

11. OLIGONUCLEOTIDSYNTHESEN UNTER VERWENDUNG DER ISOXANTHOPTERIN-PHOSPHITAMIDE 127 UND 128

Um die Anwendbarkeit der beiden neu dargestellten Isoxanthopterin-Bausteine **127** und **128** zu überprüfen, wurden im Anschluß an ihre Synthesen einige Oligonucleotid-Synthesen unter Verwendung der beiden Phosphitamide durchgeführt.

11.1. Die Wahl der Zielsequenz

Aufgrund der vergleichsweise niedrigen Ausbeuten in den letzten Stufen während der Darstellung der beiden Phosphitamide stand nur wenig Material zur Verfügung. Daher wurde für die Versuche zur Oligonucleotid-Synthese eine Sequenz ausgewählt, von welcher ausreichend experimentelle Vergleichs-Daten bekannt waren.

Die Wahl fiel dabei auf ein 21-mer, welche dem 3'-Endstück der terminalen U5-Sequenz des HIV-Genoms entspricht. Die Basensequenz dieses Oligomers ist in Abb.11.1 angegeben.



Abb.11.1 : 21-mer Zielsequenz (**129**) mit Nummerierung der Guanin-Positionen

Wie bereits in Kapitel 1.3. angesprochen, wurde auf Basis dieser Sequenz, bzw. der an der G⁶-Position mit 3-Methylisoxanthopterin (3-MI) modifizierten Variante (Abb.11.2), ein Echt-Zeit-Assay für Inhibitoren der HIV-1 Integrase entwickelt^[105].

Die HIV-1-Integrase ist für den Einbau der viralen DNA in das Erbgut der Wirtszelle verantwortlich. Der erste Schritt dieses Prozesses (Integrase-3'-Processing) ist die Abspaltung des 3'-terminalen Dinucleotids d(GT) aus dem doppelsträngigen HIV-Genom.



Abb.11.2 : 3-MI-modifizierte Sequenz (**F** : 3-Methylisoxanthopterin-Position) für den HIV-1-Integrase Assay nach Hawkins et. al.^[105]

Im Assay wird nun anstelle der natürlichen HIV-DNA ein analoges, mit dem 3-MI modifiziertes 21-meres Substrat zugesetzt. Die Abspaltung des 3'-terminalen Dinucleotids durch die Integrase (Abb.11.3) setzt ein Dimer frei, welches den Fluorophor trägt. Fluorophore reagieren sehr sensitiv auf Änderungen in ihrer unmittelbaren Umgebung. Die Positionierung eines Fluoreszenz-Markers direkt im Basenstapel des Doppelstranges führt zu einer starken

Löschung der Fluoreszenz, verglichen mit dem monomeren Baustein. Folglich ergibt die Abspaltung und Freisetzung des Dinucleotids eine Intensitätszunahme, welche sich aufgrund der sehr empfindlichen Detektionsmethoden auch bei geringen Konzentrationen messen läßt. Ein weiterer Vorteil im Vergleich zur üblichen ^{32}P -Markierung liegt darin, daß sich die Fluoreszenzintensität, und somit der Reaktionsverlauf, in einfacher Weise kontinuierlich verfolgen läßt. Dies erlaubt die Automatisierung und somit die Anwendung des Assays zum Screening auf Inhibitoren der HIV-1 Integrase, was mit radioaktiver Markierung nicht möglich ist.

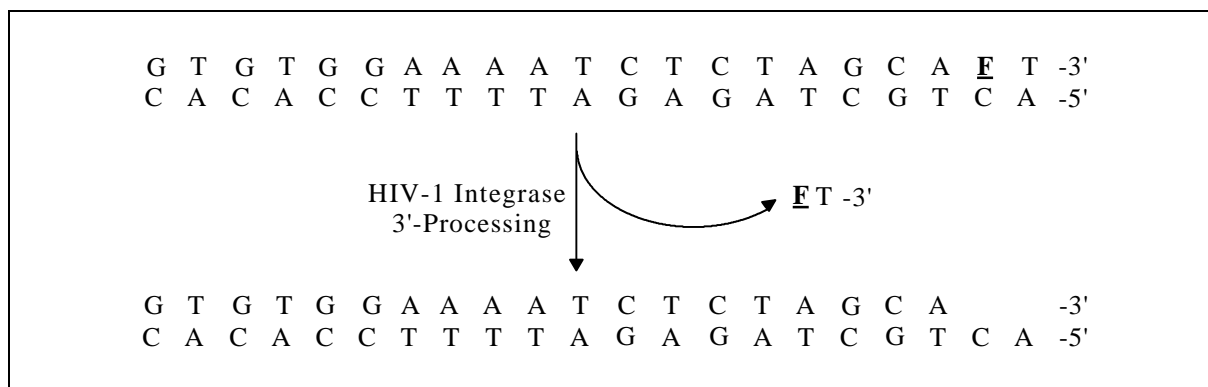


Abb.11.3 : Die 3'-Processing-Reaktion mit dem 3-MI-Markierten Oligomer (**F**= 3-MI)

Die Methode wurde 1995 von M.E.Hawkins et al.^[105] am National Cancer Institute in den USA entwickelt und zeigt die Anwendbarkeit und das Potential, welches Isoxanthopterin-Nucleoside als Oligonucleotid-Marker in sich bergen können.

Neben der in Abb.11.2. gezeigten Modifikation wurden auch Oligomere mit 3-MI-Substitution an den anderen fünf Guanin-Positionen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, daß die Positionierung im Strang, also die Art der benachbarten heterocyclischen Basen, einen Einfluß auf die relative Fluoreszenz-Quantenausbeute besitzt. So nimmt die Quantenausbeute mit der Anzahl benachbarter Purine deutlich ab. Ein vergleichbares Ergebnis wurde auch bereits von Rösler beim Einbau von Lumazinen anstelle des Thymins berichtet.

11.2. Erste Modell-Synthesen

In zwei ersten Modell-Synthesen wurde der 6-Phenylisoxanthopterin-Baustein **128** hinsichtlich Kondensationseigenschaften und Stabilität gegenüber den normalerweise verwendeten Abspaltungsbedingungen für β -eliminierbare Schutzgruppen (1M DBU für ca.11h) getestet.

Dazu wurden die beiden neunmeren Thymidin-Sequenzen **130** und **131** synthetisiert (Tab.11.1), bei denen an verschiedenen Positionen jeweils **128** anstelle eines dT-Bausteins eingebaut wurde. Das Thymidin benötigt bei der Oligonucleotid-Synthese keine Schutzgruppen am Aglycon. Daher konnte auf diesem Wege auch die Vollständigkeit der Abspaltung der NPE-Schutzgruppe des 6-Phenylisoxanthopterin-Bausteins getestet werden, da keine Störungen durch andere Schutzgruppen zu beachten waren.

Bei der Darstellung von **130** und **131** wurde das Syntheseprogramm „Cyc10 user“ verwendet, dessen wichtigste Eckdaten im Kurzschemata in Tabelle 10.3 in Kapitel 10 zusammengefaßt wurden. In der folgenden Tabelle 11.1. sind die Sequenzen der beiden Oligomere **130** und **131**, sowie die Kondensationsausbeuten für den 6-Phenylisoxanthopterin-Baustein (dF^P), die durchschnittliche Ausbeute pro Kondensationsschritt (stepwise) und die Gesamtausbeute (overall) zusammengefaßt. Die entsprechenden Ausbeuten ergaben sich durch die Tritylwert-Bestimmungen bei der TCA-Behandlung.

Name	Sequenz	Kondensationsausbeuten		
		dF^P	stepwise	overall
130	d(TTT <u>TF^P</u> T TTT)	91,6 %	95,4 %	68,7 %
131	d(TTT TTT <u>TF^P</u> T)	100 %	95,4 %	68,7 %

Tab.11.1 : Testsequenzen **130** und **131**, F^P: 6-Phenylisoxanthopterin

Nach Beendigung der Synthesen von **130** und **131** wurde das Trägermaterial getrocknet, und auf jeweils drei neue Säulen verteilt. Die drei Proben wurden unterschiedlichen Abspaltungsroutinen unterworfen, um zu prüfen, inwieweit die NPE-Schutzgruppe des Bausteins **128** am fertigen Oligomer unter den üblichen Bedingungen abgespalten wird.

Dabei zeigte sich, daß sowohl unter Standard-Bedingungen (1 M BDU für 11h), als auch bei geringerer DBU-Konzentration (0,1 M DBU für 11h) bzw. bei kürzerer Behandlungszeit (1 M DBU für 2h) jeweils identische HPL-Chromatogramme der Abspaltlösungen erhalten wurden. Auch eine Verlängerung der Trägerabspaltung ergab keine Änderung des nach den Standard-Methoden erhaltenen Ergebnisses. Eine Probe der Sequenz **131** lieferte sowohl nach 1h als auch nach 12h in konzentriertem Ammoniak (25%) identische HPL-Chromatogramme.

Dies bedeutet, daß zur Darstellung von isoxanthopterin-mofizierten Oligonucleotiden unter Verwendung der beiden Bausteine **127** und **128**, was Schutzgruppen- bzw. Trägerabspaltung betrifft, die üblichen Bedingungen angewandt werden können.

Allerdings müssen die Kondensationszeiten gegenüber dem verwendeten Cyc10 user (59s) erhöht werden, da insbesondere bei der Darstellung von **130** die Kondensationsausbeute des Markerbausteins mit nur 91.6% zu niedrig lag. Diese ungenügende Kondensation zeigt sich durch das Auftreten von Fehlsequenzen im HPLC.

Die in Abb.11.4 gezeigten Chromatogramme stammen aus den Schutzgruppenabspaltungen unter Standard-Bedingungen (1 M DBU für 11h und Trägerabspaltung mit Ammoniak(25%) für 1h). Die nach Variation der Bedingungen von Schutzgruppen- bzw. Trägerabspaltung erhaltenen Chromatogramme waren annähernd identisch.



Abb.11.4 : HPL-Chromatogramm der Sequenz **130** (1M DBU(11h), 25%-ige NH₃(1h), Standard-Gradient, RP-18-Säule)

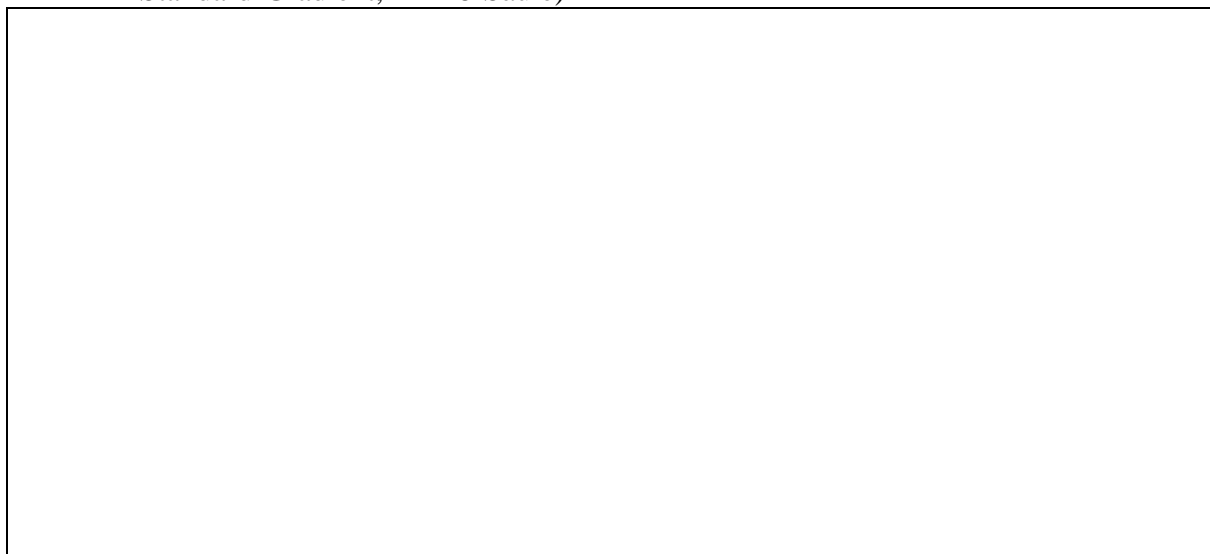


Abb.11.5 : HPL-Chromatogramm der Sequenz **131** (1M DBU(11h), 25%-ige NH₃(1h), Standard-Gradient, RP-18-Säule)

In beiden Chromatogrammen sind auch Peaks sichtbar, welche erst nach dem Hauptprodukt eluieren. Normalerweise werden diese Signale einer unvollständigen Schutzgruppenabspaltung zugeschrieben. Da jedoch die Variationen der Bedingungen bei diesem Prozeß keinen Einfluß auf diese Peaks ergab, ist diese Annahme auszuschließen (vergleiche auch Kap.11.4).

11.3. Synthese der 21-meren Sequenzen

Nach den Ergebnissen der Testsynthesen wurde für die Darstellung der länger-kettigen Oligonucleotide das Syntheseprogramm „Cyc04 user“ von Charubala¹⁹⁷¹ verwendet. Dieses Programm beinhaltet einen zusätzlichen zweiten Kondensationsschritt, der die Kondensationszeit pro Synthesecyclus annähernd verdoppelt.

Es wurden insgesamt dreizehn Oligonucleotide mit zu **129** analoger Sequenz synthetisiert, bei denen jeweils eines, in einem Fall auch zwei, der Guanine (in den Positionen G¹-G⁶) durch einen Isoxanthopterin- (F^H) oder 6-Phenylisoxanthopterin-Baustein (F^P) (**127** oder **128**) ersetzt wurde. Die Tabelle 11.2 gibt einen Überblick über die dargestellten Sequenzen und die mittels der Tritylwerte bestimmten Kondensationsausbeuten.

Nr.	Sequenz	dF	stepw.	overall
132	5'> <u>F^H</u> TG TGG AAA ATC TCT AGC AGT <3'	98,5 %	98,5 %	74,1 %
133	5'> G <u>T</u> F ^H TGG AAA ATC TCT AGC AGT <3'	90,8 %	91,7 %	17,6 %
134	5'> GTG <u>T</u> F ^H G AAA ATC TCT AGC AGT <3'	92,4 %	95,7 %	41,5 %
135	5'> GTG T <u>G</u> F ^H AAA ATC TCT AGC AGT <3'	91,2 %	92,4 %	20,6 %
136	5'> GTG TGG AAA ATC TCT <u>A</u> F ^H C AGT <3'	93,3 %	98,2 %	70,0 %
137	5'> GTG TGG AAA ATC TCT AGC <u>A</u> F ^H T <3'	100 %	98,1 %	68,0 %
138	5'> <u>F^P</u> TG TGG AAA ATC TCT AGC AGT <3'	96,4 %	96,8 %	52,3 %
139	5'> G <u>T</u> F ^P TGG AAA ATC TCT AGC AGT <3'	97,1 %	97,3 %	58,4 %
140	5'> GTG <u>T</u> F ^P G AAA ATC TCT AGC AGT <3'	98,0 %	98,4 %	72,3 %
141	5'> GTG T <u>G</u> F ^P AAA ATC TCT AGC AGT <3'	97,8 %	97,9 %	65,2 %
142	5'> GTG TGG AAA ATC TCT <u>A</u> F ^P C AGT <3'	96,8 %	94,1 %	29,8 %
143	5'> GTG TGG AAA ATC TCT AGC <u>A</u> F ^P T <3'	100 %	98,5 %	73,2 %
144	5'> GTG <u>T</u> F ^P <u>F</u> ^P AAA ATC TCT AGC AGT <3'	96,8 % 97,0 %	97,1 %	55,8 %

Tab. 11.2 : Kondensationsausbeuten bei der Darstellung der 21-meren Isoxanthopterinmodifizierten Oligonucleotide **132-144** (F^H = Isoxanthopterin, F^P = 6-Phenylisoxanthopterin); dF : Einbau von **127** bzw. **128**, stepw. : durchschnittliche schrittweise Ausbeute, overall : Gesamtausbeute an Oligomer, bestimmt jeweils über die Tritylwerte.

11.4. Qualität der durchgeführten Synthesen

Die Überprüfung der Qualität der erhaltenen Oligonucleotide erfolgte über das HPLC der Rohprodukte. Fehlsequenzen, welche auf unvollständiger Kondensation während der Synthese beruhen, werden im HPLC früher eluiert als das Hauptprodukt. Dagegen ergibt eine unvollständige Schutzgruppenabspaltung später eluierende Peaks.

Zur Beurteilung der Synthesequalität der von ihm dargestellten Oligonucleotide verwendete Wagner^[365] folgende Einstufungen, nach welchen auch in Tabelle 11.3 die Beurteilung der Synthesen von **132-144** erfolgte :

- 1 : reines Produkt
- 1-2 : schwache Verunreinigungen durch früher und/oder später eluierende Peaks
- 2 : stärkere Verunreinigungen als bei 1-2
- 2-3 : noch stärkere Verunreinigungen als bei 2, meist wegen schlechterer Kondensation
- 3 : sehr starke Verunreinigung durch Fehlsequenzen und unvollständige Abspaltung der Schutzgruppen

Nr.	Sequenz	Qualität
132	5'> F^H TG TGG AAA ATC TCT AGC AGT <3'	3
133	5'> GT F^H TGG AAA ATC TCT AGC AGT <3'	1-2
134	5'> GTG T F^H G AAA ATC TCT AGC AGT <3'	1-2
135	5'> GTG T GF^H AAA ATC TCT AGC AGT <3'	1-2
136	5'> GTG TGG AAA ATC TCT AF^HC AGT <3'	2
137	5'> GTG TGG AAA ATC TCT AGC AF^HT <3'	1
138	5'> F^P TG TGG AAA ATC TCT AGC AGT <3'	3
139	5'> GT F^P TGG AAA ATC TCT AGC AGT <3'	1-2
140	5'> GTG T F^P G AAA ATC TCT AGC AGT <3'	2
141	5'> GTG T GF^P AAA ATC TCT AGC AGT <3'	1-2
142	5'> GTG TGG AAA ATC TCT AF^PC AGT <3'	2
143	5'> GTG TGG AAA ATC TCT AGC AF^PT <3'	1-2
144	5'> GTG T F^PF^P AAA ATC TCT AGC AGT <3'	2

Tab. 11.3 : Synthesequalität der Darstellungen der 21-meren isoxanthopterinmodifizierten Oligonucleotide **132-144** (**F^H** = Isoxanthopterin, **F^P** = 6-Phenylisoxanthopterin)

Wie sich der Tabelle 11.3 entnehmen läßt, schwanken die Ergebnisse der Synthesen stark und zeigen keine unbedingte Korrelation zu den ersten Anhaltspunkten aus den Kondensationsausbeutebestimmungen über die Tritylwerte. Die schlechtesten Ergebnisse nach dem HPLC wurden bei den zwei Sequenzen mit endständigem Pteridineinbau (**132** und **138**) erhalten, deren Tritylwerte im Schnitt (98.5% bzw. 96.8%) jedoch deutlich besser sind als beispielsweise diejenigen der Sequenz **133** (91.7%). Dafür konnte **133** in guter HPLC-Qualität erhalten werden, während sich **132** und **138** als stark verunreinigt erwiesen.

Als Beispiele sind die HPL-Chromatogramme der Rohprodukte **132-137**, welche bei den Synthesen unter Einbau des Isoxanthopterin-Bausteins **127** erhalten wurden, in den Abbildungen 11.5 - 11.10 dargestellt.



Abb.11.5 : HPL-Chromatogramm der Sequenz **132** (Standard-Gradient, RP-18-Säule)

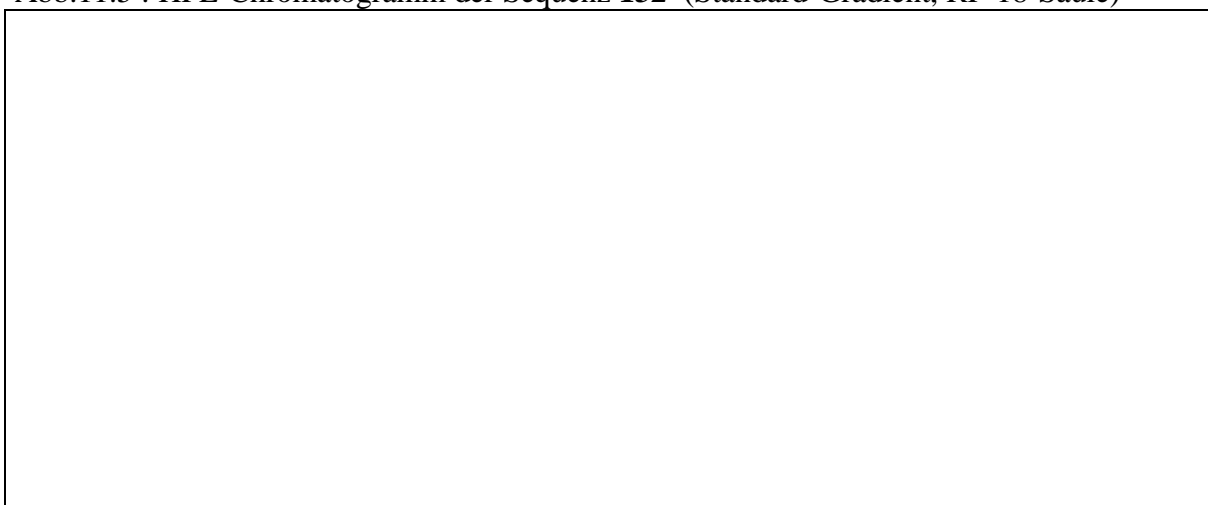


Abb.11.6 : HPL-Chromatogramm der Sequenz **133** (Standard-Gradient, RP-18-Säule)

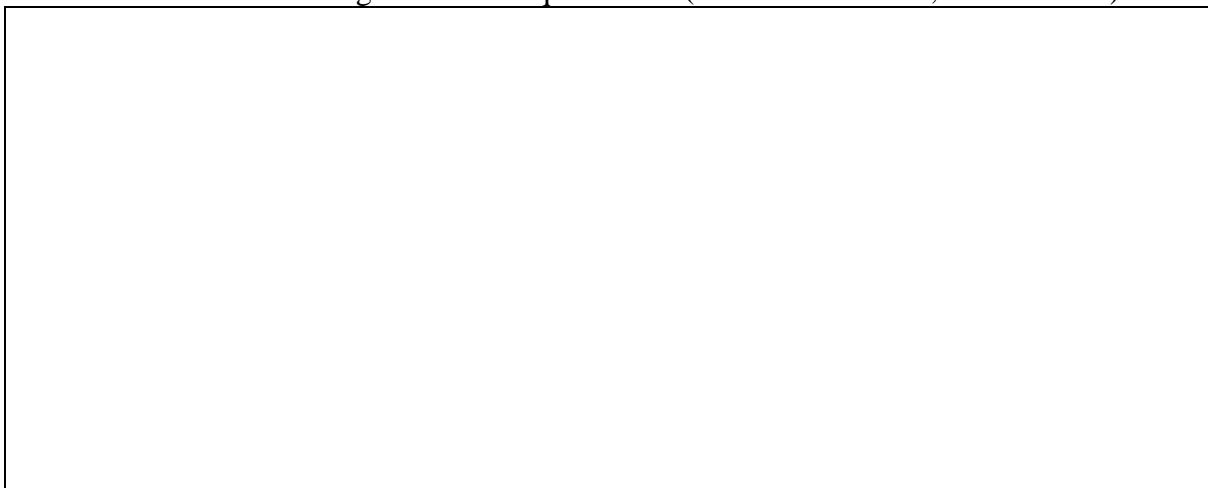
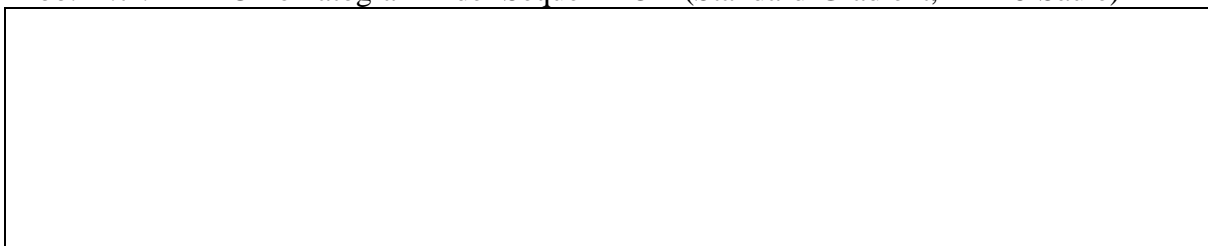


Abb.11.7 : HPL-Chromatogramm der Sequenz **134** (Standard-Gradient, RP-18-Säule)



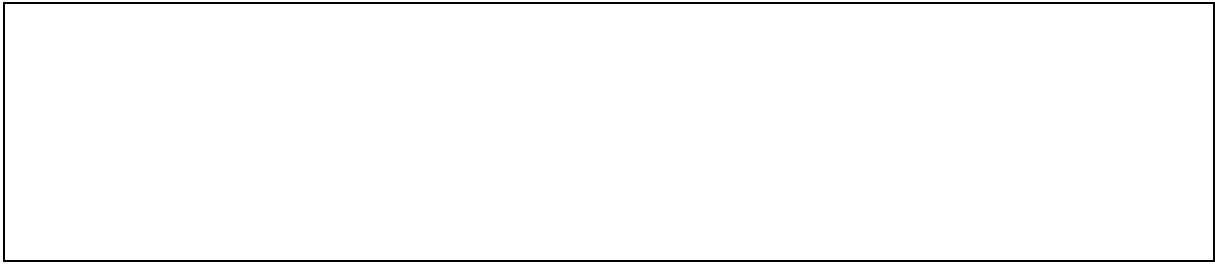


Abb.11.8 : HPL-Chromatogramm der Sequenz **135** (Standard-Gradient, RP-18-Säule)

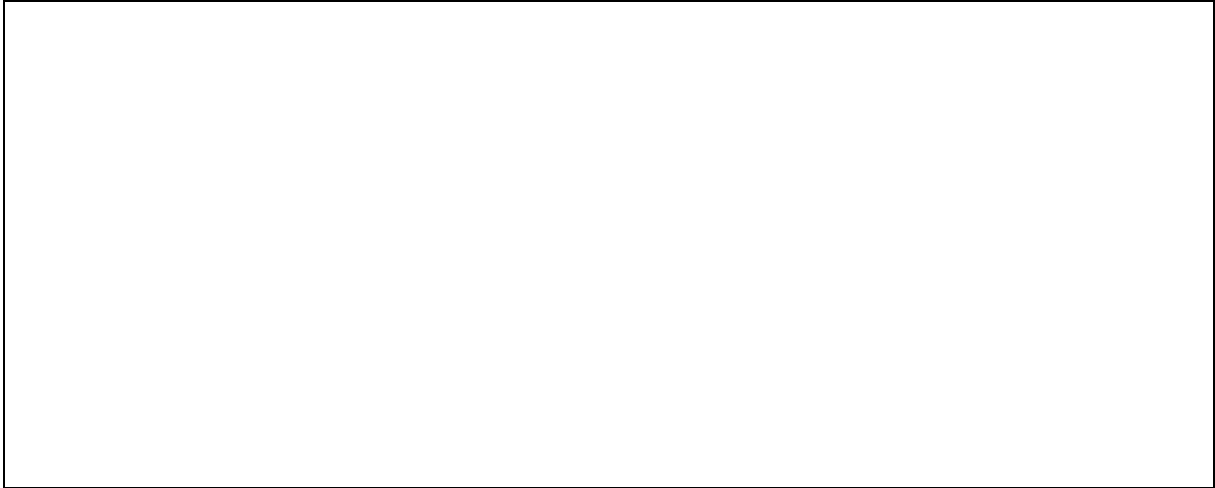


Abb.11.9 : HPL-Chromatogramm der Sequenz **136** (Standard-Gradient, RP-18-Säule)

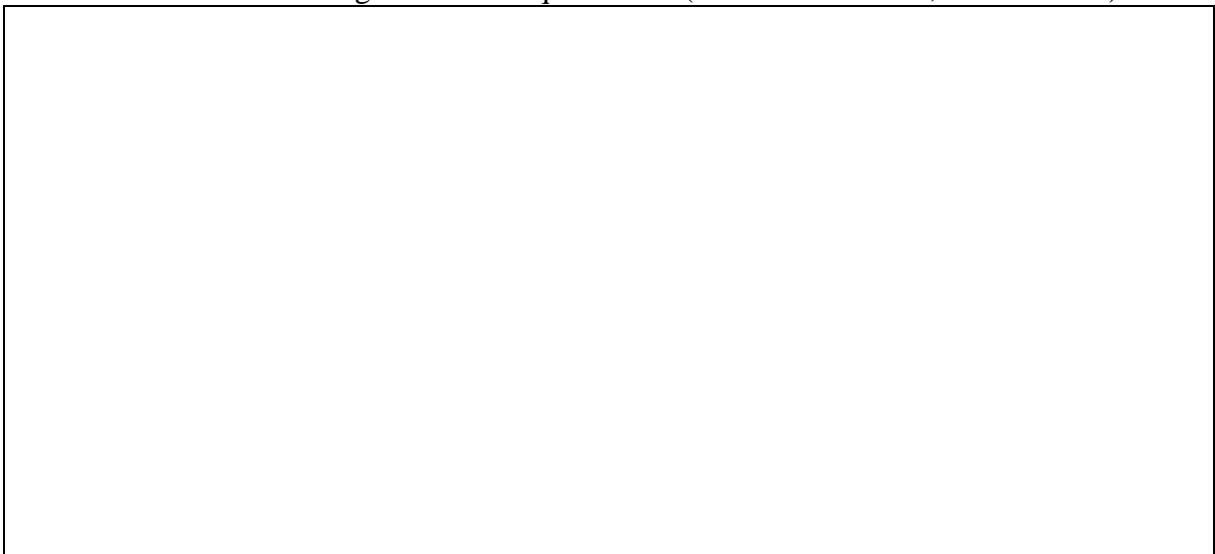


Abb.11.10 : HPL-Chromatogramm der Sequenz **137** (Standard-Gradient, RP-18-Säule)

Das erhaltene schlechte Ergebnis im Fall von **132** läßt sich nach Jungmann^[366] vermutlich auf eine Instabilität der Pteridin-Bausteine gegenüber dem bei der Trägerabspaltung verwendeten Ammoniak zurückführen. Er beobachtete beim Einbau von 4-Amino-7(8H)-pteridinon-N⁸- β -D-2'-desoxyribosiden anstelle des 2'-Desoxyadenosins an endständige Positionen in Oligomere ähnliche Resultate. Befindet sich dagegen das Pteridinsystem zwischen anderen Heterocyclen im Basenstapel des Oligonucleotids, so tritt dieses Problem nicht auf.

Während einige der synthetisierten Oligomeren frei von Fehlsequenzen erhalten werden konnten, finden sich in fast allen HPL-Chromatogrammen (mit Ausnahme von **137**) wie schon bei den Synthesen der Testsequenzen **130** und **131** nach dem Hauptprodukt eluierende Peaks. Diese werden üblicherweise der Ausbildung von Sekundärstrukturen oder einer unvollständigen Schutzgruppenabspaltung zugeschrieben. Bei der Darstellung der 9-meren **130** und **131** hatte sich jedoch gezeigt, daß eine Änderung der Bedingungen bei der Schutzgruppenabspaltung keinen Einfluß auf die Intensität dieser Peaks besitzt. Auch die Durchführung einer Ionenaustausch-HPLC auf Dionex-Material bei der Sequenz **133** durch G.Walcher^[367] führte zu keiner Änderung im Chromatogramm, was darauf schließen läßt, daß die Peaks ebenfalls nicht auf Sekundärstrukturen zurückzuführen sind.

Analoges wurde auch bereits von Wagner^[365], Jungmann^[366] und Beier^[368] bei der Synthese von Oligonucleotiden nach der NPE-/NPEOC-Strategie berichtet. Beier konnte zeigen, daß dieses besonders bei der Darstellung längerkettiger adenosinreicher Sequenzen auftretende Problem auf einen unvollständigen Schutz der 6-Aminofunktion im dA durch die NPEOC-Gruppe zurückzuführen ist.

Anzumerken ist an dieser Stelle, daß alle Synthesen nur jeweils einmal durchgeführt und daher keine Optimierungen von Kondensationszeiten und Abspaltungsbedingungen vorgenommen wurden.

11.4. Bestimmung der Schmelztemperaturen T_m

Oligonucleotide binden über Wasserstoffbrücken an komplementäre Sequenzen. Ein Maß für die Stärke dieser Bindungen ist die Schmelztemperatur (T_m -Wert). Über Watson-Crick-Basenpaarung sind Hybridisierungen zwischen DNA und DNA, DNA und RNA, sowie RNA und RNA möglich, wobei deren Stabilität allgemein in dieser Reihenfolge zunimmt.

Einfluß auf die Höhe des T_m -Wertes haben dabei auch neben der Kettenlänge, die Basenzusammensetzung und die Konzentrationen des Oligomers, sowie der Salzgehalt des Puffers.

In der Literatur finden sich zwei empirische Formeln zur Vorhersage von T_m -Werten bei Oligonucleotidsequenzen :

$$(1) \quad T_m (\text{°C}) = n \cdot (2\text{°C}) + m \cdot (4\text{°C})$$

n: Anzahl der A-T-Basenpaare, m: Anzahl der G-C-Basenpaare

$$(2) \quad T_m (\text{°C}) = 81,5 + 0,41 \cdot (\%GC) + 16,6 \cdot \log[M^+] - 500/n - 0,61 \cdot (\%F) - 1,2 \cdot D$$

%GC: prozentualer Anteil der G-C-Basenpaare, $[M^+]$: molare Konzentration der monovalenten Kationen im Puffer, n: Kettenlänge des Oligomers, %F: prozentualer Formamidgehalt im Puffersystem, D: prozentualer Mismatchanteil

Nach der Faustregel von Wallace^[369] (1) wird lediglich die unterschiedliche Anzahl der Wasserstoffbrücken zwischen A-T- und G-C-Basenpaaren berücksichtigt. Die etwas aufwendigere Formel von Baldino^[370] und Teoule^[371] (2) berücksichtigt hingegen auch andere Parameter, wie z.B. den Salzgehalt der Lösung. Sie liefert für Na⁺-Konzentrationen um etwa 0,1 M gute Werte, ist jedoch für ein formamidhaltiges Puffersystem konzipiert.

Beide Formel lassen sich jedoch nicht auf pteridinmodifizierte Oligomere anwenden. Die Auswirkungen des Einbaus einer nichtnatürlichen Base in ein Oligomer können in der Regel nicht vorhergesagt werden. Der Vergleich der T_m-Werte einer unmodifizierten Sequenz mit denen modifizierter Oligomere erlaubt dagegen Rückschlüsse auf mögliche Störungen, welche von der Modifikation herrühren.

Für die Verwendung der Isoxanthopterin-Bausteine als Fluoreszenz-Marker in der Oligonucleotid-Chemie stellt sich die Frage, inwieweit die Pteridine durch ihren Einbau anstelle eines Guanins die Hybridisierung stören.

Wie bereits in der Aufgabenstellung angedeutet wurde, bedingt die Geometrie des Rings, an welchen die Desoxyribose gebunden ist, eine unterschiedliche Stellung des Zuckers zur Base im entsprechenden Nucleosid (Abb.11.11). Diese könnte in doppelsträngiger DNA die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen einem Isoxanthopterin-Nucleosid und einem dC-Baustein des Komplementärstranges stören.

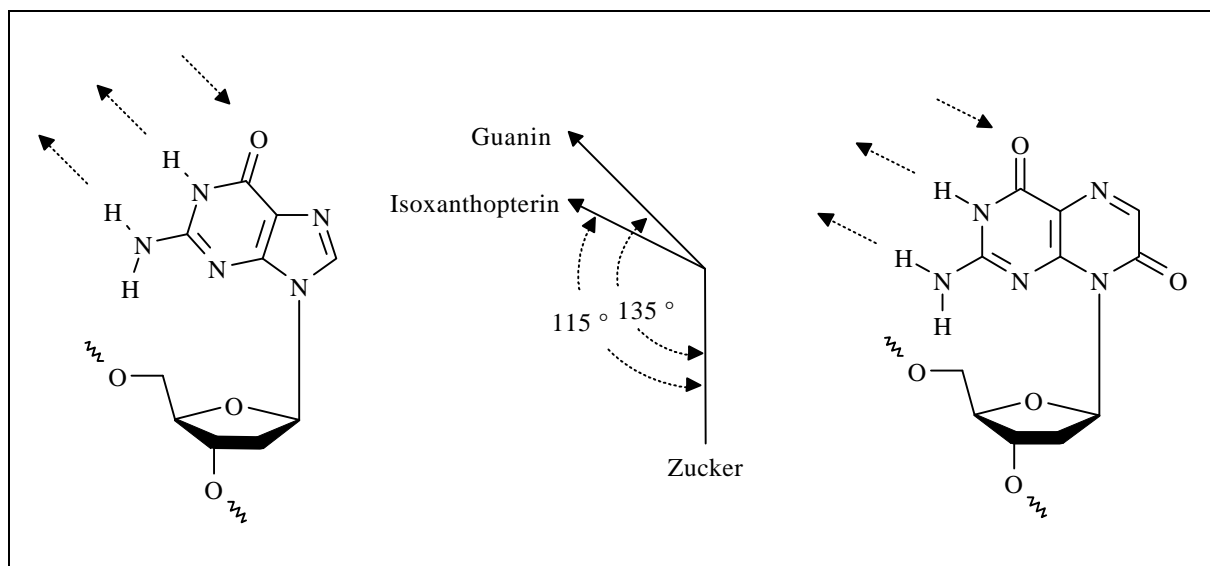


Abb.11.11: Vergleich von 2'-Desoxy-guanosin und dem 2'-Desoxy-isoxanthopterin-Nucleosid bezüglich der Ausrichtung der H-Brücken gegenüber dem Zucker (Winkelangaben zur Illustrierung graphisch ermittelt)

Für Techniken wie das DNA-probing jedoch muß das markierte Oligomer gute Hybridisierungseigenschaften besitzen. Von den bislang getesteten Isoxanthopterin-Derivaten ergaben das 3-Methylisoxanthopterin und das 3-Methyl-2-N-(2-phenylethyl)-isoxanthopterin beide eine deutliche Abnahme der T_m -Werte, was aufgrund der Blockierung des Pyrimidinteils durch sterisch umfangreiche Substituenten zu erwarten war. Dagegen zeigte sich im Fall des 6-Methylisoxanthopterins, daß hier trotz der unterschiedlichen Geometrie keine oder allenfalls geringe Störungen der Duplexstabilität resultierten.

Die Schmelztemperaturen der Oligomeren **132-144** wurden in einer Pufferlösung bei pH 7,4 und einer Na^+ -ionen-Konzentration von 0,15 mol/l gemessen. Die Konzentration an Oligonucleotid betrug 0,5 oD_{260} .

Die Lösungen wurden langsam von 10 auf 80°C erhitzt (0,2°C/min), während bei einer Meßwellenlänge von 260 nm die Absorptionsbestimmung der Lösung erfolgte. Das Schmelzen des Doppelstranges, das auch Denaturierung genannt wird, geschieht in einem engen Temperaturbereich. Dabei lösen sich die beiden Stränge voneinander, was sich durch einen Anstieg der Absorption bemerkbar macht. Im Doppelstrang kommt es durch π -Wechselwirkungen zwischen den Basen zu einem hypochromen Effekt, der bei der Denaturierung abnimmt.

Trägt man Absorption gegen die Temperatur auf, so erhält man eine Kurve, an deren Wendepunkt eine 50 %-ige Dissoziation stattgefunden hat. Diesen Punkt bezeichnet man als Schmelztemperatur (T_m). Genauere Angaben zu dem verwendeten Temperaturprofil finden sich im Experimentellen Teil in Abb.V.1 und Tabelle VII.

Abb.11.12 zeigt als Beispiel die Schmelzkurve der Oligonucleotidsequenz **135**. Das Oligomer wurde vor der T_m -Bestimmung über HPLC gereinigt. Das zweite Diagramm zeigt die erste Ableitung dieser Kurve, der Wert auf der x-Achse am Maximum entspricht der Schmelztemperatur.

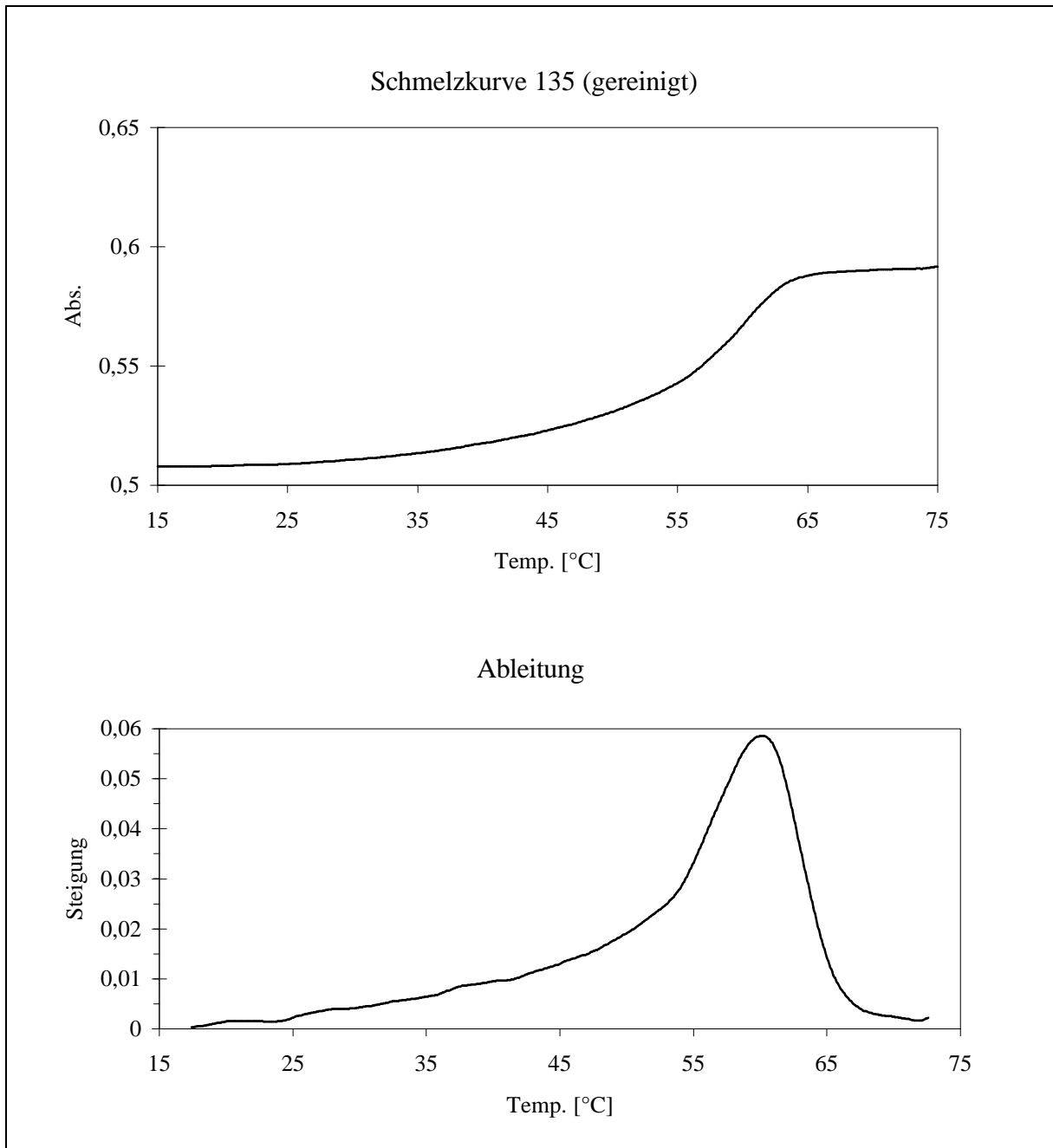


Abb.11.12 : Schmelzkurve von **135** (gereinigt) und 1.Ableitung

Abb.11.13 zeigt eine T_m -Bestimmung, bei welcher das eingesetzte Oligomer nicht aufgereinigt wurde. Es zeigt sich ein zweiter T_m -Wert bei tieferer Temperatur, der von einer Fehlsequenz herrührt. Bei der Ableitung dieser Kurve ist der zusätzliche zweite Schmelzpunkt noch deutlicher zu sehen.

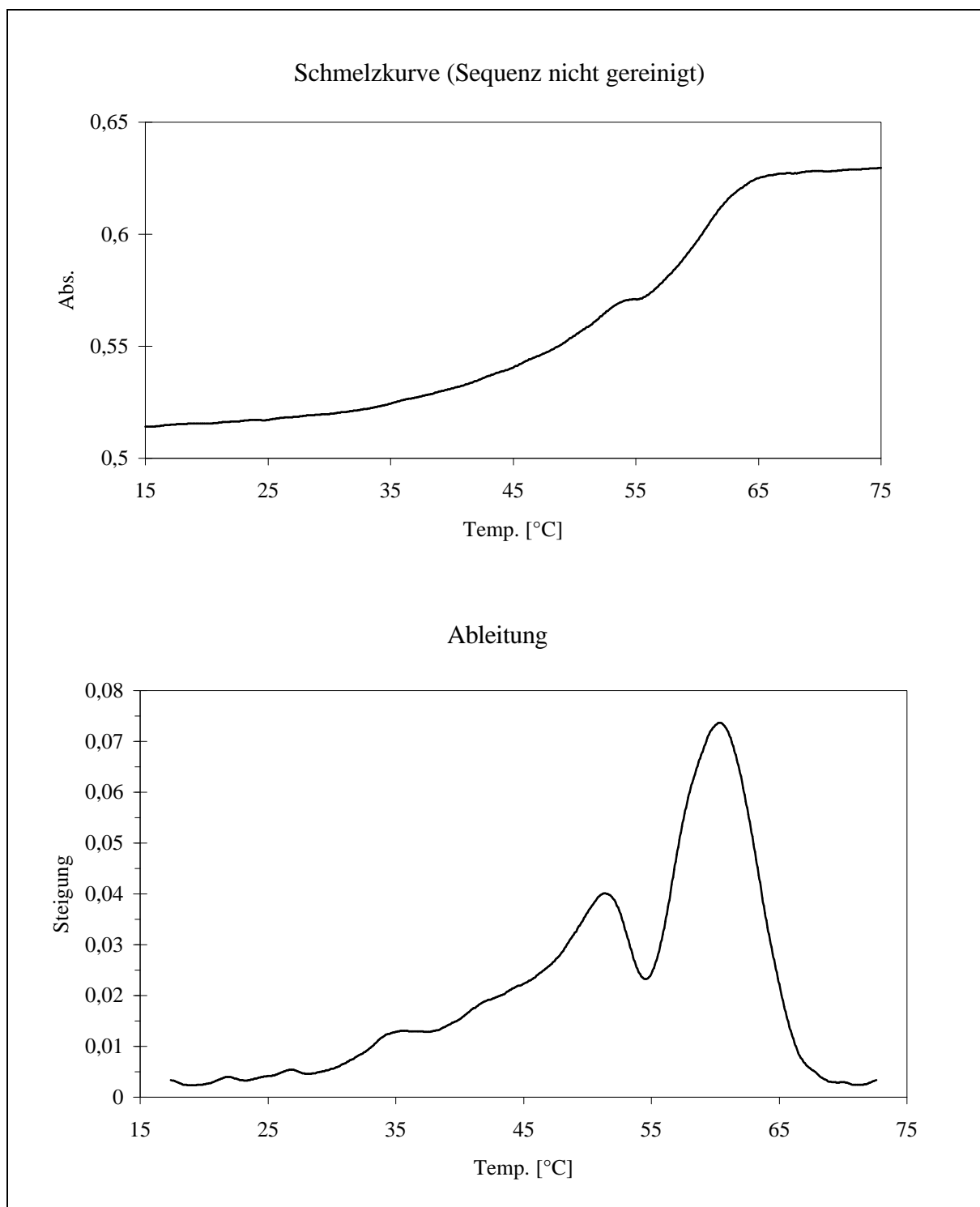


Abb.11.13 : Schmelzkurve eines ungereinigten Oligonucleotids mit sichtbarer Fehlsequenz

Zur Bestimmung der T_m -Werte bei den Sequenzen **132-144** wurden daher in den meisten Fällen über HPLC aufgereinigte Produkte eingesetzt. Tabelle 11.4 faßt die Ergebnisse der Messungen an den Sequenzen **132-144** zusammen.

Nr.	Sequenz										T_m	Vgl.	δ_{Ref}
129	5'	GTG	TGG	AAA	ATC	TCT	AGC	AGT	3'		59,2-60,3		
	3'	CAC	ACC	TTT	TAG	AGA	TCG	TCA	5'				

132	5' 3'	F^H TG CAC	TGG ACC	AAA TTT	ATC TAG	TCT AGA	AGC TCG	AGT TCA	3' 5'	58,4	60,0	-1,6
133	5' 3'	GTF^H	TGG ACC	AAA TTT	ATC TAG	TCT AGA	AGC TCG	AGT TCA	3' 5'	57,6	59,2	-1,6
134	5' 3'	GTG CAC	TF^H G ACC	AAA TTT	ATC TAG	TCT AGA	AGC TCG	AGT TCA	3' 5'	58,1	60,0	-1,9
135	5' 3'	GTG CAC	TGF^H	AAA TTT	ATC TAG	TCT AGA	AGC TCG	AGT TCA	3' 5'	60,0	60,0	0
136	5' 3'	GTG CAC	TGG ACC	AAA TTT	ATC TAG	TCT AGA	AF^H C TCG	AGT TCA	3' 5'	59,0	60,0	-1,0
137	5' 3'	GTG CAC	TGG ACC	AAA TTT	ATC TAG	TCT AGA	AGC TCG	AF^H T TCA	3' 5'	57,6	59,2	-1,6
138	5' 3'	F^P TG CAC	TGG ACC	AAA TTT	ATC TAG	TCT AGA	AGC TCG	AGT TCA	3' 5'	58,6	60,3	-1,7
139	5' 3'	GTF^P	TGG ACC	AAA TTT	ATC TAG	TCT AGA	AGC TCG	AGT TCA	3' 5'	59,6	60,3	-0,7
140	5' 3'	GTG CAC	TF^P G ACC	AAA TTT	ATC TAG	TCT AGA	AGC TCG	AGT TCA	3' 5'	59,0	60,0	-1,0
141	5' 3'	GTG CAC	TGF^P	AAA TTT	ATC TAG	TCT AGA	AGC TCG	AGT TCA	3' 5'	59,9	60,3	-0,4
142	5' 3'	GTG CAC	TGG ACC	AAA TTT	ATC TAG	TCT AGA	AF^P C TCG	AGT TCA	3' 5'	57,6	59,2	-1,3
143	5' 3'	GTG CAC	TGG ACC	AAA TTT	ATC TAG	TCT AGA	AGC TCG	AF^P T TCA	3' 5'	59,9	60,3	-0,4
144	5' 3'	GTG CAC	TF^HF^H	AAA TTT	ATC TAG	TCT AGA	AGC TCG	AGT TCA	3' 5'	57,9	59,2	-1,3

Tab. 11.4 : Schmelztemperaturen der isoxanthopterinmodifizierten Oligonucleotide **132-144** und der unmodifizierten Referenz **129**, die Referenzmessung einer Serie ist in der vorletzten Spalte unter Vgl. angegeben, δ_{Ref} bezeichnet die Differenz einer Messung zur jeweiligen Referenz. [alle Werte in °C]

In der Tabelle 11.4 ist neben dem für die Sequenz gemessenen T_m -Wert auch die jeweilige Referenzmessung angegeben. Für diese Messungen wurde mit exakt den gleichen Puffern und Mengen gearbeitet, was diese Werte verlässlicher macht. Die Differenz zwischen Referenz und Meßwert findet sich als δ_{Ref} in der letzten Spalte. Bei Betrachtung dieser Werte ergaben sich Abweichungen zwischen 0°C und -1,9°C.

Dieses Ergebnis deckt sich mit T_m -Bestimmungen von Oligonucleotiden gleicher Basensequenz, bei welchen anstelle von Isoxanthopterin oder 6-Phenylisoxanthopterin ein 6-Methylisoxanthopterin statt eines Guanins inkorporiert wurde^[97]. Hierbei ergab sich eine maximale Abweichung von -1,6°C. Dagegen führte der Einbau von 3-Methylisoxanthopterin^[97] in die gleiche Sequenz zur einem drastischen Abfall der Schmelztemperaturen um teilweise über 10°C. In diesem Fall unterbindet der Methylsubstituent die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zum Komplementärstrang und kann auch aufgrund seines sterischen Anspruchs die gleichmäßige Positionierung der Nachbar-Basen stören.

Als Schlußfolgerung aus diesen Ergebnissen kann festgestellt werden, daß der Einbau der Isoxanthopterin-Bausteine **127** und **128** die Hybridbildung mit dem Komplementärstrang nur

geringfügig stört. Die unter Einbau von **127**, **128** oder auch dem 6-Methylisoxanthopterin-Baustein von Charubala erhaltenen Werte bedeuten gegenüber den Erwartungswerten für den Wegfall eines G-C-Paares nach der Faustregel von Wallace (-4°C) eine geringe Beeinträchtigung der Hybridisierungseigenschaften der modifizierten Sequenzen.

Die größte gemessene Abweichung zur entsprechenden Referenzmessung an **129** wurde bei Sequenz **134** mit -1.9°C erhalten.

Dies könnte darauf hindeuten, daß eventuell anstelle einer vollständigen nur eine teilweise Basenpaarung vorliegt. Eine andere Erklärung wären gute Basestacking-Eigenschaften des Isoxanthopterin-Systems, die den Verlust an Stabilität durch die Ausbildung eines Basenpaares teilweise ausgleichen.

12. ZUSAMMENFASSUNG

12.1. Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es, einen synthetischen Zugang zu ausgewählten Isoxanthopterin-Nucleosiden zu finden, welche aufgrund der strukturellen Nähe zum 2'-Desoxyguanosin an dessen Stelle als Fluoreszenzmarker mittels der automatisierten Festphasensynthese nach dem Phosphitamid-Verfahren in Oligodesoxyribonucleotide eingebaut werden sollten. Im Gegensatz zu den mittlerweile bereits publizierten Isoxanthopterin-Nucleosiden von Charubala et al.^[97] bzw. Hawkins et al.^[105] sollte dabei der Pyrimidinteil des Isoxanthopterins nicht modifiziert werden, um eine größtmögliche Nähe zum natürlich vorkommenden Purin-Nucleosid zu erhalten.

Die ungewöhnlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften des Isoxanthopterins (**1**), bedingen zur Synthese geeigneter Phosphitamid-Bausteine eine Unterteilung des Syntheseweges in vier Abschnitte (Kap.3). Problematisch sind hierbei insbesondere die Schwerlöslichkeit, die Tendenz zur Selbstakkumulation und die geringe Reaktivität der exocyclischen Aminofunktion. Um diese Probleme zu umgehen, war zur erfolgreichen Darstellung der beiden Phosphitamidbausteine **127** und **128** der Einsatz unterschiedlicher Schutzgruppenkombinationen erforderlich.

In einem ersten Schritt des Syntheseweges muß ein mit geeigneten Schutzgruppen versehenes Pteridin dargestellt werden, welches in der zweiten Stufe eine möglichst selektive Glycosidierung an der N⁸-Position erlaubt. Anschließend müssen die für die Nucleosid-Synthese erforderlichen Schutzgruppen der heterocyclischen Base abgespalten und durch für die Oligonucleotid-Synthese geeignete ersetzt werden. Als letzter Schritt sind die 5'- bzw. die 3'-Position am Zucker zu tritylieren bzw. zu phosphitylieren um einen entsprechenden Phosphitamid-Baustein zu erhalten.

In dieser Arbeit wurden zwei Phosphitamid-Bausteine für den Einsatz in der Oligonucleotid-Synthese nach dem Phosphitamid-Verfahren^[275] dargestellt. Das 2-Amino-N⁸-[2-desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinon-3'-O-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)phosphitamid (**127**) als Isoxanthopterin-Baustein und das 2-Amino-N⁸-[2-desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-6-phenyl-7(8H)-pteridinon-3'-O-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)phosphitamid (**127**) als 6-Phenylisoxanthopterin-Baustein sind beide entsprechend der NPE-Strategie^[282-296] an der O⁴-Position mit der 2-(4-Nitrophenyl)ethyl-Schutzgruppe blockiert.

Für den Zugang zu den beiden Bausteinen wurden jeweils zwei alternative Synthesewege verfolgt, eine „2-Amino-Route“ und eine „2-Methylmercapto-Route“. Ausgangspunkte waren

die entsprechenden heterocyclischen Basen, wobei die 6-H-substituierten Grundkörper, das 2-Amino-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinon (**5**)^[136] und das 2-Methylmercapto-4,7(3H,8H)-pteridindion (**7**)^[137], sowie die Modellverbindung 2-N,N-Dimethylamino-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinon (**33**)^[138] im Wesentlichen entsprechend der vorhandenen Literatur dargestellt wurden.

Zu den bislang nicht beschriebenen 6-Phenylisoxanthopterinen **9** und **10** mußten entsprechende Synthesewege ausgearbeitet werden, was sowohl beim 2-Amino-4-benzyloxy- (**9**) als auch beim 2-Methylmercapto-Derivat (**10**) durch eine saure Gabriel-Isay-Kondensation der entsprechenden 5.6-diaminostituierten Pyrimidin-Edukte mit Phenylglyoxylsäureester regioselektiv und in guten Ausbeuten gelang.

Um eine selektive Glycosidierung dieser Pteridin-Derivate an der N⁸-Position zu gewährleisten, wurden zusätzliche Schutzgruppen in die 2-Amino- bzw. die 4-Oxo-Position eingeführt. Dabei erwiesen sich die dmf-Gruppe zum Schutz der Aminofunktion und die Pivaloyl-Gruppe zur Blockierung der O⁴-Position als die geeignetsten Vertreter.

Ausgehend von diesen Isoxanthopterin-Derivaten (Verbindungen **6**, **7**, **9**, **10**, **33**, **54**, **58** und **60**) gelang anschließend die Darstellung der entsprechenden N⁸-β-D-2'-Desoxyriboside **79**, **80**, und **82-87** in Ausbeuten zwischen 30 und 57%. Mit der Verbindung **81** gelang in einem Fall auch die Isolierung des entsprechenden α-anomeren N⁸-Nucleosids in 15% Ausbeute. Die Pteridine wurden dabei ausschließlich in Acetonitril unter Verwendung von DBU nach der von Jungmann und Pfeleiderer^[218] beschriebenen Methode glycosidiert. Dieses Verfahren erwies sich beim vorliegenden 7(8H)-Pteridinonsystem als den anderen Methoden bezüglich Regio- und Stereoselektivität überlegen.

Durch Vergleich der Signalaufspaltung der H-C(2')-Protonen in den ¹H-NMR-Spektren der Verbindungen **79-87** mit den über NOE-Spektroskopie gesicherten Daten von Vergleichsverbindungen^[105,340] wurde die Konfigurationszuordnung am anomeren Zentrum der Nucleoside getroffen. Die Daten der Vergleichsverbindungen entsprachen dabei auch den selben Aufspaltungsmustern, wie sie bereits an anderer Stelle in der Literatur beschrieben wurden^[98,100,231,232].

An der Modellverbindung, dem 2-N,N-Dimethylamino-4-benzyloxy-N⁸-[2-desoxy-3,5-di-O-p-toluoyl-β-D-ribofuranosyl]-7(8H)-pteridinon (**85**) gelang nach hydrogenolytischer Abspaltung der Benzylgruppe die Einführung der NPE-Schutzgruppe an O⁴ in einer Mitsunobu-Reaktion. Dieses Ergebnis ließ sich jedoch nicht auf die 2-amino-6-H-substituierten Nucleoside **79**, **82** und **83** übertragen. Löslichkeitsprobleme bei diesen am Aglycon entschützten Isoxanthopterin-Nucleosiden verhinderten eine erfolgreiche Mitsunobu-Reaktion.

Die Verbindungen **79**, **82** und **83** konnten daher nur zum totalentschützten Isoxanthopterin-N⁸-β-D-2'-desoxyribofuranosid **98** derivatisiert werden. Dieses Nucleosid erwies sich für die Umsetzung zu einem Phosphitamid-Baustein jedoch wiederum als zu schwerlöslich

In der Methylmercapto-Route gelang hingegen über das N⁸-[3.5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-2-methylmercapto-4,7(3H,8H)-pteridindion (**84**) der Zugang zum O⁴-NPE-geschützten Isoxanthopterin-Nucleosid **115**. Die Einführung der NPE-Schutzgruppe in die O⁴-Position erfolgte über eine Mitsunobu-Reaktion in 78% Ausbeute. Durch Oxidation der Schwefel-Funktion zur Methylsulfonyl-Gruppe in 97% und anschließende nucleophile Substitution mit Ammoniak 89% konnte die Amino-Funktion in die C(2)-Position des Pteridinsystems eingeführt werden (**113**). Ausgehend von diesem Isoxanthopterin-Nucleosid gelang durch Abspaltung der Zuckerschutzgruppen unter Verwendung von Natriumcyanid in Methanol in 86% Ausbeute die Darstellung des 2-Amino-N⁸-[2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinons (**115**).

Dabei konnten die Probleme, welche diesen Syntheseweg nach der Literatur^[112] versperren, durch Einsatz von Dimethyldioxiran (**106**) als Oxidationsmittel umgangen werden. Die bei einer Reihe anderer Oxidationsmittel bei Reaktionen an einem Modellsystem auftretenden Nebenreaktion (Oxidation der C(6)-Position am Pteridingerüst analog den Ergebnissen von Kyriases^[112]) konnte durch Verwendung von **106** unterdrückt werden. Das Dimethyldioxiran bietet zudem den Vorteil, daß nach erfolgter Synthese keine Rückstände an Oxidationsmittel aus dem Produkt abgetrennt werden müssen. Es genügt das Abziehen des Lösungsmittels, da sämtliche Komponenten des Oxidationsmittels (**106**, Aceton) flüchtig sind. Dagegen muß bei Verwendung von m-CPBA in vielen Fällen eine chromatographische Reinigung erfolgen.

In der 6-Phenylreihe gelang die Darstellung des zu **115** analogen 2-Amino-N⁸-[2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-6-phenyl-7(8H)-pteridinons (**118**) sowohl ausgehend von den 2-aminosubstituierten Nucleosiden **86** und **87**, als auch über das 2-methylmercaptosubstituierte Nucleosid-Derivat **80**.

Anders als bei den 6-H-Analoga konnte ausgehend von 2-Amino-4-benzyloxy-N⁸-[3.5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**86**) und dessen an der 2-Aminofunktion dmf-geschützten Derivat **87** nach Abspaltung der Schutzgruppen am Aglycon die NPE-Gruppe über eine Mitsunobu-Reaktion an O⁴ in 86% Ausbeute eingeführt werden. Durch Behandlung des so dargestellten Nucleosids **117** mit Natriumcyanid in Methanol konnte bei einer Ausbeute von 71% ein Zugang zu Verbindung **118** erreicht werden.

Ausgehend vom N⁸-[3.5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-2-methylmercapto-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridindion (**80**) gelang nach der schon beim entsprechenden 6-H-substituierten Derivat **84** beschriebenen Weise ebenfalls die Darstellung von **118**. Nach

Einführung der NPE-Schutzgruppe in die O⁴-Position über eine Mitsunobu-Reaktion in 86% erfolgte die Oxidation der Schwefel-Funktion (85% Ausbeute) in diesem Fall allerdings mit m-CPBA. Ein Substituent an der C(6)-Position verhindert die Weiteroxidation des Pteridinsystems, welche in der 6-H-Reihe auftritt^[112] und die Verwendung von Dimethyldioxiran (**106**) erforderte. Die nachfolgende nucleophile Substitution durch Ammoniak führte in 95% Ausbeute zu dem auch ausgehend von **86** und **87** erhaltenen Nucleosid **117**.

Als günstigster Zugangsweg zu den OH-freien Isoxanthopterin-Nucleosiden **115** und **118** erwies sich in beiden Fällen die Methylmercapto-Route. Während zur Darstellung von **115** die Amino-Route aufgrund von Löslichkeits- und Schutzgruppenproblemen scheiterte, konnte sie als Alternative bei der Darstellung von **118** erfolgreich durchgeführt werden. Wegen der hohen Ausbeute bei der Glycosidierung des 2-Methylmercapto-6-phenyl-4-pivalyloxy-7(8H)-pteridinons (**58**) zum entsprechenden N⁸-β-Nucleosid **80** liegen die Vorteile jedoch auch hier bei der Methylmercapto-Route. In fünf Stufen von der Glycosidierung bis zur Abspaltung der Zuckerschutzgruppen wurde eine Ausbeute von 27 % erhalten. Mit 18 % ist das Ergebnis ausgehend vom 2-Amino-4-benzyloxy-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**9**) weniger gut, doch werden hier ausgehend von der Glycosidierung lediglich 4 Stufen zur Darstellung von **118** benötigt. Sollte sich das Ergebnis von 30 % bei der Glycosidierung von **9** noch steigern lassen, so stellt dieser Weg eine schnellere Alternative dar.

Durch Einführung der Dimethoxytritylgruppe in die 5'-OH-Funktion über die Behandlung der beiden Nucleoside **115** und **118** mit Dimethoxytritylchlorid in absolutem Pyridin gelang die Darstellung der beiden 5'-O-(4,4'-Dimethoxytrityl)-Verbindungen **123** und **124**. Deren anschließende Phosphitylierung an der 3'-OH-Position mit bis-N,N-Diisopropylamino-2-cyanoethoxyphosphan (**125**) unter Tetrazol-Katalyse lieferte die entsprechenden Bausteine für die Oligonucleotid-Synthese, das 2-Amino-N⁸-[2-desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinon-3'-O-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)-phosphitamid (**127**) bzw. dessen 6-Phenylderivat **128**.

Die zwei Bausteine wurden nach ihrer erfolgreichen Darstellung auf ihre Verwendbarkeit bei der automatisierten Festphasensynthese zum Aufbau isoxanthopterin-modifizierter Oligodesoxyribonucleotid-Sequenzen getestet. Dabei konnte in einer Reihe von Synthesen 21-merer DNA-Sequenzen gezeigt werden, daß sowohl **127** als auch **128** prinzipiell in gleicher Weise wie die Standard-Nucleosid eingesetzt werden können. Der einzige Unterschied ergab sich bei der Verwendung von **127**, bei welchem anstelle des üblichen Acetonitrils Methylenchlorid als Lösungsmittel verwendet werden mußte. Ansonsten erfolgten die Synthesen nach Standard-Bedingungen.

Durch Einbau der Isoxanthopterin-Derivate anstelle von 2'-Desoxyguanosin wurden die fluoreszenzmarkierten Oligonucleotid-Sequenzen **132-144** erhalten. Dabei zeigte sich, daß zwar einerseits den Standardbausteinen vergleichbare Kondensationsausbeuten erreicht werden konnten, doch daß andererseits die Bedingungen der Synthese (Kondensationszeit, Schutzgruppenabspaltung,...) noch optimiert werden müssen, um durchgängig gute Ergebnisse zu erhalten.

Die isoxanthopterinmodifizierten Oligonucleotide **132-144** zeigten im Vergleich zu einer entsprechenden unmodifizierten Sequenz **129** nur geringfügige Störungen in den Hybridisierungseigenschaften. Die gemessenen T_m -Werte lagen nur maximal 1.9°C unter denen der Referenz **129**. Dies bedeutet, daß der Einbau des Pteridins anstelle eines Guanins die Hybridisierung mit einer komplementären Sequenz nicht nachhaltig stört, ein Befund der den Isoxanthopterin-Derivaten **127** und **128** interessante Einsatzmöglichkeiten als Marker in der Oligonucleotidchemie eröffnet.

Der Einbau eines Fluorophors in den Basenstapel eines Oligonucleotids reduziert die Fluoreszenzquantenausbeute des Markers drastisch^[98,105] und macht somit ein derartiges System für die Anwendung im DNA-Probing weniger interessant. In diesem Bereich sind die etablierten Markersysteme hinsichtlich Fluoreszenzintensität und relativen Quantenausbeuten überlegen. Der Einbau der beiden Isoxanthopterine führt auch nicht zu einem Anstieg der Schmelztemperaturen der modifizierten Sequenzen, was die Moleküle für den Einsatz in der Antisense-Technologie ebenfalls weniger interessant macht. Vermutlich führen die Differenzen in der Molekülgeometrie zwischen den Isoxanthopterin- N^8 -Nucleosiden und dem 2'-Desoxyguanosin zu geringfügigen Störungen der Duplexstabilität.

Die hohe Sensitivität von Fluorophoren gegenüber ihrer unmittelbaren Umgebung eröffnet jedoch neue Anwendungsmöglichkeiten innerhalb der Oligonucleotidchemie, wie sie beispielsweise von Hawkins et al.^[105] aufgezeigt wurden. Der in diesem Fall verwendete Marker, das 3-Methylisoxanthopterin, beeinflusst allerdings aufgrund der Methylsubstitution die Hybridisierungseigenschaften der markierten Sequenz sehr ungünstig. Dies zeigte sich in einem deutlichen Abfall der Schmelztemperaturen der modifizierten Sequenzen um teilweise über 10°C ^[97]. An dieser Stelle sollte die Verwendung von Isoxanthopterin-Derivaten mit nicht-modifiziertem Pyrimidinteil in der selben Sequenz deutliche Vorteile zeigen. Selbst beim Einbau von zwei 6-Phenylisoxanthopterin-Bausteinen (Sequenz **144**) betrug die gemessene Differenz des T_m -Werts zur unmodifizierten Referenz weniger als 2°C .

Somit sollte sich der Baustein beispielsweise auch zur Markierung kürzerer Substrate für Enzymreaktion verwenden lassen, auch könnte bei geringeren Na^+ -Konzentrationen bzw. höherer Inkubationstemperatur gearbeitet werden. Dies eröffnet im Vergleich zum 3-

Methylisoxanthopterin-Baustein von Hawkins et al.^[105] ein breiteres Anwendungsspektrum, da Enzymreaktionen oftmals stark von den Reaktionsbedingungen abhängen.

12.2. Ausblick

Im Verlauf der Synthesen von **127** und **128** wurden auf den Methylmercaptorouten zwei sehr interessante Nucleoside dargestellt. Die beiden methylsulfonyl-substituierten Pteridin-Nucleoside, das N⁸-[3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-2-methylsulfonyl-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinon (**110**) und sein 6-Phenyl-Derivat **121** (Abb.12.1) stellen vielfältig verwendbare Synthesebausteine dar.

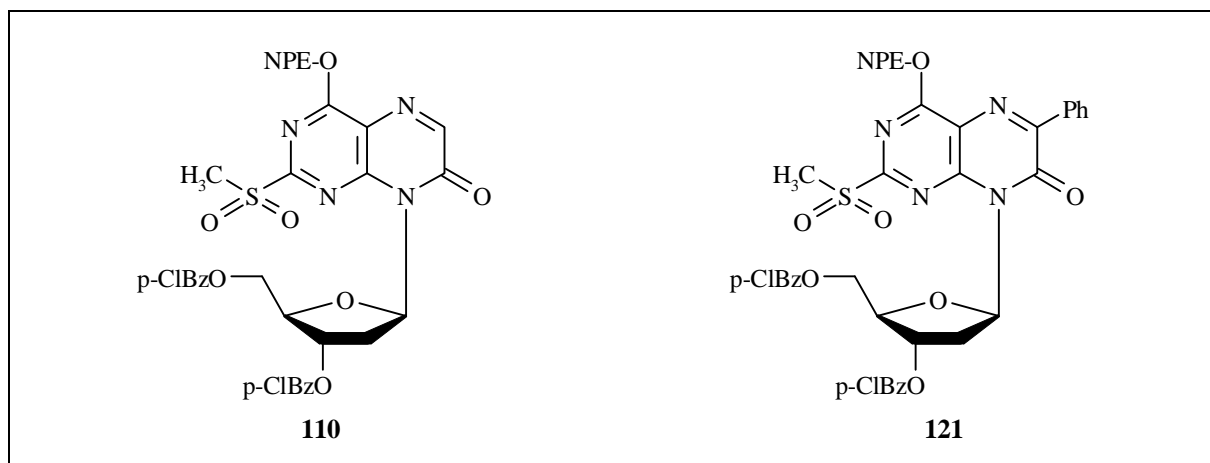


Abb.12.1: Die Nucleoside **110** und **121**

Durch nucleophile Substitution unter äußerst milden Bedingungen gelang die Einführung der Aminofunktion in die Position 2 des Pteridingerüsts in guten Ausbeuten. In gleicher Weise sollten sich durch Verwendung anderer Nucleophile an der Position 2 unterschiedlichst derivatisierte Isoxanthopterin-Nucleoside darstellen lassen (Abb.12.2).

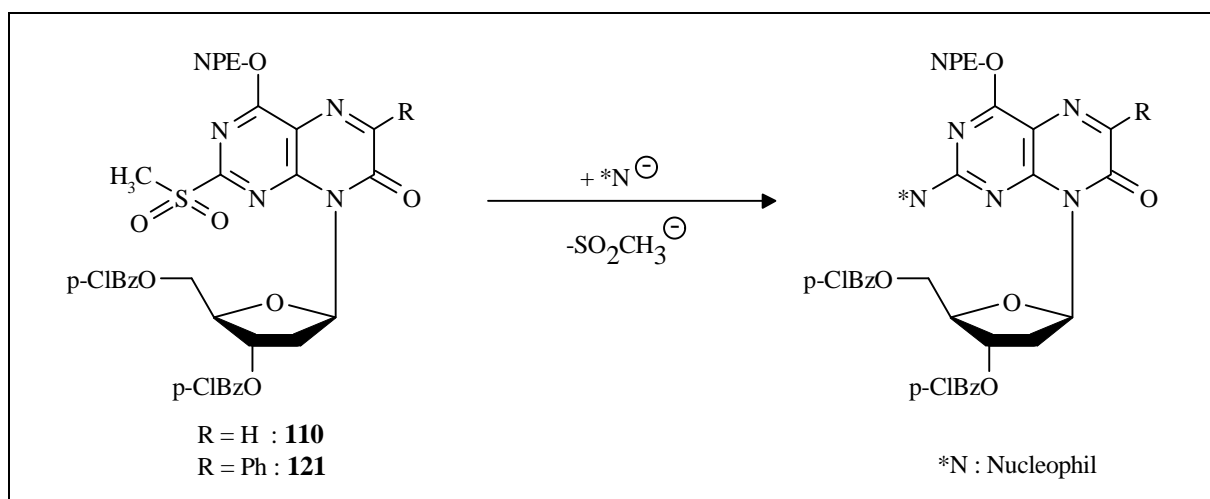


Abb.12.2: mögliche Substitutionen an **110** und **121**

Mit den beiden Bausteinen **127** und **128** wurden interessante Markermoleküle dargestellt, für deren Einsatz am DNA-Synthesizer jedoch, was Kondensationszeiten und Abspaltbedingungen betrifft, sicherlich noch Optimierungen vorgenommen werden können. Im Bereich der Synthesen sollten sich die Ausbeuten sowohl der Tritylierung als auch der Phosphitylierung durch Verwendung kürzerer Kieselgelsäulen wie bei der Darstellung von **127** eventuell noch steigern lassen.

Der synthetische Aufwand bei der Darstellung der Isoxanthopterin-Phosphitamid-Bausteine ist ungleich höher als bei anderen Markersystemen und steht daher einer universelleren Anwendbarkeit entgegen. Doch haben insbesondere die Arbeiten von Hawkins et al.^[105] gezeigt, daß die Pteridin-Nucleoside als DNA-Marker im Bereich von Enzymreaktionen wie beispielsweise bei der HIV-1-Integrase durchaus ihre Anwendungen finden können. Durch Substitution an der C(6)-Position sind die Isoxanthopterin-Bausteine zudem in ihren spektroskopischen Eigenschaften variierbar, was das Potential der Verbindungen zusätzlich erhöht.

12.3. Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Veröffentlichungen zusammengefaßt :

- Jörg Lehbauer und Wolfgang Pfeleiderer
Synthesis of 8-(β -D-2-Deoxyribofuranosyl)-isoxanthopterin
Pteridines **1996**, Z, 101

- Jörg Lehbauer und Wolfgang Pfeleiderer
Synthesis of 6-Phenyl-8-(β -D-2-deoxyribofuranosyl)-isoxanthopterin
Pteridines **1997**, g, 38

- Jörg Lehbauer und Wolfgang Pfeleiderer
Isoxanthopterin and 6-Phenylisoxanthopterin-N⁸-nucleosides - new fluorescent
analogues of 2' Deoxyguanosine
Nucleosides & Nucleotides, **1997**, in print

II. EXPERIMENTELLER TEIL

A. ALLGEMEINE HINWEISE

- Für die analytische Dünnschichtchromatographie wurden Celluloseplatten der Firma Schleicher & Schüll (Cellulose 1440 / LS 254) bzw. Kieselgelplatten der Firma Merck (Kieselgel 60 F₂₅₄) und Schleicher & Schüll (F 1500 / LS 254) verwendet.
- Für die präparative Säulenchromatographie wurde Flash-Kieselgel (30-60 µm) der Firma Baker bei einem Überdruck von 0.2-0.4 bar verwendet.
- Zur Bestimmung der Schmelzpunkte wurden einseitig offene Glaskapillaren in Geräten der Firmen Büchi und Gallenkamp verwendet, die angegebenen Werte sind nicht korrigiert.
- Die Messung der UV-Absorptionsspektren erfolgte an Zweistrahl-Spektrometern der Firma Perkin-Elmer (Modell Lambda 5 bzw. Lambda 15).
- Für die temperaturabhängigen UV-Messungen (Schmelzkurvenbestimmung der Oligonucleotide) wurde ein System von Perkin-Elmer (Spektrometer Lambda 2, mit thermostatisierbarem Probenwechsler und Programmierereinheit PTP 6, sowie die Software PETEMP und PECSS) verwendet.
- Die Aufnahme der ¹H-NMR-Spektren erfolgte an einem 250 MHz-Spektrometer der Firma Bruker (Modell AC 250), als Standard dienten das Protonen-Resonanzsignal des angegebenen verwendeten deuterierten Lösungsmittels oder Tetramethylsilan.
- Die Aufnahme der ³¹P-NMR-Spektren erfolgte an einem 400 MHz-Spektrometer der Firma Joel (Modell GX 400). Als externer Standard diente 85 %-ige Orthophosphorsäure in CDCl₃.
- Die Elementaranalysen wurden im mikroanalytischen Labor der Fakultät Chemie an der Universität Konstanz durchgeführt.
- Die Aufnahme des Massenspektrums wurde von M.-J.Quelle-Kern in der Arbeitsgruppe Przybylski an der Universität Konstanz durchgeführt.
- Die verwendeten Lösungsmittel wurden sofern nötig nach Standardmethoden gereinigt und/oder absolutiert. Die übrigen Reagentien wurden, sofern nicht anders vermerkt, in der erworbenen Qualität eingesetzt.
- Die Durchführung der Oligonucleotidsynthesen erfolgte an einem DNA-Syntheseautomaten der Firma Applied Biosystems (Modell ABI 392B).

- Zur Lyophilisieren kleiner Mengen wässriger Lösungen stand ein Speed-Vac-Konzentrator der Firma Zymark (Turbo Vap LV) für Eppendorf-Reaktionsgefäße bis 1.5 ml zur Verfügung.
- Für die HPLC-Analytik der Oligonucleotide stand eine Anlage von Merck-Hitachi (Gradientenpumpe: L 6200, Detektor: L 4000, Steuerungssoftware: HPLC-Manager v. Merck) zur Verfügung. Verwendet wurden Lichrospher 100 (RP-18) Säulen der Firma Merck.

B. SYNTHESE DER HETEROCYCLISCHEN BASEN

2-(N,N-Dimethylamino-methylenamino)-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinon (6)^[101]

[C₁₆H₁₆N₆O₂ (324,34)]

2,90 g (10,77 mmol) 2-Amino-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinon (**5**) werden in 100 ml abs. DMF aufgeschlämmt und auf 40°C erwärmt. Zu der beige Suspension gibt man 1,92 ml (1,05 Äq.) N,N-Dimethylformamid-diethylacetal (**55**) und rührt bei 40°C für 3h. Bereits nach ca. 90 min hat sich eine klare Lösung gebildet, für vollständigen Umsatz (DC) wird die orange Lösung noch für weitere 90 min gerührt. Das Reaktionsgemisch wird am Rotationsverdampfer unter Hochvakuum bis fast zur Trockne eingengt. Zum Ausfällen des Produkts wird unter Rühren ein Gemisch aus 1ml MeOH und 50 ml Diethylether zugesetzt. Der entstandene Niederschlag wird nach 10 min abgesaugt. Zur Steigerung der Ausbeute wird das Filtrat erneut eingengt und der selben Prozedur ein zweites Mal unterworfen. Die Produktfraktionen werden vereinigt und im HV bei 40°C getrocknet.

Ausbeute : 3,42 g (10,55 mmol / 98 %)

Charakterisierung : beiger Feststoff

Smp. : >330°C

R_f (Cellulose) : 0,40; Tol/EE (1:3)

UV (pH=0) : 221nm(4,53), 331nm(4,26)

UV (MeOH) : 209nm(4,43), 228nm(4,35), [259nm(4,05)], 350nm(4,39)

¹H-NMR (DMSO-d₆) : 11,80ppm (1H, b, H-(N⁸)) / 8,75ppm (1H, s, 2-N=CH-NMe₂) / 7,75 ppm (1H, s, H-C(6)) / 7,55-7,30ppm (5H, m, H_{Ar}) / 5,50ppm (2H, s, 4-O-CH₂-) / 3,19ppm (6H, d, N(CH₃)₂)

C/H/N-Analyse : C₁₆H₁₆N₆O₂ x 0,5 H₂O(332,34)

ber.: C 57,82, H 4,85, N 25,29 ; gef.: C 57,71, H 5,08, N 25,82

2-Methylmercapto-4,7(3H,8H)-pyrido-[2,3-d]-pyrimidindion (8)

[C₈H₇N₃O₂S (209,23)]

3,93g (25 mmol) 6-Amino-2-methylmercapto-4(3H)-pyrimidinon (**66**) werden in 100 ml Eisessig gelöst. Nach Zugabe von 5,66 ml (27,5 mmol) Ethoxymethylenmalonsäurediethylester (**63**) zu der schwach gelblichen Lösung wird das Reaktionsgemisch für 12 h am Rückfluß gekocht, wobei sich ein farbloser, feiner Niederschlag abscheidet. Man läßt abkühlen und saugt nach mehrstündigem Stehenlassen ab. Das Produkt wird mehrmals mit Wasser gewaschen und getrocknet, wobei 3,64g (17,4 mmol / 69,6%) Rohprodukt erhalten werden, dessen Gehalt an Nebenprodukt (das N-(3,4-Dihydro-2-methylmercapto-4-oxo-6-pyrimidinyl)-aminomethylenmalonsäurediethylester (**67**), vgl. Kap.4.3.2) nach dem ¹H-NMR bei über 30% lag. Das Rohprodukt wurde insgesamt viermal aus DMF/Wasser umkristallisiert. Dazu wird in DMF (100 ml) in der Siedehitze gelöst und solange mit Wasser versetzt bis die Trübung bestehen bleibt. Nach Zugabe von 5 ml DMF und erneutem Aufkochen läßt man Abkühlen und sammelt den entstandenen Niederschlag. Nach viermaligem Umkristallisieren konnte ein im NMR reines Produkt erhalten werden.

Ausbeute : 525 mg (2,51 mmol / 10%)

Charakterisierung : farbloser Feststoff

Smp. : > 300°C

UV (MeOH) : 215nm(4,28), 241nm(4,03), 290nm(3,94), 325nm(4,19), [340nm(4,09)]

¹H-NMR (DMSO-d₆) : 12,82 ppm (1H, b, H-(N⁸)) / 12,18 ppm (1H, b, H-(N³)) / 7,84-7,80 ppm (1H, d, H-C(5)) / 6,25-6,21 ppm (1H, d, H-C(6)) / 2,51 ppm (3H, s, 2-SCH₃)

C/H/N-Analyse : es wurde keine stimmende Analyse erhalten

2-Amino-4-benzyloxy-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (9)

[C₁₉H₁₅N₅O₂ (345,36)]

In 50 ml 20 %-iger Essigsäure werden 578 mg (2,5 mmol) 2.5.6-Triamino-4-benzyloxy-pyrimidin (**31**) gelöst. Unter kräftigem Rühren werden 360 µl (1,1 Äq.) Phenylglyoxylsäuremethylester (**37**) zugegeben. Nach 45 min Rühren wird auf 60-70°C erhitzt und über Nacht bei dieser Temperatur weitergerührt. Dabei scheidet sich eine feiner intensiv gelber Niederschlag ab. Nach 16 h läßt man abkühlen und saugt den Niederschlag ab, wäscht erst mit Wasser (2 * 20 ml) und anschließend mit Ether (2 * 20 ml). Das Produkt wird in der Trockenpistole bei 100 °C am HV getrocknet.

Ausbeute : 650 mg (1,88 mmol / 75 %)

Charakterisierung : gelber Feststoff

Smp. : > 330°C

UV (MeOH) : 209nm(4,60), 239nm(4,14), 288nm(3,85), 370nm(4,34)

¹H-NMR (DMSO-d₆) : 12,56 ppm (1H, sb, H-(N⁸), mit D₂O austauschb.) / 8,13-8,08 ppm (2H, dd, 2H_{Ar}(Ph)) / 7,59-7,33 ppm (8H, m, 8 H_{Ar}(Bn+Ph)) / 7,28 ppm (2H, sb, 2-NH₂, mit D₂O austauschb.) / 5,52 ppm (2H, s, 4-O-CH₂)

C/H/N-Analyse : ber.: C 66,08, H 4,38, N 20,28 ; gef.: C 65,99, H 4,40, N 20,35

2-Methylmercapto-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridinon (10)

[C₁₃H₁₀N₄O₂S (286,31)]

In einem 100 ml Kolben werden 4,31g (25 mmol) 5,6-Diamino-2-methylmercapto-4(3H)-pyrimidinon (**39**) in 25 ml Eisessig aufgeschlämmt. Nach Zugabe von 4,25 ml (30 mmol) Phenylglyoxylsäuremethylester (**37**) wird unter Kühlung mit einem Eiswasserbad für 30 min gerührt, wobei die Temperatur so gehalten werden muß, daß der Eisessig gerade noch flüssig bleibt. Bereits nach kurzer Zeit färbt sich das Reaktionsgemisch dabei tieforange. Nach 30 min wird der orange Feststoff abgesaugt. Man wäscht mit sehr wenig Wasser und etwas Ether nach und trocknet die Schiff'sche Base noch weiter indem man Luft durchsaugt. Das rohe 6-Amino-5-(α -methoxycarbonyl- α -phenyl-methylenamino)-2-methylmercapto-4(3H)-pyrimidinon (**44**) wird anschließend ohne weitere Reinigung in 250 ml Methanol aufgeschlämmt, mit 25 ml 0,1 N NaOH-Lösung versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Bereits nach 10 min zeigt das DC die vollständige Cyclisierung an, dabei verfärbt sich das Reaktionsgemisch von orange nach schwach gelblich bis farblos. Durch Zugabe von Eisessig unter Rühren bis pH 4-5 wird das Pteridin **10** ausgefällt. Der Niederschlag wird nach einigen Stunden Stehenlassen abgesaugt, gründlich mit Wasser gewaschen und in der Trockenpistole getrocknet.

Eine weitere Reinigung kann unterbleiben.

Ausbeute : 4,61 g (16,1 mmol / 64 %)

Charakterisierung : gelber Feststoff

Smp. : > 300°C

UV (pH 13) : 234nm(4,55), [257nm(4,21)], 358nm(4,29)

UV (MeOH) : 211nm(4,50), [237nm(4,11)], 289nm(4,04), 352nm(4,23)

pK_a-Werte : (1) 6,42 ± 0,2 (über UV bestimmt), (2) 8,99 ± 0,17 (über UV bestimmt)

¹H-NMR (DMSO-D₆) : 12,94 ppm (2H, b, H-(N⁸) + H-(N³), D₂O-austauschbar) / 8,26-8,22 ppm (2H, m, 2 H_{Ar}(Ph)) / 7,46-7,42 ppm (3H, m, 3 H_{Ar}(Ph)) / 2,57 ppm (3H, s, 2-SCH₃)

C/H/N-Analyse : C₁₃H₁₀N₄O₂S* H₂O (304,33),

ber.: C 51,31, H 3,97, N 18,41 ; gef.: C 51,12, H 3,34, N 17,88

2,5,6-Triamino-4-benzyloxy-pyrimidin (31)^[134]

[C₁₁H₁₃N₅O (231,26)]

9,80 g (40mmol) 2,6-Diamino-4-benzyloxy-5-nitroso-pyrimidin (**30**) werden in 750 ml Methanol aufgeschlämmt und nach Zugabe von 250 mg Platinoxidhydrat in einer Schüttelente mit H₂ über Nacht reduziert. H₂-Aufnahme (ber.: 1,79 l) : ca.1,70 l. Die gelbe Lösung der 2,5,6-Triaminoverbindung wird nach Zugabe einer Spatelspitze Natriumdithionit zur Vermeidung der Rückoxidation zur Entfernung des Katalysators filtriert und anschließend zur Trockne einrotiert. Der Rückstand wird aus Wasser (500 ml) wiederum unter Beigabe einer Spatelspitze Natriumthionit umkristallisiert um einen Rest eines anhaftenden braunen Öls zu entfernen.

Ausbeute : 8,32 g (35,98 mmol / 90 %)

Charakterisierung : schwach bräunliche kristalline Plättchen

Smp. : > 144-147°C

¹H-NMR (DMSO-d₆) : 7,50-7,25 ppm (5H, m, H_{Ar}(Ph)) / 5,71 ppm (2H, sb, D₂O-austauschbar, 6-NH₂) / 5,32 ppm (2H, sb, D₂O-austauschbar, 2-NH₂) / 5,25 ppm (2H, s, 4-OCH₂-) / 3,22 ppm (2H, sb, D₂O-austauschbar, 5-NH₂)

Besondere Hinweise : Anstelle von Platin kann auch Raney-Nickel verwendet werden, was allerdings deutlich verlängerte Reaktionszeiten mit sich bringt, wie schon während der Diplomarbeit^[101] bei der Reduktion von 2,6-Diamino-4-(4-methoxybenzyloxy)-5-nitroso-pyrimidin beobachtet wurde.

2,6-Diamino-4-benzyloxy-5-carbethoxymethylenamino-pyrimidin (32)^[36]

[C₁₇H₁₅N₅O₃ (315,33)]

8,00 g (32,6 mmol) 2,6-Diamino-4-benzyloxy-5-nitroso-pyrimidin (**30**) werden in 200 ml dest. MeOH vorgelegt. Nach Zugabe von 20 mg Platin-(IV)-oxid-hydrat wird die violette Suspension bei Raumtemperatur mit H₂ über Nacht hydriert. Nach Aufnahme von ~ 1450 ml (ber.: 1460 ml) H₂ wird der leicht trüben gelben Lösung der Triaminoverbindung **31** eine Spaltelspitze Natriumdithionit in 5ml H₂O zugesetzt um die Rückoxidation bei der Aufarbeitung zu verhindern. Es wird erwärmt, bis eine klare Lösung erhalten wird und zur Entfernung des Katalysators über ein Kieselgurbett abgesaugt. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt, wobei ein bräulicher Feststoff erhalten wird. Im Fall eines öligen Rückstandes muß (eventuell auch mehrmals) mit 50ml Ethanol coevaporiert werden. (Die öligen Anteile erschweren das nachfolgende Aufschlänmen in Wasser).

Der Rückstand wird in 750 ml H₂O aufgeschlämmt. Nach Zugabe von 9 g Glyoxylsäure-ethylester-ethylhalbacetal (**18**) wird für 15 min kräftig geschüttelt, wobei bereits nach kurzer Zeit die Farbe der Suspension von beige in ein kräftiges Gelb umschlägt. Es wird dann für weitere 2 h bei 40°C gerührt*. Man läßt etwas abkühlen und saugt ab und trocknet das gelbe Produkt bei 40°C im HV über Blaugel.

Ausbeute : 9,80 g (31,1 mmol / 95 %)

Charakterisierung : gelber Feststoff

Smp. : >340°C

R_f (Cellulose) :0,49; Citrat(4%)/MeOH (1:1)

¹H-NMR (DMSO-d₆) : 8,10 ppm (1H, s, 5-N=CH-), 7,50-7,25 ppm (5H, m, 5 H_{Ar}(Bn)) / 6,75 ppm (2H, sb, D₂O-austauschbar, 2-NH₂) 6,25 ppm (2H, sb, D₂O-austauschbar, 6-NH₂) / 5,40 ppm (2H, s, 4-OCH₂-) / 4,15 ppm (2H, q, -OCH₂-(OEt)) / 4,15 ppm (3H, q, -CH₃(OEt))

* : Da sich das Gemisch nur schwer rühren läßt, entweder KPG-Rührer oder Reaktion im 1000 ml Kjehtdahl-Kolben durchführen und diesen für 2h an den Rotationsverdampfer hängen (Wasserbad : 40°C).

2-Methylmercapto-7-phenyl-4,6(3H,5H)-pteridindion (38)

[C₁₃H₁₀N₄O₂S (286,31)]

860 mg (5 mmol) 5,6-Diamino-2-methylmercapto-4(3H)-pyrimidinon (**39**) werden in 50 ml 1N HCl gelöst und mit 850 µl (6 mmol) Phenylglyoxylsäuremethylester (**37**) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird bei 50°C über Nacht gerührt, wobei sich ein intensiv gelber Niederschlag abscheidet. Nach dem Abkühlen wird abgesaugt und aus 70ml Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute : 886 mg (3,1 mmol / 62 %)

Charakterisierung : gelber Feststoff

Smp. : > 300°C

UV (pH 5) : 214nm(4,24), 287nm(3,96), 395nm(3,63)

UV (pH 13) : 216nm(4,22), 274nm(4,06), 394nm(3,79)

¹H-NMR (DMSO-D₆) : 12,94 ppm (2H, b, H-N⁸+ H-N³, D₂O-austauschbar) / 8,26-8,22 ppm (2H, m, 2 H_{Ar}(Ph)) / 7,46-7,42 ppm (3H, m, 3 H_{Ar}(Ph)) / 2,57 ppm (3H, s, 2-SCH₃)

C/H/N-Analyse : C₁₃H₁₀N₄O₂S * 0,75 H₂O (299,82),

ber.: C 52,08, H 3,87, N 18,69 ; gef.: C 51,92, H 3,47, N 18,48

6-Amino-5-(α-methoxycarbonyl-α-phenyl-methylenamino)-2-methylmer-capto-4(3H)-pyrimidinon (44)

[C₁₄H₁₄N₄O₃S (318,36)]

Zu einer Mischung aus 431 mg (2,5 mmol) 5,6-Diamino-2-methylmercapto-4(3H)-pyrimidinon (**39**) und 2,5 ml Eisessig werden unter Kühlung im Eisbad 424 µl Phenylglyoxylsäuremethylester (**37**) gegeben. Das Gemisch wird gerührt bis der Eisessig fest wird. Man läßt langsam auftauen und saugt den verbleibenden orangen Niederschlag ab. Die

Substanz wird mit wenig Wasser und Diethylether gewaschen und in der Trockenpistole getrocknet. Rohausbeute : 305 mg

Das Rohprodukt wird aus 5ml Methanol umkristallisiert. Die gebildeten Nadeln werden nach 48 im Kühlschrank abgesaugt und getrocknet.

Ausbeute : 167 mg (520 μ mol / 21 %)

Charakterisierung : orange Nadeln

Smp. : 265-270°C (zuvor Gelbfärbung)

UV(MeOH) : 204nm(4,28), 245nm(4,26), 294nm(4,10), 400nm(3,98)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) : 12,15 ppm (1H, b, H-N 3 , D $_2$ O-austauschbar) / 7,80-7,71 ppm (2H, m, 2 H $_{Ar}$ (Ph)) / 7,44-7,32 ppm (3H, m, 3 H $_{Ar}$ (Ph)) / 6,82 ppm (2H, b, 6-NH $_2$, D $_2$ O-austauschbar) / 3,73 ppm (3H, s, OCH $_3$) / 2,45-2,50 (3H, v, SCH $_3$)

C/H/N-Analyse : C $_{14}$ H $_{14}$ N $_4$ O $_3$ S (318,36)

ber.: C(52,82), H(4,43), N(17,60) ; gef.: C(52,79), H(4,65), N(17,29)

3-Methyl-2-methylmercapto-7-phenyl-4,6(3H,5H)-pteridindion (49)

[C $_{14}$ H $_{12}$ N $_4$ O $_2$ S(300,34)]

600mg (2mmol) 6-Amino-3-methyl-2-methylmercapto-5-nitroso-4(3H)-pyrimidinon^[104,145-147] werden in 100 ml Methanol aufgenommen und unter Raney-Nickelkatalyse mit H $_2$ reduziert, wobei ca. 150 ml (ber.: 134ml) H $_2$ aufgenommen werden. Die Lösung der 5,6-Diaminoverbindung (**48**) wird zur Entfernung des Katalysators filtriert und anschließend zur Trockne einrotiert, Der Rückstand wird nicht weiter gereinigt, sondern nur über Nacht am HV getrocknet. Der gelblich braune Rückstand wird in 10 ml 1N HCl gelöst und bei 40°C mit 340 μ l (2,4 mmol) Phenylglyoxylsäuremethylester (**37**) versetzt. Aus der zu Beginn tieforange Lösung fällt nach kurzer Zeit bereits ein gelber Niederschlag aus, der nach 10min abgesaugt, mit Wasser gewaschen und gründlich getrocknet wird.

Ausbeute : 86 mg (286 μ mol / 72 %)

Charakterisierung : gelbe filzige Nadeln

Smp. : > 300°C

UV (pH 5) : 203nm(4,18),290nm(4,01), 396(3,56)

pK $_a$ -Wert : 6,72 \pm 0,1 (über UV bestimmt)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) : 12,83 ppm (1H, b, D_2O -austauschbar, H-N^5) / 8,31 ppm (2H, m, 2 $\text{H}_{\text{Ar}}(\text{Ph})$) / 7,48 ppm (3H, m, 3 $\text{H}_{\text{Ar}}(\text{Ph})$) / 3,52 ppm (3H, s, $\text{N}^3\text{-CH}_3$) / 2,65 ppm (3H, s, 2- SCH_3)

C/H/N-Analyse : $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2\text{S} \times \text{H}_2\text{O}$ (318,36)

ber.: C 52,82, H 4,43, N 17,60 ; gef.: C 52,32, H 4,06, N 17,48

3-Methyl-2-methylmercapto-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridindion (50)

[$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ (300,34)]

180 mg (600 μmol) 6-Amino-3-methyl-2-methylmercapto-5-nitroso-4(3H)-pyrimidinon^[104,145-147] werden in 50 ml Methanol aufgeschlämmt und unter Raney-Nickelkatalyse mit H_2 reduziert. H_2 -Aufnahme ca. 25 ml (ber.: 27ml). Die Lösung der 5,6-Diaminoverbindung (**48**) wird zur Entfernung des Katalysators filtriert und anschließend zur Trockne einrotiert. Der Rückstand wird nicht weiter gereinigt, sondern nur über Nacht am HV getrocknet.

Der gelblich braune Rückstand wird bei 10°C in 5 ml Eisessig gelöst und mit 85 μl (0,6mmol) Phenylglyoxylsäuremethylester (**37**) versetzt. Die tieforange Lösung wird nach 5min auf Eis gegossen, wobei sich eine orange Substanz (**51**) abscheidet. Das wässrige Gemisch wird mit 50 ml Methylenchlorid extrahiert. Die organische Phase wird mit 20 ml Wasser gewaschen, getrocknet und einrotiert. Der orange Rückstand wird in 20ml Methanol aufgenommen und bei Raumtemperatur mit 0,5 ml conc. Ammoniak (25%) versetzt. Nach 30 min Rühren wird mit verdünnter Essigsäure (1N) neutralisiert wobei sich ein gelber Niederschlag abscheidet, der abgesaugt, mit Wasser gewaschen und gründlich getrocknet wird.

Ausbeute : 86 mg (286 μmol / 48 %)

Charakterisierung : gelbes Pulver

Smp. : $> 300^\circ\text{C}$

UV (pH 5) : 221nm(4,41), [240nm(4,24)], 303nm(3,96),364nm(4,39)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) : 12,90 ppm (1H, b, D_2O -austauschbar, H-N^8) / 8,29-8,23 ppm (2H, m, 2 $\text{H}_{\text{Ar}}(\text{Ph})$) / 7,48-7,40 ppm (3H, m, 3 $\text{H}_{\text{Ar}}(\text{Ph})$) / 3,51 ppm (3H, s, $\text{N}^3\text{-CH}_3$) / 2,62 ppm (3H, s, 2- SCH_3)

C/H/N-Analyse : $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2\text{S} \times 0,5 \text{H}_2\text{O}$ (309,35)

ber.: C 52,02, H 4,24, N 18,11 ; gef.: C 51,12, H 3,34, N 17,88

2-Isobutyroylamido-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinon (54)

[C₁₇H₁₇N₅O₃ (339,35)]

1,71g (6,35 mmol) 2-Amino-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinon (**5**) werden in 50 ml abs. DMF aufgeschlämmt und mit 5,08ml (30mmol/~5Äq.) Isobuttersäureanhydrid und 30mg (245 µmol) DMAP versetzt. Das Gemisch wird für 60 min am Rückfluß erhitzt, wobei sich nach 15 min eine dunkelbraune klare Lösung bildet. Nach dem Abkühlen werden 3 ml MeOH zugegeben, die Mischung wird für 5 min gerührt und anschließend zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in 100 ml DMF in der Hitze gelöst und mit Aktivkohle behandelt. Zum heißen Filtrat werden unter Rühren etwa 70ml Wasser zugesetzt, wobei eine leicht Trübung entsteht. Man läßt abkühlen und saugt die abgeschiedenen Kristalle nach 12h Stehenlassen im Kühlschrank ab, wäscht mit Ether (20 ml) nach und trocknet am HV.

Ausbeute : 970 mg (2,86 mmol / 45 %)

Charakterisierung : farblose flockige Kristalle

Smp. : 252-257°C

R_f (Kieselgel) : 0,53; Tol/EE (4:1)

UV (MeOH) : 216nm(4,60), [229nm(4,41)], 322nm(4,19), 332nm(4,20), [349nm(4,05)]

¹H-NMR (DMSO-d₆) : 10,60 ppm (1H, sb, D₂O-austauschbar, 2-NH^{iBu}) / 7,90 ppm (1H, s, H-C(6)) / 7,61-7,29 ppm (5H, m, 5H_{Ar}(Bn)) / 5,55 ppm (2H, s, 4-O-CH₂) / 3,10-2,91 ppm (1H, m, CH(CH₃)₂) / 1,15 ppm (6H, d, CH(CH₃)₂)

C/H/N-Analyse : C₁₇H₁₇N₅O₃ (339,35)

ber.: C 60,17, H 5,05, N 20,64 ; gef.: C 59,92, H 5,06, N 20,37

2-Methylmercapto-6-phenyl-4-pivaloyloxy-7(8H)-pteridinon (58)

[C₁₈H₁₈N₄O₃S (370,43)]

In einem Gemisch aus 50 ml abs. Pyridin und 2 ml abs. Triethylamin werden unter Kühlung im Eisbad 2,86g (10 mmol) 2-Methylmercapto-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridindion (**10**) aufgeschlämmt. Dazu werden unter Kühlung langsam (5 min) 1,23 ml (10 mmol) Pivaloylchlorid zutropft, wobei eine dunkle Lösung entsteht. Nach Ende des Zutropfens wird das Eisbad entfernt und das Gemisch für weitere 45 min gerührt. Anschließend wird zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in 700 ml Methylenchlorid aufgenommen und gegen 200 ml 0,5

M TEAC-Puffer ausgeschüttelt. Die organische Phase wird nach Trocknen über Natriumsulfat einrotiert und auf 5 g Kieselgel aufgezogen. Die Trennung erfolgte über eine Kieselgelsäule mit einem Toluol/Essigester-Gradienten(10:1 - 3:1). Das Produkt wird bei einem Verhältnis von Tol/EE (4:1) eluiert. Die produkthaltigen Fraktionen werden vereinigt und einrotiert, wobei **58** als gelbes Pulver erhalten wird.

Ausbeute : 2,29 g (6,19 mmol / 62 %)

Charakterisierung : gelber Feststoff

Smp. : > 300°C

R_f (Kieselgel) : 0,43; CH₂Cl₂/MeOH (19:1)

UV (MeOH) : 203nm(4,39), [212nm(4,35)], [239nm(4,18)], 283nm(3,99), 363nm(4,33)

¹H-NMR (DMSO-d₆) : 13,35 ppm (1H, b, H-(N⁸)) / 8,16-8,12 ppm (2H, m, 2 H_{Ar}(Ph)) / 7,56-7,49 ppm (3H, m, 3 H_{Ar}(Ph)) / 2,66 ppm (3H, s, 2-SCH₃) / 1,38-1,32 ppm (9H, s, C(CH₃)₃)

¹H-NMR (CDCl₃) : praktisch identisch nur H-(N⁸) kommt als sb bei 9,48 ppm

C/H/N-Analyse : C₁₈H₁₈N₄O₃S (370,43)

ber.: C 58,36, H 4,90, N 15,12 ; gef.: C 58,94, H 5,16, N 14,85

4-(N,N-Diphenylcarbamoyloxy)-2-methylmercapto-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (59)

[C₂₆H₁₉N₅O₃S (481,53)]

1,43g (5 mmol) 2-Methylmercapto-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridindion (**10**) werden in 200 ml abs. Pyridin aufgeschlämmt. Nach Zugabe von 1,16 g (5 mmol) Diphenylcarbamoylchlorid wird für 2,5 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird einrotiert, in 250 ml Methylenchlorid aufgenommen und gegen 100 ml Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und nach Filtration einrotiert. Die Reinigung erfolgt über eine Kieselgelsäule mit Tol/EE (10:1 - 4:1), produkthaltige Fraktionen werden vereinigt, einrotiert und am HV getrocknet. Zur weiteren Reinigung wird aus 25 ml Toluol umkristallisiert.

Ausbeute : 226 mg (469 µmol / 9 %)

Charakterisierung : gelbgrüne Kristalle

Smp.: 267-270°C

R_f (Kieselgel) : 0,51; CH₂Cl₂/MeOH (19:1)

Smp.: 238-245°C

R_f (Kieselgel) : 0,68; CH₂Cl₂/MeOH (19:1)

UV(MeOH): 207nm(4,46), 223nm(4,23), 243nm(4,05), 260nm(3,94), 288nm(3,83), 378nm(4,38)

¹H-NMR (DMSO-d₆) : 8,78 ppm (1H, s, (2-N=CH-)) / 8,13 ppm (2H, d, 2H_{Ar}(Ph)) / 7,54-7,35 ppm (8H, m, 8H_{Ar}(Bn + Ph)) / 5,65 ppm (2H, s, 4-O-CH₂-) / 3,19 ppm (3H, s, NCH₃) / 3,07 ppm (3H, s, NCH₃)

C/H/N-Analyse : C₂₂H₂₀N₆O₂ (400,44)

ber.: C(65,99), H(5,03), N(20,99) ; gef.: C(65,71), H(4,86), N(20,62)

2-Isobutyroylamido-4-benzyloxy-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (61)

[C₂₃H₂₁N₅O₃ (415,45)]

863 mg (2,5 mmol) 2-Amino-4-benzyloxy-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**9**) werden in 10 ml abs. DMF aufgeschlämmt. Nach Zugabe von 470 µl (2,75 mmol) Isobuttersäureanhydrid wird das

Reaktionsgemisch auf 120 °C erhitzt, wobei alles in Lösung geht. Nach 4h wird die Reaktion durch Zugabe von 2 ml Methanol gequenched. Man läßt abkühlen, wobei sich ein gelber Niederschlag abscheidet. Nach Erkalten des Ansatzes saugt man den Niederschlag ab, wäscht mit Wasser (20 ml) und mit Ether (20 ml) nach und trocknet am HV.

Ausbeute : 470 mg (1,13 mmol / 45 %)

Charakterisierung : gelber Feststoff

Smp.: 196-201°C

R_f (Kieselgel) : 0,73; Tol/EE (4:1)

UV (MeOH) : 215nm(4,55), [227nm(4,33)], 287nm(3,78), 359nm(4,34)

¹H-NMR (DMSO-d₆) : 12,96 ppm (1H, sb, H-(N⁸)) / 10,63 ppm (1H, sb, 2-NH) / 8,21-8,12 ppm (2H, m, 2H_{Ar}(Ph)) / 7,63-7,55 ppm (2H, m, 2 H_{Ar}(Bn)) / 7,49-7,32 ppm (6H, m, 6 H_{Ar}(Bn + Ph)) / 5,59 ppm (2H, s, 4-O-CH₂-) / 3,03-2,90 ppm (1H, m, CH(CH₃)₂) / 1,12-1,07 ppm (6H, d, CH(CH₃)₂)

C/H/N-Analyse : C₂₃H₂₁N₅O₃ (415,45)

ber.: C 66,49, H 5,09, N 16,86 ; gef.: C 66,06, H 5,18, N 17,40

2-Ethylmercapto-4,7(3H,8H)-pyrido-[2,3-d]-pyrimidin (73)

[C₉H₉N₃O₂S (223,26)]

8,56 g (50 mmol) 6-Amino-2-ethylmercapto-4(3H)-pyrimidinon (**71**) werden in 100 ml Eisessig gelöst. Nach Zugabe von 10,8 ml (52,5 mmol) Ethoxymethylenmalonsäurediethylester (**63**) zu der schwach gelblichen Lösung wird für 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach dieser Zeit wird das Reaktionsgemisch für weitere 16 h am Rückfluß gekocht, wobei sich ein farbloser Niederschlag abscheidet. Man läßt abkühlen und saugt den entstandenen Niederschlag ab. Das Produkt **73** wird erst mehrmals mit Wasser säurefrei gewaschen, anschließend noch einmal mit Ether und dann am HV getrocknet. Ein weiteres Kochen des Filtrats führt nicht zur Abscheidung neuen Produkts. Beim Einengen des Filtrats wird nur verunreinigtes Produkt **73** isoliert.

Ausbeute : 4,27 g (19,1 mmol / 38 %)

Charakterisierung : farbloser Feststoff

Smp. : > 300°C

R_f (Kieselgel) : 0,55; CH₂Cl₂/MeOH (10:1)

UV (MeOH) : 216nm(4,33), 243nm(4,08), 290nm(3,95), 327nm(4,23), [339nm(4,11)]

¹H-NMR (DMSO-d₆) : 12,73 ppm (1H, b, H-(N⁸)) / 12,15 ppm (1H, b, H-(N³)) / 7,79-7,75 ppm (1H, d, H-C(5)) / 6,27-6,23 ppm (1H, d, H-C(6)) / 3,22-3,12 ppm (2H, q, 2-SCH₂-CH₃) / 1,35-1,26 ppm (3H, t, 2-SCH₂-CH₃)

C/H/N-Analyse : C₉H₉N₃O₂S x 0,1 H₂O (225,26),

ber.: C 48,03, H 4,12, N 18,61 ; gef.: C 48,03, H 4,12, N 18,12

C. SYNTHESE DER NUCLEOSIDE**2-Desoxy-3,5-di-O-p-chlorbenzoyl- α -D-ribofuranosyl-chlorid (76)**^[105,193,194][C₁₉H₁₅Cl₃O₅ (429,66)]

Eine Lösung von 13,6 g (100 mmol) 2-Desoxy-D-ribose (**77**) in 243 ml Methanol wird mit 27 ml einer 1%-igen methanolischen Salzsäure versetzt. Nach 15 min werden unter kräftigem Rühren 5 g Silbercarbonat zugesetzt. Das Gemisch wird filtriert und das Lösungsmittel abgezogen. Der Rückstand (Methyl-2-desoxy-D-ribofuranosid) wird nach zweimaligem Coevaporieren mit 10 ml Pyridin in 80ml trockenem Pyridin gelöst und mittels Eisbad gekühlt. Der Lösung werden 38,5 g (220 mmol) p-Chlorbenzoylchlorid zugegeben, das Reaktionsgemisch wird anschließend erst für 1h unter Kühlung gerührt und danach für weitere 2h auf 40-50°C erwärmt. Nach Abkühlen wird zur Hydrolyse auf das 3-fach Volumen Eiswasser gegeben. Es wird dreimal mit je 100 ml Methylenchlorid¹ extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, und mit jeweils 100 ml Wasser, 1N H₂SO₄ und 1N NaHCO₃ gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird einrotiert. Der gelbe ölige Rückstand wird in 500 ml Diethylether aufgenommen, zur Abtrennung der p-Chlorbenzoesäure filtriert und erneut zur Trockne eingeeengt und über Nacht am HV getrocknet. Das gelbe Öl wird in 40 ml Eisessig/Essigsäureanhydrid (19/1) gelöst und zu 80 ml zuvor mit HCl gesättigtem gekühltem Eisessig/Essigsäureanhydrid-Gemisch (19/1) gegeben. Bei 10°C wird unter Rühren für 15 min HCl-gas durch die Lösung geleitet, wobei sich bereits nach kurzer Zeit das Produkt als farbloser Kristallbrei abscheidet. Nach 30 min wird abgesaugt und mehrmals gründlich mit trockenem Diethylether gewaschen. Vor seiner Verwendung muß **76** für mindestens eine Woche im Exsikkator über P₂O₅/KOH getrocknet werden. Eine Umkristallisation (Toluol oder CCl₄^[105,193,194]) ist nicht notwendig.

Ausbeute : 31,45 g (73,2mmol / 73%)

Charakterisierung : farblose Kristalle

¹H-NMR (CDCl₃) : 8,12-7,97 ppm (4H, 2 d, 4H_{Ar}(pcb)) / 7,41-7,32 ppm (4H, 2 d, 4H_{Ar}(pcb)) / 6,57 ppm (1H, m, H-C(1')) / 5,52 ppm (1H, m, H-C(3')) / 4,78 ppm (1H, m, H-C(4')) / 4,68-4,53ppm (2H, m, 2 H-C(5')) / 2,95-2,69 ppm (2H, 2 m, 2 H-C(2'))

¹ Methylenchlorid ergibt bessere Phasentrennung und erlaubt so eine schnellere und effektivere Extraktion des Produkts. Allerdings löst sich dabei auch die bei der Hydrolyse des überschüssigen Acylchlorids gebildete p-Chlor-benzoesäure, daher muß in einem zweiten Schritt in Ether gelöst und filtriert werden, wobei die Säure zurückbleibt. Nach Literatur^[105,193,194] wird direkt mit Ether extrahiert.

2-N,N-Dimethylaminomethylenamino-4-benzyloxy-N⁶-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxyβ-D-ribofuranosyl]-7(8H)-pteridinon (79)

[C₃₅H₃₀Cl₂N₆O₇ (717,57)]

In 100 ml abs. Acetonitril werden 3,01g (9,28 mmol) 2-N,N-Dimethylaminomethylenamino-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinon (**6**) aufgeschlämmt und mit 1,67 ml (1,2 Äq.) DBU versetzt. Nach 15 min Rühren werden zu der Suspension insgesamt 4 g (9,3 mmol) 3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy-α-D-ribofuranosylchlorid (**76**) in drei Portionen zugegeben. Für kurze Zeit erhält man eine klare braunorange Lösung aus der sich nach wenigen Minuten ein farbloser Niederschlag abzuscheiden beginnt. Nach 1 h wird der Niederschlag abgesaugt, mit wenig Acetonitril und Ether gewaschen und getrocknet.

(Im DC zeigt sich im Filtrat nur sehr wenig Produkt, daher wurde die Mutterlauge nicht weiter aufgearbeitet. Dem DC nach handelt es sich bei den anderen Substanzen im Gemisch hauptsächlich um Edukt und das an der Aminofunktion entschützte Pteridin.)

Ausbeute : 1,43 g (4,47 mmol / 48%)

Charakterisierung : feine farblose Nadeln

Smp. : 147-151°C

R_f (Kieselgel) : 0,46; Toluol/Essigester (1:9)

UV (MeOH) : 202nm(4,73), 239nm(4,68), 356nm(4,39)

¹H-NMR (CDCl₃) : 8,67 ppm (1H, s, 2-N=CH-) / 7,99-7,92 ppm (5H, m, H-C(6) + 4 H_{Ar}(pcb)) / 7,58-7,50 ppm (1H, m, H-C(1')) / 7,50-7,30 ppm (9H, m, 5 H_{Ar}(4-OBn) + 4 H_{Ar}(pcb)) / 6,13-6,06 ppm (1H, m, H-C(3')) / 5,62 ppm (2H, s, 4-OCH₂-) / 4,87-4,49 ppm (3H, 3 m, H-C(4') + H-C(5') + H-C(5'')) / 3,41-3,30 ppm (1H, m, H_β-C(2')) / 3,22-3,20 ppm (6H, d, N(CH₃)₂) / 2,58-2,47 ppm (1H, m, H_α-C(2'))

C/H/N-Analyse : C₃₅H₃₀Cl₂N₆O₇ (717,57)

ber.: C 58,58, H 4,21, N 11,71 ; gef.: C 59,22, H 4,53, N 11,24

2-Methylmercapto-6-phenyl-N⁸-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxyβ-D-ribofuranosyl]-4,7(3H,8H)-pteridindion (80)

[C₃₂H₂₄Cl₂N₄O₇S (679,54)]

Methode A: (Direktglycosidierung von **10**)

1,43 g (5 mmol) 2-Methylmercapto-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridindion (**10**) werden in 100 ml abs. Acetonitril aufgeschlämmt und mit 1,70 ml DBU (11 mmol / 2,2 Äq.) versetzt. Zu der gelben Lösung werden in drei Portionen insgesamt 1,94 g (4,5 mmol / 0,9 Äq.) 3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy-α-D-ribofuranosylchlorid (**76**) zugegeben. Nach 60 min Rühren wird abgebrochen und der Ansatz einrotiert. Der gelbe Rückstand wird in 200 ml Methylenchlorid gelöst und zweimal mit 50ml Wasser gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat wird wieder zur Trockne einrotiert, wobei ein gelber Schaum erhalten wird. Die Reinigung des Produkts **80** erfolgt über eine Kieselgelsäule mit Toluol/Essigester (20:1 - 5:1). Die produkthaltigen Fraktionen werden vereinigt und einrotiert.

Ausbeute : 911 mg (1,34 mmol / 30%)

Methode B: (Glycosidierung des O⁴-pivaloylierten Pteridinderivats **58**)

1,85g (5 mmol) 2-Methylmercapto-6-phenyl-4-pivaloyloxy-7(8H)-pteridinon (**58**) werden in 200 ml abs. Acetonitril aufgeschlämmt. Zugabe von 771 µl DBU (5 mmol) führt zu einer gelben klaren Lösung. In zwei Portionen werden dann insgesamt 2,15 g (5 mmol) 3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy-α-D-ribofuranosylchlorid (**76**) zugegeben. Nach 60 min Rühren wird der Ansatz einrotiert und in 250 ml Methylenchlorid aufgenommen. Der gelben Lösung werden 25 ml methanolischer Ammoniak beigegeben. Nach 10 min Rühren bei RT wird erneut einrotiert und direkt im Anschluß säulenchromatographisch getrennt. Dabei muß darauf geachtet werden, daß die Abspaltung der Pivaloylschutzgruppe nicht zu lange geht, da sich sonst im DC viel polarere Nebenprodukte bilden, bei denen es nicht klar ist, ob es sich um vollentschützte Produkte, oder um Zersetzungsprodukte handelt. 10 min erwiesen sich als gute Zeitspanne. Die Isolierung von **80** erfolgt über eine Kieselgelsäule mit Tol/EE (20:1 - 8:1). Das Produkt eluiert bei Tol/EE (10:1). Die produkthaltigen Fraktionen werden vereinigt und einrotiert.

Ausbeute : 1,84 g (2,71 mmol / 54 %)

Charakterisierung : gelbe Nadeln

Smp.: 184-189°C

R_f (Kieselgel) : 0,53; Tol/EE (5:1)

UV (MeOH) : 202nm(4,68), [221nm(4,49)], 240nm(4,63), [267nm(4,09)], 378nm(4,31)

pK_A-Wert : 8,71 ± 0,17 (UV-spektroskopisch bestimmt)

¹H-NMR (CDCl₃) : 8,25-8,17 ppm (2H, m, 2H_{Ar}(Ph)) / 8,03-7,90 ppm (4H, m, 4 H_{Ar}(pcb)) / 7,50-7,44 ppm (1H, m, H-C(1')) / 7,40-7,12 ppm (7H + CHCl₃, m, 4H_{Ar}(pcb) + 3H_{Ar}(Phe)) / 6,15-6,09 ppm (1H, m, H-C(3')) / 4,90-4,56 ppm (3H, 3 m, H-C(4') + H-C(5') + H-C(5')) / 3,45-3,33 ppm (1H, m, H_β-C(2')) / 2,58-2,49 ppm (4H, s, 2-SCH₃ + H_α-C(2'))

C/H/N-Analyse : C₃₂H₂₄Cl₂N₄O₇S (679,54)

ber.: C 56,56, H 3,56, N 8,24 ; gef.: C 56,41, H 3,64, N 8,11

2-iso-Butyrylamido-4-benzyloxy-N⁸-[3,5-di-O-p-toluoyl- α -D-2-desoxyribofuranosyl]-7(8H)-pteridinon
(81)

2-iso-Butyrylamido-4-benzyloxy-N⁸-[3,5-di-O-p-toluoyl- β -D-2-desoxyribofuranosyl]-7(8H)-pteridinon
(82)

[C₃₈H₃₇N₅O₈ (691,75)]

2,83 g (7,29 mmol) 2-(iso-Butyrylamido)-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinon (**54**) werden in 200 ml absolutem Acetonitril aufgeschlämmt. Nach Zugabe von 2,2 Moläquivalenten (2,46 ml / 16 mmol) DBU wird bei Raumtemperatur solange gerührt (<2 min) bis das Edukt in Lösung gegangen ist. Die klare Lösung wird im Eisbad gekühlt und weitere 10 min gerührt. Dazu werden insgesamt 3,12 g (8 mmol) 3,5-Di-O-p-toluoyl- α -D-2-desoxyribofuranosyl-chlorid (**75**)^[193,194] in drei Portionen zugegeben. Es wird noch für weitere 15 min bei 0°C gerührt, danach läßt man unter Rühren bis auf Raumtemperatur erwärmen. Dabei wird das Reaktionsgemisch klar.

Nach 2 h wird der Ansatz zur Trockne eingeeengt. Man nimmt in 300 ml Methylenchlorid auf und schüttelt zur Entfernung des DBU erst mit 100 ml 1N NaHCO₃-Lösung aus und wäscht anschließend zweimal mit je 100 ml Wasser. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration und Einengen am Rotationsverdampfer erhält man 5,94 g fast farblosen Schaum. Die Auftrennung der Anomeren erfolgte chromatographisch über eine Kieselgelsäule mit Toluol/Essigester (20:1 - 5:2), wobei das α -Anomer **81** zuerst eluiert wird (Tol/EE 8:1). Die produkthaltigen Fraktionen werden einrotiert und am HV getrocknet. Nach Auftreten erster Mischfraktionen wird mehr Essigester zugesetzt (5:1 - 5:2), wobei das β -Anomer eluiert wird. Die Mischfraktionen werden verworfen, die **82**-haltigen Fraktion werden vereinigt und zur Trockne eingeeengt und am HV getrocknet.

<u>Ausbeuten</u> :	81	750 mg	(1,08 mmol / 15%)
	82	2,88 g	(4,16 mmol / 57%)

Charakterisierung : **81** farbloser Schaum

Smp.: 129-137°C

R_f (Kieselgel) : 0,41; Tol/EE (5:1)

UV (MeOH) : 202nm(4,71), 217nm(4,49), 238nm(4,66), 323nm(4,14)

¹H-NMR (CDCl₃) : 8,12 ppm (1 H, s, H-C(6)) / 8,05 ppm (1 H, s, D₂O-austauschbar, 2-NH) / 7,94-7,90 ppm (4H, d, 4 H_{Ar}(tol)) / 7,57-7,53 ppm (2H, d, 2 H_{Ar}(Bn)) / 7,42-7,34 ppm (3H, m, 3 H_{Ar}(Bn)) / 7,28-7,15 ppm (4H {+ Lösungsmittelpeak}, 2d {s}, 4 H_{Ar}(tol)) / 7,06-7,02 ppm (1H, pq, H-C(1')) / 5,78- 5,70 ppm (3H, m+s, H-C(3') + 4-O-CH₂-) / 4,73-4,47 ppm (3H, m, H-C(4') + 2 H-C(5')) / 3,15-3,01 ppm (1H, m, -CH (ⁱBut)) / 2,98-2,72 ppm (2H, 2m, 2 H-C(2')) / 2,46-2,35 ppm (6H, 2s, 2 CH₃(tol)) / 1,29-1,23 ppm (6H, m(2d), 2 CH₃ (ⁱBut))

¹H-NMR (DMSO) : 10,70 ppm (1H, s, D₂O-austauschbar, 2-NH) / 8,08 ppm (1H, s, H-C(6)) / 7,93-7,88 ppm (2H, d, 2 H_{Ar}(tol)) / 7,77-7,72 ppm (2H, d, 2 H_{Ar}(tol)) / 7,65-7,55 ppm (2H, m, 2 H_{Ar}(Bn)) / 7,45-7,27 ppm (5H, m, 2 H_{Ar}(Bn) + 3 H_{Ar}(tol)) / 7,25-7,21 ppm (2H, d, 2 H_{Ar}(Bn)) / 6,85 ppm (1H, m, H-C(1')) / 5,70-5,54 ppm (3H, m+s, H-C(3') + 4-O-CH₂-) / 4,70-4,38 ppm (3H, 3m, H-C(4') + 2 H-C(5')) / 2,98-2,75 ppm (3H, m, 2 H-C(2') + -CH (ⁱBut)) / 2,46-2,30 ppm (6H, 2s, 2 CH₃(tol)) / 1,19-1,10 ppm (6H, m(2d), 2 CH₃ (ⁱBut))

C/H/N-Analyse : von **81** wurde keine stimmende Analyse erhalten

Charakterisierung : **82** farbloser Schaum

Smp.: 136-142°C

R_f (Kieselgel) : 0,27; Tol/EE (5:1)

UV (MeOH) : 202nm(4,69), 217nm(4,50), 238nm(4,66), 323nm(4,15)

¹H-NMR (CDCl₃) : 8,29 ppm (1H, s, 2-NH) / 8,02 ppm (1H, s, H-C(6)) / 7,94-7,80 ppm (4H, 2d, 4 H_{Ar} (tol)) / 7,53-7,46 ppm (2H, m, 2 H_{Ar} (Bn)) / 7,39-7,33 ppm (3H, m, 3 H_{Ar} (Bn)) / 7,32-7,10 ppm (5H + CHCl₃, m, 4 H_{Ar} (tol) + H-C(1')) / 6,08-6,03 ppm (1H, m, H-C(3')) / 5,63 ppm (2H, s, 4-O-CH₂) / 4,81-4,74 ppm (1H, m, H-C(4')) / 4,61-4,46 ppm (2H, m, 2 H-C(5')) / 3,58-3,47 ppm (1H, m, H-C(2')_β) / 3,01-2,92 ppm (1H, m, CH (ⁱBut)) / 2,51-2,34 ppm (7H, m + 2 s, H-C(2')_α + 2 CH₃(tol)) / 1,29-1,20 ppm (6H, m (2d), 2 CH₃ (ⁱBut))

C/H/N-Analyse : C₃₈H₃₇N₅O₈ x 0,25 H₂O (696,25)

ber.: C 65,55, H 5,39, N 10,01 ; gef.: C 65,68, H 5,38, N 9,59

2-(N,N-Dimethylaminomethylenamino)-4-benzyloxy-N-[2-desoxy-3,5-di-O-(p-toluoyl)]β-D-ribofuranosyl]-7(8H)-pteridinon (83)⁽¹⁰¹⁾

[C₃₇H₃₆N₆O₇ (672,73)]

3,24 g (10 mmol) 2-(N,N-Dimethylaminomethylenamino)-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinon (**6**) werden in 100 ml abs. Acetonitril aufgeschlämmt und zur Entfernung des Kristallwassers für 30 min mit etwas Molsieb gerührt. Man dekantiert vom Molsieb ab und spült mit 50 ml abs. MeCN nach. Dabei bleiben nur geringe Reste der Pteridinbase zurück. Zu der Suspension der Base gibt man 1,87 ml (12,5 mmol) DBU und rührt bei Raumtemperatur. Nach etwa 10 min geht das Pteridin in Lösung. Unter Rühren werden portionsweise 4,5 g (11,0 mmol) 2-Desoxy-3,5-di-O-(p-toluoyl)-α-D-ribofuranosylchlorid (**75**)^[193,194] zugegeben. Nach 30 min saugt man den entstandenen farblosen Niederschlag ab und trocknet im HV bei 40°C, wobei 2,43 g (α/β-Gemisch) erhalten werden. Das Filtrat wird einrotiert und in 100 ml CH₂Cl₂ aufgenommen. Zur Entfernung des DBUs wird 2 mal mit je 50 ml H₂O gewaschen. Nach dem Trocknen verbleiben 5,22 g brauner Schaum. Die chromatographische Auftrennung erfolgt über eine Kieselgelsäule mit Toluol / Essigester (3:1). Die Fraktionen mit R_f = 0,65 werden vereinigt, einrotiert und getrocknet, wobei 1,67 g α/β - Gemisch erhalten werden. Umkristallisation beider Fraktionen aus EE / MeOH (20:1) ergibt 3,29g farblose fein verfilzte Nadeln. Das Produkt ist anomerenrein (¹H-NMR-Spektrum zeigt keine Spuren des α-Nucleosids).

Ausbeute : 3,29g (4,89 mmol / 49%)

Charakterisierung : farblose feine Nadeln

Smp. : 145-149°C

R_f (Kieselgel) : 0,47; Toluol/Essigester (9:1)

UV (MeOH) : 221nm(4,62) [234nm(4,59)], 356nm(4,28)

¹H-NMR (CDCl₃) : 8,55 ppm (1H, s, 2-N=CH-) / 7,84 ppm (5H, m, H-C(6) + 4H_{Ar} (tol)) / 7,48-7,23 ppm (6H, 2m, H-C(1') + 5H_{Ar}(Bn)) / 7,21-7,03 ppm (4H, dd, 4H_{Ar} (tol)) / 5,99 ppm (1H, m, H-C(3')) / 5,54 ppm (2H, s, 4-OCH₂) / 4,75ppm (1H, m, H-C(4')) / 4,68-4,48ppm (2H, m, 2 H-C(5')) / 3,29 ppm (1H, m, H-C(2')_β) / 3,10 ppm (6H, d, N(CH₃)₂) / 2,43 ppm (1H, m, H-C(2')_α) / 2,35-2,29 ppm (6H, 2 s, 2*CH₃(tol))

C/H/N-Analyse : C₃₇H₃₆N₆O₇ (672,73)

ber.: C 61,80, H 3,96, N 9,48 ; gef.: C 61,46, H 4,07, N 9,23

N⁸-[3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-2-methylmercapto-4,7(3H,8H)-pteridindion
(84)

[C₂₆H₂₀Cl₂N₄O₇S (603,44)]

1,5 g (5,0 mmol) 2-Methylmercapto-4,7(3H,8H)-pteridindion (**7**)^[137] werden in 100ml abs. Acetonitril aufgeschlämmt und durch Zugabe von 1,87 ml (12,5 mmol / 2,5 Äq.) DBU weitgehend in Lösung gebracht. Das Gemisch wird im Eisbad für 10 min gerührt. Nach Zugabe von 1,93 g (4,5 mmol / 0,9 Äq.) 3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy-α-D-ribofuranosylchlorid (**76**) in drei Portionen wird für 60 min weitergerührt. Das Eisbad wird entfernt und zur Neutralisation eine Mischung von 200µl Eisessig, 18 ml MeOH und 2ml Wasser zugegeben. Die klare Lösung wird weitere 30 min gerührt und anschließend zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wird in 150 ml Methylenchlorid gelöst und zweimal mit je 50ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und erneut einrotiert, wobei 2,52 g (4,17 mmol / 93%) eines braunen Schaums erhalten werden. Die Trennung erfolgt über eine Kieselgelsäule mit CH₂Cl₂/MeOH (99:1 - 95:5). Die Produktfraktionen werden vereinigt und zur Trockne eingeeengt.

Ausbeute : 870 mg (1,44 mmol / 32% bez.auf **76**)

Für analytische Zwecke wurde eine kleine Probe aus Toluol umkristallisiert.

Charakterisierung : schwach bräunlicher Schaum

Smp. : 165-168°C

R_f (Kieselgel) : 0,38; CH₂Cl₂/MeOH (9:1)

UV (MeOH) : 202nm(4,70), 239nm(4,64), 352nm(4,06)

¹H-NMR (CDCl₃) : 8,04 ppm (1H, s, H-C(6)) / 7,99-7,93 ppm (m, 4 H_{Ai}(pcb)) / 7,48-7,73 ppm (5H, m+q, H-C(1') + 4 H_{Ar}(pcb)) / 5,99 ppm (1H, m, H-C(3')) / 4,83-4,54 ppm (3H, 3 m, H-C(4') + H-C(5') + H-C(5')') / 3,35 ppm (1H, m, H-C(2')_β) / 2,67 ppm (3H, s, 2-SCH₃) / 2,55 ppm (1H, m, H-C(2')_α)

C/H/N-Analyse : C₂₆H₂₀Cl₂N₄O₇S (603,44)

ber.: C 51,75, H 3,34, N 9,28 ; gef.: C 51,24, H 3,28, N 9,28

2-N,N-Dimethylamino-4-benzyloxy-N⁸-[3,5-di-O-p-toluoyl-β-D-2-desoxyribofuranosyl]-7(8H)-pteridinon (85)

[C₃₆H₃₅N₅O₇ (649,70)]

3,27g (11mmol) 2-N,N-Dimethylamino-4-benzyloxy-7(8H)-pteridinon (**33**)^[138] werden in 100 ml abs. Acetonitril unter Zugabe von 2,06 ml (13,75 mmol / 1,25 Äq.) DBU gelöst. Zu der klaren Lösung werden in drei gleichen Portionen in kurzen Abständen insgesamt 4,70g (12,1 mmol / 1,1 Äq.) 3,5-di-O-p-Toluoyl-2-desoxy-α-D-ribofuranosylchlorid (**75**)^[193,194] zugegeben. Nach 30 min Rühren bei Raumtemperatur wird die Reaktion durch Zugabe von 735 µl Eisessig in 50 ml MeOH/Wasser (9:1) abgestoppt. Nach 90 min Rühren wird einrotiert, in 250 ml Methylenchlorid aufgenommen und zweimal mit je 50 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, zur Trockne eingengt und über eine Kieselgelsäule mit Toluol/Essigester (20:1 - 4:1) chromatographisch aufgetrennt. Die produkthaltigen Fraktionen werden eingengt und am HV getrocknet.

Ausbeute : 3,22 g (4,95 mmol / 45 %)

Charakterisierung : farbloser amorpher Feststoff

Smp.: 127-132°C

R_f (Kieselgel) : 0,76; Tol/EE (4:1)

UV (MeOH) : 202nm(4,79), [214nm(4,59)], 239nm(4,68), 282nm(3,73), 362nm(4,23)

¹H-NMR (CDCl₃) : 7,92 ppm (4H, d, 4H_{Ar}(Tol)) / 7,77 ppm (1H, s, H-C(6)) / 7,51-7,11 ppm (10H, m+dd, H-C(1') + 4H_{Ar}(Tol) + 5H_{Ar}(Bn)) / 5,94 ppm (1H, m, H-C(3')) / 5,56 ppm (2H, s, 4-O-CH₂-) / 4,79-4,52 ppm (3H, 3 m, H-C(4') + H-C(5') + H-C(5')') / 3,39 ppm (1H, m, H-C(2')_β) / 3,22 ppm (6H, s, 2-N(CH₃)₂) / 2,51-2,35 ppm (7H, m+d, 2 * CH₃ (Tol) + H-C(2')_α)

C/H/N-Analyse : C₃₆H₃₅N₅O₇ (649,70)]

ber.: C 66,55, H 5,43, N 10,78 ; gef.: C 66,24, H 5,43, N 10,53

2-Amino-4-benzyloxy-N⁸-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (86)

[C₃₈H₂₉Cl₂N₅O₇ (738,58)]

In 200 ml abs. Acetonitril werden 2,59 g (7,5 mmol) 2-Amino-4-benzyloxy-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**9**) durch Zugabe von 1,39 ml (9 mmol) DBU gelöst. Zu der gelben Lösung werden

3,22 g (1 Äq.) 3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy- α -D-ribofuranosylchlorid (**76**) zugegeben. Nach 10 min geht alles in Lösung, trotzdem wird noch für 45 min weitergerührt, bevor der Ansatz einrotiert wird. Man nimmt in 250 ml Methylenchlorid auf und wäscht mit 50 ml Wasser. Nach Trocknen auf Natriumsulfat wird einrotiert und über eine Kieselgelsäule mit Toluol/Essigester-Gradient getrennt. Nach Abtrennen der unpolaren Substanzen mit reinem Toluol wird das Produkt mit Tol/EE (10:1) eluiert. Die produkthaltigen Fraktionen werden vereinigt und einrotiert. Die Trocknung erfolgt am HV.

Ausbeute : 1,67 g (2,27 mmol / 30%)

Charakterisierung : gelber Feststoff

Smp. : 142-147°C

R_f (Kieselgel) : 0,42; Tol/EE (10:1)

UV (MeOH) : 202nm(4,57), 242nm(4,49), 372nm(4,12)

¹H-NMR (CDCl₃) : 8,20-8,12 ppm (2H, m, 2H_{Ar}(Phe)) / 7,97-7,89 ppm (4H, m, 4H_{Ar} (pcb)) / 7,50-7,15 ppm (13H + CHCl₃, m ü, H-C(1') + 3H_{Ar}(Phe) + 4H_{Ar} (pcb) + 5H_{Ar}(Bn)) / 6,15-6,08 ppm (1H, m, H-C(3')) / 5,57 ppm (2H, s, 4-OCH₂-) / 5,39 ppm (2H, s b, 2-NH₂, D₂O-austauschbar) / 4,98 ppm (1H, m, H-C(4')) / 4,63-4,52 ppm (2H, m, 2 H-C(5')) / 3,48-3,35 ppm (1H, m, H-C(2')_β) / 2,55-2,45 ppm (1H, m, H-C(2')_α)

C/H/N-Analyse : C₃₈H₂₉Cl₂N₅O₇ (738,58)

ber.: C 61,80, H 3,96, N 9,48 ; gef.: C 61,46, H 4,07, N 9,23

2-N,N-Dimethylaminomethylenamino-4-benzyloxy-N-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy- β -D-ribofuranosyl]-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (87)

[C₄₁H₃₄Cl₂N₆O₇ (793,66)]

1,95 g (4,86 mmol) 2-N,N-Dimethylaminomethylenamino-4-benzyloxy-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**60**) werden durch Zugabe von 710 μ l (5 mmol) DBU in 100 ml abs. Acetonitril gelöst. Nach 15 min Rühren bei RT werden 2,10 g (4,88 mmol/ 1 Äq.) 3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy- α -D-ribofuranosylchlorid (**76**) zugegeben und für 60 min gerührt. Danach wird einrotiert, in 500 ml Methylenchlorid augenommen und nacheinander mit 100 ml 0,1 %-iger Essigsäure und 2 mal mit 100 ml Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird einrotiert und auf 2 g Kieselgel aufgezogen. Die Trennung erfolgt säulenchromatographisch mit Toluol/Essigsäureethylester (20:1 - 10:1). Die produkthaltigen Fraktionen (Tol/EE 12:1) werden vereinigt, einrotiert und am HV getrocknet.

Ausbeute : 1,23 g (1,55 mmol / 32%)

Charakterisierung : gelbe Nadeln (aus Toluol)

Smp.: 121-124°C

R_f (Kieselgel) : 0,63; Tol/EE (10:1)

UV (MeOH) : 202nm(4,63), [217nm(4,36)], 240nm(4,49), 271nm(4,01), 383nm(4,14)

¹H-NMR (CDCl₃) : 8,67 ppm (1H, s, 2-N=CH-NMe₂) / 8,25-8,16 ppm (2H, m, 2 H_{Ar}(Ph)) / 7,98-7,90 ppm (4H, d, 4 H_{Ar}(pcb)) / 7,67-7,61 ppm (1H, q, H-C(1')) / 7,50-7,20 ppm (12 H, m(ü), 3 H_{Ar}(Ph) + 4 H_{Ar}(pcb) + 5 H_{Ar}(Bn)) / 6,22-6,11 ppm (1H, m, H-C(3')) / 5,66 ppm (2H, s, 4-OCH₂-) / 4,86-4,47 ppm (3H, 3m, H-C(4') + 2*H-C(5')) / 3,43-3,32 ppm (1H, m, H-C(2')_β) / 3,24-3,20 ppm (6H, d, N(CH₃)₂) / 2,61-2,48 ppm (1H, m, H-C(2')_α)

C/H/N-Analyse : C₄₁H₃₄Cl₂N₆O₇ (793,66)

ber.: C 62,05, H 4,32, N 10,59 ; gef.: C 61,84, H 4,06, N 10,13

2-Ethylmercapto-4,7(3H,8H)-pyrido[2,3-d]pyrimidindion-Glycosid (88)

(vermutlich das 7-O-[3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy-α-D-ribofuranosyl]-2-ethylmercapto-4(3H)-pyrido[2,3-d]pyrimidinon

[C₂₈H₂₂Cl₂N₄O₇S (629,43)]

1,0 g (4,48 mmol) 2-Ethylmercapto-4,7(3H,8H)-pyrido[2,3-d]pyrimidindion (**73**) werden in 50 ml trockenem Acetonitril aufgeschlämmt und mit 1,40 ml (9,85 mmol / 2,2Äq.) DBU versetzt. Zu der klaren Lösung werden in drei Portionen im Abstand von je 2 min. insgesamt 1,93 g (4,49 mmol / 1 Äq.) 3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy-α-D-ribofuranosylchlorid (**76**) zugegeben, wobei kurz nach der Zugabe wieder eine klare Lösung erhalten wird. Nach 2h Rühren bei Raumtemperatur wird zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in 100 ml Methylenchlorid gelöst und mit 30 ml Wasser gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat wird erneut eingengt, wobei ein bräunlicher Schaum erhalten wird. Die Auftrennung erfolgt über eine Kieselgelsäule mit CH₂Cl₂/MeOH (99:1 - 95:5). Das Produkt wird dabei bei einem Methanolgehalt von 4-5% eluiert. Die Produktfraktionen werden vereinigt und zur Trockne eingengt und am HV getrocknet.

Ausbeute : 798 mg (1,27 mmol / 28 %)

Charakterisierung : farbloser amorpher Feststoff

UV (MeOH) : 202nm(4,63), [220nm(4,62)], 241nm(4,72), [290nm(4,09)], 310nm(4,21), [323nm(4,15)], [337nm(3,94)]

¹H-NMR (CDCl₃) : 9,04 ppm (1H, b, H-N³) / 8,02-7,91 ppm (4H, d, 4 H_{Ar}(pcb)) / 7,65-7,61 ppm (1H, d, H-5) / 7,47-7,36 ppm (4H, d, 4 H_{Ar}(pcb)) / 6,95 ppm (1H, m, H-C(1')) / 6,43-6,39 ppm (1H, d, H-C(6)) / 5,72 ppm (1H, m, H-C(3')) / 4,70-4,51 ppm (3H, 2m, H-C(4') + H-C(5') + H-C(5')) / 3,17-3,08 ppm (2H, q, 2-S-CH₂-CH₃) / 2,93-2,64 ppm (2H, 2m, 2 H-C(2')) / 1,42-1,36 ppm (2H, q, 2-S-CH₂-CH₃)

C/H/N-Analyse : von der Verbindung konnte keine stimmende Analyse erhalten werden.

UV (MeOH) * : 202nm(4,70), [210(4,55)], 237nm(4,56), 286(3,85), 351(4,06)

¹H-NMR (DMSO-d₆) : 11,31 ppm (1H, sb, H-N³) / 7,90-7,83 ppm (4H, 2d, 4 H_{Ar}(tol)) / 7,48 ppm (1H, s, H-C(6)) / 7,30-7,14 ppm (5H, 2d + m, 4 H_{Ar}(tol) + H-C(1')) / 5,86 ppm (1H, m, H-C(3')) / 4,67-4,61 ppm (1H, m, H-C(4')) / 4,50-4,41 ppm (2H, m, 2 H-C(5')) / 3,23 ppm (1H, m, H-C(2')_β) / 2,45-2,34 ppm (7H, m+2s, H-C(2')_α + 2 CH₃(tol))

C/H/N-Analyse : C₃₀H₃₀N₆O₇ x H₂O (604,61)

ber.: C 59,60, H 5,33, N 13,90 ; gef.: C 59,92, H 5,24, N 13,80

* : Produkt noch mit Katalysator verunreinigt, daher können die Werte im Reinprodukt abweichen

2-(N,N-Dimethylaminomethylenamino)-N⁸-[2-desoxy-3,5-di-O-p-toluoyl-β-D-ribofuranosyl]-4,7(3H,8H)-pteridindion (90)

[C₃₀H₃₀N₆O₇ (586,60)]

1,54 g (2,27 mmol) 2-(N,N-Dimethylaminomethylenamino)-4-benzyloxy-N⁸-[2-desoxy-3,5-di-O-p-toluoyl-β-D-ribofuranosyl]-7(8H)-pteridinon (**83**) werden in 100 ml Methylenchlorid/Methanol (2:1) gelöst. Nach der Zugabe von 117 mg Palladium (5% auf Bariumcarbonat) wird die stark blau fluoreszierende Lösung mit Wasserstoff über Nacht hydriert wobei ca 50ml (ber.: 51ml) H₂ aufgenommen werden. Das Reaktionsgemisch wird mit 100 ml Methylenchlorid verdünnt und filtriert. Die gelbe klare Produktlösung wird zur Trockne eingengt, wobei ein gelber Feststoff erhalten wird. Diesen trocknet man bei 40 °C im Hochvakuum.

Ausbeute : 1,28 g (2,18 mmol / 97 %)

Charakterisierung : gelblicher amorpher Feststoff

Smp.: 164-170°C

R_f (Kieselgel) : 0,51; Tol/EE/MeOH (5:4:2)

UV (MeOH) : 203nm(4,72), 239nm(4,66), 360nm(4,33)

¹H-NMR (CDCl₃) : 9,23 ppm (1H, s, H-N³) / 8,64 ppm (1H, s, 2-N=CH-) / 7,92-7,87 ppm (5H, m, H-C(6) + 4 H_{Ar}(tol)) / 7,45-7,35 ppm (1H, m, H-C(1')) / 7,24-7,20 ppm (2H, d, 2 H_{Ar}(tol)) / 7,15-7,12 ppm (2H, d, 2 H_{Ar}(tol)) / 6,0-5,85 ppm (1H, m, H-C(3')) / 4,8-4,55 ppm (3H, m, H-C(4') + 2 x H-C(5')) / 3,45-3,33 ppm (1H, m, H-C(2')_β) / 3,25 ppm (3H, s, N-CH₃) / 3,10 ppm (3H, s, N-CH₃) / 2,55-2,45 ppm (1H, m, H-C(2')_α) / 2,45 ppm (3H, s, CH₃(tol)) / 2,35 ppm (3H, s, CH₃(tol))

C/H/N-Analyse : C₃₀H₃₀N₆O₇ x H₂O (604,61)

ber.: C 59,60, H 5,33, N 13,90 ; gef.: C 59,92, H 5,24, N 13,80

2-(N,N-Dimethylaminomethylenamino)-N⁸-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-4,7(3H,8H)-pteridindion (91)

[C₂₈H₂₄Cl₂N₆O₇ (627,44)]

1,07 g (1,49 mmol) 2-(N,N-Dimethylaminomethylenamino)-4-benzyloxy-N⁸-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-7(8H)-pteridinon (**79**) werden in 100 ml Methylenchlorid/Methanol (2:1) gelöst. Nach der Zugabe von 200 mg Palladium/Aktivkohle

(5%) wird das Gemisch mit Wasserstoff für 24 h hydriert. Das Reaktionsgemisch wird mit 100 ml Methylenchlorid verdünnt und filtriert. Die gelbe klare Produktlösung wird zur Trockne eingengt, wobei ein schwachgelber amorpher Feststoff erhalten wird, der für 48h im HV bei 50°C getrocknet wird.

Ausbeute : 898 mg (1,43 mmol / 96%)

Charakterisierung : gelblicher Feststoff

Smp.: 158-165°C

¹H-NMR (CDCl₃) : 9,74 ppm (1H, sb, H-N³) / 8,65 ppm (1H, s, 2-N=CH-) / 7,98-7,91 ppm (5H, d(4H) + s, 4H_{Ar}(pcb) + H-C(6)) / 7,44-7,31 ppm (5H, 2d + m(ü), 4H_{Ar}(pcb) + H-C(1')) / 6,04 ppm (1H, m, H-C(3')) / 4,84-4,55 ppm (3H, 3m, H-C(4'), H-C(5'), H-C(5')) / 3,36 ppm (1H, m, H-C(2')_β) / 3,27 ppm (3H, s, N-CH₃) / 3,16 ppm (3H, s, N-CH₃) / 2,54 ppm (1H, m, H-C(2')_α)

C/H/N-Analyse : von der Verbindung wurde keine stimmende C,H,N-Analyse erhalten

2-(N,N-Dimethylamino)-N⁸-[2-desoxy-3,5-di-O-p-toluoyl-β-D-ribofuranosyl]-4,7(3H,8H)-pteridindion (93)

[C₂₉H₂₉N₅O₇ (559,58)]

In einer Schüttelente werden 3,08g (4,73mmol) 2-N,N-Dimethylamino-4-benzyloxy-N⁸-[2-desoxy-3,5-di-O-p-toluoyl-β-D-ribofuranosyl]-7(8H)-pteridinon (**85**) in 150 ml MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) gelöst und nach Zugabe von 30mg Pd (C) für 40h hydriert. Nach einem Verbrauch von ca. 100 ml H₂ (ber.: 106 ml) stoppt die Wasserstoffaufnahme. Die Reaktionsmischung wird filtriert, zur Trockne einrotiert und am HV getrocknet, wobei 2,59g (98%) **93** als Rohprodukt erhalten werden.

Umkristallisation aus 200 ml Ethanol ergibt 1,92 g schwach grünliche Kristalle, eine zweite Fraktion mit 0,31 g wird aus dem Filtrat nach Einrotieren durch erneute Umkristallisation aus 50 ml Ethanol erhalten.

Ausbeute : 2,23 g (3,98 mmol / 84 %)

Charakterisierung : schwach grünliche Kristalle

Smp.: 142-146°C

R_f (Kieselgel) : 0,10; CH₂Cl₂/MeOH (50:1)

UV (MeOH) : 202nm(4,69), 236nm(4,63), 297nm(3,94), 357(4,12)

¹H-NMR (CDCl₃) : 11,37 ppm (1H, b, H-N³, D₂O-austauschbar) / 7,93-7,85 ppm (4H, dd, 4H_{Ar}(tol)) / 7,76 ppm (1H, s, H-C(6)) / 7,35 ppm (1H, m, H-C(1')) / 7,24-7,12 ppm (4H, dd, 4H_{Ar}(tol)) / 5,93 ppm (1H, m, H-C(3')) / 4,83-4,52 ppm (3H, m, H-C(4')+ 2 H5') / 3,42-3,28 ppm (7H, m+s, H-C(2')_β + 2-NMe₂) / 2,53-2,35 ppm (7H, m+d, H-C(2')_α + 2 CH₃(tol))

C/H/N-Analyse : C₂₉H₂₉N₅O₇ x 0,5 H₂O (568,59)

ber.: C 61,74, H 5,27, N 12,42 ; gef.: C 61,52, H 5,26, N 12,18

2-N,N-Dimethylamino-N⁸-[2-desoxy-3,5-di-O-p-toluoyl-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinon (94)

[C₃₇H₃₆N₆O₉ (708,73)]

In 5 ml abs.Dioxan werden 140 mg (250 μmol) 2-N,N-Dimethylamino-N⁸-[2-desoxy-3,5-di-O-p-toluoyl-β-D-ribofuranosyl]-4,7(3H,8H)-pteridindion (**93**) aufgeschlämmt und nacheinander mit 72 mg (275 μmol / 1,1 Äq.) Triphenylphosphin und 46 mg (275 μmol / 1,1 Äq.) 2-(4-Nitrophenyl)ethanol versetzt. Nach 30 min Rühren bei RT werden 55 μl (275 μmol / 1,1 Äq.) Diisopropylazodicarboxylat zugegeben und das Gemisch bei Raumtemperatur über Nacht gerührt.

Nach 14h wird der Ansatz einrotiert, und über eine Kieselgelsäule mit Tol/EE-Gradienten getrennt. Nach gründlichem Vorspülen mit Toluol wird das Produkt mit Tol/EE (10:1) eluiert. Die produktthaltigen Fraktionen werden vereinigt, einrotiert und am HV getrocknet.

Ausbeute : 146 mg (206 μmol / 82 %)

Charakterisierung : farbloser Feststoff

Smp.: 116-119°C

R_f (Kieselgel) : 0,62; CH₂Cl₂/MeOH (50:1)

UV (MeOH) : 202nm(4,79), [212nm(4,62)], 240nm(4,67), [268nm(4,16)], 362nm(4,19)

¹H-NMR (CDCl₃) : 8,20-8,16 ppm (2H, d(m), 2H_{Ar}(NPE) o zu NO₂) / 7,94-7,90 ppm (4H, m, 4H_{Ar} (tol)) / 7,78 ppm (1H, s, H-C(6)) / 7,48-7,40 ppm (3H, m, H-C(1') + 2H_{Ar}(NPE) m zu NO₂) / 7,24-7,12 ppm (4H, m, 4H_{Ar} (tol)) / 5,98-5,92 ppm (1H, m, H-C(3')) / 4,80-4,53 ppm (5H, m+ t, H-C(4') + H-C(5') + H-C(5')' + -CH₂-(NPE)) / 3,45-3,28 ppm (3H, m+t, H2'_β + -CH₂-(NPE)) / 3,25 ppm (6H, s, 2-N(CH₃)₂) / 2,52-2,34 ppm (7H, m + 2 s, H-C(2')_α + 2 CH₃ (tol))

C/H/N-Analyse : C₃₇H₃₆N₆O₉ (708,73)

ber.: C 62,70, H 5,12, N 11,86 ; gef.: C 62,76, H 5,17, N 11,30

2-Amino-N⁸-[2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-4,7(3H,8H)-pteridindion (98)

[C₁₁H₁₃N₅O₅ (295,25)]

1,17g (2 mmol) 2-(N,N-Dimethylaminomethylenamino)-N⁸-[2-desoxy-3,5-di-O-p-toluoyl-β-D-ribofuranosyl]-4,7(3H,8H)-pteridindion (**90**) werden in 100 ml konzentriertem Ammoniak gelöst und über Nacht (12h) bei 50°C gerührt. Das Reaktionsgemisch wird auf 20 ml eingengt, wobei sich ein beige-gelber Feststoff abscheidet. Der Niederschlag wird abgesaugt und gründlich mit Wasser neutralgewaschen (5x20ml). Nach zusätzlichem Waschen mit etwas Ethanol (10 ml) und Diethylether (10ml) wird am HV getrocknet, wobei 251 mg **98** erhalten werden. Das Filtrat wird mit den Waschlösungen vereinigt und auf 10 ml eingengt wobei sich weitere 37 mg Produkt abscheiden, das analog der ersten Fraktion isoliert wird.

Ausbeute : 288 mg (0,98 mmol / 49 %)

Charakterisierung : farbloser Feststoff

Smp. : >300°C (färbt sich dunkel ab ca.220°C)

R_f (Cellulose) : 0,65; Methanol/Citratlösung(4%) (1:1)

UV (pH 12) : 258nm(4,07), [279nm(3,65)], 356nm(4,13)

¹H-NMR (DMSO-d₆) : 11,25 ppm (1H, b, H-N³, D₂O-austauschbar) / 7,53 ppm (1H, s, H-C(6)) / 7,12 ppm (1H, t, H-C(1')) / 5,14 ppm (1H, d, 3'-OH, D₂O-austauschbar) / 4,63 ppm (1H, t, 5'-OH, D₂O-austauschbar) / 4,92 ppm (1H, m, H-C(3')) / 3,75-3,40 ppm (3H, m, H-C(4') + 2 H-C(5')) / 2,88 ppm (1H, m, H-C(2')_β) / 1,95 ppm (1H, m, H-C(2')_α)

C/H/N-Analyse : C₁₁H₁₃N₅O₅ x 0,5 H₂O (304,26)

ber.: C 43,42 , H 4,64, N 23,02 ; gef.: C 43,57, H 4,55, N 23,53

2-(N,N-Dimethylaminomethylenamino)-N⁸-[2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-4,7(3H,8H)-pteridindion (99)

[C₁₄H₁₈N₆O₅ (350,33)]

118 mg (200 μmol) 2-(N,N-Dimethylaminomethylen-amino)-N⁸-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-4,7(3H,8H)-pteridindion (**91**) werden mit 10 ml 1 N Natrium-methanolat-lösung versetzt und für 32 h gerührt. Die klare gelbe Lösung wird anschließend durch Zugabe von 572 μl (10 mmol) Eisessig neutralisiert und zur Trockne eingengt

Der Rückstand wird in Methanol (5ml) aufgeschlämmt und auf Kieselgel aufgezogen. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch über eine kurze Kieselgelsäule (D: 1cm / L: 4 cm). Es werden erst mit Methylenchlorid (50 ml) nichtfluoreszierende Reaktionsprodukte abgetrennt, wonach mit Methylenchlorid/Methanol (10:1 : 250 ml) das Produkt eluiert wird. (R_f (KG) : 0,08).

Die produkthaltigen Fraktionen werden langsam bis auf 1-2 ml einrotiert, wobei sich gegen Ende hin ein Feststoff abzuscheiden beginnt. Dieser Niederschlag wird nach dem Abkühlen abgesaugt, mit Ether gewaschen und getrocknet.

Ausbeute : 31 mg (88 μ mol / 44 %)

Charakterisierung : farbloser Feststoff

Smp.: 180-186°C

R_f (Kieselgel) : 0,08; CH₂Cl₂/MeOH (10:1)

UV (MeOH) : 210nm(4,19), [216nm(4,08)], 247nm(4,04), 290nm(3,99), 300nm(3,93), 360nm(4,22), [369nm(4,17)]

¹H-NMR (DMSO-d₆) : 11,93 ppm (1H, b, H-N³, D₂O-austauschbar) / 8,86ppm (1H, s, 2-N=CH-) / 7,61 ppm (1H, s, H-C(6)) / 7,25 ppm (1H, m, H-C(1')) / 5,17 ppm (1H, d, 3'-OH, D₂O-austauschbar) / 4,63 ppm (1H, t, 5'-OH, D₂O-austauschbar) / 4,42 ppm (1H, m, H-C(3')) / 3,75-3,40 ppm (3H, m, H-C(4') + 2 H-C(5')) / 3,22 ppm (3H, s, N-CH₃) / 3,07 ppm (3H, s, N-CH₃) / 2,75 ppm (1H, m, H-C(2')_β) / 2,09 ppm (1H, m, H-C(2')_α)

C/H/N-Analyse : C₁₄H₁₈N₆O₅ x H₂O (368,34)

ber.: C 45,65, H 5,47, N 22,65 ; gef.: C 45,19, H 5,01, N 22,09

N⁸-[3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxyβ-D-ribofuranosyl]-2-methylmercapto-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinon (100)

[C₃₄H₂₇Cl₂N₅O₉S (752,59)]

In 100 ml abs. Dioxan werden 2,20 g (3,64 mmol) N⁸-[3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-2-methylmercapto-4,7(3H,8H)-pteridindion (**84**), 1,20 g (4,56 mmol / 1,25 Äq.) Triphenylphosphin und 762 mg (4,56mmol / 1,25 Äq.) 2-(4-Nitrophenyl)ethanol vorgelegt und für 15 min bei RT gerührt. Danach werden 0,9 ml (4,56 mmol) Diisoproyl-azodicarboxylat zugeben und das Reaktionsgemisch weitergerührt. Nach 4h wird abgebrochen

und einrotiert. Die Trennung erfolgt über eine Kieselgelsäule mit Tol/EE-Gradient, beginnend mit reinem Toluol. Wenn kein Triphenylphosphin und überschüssiger NPEOH mehr im DC gefunden werden kann wird das Produkt mit Tol/EE (10:1) eluiert. Die Fraktionen mit $R_f = 0,33$ werden gesammelt, wobei sorgfältig von einem etwas schneller laufenden Nebenprodukt abzutrennen ist (vermutl. N^3 -NPE-Derivat). Die produkthaltigen Fraktionen werden vereinigt und einrotiert. Das Produkt wird am HV getrocknet. Eine kleine Probe wurde für analytische Zwecke aus Toluol umkristallisiert.

Ausbeute : 2,15 g (2,86 mmol / 78 %)

Charakterisierung : farbloser Feststoff

Smp.: 129-133°C

R_f (Kieselgel) : 0,44; Tol/EE (5:1)

UV (MeOH) : 202nm(4,75), 221nm(4,60), 241nm(4,69), [267nm(4,23)], 336nm(4,18)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) : 8,18-8,14 ppm (2H, d, 2 H_{Ar} (NPE)) / 8,03 ppm (1H, s, H-C(6)) / 7,98-7,88 ppm (4H, m, 4 H_{Ar} (pcb)) / 7,64-7,55 ppm (4H, m, 4 H_{Ar} (pcb+NPE)) / 7,54-7,48 ppm (2H, m, 2 H_{Ar} (pcb)) / 7,31-7,26 ppm (1H, m, H-C(1')) / 5,93-5,85 ppm (1H, m, H-C(3')) / 4,81-4,71 ppm (2H, t, 4-O- CH_2 - CH_2) / 4,71-4,53 ppm (3H, m, H-C(4') + H-C(5') + H-C(5')') / 3,31-3,25 ppm (3H, t (ü), + 4-O- CH_2 - CH_2) / 3,18-3,08 ppm (1H, m, / 2,67-2,55 ppm (4H, ü, 2-SCH₃ + H-C(2')_α)

C/H/N-Analyse : $\text{C}_{34}\text{H}_{27}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_9\text{S}$ (752,59)

ber.: C 54,26, H 3,62, N 9,31 ; gef.: C 54,45, H 3,86, N 9,48

Dimethyldioxiran (106) in Aceton

($^{2/3}$ Literaturansatz^[339])

Apparatur : 2000 ml Dreihalskolben mit Rührstab im Eisbad. Über ein Absaugstück mit Hahn und Schläuche wird der Kolben unter Zwischenschaltung einer Kühlfalle (Schlenkgefäß in Isopropanol/ N_2 -Bad) an eine Drehschieberpumpe angeschlossen.

Durchführung : Im Kolben werden 170 ml bidestilliertem Wasser 38,7 g Natriumbicarbonat gelöst und mit 128 ml Aceton versetzt. Die Mischung wird im Eisbad auf etwa 5°C gekühlt. In fünf Portionen werden anschließend unter kräftigem Rühren insgesamt 80 g Kaliummonooxypersulfat-Tripelsalz (2 $\text{KHSO}_5 \times \text{KHSO}_4 \times \text{K}_2\text{SO}_4$) zugegeben. 3 Minuten nach der letzten Zugabe wird über die Pumpe ein Vakuum von ca.100 mbar angelegt, das Eisbad entfernt und das Dimethyldioxiran-Acetongemisch in die Kühlfalle überkondensiert. Dabei

werden rund 90 ml (Lit.: 100ml) einer gelben Lösung erhalten, deren Gehalt im Bereich von etwa 0,07 M (Lit.:0,09-0,11M) liegt (Diese Menge ist ausreichend zur Oxidation von 2 g Nucleosid). Die Lösung wird über K_2CO_3 getrocknet, filtriert und kann bei $-20^\circ C$ über Molsieb für einige Tage aufbewahrt werden. Dennoch sollte die Oxidationsreaktion möglichst noch am folgenden Tag durchgeführt werden, da das Reagenz an Oxidationsvermögen verliert.

N^8 -[3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy- β -D-ribofuranosyl]-2-methylsulfonyl-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinon (110)

$[C_{34}H_{27}Cl_2N_5O_{11}S (784,59)]$

188 mg (250 μ mol) N^8 -[3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy- β -D-ribofuranosyl]-2-methylmercapto-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinon (**100**) werden in 20 ml abs. CH_2Cl_2 gelöst. Dazu gibt man 7,15 ml einer 0,07 molaren Dimethyldioxiranlösung (= 500 μ mol) und rührt für 10 min bei RT. Das DC zeigt das Verschwinden des Edukts, jedoch zwei Produkte (R_f (KG): 0,42 und R_f (KG): 0,82; LM: EE). Es werden nochmals 1,8 ml (= 125 μ mol) der Dimethyldioxiranlösung zugegeben, wobei der Fleck bei R_f : 0,42 verschwindet. Der Ansatz wird filtriert, einrotiert und am HV getrocknet.

Ausbeute : 190 mg (242 μ mol /97 %)

Charakterisierung : farbloser Schaum

Smp.: 175-179 $^\circ C$

R_f (Kieselgel) : 0,82; EE

UV (MeOH) : 202nm(4,76), 217nm(4,52), 240nm(4,64), 278nm(4,21), [292nm(4,18)]

1H -NMR ($CDCl_3$) : 8,29 ppm (1H, s, H-C(6)) / 8,20-8,14 ppm (2H, d, $2H_{Ar}$ (NPE) o zu NO_2) / 7,96-7,88 ppm (4H, dd, $4H_{Ar}$ (pcb)) / 7,50-7,28 ppm (7H, ü, $2H_{Ar}$ (NPE) o zu NO_2 + $4H_{Ar}$ (pcb) + H-C(1')) / 6,12-6,05 ppm (1H, m, H-C(3')) / 4,93-4,87 ppm (2H, t, 4-O- CH_2 - CH_2 -) / 4,75-4,48 ppm (3H, m, H-C(4') + H-C(5') + H-C(5')) / 3,38-3,20 ppm (6H, s+t+m (ü), 2- SO_2 - CH_3 + 4-O- CH_2 - CH_2 - + H-C(2') $_\beta$) / 2,65-2,50 ppm (1H, m, H-C(2') $_\alpha$)

C/H/N-Analyse : $C_{34}H_{27}Cl_2N_5O_{11}S \times 1,5 H_2O$ (811,61)

ber.: C 50,32, H 3,72, N 8,62 ; gef.: C 50,12, H 3,63, N 8,52

2-Amino-N⁸-[3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinon (113)

[C₃₃H₂₆Cl₂N₆O₉ (721,51)]

In 20 ml abs. Methylenchlorid werden 79 mg (100 μmol) N⁸-[3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-2-methylsulfonyl-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinon (**110**) gelöst. Durch diese Lösung wird solange Ammoniak-Gas geleitet, bis der Eduktfleck im DC verschwunden ist (ca. 1h). Das DC zeigt einen einzelnen Fleck. Das Reaktionsgemisch wird in einen Scheidetrichter überführt und 2 x mit je 20 ml Wasser gewaschen. Danach wird auf MgSO₄ getrocknet, einrotiert und schließlich am HV getrocknet.

Umkristallisation aus sehr wenig EE (< 2,5 ml)

Ausbeute : 64 mg (88,7 μmol / 89 %)

Charakterisierung : dunkelgelbe Kristalle

Smp. : 163-166°C

R_f (Kieselgel) : 0,71; Tol/EE (2:1)

UV (MeOH) : 203nm(4,78), 239nm(4,64), [269nm(4,19)], 348nm(4,13)

¹H-NMR (CDCl₃) : 8,17-8,10 ppm (2H, d(dd), 2H_{Ar}(NPE) o zu NO₂) / 7,97-7,90 ppm (4H, m, 4H_{Ar}(pcb)) / 7,85 ppm (1H, s, H-C(6)) / 7,50-7,05 ppm (7H, m, 2H_{Ar}(NPE) m zu NO₂ + 4H_{Ar}(pcb) + H-C(1')) / 6,10-6,02 ppm (1H, m, H-C(3')) / 5,53 ppm (1-2H, b, 2-NH₂, D₂O-austauschbar) / 5,02-4,93 ppm (1H, m, H-C(4')) / 4,71-4,63 ppm (2H, t, -CH₂- (NPE)) / 4,58-4,52 ppm (2H, m, H-C(5') + H-C(5')) / 3,43-3,32 ppm (1H, m, H-C(2')_β) / 3,31-3,25 ppm (2H, t, -CH₂- (NPE)) / 2,52-2,42 ppm (1H, m, H-C(2')_α)

C/H/N-Analyse : C₃₃H₂₆Cl₂N₆O₉ x H₂O (739,52)

ber.: C 53,60, H 3,81, N 11,36 ; gef.: C 53,90, H 4,13, N 11,03

2-Amino-N⁸-[2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinon (115)

[C₁₉H₂₀N₆O₇ (444,40)]

721 mg (1 mmol) 2-Amino-N⁸-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinon (**113**) werden in 30 ml abs. Methanol aufgenommen und mit 245 mg (5 mmol) Natriumcyanid versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 12 h

wird der entstandene Niederschlag abgesaugt, mit Wasser und Methylenchlorid gewaschen und am HV bei 40°C in der Trockenpistole über CaCl₂ getrocknet.

Ausbeute : 381 mg (857 µmol / 86 %)

Charakterisierung : farbloser Feststoff

Smp.: 228-242 °C(Zers.)

UV (MeOH) : 210nm(4,57), [229nm(4,11)], [267nm(4,01)], 278nm(4,02), 347 nm(4,18)

¹H-NMR (DMSO-d₆) : 8,19-8,14 ppm (2H, d, 2 H_{Ar}(NPE)) / 7,64-7,58 ppm (3H, d + s, 2 H_{Ar}(NPE) + H-C(6)) / 7,40 ppm (2H, sb, 2-NH₂) / 7,10 ppm (1H, m, H-C(1')) / 5,15 ppm (1H, d, 3'-OH) / 4,62 ppm (3H, t+m (ü), -CH₂-(NPE) + H-C(3')) / 4,40 ppm (1H, mb, 5'-OH) / 3,72-3,21 ppm (5H (+HDO), m + t, H-C(4'), H-C(5'), H-C(5')', -CH₂-(NPE)) / 2,85 ppm (1H, q, H-C(2')_β) / 1,93 ppm (1H, m, H-C(2')_α)

C/H/N-Analyse : C₁₉H₂₀N₆O₇ (444,40)

ber.: C 51,35, H 4,54, N 18,91; gef.: C 51,04, H 4,42, N 18,62

2-Amino-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxyβ-D-ribofuranosyl]-6-phenyl-N⁸-4,7(3H,8H)-pteridindion (116)

[C₃₁H₂₃Cl₂N₅O₇ (648,46)]

Methode A : (2-Amino-Edukt **86**)

In einer Schüttelente werden 1,50 g (2,03 mmol) 2-Amino-4-benzyloxy-N⁸-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**86**) in 100 ml Methylenchlorid gelöst. Nach Zugabe von 50 ml Methanol und 50 mg 5%-iger Pd(C) wird mit H₂ hydriert. Es wird solange hydriert, bis der Eduktfleck im DC verschwunden ist, wobei ca 50ml (ber.: 45ml) H₂ aufgenommen wird. Der Ansatz wird anschließend zur Trockne eingengt. Da sich das Produkt in Methylenchlorid nur schlecht löst (Flockenbildung) wird zur Abtrennung des Katalysators eine Soxhletextraktion durchgeführt (500ml Methylenchlorid, über 24 h). Die organische Phase wird zur Trockne eingengt und im HV bei 50°C getrocknet.

Ausbeute : 1,26 g (1,94 mmol / 96 %)

Methode B : (2-Dimethylaminomethylen-amino-Edukt **87**)

800 mg (1,01 mmol) 2-(N,N-Dimethylaminomethylenamino)-4-benzyloxy-N⁸-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**87**) werden in 20ml methanolischem Ammoniak für 10 min gerührt. Es wird mit Eisessig neutralisiert und einrotiert. Der Rückstand wird in 150 ml Methylenchlorid aufgenommen und 2 mal mit 50 ml Wasser gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat wird erneut zur Trockne eingeeengt und über Nacht am HV getrocknet. Der gelbe Rückstand wird in 100 ml Methylenchlorid aufgenommen und nach Zugabe von 50 ml Methanol und 50 mg 5%-iger Pd(C) für 20 h hydriert. Nach einer H₂-Aufnahme von ca.25-30ml (ber.: 22,4 ml) wird zur Trockne eingeeengt.

Analog Methode A erfolgt die weitere Reinigung über eine Soxhletextraktion (500ml Methylenchlorid, über 24 h). Die organische Phase wird zur Trockne eingeeengt und im HV bei 50°C getrocknet.

Ausbeute : 484 mg (746 μmol / 74%)

Charakterisierung : gelber Feststoff

Smp.: 166-171°C

R_f (Kieselgel) : 0,48; Tol/EE (3:1)

UV (MeOH) : 202nm(4,62), 242nm(4,52), 359nm(4,06)

¹H-NMR (CDCl₃) : 12,9 ppm (1H, s b, H-N(3), D₂O-austauschbar) / 8,20-8,12 ppm (2H, m, 2H_{Ar}(Phe)) / 7,97-7,89 ppm (4H, m, 4H_{Ar}(pcb)) / 7,50-7,15 ppm (8H + CHCl₃, m ü, H-C(1') + 3H_{Ar}(Phe) + 4H_{Ar}(pcb)) / 6,15-6,08 ppm (1H, m, H-C(3')) / 5,39 ppm (2H, s b, 2-NH₂, D₂O-austauschbar) / 4,98 ppm (1H, m, H-C(4')) / 4,63-4,52 ppm (2H, m, 2 H-C(5')) / 3,48-3,35 ppm (1H, m, H-C(2')_β) / 2,55-2,45 ppm (1H, m, H-C(2')_α)

C/H/N-Analyse : C₃₁H₂₃Cl₂N₅O₇ (648,46)

ber.: C 57,42, H 3,58, N 10,80 ; gef.: C 56,92, H 3,69, N 10,32

2-Amino-N⁸-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxyβ-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (117)

[C₃₉H₃₀Cl₂N₆O₉ (797,60)]

Methode A : 2-Amino-Route

In 50 ml abs. Dioxan werden 1,25g (1,93 mmol) 2-Amino-N⁸-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridindion (**116**), 632 mg (1,25 Äq.) Triphenylphosphin und 403 mg (1,25 Äq.) 2-(4-Nitrophenyl)ethanol zusammengegeben und für 15 min gerührt. Danach werden 464 µl Azodicarbonsäurediisopropylester (1,25 Äq.) zugegeben und bei RT für 3 h gerührt, wobei vollständige Lösung eintritt.

Der Ansatz wird einrotiert, auf wenig Kieselgel aufgezogen und über eine mit Toluol vorkonditionierte Kieselgelsäule aufgetrennt. Mit Toluol werden die unpolaren Bestandteile des Reaktionsgemisches abgetrennt, mit Tol/EE (10:1) eluiert man das Produkt. Dabei ist sorgfältig von dem im DC wenig darüberlaufenden Nebenproduktfleck abzutrennen.

Die produkthaltigen Fraktionen werden vereinigt und einrotiert. Das Produkt wird in Methylenchlorid (20 ml) gelöst und durch Zugabe von Petrolether ausgefällt. Der Niederschlag wird abgesaugt und in der Trockenpistole getrocknet.

Ausbeute : 1,23 g (1,66 mmol / 86 %)

Methode B : 2-Methylmercapto-Route

In 100 ml abs. CH₂Cl₂ werden 900 mg (1,04mmol) N⁸-[3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-2-methylsulfonyl-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridindion (**121**) gelöst. Über ein Gaseinleitungsrohr wird während langsamem Rühren für 90 min ein schwacher Ammoniakgas-Strom durch diese Lösung geleitet. Nach Verschwinden des Eduktflecks im DC wird das Gemisch in einen Scheidetrichter überführt und zweimal mit 50ml Wasser gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat und Filtration wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen.

Das erhaltene Produkt erwies sich nach DC, ¹H-NMR und UV identisch mit dem nach Methode A gewonnenen **117**.

Ausbeute : 792mg (993 µmol / 95%)

Charakterisierung : gelber Feststoff

Smp.: 106-109°C

R_f (Kieselgel) : 0,92; Tol/EE (3:1)

UV (MeOH) : 202nm(4,61), 241nm(4,50), 373nm(4,14)

¹H-NMR (CDCl₃): 8,20-8,12 ppm (4H, m, 2H_{Ar}(Phe) + 2H_{Ar}(NPE)) / 7,97-7,89 ppm (4H, m, 4H_{Ar}(pcb)) / 7,55-7,23 ppm (10H + CHCl₃, m ü, H-C(1') + 3H_{Ar}(Phe) + 4H_{Ar}(pcb) + 2H_{Ar}(NPE)) / 6,21-6,08 ppm (1H, m, H-C(3')) / 5,39 ppm (2H, s b, 2-NH₂, D₂O-

austauschbar) / 4,98-4,87 ppm (3H, 3 m, H-C(4')) / 4,76-4,65 ppm (2H, t, 4-O-CH₂-CH₂-) / 4,63-4,52 ppm (2H, m, 2 H-C(5')) / 3,48-3,35 ppm (1H, m, H-C(2')_β) / 3,32-3,25 ppm (2H, t, 4-O-CH₂-CH₂-) / 2,55-2,45 ppm (1H, m, H-C(2')_α)

C/H/N-Analyse : C₃₉H₃₀Cl₂N₆O₉ (797,60)

ber.: C 58,72, H 3,79, N 10,54 ; gef.: C 58,87 , H 4,18 , N 10,43

2-Amino-N⁸-[2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (118)

[C₂₅H₂₄N₆O₇ (520,50)]

1,20 g (1,50 mmol) 2-Amino-N⁸-[3,5-di-O-p-chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**117**) werden in 50 ml abs. Methanol aufgenommen. Nach Zugabe von 370 mg (7,5 mmol) Natriumcyanid wird die Suspension bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Nach 14 h zeigt sich im DC ein Hauptprodukt. Der Feststoff wird abgesaugt und mit Wasser und später mit Methylenchlorid gewaschen. Anschließend wird im HV in der Trockenpistole bei 50°C getrocknet.

Ausbeute : 554 mg (1,06 mmol / 71 %)

Charakterisierung : gelbes Pulver

Smp. : 197-202°C

UV (MeOH) : 211nm(4,59), 248nm(4,22), 373nm(4,29)

¹H-NMR (DMSO-d₆) : 8,19-8,15 ppm (2H, d, 2H_{Ar}(NPE)) / 8,07-8,00 ppm (2H, m, 2H_{Ar}(Ph)) / 7,65-7,61 ppm (2H, d, 2H_{Ar}(NPE)) / 7,48-7,39 ppm (5H, m, 3H_{Ar}(Ph) + 2-NH₂) / 7,17-7,12 ppm (1H, t, H-C(1')) / 5,13 ppm (1H, b, D₂O-austauschbar, 3'-OH) / 4,66-4,60 ppm (2H, t, -CH₂-(NPE)) / 4,43 ppm (1H, b, D₂O-austauschbar, 5'-OH) / 3,76-3,35 ppm (4H, m, H-C(3') + H-C(4') + 2 H-C(5')) / 3,24-3,20 ppm (2H, t, -CH₂-(NPE)) / 2,93-2,81 ppm (1H, m, H-C(2')_β) / 1,99-1,88 ppm (1H, m, H-C(2')_α)

C/H/N-Analyse : C₂₅H₂₄N₆O₇ (520,50)

ber.: C 57,69, H 4,65, N 16,15 ; gef.: C 57,23 , H 4,72 , N 15,80

N⁸-[3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxyβ-D-ribofuranosyl]-2-methylmercapto-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridinon (119)

[C₄₀H₃₁Cl₂N₅O₉S (828,69)]

1,50 g (2,21 mmol) N⁸-[3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-2-methylmercapto-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridindion (**80**), 724 mg (2,76 mmol = 1,25 Äq.) Triphenylphosphin und 461 mg (2,76 mmol = 1,25 Äq.) 2-(4-Nitrophenyl)ethanol werden vermischt und in 150 ml trockenem Dioxan gelöst. Nach 15 min Rühren bei Raumtemperatur werden 545 µl Azodicarbonsäure-diisopropylester zugegeben. Nach 5h wird der Ansatz abgebrochen und einrotiert. Die Trennung des Rückstandes erfolgt über eine Kieselgelsäule mit einem Tol/EE-Gradienten, beginnend mit reinem Toluol. Wenn kein Triphenylphosphin und überschüssiger NPEOH mehr im DC gefunden werden kann wird das Produkt mit Tol/EE (10:1) eluiert. Die produkthaltigen Fraktionen werden vereinigt und einrotiert. Das Produkt wird am HV getrocknet. Umkristallisation aus Toluol/Essigester (1:1).

Ausbeute : 1,58 g (1,90 mmol / 86 %)

Charakterisierung : gelber Feststoff

Smp.: 98-102°C

R_f (Kieselgel) : 0,45; Tol/EE (10:1)

UV (MeOH) : 203nm(4,65), 221nm(4,46), 242nm(4,55), 364nm(3,90)

¹H-NMR (CDCl₃) : 8,21-8,17 ppm (4H, m, 4H_{Ar}) / 8,00-7,94 ppm (4H, m, 4H_{Ar}) / 7,54-7,15 ppm (10H + CHCl₃, m (ü), 9H_{Ar} + H-C(1')) / 6,12 ppm (1H, m, H-C(3')) / 4,85-4,53 ppm (5H, t + m, 4-O-CH₂-CH₂ + H-C(4') + H-C(5') + H-C(5')') / 3,41-3,18 ppm (3H, m + t (ü), 4-O-CH₂-CH₂ + H-C(2')_β) / 2,63-2,52 ppm (4H, t + m (ü), 2-SCH₃ + H-C(2')_α)

C/H/N-Analyse : C₄₀H₃₁Cl₂N₅O₉S (828,69)

ber.: C 57,97, H 3,77, N 8,45 ; gef.: C 57,61, H 3,67, N 8,09

N⁸-[3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxyβ-D-ribofuranosyl]-2-methylsulfonyl-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-6-phenyl-4,7(3H,8H)-pteridinon (121)

[C₄₀H₃₁Cl₂N₅O₁₁S (860,69)]

1,50 g (1,81 mmol) N⁸-[3,5-di-O-p-Chlorbenzoyl-2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-2-methylmercapto-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**119**) werden in 100 ml abs. Methylenchlorid gelöst. Der klaren, gelben Lösung werden 1,20 g m-

Chlorperbenzoesäure (55% Fluka, = 3,80 mmol / 2,1 Äq.) zugegeben. Das resultierende Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur für 18 h gerührt. Danach wird der Ansatz zur Trockne eingengt und chromatographisch über eine Kieselgelsäule getrennt. Das Produkt wird mit Toluol-Essigester (3:1) eluiert, produktthaltige Fraktionen werden vereinigt, zur Trockne eingengt und am HV getrocknet.

Ausbeute : 1,33 g (1,54 mmol / 85 %)

Charakterisierung : farbloser Schaum

R_f (Kieselgel) : 0,74; CHCl₃/MeOH (19:1)

UV (MeOH) : 202nm(4,76), 217nm(4,52), 240nm(4,64), 278nm(4,21), [292nm(4,18)]

¹H-NMR (DMSO-d₆) : 8,17-8,12 ppm (4H, m, 4H_{Ar}) / 7,98-7,86 ppm (2H, m, 2H_{Ar}) / 7,26-7,20 ppm (10H, m (ü), 9H_{Ar} + H-C(1')) / 6,05 ppm (1H, m, H-C(3')) / 4,91 ppm (2H, t, 4-O-CH₂-CH₂-) / 4,74-4,53 ppm (3H, 2m, H-C(4') + H-C(5') + H-C(5')) / 3,50 ppm (3H, s, 2-SO₂-CH₃) / 3,43-3,20 ppm (1H + Wasser, m (ü), H-C(2')_β) / 2,96 ppm (2H, t, 4-O-CH₂-CH₂) / 2,65 ppm (1H, m, H-C(2')_α)

C/H/N-Analyse : von der Verbindung wurde keine C,H,N-Analyse durchgeführt. Die Verbindung wurde nach UV und ¹H-NMR direkt weiter umgesetzt.

2-Amino-N⁸-[2-desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinon (123)

[C₄₀H₃₈N₆O₉ (746,78)]

600 mg (1,35mmol) 2-Amino-N⁸-[2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinon (**115**) werden zweimal mit je 5 ml abs. Pyridin coevaporiert und anschließend in 10ml abs Pyridin gelöst. Nach Zugabe von 373 mg (1,48 mmol / 1,1Äq.) Dimethoxytritylchlorid wird das Reaktionsgemisch über Nacht gerührt. Nach 12 h wird unter Hochvakuum bei einer Wasserbadtemperatur von 35°C zur Trockne einrotiert. Die chromatographische Trennung erfolgt über eine Kieselgelsäule mit Toluol/Essigester dem ca.1% Triethylamin zugesetzt wird. Die Säule wurde mit Toluol/Triethylamin(1%) konditioniert. Die Elution des Produkts erfolgt mit Tol/EE (3:1). Die produktthaltigen Fraktionen werden zur Trockne eingengt und am HV getrocknet, wobei ein farbloser Schaum erhalten wird.

Ausbeute : 323 mg (432 μmol / 32%)

Charakterisierung : farbloser Schaum

Smp. : 68-79°C (Zers.)

R_f (Kieselgel) : 0,58; Tol/EE (2:1)

UV (MeOH) : 205nm(4,94), 237nm(4,56), 272nm(4,25), 348nm(4,15)

¹H-NMR (CDCl₃) : 8,11-8,06 ppm (2H, d, 2H_{Ar}(NPE)) / 7,70 ppm (1H, s, H-C(6)) / 7,39-7,06 ppm (12H +CHCl₃, H-C(1') + 11 H_{Ar}) / 6,74-6,69 ppm (4H, m, 4H_{Ar}(DMTr)) / 5,00 ppm (2H, s b, 2-NH₂) / 4,77 ppm (1H, m, H-C(3')) / 4,62 ppm (2H, t, -CH₂-(NPE)) / 3,89 ppm (1H, q, H-C(4')) / 3,72 ppm (6H, s, 2 OCH₃) / 3,49 ppm (1H, m, H-C(5')) / 3,38 ppm (1H, m, H-C(5')') / 3,29 ppm (2H, t, -CH₂-(NPE)) / 2,99-2,88 ppm (1H, m, H-C(2')_β) / 2,32-2,20 ppm (1H, m, H-C(2')_α) / 2,09 ppm (1H, d(b), 3'-OH)

C/H/N-Analyse : C₄₀H₃₈N₆O₉ (746,78)

ber.: C 64,33, H 5,13, N 11,25 ; gef.: C 64,31, H 5,05, N 10,92

2-Amino-N⁸-[2-desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (124)

[C₄₆H₄₂N₆O₉ (822,87)]

520 mg (1mmol) 2-Amino-N⁸-[2-desoxy-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**118**) werden zweimal mit je 5 ml abs. Pyridin coevaporiert und anschließend in 5 ml abs Pyridin gelöst. Nach Zugabe von 373 mg (1,1 mmol) Dimethoxytritylchlorid wird das Reaktionsgemisch über Nacht gerührt. Nach 12 h wird unter Hochvakuum bei einer Wasserbadtemperatur von 35°C zur Trockne einrotiert.

Die Trennung erfolgt über eine Kieselgelsäule mit Toluol/Essigester dem ca.1% Triethylamin zugesetzt wird. Die Säule wurde mit Toluol/Triethylamin (1%) konditioniert. Die Elution des Produkts erfolgt mit Tol/EE (4:1). Die produktthaltigen Fraktionen werden zur Trockne eingengt und am HV getrocknet.

Ausbeute : 534 mg (649 μmol / 65 %)

Charakterisierung : gelber Schaum

Smp. : 60-70°C (Zers.)

R_f (Kieselgel) : 0,51; Tol/EE (4:1)

UV (MeOH) : 205nm(4,81), 237nm(4,43), [271nm(4,19)], 374nm(4,23)

¹H-NMR (DMSO-d₆) : 8,19-8,15 ppm (2H, d, 2H_{Ar}(NPE)) / 8,09-7,97 ppm (2H, m, 2H_{Ar}(Phe)) / 7,65-7,61 ppm (2H, d, 2H_{Ar}(NPE)) / 7,41-7,14 ppm (14H, m, + 3H_{Ar}(Phe) + 9H_{Ar}(DMTr) + 2-NH₂) / 7,11-7,05 ppm (1H, m, H-C(1')) / 5,64-5,61 ppm (1H, d, D₂O-exchangeable, 3'-OH) / 4,66-4,60 ppm (2H, t, -CH₂-(NPE)) / 4,12 ppm (1H, m, H-C(3')) / 3,72-3,35 ppm (9H, 4m, H-C(4') + 2 H-C(5') + 2 OMe) / 3,24-3,20 ppm (2H, t, -CH₂-(NPE)) / 2,93-2,81 ppm (1H, m, H-C(2')_β) / 1,99-1,88 ppm (1H, m, H-C(2')_α)

C/H/N-Analyse : C₄₆H₄₂N₆O₉ (822,87)

ber.: C 67,14, H 5,14, N 10,21 ; gef.: C 66,82, H 5,22, N 9,96

2-Amino-N⁸-[2-desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinon-3'-O-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)-phosphitamid (127)

[C₄₉H₅₅N₈O₁₀P (947,00)]

300 mg (402 μmol) 2-Amino-N⁸-[2-desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-7(8H)-pteridinon (**123**) werden unter Schutzgas in 10 ml abs. Acetonitril gelöst und mit 133 mg (442 μmol) bis-N,N-Diisopropylamino-2-cyanoethoxyphosphan (**125**) versetzt. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von 14 mg (200 μmol) Tetrazol (**126**) gestartet. Die Lösung wird für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird anschließend mit 40 ml CH₂Cl₂ verdünnt und mit 10 ml 1M NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird mit 20 ml CH₂Cl₂ rückextrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingengt. Die Reinigung erfolgt über eine kurze Kieselgelsäule (5 cm) mit Toluol/Essigester dem einige Tropfen Triethylamin zugesetzt wurden. Die Säule wurde mit Toluol/Triethylamin (250:1) vorkonditioniert. Die Elution des Produkts erfolgt mit Tol/EE (10:3). Die produkthaltigen Fraktionen werden zur Trockne eingengt und am HV getrocknet.

Ausbeute : 270 mg (285 μmol / 71 %)

Charakterisierung : farbloser Schaum

Smp. : 68-73°C (Zers.)

R_f (Kieselgel) : 0.27; Tol/EE (10:1)

UV (MeOH) : 205nm(4,90), 238nm(4,52), 272nm(4,21), 348nm(4,15)

¹H-NMR (CDCl₃) : 8,17-8,14 ppm (2H, d, 2H_{Ar}(NPE)) / 7,78 ppm (1H, d, H-C(6)) / 7,48-7,41 ppm (4H, d+m(ü) 4H_{Ar}) / 7,35-7,31 ppm (12H (+CHCl₃), H-C(1') + 11H_{Ar}) / 6,78-6,71 ppm

(4H, m, 4H_{Ar}(DMTr)) / 5,06 ppm (2H, d b, 2-NH₂) / 4,80 ppm (1H, m, H-C(3')) / 4,68 ppm (2H, 2t, -CH₂-(NPE)) / 4,22 ppm (1H, m, H-C(4')) / 3,74 ppm (6H, s, 2 OCH₃(DMTr)) / 3,63-3,41 ppm (4H, m, H-C(5'), H-C(5)'), -CH₂-(CE)) / 3,27 ppm (2H, t, -CH₂-(NPE)) / 2,99 ppm (1H, m, H-C(2')_β) / 2,62-2,25 ppm (5H, m, 2 CHMe₂ + -CH₂-(CE) + H-C(2')_α) / 1,17-1,03 ppm (12H, m, 2 CH(CH₃)₂)

³¹P-NMR-Daten : 149,049 ppm + 148,972 ppm

C/H/N-Analyse : C₄₉H₅₅N₈O₁₀P (947,00)

ber.: C 62,15, H 5,85, N 11,83 ; gef.: C 61,84, H 5,62, N 11,63

2-Amino-N⁸-[2-desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-6-phenyl-7(8H)-pteridinon-3'-O-(2-cyanoethyl-N,N-diisopropyl)-phosphitamid (128)

[C₅₅H₅₉N₈O₁₀P (1023,10)]

822 mg (1mmol) 2-Amino-N⁸-[2-desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-β-D-ribofuranosyl]-4-(2-(4-nitrophenyl)ethoxy)-6-phenyl-7(8H)-pteridinon (**124**) werden unter Schutzgas in 10 ml abs. Acetonitril gelöst. Ebenfalls unter Schutzgas werden 331 mg (1,1 mmol) bis-N,N-Diisopropylamino-2-cyanoethoxyphosphan (**125**) zugesetzt und die Reaktion durch Zugabe von 35 mg (500 μmol) Tetrazol (**126**) gestartet. Die Lösung wird für 12 h bei Raumtemperatur gerührt.

Das Reaktionsgemisch wird mit 40 ml CH₂Cl₂ verdünnt und mit 10 ml 1M NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird mit 20 ml CH₂Cl₂ rückextrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingengt.

Die Reinigung erfolgt über eine Kieselgelsäule mit Toluol/Essigester dem einige Tropfen Triethylamin zugesetzt wurden. Die Säule wurde mit Toluol/Triethylamin (250:1) konditioniert. Die Elution des Produkts erfolgt mit Tol/EE (10:1). Die produkthaltigen Fraktionen werden zur Trockne eingengt und am HV getrocknet.

Ausbeute : 695 mg (679 μmol / 68 %)

Charakterisierung : gelber Schaum

Smp. : 65-72°C (Zers.)

R_f (Kieselgel) : 0,42; Tol/EE (10:1)

UV (MeOH) : 205nm(4,80), 238nm(4,42), [271nm(4,19)], 374nm(4,22)

¹H-NMR (CDCl₃) : 8,21-8,15 ppm (2H, d, 2H_{Ar}(NPE)) / 8,09-7,97 ppm (2H, m, 2H_{Ar}(Phe)) / 7,59-7,49 ppm (2H, d, 2H_{Ar}(NPE)) / 7,46-7,10 ppm (>12H, m, + H-C(1') + 3H_{Ar}(Phe) +

$9H_{Ar}(DMTr) + CHCl_3$) / 6,75-6,65 ppm (4H, m, $H_{Ar}(DMTr, o\text{-zu } NO_2)$) / 5,10-5,04 ppm (2H, mb, D_2O -austauschbar, 2-NH₂) / 4,68-4,62 ppm (2H, t, -CH₂-(NPE)) / 4,30-4,21 ppm (1H, m, H-C(3')) / 3,78-3,72 ppm (2H, t, -CH₂-(CE)) / 3,72-3,64 ppm (6H, m, 2 OMe) / 3,68-3,35 ppm (3H, 3 m, H-C(4') + 2 H-C(5')) / 3,24-3,20 ppm (2H, t, -CH₂-(NPE)) / 3,05-2,93 ppm (1H, m, H-C(2')_β) / 2,60-2,52 ppm (2H, t, -CH₂-(CE)) / 2,39-2,26 ppm (1H, m, H-C(2')_α) / 2,35-2,33 ppm (6H, s, CH(CH₃)₂) / 1,21-1,09 ppm (12H, m, 4 CH₃)

³¹P-NMR-Daten : 149,189 ppm + 149,142 ppm

C/H/N-Analyse : C₅₅H₅₉N₈O₁₀P (1023,10)

ber.: C 64,57, H 5,81, N 10,95 ; gef.: C 64,16, H 5,72, N 10,52

E. OLIGONUCLEOTIDSYNTHESEN

1. Verwendete Synthese- und Abspaltungsbedingungen

1.1. Reagentien und Lösungen

Die Angaben in Klammern hinter den Reagentien beziehen sich auf die jeweiligen Flaschenpositionen am ABI 392B.

* Phosphitamidlösungen (Pos.1(A), 2(G), 3(C), 4(T), 5(variable))

Die Phosphitamide werden als 0,1M - 0,15M Lösungen in Acetonitril eingesetzt, wobei die Zugabe der berechneten Menge Solvens am DNA-Synthesizer mittels eines „auto-dilute“-Programmes erfolgt. Da dabei nur Acetonitril zugegeben werden kann mußte im Fall des Isoxanthopterin-Phosphitamid das Methylenchlorid per Hand zugegeben werden.

* Tetrazol (Pos.9)

Als Aktivator für die Kondensation wurden 0,5 M Lösungen in Acetonitril verwendet (875mg sublimiertes Tetrazol / 25ml Acetonitril).

* Ammoniak (Pos.10)

Zur Trägerabspaltung wurde konzentrierter wässriger Ammoniak p.a. (25%) eingesetzt.

* Cap A (Pos.11)

Die erste Capping-Komponente wurde aus Essigsäureanhydrid, 2,6-Lutidin und THF (dest.) im Verhältnis 1:1:8 hergestellt.

* Cap B (Pos.12)

Die zweite Capping-Komponente wurde aus N-Methylimidazol und THF(dest.) im Verhältnis 16:84 hergestellt.

* DBU (Pos.12)

Die verwendete 1M DBU-Lösung wurde durch Verdünnen von 15ml DBU mit Acetonitril auf 100ml hergestellt.

* Trichloressigsäure (Pos.14)

Es wurde eine Lösung von 3g Trichloressigsäure in 100ml Methylenchlorid p.a. verwendet.

* Iod (Pos.15)

Zur Herstellung der 0,05M Iod-Lösung wurden 1,27g sublimiertes Iod in 10ml Pyridin p.a. und 20ml Wasser gelöst und anschließend mit 70 ml dest. THF aufgefüllt.

* Acetonitril (Pos.18)

Das zur Oligonucleotidsynthese verwendete Acetonitril der Firma MWG-Biotech besitzt einen Wassergehalt unter 30 ppm (DNA-Synthesizer-Grade).

* Methylenchlorid (Pos.19)

Verwendet wurde Methylenchlorid (p.a.) der Firma Fluka.

1.2. Syntheseprogramme

In den folgenden Tabellen sind die verwendeten Syntheseprogramme für den ABI 392B zusammengestellt, die „auto-dilute-procedure“ (Tab.I), die Syntheseroutinen (cycl04usr, Tab.II/cycl10usr, Tab III) und die Abspaltungsprozeduren (end01usr, Tab.IV./endCE, Tab. V). Tab.VI zeigt die Belegung der Flaschenpositionen am Gerät während den Syntheseschritten.

1.2.1. Die „auto-dilute-procedure“

step N°	func N°	step name	time [s]	step N°	func N°	step name	time [s]
1	106	begin	5,0	22	1	block flush	4,0
2	64	18 to waste	4,0	23	14	flush to bases	120,0
3	1	block flush	10,0	24	150	bottle 1 on	
4	14	flush to bases		25	50	A to waste	1,0
5	86	18 to bases		26	151	bottle 1 off	
6	104	interrupt		27	152	bottle 2 on	
7	150	bottle 1 on		28	51	A to waste	1,0
8	70	18 to A	variabel	29	153	bottle 2 off	
9	151	bottle 1 off		30	154	bottle 3 on	
10	152	bottle 2 on		31	52	A to waste	1,0
11	71	18 to G	variabel	32	155	bottle 3 off	
12	153	bottle 2 off		33	156	bottle 4 on	
13	154	bottle 3 on		34	53	A to waste	1,0
14	72	18 to C	variabel	35	157	bottle 4 off	
15	155	bottle 3 off		36	158	bottle 5 on	
16	156	bottle 4 on		37	54	A to waste	1,0
17	73	18 to T	variabel	38	159	bottle 5 off	
18	157	bottle 4 off		39	64	18 to waste	7,0
19	158	bottle 5 on		40	1	block flush	5,0
20	74	18 to 5	variabel	41	107	end	
21	159	bottle 5 off					

Tab.I: : auto-dilute-procedure (ABI DNA-Synthesizer 392B)

Diese Prozedur ist ein Standard-Programm des Geräts. Die in der time-Spalte mit „variabel“ bezeichneten Schritte werden der gewünschten Synthese, bzw. der benötigten Phosphitamid-Lösung angepaßt. Bei bekannter Flußrate von Acetonitril zur entsprechenden Basenposition läßt sich die erforderliche Pumpzeit errechnen.

Im Fall des Isoxanthopterin-Bausteins **3** in Position bottle 5 wurde die Zeit auf 0 gesetzt und das eingewogene Phosphitamid von Hand mit der berechneten Menge Methylenchlorid versetzt. **3** löst sich nur ungenügend in reinem Acetonitril und das Gerät bietet keine Funktion 19 (CH₂Cl₂) to 5, auf deren Basis eine entsprechende eigene Verdünnungsroutine erstellt

werden konnte.

1.2.2. Das verwendete Syntheseprogramm „Cyc04 user“

step N°	func N°	step name	time [s]
1	106	begin	
2	64	18 to waste	3,0
3	42	18 to column	10,0
4	2	reverse flush	8,0
5	42	18 to column	10,0
6	2	reverse flush	10,0
7	1	block flush	4,0
8	101	phos prep	3,0
9	140	column 1 on	
10	111	block vent	2,0
11	58	tet to waste	2,0
12	33	B+tet to column	3,0
13	34	tet to column	2,0
14	33	B+tet to column	2,0
15	103	wait	50,0
16	34	tet to column	2,0
17	33	B+tet to column	2,5
18	43	push to column	
19	141	column 1 off	
20	142	column 2 on	
21	1	block flush	3,0
22	64	18 to waste	4,0
23	111	block vent	2,0
24	58	tet to waste	2,0
25	33	B+tet to column	3,0
26	34	tet to column	2,0
27	33	B+tet to column	2,0
28	103	wait	50,0
29	34	tet to column	2,0
30	33	B+tet to column	2,5
31	43	push to column	
32	143	column 2 off	
33	140	column 1 on	
34	111	block vent	2,0

step N°	func N°	step name	time [s]
35	33	B+tet to column	3,0
36	34	tet to column	2,0
37	33	B+tet to column	2,0
38	103	wait	50,0
39	34	tet to column	2,0
40	33	B+tet to column	2,5
41	43	push to column	
42	141	column 1 off	
43	142	column 2 on	
44	64	18 to waste	4,0
45	1	block flush	3,0
46	111	block vent	2,0
47	33	B+tet to column	3,0
48	34	tet to column	2,0
49	33	B+tet to column	2,0
50	34	tet to column	2,0
51	33	B+tet to column	2,5
52	43	push to column	
53	143	column 2 off	
54	4	flush to waste	0,5
55	103	wait	30,0
56	64	18 to waste	4,0
57	42	18 to column	10,0
58	2	reverse flush	5,0
59	1	block flush	4,0
60	102	cap prep	3,0
61	39	cap to column	10,0
62	103	wait	10,0
63	64	18 to waste	5,0
64	2	reverse flush	10,0
65	42	18 to column	10,0
66	2	reverse flush	10,0
67	1	block flush	4,0
68	41	15 to column	8,0

69	64	18 to waste	10,0
70	1	block flush	3,0
71	103	wait	10,0
72	64	18 to waste	5,0
73	42	18 to column	10,0
74	2	reverse flush	10,0
75	1	block flush	5,0
76	42	18 to column	10,0
77	2	reverse flush	10,0
78	1	block flush	5,0
79	42	18 to column	10,0
80	2	reverse flush	10,0
81	1	block flush	5,0
82	105	start detrityl	
83	64	18 to waste	4,0
84	42	18 to column	10,0
85	2	reverse flush	5,0
86	1	block flush	3,0
87	167	if monitoring	
88	44	19 to column	25,0
89	40	14 to column	3,0
90	109	waste - port	
91	120	advance FC	
92	120	advance FC	
93	113	end advance	
94	135	monitor trityls	
95	40	14 to column	45,0
96	136	monitor noise	
97	40	14 to coulmn	10,0
98	137	stop monitor	
99	42	18 to column	10,0
100	169	end monitoring	
101	3	trityl flush	8,0
102	40	14 to coulmn	8,0
103	103	wait	10,0
104	3	trityl flush	7,0
105	42	18 to column	10,0
106	2	reverse flush	5,0
107	1	block flush	4,0
108	110	waste - bottle	
109	42	18 to column	10,0
110	1	block flush	4,0
111	107	end	

Tab.II.: Synthesecyclus (Cyc04 user) für ABI 392B für Synthesen mit 0,2-0,4 µmol Ansatzgröße

Dieser Synthesecyclus wurde von R.Charubala^[364] bei der Synthese derselben 21-meren Zielsequenz verwendet, wobei in verschiedene Positionen anstelle von 2'Desoxy-Guanosin das 3-Methyl-2-N-(2-phenylethyl)-isoxanthopterin-N-8-desoxyribosid als Pteridinanalogon eingebaut wurde. Verglichen mit den Standard-Synthese-Routinen des ABI 392B besitzt dieser Cycus einen zweiten Kondensationschritt pro Synthese, was sich bereit bei einer Vielzahl von Synthesen durch Charubala bewährt hatte.

1.2.3. Das für die Synthese der Neun-meren verwendete Programm „Cyc10 user“

step N°	func N°	step name	time [s]
1	106	begin	
2	64	18 to waste	3,0
3	42	18 to column	10,0
4	2	reverse flush	8,0
5	42	18 to column	10,0
6	2	reverse flush	10,0
step N°	func N°	step name	time [s]

7	1	block flush	4,0
8	101	phos prep	3,0
9	140	column 1 on	
10	111	block vent	2,0
11	58	tet to waste	2,0
12	33	B+tet to column	3,5
13	34	tet to column	1,5
14	33	B+tet to column	2,0
15	103	wait	50,0
16	34	tet to column	1,0
17	33	B+tet to column	1,0
18	43	push to column	
19	141	column 1 off	
20	142	column 2 on	
21	64	18 to waste	4,0
22	1	block flush	3,0
23	111	block vent	2,0
24	58	tet to waste	2,0
25	33	B+tet to column	3,5
26	34	tet to column	1,5
27	33	B+tet to column	2,0
28	103	wait	50,0
29	34	tet to column	1,0
30	33	B+tet to column	1,0
31	43	push to column	
32	143	column 2 off	
33	4	flush to waste	0,5
34	64	18 to waste	4,0
35	42	18 to column	10,0
36	2	reverse flush	5,0
37	1	block flush	4,0
38	41	15 to column	12,0
39	64	18 to waste	10,0
40	1	block flush	3,0
41	103	wait	90,0
42	64	18 to waste	5,0
43	42	18 to column	10,0

44	2	reverse flush	10,0
45	1	block flush	5,0
46	42	18 to column	10,0
47	2	reverse flush	10,0
48	1	block flush	5,0
49	42	18 to column	10,0
50	2	reverse flush	10,0
51	1	block flush	5,0
52	42	18 to column	10,0
53	2	reverse flush	10,0
54	1	block flush	5,0
55	102	cap prep	3,0
56	39	cap to column	10,0
57	103	wait	10,0
58	64	18 to waste	5,0
59	2	reverse flush	10,0
60	42	18 to column	10,0
61	2	reverse flush	10,0
62	42	18 to column	10,0
63	2	reverse flush	10,0
64	1	block flush	3,0
65	105	start detrityl	
66	64	18 to waste	4,0
67	42	18 to column	10,0
68	2	reverse flush	5,0
69	1	block flush	3,0
70	167	if monitoring	
71	44	19 to column	35,0
72	40	14 to column	3,0
73	109	waste - port	
74	120	advance FC	
75	120	advance FC	
76	113	end advance	
77	135	monitor trityls	
78	40	14 to column	85,0
79	136	monitor noise	
80	40	14 to coulmn	10,0

81	137	stop monitor	
82	42	18 to column	10,0
83	169	end monitoring	
84	3	trityl flush	8,0
85	40	14 to column	8,0
86	103	wait	10,0
87	3	trityl flush	7,0
88	42	18 to column	10,0

89	2	reverse flush	5,0
90	1	block flush	4,0
91	110	waste - bottle	
92	42	18 to column	10,0
93	2	reverse flush	5,0
94	1	block flush	4,0
95	107	end	

Tab.III.: Synthesecyclus (Cyc04 user) für ABI 392B

Dieser Synthesecyclus entspricht im Wesentlichen dem Cyc04 user, besitzt jedoch keinen zweiten Kondensationsschritt.

1.2.4. Das Programm zur Schutzgruppen-Abspaltung „small scale DBU“

step N°	func N°	step name	time [s]
1	106	begin	
2	2	reverse flush	30,0
3	1	block flush	5,0
4	61	12 to waste	5,0
5	38	12 to column	30,0
6	64	18 to waste	10,0
7	1	block flush	5,0
8	103	wait	900
9	103	wait	900
10	103	wait	900
11	103	wait	900
12	2	reverse flush	10,0
13	1	block flush	5,0
14	61	12 to waste	5,0
15	38	12 to column	25,0
16	64	18 to waste	10,0
17	1	block flush	5,0
18	103	wait	900
19	103	wait	900
20	103	wait	900
21	103	wait	900
22	103	wait	900

23	103	wait	900
24	103	wait	900
25	103	wait	900
step N°	func N°	step name	time [s]
26	2	reverse flush	10,0
27	1	block flush	5,0
28	61	12 to waste	5,0
29	38	12 to column	25,0
30	64	18 to waste	10,0
31	1	block flush	5,0
32	103	wait	900
33	103	wait	900
34	103	wait	900
35	103	wait	900
36	103	wait	900
37	103	wait	900
38	103	wait	900
39	103	wait	900
40	2	reverse flush	10,0
41	1	block flush	5,0
42	61	12 to waste	5,0
43	38	12 to column	25,0
44	64	18 to waste	10,0

45	1	block flush	5,0	68	2	reverse flush	10,0
46	103	wait	900	69	1	block flush	5,0
47	103	wait	900	70	61	12 to waste	5,0
48	103	wait	900	71	38	12 to column	25,0
49	103	wait	900	72	64	18 to waste	10,0
50	103	wait	900	73	1	block flush	5,0
51	103	wait	900	74	103	wait	900
52	103	wait	900	75	103	wait	900
53	103	wait	900	76	103	wait	900
54	2	reverse flush	10,0	77	103	wait	900
55	1	block flush	5,0	78	103	wait	900
56	61	12 to waste	5,0	79	103	wait	900
57	38	12 to column	25,0	80	103	wait	900
58	64	18 to waste	10,0	81	103	wait	900
59	1	block flush	5,0	82	2	reverse flush	10,0
60	103	wait	900	83	1	block flush	5,0
61	103	wait	900	84	64	18 to waste	5,0
62	103	wait	900	85	42	18 to column	40,0
63	103	wait	900	86	2	reverse flush	1,0
64	103	wait	900	87	42	18 to column	20,0
65	103	wait	900	88	2	reverse flush	20,0
66	103	wait	900	89	1	block flush	5,0
67	103	wait	900	90	107	end	

Tab. IV : Synthese-Routine zur Abspaltung der β -eliminierbaren Schutzgruppen „small scale DBU“

Vor der Anwendung dieses Synthesecyclusses wird in der Flaschenposition 12 die CAP-B-Lösung gegen das DBU ausgetauscht. Die Dauer dieser DBU-Behandlung beträgt ohne Waschschrte 11h, was normalerweise ausreicht, um sämtliche NPE-, NPEOC- und Cyanoethylgruppe abzuspalten

1.2.5. Das Programm zur Trägerabspaltung mit Ammoniak „end CE“

step N°	func N°	step name	time [s]
1	106	begin	
2	42	18 to column	60,0
3	2	reverse flush	60,0
4	115	prep 10	15,0
5	36	10 to collect	11,0
6	64	18 to waste	5,0
7	1	block flush	5,0
8	103	wait	900

step N°	func N°	step name	time [s]
9	36	10 to collect	11,0
10	64	18 to waste	5,0
11	1	block flush	5,0
12	103	wait	900
13	36	10 to collect	11,0
14	64	18 to waste	5,0
15	1	block flush	5,0
16	103	wait	900
17	36	10 to collect	11,0
18	64	18 to waste	5,0
19	1	block flush	5,0
20	103	wait	900
21	5	flush to collect	5,0
22	36	10 to collect	11,0
23	5	flush to collect	5,0
24	2	reverse flush	60,0
25	1	block flush	4,0
26	64	18 to waste	5,0
27	42	18 to column	30,0
28	2	reverse flush	60,0
29	1	block flush	10,0
30	100	10 vent	30,0
31	107	end	

Tab. V : Trägerabspaltung (endCE) am ABI 392B

Ebenfalls ein Standard-Programm am ABI 392B, welches ursprünglich für die Abspaltung von der festen Phase bei Oligonucleotid-Synthesen unter Verwendung der Acylstrategie entwickelt wurde, jedoch ebensogut für die NPE-Strategie verwendbar ist.

1.2.6. Belegung der Flaschen-Positionen am ABI 392B während des Synthese

Position	auto-dilute / Synthese	Schutzgruppen-/ Träger-Abspaltung
1	dA-Phosphitamid-Lösung	_(*)
2	dG-Phosphitamid-Lösung	_(*)
3	dC-Phosphitamid-Lösung	_(*)
4	dT-Phosphitamid-Lösung	_(*)
5	Isoxanthopterin-Phosphitamid-Lösung	_(*)
9	Tetrazol	_(**)
10	_(***)	konz. Ammoniak (25%)
11	CAP A	_(***)
12	CAP B	1M DBU
14	TCA-Lösung	_(***)
15	Iod-Lösung	_(****)
18	Acetonitril	Acetonitril
19	Methylenchlorid	Methylenchlorid

- : Position in diesem Schritt nicht benötigt / (*) : leere Flasche bleibt am Gerät / (**): Tetrazol wird durch eine Acetonitril-Flasche ersetzt, da das Reagenz bei längerem Stehen auskristallisieren und die Schläuche verstopfen kann / (***) : Flasche ständig am Gerät, wird bei Bedarf nachgefüllt / (****) : kann normalerweise am Gerät bleiben, da parallel auch Thiophosphat-Oligomere dargestellt wurden, bei welchen mit Beaucage-Reagenz oxidiert wird, wurde zur Vermeidung von Kontaminationen durch Iod nach der Synthese jeweils auf eine Acetonitril-Flasche gewechselt.

2. Analytik der Oligonucleotidsequenzen

2.1. Kondensationsausbeuten

Zur Bestimmung der relativen Kondensationsausbeute eines Syntheseschritts beim Aufbau eines Oligomers an fester Phase wird die Absorption der Tritylkationen aus der Detritylierung

im UV bei 498 nm herangezogen. Während an anderen DNA-Synthesizern dazu die Abspalllösung jedes einzelnen Schrittes über einen Fraktionssammler aufgefangen und die Proben nach entsprechender Verdünnung und Volumenangleichung separat vermessen und zueinander in Relation gesetzt werden müssen, bietet der ABI 392B hierfür eine automatische Prozedur. Die Leitung zum Tritylport wird im Gerät durch einen UV-Detektor mit fester Wellenlänge (498nm) geleitet, wobei automatisch der Wert bezüglich der vorangegangenen Kondensation bestimmt wird. Am Ende der Synthese erhält man ein Syntheseprotokoll in welchem die Ausbeuten der einzelnen Schritte, die Gesamt- und die Durchschnitts-Ausbeute aufgeführt sind.

2.2. Oligonucleotid-Ausbeute bei der Abspaltung vom Träger

Zur Bestimmung der Ausbeute an Oligomer, welches bei der Ammoniakbehandlung erhalten wird, wurde die optische Dichte dieser Lösung bei 260nm (oD_{260}) herangezogen. Ein Aliquot (10-50 μ l) der Lösung wird dazu auf 1000 μ l aufgefüllt. In einer 1ml-Küvette erfolgt die Bestimmung der Absorption bei 260nm (oD_{260}). Aufgrund dieses Wertes wurde die Abspalllösung aufgeteilt, wobei jeweils zweimal 0,4 oD und 1 oD für HPLC und Schmelzpunktsbestimmung gesondert abgefüllt wurden. Die restliche Lösung wurde auf vier Eppendorf-Caps verteilt und alle Proben zur Aufbewahrung lyophilisiert.

2.3. HPLC

Die Reinheitskontrolle der abgespaltenen Oligonucleotide wurde über Reversed-Phase-HPLC durchgeführt. Als stationäre Phase dienten hierzu RP-18-Säulen der Firma Merck, die HPLC-Anlage stammt ebenfalls von Merck-Hitachi.

Die mobile Phase bestand aus drei Komponenten (A: 0,1N TEAA-Puffer, B: 0,1N TEAA-Puffer/Acetonitril (1/1), C: Acetonitril), aus denen durch entsprechende Mischung am Gerät ein Gradient erhalten wurde. Bei sämtlichen HPL-Chromatogrammen wurde der bereits von Charubala zur Reinheitsüberprüfung der mit 3-Methyl-2-(2-phenylethyl)amino-isoxanthopterin modifizierten 21-meren Oligonucleotide verwendete Gradient benutzt (Tab.VII).

Zeit [min]	Vol-% A	Vol-% B
0,0	95	5
2,0	95	5
32,0	60	40
37,0	0	100

40,0	0	100
45,0	95	5
50,0	95	5

Tab. VII : Standard-HPLC-Gradient zur Oligonucleotid-Analytik für Oligomere einer Länge bis zu maximal 25 Basen

2.4. Schmelzkurven

Phosphatpuffer pH 7

1,84g (0,013mol) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ und 9,40g (0,053mol) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ werden mit Wasser auf 100ml aufgefüllt. Die Na^+ -Ionenkonzentration dieses Stammpuffers liegt bei 1,2mol/l.

Probenvorbereitung

Die Messungen wurden bei einer Na^+ -Konzentration von 0,15 M durchgeführt. In einer Quarzglaszuvette wurden jeweils 0,6ml der Oligonucleotidstammlösungen der zueinander komplementären Sequenzen (je 0,6 oD_{260}), 900 μl bidestilliertes Wasser und 300 μl des Stammpuffers gemischt. Zur Vermeidung von Konzentrationsänderungen durch Verdunstung wird die Probe mit 250 μl Pentadecan überschichtet.

Messungen

Die Proben wurden bei einer Detektionswellenlänge von 260nm über einen Temperaturbereich von 15-75°C vermessen. Die Aufheiz- und Abkühlrate lag bei jeweils 0,2°C/min, jede Messung beinhaltete zwei Aufheiz- und Abkühlphasen.

Benutzt wurde ein Lambda 2 Spektrometer der Firma Perkin-Elmer mit über ein Peltier-Element (PTP-6) thermostatisierbarem 6-fach Probenwechsler. Am PTP-6 wird dabei der Temperaturgradient vorgegeben (siehe Abb.V.1 und Tab.VIII) wobei ein Temperaturbereich zwischen 10 und 80°C festgelegt wird. Die Datenerfassung und Auswertung erfolgte passiv im Temperaturbereich zwischen 15 und 75°C über einen Computer mittels der passenden Software (PETEMP und PECSS) der Firma Perkin-Elmer.

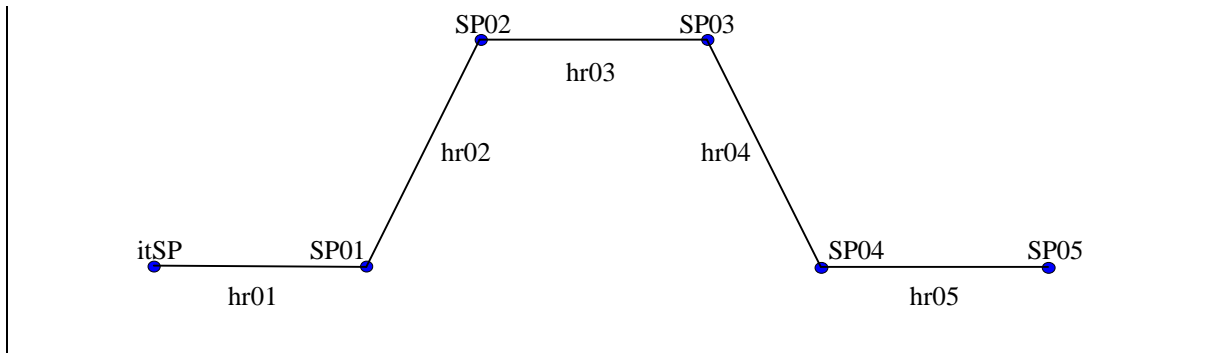


Abb.V.1 : Temperaturprofil der Schmelzkurvenmessungen am PTP-6

Wert	Benennung	Zeit/Temp.
itSP	Initial Temp.Set Point (Start-Temperatur)	10,0 °C
SP01	Temperatur-Cyclus Set-Point 1	10,0 °C
SP02	Temperatur-Cyclus Set-Point 2	80,0 °C
SP03	Temperatur-Cyclus Set-Point 3	80,0 °C
SP04	Temperatur-Cyclus Set-Point 4	10,0 °C
SP05	Temperatur-Cyclus Set-Point 5	10,0 °C
hr01	Plateau 1	5 min
hr02	Heizperiode (1.Rampe (für $\delta T=70^{\circ}\text{C}$) : $0,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	5h 50 min
hr03	Plateau 2	30min
hr04	Kühlperiode (2.Rampe (für $\delta T=70^{\circ}\text{C}$) : $0,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	5h 50 min
hr05	Plateau 3	5 min

Tab. VIII: Einstellungen am PTP-6 für das verwendete Temperaturprofil

III. LITERATUR-VERZEICHNIS

Nr	Literaturstelle {Format : Autor(1); Autor(2); ... : Journal Jahr , <i>Band-N^o</i> , Seite }
1	: J.C.E.Simpson, J.C.E. : Ann.Rep.Prog.Chem. 1947 , <u>43</u> , 250
2	: Miescher, F. : Hoppe-Seyler's Med.Chem.Unters. 1871 , , 441
3	: Watson, J.D.; Crick, F.H.C. : Nature 1953 , <u>171</u> , 737
4	: Altmann, R. : Arch.Anat.Physiol. 1898 , , 524
5	: Kossel, A. : Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 1879 , <u>3</u> , 284
6	: Kossel, A. : Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 1881 , <u>5</u> , 152
7	: Kossel, A. : Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 1882 , <u>6</u> , 422
8	: Kossel, A. : Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 1883 , <u>7</u> , 7
9	: Kossel, A.; Neumann, A. : Ber.Deut.Chem.Ges. 1893 , <u>26</u> , 2753
10	: Kossel, A.; Studel, H. : Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 1903 , <u>38</u> , 49
11	: Ascoli, A. : Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 1900 , <u>31</u> , 161
12	: Kossel, A.; Neumann, A. : Ber.Deut.Chem.Ges. 1894 , <u>27</u> , 2215
13	: Levene, P.A.; Jacobs, W.A. : Ber.Deut.Chem.Ges. 1909 , <u>42</u> , 2474
14	: Levene, P.A.; Jacobs, W.A. : Ber.Deut.Chem.Ges. 1909 , <u>42</u> , 2703
15	: Levene, P.A.; London, E.S. : J.Biol.Chem. 1929 , <u>83</u> , 793
16	: Levene, P.A.; Mikeska, L.A.; Mori, T. : 1930 , <u>85</u> , 785
17	: Avery, O.T.; MacLeod, C.M.; McCarty, M. : J.Exp.Med. 1944 , <u>79</u> , 137
18	: Brown, D.M.; Todd, A.R. : J.Chem.Soc, 1952 , , 52
19	: Decker, C.R.; Michelson, A.M.; Todd, A.R. : J.Chem.Soc, 1953 , , 947
20	: Chargaff, E.: The Nucleic Acids, Vol 1, 1955 , , 307
21	: Franklin, R.E.; Gosling, R.G. : Nature 1953 , <u>171</u> , 740
22	: Wilkins, M.H.F.; Stokes, A.R.; Wilson H.R. : Nature 1953 , <u>171</u> , 738
23	: Nirenberg, M.W.; Leder, P.; Bernfield, M.; Brimacombe, R.; Trupin, J.; Rottman, F.; O'Neal, C. : Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1965 , <u>53</u> , 1161
24	: Söll, D.; Ohtsuka, E.; Jones, D.S.; Lohrmann, R.; Hayatsu, H.; Nishimura, S.; Khorana, H.G. : Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1965 , <u>54</u> , 1378
25	: Rossi, A.: Nucleoside Analogues 1979 , , 409
26	: Sidwell, R.W. : Nucleoside Analogues 1979 , , 337
27	: Isono, K. : J.Antibiotics 1988 , <u>41</u> , 1711
28	: Mitsuya, H.; Broder, S. : Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1986 , <u>83</u> , 1911
29	: Mitsuya, H.; Weinhold, K.J.; Furman, P.A.; St.Clair, M.H.; Lehrmann, S.N.; Gallo, R.C.;

- Bolognesi, D.; Barry, D.W.; Broder, S. : Proc.Natl.Acad.Sci.USA **1985**, 82, 7096
- 30 : Teoule, R.; Bazin, H.; Fouque, B.; Roget, A.; Sauvago, S. : Nucleosides & Nucleotides **1991**, 10, 129
- 31 : Itakura, K.; Rossi, J.J.; Wallace, R.B. : Ann.Rev.Biochem. **1984**, 53, 323
- 32 : Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. : Proc.Natl.Acad.Sci.USA **1977**, 74, 5436
- 33 : Smith, M. in Wassermann, S.M. (ed.) : „Methods of RNA and DNA Sequencing“, Praeger Scientific, New York **1983**
- 34 : Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, J.J. (eds.) in PCR Protocols, Academic Press, London **1990**
- 35 : Winter, G.; Fersht, R.; Wilkinson, A.J.; Zoller, M.; Smith, M. : Nature **1982**, 299, 756
- 36 : Engels, J.W.; Uhlmann, E. : Angew.Chem. **1989**, 101, 733
- 37 : Crea, R.; Kraszewski, A.; Hirose, T.; Itakura, K. : Proc.Natl.Acad.Sci.USA **1978**, 75, 5765
- 38 : Edge, M.; Greene, A.R.; Heathcliffe, G.R.; Meacock, P.A.; Schuch, W.; Scanlon, D.B.; Atkinson, T.C.; Newton, C.R.; Markham, A. : Nature **1981**, 292, 756
- 39 : Uhlmann, E.; Peymann, A. : Chem.Rev. **1990**, 90, 543
- 40 : Murray, J.A.H. : „Antisense RNA and DNA“, Wiley Liss, New York **1992**
- 41 : Southern, E.M. : J.Mol.Biol. **1975**, 98, 503
- 42 : Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. : Proc.Natl.Acad.Sci.USA **1977**, 74, 5463
- 43 : Zamecnic, P.C.; Stephenson, M.L. : Proc.Natl.Acad.Sci.USA **1978**, 75, 280
- 44 : Miller, P.S.; Yano, Y.; Yano, E.; Carrol, C.; Yayaraman, K.; Ts’O, P.O.P. : Biochem. **1979**, 18, 5134
- 45 : Asseline, U.; Thuong, N.T.; Helene, C. : C.R.Acad.Sci.Paris, Ser.3 **1983**, 267, 369
- 46 : Asseline, U.; Delarue, M.; Lancelot, G.; Toulme, F.; Zhuong, N.Z.; Montenay-Garestier, T.; Helene, C. : Proc.Natl.Acad.Sci.USA **1984**, 81, 3297
- 47 : Miller, P.S.; Agris, C.H.; Aurelian L.; Blake, R.K.; Murakami, A.; Reddy, M.P.; Spitz, S.A.; Ts’O, P.O.P. : Biochem **1985**, 24, 769
- 48 : Blake, R.K.; Murakami, A.; Spitz, S.A.; Glave, S.A.; Reddy, M.P.; Ts’O, P.O.P.; Miller, P.S. : Biochem **1985**, 24, 6139
- 49 : Zamecnic, P.C.; Goodchild, J.; Taguchi, Y.; Sarin, P.S. : Proc.Natl.Acad.Sci.USA **1986**, 83, 4143
- 50 : Englisch, U.; Gauss, D.H. : Angew.Chem. **1991**, 103, 629
- 51 : Teoule, R.; Herve Bazin, H.; Fouque, B.; Roget, A.; Sauvaigo, S. : Nucleosides & Nucleotides **1991**, 10, 129
- 52 : Ruth, J.L. : DNA **1984**, 3, 123
- 53 : Ruth, J.L. : DNA **1985**, 4, 93
- 54 : Sproat, B.; Beijer, B.; Rider, P. : Nucleic Acids Res. **1987**, 15, 4837

- 55 : Singh, D.; Kumar, V.; Ganesh, K.N. : Nucleic Acids Res. **1990**, 18, 3339
- 56 : Telser, J.; Cruickshank, K.A.; Morrison, L.E.; Netzel, T.L. : J.Am.Chem.Soc. **1989**, 111, 6966
- 57 : Kierzek, R.; Markiewicz, W.T. : Nucleosides & Nucleotides **1991**, 58, 177
- 58 : Sigmund, H. : Dissertation, Universität Konstanz **1993**
- 59 : Pfeleiderer, W.; Sigmund, H.; Reckmann, B. : Ger.Appl.No. P423703, **1992**
- 60 : Coons, A.H.; Kaplan, M.H. : J.Exp.Med. **1950**, 91, 1
- 61 : Smith, L.M.; Fung, S.; Hunkapiller, M.W.; Hunkapiller, T.J.; Hood, L.E. : Nucleic Acids Res. **1985**, 13, 2399
- 62 : Smith, L.M.; Sanders, J.Z.; Kaiser, R.J.; Hughes, P.; Dodd, C.; Conell, C.R.; Heiner, C.; Kent, S.H.B.; Hood, L.E. : Nature **1986**, 321, 674
- 63 : Ansorge, W.; Sproat, B.S.; Stegemann, J.; Schwager, C. : Nucleic Acids Res. **1987**, 15, 4593
- 64 : Prober, J.M.; Trainor, G.L.; Dam, R.J.; Hobbs, F.W.; Robertson, C.W.; Zagursky, R.J.; Cocuzza, A.J.; Jensen, M.A.; Baumeister, K. : Science **1987**, 238, 336
- 65 : Zuckerman, R.; Corey, D.; Schultz, P. : Nucleic Acids Res. **1987**, , 5305
- 66 : Kumar, A.; Tchen, P.; Rouillet, F.; Cohen, J. : Anal. Biochem. **1988**, 169, 376
- 67 : Urdea, M.S.; Warner, R.B.; Running, J.A.; Stempien, M.; Clyne, J.; Horn, T. : Nucleic Acids Res. **1988**, 16, 4973
- 68 : Tanaka, T.; Yamada, Y.; Ikehara, M. : Chem.Pharm.Bull. **1988**, 36, 1386
- 69 : Telser, J.; Cruickshank, K.A.; Morrison, L.E.; Netzel, T.L. : J.Am.Chem.Soc. **1989**, 111, 6966
- 70 : Maier, T. : Diplomarbeit, Universität Konstanz **1992**
- 71 : Gillam, I.A. : Trends in Biotechnology **1987**, 5, 332
- 72 : Amman, R.I.; Krumholz, L.; Stahl, D.A. : J.Bacteriol. **1990**, , 172
- 73 : Bannwarth, W.; Müller, F. : Helv.Chim.Acta **1991** 74, 2000
- 74 : Maier, T. : Dissertation, Univ.Konstanz, **1995**
- 75 : Inoue, H.; Imura, A.; Ohtsuka, E. : Nucleic Acids Res. **1985**, 13, 7119
- 76 : Lin, P.K.T.; Brown, D.M. : Nucleic Acids Res. **1989**, 17, 10373
- 77 : Lin, P.K.T.; Brown, D.M. : Nucleic Acids Res. **1992**, 20, 5147
- 78 : Purmann, R. : Liebigs Ann.Chem. **1941**, 548, 284
- 79 : Kauffmann, T.; Vogt, K. : Chem.Ber. **1951**, 92, 2855
- 80 : Viscontini, M.; Schoeller, M.; Loeser, E.; Karrer, P.; Hadorn, E. : Helv.Chim.Acta **1955**, 38, 397
- 81 : Ziegler-Günder, I.; Hadorn, E. : Vererbungslehre **1958**, 89, 235
- 82 : Hopkins, F.G. : Nature **1891**, 45, 197

- 83 : Hopkins, F.G. : Nature **1891**, 45, 581
- 84 : Wieland, H.; Schöpf, C. : Ber.Deut.Chem.Ges. **1925**, 58, 2178
- 85 : Schöpf, C.; Wieland, H.: Ber.Deut.Chem.Ges. **1926**, 59, 3067
- 86 : Wieland, H.; Metzger, H.; Schöpf, C.: Liebigs Ann.Chem. **1933**, 507, 261
- 87 : Purrmann, R. : Liebigs Ann.Chem. **1940**, 544, 182
- 88 : Purrmann, R. : Liebigs Ann.Chem. **1941**, 546, 98
- 89 : Kühling, O. : Ber.Deut.Chem.Ges. **1894**, 27, 2116
- 90 : Kühling, O. : Ber.Deut.Chem.Ges. **1895**, 28, 1968
- 91 : Forrest, H.S.; Hull, R.; Rodda, H.J.; Todd, A.R. : J.Chem.Soc. (London) **1951**, , 3
- 92 : Ritzmann, G.; Pfeleiderer, W. : Chem.Ber. **1973**, 106, 1401
- 93 : Ritzmann, G.; Ienaga, K.; Pfeleiderer, W. : Liebigs Ann.Chem. **1977**, , 1217
- 94 : Harzer, K.; Pfeleiderer, W. : Helv.Chim.Acta **1973**, 56, 1225
- 95 : Harris, R.; Pfeleiderer, W. : Liebigs Ann.Chem **1981**, , 1457
- 96 : Schmid, H.; Schraner, M.; Pfeleiderer, W. : Chem.Ber. **1973**, 106, 1952
- 97 : Charubala, R.; Rösler, A.; Maurinsh, J.; Jungmann, O.; Lehbauer, J.; Hawkins, M.E.; Pfeleiderer, W.: Nucleosides & Nucleotides **1997**, in print
- 98 : Rösler, A. : Dissertation, Universität Konstanz **1995**
- 99 : Maurinsh, Y.; Pfeleiderer, W. : Nucleosides & Nucleotides **1996**, 15, 431
- 100 : Jungmann, O. : Diplomarbeit, Universität Konstanz, **1993**
- 101 : Lehbauer, J. : Diplomarbeit, Universität Konstanz, **1993**
- 102 : Matysiak, S. : Diplomarbeit, Universität Konstanz **1991**
- 103 : Waldscheck, B. : Diplomarbeit, Universität Konstanz, **1996**
- 104 : Melguizo, M.; Gottlieb, M.; Pfeleiderer, W. : Pteridines **1995**, 6, 85
- 105 : Hawkins, M.E.; Pfeleiderer, W.; Mazumder, A.; Pommier, Y.G.; Balis, F.M. : Nucleic Acids Res. **1996**, 23, 2872
- 106 : Charubala, R.; Pfeleiderer, W. : Helv.Chim.Acta **1979**, 62, 1179
- 107 : Charubala, R.; Pfeleiderer, W. : Liebigs Ann.Chem. **1980**, , 65
- 108 : Bannwarth, W.; Charubala, R.; Pfeleiderer, W. : Liebigs Ann.Chem. **1980**, , 50
- 109 : Gottarelli, G.; Mezzina, E.; Spada, G.P.; Carsughi, F.; Di Nicola, G.; Sabatucci, A.; Bonazzi, S. : Helv.Chim.Acta **1996**, 79, 220
- 110 : Schmid, H. : Dissertation, Universität Konstanz, **1971**
- 111 : Kiriasis, L. Pfeleiderer, W. : in „Chemistry and Biology of Pteridines“, Kisliuk, R.L.; Brown, G.M. (eds.), Elsevier/North-Holland **1979**, , 49
- 112 : Kiriasis, L.; Pfeleiderer, W. : Nucleosides & Nucleotides **1989**, 8, 1345
- 113 : Taylor, E.C.; Lenard, K : J.Am.Chem.Soc. **1968**, 90, 2424
- 114 : Taylor, E.C. : in „Chemistry and Biology of Pteridines“, Iwai, K.; Goto, M.; Akino, M.;

- Iwanami, Y. Tokyo, International Academic Printing Co.Ltd. **1969**
- 115 : Taylor, E.C.; Perkham, K.L.; Sword, I.P.; Sequin-Frey, M.; Jacobi, P.A. : J.Am.Chem.Soc. **1973**, 95, 6407
- 116 : Polonovski, M.; Jerome, H.; Gabriel Bertrand, M. : Compt.Rend.Hebd.Seances Acad.Sci. **1950**, 230, 392
- 117 : Boon, R.W.; Jones, W.G.M.; Ramage, G.R. : J. Chem.Soc. **1951**, , 96
- 118 : Timmis, G.M. : Nature **1949**, 164, 139
- 119 : Osdene, T.; Timmis, G.M. : J.Chem.Soc. **1955**, , 2038
- 120 : Gabriel, S. : Ber.deut.chem.Ges. **1901**, 34, 1234
- 121 : Isay, O. : Ber.deut.chem.Ges. **1906**, 39, 250
- 122 : Harris, R.; Pfeleiderer, W : Liebigs Ann.Chem. **1981**, , 1547
- 123 : Weinstock, J.; Rosenbloom, J.P.; Hines, R.H. : J.Org.Chem. **1968**, 33, 3339
- 124 : Youssefyeh, R.Y.; Kalmus, A. : Chem.Commun. **1970**, , 1371
- 125 : Taylor, E.C.; Evans, B.E. : Chem.Commun. **1971**, , 189
- 126 : Purrmann, R. : Liebigs Ann.Chem. **1941**, 548, 284
- 127 : Elion, G.B.; Hitchings, G.H.; Russel, P.B. : J.Am.Chem.Soc. **1950**, 72, 78
- 128 : Pfeleiderer, W. : Chem.Ber. **1957**, 90, 2588
- 129 : Pfeleiderer, W. : Chem.Ber. **1957**, 90, 2604, **1957**, 90, 2617, **1957**, 90, 2624, **1959**, 92, 3190
- 130 : Pfeleiderer, W.; Rukwied, M. : Chem.Ber. **1961**, 94, 1
- 131 : Yoneda, F.; Higuchi, M. : J.Chem.Soc. Perk.Trans.I **1977**, , 1336
- 132 : Kang, Y.; Soyka, R.; Pfeleiderer, W. : J.Heterocycl.Chem. **1987**, 24, 597
- 133a : Taghavi-Moghadam, S. : Dissertation, Universität Konstanz **1997**
- 133b : Taghavi-Moghadam, S.; Pfeleiderer, W. : Pteridines **1997**, 8, 49
- 133c : Taghavi-Moghadam, S.; El-Kalyoubi, S.; Pfeleiderer, W. : Pteridines **1997**, 8, 50
- 134 : Pfeleiderer, W.; Lohrmann, R. : Chem.Ber. **1961**, 94, 12
- 135 : Roth, B.; Smith, J.M.jr; Hultquist, M.E. : J.Am.Chem.Soc. **1950**, 72, 1915
- 136 : Pfeleiderer, W.; Reisser, F. : Chem.Ber. **1962**, 95, 1621
- 137 : Kazimierczuk, Z.; Pfeleiderer, W. : Chem.Ber. **1979**, 112, 1499
- 138 : Itoh, T.; Pfeleiderer, W. : Chem.Ber.**1970**, 109, 3226
- 139 : Pfeleiderer, W. : Chem.Ber. **1958**, 91, 1671
- 140 : Renfrew, A.G.; Piatt, P.C.; Cretcher, L.H. : J.Org.Chem. **1952**, 17, 467
- 141 : Yamamoto, H.; Hutzenlaub, W.; Pfeleiderer, W. : Chem.Ber. **1973**, 106, 3175
- 142 : Lung, A. : Diplomarbeit, Universität Konstanz, **1991**
- 143 : Elion, G.B.; Hitchings, G.H.; Russell, P.B. : J.Am.Chem.Soc. **1950**, 72, 78
- 144 : Tschesche, R.; Köhnke, K.H.; Korte, F. : Z.Naturforschung **1950**, 5b, 132

- 145 : Tschesche, R.; Köhnke, K.H.; Korte, F. : Chem.Ber. **1951**, 84, 485
- 146 : Albert, A.; Brown, D.J. : J.Chem.Soc. (London) **1953**, 11, 74
- 147 : Pfeleiderer, W. : Chem.Ber. **1959**, 92, 3190
- 148 : Johns, C.O.; Baumann, F.J. : J.Biol.Chem. **1913**, 14, 318
- 149 : Johns, C.O.; Hendrix, M.B. : J.Biol.Chem. **1913**, 20, 153
- 150 : Schneider, H.J.; Pfeleiderer, W. : Chem.Ber. **1974**, 107, 3377
- 151 : Zemlicka, J.; Chladek, S.; Holy, A.; Smrt, J. : Coll.Czech.Chem.Comm. **1966**, 31, 3198
- 152 : Schulz, B.S. : Diplomarbeit, Universität Konstanz **1993**
- 153 : Schulz, B.S. : Dissertation, Universität Konstanz **1996**
- 154 : Melguizo, M. : Forschungsbericht, Universität Konstanz, **1994**
- 155 : CRC-Handbook of Chemistry and Physics 58th Ed., **1978**
- 156 : Herbert, B.S.; Ferone, R.; Herman, T.A.; Hitchings, G.H.; Barnelt, M.; Bushby, S.R.M. : J.Med.Chem. **1968**, 11, 711
- 157 : Broom, A.D.; Shim, J.L.; Anderson, G.L. : J.Org.Chem. **1976**, 41, 1095
- 158 : Gunsalus, R.P.; Wolfe, R.S. : J.Biol.Chem. **1960**, 255, 1891
- 159 : Ashton, W.T.; Brown, R.D. : J.Am.Chem.Soc. **1979**, 101, 4419
- 160 : Ashton, W.T.; Brown, R.D. : J.Heterocyclic Chem. **1980**, 17, 1709
- 161 : Klinsiecki, L.; Sucharda, E. : Roczniki Chem. **1923**, 3, 251
- 162 : Robins, R.K.; Hitchings, G.H. : J.Am.Chem.Soc. **1955**, 77, 2256
- 163 : Robins, R.K.; Hitchings, G.H. : J.Am.Chem.Soc. **1958**, 80, 3449
- 164 : Oakes, V.; Pascoe, R.; Rydon, H.N. : J.Chem.Soc.(London) **1956**, , 1045
- 165 : Irwin, W.J.; Wibberley, D.G. : Advan. Heterocyclic Chem. **1969**, 10, 149
- 166 : Lunt, E.; Newton, C.G. : in „Comprehensive Heterocyclic Chemistry“ Vol III, Kap.2.15, Pergamon Press, Oxford, **1984**, , 199
- 167 : Garcia, J.A.; Sanchez, A.; Nogueras, M. : J.Heterocyclic Chem. **1989**, 26, 1089
- 168 : Rizkalla, B.H.; Broom, A.D. : J.Org.Chem. **1972**, 37, 3981
- 169 : Albert, A.; Serjeant, E.P. : „The Determination of Ionization Constants“, 3rd-Ed., London, New York, Chapman and Hall, **1984**, S 70-101
- 170 : Helferich, B. ; Grootz, R. : Ber.Dtsch.Chem.Ges. **1929**, 62, 2788
- 171 : Helferich, B. ; Schmitz-Hillebrecht, E. : Ber.Dtsch.Chem.Ges. **1933**, 66, 378
- 172 : Helferich, B. ; Lampert, U. : Ber.Dtsch.Chem.Ges. **1934**, 67, 1167
- 173 : Helferich, B. ; Forstoff, L. : Ber.Dtsch.Chem.Ges. **1961**, 94, 158
- 174 : Koenigs, W.; Knorr, E. : Ber.Dtsch.Chem.Ges. **1901**, 34, 957
- 175 : Nishimura, T.; Shimizu, B.; Iwai, I. : Chem.Pharm.Bull. **1963**, 11, 1470
- 176 : Nishimura, T.; Iwai, I. : Chem.Pharm.Bull. **1964**, 12, 1471
- 177 : Birkofer, L.; Ritter, A.; Kuhltau, H.P. : Angew.Chem. **1963**, 75, 209

- 178 : Birkofer, L.; Ritter, A.; Kuhltau, H.P. : Chem.Ber. **1964**, 97, 934
- 179 : Hilbert, G.E.; Johnson, T.B. : J.Am.Chem.Soc. **1930**, 52, 2001
- 180 : Hilbert, G.E.; Johnson, T.B. : J.Am.Chem.Soc. **1930**, 52, 4489
- 181 : Sato, T.; Shimadate, T.; Ishido, Y. : Nippon Kagaku Zasshi **1960**, 81, 1440
- 182 : Sato, T.; Shimadate, T.; Ishido, Y. : Chem. Abstr. **1962**, 56, 11692g
- 183 : Ishido, Y.; Hosono, A.; Fujii, K.; Kikuchi, Y.; Sato, T. : Chem. Abstr. **1966**, 65, 17034c
- 184 : Fischer, E.; Helferich, B. : Ber.Dtsch.Chem.Ges. **1914**, 47, 210
- 185 : Levene, P.A.; Sobotka, H. : J.Biol.Chem. **1925**, 65, 469
- 186 : Davoll, J.; Lowy, B.A. : J.Am.Chem.Soc. **1951**, 73, 1650
- 187 : Davoll, J. : J.Am.Chem.Soc. **1951**, 73, 3174
- 188 : Davoll, J.; Lowy, B.A. : J.Am.Chem.Soc. **1952**, 74, 1563
- 189 : Fox, J.J.; Yung, W.; Davoll, J.; Brown, G.B. : J.Am.Chem.Soc. **1956**, 78, 2117
- 190 : Ulbricht, T.L.V.; Angew.Chem.Intern.Ed. **1962**, 1, 476
- 191 : Ulbricht, T.L.V.; Rogers, G.T. : J.Chem.Soc.(London) **1965**, , 6125
- 192 : Ulbricht, T.L.V.; Rogers, G.T. : J.Chem.Soc.(London) **1965**, , 6130
- 193 : Kazimierczuk, Z.; Cottam, H.B.; Revankar, G.R.; Robins, R.K. : J.Am.Chem.Soc.**1984**, 106, 6379
- 194 : Seela, F.; Kehne, A. : Liebigs Ann.Chem. **1983**, , 876
- 195 : Seela, F.; Steker, H. : Tetrahedron Lett. **1984**, 25, 5017
- 196 : Seela, F.; Steker, H. : Helv.Chim.Acta **1985**, 68, 563
- 197 : Hoffer, M. : Chem.Ber. **1960**, 93, 2777
- 198 : Bhat, C.C: : in „Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry“, Zorbach, W.W.; Tipson, R.S. (eds.) : New York, Interscience Publ. **1968**, Vol 1, 521
- 199 : Hilbert, G.E.; Jansen, E.F. : J.Am.Chem.Soc. **1936**, 58, 60
- 200 : Prystas, M.; Sorm, F. : Coll.Czech.Chem.Comm. **1969**, 34, 331 und 2316
- 201 : Newmark, P.; Goodman, I. : J.Am.Chem.Soc. **1957**, 79, 6446
- 202 : Lohrmann, R.; Lagowski, J.M.; Forrest, H.S. : J.Chem.Soc. (London) **1964**, , 451
- 203 : Michelson, A.M.; Drell, W.; Mitchell, H.K. : Proc.Natl.Acad.Sci., USA **1951**, 37, **396**
- 204 : Wittenburg, E. : Z.Chem. **1964**, 4, 303
- 205 : Wittenburg, E. : Chem.Ber **1968**, 101, 1095
- 206 : Wittenburg, E.; Etzold, G.; Langen, P. : Chem.Ber. **1968**, 101, 494
- 207 : Wittenburg, E. : Chem.Ber **1968**, 101, 1614
- 208 : Wittenburg, E. : Chem.Ber **1968**, 101, 2132
- 209 : Niedballa, U.; Vorbrüggen, H. : J.Org.Chem. **1974**, 39, 3654
- 210 : Niedballa, U.; Vorbrüggen, H. : J.Org.Chem. **1974**, 39, 3660
- 211 : Niedballa, U.; Vorbrüggen, H. : J.Org.Chem. **1974**, 39, 3664

- 212 : Niedballa, U.; Vorbrüggen, H. : J.Org.Chem. **1974**, 39, 3668
- 213 : Niedballa, U.; Vorbrüggen, H. : J.Org.Chem. **1974**, 39, 3672
- 214 : Vorbrüggen, H.; Krolikiewiewicz, K.; Bennua, B. : Chem.Ber. **1981**, 114, 1234
- 215 : Tipson, R.S. : J.Biol.Chem. **1939**, 130, 55
- 216 : Isbell, H.,S. : Annu.Rev.Biochem. **1940**, 9, 65
- 217 : Baker,, B.R. : Chem.Biol.Purines, Ciba Found.Symp. **1957**, , 120
- 218 : Jungmann, O.; Pfeleiderer, W. : Tetrahedron Lett. **1996**, 37, 8355
- 219 : Anderson, G.L.; Broom, A.D. : J.Org.Chem. **1977**, 42, 997
- 220 : Hudson, C.D. : J.Am.Chem.Soc. **1909**, 31, 66
- 221 : Hudson, C.D. : Adv.Carbohydr.Chem. **1958**, 3, 1
- 222 : Lemieux, R.U.; Hoffer, M. : Can.J.Chem. **1961**, 39, 110
- 223 : Karplus, M. : J.Chem.Phys. **1959**, 30, 11
- 224 : Rayner, B.; Tapiero, C.; Imbach, J.L. : Carbohydr.Res. **1976**, 47, 195
- 225 : Robins, M.J.; Wilson, J.S.; Sawyer, L.; James, M.N. : Can.J.Chem. **1983**, 61, 1911
- 226 : Lemieux, R.U. : Can.J.Chem. **1961**, 39, 116
- 227 : Robins, M.J.; Robins, R.K. : J.Am.Chem.Soc. **1965**, 87, 4934
- 228 : Ramzaeva, N.; Seela, F. : Helv.Chim.Acta **1995**, 78, 1083
- 229 : Seela, F.; Zulauf, M. : Synthesis **1996**, , 726
- 230 : Rosemeyer, H.; Seela, F. : Nucleosides & Nucleotides **1997**, in print
- 231 : Cao, X. : Dissertation, Universität Konstanz **1991**
- 232 : Cao, X.; Pfeleiderer, W.; Rosemeyer, H.; Seela, F.; Bannwarth, W.; Schönholzer, P. : Helv. Chim.Acta **1992**, 75, 1267
- 233 : Michelson, A.M.; Todd, A.R. : J.Chem.Soc.(London) **1953**, , 2632
- 234 : Khorana, H.G.; Tener, G.M.; Moffat, J.G.; Pol, E.H. : Chem.Ind.(London) **1956**, , 1523
- 235 : Gilham, P.T.; Khorana, H.G. : J.Am.Chem.Soc. **1958**, 80, 6212
- 236 : Smith, M.; Rammler, D.H.; Goldberg, I.H.; Khorana, H.G. : J.Am.Chem.Soc. **1962**, 84, 430
- 237 : Rammler, D.H.; Khorana, H.G. : J.Am.Chem.Soc. **1962**, 84, 3112
- 238 : Khorana, H.G. : Science **1979**, 203, 614
- 239 : Smith, M.; Moffat, J.G.; Khorana, H.G. : J.Am.Chem.Soc. **1958**, 80, 6204
- 240 : Jacob, T.M.; Khorana, H.G. : J.Am.Chem.Soc. **1964**, 86, 1630
- 241 : Lohrmann, R.; Khorana, H.G. : J.Am.Chem.Soc. **1966**, 88, 829
- 242 : Letsinger, R.; Mahaderan, V. : J.Am.Chem.Soc. **1965**, 87, 3526
- 243 : Reese, C.B.; Saffhill, R. : J.Chem.Soc.Chem.Comm. **1968**, , 767
- 244 : Eckstein, F.; Risk, I. : Chem.Ber. **1969**, 102, 2362
- 245 : Itakura, K.; Katagiri, N.; Bahl, C.P.; Wightman, R.H.; Narang, S.A. : J.Am.Chem.Soc.

- 1975**, 97, 7327
- 246 : Reese, C.B.; Titmas, R.C.; Yau, L. : Tetrahedron Lett. **1978**, 19, 2727
- 247 : Jones, S.S.; Rayner, B.; Reese, C.B.; Ubasawa, A.; Ubasawa, M. : Tetrahedron **1980**, 36, 3075
- 248 : Devine, K.G.; Reese, C.B. : Tetrahedron Lett. **1986**, 27, 5529
- 249 : Gough, G.R.; Brunden, M.J.; Gilham, P.T. : Tetrahedron Lett. **1981**, 22, 4177
- 250 : Sood, A.U.; Narang, S.A. : Nucleic Acids Res. **1977**, 4, 2757
- 251 : Narang, S.A.; Hsiung, H.M.; Brousseau, R. : Methods Enzymol. **1979**, 68, 90
- 252 : Hsiung, H.M.; Sung, W.L.; Brousseau, R.; Wu, R.; Narang, S.A.: Nucleic Acids Res. **1980**, 8, 5753
- 253 : Hall, R.H.; Todd, A.R.; Webb, R.F. : J.Chem.Soc.(London) **1957**, , 3291
- 254 : Garegg, P.J.; Regberg, T.; Stawinski, J.; Strömberg, R. : Chim.Scripta **1985**, 25, 280
- 255 : Garegg, P.J.; Lindh, I.; Regberg, T.; Stawinski, J.; Strömberg, R. : Tetrahedron Lett. **1986**, 27, 4051
- 256 : Garegg, P.J.; Lindh, I.; Regberg, T.; Stawinski, J.; Strömberg, R. : Tetrahedron Lett. **1986**, 27, 4055
- 257 : Froehler, B.C.; Matteucci, M.D. : Tetrahedron Lett. **1986**, 27, 469
- 258 : Froehler, B.C.; Ng; P.G.; Matteucci, M.D. : Nucleic Acids Res. **1986**, 14, 5399
- 259 : Andrus, A.; Efcavitch, J.W.; Mc Bride, L.J.; Giusti, B. : Tetrahedron Lett. **1988**, 29, 861
- 260 : Letsinger, R.L.; Lursford, W.B. : J.Am.Chem.Soc. **1976**, 98, 2655
- 261 : Matteucci, M.D.; Caruthers, M.H. : J.Am.Chem.Soc. **1981**, 103, 3185
- 262 : Beaucage, S.L.; Caruthers, M.H. : Tetrahedron Lett. **1981**, 22, 1859
- 263 : Caruthers, M.H.; Barone, A.D.; Beaucage, S.L.; Dodds, D.R.; Fisher, E.E.; Mc Bride, L.J.; Matteucci, M.D.; Stabinsky, Z.; Tang, J.Y. : Methods Enzymol. **1987**, 157, 287
- 264 : Sinha, N.D.; Biernat, J.; Köster, H. : Tetrahedron Lett. **1983**, 24, 5843
- 265 : Sinha, N.D.; Biernat, J.; Mc Manus, J.; Köster, H. : Nucleic Acids Res. **1984**, 12, 4539
- 266 : Mc Bride, L.J.; Caruthers, M.H. : Tetrahedron Lett. **1983**, 24, 245
- 267 : Adams, S.P.; Kavka, K.S.; Wykes, E.J.; Holder, S.B.; Galuppi, G.R. : J.Am.Chem.Soc. **1983**, 105, 661
- 268 : Gasparutto, D.; Molko, D.; Teoule, K. : Nucleosides & Nucleotides **1990**, 9, 1087
- 269 : Dorman, M.A.; Noble, S.A.; Mc Bride, C.J.; Caruthers, M.H. : Tetrahedron **1984**, 40, 95
- 270 : Beiter, A.H.; Pfeleiderer, W. : Tetrahedron Lett. **1984**, 25, 1975
- 271 : Uznanski, B.; Wilk, A.; Stec, W.J. : Tetrahedron Lett. **1987**, 28, 3401
- 272 : Schwarz, M.W.; Pfeleiderer, W. : Tetrahedron Lett. **1984**, 25, 5513
- 273 : Schwarz, M.W.; Pfeleiderer, W. : Nucleosides & Nucleotides **1985**, 4, 291
- 274 : Beiter, A.H.; Pfeleiderer, W. : Synthesis **1989**, , 497

- 275 : Khorana, H.G. : Bioorg.Chem. **1978**, 1, 351
- 276 : Khorana, H.G.; Turnaer, A.F.; Vizolyi, J.P. : J.Am.Chem.Soc. **1961**, 83, 687
- 277 : Ralph, K.K.; Khorana, H.G. : J.Am.Chem.Soc. **1961**, 83, 2926
- 278 : Büchi, H.; Khorana, H.G. : J.Mol.Biol. **1972**, 72, 251
- 279 : Schulhof, J.C.; Molko, D.; Teoule, R. : Nucleic Acids Res. **1987**, 15, 397
- 280 : Sinha, N.D.; Davis, P.; Usman, N.; Perez, J.; Hodge, R.; Kremsky, J.; Casale, R. : Biochimie **1993**, 75, 13
- 281 : Theisen, P.; Mc Collum, C.; Andrus, A. : Nucleosides & Nucleotides **1993**, 12, 1033
- 282 : Uhlmann, E.; Pfeleiderer, W. : Nucleic Acids Res. Spec.Publ. **1978**, 4, 25
- 283 : Uhlmann, E.; Pfeleiderer, W. : Tetrahedron Lett. **1980**, 21, 1181
- 284 : Uhlmann, E.; Charubala, R.; Pfeleiderer, W. : Nucleic Acids Res. Spec.Publ. **1981**, 9, 131
- 285 : Trichtinger, T.; Charubala, R.; Pfeleiderer, W. : Tetrahedron Lett. **1983**, 24, 74
- 286 : Himmelsbach, F.; Pfeleiderer, W. : Tetrahedron Lett. **1983**, 24, 3583
- 287 : Schulz, B.S.; Pfeleiderer, W. : Tetrahedron Lett. **1983**, 24, 3587
- 288 : Himmelsbach, F. : Dissertation, Universität Konstanz **1984**
- 289 : Himmelsbach, F.; Schulz, B.S.; Trichtinger, T.; Charubala, R.; Pfeleiderer, W. : Tetrahedron **1984**, 40, 59
- 290 : Pfeleiderer, W.; Himmelsbach, F.; Charubala, R.; Schirmeister, H.; Beiter, A.; Schulz, B.S.; Trichtinger, T. : Nucleosides & Nucleotides **1985**, 4, 81
- 291 : Himmelsbach, F.; Charubala, R.; Pfeleiderer, W. : Helv.Chim.Acta **1987**, 70, 1286
- 292 : Farkas, S.; Pfeleiderer, W. : Nucleosides & Nucleotides **1987**, 6, 509
- 293 : Pfeleiderer, W.; Schirmeister, H.; Reiner, T.; Pfister, M.; Charubala, R. : in „New Protecting Groups in Nucleoside and Nucleotide Chemistry in Biophosphates and their Analogues - Synthesis, Struktur, Metabolism and Activity“, Bruzik, K.S.; Stec, W.J. (eds.), Amsterdam, Elsevier **1987**
- 294 : Farkas, S. : Dissertation, Universität Konstanz **1988**
- 294b : Schirmeister, H. : Dissertation, Universität Konstanz **1988**
- 295 : Pfeleiderer, W.; Pfister, M.; Farkas, S.; Schirmeister, H.; Charubala, R.; Stengele, K.P.; Mohr, M.; Bergmann, F.; Gokhale, S. : Nucleosides & Nucleotides **1991**, 10, 377
- 296 : Himmelsbach, F.; Schirmeister, H.; Pfeleiderer, W. : Helv.Chim.Acta **1993**, 76, 385
- 297 : Gioli, C.; Chattopadhyaya, J.B. : J.Chem.Soc.Chem.Comm. **1982**, , 672
- 298 : Happ, E.; Scalfi-Happ, C.; Chladek, S. : J.Org.Chem. **1987**, 52, 5387
- 299 : Hagen, M.D.; Scalfi-Happ, C.; Happ, E.; Chladek, S. : J.Org.Chem. **1988**, 53, 5040
- 300 : Hagen, M.D.; Chladek, S. : J.Org.Chem. **1989**, 54, 3189
- 301 : Hayakawa, Y.; Wakabayashi, S.; Kato, H.; Noyori, R. : J.Am.Chem.Soc. **1990**, 112, 1691
- 302 : Tener, G.M. : J.Am.Chem.Soc. **1961**, 83, 159

- 303 : Schaller, H.; Weimann, G.; Lerch, B.; Khorana, H.G. : J.Am.Chem.Soc. **1963**, 85, 3821
- 304 : Chattopadhyaya, J.B.; Reese, C.B. : J.Chem.Soc.Chem.Comm. **1978**, , 639
- 305 : Kwiatkowski, M.; Chattopadhyaya, J.B. : Acta Chem.Scand. **1984**, 38, 657
- 306 : Bergmann, F. : Dissertation, Universität Konstanz **1994**
- 307 : Bergmann, F.; Pfeleiderer, W. : Helv.Chim.Acta **1994**, 77, 203, 481,988
- 308 : Giegrich, H. : Dissertation, Universität Konstanz **1996**
- 309 : Hermann, C. : Diplomarbeit, Universität Konstanz **1996**
- 310 : Fodor, S.P.A.; Read, J.L.; Pirrung, M.C.; Stryer, L.; Tsai Lu, A.; Solas, D. : Science **1991**, 251, 767
- 311 : Fodor, S.P.A.; Rava, R.P.; Huang, X.C.; Pease, A.C.; Holmes, C.P.; Adams, C.L. : Nature **1993**, 364, 555
- 312 : Pease, A.C.; Solas, D.; Sullivan, E.J.; Cronin, M.T.; Holmes, C.P.; Fodor, S.P.A.: Proc.Natl. Acad.Sci.USA **1994**, 91, 5022
- 313 : Beaucage, S.L.; Iyer, R.P. : Tetrahedron **1992**, 48, 2223
- 314 : vgl. Greene, T.W.; Wuts, P.G.M. : „Protective Groups in Organic Synthesis“, 2nd.Ed. , New York, John Wiley & sons **1991**
- 315 : Mitsunobu, O. : Synthesis **1981**, , 1
- 316 : Hanaya, T.; Torigoe, K.; Soranaka, K.; Yamamoto, H.; Quizeng, Y.; Pfeleiderer, W. : Pteridines **1995**, 6, 1
- 317 : Yao, Q. : Dissertation, Universität Konstanz, **1997**
- 318 : Kume, A.; Sekine, M.; Hata, T. : Tetrahedron Lett. **1982**, 23, 4365
- 319 : Sekine, M.; Matsuzaki, J.; Hata, T. : Tetrahedron Lett. **1982**, 23, 5287
- 320 : Hata, T.; Gokita, N.; Sakairi, N.; Yamaguchi, K.; Sekine, M.; Ishido, Y. : Bull.Chem.Soc.Jpn. **1982**, 55, 2949
- 321 : Zemplen, G. : Ber.Dtsch.Chem.Ges. **1926**, 59, 1258
- 322 : Zemplen, G.; Geres, A.; Hadacsy, J. : Ber.Dtsch.Chem.Ges. **1936**, 69, 1827
- 323 : Bambry, R.E.; Freeley, D.T.; Lawton, G.C.; Weaver, J.M.; Wemple, J. : J.Med.Chem. **1984**, 27, 1613
- 324 : Asakura, J. : Nucleosides & Nucleotides **1993**, 12, 701
- 325 : Watanabe, K.; Itoh, K.; Araki, Y.; Ishido, Y. : Carbohydr.Res. **1986**, 154, 165
- 326 : Herzig, J.; Nudelman, A.; Gottlieb, H.E.; Fisher, B. : J.Org.Chem. **1986**, 51, 727
- 327 : Asakura, J.; Tomura, T. : Nucleosides & Nucleotides **1988**, 7, 245
- 328 : Pearson, R.G.; Sobel, H.; Songstad, J. : J.Am.Chem.Soc. **1968**, 90, 319
- 329 : Bortolini, O.; Campestrini, S.; DiFuria, F.; Modena, G. : J.Org.Chem. **1987**, 52, 5093
- 330 : Murray, R.W.; Jeyaraman, R.J. : J.Org.Chem. **1985**, 50, 2847
- 331 : Petrow, V.A.; DesMarteau, D.D. : Inorg.Chem. **1992**, 31, 3776

- 332 : Petrow, V.A.; DesMarteau, D.D. : J.Org.Chem. **1993**, 58, 4754
- 333 : DesMarteau, D.D.; Petrow, V.A.; Montanari, V.; Pregnolato, M.; Resnati, G.: J.Org.Chem. **1994**, 59, 2762
- 334 : Bell, G.A.; Duncin, I.R. : J.Chem.Soc.Chem.Comm. **1983**, , 1213
- 335 : Lovas, F.J.; Suenram, R.D. : Chem.Phys.Lett. **1977**, 51, 453
- 336 : Adam, W.; Chan, Y.Y.; Cremer, D.; Scheutzow, D.; Schindler, M. : J.Org.Chem. **1987**, 52, 2800
- 337 : Murray, R.W.; Singh, M. : Org.Synth. **1996**, 74, 91
- 338 : Adam, W.; Hadjiarapoglou, L.; Smerz, A.: Chem.Ber. **1991**, 124, 227
- 339 : Adam, W.; Bialas, J.; Hadjiarapoglou, L. : Chem.Ber. **1991**, 124, 2377
- 340 : Gottlieb, M. : pers.Mitteilung
- 341 : Kraszewski, A.; Norris, K.E. : Nucleic Acids Res.Symp.Ser. **1987**, 18, 177
- 342 : Stengele, K.-P.; Pfeleiderer, W. : Tetrahedron Lett. **1990**, 31, 2549
- 343 : Stengele, K.-P. : Dissertation, Universität Konstanz **1991**
- 344 : Merrifield, R.B. : Fed.Proc. **1962**, 21, 412
- 345 : Merrifield, R.B. : J.Am.Chem.Soc. **1963**, 85, 2149
- 346 : Merrifield, R.B. : Science **1965**, 150, 178
- 347 : Letsinger, R.L.; Mahadevan, V. : J.Am.Chem.Soc. **1966**, 88, 5319
- 348 : Köster, H. : Tetrahedron Lett. **1972**, 13, 1527
- 349 : Chow, F.; Kempe, T.; Palm, G. : Nucleic Acids Res. **1981**, 9, 2807
- 350 : Gough, G.R.; Brunden, M.J.; Gilham, P.T. : Tetrahedron Lett. **1981**, 22, 4177
- 351 : Gough, G.R.; Brunden, M.J.; Gilham, P.T. : Tetrahedron Lett. **1983**, 24, 5321
- 352 : Reddy, M.P.; Michael, M.A.; Farooqui, F.; Girgis, N.S. : Tetrahedron Lett. **1994**, 35, 5771
- 353 : Rapp, W. : Rapp Polymere D-72072 Tübingen
- 354 : Conte, M.R.; Mayol, L.; Montesarchio, D.; Piccialli, G.; Santacroce, C. : Nucleosides & Nucleotides **1993**, 12, 351
- 355 : Wright, P.; Loyd, D.; Rapp, W.; Andrus, A. : Tetrahedron Lett. **1993**, 34, 3373
- 356 : Weiler, J. : Dissertation, Universität Konstanz, **1995**
- 357 : Efcavitch, J.W.; McBride, L.J.; Eadie, J.S. : in „New Protecting Groups in Nucleoside and Nucleotide Chemistry in Biophosphates and their Analogues - Synthesis, Struktur, Metabolism and Activity“, Bruzik, K.S.; Stec, W.J. (eds.), Amsterdam, Elsevier **1987**
- 358 : Schwarz, M.W. : Dissertation, Universität Konstanz, **1968**
- 359 : Reiner, T. : Dissertation, Universität Konstanz, **1988**
- 360 : Damha, M.J.; Giannaris, P.A.; Zabarylo, S.V. : Nucleic Acids Res. **1990**, 18, 3813
- 361 : Stengele, K.-P. : Dissertation, Universität Konstanz **1991**
- 362 : Aerschot, A.v.; Herdewjin, P.; Vanderhaeghe, H. : Nucleosides & Nucleotides **1988**, 7, 75

- 363 : Katzhendler, J.; Cohen, S.; Rahamim, E.; Weisz, M.; Ringel, I.; Deutsch, J. : Tetrahedron **1989**, 45, 2777
- 364 : Charubala, R. : pers. Mitteilung
- 365 : Wagner, T. : Dissertation, Universität Konstanz **1996**
- 366 : Wallace, R.B.; Schaffer, J.; Murphy, R.F.; Bonner, J.; Itakura, K. : Nucleic Acids Res. **1979**, 6, 3543
- 367 : Baldino, F.Jr.; Chesselet, M.-F.; Lewis, M.E. : Methods in Enzymol. 167, 761
- 368 : Teoule, R.; Bazin, H.; Fouque, B.; Roget, A.; Sauvaigo, S. : Nucleosides & Nucleotides **1991**, 10, 129

