swann, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3839–3845.
- [138] C. R. Allerson, S. L. Chen, G. L. Verdine, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7423–7433.

- [139] T. Shibata, N. Glynn, T. B. H. McMurry, R. S. McElhinney, G. P. Margison, D. M. Williams, *Nucl. Acids Res.* **2006**, *34*, 1884–1891.
- [140] Y.-Z. Xu, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 187–196.
- [141] Y.-Z. Xu, Q. Zheng, P. F. Swann, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 1729–1740.
- [142] E. Kierzek, R. Kierzek, *Nucl. Acids Res.* **2003**, *31*, 4461–4471.
- [143] S. Bae, M. K. Lakshman, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 782–789.
- [144] F. Albericio, L. A. Carpino in *Methods in Enzymology : Solid-Phase Peptide Synthesis* (Ed.: Gregg B. Fields), Academic Press, **1997**.
- [145] a) C. J. Larson, G. L. Verdine, *Nucl. Acids Res.* **1992**, *20*, 3525. b) C. H. Min, G. L. Verdine, *Nucl. Acids Res.* **1996**, *24*, 3806–3810.
- [146] a) A. E. Ferentz, T. A. Keating, G. L. Verdine, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9006–9014. b) C. R. Allerson, G. L. Verdine, *Chemistry & Biology* **1995**, *2*, 667–675. c) D. A. Erlanson, L. Chen, G.L. Verdine, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12583–12584.
- [147] M. Acedo, C. Fabrega, A. Aviho, M. Goodman, P. Fagan, D. Wemmer, R. Eritja, *Nucl. Acids Res.* **1994**, *22*, 2982–2989.
- [148] I. Luyten, P. Herdewijn, *European Journal of Medicinal Chemistry* **1999**, *33*, 515–576.
- [149] a) E. M. Duguid, Y. Mishina, C. He, *Chemistry & Biology* **2003**, *10*, 827–835. b) E. M. Duguid, P. A. Rice, C. He, *J. Mol. Biol.* **2005**, *350*, 657–666.
- [150] U. K. Shigdel, J. Zhang, C. He, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 90–93.
- [151] M. C. R. Buff, F. Schäfer, B. Wulffen, J. Müller, B. Pöttsch, A. Heckel, G. Mayer, *Nucl. Acids Res.* **2010**, *38*, 2111–2118
- [152] M. H. Caruthers, *Science* **1985**, *230*, 281–285.
- [153] M. Smith, D. H. Rammler, I. H. Goldberg, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 430–440.
- [154] H.-J. Fritz, W. Frommer, W. Kramer, W. Werr in *Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments: A Laboratory Manual* (Eds.: H.-G. Gassen, A. Lang), Verlag Chemie, Weinheim, **1982**.
- [155] R. Damoiseaux, A. Keppler, K. Johnsson, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 285–287.
- [156] O. Mitsunobu, *Synthesis* **1981**, *1981*, 1–28.
- [157] J. R. Quinn, S. C. Zimmerman, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7459–7467.
- [158] H. P. Daskalov, M. Sekine, T. Hata, *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1981**, *54*, 3076–3083.
- [159] M. C. R. Buff, *Dissertation*, Universität Frankfurt a. M., in Vorbereitung
- [160] M. C. R. Buff, *Diplomarbeit*, Universität Bonn, **2005**.
- [161] P. Potier, A. Abdennaji, J.-P. Behr, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 4188–4194.
- [162] T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective groups in organic synthesis*, Wiley-Interscience, Hoboken, NJ, **2002**.
- [163] M. P. Reddy, N. B. Hanna, F. Farooqui, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4311–4314.
- [164] C. Özcoban, *Diplomarbeit*, Universität Frankfurt a.M., **2010**.
- [165] L. C. J. Gillet, O. D. Scharer, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 4205–4208.
- [166] a) H. Lusic, D. D. Young, M. O. Lively, A. Deiters, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1903–1906. b) D. D. Young, W. F. Edwards, H. Lusic, M. O. Lively, A. Deiters, *Chem. Comm.* **2008**, 462–464.
- [167] J. A. Huntington, *J. Thromb. Haemost.* **2005**, *3*, 1861–1872.
- [168] a) F. Duckert, *Chem. unserer Zeit* **1975**, *9*, 1–9. b) Klaus Roth, *Chem. unserer Zeit* **2004**, *38*, 426–433. c) Johannes Oldenburg, Hans-Jörg Hertfelder, *Pharm. unserer Zeit* **2006**, *35*, 20–28.
- [169] T. E. Adams, J. A. Huntington, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2006**, *26*, 1738–1745.
- [170] C. Kettner, E. Shaw in *Methods in Enzymology : Proteolytic Enzymes, Part C* (Ed.: Laszlo Lorand), Academic Press, **1981**.
- [171] C. J. Murray, A. D. Lopez, *The Lancet* **1997**, *349*, 1269–1276.
- [172] K. Rehse, *Pharm. unserer Zeit* **1975**, *4*, 1–9.

- [173] D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, A. G. Beck-Sickinger, *Lehrbuch der Biochemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [174] S. Harder, H. K. Breddin, *Pharm. unserer Zeit* **2004**, *33*, 172–180.
- [175] T. M. Hyers, G. Agnelli, R. D. Hull, T. A. Morris, M. Samama, V. Tapson, J. G. Weg, *Chest* **2001**, *119*, 176S–193S.
- [176] S. Klumpp, *Pharm. unserer Zeit* **1992**, *21*, 37–41.
- [177] Johannes Dodt, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 948–962.
- [178] F. Markwardt, *Thromb. Res.* **1994**, *74*, 1–23.
- [179] H. van Aken, C. Bode, H. Darius, C. Diehm, M. Encke, D. C. Gulba, S. Haas, W. Hacke, W. Puhl, M. Quante et al., *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* **2001**, *7*, 195–204.
- [180] C. A. Kretz, A. R. Stafford, J. C. Fredenburgh, J. I. Weitz, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 37477–37485.
- [181] R. F. Macaya, P. Schultze, F. W. Smith, J. A. Roe, J. Feigon, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 3745–3749.
- [182] J. I. Weitz, M. Hudoba, D. Massel, J. Maraganore, J. Hirsh, *J. Clin. Invest.* **1990**, *86*, 385–391.
- [183] A. Schwienhorst, *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 2773–2791.
- [184] C. P. Rusconi, E. Scardino, J. Layzer, G. A. Pitoc, T. L. Ortel, D. Monroe, B. A. Sullenger, *Nature* **2002**, *419*, 90–94.
- [185] W. A. Pieken, D. B. Olsen, F. Benseler, H. Aurup, F. Eckstein, *Science* **1991**, *253*, 314–317.
- [186] C. K. Dyke, S. R. Steinhubl, N. S. Kleiman, R. O. Cannon, L. G. Aberle, M. Lin, S. K. Myles, C. Melloni, R. A. Harrington, J. H. Alexander et al., *Circulation* **2006**, *114*, 2490–2497.
- [187] A. Bullen, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 54–67.
- [188] W. R. Zipfel, R. M. Williams, W. W. Webb, *Nat. Biotech.* **2003**, *21*, 1369–1377.
- [189] D. M. Tasset, M. F. Kubik, W. Steiner, *J. Mol. Biol.* **1997**, *272*, 688–698.
- [190] F. A. L. M. Eskens, *Br. J. Cancer* **2004**, *90*, 1–7.
- [191] J. Folkman, M. Bach, J. W. Rowe, F. Davidoff, P. Lambert, C. Hirsch, A. Goldberg, H. H. Hiatt, J. Glass, E. Henshaw, *N. Engl. J. Med.* **1971**, *285*, 1182.
- [192] V. Almendro, P. Gascón, *Clin. Transl. Oncol.* **2006**, *8*, 475–481.
- [193] a) A. Laurent, *Tech. Vasc. Interv. Radiol.* **2007**, *10*, 248–256. b) P. E. Andersen, N. Lund, P. Justesen, T. Munk, B. Elle, C. Floridon, *Acta Radiol.* **2001**, *42*, 234–238.
- [194] K. Stuart, *Oncologist* **2003**, *8*, 425–437.
- [195] A. K. Ghosh, T. T. Doung, S. P. McKee, W. J. Thompson, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2781–2784.
- [196] G. T. Hermanson, *Bioconjugate techniques*, Acad. Press, San Diego, **2007**.
- [197] a) D. H. Rich, S. K. Gurwara, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1973**, 610–611. b) C. G. Bochet, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 125–142.
- [198] a) H. Ruparel, L. Bi, Z. Li, X. Bai, D. H. Kim, N. J. Turro, J. Ju, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 5932–5937. b) J. Guo, N. Xu, Z. Li, S. Zhang, J. Wu, D. H. Kim, M. Sano Marma, Q. Meng, H. Cao, X. Li et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 9145–9150.
- [199] R. Lemaire, J. Stauber, M. Wisztorski, C. van Camp, A. Desmons, M. Deschamps, G. Proess, I. Rudlof, A. S. Woods, R. Day et al., *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 2057–2067.
- [200] M. J. Thompson, P. J. Zeegers, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 2661–2674.
- [201] H. Nemoto, H. Ishibashi, M. Nagamochi, K. Fukumoto, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1707–1712.
- [202] Sigrid Bühler, Irene Lagoja, Heiner Giegrich, Klaus-Peter Stengele, Wolfgang Pfeleiderer, *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, 620–659.
- [203] H. A. Fahim, A. M. Fleifel, *J. Chem. Soc.* **1952**, 4519–4521.
- [204] A. Bianco, P. Passacantilli, G. Righi, *Synth. Comm.* **1988**, *18*, 1765–1771.
- [205] E. Valeur, M. Bradley, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606–631.
- [206] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067–1068.

- [207] A. Williams, I. T. Ibrahim, *Chem. Rev.* **1981**, *81*, 589–636.
- [208] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788–798.
- [209] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397–4398.
- [210] V. Dourtoglou, J.-C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 1269–1272.
- [211] J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205–208.
- [212] L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mügge et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 441–445.
- [213] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927–1930.
- [214] J. Olejnik, E. Krzymanska-Olejnik, K. J. Rothschild, *Nucl. Acids Res.* **1998**, *26*, 3572–3576.
- [215] X. Bai, Z. Li, S. Jockusch, N. J. Turro, J. Ju, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 409–413.
- [216] J. Olejnik, H. C. Ludemann, E. Krzymanska-Olejnik, S. Berkenkamp, F. Hillenkamp, K. J. Rothschild, *Nucl. Acids Res.* **1999**, *27*, 4626–4631.
- [217] E. Jablonski, E. W. Moomaw, R. H. Tullis, J. L. Ruth, *Nucl. Acids Res.* **1986**, *14*, 6115–6128.
- [218] R. A. Reyes, G. L. Cockerell, *Nucl. Acids Res.* **1993**, *21*, 5532–5533.
- [219] M. Göppert-Mayer, *Ann. Phys.* **1931**, *401*, 273–294.
- [220] W. Kaiser, C. G. B. Garrett, *Phys. Rev. Lett.* **1961**, *7*, 229.
- [221] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512–7515.
- [222] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *The Journal of Organic Chemistry* **1978**, *43*, 2923–2925.
- [223] S. Natori, *Pharmaceutical bulletin* **1957**, *5*, 553–560.
- [224] D. M. Noll, A. M. Noronha, P. S. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3405–3411.
- [225] R. Sarges, R. F. Hank, J. F. Blake, J. Bordner, D. L. Bussolotti, D. M. Hargrove, J. L. Treadway, E. M. Gibbs, *Journal of Medicinal Chemistry* **1996**, *39*, 4783–4803.
- [226] M. J. Thompson, P. J. Zeegers, *Tetrahedron Letters* **1988**, *29*, 2471–2474.



## 8 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Alexander Heckel für die sehr interessante Aufgabenstellung, stets hervorragende Unterstützung und die Sorge um das leibliche wie auch seelische Wohl seiner Mitarbeiter.

Herrn Prof. Dr. Joachim W. Engels danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein großer Dank geht an Prof. Dr. Günter Mayer und Dr. Jens Müller für die hervorragende und erfolgreiche Zusammenarbeit sowie erkenntnisreiche Diskussionen.

Allen Mitgliedern des AK Heckel sei Dank gesagt für das gute Arbeitsklima und die gemeinsame, freundschaftliche Zusammenarbeit. Im Besonderen danke ich Florian Schäfer und Clara Menge für das Korrekturlesen dieser Arbeit, Martin Held für tatkräftige Hilfe bei Kämpfen mit der HPLC und Maximilian Buff für gute Gespräche und ausreichende Schokoladenversorgung.

Dr. Uwe Hener und Andreas Münch danke ich für die Unterstützung bei der Anfertigung von Massenspektren.

Vielen Dank meinen hilfreichen Praktikanten Alex Rodrigues Correia, Ingrid Kleinschmidt und Tarek Abu-Husein für ihre engagierte und sorgfältige Arbeit.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden, die mich bedingungslos unterstützt und in schwierigen Zeiten ermutigt haben.

Der größte Dank geht an Vera. Sie hat so manche Laune geduldig ertragen. Danke, meine Mus!



## 9 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name	Timo Mack
geboren am	4. Februar 1980 in Köln
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Ausbildung

seit 08/2006	Promotionsstudium der Chemie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn und der Goethe-Universität Frankfurt a.M. <i>Titel der Dissertation:</i> Synthese photolabil geschützter Desoxyribonukleoside und Anwendung photoaktivierbarer Aptamersequenzen zur Regulation von $\alpha$ -Thrombin (bei Prof. Dr. A. Heckel)
10/2005 – 07/2006	Projektarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. K. Sandhoff, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
10/2000 – 09/2005	Studium der Chemie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Abschluss: Diplom <i>Titel der Diplomarbeit:</i> Funktionalisierte Polyamine als molekulare Transporter (bei Prof. Dr. K. Sandhoff)
08/1999 – 06/2000	Zivildienst beim Landschaftsverband Rheinland in einer Wohngruppe für Menschen mit geistiger Behinderung
09/1990 – 05/1999	Anno-Gymnasium in Siegburg. Abschluss: Abitur

**Wissenschaftliche Publikationen & Stipendien**

Stipendien	Diplomstipendium der Theodor-Laymann-Stiftung
Erstveröffentlichungen	G. Mayer, J. Müller, <u>T. Mack</u> , A. Heckel et al.; Differential Regulation of Protein Subdomain Activity with Caged Bivalent Ligands, <i>ChemBioChem</i> 2009, 10(4), 654-657
	<u>T. Mack</u> , C. Özcoban, A. Heckel et al.; A new caged nucleotide for selective uncaging, <i>eingereicht</i>
	A. Rodrigues-Correia, M. B. Koeppel, F. Schäfer, K. B. Joshi, <u>T. Mack</u> , A. Heckel; Comparison of the duplex destabilizing effects of nucleobase-caged oligonucleotides, <i>eingereicht</i>
Reviews	M. Buff, <u>T. Mack</u> , A. Heckel, Light-activatable nucleic acids "caged" at the nucleobases, <i>Chimia</i> 2009, 63(5), 261-264

„Holzhacken ist deshalb so beliebt, weil man bei dieser Tätigkeit den Erfolg sofort sieht“

- Albert Einstein -