

# Untersuchungen zu Synthese und Eigenschaften von Oligonucleotid- Prodrugs

Dissertation

Zur Erlangung des Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

von  
Verena Böttner, M.Sc.

Saarbrücken

2019



Tag des Kolloquiums: 09. Dezember 2019

Dekan: Prof. Dr. Guido Kickelbick

Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Ducho  
Prof. Dr. Uli Kazmaier

Akad. Mitarbeiter: Dr. Josef Zapp

Vorsitz: Prof. Dr. Thorsten Lehr

Die vorliegende Arbeit wurde an der Universität des Saarlandes im Fachbereich Pharmazie im Arbeitskreis von Prof. Dr. Christian Ducho im Zeitraum von März 2015 bis September 2019 angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Christian Ducho  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Uli Kazmaier





# Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurde ein neuartiger Prodrug-Ansatz für einzelsträngige Oligonucleotide (ON) mit potenzieller Antisense-Aktivität entwickelt und untersucht. Die Ergebnisse dienen somit der Erforschung von modifizierten ONs mit therapeutischem Potenzial. Das Design der Prodrugs geht auf Erfolge in der Entwicklung von Phosphat-maskierten Pro-Mononucleotid-Analoga zurück.

Es konnten erfolgreich unterschiedliche Acyloxybenzyl-(AB)-Prodrug-Modellverbindungen (Dimere und Trimere) synthetisiert werden und diese *in vitro* detailliert auf ihre pharmakokinetischen Eigenschaften in biologischen Medien und enzymfreiem Puffer untersucht werden.

Darauf aufbauend war es möglich, die Synthese eines AB-modifizierten Thymidylat-Octamers unter außerordentlich milden Bedingungen in einer modifizierten automatisierten Festphasensynthese zu etablieren. Hierzu wurde ein photolabiler Linker für die Festphasensynthese nach teilweise literaturbekannter Synthese dargestellt und untersucht.

Erste Ansätze für die Synthese gemischter Basensequenzen lieferte die mild spaltbare Cyanoethoxycarbonyl-(Ceoc)-Schutzgruppe für die exocyclische Amino-Funktion der anderen drei Nucleobasen. Eine entsprechende dC<sup>PG</sup>-dT-Dimer-Modellverbindung wurde ebenfalls untersucht.

Somit wurden wichtige Grundlagen für die zukünftige Synthese biologisch aktiver ON-Prodrugs geschaffen.



## Abstract

In this thesis, a new approach towards single-stranded oligonucleotide (ON) prodrugs with potential antisense activity has been investigated. The results lay the foundation for investigating modified ONs with potential for therapeutic applications. The design of these prodrugs is based on the developments of phosphate-masked pro-mononucleotide analogues.

Several different acyloxybenzyl (AB) prodrug model compounds (dimers and trimers) were successfully synthesized and tested in vitro in biological media and enzyme-free phosphate buffer for their pharmacokinetic properties. Based on this, it was possible to establish the synthesis of an AB-modified thymidylate octamer under very mild conditions using a modified automated solid phase-supported synthesis. For this, a photolabile linker was prepared and investigated, partially following literature-known routes. First approaches towards the synthesis of mixed base sequences were based on the mildly cleavable cyanoethoxycarbonyl (Ceoc) protecting group for the exocyclic amino functionality of the other three nucleobases. An according dC<sup>PG</sup>-dT dimer model compound was also synthesized and investigated.

Overall, this work provides the foundation for the future synthesis of biologically active ON prodrugs.



# Danksagung

Im Besondern Danke ich Herrn Prof. Dr. Christian Ducho für die interessante Aufgabenstellung, die Möglichkeit meine Dissertation in seinem Arbeitskreis anzufertigen sowie für seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Zudem danke ich Herrn Prof. Dr. Uli Kazmaier für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Dr. Joseph Zapp möchte ich für die zuverlässige und schnelle Aufnahmen vieler NMR-Spektren danken und für die stete Bereitschaft, aus wenig Substanz viele Informationen herauszuschöpfen.

Weiterhin geht ein großer Dank an die aktuellen und ehemaligen Mitarbeiter des Arbeitskreises, die stets für gute Arbeitsatmosphäre gesorgt haben und mich sowohl fachlich als auch freundschaftlich unterstützt haben.

Des Weiteren danke ich meinen Praktikanten Christian Rohrbacher, Manuel Hawner und Ben Zoller für die angenehme Zusammenarbeit.

Insbesondere möchte ich mich bei Stefan Boettcher, Martina Jankowski und Stefanie Weck für die stete Unterstützung im Biolabor bedanken.

Für die viele Zeit, Hilfe und gemeinsame Begeisterung am DNA-Synthesizer und die gemeinsame Zeit in der Kleingruppe möchte ich Melissa Meng danken.

Außerdem geht ein großer Dank an Giuliana Niro und Stefanie Weck, mit denen das Betreuen des OC-Praktikums unglaublich viel Spaß gemacht hat und mit denen ich auch außerhalb der Uni eine schöne Zeit verbringen durfte.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinem langjährigen Lebenspartner Dr. André Schäfer für die Unterstützung während der Promotion und des gesamten Studiums bedanken. Danke, dass du immer an mich geglaubt hast!



## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Äq.	Äquivalente
brs	broad signal
Bu	Butyl
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
Cap A	THF:2,6-Lutidin:Essigsäureanhydrid = 8:1:1
Cap B	THF: <i>N</i> -Methylimidazol = 84:16
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
COSY	Correlation Spectroscopy (NMR)
CPG	Controlled Pore Glass
δ	chemische Verschiebung [ppm] (NMR)
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCI	4,5-Dicyanoimidazol
DCU	1,3-Dicyclohexylharnstoff
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTr	Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonucleinsäure
d.r.	diastereomeric ratio
EDC	1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimid
ESI	Elektronenspray-Ionisation (MS)
<i>et al.</i>	und Andere
EtOAc	Ethylacetat
G	Guanin
ges.	gesättigt

---

HMBC	heteronuclear multiple bond coherence (NMR)
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRMS	hochauflösende Massenspektrometrie
HSQC	heteronuclear single quantum coherence (NMR)
<i>J</i>	skalare Kopplungskonstante [Hz] (NMR)
LC	Flüssigkeitschromatographie
LCAA	long chain alkyl amine
LG	Leaving Group
M	Molar
m	Multipllett
Mod.	Modifikation
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
<i>o</i>	<i>ortho</i>
<i>p</i>	<i>para</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Petrolether (40/60)
pent	pentet
PG	Protecting Group
PLE	Schweineleber-Esterase
Pr	Propyl
ppm	parts per million
q	Quartett
quant.	quantitativ
R	Rest
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleinsäure
RP	Umkehrphase
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute-Medium
RT	Raumtemperatur

---

s	Singulett
SVPDE	Schlangengift-Phosphodiesterase
T	Thymin
t	Triplett
<i>t</i>	<i>tert</i>
<i>t</i> -BuOOH	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin
TMSE	Trimethylsilylethyl
$t_R$	Retentionszeit
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Kenntnisstand</b> .....	<b>7</b>
2.1	Das Antisense-Konzept.....	7
2.2	Nucleinsäure-Modifikationen.....	10
2.2.1	Modifikationen der (Desoxy-)Riboseeinheit.....	12
2.2.2	Modifikationen der Nucleobase.....	14
2.2.3	Modifikationen des Rückgrats .....	16
2.2.4	Fortgeschrittene Kombinationen von Modifikationen .....	25
2.3	Das Prodrug-Konzept für AONs.....	28
2.4	Automatisierte Festphasensynthese von Oligonucleotiden.....	34
<b>3</b>	<b>Zielsetzung und Planung der Arbeit</b> .....	<b>41</b>
3.1	Zielsetzung.....	41
3.2	Planung und retrosynthetische Betrachtungen .....	45
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>50</b>
4.1	Synthese und Untersuchungen von lipophil maskierten Di- und Trinucleotiden als Modellverbindungen.....	50
4.1.1	Synthese .....	50
4.1.2	<i>In-vitro</i> -Assays .....	61
4.2	Synthese und Untersuchungen einer festen Phase mit photolabilem Linker .....	73
4.3	Automatisierte Festphasensynthese eines T-Octamer-Prodrugs.....	87
4.4	Synthese einer C-T-Dimer-Modellverbindung .....	96
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>104</b>
<b>6</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>110</b>
<b>7</b>	<b>Experimentalteil</b> .....	<b>114</b>
7.1	Allgemeines .....	114
7.1.1	Allgemeine Arbeitsweisen .....	114
7.1.2	Edukte und Reagenzien.....	114
7.1.3	Lösungsmittel.....	114
7.1.4	Absolute Lösungsmittel.....	114
7.1.5	Chromatographie .....	115
7.1.6	Instrumentelle Analytik .....	118
7.2	Oligonucleotidsynthese .....	121
7.2.1	Reagenzien.....	121
7.2.2	Automatisierte Festphasensynthese .....	121
7.2.3	Abspaltung vom Träger.....	124
7.2.4	HPLC-Reinigung .....	124

7.2.5	Ausbeutenbestimmung.....	124
7.3	Gelelektrophorese.....	126
7.3.1	10 x TBE-Puffer.....	126
7.4	Pharmakokinetische in-vitro-Assays.....	127
7.4.1	Herstellung von Medien.....	127
7.4.2	Verwendete Puffer.....	128
7.4.3	Durchführung.....	130
7.5	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV).....	132
7.5.1	Synthese von 4-Acyloxybenzylalkoholen (AAV 1).....	132
7.5.2	Synthese von Phosphordiamiditen (AAV 2).....	132
7.5.3	Synthese von Phosphoramiditen (AAV 3).....	133
7.5.4	Synthese von maskierten Dinucleotiden (AAV 4).....	133
7.5.5	Dimethoxytrityl-Entschützung (AAV 5).....	134
7.5.6	Synthese von maskierten Trinucleotiden (AAV 6).....	134
7.5.7	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl-Entschützung (AAV 7).....	134
7.6	Synthesen.....	135
7.6.1	5'-O-Dimethoxytritylthymidin <b>32</b> .....	135
7.6.2	3',5'-Bis-O-( <i>tert</i> -butyldimethylsilyl)thymidin <b>42</b> .....	136
7.6.3	3'-O- <i>tert</i> -Butyldimethylsilylthymidin <b>43</b> .....	137
7.6.4	4-Acetoxybenzylalkohol <b>38a</b> .....	138
7.6.5	4-Pivaloyloxybenzylalkohol <b>38b</b> .....	139
7.6.6	4-Butyryloxybenzylalkohol <b>38c</b> .....	140
7.6.7	4-Acetyloxybenzylphosphordiamidit <b>29a</b> .....	141
7.6.8	4-Pivaloyloxybenzylphosphordiamidit <b>29b</b> .....	141
7.6.9	4-Butyryloxybenzylphosphordiamidit <b>29c</b> .....	142
7.6.10	5'-O-DMTr-thymidinylphosphoramidit <b>22a</b> .....	143
7.6.11	5'-O-DMTr-thymidinylphosphoramidit <b>22b</b> .....	144
7.6.12	5'-O-DMTr-thymidinylphosphoramidit <b>22c</b> .....	144
7.6.13	Geschütztes Dinucleotid-Prodrug <b>27a</b> .....	145
7.6.14	Geschütztes Dinucleotid-Prodrug <b>27b</b> .....	146
7.6.15	Geschütztes Dinucleotid-Prodrug <b>27c</b> .....	147
7.6.16	Geschütztes Dinucleotid-Phosphorthioat-Prodrug <b>27d</b> .....	149
7.6.17	Geschütztes Dinucleotid-Prodrug <b>26a</b> .....	150
7.6.18	Geschütztes Dinucleotid-Prodrug <b>26b</b> .....	151
7.6.19	Geschütztes Dinucleotid-Prodrug <b>26c</b> .....	153
7.6.20	Geschütztes Dinucleotid-Phosphorthioat-Prodrug <b>26d</b> .....	155
7.6.21	Geschütztes Trinucleotid-Prodrug <b>44a</b> .....	156
7.6.22	Geschütztes Trinucleotid-Prodrug <b>44b</b> .....	158
7.6.23	Geschütztes Trinucleotid-Prodrug <b>44c</b> .....	159
7.6.24	Geschütztes Trinucleotid-Prodrug <b>25a</b> .....	161
7.6.25	Geschütztes Trinucleotid-Prodrug <b>25b</b> .....	162

7.6.26	Geschütztes Trinucleotid-Prodrug <b>25c</b> .....	163
7.6.27	Dinucleotid-Prodrug <b>20a</b> und Referenzverbindung <b>20e</b> .....	164
7.6.28	Dinucleotid-Prodrug <b>20b</b> .....	167
7.6.29	Dinucleotid-Prodrug <b>20c</b> .....	169
7.6.30	Dinucleotid-Phosphorthioat-Prodrug <b>20d</b> .....	172
7.6.31	Referenzverbindungen <b>20ffast/20fslow</b> .....	174
7.6.32	Trinucleotid-Prodrug <b>21a</b> .....	176
7.6.33	Trinucleotid-Prodrug <b>21b</b> .....	178
7.6.34	Trinucleotid-Prodrug <b>21c</b> .....	180
7.6.35	Methyl-4-(4-formyl-2-methoxyphenoxy)butanoat <b>49</b> .....	181
7.6.36	4-(4-Formyl-2-methoxyphenoxy)buttersäure <b>50</b> .....	182
7.6.37	4-(4-Formyl-2-methoxy-5-nitrophenoxy)buttersäure <b>51</b> .....	184
7.6.38	2-(Trimethylsilyl)ethyl-4-(4-formyl-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoat <b>52</b> .....	185
7.6.39	2-(Trimethylsilyl)ethyl-4-(4-(hydroxymethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy)-butanoat <b>33</b> .....	186
7.6.40	2-(Trimethylsilyl)ethyl-4-(4-(brommethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy)-butanoat <b>53</b> .....	187
7.6.41	3- <i>N</i> -funktionalisiertes 5'-O-DMTr-Thymidin-Derivat <b>54</b> .....	188
7.6.42	Thymidin-abgeleitetes Carbamat <b>58</b> .....	189
7.6.43	Thymidin-abgeleitetes Carbonat <b>31</b> .....	191
7.6.44	Thymidin-abgeleitetes Carbonat <b>60</b> .....	193
7.6.45	Thymidin-abgeleitetes Carbonat <b>62</b> .....	194
7.6.46	Thymidin-beladener CPG-Träger <b>23</b> .....	196
7.6.47	2-Cyanoethylchlorformiat <b>65</b> .....	197
7.6.48	4- <i>N</i> -(2-Cyanoethyloxycarbonyl)-2'-desoxycytidin <b>68</b> .....	198
7.6.49	4- <i>N</i> -(2-Cyanoethyloxycarbonyl)-5'-O-DMTr-2'-desoxycytidin <b>69</b> .....	199
7.6.50	2'-Desoxycytidin-abgeleitetes Phosphoramidit <b>70</b> .....	201
7.6.51	Geschütztes C-T-Dinucleotid-Prodrug <b>71</b> .....	202
7.6.52	Geschütztes C-T-Dinucleotid <b>72</b> .....	204
7.6.53	Basen-entschütztes C-T-Dinucleotid-Prodrug <b>73</b> .....	205
	<b>Literatur</b> .....	<b>207</b>
	<b>Anhang</b> .....	<b>217</b>



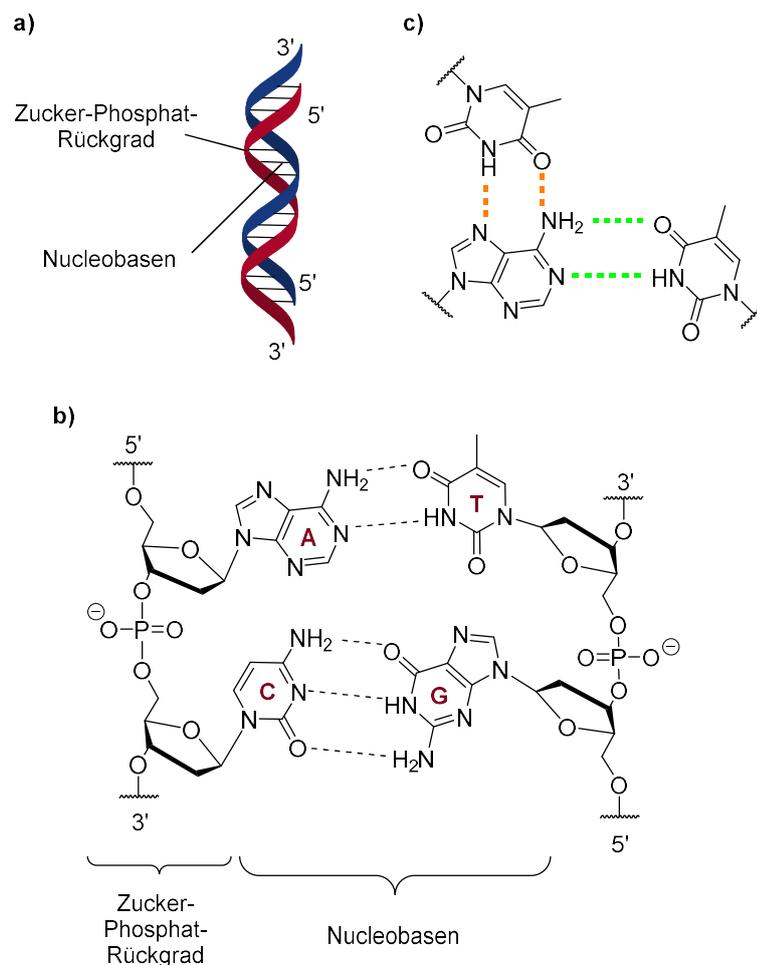
# 1 Einleitung

In der heutigen Zeit, in der die Lebenserwartung der Menschen stetig steigt, sind immer häufiger genetische und neurologische Krankheiten, Autoimmunerkrankungen, Krebs und virale Infektionen, die noch immer nicht heilbar sind, die Todesursache. Die World Health Organisation veröffentlichte im September 2018 einen Bericht über Krebs. In diesem wird berichtet, dass Krebs, häufig ausgelöst durch virale Infektionen wie Hepatitis B,<sup>[1]</sup> 2018 global gesehen die zweithäufigste Todesursache war und schätzungsweise 18.1 Millionen neue Fälle aufkamen und 9.6 Millionen Menschen an Krebs starben.<sup>[2]</sup>

Sowohl viralen oder bakteriellen Infektionen als auch Krebs liegt die Produktion körperfremder bzw. fehlerhafter Proteine zugrunde, die durch RNAs codiert werden, welche wiederum durch veränderte DNA produziert werden. In einem gesunden Organismus liegt ein Gleichgewicht zwischen Zellwachstum und Zelltod vor. Wenn aber, beispielsweise aufgrund von Fremd-DNA in den Zellen, Veränderungen im Genom existieren, kann das Gleichgewicht verschoben werden. Zum einen kann das Zellwachstum verstärkt angeregt werden, wie z.B. bei Krebs, oder zum anderen kann es zur Degeneration von z.B. Nervenzellen kommen, wie bei der Parkinson-Erkrankung. Bei Autoimmunerkrankungen hingegen wird das Immunsystem chronisch fehlreguliert und fälschlicherweise werden körpereigene, gesunde Zellen vom Immunsystem beschädigt und sogar zerstört.

Bereits vor über einem Jahrhundert begann die Erforschung der Zellen, ihrer Bestandteile und der intrazellulären Vorgänge. Im Jahre 1869 gelang es MIESCHER durch Zugabe von verdünnter Salzsäure zum Zellextrakt Biopolymere zu fällen, die er Nuclein nannte, da diese im Nucleus gefunden wurden.<sup>[3]</sup> Erst über 30 Jahre später gelang KOSSEL die Isolierung und Charakterisierung von vier Bausteinen und einem Zuckermolekül.<sup>[4,5]</sup> Zur selben Zeit benannte ALTMANN das Nuclein aufgrund seiner chemischen Eigenschaft Nucleinsäure und prägte diesen Begriff.<sup>[6]</sup> Des Weiteren gelang es LEVENE um 1930 die Bestandteile der sogenannten Nucleinsäure aus dem Nucleus zu charakterisieren. Dabei entdeckte er die Desoxyribose-Einheit, den Phosphorsäureester und die zwei Basen Thymin und Cytosin und nannte die Baueinheiten Nucleotid.<sup>[7]</sup> 1944 gelang es dann AVERY, MCLEOD und MCCARTY

nachzuweisen, dass nicht Proteine, sondern die Nucleinsäure die Speicher der Erbinformationen sind, wie bereits von MIESCHER postuliert worden war, und dass DNA bei der bakteriellen Transformation übertragen wird.<sup>[8]</sup> Den ersten Hinweis auf die Basenpaarung entdeckte CHARGAFF 1950, als er feststellte, dass das Stoffmengenverhältnis von Adenin (A) zu Thymin (T) und Cytosin (C) zu Guanin (G) innerhalb einer lebenden Spezies immer jeweils 1:1 beträgt.<sup>[9]</sup> Auf den Ergebnissen von FRANKLIN<sup>[10]</sup> basierend, die als erste Röntgenbeugungsmuster von zwei verschiedenen Formen der DNA ermittelte und damit den ersten Hinweis für die Helix-Form lieferte, veröffentlichten WATSON und CRICK 1953 ein Modell der dreidimensionalen Struktur der DNA-Doppelhelix für die rechtsgängige B-Helix (Abb. 1.1).<sup>[11]</sup> Die erste DNA-RNA-Hybridstruktur wurde erstmals 1960 von HALL und SPIEGELMAN erhalten.<sup>[12]</sup>



**Abb. 1.1:** a) DNA-Doppelhelix; b) Watson-Crick-Basenpaarung; c) Ausbildung einer Tripelhelix (grün: Watson-Crick-Basenpaarung, orange: Hoogsteen-Basenpaarung).

Zur selben Zeit stellte RICH fest, dass es sich bei der Hybridstruktur um eine DNA-ähnliche Doppelhelix handelt.<sup>[13]</sup> Eine Doppelhelix kann somit entweder aus komplementären DNA/DNA- oder DNA/RNA-Strängen aufgebaut sein. Darauf aufbauend wurde weiter an der Entschlüsselung der Informationsübertragung und der Biogenese von Proteinen ausgehend von der DNA geforscht.

Ein DNA-Einzelstrang ist somit aufgebaut aus dem Phosphat-Desoxyribose-Rückgrat und den vier Nucleobasen Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin (*Abb. 1.1*). Die Stabilität einer aus einem Sense- und Antisense-Strang aufgebauten Doppelhelix stammt aus den Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären AT- und GC-Basenpaarungen und von den  $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen den Basen, wenn sie übereinander „gestapelt“ werden (*Abb. 1.1*). In weiteren Untersuchungen wurde nach der Entdeckung der B-DNA-Struktur 1957 auch eine Tripelhelix im Nucleus entdeckt, die spontan aus Polynucleotidketten gebildet werden kann. 1979 wurde von WANG sogar eine linksgängige Z-Konformation der DNA beobachtet.<sup>[14]</sup> Die Erforschung der Proteinbiosynthese erfolgte bis dahin nur über natürlich vorkommende Nucleinsäuren. Erst um das Jahr 1970 wurde die festphasengestützte Synthese von Oligonucleotiden (ON) etabliert, die die Synthese von chemischen Analoga ermöglichte.<sup>[15]</sup> Diese Tatsache und der von STEPHENSON 1978 berichtete Befund, dass man durch Einschleusen definierter Nucleotidsequenzen in Zellen deren Proteinbiosynthese beeinflussen kann,<sup>[16]</sup> eröffneten großes Potenzial im Hinblick auf modifizierte ONs und deren Einsatz als Therapeutika.

Vor der Proteinbiosynthese werden im Nucleus bestimmte Abschnitte von DNA-Einzelsträngen als RNA kopiert (Transkription). Diese Kopien werden messenger-RNAs (mRNA) genannt. Verlässt die mRNA den Nucleus und gelangt ins Cytoplasma, dient sie dort dem Ribosom als Vorlage für die Synthese bestimmter Proteine (Translation). Drei aufeinanderfolgende Nucleotide stellen immer ein Codon dar und aus einer mRNA können  $10^2 - 10^4$  Proteine translatiert werden.<sup>[17]</sup> Die meisten herkömmlichen Medikamente greifen Proteine direkt an, was jedoch eine hohe Wirkstoffkonzentration zur Folge hat und damit die Gefahr unerwünschter Nebenwirkungen erhöht. Um die Konzentration und Nebenwirkungen verringern zu können, bieten ONs eine

mögliche Alternative als Wirkstoff, aufgrund ihrer Fähigkeit sequenzspezifisch an endogene Nucleotidsequenzen zu binden.<sup>[18]</sup> In der Antigen-therapie wird davon ausgegangen, dass exogene ONs über die Hoogsteen-Basenpaarung (*Abb. 1.1*) Tripelhelices mit DNA-Doppelsträngen im Nucleus bilden und damit die Transkription unterbinden.<sup>[19]</sup> Außerdem besteht die Möglichkeit mit einem exogenen ON nach dem Antisense-Mechanismus die Proteinbiosynthese zu inhibieren, indem die Translation unterbunden wird.<sup>[20]</sup> Hierbei wird ein DNA-Einzelstrang in die Zelle eingeschleust, um mit der mRNA sequenzspezifisch ein DNA/RNA-Hybrid zu bilden. Dadurch findet zum einen eine sterische Hinderung der Translation statt und zum anderen wird der RNA-Strang durch RNase H abgebaut. Ein weiterer Ansatz für den Einsatz von ONs ist der Gebrauch von doppelsträngiger RNA in der Genregulation auf Basis der Entdeckung der RNA-Interferenz (RNAi) durch FIRE und MELLO.<sup>[21]</sup> Bei diesem Vorgang wird die Inhibierung der Expression der mRNA durch einen RNA-induced-silencing complex (RISC) durchgeführt. Endogene microRNAs (miRNA) bilden hierbei mit dem RISC einen RNA-RISC-Komplex, der eine sequenzspezifische mRNA zerstört. Die exogene, kurze interferierende RNA (small interfering RNA, siRNA) ist der zellulären miRNA sehr ähnlich und kann ebenfalls einen RNA-RISC-Komplex ausbilden und somit die mRNA spalten.<sup>[22]</sup> Derartige Stummschaltungen von Genen durch RNAi gehören heutzutage zur Routine und helfen bei der Genfunktionsanalyse.<sup>[23]</sup>

Es gibt somit mehrere Möglichkeiten, durch Verwendung eines exogenen ONs mit spezifischer Basensequenz eine bestimmte Genexpression gezielt zu beeinflussen und zu inhibieren. Die notwendige Selektivität für humane Zellen wird bei Verwendung von 15-20 Nucleotide-langen ON-Einzelsträngen erreicht. Der große Vorteil der exogenen ONs ist deren katalytische Wirkung. Sie unterstützen die Spaltung einer RNA, werden aber selbst nicht angegriffen und können somit weitere DNA/RNA-Bindungen eingehen. Jedoch gibt es auch einige Hürden. Die exogenen, nativen ONs weisen mangelhafte Zellaufnahme und geringe Nuclease-Stabilität (Halbwertszeit ca. 5 min in humanem Serum.) auf.<sup>[24]</sup> Deswegen sind chemische Modifikationen unausweichlich.

Es befinden sich bereits viele Antisense-Therapeutika in klinischen Studien und zwei wurden bereits von der FDA (Food and Drug Administration) zugelassen. Hierbei handelt es sich zum einen um Fomivirsen (Vitravene®), ein 21mer-

Antisense-DNA-Phosphorthioat-Oligonucleotid. Es wird als Virostatikum zur Behandlung von Infektionen mit dem Cytomegalievirus (CMV) bei Immundefizienz (z.B. AIDS) eingesetzt. Jedoch ist die Injektion des Wirkstoffs durch den Glaskörper des Auges sehr unangenehm und nachteilig. Zum anderen handelt es sich um Mipomersen (Kynamro<sup>®</sup>), ein 20mer-Antisense-DNA-Phosphorthioat-Oligonucleotid mit 2'-Modifikationen. Es kommt bei der erblichen familiären Hypercholesterinämie zum Einsatz, hat jedoch starke Leberschäden als Nebenwirkung.<sup>[25]</sup>

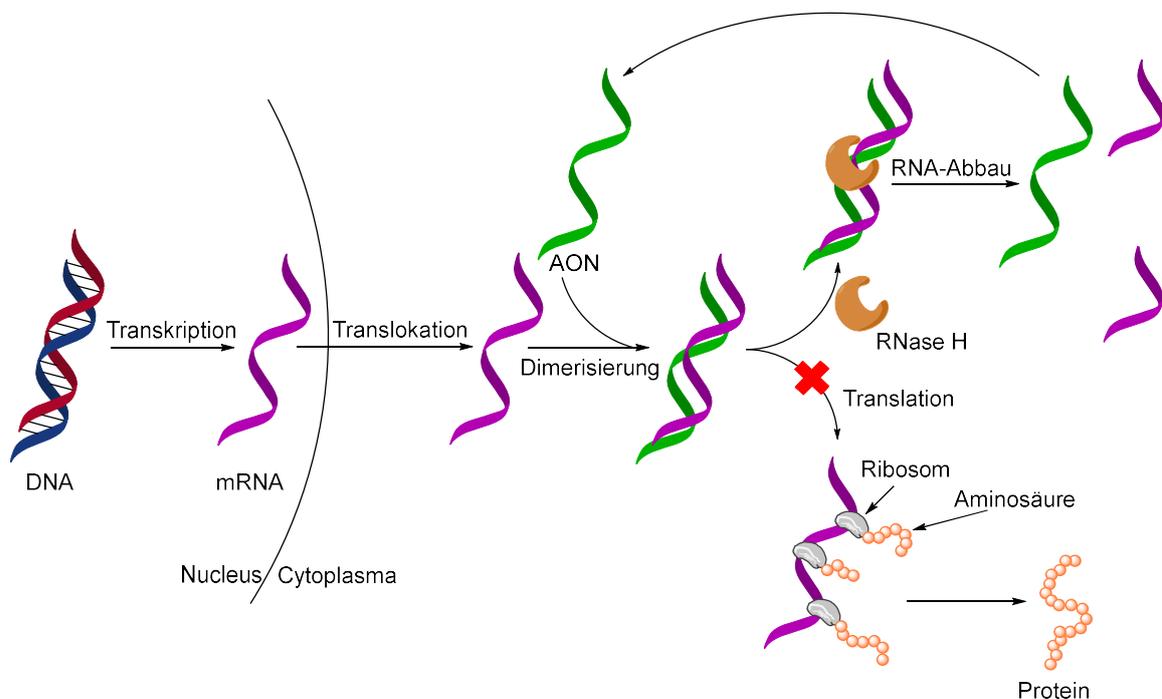
Trotz der Nebenwirkungen dieser Art der Medikation ist die Anzahl an modifizierten ONs für klinische Testungen rapide gestiegen. Es gibt viele verschiedene Möglichkeiten für chemische Modifikationen: am Zucker, am Rückgrat oder auch an der Nucleobase. Unabhängig davon sind wichtige Voraussetzungen, dass eine doppelhelikale Struktur infolge stabiler Hybridisierung weiterhin ausgebildet werden kann, und dass das Rückgrat weiterhin isoster zur RNA ist.



## 2 Kenntnisstand

### 2.1 Das Antisense-Konzept

ON-basierte Antisense-Anwendungen repräsentieren eine vielversprechende und wichtige Errungenschaft im Hinblick auf das Design neuer Wirkstoffe. Die Besonderheit dieses Ansatzes liegt in der Fähigkeit der Antisense-Oligonucleotide (AON) die Proteinbiosynthese auf der Ebene der Translation effektiv zu inhibieren. Wie bereits beschrieben legten ZAMECNIK und STEPHENSON<sup>[16]</sup> den Grundstein für dieses Konzept, indem sie als erste zeigten, dass synthetische Oligonucleotide Antisense-Effekte aufweisen können. Sie identifizierten eine sich wiederholende Sequenz von 21 Nucleotiden, die sich als entscheidend für die Bildung eines Komplexes mit der Nucleotid-Sequenz vom 5'- und 3'-Ende des 35S RNA Rous Sarcoma Virus gezeigt hatte. Dazu synthetisierten sie ein 13-mer-ON, das komplementär zu einem Teil der viralen Sequenz war. Infolge dessen wurde eine Inhibition des Viruswachstums beobachtet, wenn das ON zu kultivierten Fibroblasten gegeben wurde. Dies war offensichtlich durch die Hybridisierung der viralen RNA (Sense-Strang) mit der synthetischen DNA (Antisense-Strang) begründet.<sup>[16]</sup>



**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von Antisense-Oligonucleotiden.

In *Abb. 2.1* ist der Eingriff eines exogenen Antisense-ON (AON) in die Proteinbiosynthese der Zelle schematisch dargestellt. Die mRNA, das Target des Antisense-Ansatzes, wird im Zellkern durch Transkription der DNA und anschließender Reifung erhalten. Während dieser Reifung wird zum einen am 5'-Ende ein 7-Methylguanylattriphosphat angehängt (Capping) und zum anderen findet am 3'-Ende eine Polyadenylierung statt. Es wird angenommen, dass das Capping und die Poly(A)-Kette vor enzymatischem Abbau schützt und den Transport der mRNA aus dem Zellkern in das Cytoplasma unterstützt.<sup>[26]</sup> Die Unterdrückung der Transkription durch Tripelhelixbildung der DNA mit einem exogenen ON zählt definitionsgemäß nicht zu den Antisense-Konzepten, da keine RNA involviert ist, sondern zu dem Antigen-Konzept. Durch AONs, die komplementär zur mRNA im Cytoplasma sind, lässt sich die Proteinbiosynthese durch sterische Behinderung des ribosomalen Komplexes verhindern (*Abb. 2.1*). Außerdem ist neben der Sterik auch die Aktivierung des Enzyms RNase H ein vielversprechender Ansatz bei der Antisense-Wirkungsweise. Die gebildeten RNA/DNA-Hybride werden von der RNase H erkannt und Phosphatdiesterbindungen der Sense-RNA werden gespalten, während die Antisense-DNA nicht angegriffen wird. Somit kann der Antisense-DNA-Strang erneut freigesetzt werden und mit weiteren mRNA-Strängen hybridisieren. Im weiteren Sinne liegt daher eine Art „katalytische“ Wirkung vor, was einen positiven Effekt auf die benötigte Wirkstoffmenge hat, da diese gering gehalten werden kann. Wie bereits oben erwähnt, haben handelsübliche Medikamente größtenteils eine Wirkung direkt auf Proteine, wohingegen bei dem Einsatz von AONs die spezifische Sequenz einer Ziel-RNA angegriffen wird. Es ist daher notwendig, auf ausreichende Spezifität und Selektivität sowie auf Sterik zu achten, damit eine Duplexbildung stattfinden kann. Außerdem ist von Bedeutung, dass die AON-Sequenz nicht selbstkomplementär ist oder andere unspezifische Wechselwirkungen eingehen kann. Als prominentes Problem sind hierbei G-Quadruplexe zu nennen. Diese Quadruplexe bilden sich aus, wenn in Nucleinsäuren-Sequenzen vier Abfolgen von mindestens zwei Guanin-Nucleobasen vorliegen. Dabei ordnen sich vier Basen in einer Ebene an. Diese planaren Ebenen können durch  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen einen Stapel bilden und formen so die G-Quadruplexe. Während die Doppelhelix durch Watson-Crick-Basenpaarungen zustande kommt, werden G-Quadruplexe durch Hoogsteen-

Wechselwirkungen stabilisiert.<sup>[27,28]</sup> Ein weiteres Problem liegt im unterschiedlichen Aufbau von viraler DNA (so genannte CpG-Motive) im Vergleich zur humanen DNA. Das im Vergleich zur eukaryotischen DNA gehäufte Vorkommen des CpG-Dinucleotids ermöglicht es dem Immunsystem potenzielle Krankheitserreger aufgrund ihrer DNA-Struktur zu erkennen. Im Genom von Bakterien und Viren sind CpG-Motive nichtmethylierte Cytidin-Guanosin-Dinucleotide, wohingegen bei Wirbeltieren das Cytosin der CpG-Motive bis zu 90% in methylierter Form vorliegt. Synthetische Oligonucleotide, die solche CpG-Motive enthalten, imitieren die Anwesenheit von mikrobieller DNA und induzieren ein charakteristisches Aktivierungsmuster von Immunzellen.<sup>[29]</sup>

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Länge eines AONs, die optimal bei 15 bis 20 Basen liegt.<sup>[17]</sup> Bei kürzeren AONs nimmt die Spezifität ab und bei längeren Analoga übt der verringerte Einfluss von Basenfehlpaarungen auf die Bindungsenthalpie einen selektivitätssenkenden Effekt aus. Um die Bindungsaffinität eines DNA/RNA-Hybriden zu bestimmen, wird der  $T_m$ -Wert (Schmelzpunkt) bestimmt. Dieser gibt die Temperatur an, bei der die Hälfte eines Doppelstranges in die verknäuelten Einzelstrangzustände übergegangen ist. Die am häufigsten verwendete, experimentelle Methode zur Bestimmung eines  $T_m$ -Wertes ist die Messung der Absorptionsänderung ( $\lambda = 260 \text{ nm}$ ) von Oligonucleotiden mit einem komplementären Strang als eine Funktion der Temperatur. Der  $T_m$  entspricht der Temperatur am Mittelpunkt der S-förmigen Kurve zwischen den Temperaturplateaus der doppelsträngigen Nucleinsäure und der einzelsträngigen Form. Außerdem gibt es Methoden, um einen  $T_m$ -Wert zu kalkulieren. Hierzu zählt zum einen die Gleichung von WALLACE aus dem Jahre 1979, die eine Näherung des  $T_m$ -Wertes jedoch nur für DNA-Duplices angibt.<sup>[30]</sup> Für einen DNA/RNA-Hybrid dient vorrangig die Nearest-Neighbors-Methode aus dem Jahre 1986, bei der es sich um die exakteste Methode handelt und die auch die Thermodynamik miteinbezieht.<sup>[31]</sup> Dieser Methode zufolge muss ein Oligonucleotid mindestens 15 Basen lang sein, um eine bei über  $37^\circ\text{C}$ , also bei annähernder Körpertemperatur, stabile Duplex ausbilden zu können. Dies wiederum ist von hoher Relevanz für das Design eines AONs, da der Antisense-Mechanismus nur funktioniert, wenn ein Doppelstrang mit der Target-mRNA ausgebildet werden kann.

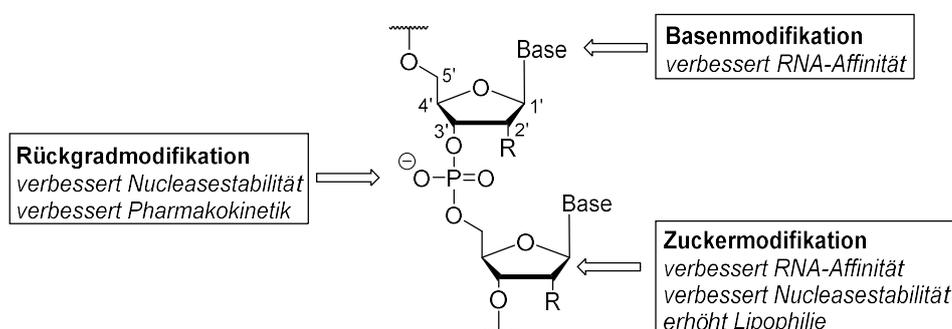
## 2.2 Nucleinsäure-Modifikationen

Genauso wichtig wie eine geeignete Sequenz zu finden ist ein geeignetes pharmakokinetisches Profil, damit die AON die Zellwand penetrieren können und das Cytoplasma erreichen.

Zellmembranen bestehen nicht nur aus Phospholipid-Molekülen, die die Phospholipid-Doppelschicht ausbilden, sondern auch aus verschiedenen Membranproteinen, die den aktiven Transport bestimmter Substanzen ermöglichen. Diese Proteine und artifizielle Systeme wie zellpenetrierende Peptide (CPPs)<sup>[32]</sup> spielen für diese Arbeit jedoch keine Rolle, da der Schwerpunkt auf der eigenständigen Zellwand-Penetrierung von AONs liegt.

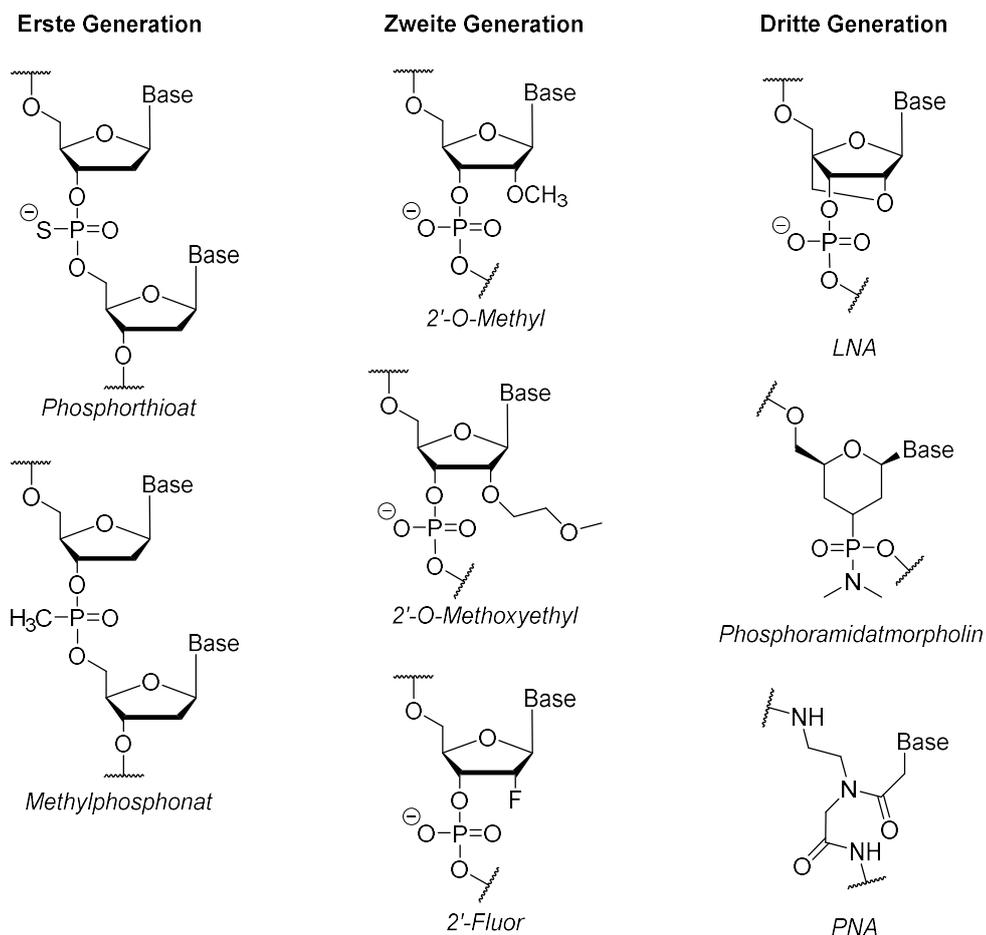
Native Oligonucleotide weisen aufgrund hoher Polarität, vor allem erzeugt durch das negativ geladene Rückgrat, zum einen eine niedrige *in-vivo*-Stabilität und so gut wie keine Zellgängigkeit auf und zum anderen sind Verteilung und Resorption stark eingeschränkt. Diese Probleme können unter anderem durch strukturelle Modifikationen gelöst werden. Modifikationen der nativen DNA-Struktur sind für *in-vivo*-Anwendungen von AONs zwingende Voraussetzung, insbesondere wegen der oben beschriebenen kurzen Lebensdauer z.B. aufgrund des schnellen enzymatischen Abbaus durch Nucleasen.

Es existieren bereits viele verschiedene Formen von Modifikationen, die in vier Kategorien (Abb. 2.2) eingeteilt werden können: Modifikation der Nucleobasen, der Riboseeinheit, des Phosphatrückgrates und fortgeschrittene Kombinationen.<sup>[25]</sup>



**Abb. 2.2:** Möglichkeiten zur strukturellen Modifikation eines ON.

Wichtige Entdeckungen bis hin zur heutigen Zeit waren unter anderem die 2'-Fluorsubstitution aus dem Jahre 1964, die bald darauf folgende Phosphorthioat-Modifikation aus dem Jahre 1966, die Synthese der Peptid-Nucleinsäuren (PNAs) aus dem Jahre 1990 sowie die der Locked-Nucleinsäuren (LNAs) aus dem Jahre 1998.<sup>[33]</sup>



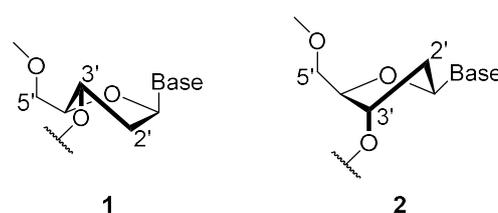
**Abb. 2.3:** Überblick verschiedener Modifikationen unterschiedlicher Generationen von AONs.

Des Weiteren können die verschiedenen Entwicklungsstufen der Modifikationen in Generationen unterteilt werden (*Abb. 2.3*). Bei der ersten Generation handelt es sich um Modifizierungen an der Phosphat-Einheit, bei der zweiten Generation um Modifizierungen an der 2'-Position der Ribose-Einheit und bei der dritten Generation handelt es sich um Modifizierungen, die die Zucker-Phosphat-Einheit ersetzen bzw. an mindestens zwei Positionen parallel modifizieren. Das bekannteste AON der ersten Generation ist Vitravene, ein Phosphorthioat-ON mit der Sequenz 5'-GCG TTT GCT CTT CTT CTT GCG-3'. Das bekannteste AON der

zweiten Generation ist Kynamro, ebenfalls ein Phosphorthioat-ON. Außerdem handelt es sich bei Kynamro um ein Gapmer, was bedeutet, dass eine 2'-O-Methoxyethyl-Modifikation (*Abb. 2.3*) nur an den äußeren Nucleotiden (je fünf am 3'- und am 5'-Ende) vorliegt. Die Sequenz lautet 5'-GCCUC dAdGdTdCsTdGdCdTdTdC GCACC-3'. Bei beiden Medikamenten handelt es sich um AONs, die durch die Food and Drug Administration (FDA) zugelassen wurden.

### 2.2.1 Modifikationen der (Desoxy-)Riboseeinheit

Eine Modifikation der Riboseeinheit bewirkt unter anderem Veränderungen in der Lipophilie der Oligonucleotide, wodurch Löslichkeit und Zellgängigkeit angepasst werden können. Darüber hinaus haben diese Modifikationen aufgrund der konformationellen Flexibilität der (Desoxy-)Riboseeinheit einen Effekt auf die Ausbildung stabiler Duplices. Es gibt fünf mögliche Konformationen der Riboseeinheit, von denen zwei energetisch bevorzugt sind (*Abb. 2.4*). Hierbei handelt es sich um die C3'-*endo*-Form (**1**) und die C2'-*endo*-Form (**2**), wobei **2** in der B-DNA, deren Nucleobasen orthogonal zur Helixachse ausgerichtet sind, vorkommt und **1** in der A-DNA, deren Nucleobasen nicht orthogonal zur Helixachse ausgerichtet sind, und in der RNA vorkommt.<sup>[34]</sup>



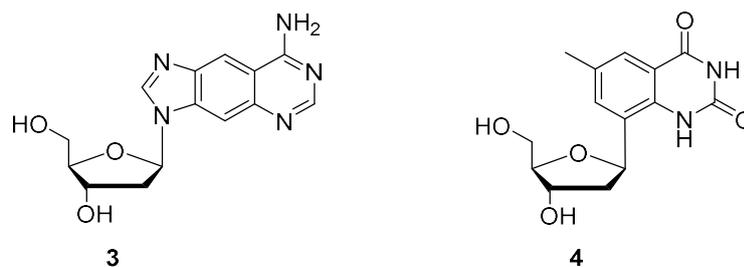
**Abb. 2.4:** Bevorzugte Konformationen der Riboseeinheit; **1**: C3'-*endo*; **2**: C2'-*endo*.

Positionen, an denen in der Riboseeinheit bei Erhalt der Grundstruktur Modifikationen vorgenommen werden, sind die 2'-Position und die 4'-Position und die Verknüpfung dieser Positionen durch Einführung verbrückter Ringsysteme (*Abb. 2.3*). Eine Veränderung der 4'-Position durch Substitution des Sauerstoffatoms mit Schwefel oder Selen führt zu der Bevorzugung der C2'-*endo*-Konformation. Dadurch wird die B-helikale Struktur favorisiert.<sup>[35,36]</sup> Des Weiteren

liegt bei partieller Substitution eines Stranges eine höhere Stabilität bei der Ausbildung von Doppelhelices mit RNA-Gegensträngen und eine geringere mit DNA-Gegensträngen vor.<sup>[35,37]</sup> Eine häufige Modifikation an der 2'-Position ist die Einführung einer 2'-O-Methylgruppe, die ein Beispiel für AONs der zweiten Generation ist (Abb. 2.3). Sie kommt nativ auch in tRNA, rRNA und snRNA vor. Aufgrund der erhöhten Elektronegativität des Substituenten, wie auch im Fall von 2'-Desoxy-2'-fluor-Analoga wird die Duplexstabilität mit RNAs verbessert (ca. 0.5-1.0 °C pro Modifikation), da die Substituenten durch stereoelektronische Effekte die C3'-*endo*-Konformation stabilisieren und somit die A-Helix-Struktur gebildet wird.<sup>[38]</sup> Um die Lipophilie zu erhöhen, können ebenfalls O-Alkyl-, O-Allyl-, Alkyl- und Allyl-Substituenten verwendet werden. Dabei konnte beobachtet werden, dass bei Verlängerung der Alkyl- bzw. Allylkette die Duplexstabilität aufgrund eines erhöhten sterischen Anspruchs wieder sinkt.<sup>[38]</sup> Bei Verwendung von positiv geladenen O-Aminoalkylgruppen wurde die Bildung von Tripel-Helices beobachtet, die durch Wechselwirkungen zwischen der protonierten Aminogruppe und dem anionischen Phosphatrückgrat gebildet werden.<sup>[39]</sup> Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Duplexstabilität besteht in einer konformativen Einschränkung der Riboseeinheit, indem ein verbrücktes Ringsystem eingeführt wird (Abb. 2.3). Dieses Ringsystem wird durch eine Verknüpfung zwischen 2'-C und 4'-C auf der  $\alpha$ -Seite ausgebildet, was zu einer Fixierung der Riboseeinheit in der C3'-*endo*-Konformation führt. Die so gebildeten bicyclischen Strukturen wurden von WENGEL<sup>[40,41]</sup> und IMANISHI<sup>[42]</sup> zeitgleich, jedoch unabhängig voneinander entwickelt und werden als LNA (locked nucleic acid) bezeichnet. WENGEL beobachtete eine Erhöhung der Duplexstabilität und eine erhöhte Nucleasestabilität, jedoch gingen diese Beobachtungen mit einer fehlenden RNase H-Aktivität einher.<sup>[41]</sup>

## 2.2.2 Modifikationen der Nucleobase

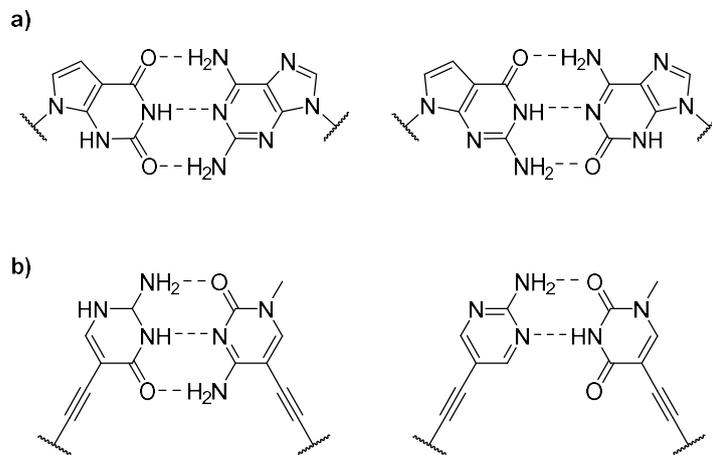
Modifizierungen an der Nucleobase dienen zum einen zur Verbesserung der Bindungsspezifität und -affinität zur endogenen Zielnucleinsäure und zum anderen zur Beeinflussung der Nucleasestabilität. Als strukturstabilisierende Kräfte zur Bildung einer stabilen Doppelhelix dienen sowohl die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren als auch die  $\pi$ -Stapelkräfte, die zwischen den aufeinandergestapelten Basenpaaren entlang der Spiralachse wirken. Eine Vergrößerung des  $\pi$ -Elektronensystems sollte sich demnach positiv auf die Stapelkräfte auswirken und damit die Duplexstabilität erhöhen. Jedoch ist ebenfalls eine Verzerrung der Helixstruktur aufgrund des erhöhten sterischen Anspruchs zu erwarten, was eine Destabilisierung zur Folge hätte.



**Abb. 2.5:** Analoga von 2'-Desoxyadenosin (**3**) bzw. -thymidin (**4**) mit vergrößerten Nucleobasen.

Um den Einfluss der jeweiligen Kräfte zu überprüfen, wurden modifizierte DNA-Stränge synthetisiert, die Derivate von 2'-Desoxyadnosin **3** bzw. -thymidin **4** beinhalteten und jeweils um einen Benzolring erweitert wurden (*Abb. 2.5*).<sup>[43]</sup> Bei der Verwendung vereinzelter Modifikationen in artifiziiellen Doppelhelices wurde eine Destabilisierung der Duplex festgestellt. Wird aber eine zehnbasenpaar lange Doppelhelix nur aus den modifizierten Derivaten aufgebaut, weist dieser Doppelstrang eine höhere thermische Stabilität ( $\Delta T_m = +3.4$  bis  $+5$  °C/Modifikation) als die native Watson-Crick-Helix auf. Der Abstand der gegenüberliegenden Desoxyriboseeinheiten vergrößert sich hierbei um ca. 2 Å im Vergleich zur nativen B-Helix.<sup>[43]</sup> Damit wurde bewiesen, dass es möglich ist, trotz vergrößerter Nucleobasen eine stabile Doppelhelix auszubilden, und dass insofern die Größenparameter bekannter Helices keine beschränkten Faktoren sind. Auf diesen Ergebnissen aufbauend beschäftigten sich 2008 HEUBERGER und

SWITZER mit artifizien, genetischen Systemen, die in ihrem Fall nur Purinbasen (Abb. 2.6) enthielten.<sup>[44]</sup>



**Abb. 2.6:** Paarung von a) vier nicht-nativen Purinbasen und b) nicht-nativen Pyrimidinbasen.

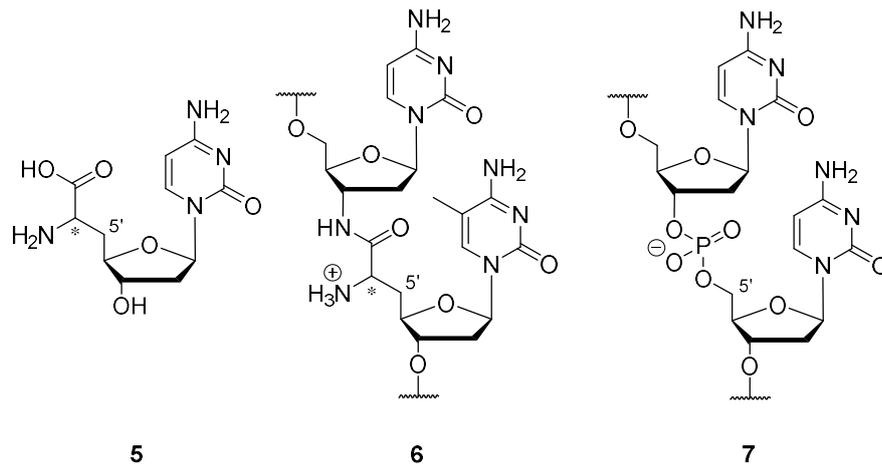
Das Ziel war es, HOOGSTEEN-Basenpaarungen und damit einhergehende Triplices zu unterbinden, indem die Positionen für Wasserstoffbrückenbindungen bereits blockiert vorliegen. Die synthetischen Purin-Purin-DNA-Doppelhelices zeigten eine vergleichbare Stabilität wie native DNA. In einigen Fällen traten jedoch Selbstassoziation und Ausbildung von Strukturen höherer Ordnung auf.<sup>[44]</sup> Ebenfalls 2008 beschäftigte sich INOUE mit artifizierlicher DNA, die aus nicht-nativen Pyrimidinbasen aufgebaut war (Abb. 2.6).<sup>[45]</sup> In diesem Fall wurden die Basen über eine Acetylen-Brücke mit der Desoxyriboseeinheit verbunden. Eine derartige artifizierliche DNA bildet mit der ihr komplementären, ebenfalls artifizierlichen DNA rechtsgängige Duplices und Triplices. Die resultierenden Duplices zeigten annähernd vergleichbare thermische Stabilität wie native Duplices. Die relative Stabilität der Duplices sank dabei in der folgenden Reihenfolge:  $d(\text{G}_{\text{artifizierlich}}/\text{C}_{\text{artifizierlich}})_n > d(\text{G}_{\text{kanonisch}}/\text{C}_{\text{kanonisch}})_n > d(\text{G}_{\text{artifizierlich}}/\text{C}_{\text{kanonisch}})_n$  (mit  $n = 6, 8, 10$ ).<sup>[45]</sup> Des Weiteren wurden verschiedene Substituenten an verschiedene Positionen der Nucleobasen eingeführt und es wurde festgestellt, dass sowohl die Wahl des Substituenten als auch die der Position Auswirkungen auf die Duplexstabilität haben. FREIER und ALTMANN untersuchten unter anderem die 5-Position des Thymins und stellten fest, dass Halogene als Substituenten keinen Einfluss auf die Stabilität bewirkten, wohingegen eine Propinyl-Gruppe die Stabilität der Duplices erhöhte (bis zu  $+2.6^\circ\text{C}/\text{Modifikation}$ ).<sup>[38]</sup> Es existieren noch

viele weitere Modifikationen an der Nucleobase, die jedoch bezogen auf diese Arbeit nur vergleichsweise geringe Relevanz haben und daher nicht näher erklärt werden sollen.

### 2.2.3 Modifikationen des Rückgrats

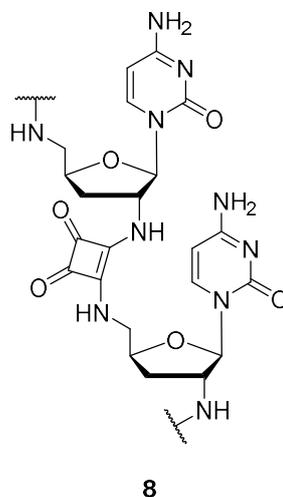
Die Phosphatdiester-Einheit dient der Verknüpfung der Nucleoside sowohl in der DNA als auch in der RNA und bildet somit zusammen mit der Ribose-Einheit deren Rückgrat. Native ON sind aufgrund der hohen Acidität der Phosphatdiester polyanionisch. Die in den Zellen vorliegenden Natrium-, Kalium- und Magnesiumionen schirmen die negative Ladung ab, sodass die intrahelikale, repulsive Wechselwirkung eines DNA-Doppelstranges oder eines DNA-RNA-Hybrids herabgesetzt wird. Des Weiteren findet eine Repulsion zwischen dem elektronegativen Rückgrat und Nucleophilen statt. Dies führt zu einer Stabilisierung von Einzel- und Doppelsträngen gegenüber unkatalysierten Hydrolysereaktionen.<sup>[46]</sup>

Zur Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften von exogenen ON kann das Phosphatrückgrat vollständig oder auch nur zum Teil modifiziert werden. Diese Modifikationen können die Nucleasestabilität erhöhen und aufgrund von Ladungsveränderungen sowie einer Erhöhung der Lipophilie die Membrangängigkeit erheblich verbessern. Als bedeutende Beispiele hierfür sind die anionische Phosphorthioat- und die elektroneutrale Methylphosphonat-Modifikation zu nennen (*Abb. 2.3*). Kationische Modifikationen, die zur Einführung zwitterionischer Strukturen dienen, sind bisher nur wenig erforscht. Hier ist die vor kurzem im Arbeitskreis DUCHO entwickelte Nucleosylaminosäure-(NAA)-Modifikation zu nennen.<sup>[47]</sup> Hierbei ist das 2'-Desoxynucleosid über die 5'-Position mit einer Glycin-Einheit über deren  $\alpha$ -C-Atom verbunden und ist somit nach Kondensation mit einem 3'-Aminonucleosid isoster zur Phosphatdiester-Einheit (*Abb. 2.7*). Der Unterschied zur nativen anionischen DNA besteht darin, dass die NAA-Internucleosidbrücke durch ihr freies Amin bei physiologischem pH-Wert positiv geladen ist.



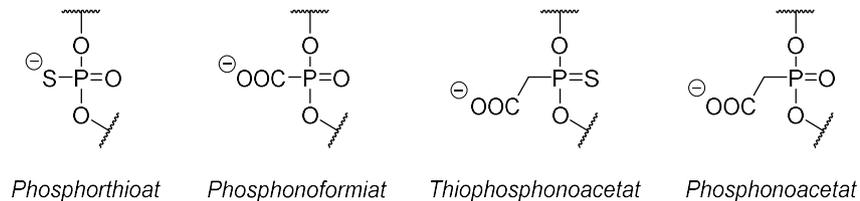
**Abb. 2.7:** Nucleosylaminosäure (5); Vergleich von eingebauter NAA-Modifikation (6) mit nativer DNA (7).

Ein wichtiger Aspekt, der bei der Modifikation des Rückgrats zu beachten ist, ist die Isosterie zur nativen Struktur des Rückgrats. Eine Verlängerung oder Verkürzung der Verbrückungseinheit würde eine Verzerrung der Doppelhelix-Struktur bewirken, da die Geometrie der Basenpaarung gestört werden könnte. Diese Verzerrung hätte eine Verringerung der thermischen Stabilität der Duplexstruktur eines ON mit einem DNA- oder RNA-Strang zur Folge. Ein literaturbekanntes Beispiel hierfür ist u.a. die 2',5'-Squaryldiamid-Verknüpfung **8** (Abb. 2.8).<sup>[48]</sup> Bei dieser liegt ein artifizielles verzerrtes Rückgrat vor, was zu einer Destabilisierung der Duplices führt ( $\Delta T_m = -15.3 \text{ }^\circ\text{C/Mod.}$ ).<sup>[48]</sup> Dies lässt sich durch die planare Struktur und die eingeschränkte Rotationsfreiheit aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters der N-C-Bindung erklären.



**Abb. 2.8:** 2',5'-Squaryl-diamid-Modifikation.

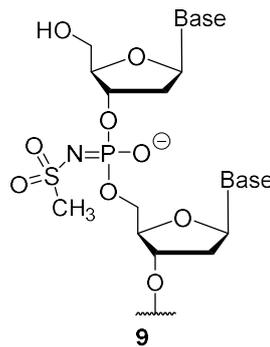
Um die Topologie der nativen Nucleinsäure beizubehalten, wurden erste Modifikationsansätze so gewählt, dass nur geringfügige Unterschiede vorlagen. Ein weiterer Punkt war zudem die negative Ladung zu erhalten. Beispiele für literaturbekannte anionische Rückgratmodifikationen sind in *Abb. 2.9* dargestellt.



**Abb. 2.9:** Anionische Rückgratmodifikationen.

Die schon zuvor erwähnte Phosphorthioat-Modifikation (*Abb. 2.9*), bei der ein Sauerstoffatom durch ein Schwefelatom substituiert ist, wurde bereits Ende der 1960er Jahre von ECKSTEIN entwickelt und in den darauffolgenden Jahrzehnten eingehend untersucht.<sup>[49]</sup> Sie ist auch in der heutigen medizinischen Forschung von großer Bedeutung, da sie sowohl eine erhöhte Stabilität gegenüber endogenen Nucleasen bewirkt als auch den Abbau der RNA-Zielsequenzen durch RNase H unterstützt.<sup>[50]</sup> Wie ebenfalls schon erwähnt ist der Wirkstoff Formivirsen (Vitravene®) von der Firma Novartis ein Antisense-Virostatikum, das aus Phosphorthioaten aufgebaut ist. Bemerkenswert ist hierbei die Tatsache, dass aufgrund des stereogenen Charakters des Phosphoratoms zwei stereoisomere Verbrückungen möglich sind und die unisomeren Stränge sich unterschiedlich verhalten. Die aus  $S_P$ -Phosphorthioaten aufgebauten ONs bilden mit entsprechenden RNA-Strängen weniger stabile Duplices als mit diastereomeren ONs, die aus  $R_P$ -Phosphorthioaten aufgebaut sind ( $T_m$ -Differenz von 2.4 °C).<sup>[51]</sup> NERENBERG verglich 1994 die unterschiedlichen Eigenschaften von durchgehend Phosphorthioat-modifizierten ONs mit denen, die einzig am 3'-Ende eine terminale Phosphorthioatgruppe trugen.<sup>[52]</sup> Unter anderem wurde festgestellt, dass durchgehend Phosphorthioat-modifizierte ONs zwar den Vorteil haben, dass sie besser RNase H aktivieren, jedoch auch verstärkt unspezifische Bindungen mit zellulären Proteinen eingehen. Diese Eigenschaft kann toxische Nebenwirkungen hervorrufen. Die in *Abb. 2.9* dargestellten Formiat- und Acetat-Modifikationen wurden von CARUTHERS entwickelt und untersucht.<sup>[53,54]</sup> Diese

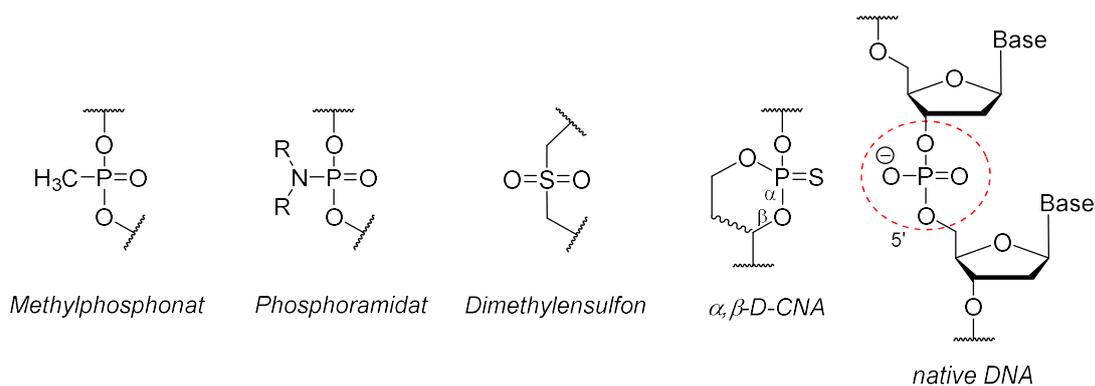
Modifikationen, die ebenfalls ein Phosphoratom tragen und negativ geladen sind, weisen, bezogen auf die Duplexstabilität, ähnliche Werte auf wie Phosphatdiester. In neuesten Studien wurde eine Alternative zu Phosphorthioaten untersucht: Methylphosphoramidat-AON **9** (*Abb. 2.10*). Diese führen nicht nur zu einer erhöhten Aktivierung der RNase H und zu einer besseren Nucleasestabilität, sondern besitzen auch eine bessere RNA-Bindungs-Affinität, begleitet von einer geringeren Toxizität.<sup>[55]</sup>



**Abb. 2.10:** Methylphosphoramidat-AON **9**.

Des Weiteren gibt es den Ansatz, die Ladung vollständig aus einem exogenen Oligonucleotid zu entfernen. Die so erhaltenen ON werden voraussichtlich eine verbesserte Zellpermeabilität aufweisen. Hierfür kann die Phosphatester-Einheit vollständig oder auch nur zum Teil beibehalten werden.<sup>[56]</sup> Ein wichtiger Punkt hierbei ist die Betrachtung der physikochemischen Eigenschaften einer Nucleinsäure und die damit verbundene Untersuchung der Relevanz der negativen Ladung in nativer DNA. In diesem Zusammenhang ist das bereits erwähnte Methylphosphonat (*Abb. 2.11*) zu nennen, das zwar eine erhöhte Nucleasestabilität und damit einhergehend eine gewünschte zelluläre Akkumulation, jedoch ebenso eine vergleichsweise geringere Löslichkeit in Wasser aufweist.<sup>[57]</sup> Dies lässt darauf schließen, dass der Austausch der polar-anionischen Phosphatdiester-Einheit mit nicht zu unterschätzenden Veränderungen der physikochemischen Eigenschaften einhergeht. Seit den 1990er Jahren widmete sich BENNER der Untersuchung von neutralen Modifikationen und stellte verschiedene Hypothesen für die Relevanz der polyanionischen Struktur der Nucleinsäuren auf. 2002 haben BENNER und HUTTER

einen Übersichtsartikel zu diesem Thema verfasst. Unter anderem wurde die Dimethylsulfon-Modifikation (Abb. 2.11) untersucht und es wurde festgestellt, dass die Löslichkeit modifizierter ON von der Sequenz abhängt. Die Eigenschaften (Löslichkeit und Basenpaarung) nativer DNA-Stränge hingegen verhalten sich bei gleicher Länge sequenzunabhängig.<sup>[58]</sup> Ein weiterer Unterschied eines uniform elektroneutralen Dimethylsulfon-modifizierten Oligonucleotids im Vergleich zu nativen Nucleinsäuren liegt im Aggregationsverhalten. Liegt ein Octamer oder längeres Oligomer vor, wird die Sekundärstruktur nicht wie erwartet durch Hybridisierung mit komplementären Strängen erhalten. Stattdessen kommt sie durch Faltung des Oligomers zustande, auch wenn eine Basensequenz gewählt wird, die in nativen Oligomeren keine Neigung zur Faltung aufweist.<sup>[58]</sup>

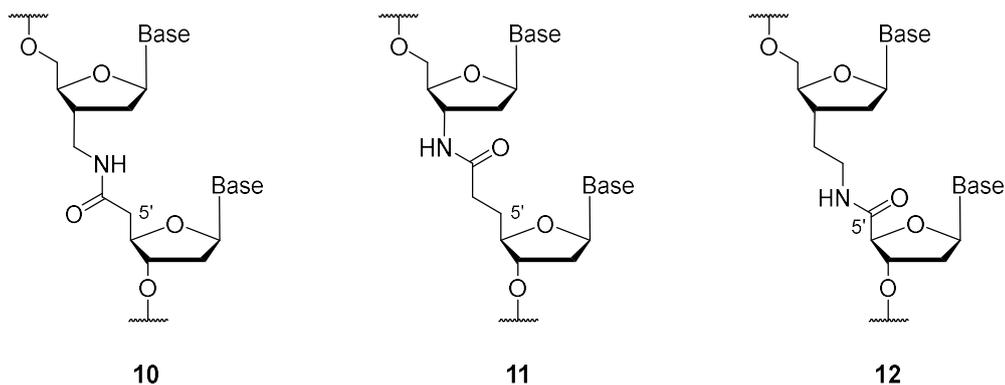


**Abb. 2.11:** Elektroneutrale Modifikationen im Vergleich zur nativen DNA.

Eine ebenfalls relevante, elektroneutrale Modifikation des Phosphatrückgrats ist die  $\alpha,\beta$ -D-CNA (dioxaphosphorinan constrained nucleic acids). Durch die Ethylen-Verbrückung zwischen dem C-5'-Atom und dem Sauerstoffatom der Phosphatdiestereinheit wurden zwei konformationell eingeschränkte Internucleotidbrücken mit unterschiedlicher Konfiguration erhalten (Abb. 2.11).<sup>[59]</sup> Die sogenannte "kanonische"  $R_{C5'}/S_P$  Einheit, die das Phosphatrückgrat in der gauche(-)-Konformation fixiert, wie sie auch in A- und B-Helixformen nativer ON vorliegt, führt zu einer Erhöhung der thermischen Stabilität. Im Falle einer neun-Basenpaare langen DNA/DNA-Duplex ( $\Delta T_m = +2.9$  bis  $+5.9$  °C/Mod.) war die Stabilität deutlich höher als bei einer komplementären DNA/RNA-Duplex ( $\Delta T_m = +0.9$  °C/Mod.).<sup>[59,60]</sup> Bei Verwendung der "nicht-kanonischen"  $S_{C5'}/R_P$ -

Einheit hingegen wurde in beiden Fällen eine Destabilisierung ( $\Delta T_m = -9.0$  bzw.  $-6.1$  °C) festgestellt.<sup>[59,60]</sup> Dieser Beobachtung liegt die Tatsache zugrunde, dass die „kanonische“ D-CNA mit der B-Helixform kompatibel ist und die „nicht-kanonische“ D-CNA hingegen strukturelle Verzerrungen herbeiführt und sogenannte "Lollipop"-Strukturen erzeugt.<sup>[59,60]</sup> Ein Beispiel für ein Phosphoramidat (Abb. 2.11) ist die von SHIMIDZU untersuchte Phosphormorpholidat-Modifikation.<sup>[61]</sup> Deren zwei Isomere ( $R_P$  bzw.  $S_P$ ) weisen zwar eine hohe Stabilität gegenüber Nucleasen auf, jedoch ist nur das  $S_P$ -Isomer in der Lage, mit einer komplementären RNA B-helikale Duplices zu bilden, deren thermische Stabilität mit der von nativen Duplices übereinstimmt.<sup>[61]</sup>

Eine bekannte, elektroneutrale Modifikation, die eine Ersetzung der Phosphatdiester-Einheit erfordert, sind die von DE MESMAEKER entwickelten Amid-Verbrückungen, deren Strukturen in Abb. 2.12 dargestellt sind.<sup>[62]</sup> Da der Einbau dieser Modifikation über Festphasensynthese unter Verwendung von amidverbrückten Nucleosid-Dimeren erfolgte, besitzen die erzeugten ON alternierende Phosphatdiester- und Amidbrücken. Die Wahl der Amid-Einheit wurde damit begründet, dass sie elektroneutral ist, kein Stereozentrum besitzt und sich inert gegenüber Nuclease-Abbau verhält. Die Position der Amid-Einheit beeinflusst die thermische Stabilität eines DNA/RNA-Hybrids.<sup>[62–64]</sup>



**Abb. 2.12:** Amidmodifikationen.

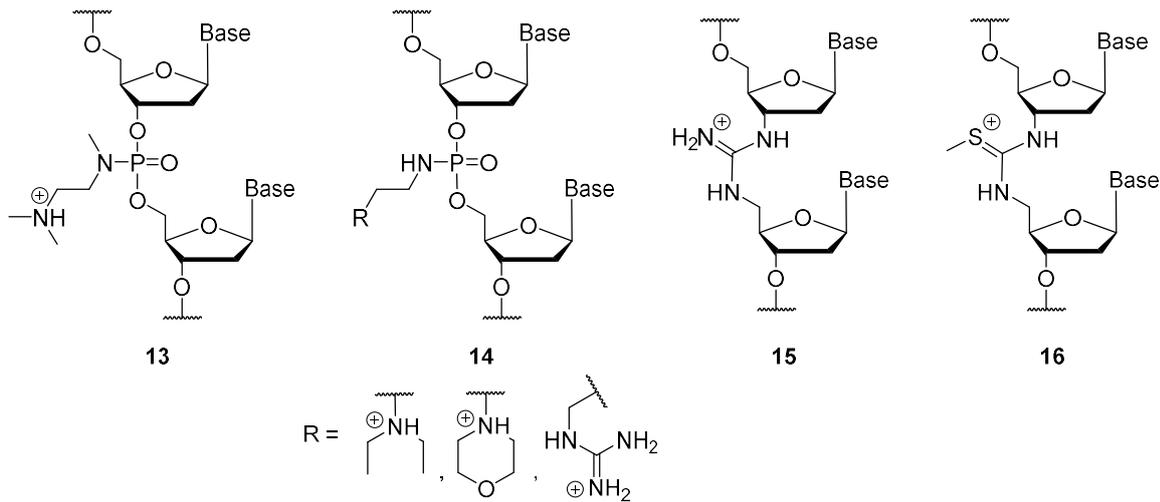
Die Struktur **12** lieferte, in einen DNA-Strang eingebaut, mit komplementären RNA-Strängen die vielversprechendsten Resultate ( $\Delta T_m = +0.5$  bis  $+3$  °C/Mod.).<sup>[62]</sup> Zurückgeführt wurde dieser Befund auf die Tatsache, dass die besagte Platzierung eine 3'-endo-Vorzugskonformation der Ribose-Einheit

induziert.<sup>[64]</sup> Die rotationseingeschränkte Amidverknüpfung liegt bevorzugt in der *trans*-Konformation vor und verzerrt die Torsionswinkel der anderen Bindungen, was durch Simulationen bestätigt werden konnte.<sup>[62]</sup> Diese erzwungene Geometrie unterstützt die Bildung einer A-Helix und stabilisiert deswegen DNA/RNA-Duplices, wohingegen DNA/DNA-Duplices destabilisiert werden.<sup>[63]</sup> Die Strukturen **10** und **11** hingegen führten durch ihren Einbau in einen DNA-Strang zur Destabilisierung ( $\Delta T_m = -0.5$  bis  $-2.9$  °C/Mod.) von Duplices sowohl mit DNA als auch mit RNA.<sup>[64,65]</sup>

In weiteren Untersuchungen wurde auch der Einbau von Amidin in RNA-Stränge und entsprechender RNA-RNA-Duplices als modifizierte siRNA untersucht. Interessanterweise änderten sich bei dem Einbau von 10 Amidin in ein 26mer die physikochemischen Eigenschaften wie die Duplexstabilität ( $\Delta T_m = -0.5$  °C/Mod.) nur geringfügig.<sup>[66]</sup> Hieraus lässt sich schließen, dass die Auswirkungen der Vorzugskonformation einen größeren Einfluss haben als der elektrostatische Effekt.

Eine weitere Möglichkeit ist der Einbau kationischer Modifikationen, die es ermöglichen, ein zum Teil oder durchgehend zwitterionisches und damit insgesamt elektroneutrales oder vollständig kationisches Rückgrat aufzubauen. Dieses Forschungsgebiet ist im Gegensatz zu den beiden zuvor behandelten Unterthemen bisher wenig erschlossen. Die vier bekanntesten artifiziellen Vertreter entsprechender Modifikationen sind die aminoalkylierten Phosphoramidate **13** und **14** (Abb. 2.13), die Guanidin-Modifikation **15** (Abb. 2.13), die S-Methylthioharnstoff-Modifikation **16** (Abb. 2.13) und die zuvor erwähnte NAA-Modifikation **6** (Abb. 2.7). Die ersten Versuche zu diesem Ansatz unternahm LETSINGER im Jahre 1986, als er ein Desoxyadenosyldinucleotid synthetisierte, das eine Aminoethylphosphoramidat-Einheit beinhaltete, die im sauren und neutralen Milieu positiv geladen war.<sup>[67]</sup> Schon zwei Jahre darauf wurde von der Synthese kurzer, kationischer DNA-Oligonucleotide mit Phosphoramidat-Verknüpfungen vom Typ **14** berichtet, die N-alkyliert waren und ein basisches Strukturmotiv trugen.<sup>[68]</sup> Diese kationischen ON dienten der Untersuchung, welche Auswirkung zwei komplementär geladene Dimere bzw. Einzelstränge hinsichtlich der Hybridisierung und damit der thermischen Stabilität der Aggregate haben.<sup>[67,68]</sup> Im Falle des Dimers wurde bei der Komplexbildung mit RNA eine  $T_m$ -Erhöhung von  $\sim 10$  °C und im Falle einer Hybridisierung mit DNA

eine  $T_m$ -Erhöhung von  $\sim 25$  °C gemessen.<sup>[67]</sup> Des Weiteren wurden Doppelstränge aus DNA und Phosphoramidat-modifizierter DNA unter physiologischen Bedingungen untersucht und es zeigte sich eine geringe Erhöhung der thermischen Stabilität. Die geringere UV-Absorption bei diesen Untersuchungen weist auf eine sehr stabile Komplexbildung zwischen dem positiv geladenen ON und der nativen DNA hin.<sup>[68]</sup> Eine Erhöhung der Salzkonzentration im Medium bewirkte eine Verringerung der thermischen Stabilität, was auf elektrostatische Abschirmung zurückzuführen ist. Duplices aus nativer anionischer DNA hingegen zeigen den gegenteiligen Effekt bei Erhöhung der Salzkonzentration.<sup>[68]</sup> Duplices, bei denen ein Strang komplett zwitterionisch vorlag, also an jeder zweiten Stelle eine positive Ladung trug, wurden nicht durch die Variation der Ionenstärke beeinflusst. Dieser Befund konnte 1998 von MICHEL und GRYAZNOV bestätigt werden.<sup>[69]</sup> Untersuchungen zum Nuclease-Abbau zeigten, dass sich sowohl das modifizierte Desoxyadenosyldinucleotid als auch das modifizierte ON inert gegenüber Nucleasen verhielten.<sup>[67,68]</sup> Andere Arbeitsgruppen haben aufbauend auf LETSINGERS Ergebnissen an Aminoalkylphosphoramidat-Verbrückungen und deren Einbau in ON geforscht. VASSEUR und DEBART beispielsweise haben eine Variation mit einer  $\alpha$ -Konfiguration am anomeren Zentrum von Antisense-ON entwickelt.<sup>[70,71]</sup> Sie untersuchten zwitterionische und kationische  $\alpha$ -ON und fanden heraus, dass diese modifizierten ON mit einer hohen Affinität DNA- und RNA-Target-Stränge binden und dass diese Stabilisierung sich proportional zu der Anzahl an Modifikationen verhält. Außerdem wurde herausgefunden, dass die thermische Stabilität sich drastisch verschlechtert, wenn ein Basen-Mismatch vorliegt.<sup>[70]</sup> Ein Vorteil der Phosphoramidat-Modifikation liegt in der Vielfalt der basischen Untereinheiten mit ihrem unterschiedlichen Protolyseverhalten. Zum einen wurden die stark basischen *N,N*-Dialkylethylendiamin-Einheiten<sup>[72,73]</sup> und die Guanidin-Einheit<sup>[74]</sup> entwickelt und zum anderen die schwächer basischen Morpholidate.<sup>[68]</sup> Auch BRUCE hat sich mit kationischen Modifikationen befasst und entwickelte die in *Abb. 2.13* gezeigte DNG (deoxyribonucleic guanidine, **15**)<sup>[75,76]</sup> und DNmt (deoxynucleic methylthiourea, **16**)<sup>[77-79]</sup>. Die 1994 erforschte Guanidin-Modifikation **15** lag in einem großen pH-Bereich positiv geladen vor. Außerdem ist diese Modifikation in der Lage, intermolekulare elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden.



**Abb. 2.13:** Oligonucleotid-Analoga mit kationischer Modifikation: aminoalkylierte Phosphoramidate **13** und **14**, Guanidin-Modifikation **15** und S-Methylthioharnstoff-Modifikation **16**.

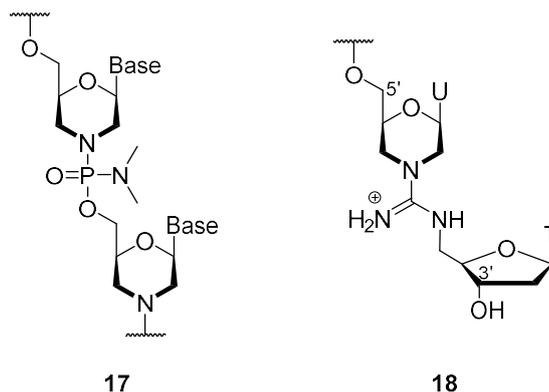
Erst vier Jahre später wurde an der ebenfalls nicht-stereogenen S-Methylthioharnstoff-Modifikation **16** geforscht, die sowohl nucleaseresistent als auch pH-unabhängig positiv geladen ist. In beiden Fällen sind moderate strukturelle Ähnlichkeiten zum Phosphatdiester auszumachen. Jedoch anders als die tetraedrische Phosphateinheit mit ihrem Bindungswinkel von  $109^\circ$  ist nun eine trigonal-planare-Einheit mit einem Bindungswinkel von  $120^\circ$  in das Rückgrat eingesetzt worden. Diese Tatsache hat einen größeren Abstand zwischen den Nucleosiden zur Folge. Trotzdem sind die DNG und DNmt in der Lage, stabile Komplexe mit nativen komplementären DNA- und RNA-Strängen zu bilden. Für einen DNG/DNA-Komplex wird von einer Erhöhung der Schmelztemperatur von  $\Delta T_m = \sim 15\text{-}20^\circ\text{C}/\text{Mod.}$  berichtet.<sup>[80]</sup> Eine Erhöhung der Ionenstärke hat eine Abschirmung der gegenteilig geladenen Rückgrate und damit eine Destabilisierung des Komplexes zur Folge.<sup>[76]</sup> Außerdem fanden die Autoren heraus, dass ein Nucleobasen-Mismatch eine signifikante Verringerung der Stabilität ( $\Delta T_m = -5^\circ\text{C}/\text{Mod.}$ ) der Duplices mit sich bringt. Vier Basen-Mismatches führten sogar zu einem kompletten Verlust der Hybridisierung.<sup>[80]</sup> Für ein DNmt-T<sub>5</sub>-ON konnte gezeigt werden, dass dieses Pentamer besser an eine komplementäre DNA bindet als die native DNA.<sup>[78]</sup> Unter physiologischen Bedingungen wurde für ein DNmt/DNA-Pentamer ein Schmelzpunkt von über  $80^\circ\text{C}$  gemessen, wohingegen ein vergleichbarer DNA/DNA-Komplex nur bis  $13^\circ\text{C}$  stabil war. Auch ein DNmt/RNA-Pentamer zeigte eine höhere thermische

Stabilität.<sup>[78]</sup> Eine Erhöhung der Ionenstärke hatte auch in diesem Fall eine Destabilisierung der Komplexe zur Folge, wobei eine DNmt-RNA-Duplex weniger destabilisiert wurde als eine DNmt-DNA-Duplex.<sup>[81]</sup> Auch in diesem Fall führte das Vorliegen von 50% T-C-Mismatches in einem Komplex zu einem gravierenden Absinken der thermischen Stabilität.<sup>[82]</sup>

Trotz der Vielzahl an Modifikationen hat sich noch keine als universell einsetzbar herausgestellt, was das Augenmerk auf den Einsatz von Prodrugs lenkte. Der Gebrauch von elektroneutralen, lipophilen Struktureinheiten zur Maskierung eines nativen, polar-polyanionischen Rückgrats soll der Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften dienen. Das Prodrug-Konzept wird in Kapitel 2.3 genauer erklärt.

## 2.2.4 Fortgeschrittene Kombinationen von Modifikationen

Bei den zuvor beschriebenen Modifikationen handelte es sich um Derivate von nativer DNA und RNA, bei denen nur ein Motiv modifiziert wurde. Es existieren aber auch Derivate, bei denen das komplette Zuckerphosphatrückgrat ausgetauscht wurde.



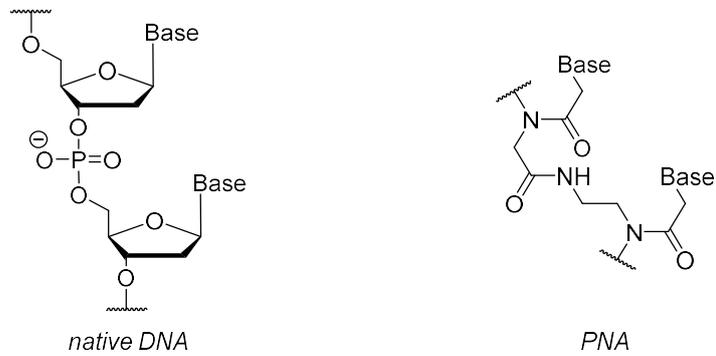
**Abb. 2.14:** Morpholino-Modifikationen **17** und **18**.

Eines der ältesten bekannten Beispiele ist die neutrale Phosphordiamidat-Morpholino-Modifikation **17** (PMO, *Abb. 2.14*). Hierbei ist die Ribose-Einheit durch Morpholin ersetzt worden und aus dem Phosphat wurde ein Phosphatdiamidat. Bei der Komplexbildung von uniformen PMO und nativer DNA

ist eine im Vergleich zu einem Komplex von zwei nativen komplementären DNA-Strängen leicht erhöhte thermische Stabilität festzustellen.<sup>[83]</sup> Darauf aufbauend wurden die Morpholinoamidine **18** (Abb. 2.14) entwickelt, die jedoch nur singular in ON-Sequenzen eingebaut wurden.<sup>[84]</sup> Die Position des Einbaus des Amidins **18** hat großen Einfluss auf die thermische Stabilität der mit einer komplementären DNA gebildeten Duplex. So führte beispielsweise ein Einbau in die Mitte der Sequenz zu einer verringerten Stabilität ( $\Delta T_m = -8.0 \text{ }^\circ\text{C}$ ), was auf sterische Hindernisse zurückzuführen war. Dahingegen bewirkte ein Einbau am 3'-Ende in der in Abb. 2.14 gezeigten Kombination eine Erhöhung der Stabilität ( $\Delta T_m = +1.5 \text{ }^\circ\text{C}$ ).<sup>[84]</sup> Diese Erhöhung wurde damit begründet, dass vorteilhafte elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der Guanidiniumgruppe und dem Phosphat herrschen. Diese elektrostatischen Wechselwirkungen wurden durch Zugabe von 1 mM  $\text{MgCl}_2$  verringert ( $\Delta T_m = +1 \text{ }^\circ\text{C}$ ), was mit der Abschirmung des Phosphats durch Magnesiumionen begründet wurde.<sup>[84]</sup>

Ein ebenfalls wichtiger Vertreter der fortgeschrittenen DNA/RNA-Analoga sind die PNAs (peptide nucleic acids). Sie wurden 1991 von NIELSEN eingeführt. Der Unterschied zu DNA/RNA liegt in der Substitution des Zuckerphosphat-Rückgrats durch eine sich wiederholende elektroneutrale *N*-(2-Aminoethyl)glycin-Einheit. Die Nucleobasen sind dabei über eine Carboxymethyl-Einheit mit dem Polyamidstrang verbunden (Abb. 2.15).<sup>[85]</sup> Da es sich um die nativen Nucleobasen handelt, ist eine Watson-Crick-Basenpaarung zu komplementären nativen DNA/RNA möglich.<sup>[86]</sup> Tests haben gezeigt, dass PNA/DNA-Duplices stabiler sind als DNA/DNA-Äquivalente. Aufgrund der Neutralität der PNAs können diese schon bei geringer Salzkonzentration mit DNA hybridisieren, da keine sich abstoßenden Rückgrat-Strukturen mehr vorliegen. Auch hohe Salzkonzentrationen sind unproblematisch, der  $T_m$ -Wert von PNA/DNA-Duplices ist in solchen Fällen sogar höher als der von DNA/DNA-Duplices.<sup>[87]</sup> Außerdem weisen PNAs eine hohe Inertheit gegenüber einem breiten Temperatur- und pH-Bereich auf.<sup>[88]</sup> Der Schmelzpunkt einer PNA/DNA- oder PNA/RNA-Duplex liegt bei einem 15mer bei  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $\Delta T_m = +1 \text{ }^\circ\text{C}/\text{Mod.}$ ), wohingegen entsprechende DNA/DNA -und DNA/RNA-Duplices nur Schmelzpunkte von ca.  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  aufweisen.<sup>[89]</sup> Ein weiterer Vorteil der nichtnativen PNA ist die Resistenz gegenüber Nucleasen und Proteasen, da sie weder eine Nucleinsäure noch ein Protein ist.<sup>[89]</sup> Die erhöhte Destabilisierung von PNA/DNA- und PNA/RNA-

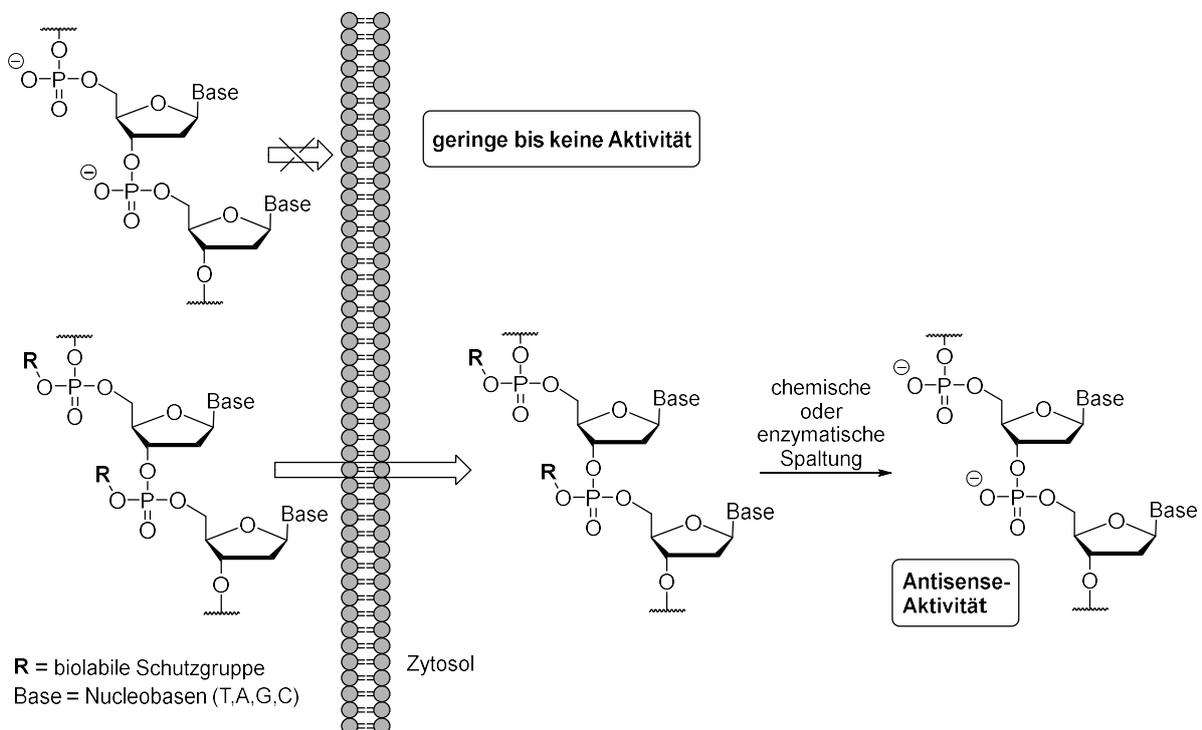
Komplexen bei Basen-Mismatches im Vergleich zu nativen Nucleinsäuren weist auf eine verbesserte Spezifität hin. Ein einzelner Mismatch in einem PNA/DNA- oder PNA/RNA-15mer verringert die Schmelztemperatur um 15 °C, bei einer DNA/DNA-Duplex sind es nur 11 °C Differenz.<sup>[90]</sup>



**Abb. 2.15:** PNA-Struktur im Vergleich zur nativen DNA.

## 2.3 Das Prodrug-Konzept für AONs

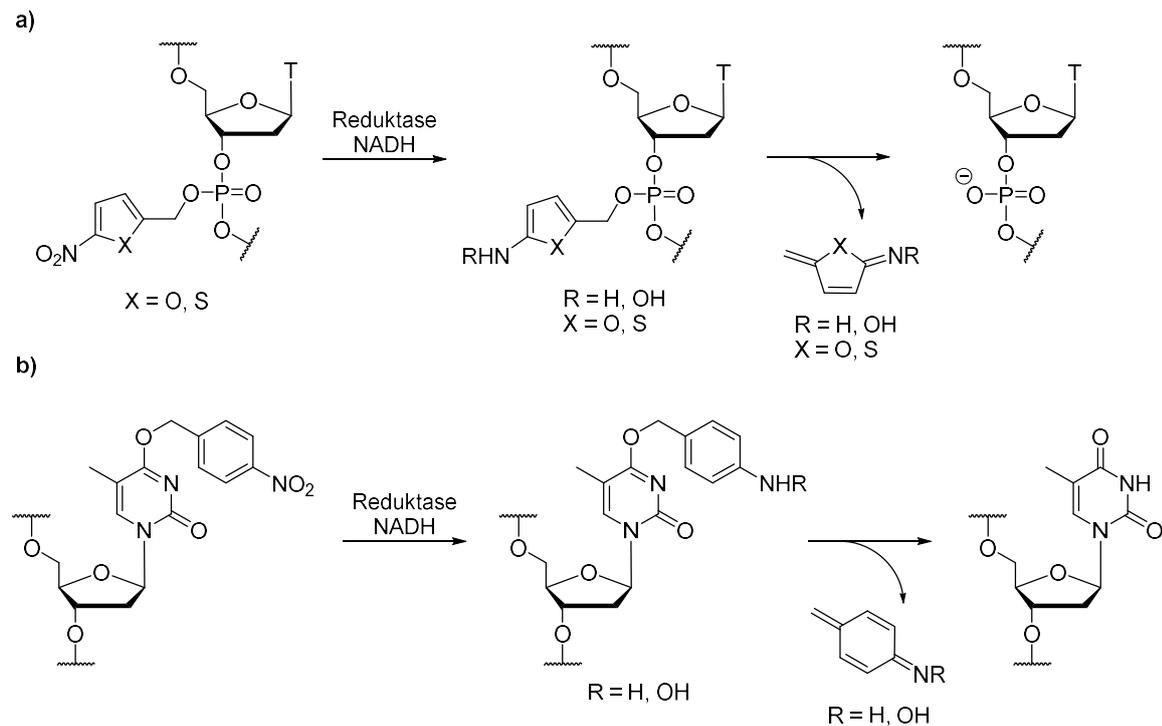
Bei Prodrugs handelt es sich, wie von ALBERT<sup>[91]</sup> 1958 definiert, um pharmakologisch inaktive Substanzen, die jedoch chemisch oder enzymatisch *in-vivo* in die eigentlich aktive Wirkform, das sogenannte Drug, umgewandelt werden. Ein Prodrug besitzt im Unterschied zum Drug eine (meist lipophile) Maskierungseinheit, was häufig eine verbesserte Zellmembran-Penetration bewirkt. Der Hauptvorteil ist somit die erhöhte Aufnahme von schlecht absorbierbaren Wirkstoffen in die Zellen. Es kann aber nicht zwingend ausgeschlossen werden, dass bereits das Prodrug eine geringe biologische Aktivität besitzt und im Falle von Oligonucleotid-Prodrugs eine Basenpaarung mit der Zielsequenz ausüben kann. Das Prodrug-Konzept ist ein möglicher und bisher eher wenig genutzter Ansatz, um die Nachteile von Antisense-Oligonucleotiden wie schlechte Zellpermeabilität, Proteinaffinität und Nuclease-Abbau zu umgehen, somit die physikochemischen Eigenschaften eines ON-Drugs zu optimieren und die pharmakokinetischen Eigenschaften zu verbessern.



**Abb.2.16:** Prodrug-Konzept für ein AON.

Es besteht die Möglichkeit, das polyanionische Phosphatrückgrat einer nativen Nucleinsäure zum Teil oder vollständig zu maskieren (*Abb. 2.16*). Die Spaltung der Maskierungsgruppe und die damit einhergehende Freisetzung des Oligonucleotids mit Antisense-Aktivität sollten durch chemische oder enzymatische Hydrolyse erst in der Zelle stattfinden. Ebenfalls ist ein externer physikalischer Stimulus wie Hitze oder Licht für die Prodrug-Spaltung möglich,<sup>[92,93]</sup> worauf jedoch in diesem Abschnitt nicht weiter eingegangen werden soll. Im Vordergrund stehen stattdessen die enzymatisch spaltbaren Modifikationen. Es ist ein sehr attraktiver Ansatz, die Kontrolle über die Genexpression innerhalb der Zelle durch zelluläre Enzyme zu steuern, da diese in der Zelle bereits natürlich vorhanden sind. Voraussetzung hierfür ist eine Konzentrationsdifferenz des nötigen Enzyms extra- und intrazellulär, damit ein Transport des Prodrugs bis in die Zelle möglich ist. Die Freisetzung der aktiven Form kann also nur, oder zumindest verstärkt, in der Zelle stattfinden. Der Hauptfokus liegt hierbei häufig auf den Enzymfamilien der Reduktasen und Esterasen, die sich für Prodrug-Ansätze gut eignen.

Bei Tumoren sind Reduktase-gesteuerte Prodrugs möglich, da intrazellulär eine Hypoxie vorliegt. Bisher existieren drei Hypoxie-aktivierbare ON-Prodrugs, die entweder eine Maskierung der negativen Ladung im Phosphatrückgrat aufweisen<sup>[94,95]</sup> oder eine Modifizierung an der Nucleobase tragen, um die Hybridisierungseigenschaften mit dem Target anzupassen.<sup>[96]</sup> In allen Fällen wurde ein Nitro-derivatisiertes Thymidin-Phosphoramidit synthetisiert und in einen Oligonucleotidstrang eingebaut. Der Abbau solcher Modifizierungen ist in *Abb. 2.17* dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass 5-Nitro-2-furylmethyl- und 5-Nitro-2-thiophenyl-methyl-Modifikationen (*Abb. 2.17 a*)), eingebaut in ein T-Oligomer, in Tumorzellextrakt durch Reduktase-Aktivität abgespalten wurden und ein natives T-Oligomer erhalten werden konnte.<sup>[94]</sup> Außerdem bewirkten diese Modifikationen eine Verbesserung der Nucleaseresistenz und Zellpermeabilität. Auch die Verwendung von Nitrophenylpropyl-Modifikationen verringerte den Abbau durch Nucleasen und verbesserte die Stabilität eines T-Oligomers in humanem Serum.<sup>[95]</sup> Die Hypoxie-aktivierbare Modifikation an der Nucleobase (*Abb. 2.17 b*)) wurde von SANEYOSHI und ONO beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass ein T-5mer mit einer eingebauten Modifikation *in vitro* durch Reduktase in Gegenwart von NADH freigesetzt werden konnte.<sup>[96]</sup>

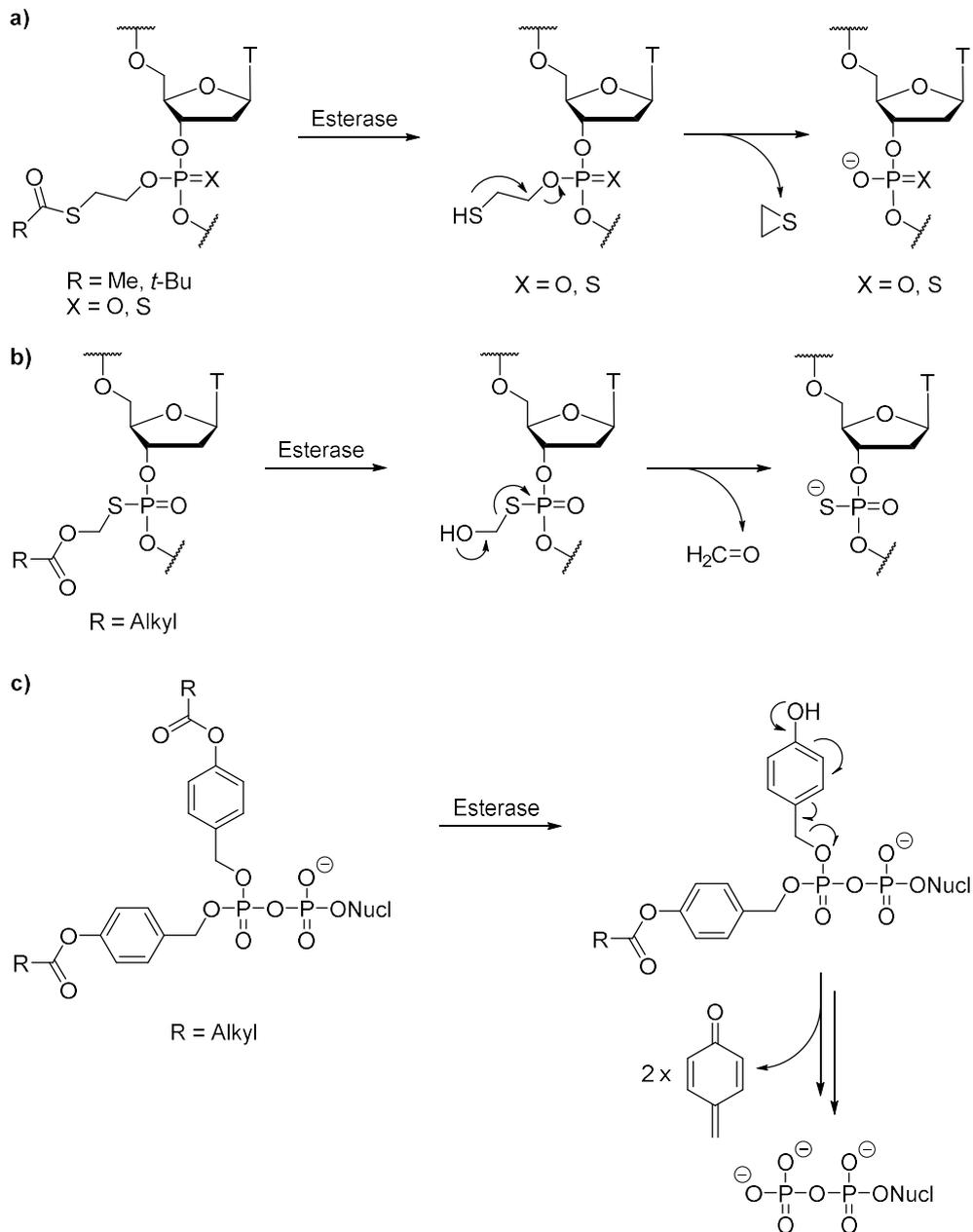


**Abb. 2.17:** Prodrug-Spaltung durch Reduktase/NADH: a) am Phosphat; b) an der Nucleobase.

Des Weiteren wurden Stabilitätstests mit komplementären Sequenzen durchgeführt, die zeigten, dass eine Destabilisierung der Duplex vorlag. Dieser Befund zeigt, dass in normalen Zellen keine bis geringe Mengen Duplices gebildet werden, wohingegen in hypoxischen Zellen eine Prodrug-Spaltung stattfinden sollte, das native ON freigesetzt wird und sich somit eine Duplex mit einem komplementären Strang ausbilden kann. Es ist somit vorrangig in Tumorzellen eine Aktivität zu erwarten.

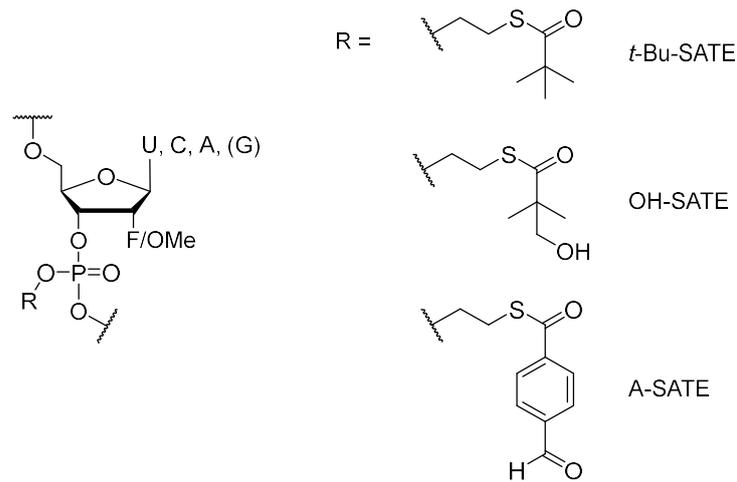
Seit mehr als 20 Jahren wird Esterase als Aktivierungsprinzip für Phosphat-Prodrugs verwendet. Die Strategie von Phosphat-maskierten Prodrugs von Mononucleotid-Analoga führte bereits zu erheblichen Erfolgen und zu der klinischen Zulassung der antiviralen Therapeutika Tenofoviridisoproxilfumarat (gegen HIV) und Sofosbuvir (gegen HCV).<sup>[97]</sup> Intensive Studien zu entsprechenden ON-Prodrugs wurden vor allem in der Gruppe von IMBACH<sup>[98]</sup> durchgeführt, aber auch von AGRAWAL<sup>[99,100]</sup> und MEIER<sup>[101]</sup>. Die bekanntesten Maskierungsgruppen sind in diesem Bereich die von IMBACH<sup>[98]</sup> entwickelten Methyl-SATE (S-Acetylthioethyl) und *tert*-Butyl-SATE (S-Pivaloylthioethyl) und die von AGRAWAL<sup>[99]</sup> entwickelten S-Acyloxymethyl-Gruppen. Die Acyloxybenzyl-(AB)-Prodrugs von MEIER<sup>[102]</sup> sind bisher nur für Nucleosiddiphosphate und

Nucleosidtriphosphate untersucht worden. Die AB-Einheit wurde auch von JESSEN für die Synthese von Inositolphosphat-Prodrugs eingesetzt, was darauf hinweist, dass diese Gruppe sich für Prodrugs von hochphosphorylierten Verbindungen eignen sollte.<sup>[103]</sup> Außerdem lieferte in den Arbeiten von JESSEN die AB-Gruppe im Vergleich zu der SATE-Einheit bezogen auf die Freisetzung des Drugs bessere Ergebnisse.<sup>[103]</sup> Die enzymatischen Spaltungen der zuvor erwähnten Prodrugs sind in *Abb. 2.18* dargestellt. Bei den Intermediaten handelt es sich entweder um Alkohole oder Thiole, die spontan die aktive Form des ON freisetzen.



**Abb. 2.18:** Mechanismus der Demaskierung von Prodrugs nach a) IMBACH; b) AGRAWAL; c) MEIER.

Der fundamentale Vorteil einer solchen Maskierungsgruppe ist der vorübergehend neutrale Phosphatdiester anstelle eines nativ negativ geladenen Rückgrats. Daraus folgt eine höhere Nucleasestabilität und eine durch die erhöhte Lipophilie verbesserte Zellgängigkeit.<sup>[104]</sup> Die Verbesserung der Zellaufnahme verhält sich proportional zur Anzahl der SATE-Gruppen und wahrscheinlich findet die Zellaufnahme durch passive Diffusion statt.<sup>[105]</sup> Trotz des Nachweises über die enzymatische Demaskierung von SATE-geschützten Phosphaten (eingebaut in T-Oligomere) im Zellextrakt<sup>[98,106,107]</sup> wurden in den folgenden Jahren keine weiteren Untersuchungen und Studien unternommen. Grund dafür war die Inkompatibilität der Maskierungsgruppen mit den Standard-Bedingungen der automatisierten Festphasensynthese, wie beispielsweise der Abspaltung von der festen Phase und der Nucleobasenentschützung (stark basische Bedingungen) (Kap. 2.4). Auch ist die Wasserlöslichkeit von vollständig SATE-modifizierten Oligomeren schlecht,<sup>[98]</sup> was IMBACH dazu veranlasst hat, gemischte Oligonucleotide bestehend aus Phosphatdiester und -triester zu synthetisieren. Die Einführung von photolabilen Basenschutzgruppen<sup>[108]</sup> und mild spaltbaren Schutzgruppen<sup>[109,110]</sup> eröffnete 2003 die Möglichkeit, gemischte Sequenzen zu synthetisieren. Jedoch wurden diese ON aufgrund der schlechten Syntheseausbeute nicht für die Anwendung in der Antisense-Forschung in Betracht gezogen. Erst wieder zehn Jahre später veröffentlichte DOWDY Ergebnisse zur Synthese, Zellpermeabilität und *in-vivo*-Aktivität von siRNA-Prodrugs, die zu ca. 65% ein neutrales Phosphatdiester-Rückgrat besitzen.<sup>[111]</sup> Da zum ersten Mal über biologische Effekte in Mäusen berichtet wurde, war die Veröffentlichung so bedeutend, dass zwei Highlight-Artikel<sup>[112,113]</sup> zum Thema erschienen. Es wurde eine Bibliothek bestehend aus 40 RNN-(ribonucleic neutral)-Phosphoramiditen angefertigt, die an der 2'-Position einen Fluor- oder Methoxy-Substituenten trugen, um nucleophile Angriffe auf den Phosphatdiester zu unterbinden. Die verwendeten Schutzgruppen für die exocyclischen Amine der Nucleobasen A, C und G konnten unter mild basischen Bedingungen unter Erhalt der Phosphatdiester entschützt werden. Die Verwendung der RNN-Phosphoramidite ermöglichte ON-Synthesen in hohen Ausbeuten, vergleichbar mit der automatisierten Synthese nativer RNA. Drei enzymatisch spaltbare Maskierungsgruppen (Abb. 2.19) wurden für eine vollständige Untersuchung der ON ausgewählt: *t*-Bu-SATE, OH-SATE und A-SATE.



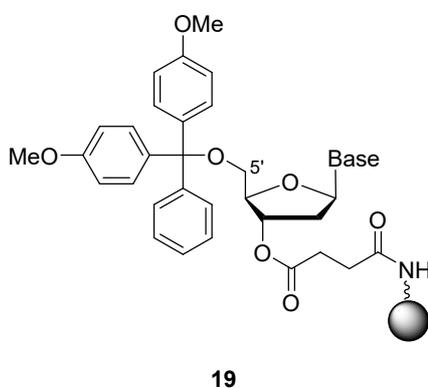
**Abb. 2.19:** SATE-maskierte RNAs nach DOWDY.

Die Anzahl an SATE-Modifikationen und deren Platzierung im siRNA-Strang hatten einen erheblichen Einfluss auf Löslichkeit und Duplexstabilität. Die synthetisierten siRNN wiesen eine hohe Löslichkeit und Serumstabilität auf und wurden nicht vom Immunsystem erkannt. Trotzdem konnten sie wegen ihrer Größe nicht passiv die Zellmembran passieren. Bei Verwendung von zellpenetrierenden Peptiden in Kombination mit der A-SATE-Modifikation war eine passive Zellgängigkeit gegeben. Insgesamt eröffnen diese Befunde neue Wege zur Synthese von ON-Prodrugs für RNAi-Therapeutika.

In den letzten zehn Jahren hat sich VASSEUR mit RNA-Prodrugs beschäftigt, die eine enzymatisch spaltbare Modifikation in der 2'-Position aufweisen.<sup>[114–117]</sup> Der Fokus liegt hierbei auf der Einführung von Acetalester-Gruppen, deren Lipophilie und Stabilität variiert werden, um die siRNA-Eigenschaften zu optimieren. Die ersten Untersuchungen fanden an kurzen U-Oligomeren mit Einbau von biolabilen 2'-O-Acyloxymethyl oder –Acylthiomethyl-Gruppen statt.<sup>[114,115]</sup> Die Einführung dieser Modifikationen verbesserte die Nucleasestabilität und gestattete Duplexbildung, und die Maskierungsgruppe konnten enzymatisch abgespalten werden. Die Abspaltung setzte dabei Formaldehyd frei. Diese Untersuchungen waren nur der Beginn vieler verschiedener ON-Prodrug-Synthesen mit Modifikation in der 2'-Position, worauf aber nicht weiter eingegangen wird, da dieses Thema für die vorliegende Arbeit nicht von zentraler Bedeutung ist.

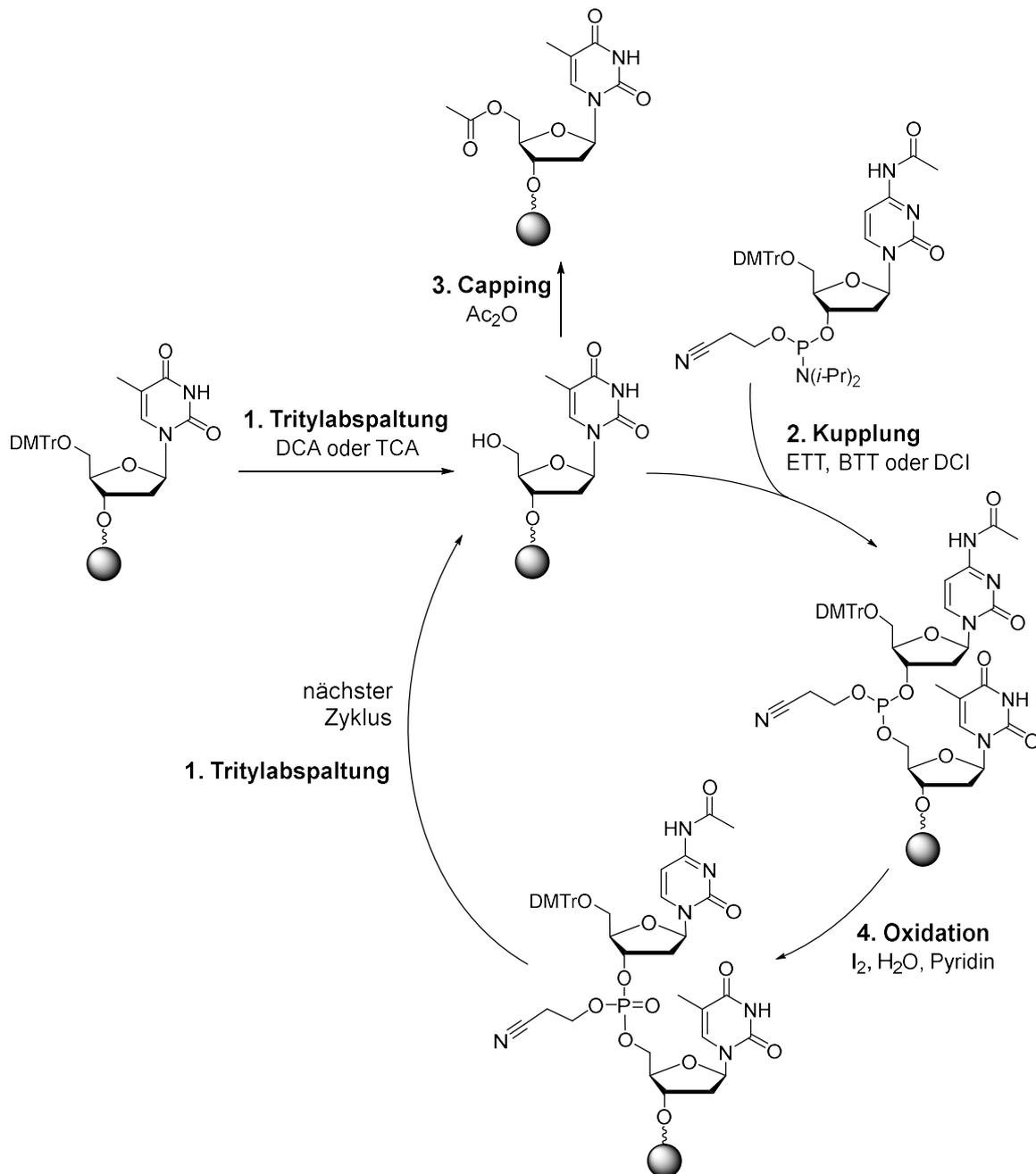
## 2.4 Automatisierte Festphasensynthese von Oligonucleotiden

Seit den 1970er Jahren<sup>[15]</sup> ist für die Oligonucleotid-Synthese die automatisierte Festphasensynthese an Synthesizern die Methode der Wahl. Im Vergleich zu der Synthese in Lösung, wie sie zuvor durchgeführt worden war,<sup>[118]</sup> ist der Vorteil, dass die jeweiligen Zwischenstufen nicht jedes Mal aufs Neue isoliert werden müssen, sondern dass Wasch- und Filtrationsdurchläufe verbleibende, Reste von Reagenzien und Nebenprodukte unter Inertgas entfernen. Heutzutage erfolgt eine schnelle und effiziente Synthese mithilfe durchdachter Synthesesyklen und modernen parallel arbeitenden Oligonucleotid-Synthesizern, die nahezu jede Sequenz erzeugen können. Bei der Festphasensynthese eines Oligonucleotids wird ein an ein inertes Trägermaterial gebundenes Startnucleosid eingesetzt. Aufeinanderfolgende Synthesesyklen führen zu Kettenverlängerungen und nach Syntheseende wird die fertige Sequenz vom Träger abgespalten. Für die Synthese werden unter anderem Nucleosid-Phosphoramidite benötigt, die bereits 1981 von BEAUCAGE und CARUTHERS entwickelt wurden und unter bestimmten Bedingungen gelagert und aktiviert werden können.<sup>[119]</sup> In den Jahren 1992 und 1993 verfassten BEAUCAGE und IYER mehrere Übersichtsartikel u.a. über funktionalisierte ON, Phosphoramiditderivate und modifizierte ON und deren Anwendungsmöglichkeiten.<sup>[120–122]</sup> Für die Festphasensynthese wird die 5'-OH-Gruppe der eingesetzten Amidite mit der säurelabilen Dimethoxytrityl-Schutzgruppe (DMTr) geschützt (wie bei Verbindung **19**, *Abb. 2.20*).



**Abb. 2.20:** Startmaterial **19** der Standard-Festphasensynthese von DNA-ON.

Auch die exocyclischen Aminofunktionen von Adenin, Guanin und Cytosin werden geschützt, um unerwünschte Nebenreaktionen zu unterbinden. Das Trägermaterial - üblicherweise CPG (controlled pore glass) oder Polystyrol-(PS)-Beads - wird vor dem Synthesebeginn über einen standardmäßig basenlabilen Linker an die 3'-Position des Startnucleosids gekuppelt (*Abb. 2.20*). Auf diese Weise wächst der ON-Strang auf dem CPG, während überschüssige Reagenzien einfach weggespült werden. Der Aufbau eines ON-Strangs erfolgt von 3'- in 5'-Richtung und das Startmaterial befindet sich in einer ca. 2 cm großen Säule zwischen zwei Fritten, was ein mechanisches Entfernen des beladenen Trägers unmöglich macht. Der Syntheseyklus ist in *Abb. 2.21* dargestellt. Zu Beginn eines jeden Kupplungszyklus wird mit Di- oder Trichloressigsäure (2% oder 3% in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) die DMTr-Schutzgruppe entfernt, um die reaktive 5'-OH-Gruppe freizusetzen. Das entstehende DMTr-Kation kann photometrisch ( $\lambda = 495 \text{ nm}$ ) detektiert werden und daraus experimentell die Ausbeute für jeden Syntheseyklus bzw. zum Ende der Synthese rechnerisch die Gesamtausbeute bestimmt werden. Im nächsten Schritt, der sogenannten Kupplung, reagiert die 5'-OH-Gruppe mit einem Phosphoramidit, das eine basenlabile 2-Cyanoethyl-Gruppe trägt, zu einem Phosphit. Das Amidit wird zuvor mit einer schwachen Säure, z.B. 5-Ethylthio-1*H*-tetrazol (ETT), 4,5-Dicyanoimidazol (DCI) oder 5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol (BTT), aktiviert. Da ein vollständiger Umsatz nahezu unmöglich ist, folgt ein Capping-Schritt. Dieser verhindert den Aufbau eines Gemisches verkürzter Sequenzen durch das Blocken nicht umgesetzter 5'-OH-Gruppen und erleichtert dadurch die Reinigung der ON. Die 5'-OH-Gruppen, die nicht reagiert haben, werden standardmäßig mit Essigsäureanhydrid ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ) und *N*-Methylimidazol in THF in Gegenwart von Pyridin acetyliert. Der Phosphitriester, der im Kupplungsschritt entstanden ist, ist recht instabil und hydrolyseempfindlich und wird im letzten Schritt zu dem stabilen Phosphatriester oxidiert. Dies erfolgt mit einer Iodlösung in Gegenwart von Wasser und Pyridin. Die zuvor erwähnten Schritte wiederholen sich in jedem Zyklus (*Abb. 2.21*) und das gewünschte ON kann entweder mit freier 5'-OH-Gruppe oder DMTr-geschützt erhalten werden. Nach erfolgter Synthese sind die Abspaltung des ON vom Trägermaterial und die Abspaltung der Schutzgruppen nötig, um einen nativ anionischen Oligonucleotid-Strang zu erhalten.

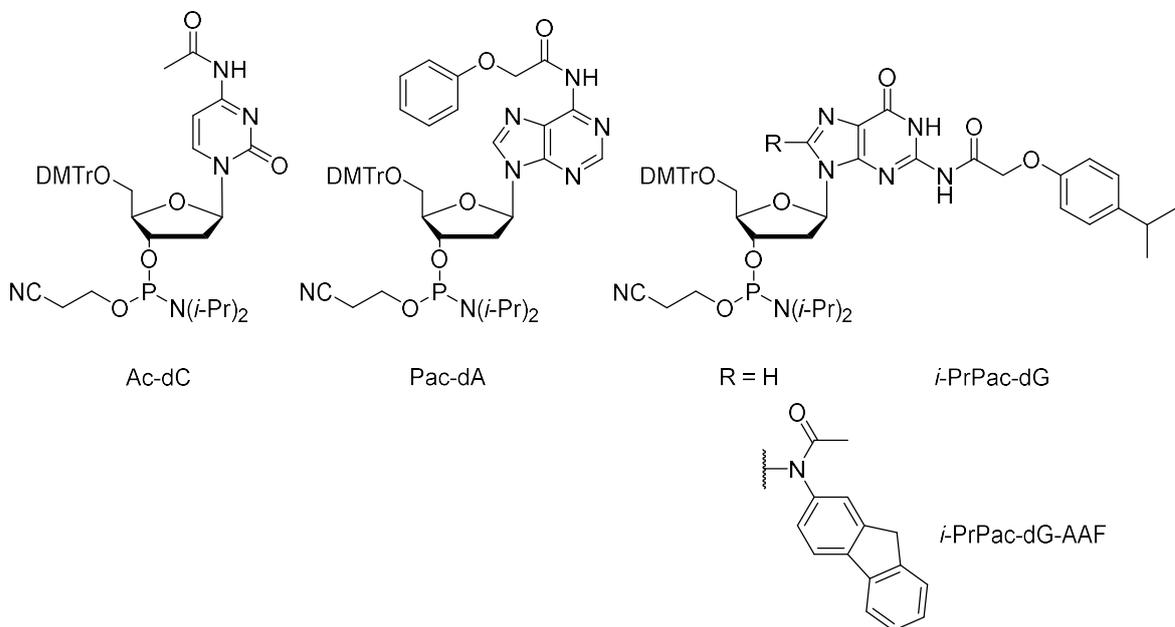


**Abb. 2.21:** Festphasensynthese eines ON bei Verwendung des Phosphoramidit-Ansatzes.

Das trägergebundenen ON wird mit einer Ammoniak/Ethanol-Lösung versetzt, wodurch die Esterbindung zwischen der 3'-OH-Gruppe des ON und des Trägermaterials gespalten wird. Zur Freisetzung der exocyclischen Aminofunktionen und des Phosphatdiester-Rückgrats wird die ammoniakalische ON-Lösung für mehrere Stunden bei 55 °C inkubiert.

Dieser Zyklus dient der Synthese von nativen ON. Werden Modifikationen eingebaut, z.B. an der Nucleobase, an der Zuckereinheit oder am Phosphatrückgrat, ist es in einigen Fällen notwendig, von den Standardmethoden

abzuweichen. Anstelle der Detritylierung mit den starken Säuren DCA ( $pK_a = 1.5$ ) oder TCA ( $pK_a = 0.7$ ), die in geringen Mengen zur Depurinierung führen können,<sup>[123]</sup> ist es SALON gelungen, unter mild sauren Bedingungen mit Triethylammoniumacetat-Puffer (pH 4.5-5.0) und einer leichten Erwärmung (40 °C) die DMTr-Gruppe zu entfernen.<sup>[124]</sup> Bei der Wahl der Phosphoramidite spielt die Schutzgruppe der exocyclischen Aminofunktion eine wichtige Rolle. Unter Standardbedingungen (basische Entschützung) werden für die DNA-Synthese die Nucleoside wie folgt geschützt: 2'-Desoxycytidin (dC) mit einer Acetyl-Gruppe, 2'-Desoxyadenosin (dA) mit einer Benzoyl-Gruppe und 2'-Desoxyguanosin (dG) mit einer Isobutyryl- oder einer Dimethylformamidin-Gruppe. Außerdem sind folgende 'ultra-mild' entschützbare Phosphoramidite kommerziell verfügbar: Pac-dA und *i*-PrPac-dG (Abb. 2.22). In diesem Fall ist es ratsam, als Cappingreagenz Phenoxyessigsäureanhydrid zu verwenden, um eine mögliche Substitution der Schutzgruppe zu verhindern. Diesen Ansatz wählte z.B. LUDOVIC für den Einbau von *N*-2'-(Desoxyguanosin-8-yl)-2-acetylaminofluoren (dG-AAF) durch 'ultra-milde' Synthese in ein ON.<sup>[125]</sup>



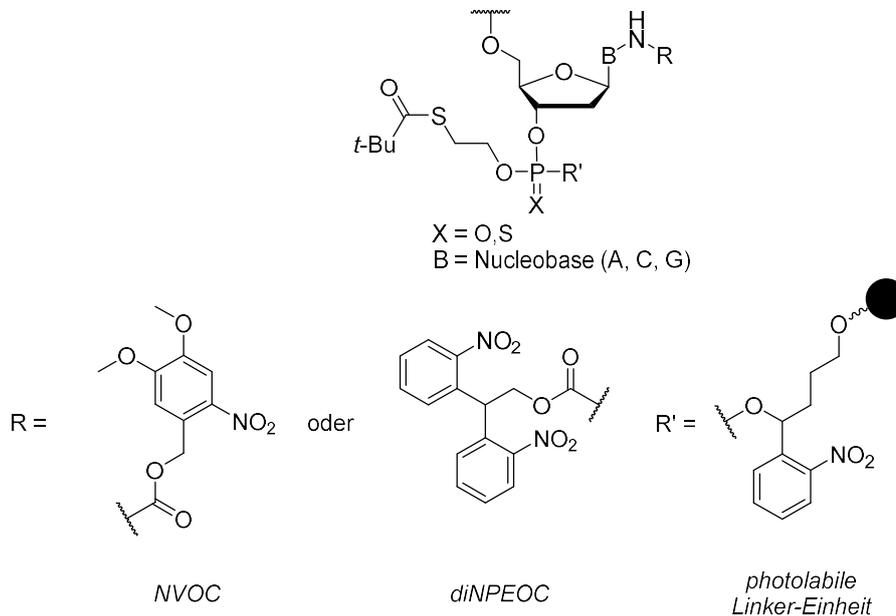
**Abb. 2.22:** Phosphoramidite für 'ultra-milde' DNA-Synthese.

Die milden Entschützungsbedingungen, bei denen mit einer 0.05 M  $\text{K}_2\text{CO}_3$ -Methanol-Lösung 4 h bei Raumtemperatur gerührt wird, waren für diese ON-Synthese noch immer zu harsch und resultierten in einer Abspaltung der

Acetyl-Gruppe von dG-AAF. Daher fiel die Wahl auf eine 10%ige (v/v) Diisopropylamin-Lösung in Methanol, in der das ON bei 55 °C über Nacht inkubiert wurde. DOWDY verwendete für seine SATE-siRNA-Prodrugs ebenfalls diese Amidite mit den mild spaltbaren Schutzgruppen und Diisopropylamin zur Entschützung.<sup>[111]</sup>

Der Cappingschritt kann z.B. umgangen werden, indem erneut mit dem Phosphoramidit oder einem reaktiveren Phosphoramidit-Derivat ohne Nucleosid<sup>[108]</sup> gekuppelt wird.

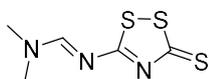
Der Oxidationsschritt wird wie oben beschrieben üblicherweise mit Iod in Gegenwart von Wasser durchgeführt, was für Modifikationen problematisch sein kann. Deswegen verwendete ALVAREZ für die Synthese von SATE-Prodrugs zum einen eine *tert*-Butylhydroperoxid-Lösung (*t*-BuOOH) in Toluol als Oxidationsmittel und zum anderen die photospaltbaren Nucleobasen-Schutzgruppen NVOC (6-Nitroveratryloxycarbonyl) und diNPEOC (2,2'-Bis(2-nitrophenyl)ethoxycarbonyl) sowie einen photospaltbaren Linker mit einer 1-(*o*-Nitrophenyl)-1,3-propandiol-Einheit (Abb. 2.23).<sup>[108]</sup>



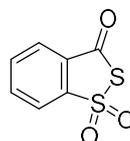
**Abb. 2.23:** Photolabile Einheiten.

Bereits 13 Jahre zuvor berichtete HAYAKAWA über die Möglichkeit, *tert*-Butylhydroperoxid-Lösungen als wasserfreie Alternative zur Oxidation von Phosphenen zu Phosphaten zu verwenden.<sup>[126]</sup> Die Wahl von Toluol als

Lösungsmittel lässt sich auf HILL zurückführen, der drei Jahre zuvor die Stabilität von *tert*-Butylhydroperoxid in verschiedenen Lösungsmitteln untersucht hat, wobei Toluol sich zur Lagerung als am vielversprechendsten erwies.<sup>[127]</sup> Die Synthese von Phosphorthioaten ist ebenfalls am Synthesizer möglich, wobei der Einsatz von schwefelhaltigen Oxidationsmitteln erforderlich ist. Außerdem muss in diesem Fall die Verschwefelung vor dem Capping-Schritt erfolgen, um Phosphatdiesterbildung zu vermeiden. Das bekannteste Verschwefelungsreagenz ist das sogenannte Beaucage-Reagenz (3*H*-1,2-Benzodithiol-3-on-1,1-dioxid, *Abb. 2.24*), das von IYER und BEAUCAGE 1990 entwickelt worden ist und seitdem, das seitdem standardmäßig verwendet wurde. Es zeichnet sich durch hohe Effizienz, kurze Reaktionszeiten und gute Löslichkeit in Acetonitril aus.<sup>[128]</sup> Nachteilig ist die limitierte Stabilität in Lösung. Ein neues Verschwefelungsreagenz, das alle positiven Eigenschaften des Beaucage-Reagenz besitzt und zusätzlich auch eine hohe Stabilität in Lösung aufweist, ist das 3-(Dimethylaminomethyliden)amino-3*H*-1,2,4-dithiazol-3-thion (DDTT, *Abb. 2.24*), das 2011 von GUZAEV vorgestellt wurde.<sup>[129]</sup>



DDTT

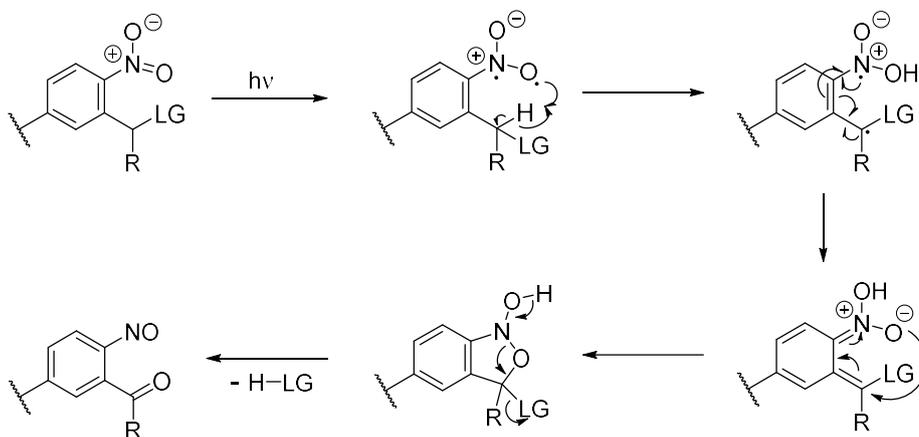


Beaucage-Reagenz

**Abb. 2.24:** Verschwefelungsreagenzien für die Synthese von Phosphorthioat-ON.

Die zuvor bereits erwähnten photolabilen Einheiten, die zum einen als Basenschutzgruppen und zum anderen als Linker eingesetzt werden, sind Bestandteil aktueller Forschung und erfreuen sich immer größerer Beliebtheit, da sie mild einzig durch Bestrahlung entfernt werden können. NIELSEN und QVORTRUP haben 2018 in einem Übersichtsartikel die wichtigsten photolabilen Linker zusammengefasst.<sup>[130]</sup> Sie beschreiben die geschichtliche Entwicklung und die unterschiedlichen Strategien. Die Linker, die in der ON-Synthese häufiger verwendet werden, sind die *o*-Nitrobenzyl- und die *o*-Nitroveratryl-Linker, deren Spaltungsmechanismus von NORRISH 1935 beschrieben worden war und auf der Grundlage beruht, dass die N=O- $\pi$ -Bindung durch ein Photon (300-350 nm) gebrochen werden kann und sich ein Diradikal bildet (*Abb. 2.25*).<sup>[131]</sup> Zum ersten

Mal wurde von der Verwendung eines solchen Linkers von RICH und GURWARA 1973 berichtet, die auf diese Weise Peptide synthetisierten.<sup>[132]</sup> Erst 1993 zeigten GREENBERG und Mitarbeiter, dass *o*-Nitrobenzyloxy-basierte Linker auch für die Oligonucleotidsynthese eingesetzt werden können.<sup>[133–135]</sup> In den Jahren darauf modifizierte und verbesserte GREENBERG<sup>[136,137]</sup> den Linker und baute u.a. eine Carbonatfunktion ein (Abb. 3.2). Auch andere Arbeitskreise entwickelten aufbauend auf GREENBERGS Arbeiten neue Linker, wie z.B. DAMHA<sup>[138]</sup> und SUTHERLAND<sup>[139]</sup>, um die Ausbeuten zu erhöhen und die Linker den jeweiligen Reaktionsbedingungen anzupassen. Es ergaben sich jedoch keine erheblichen Unterschiede, da die photochemische Spaltung stets Ausbeuten zwischen 60-70% lieferte.



**Abb. 2.25:** Photolytische Spaltung einer 2-Nitrobenzyl-Einheit (LG = leaving group).

Nicht nur die Wahl der Reagenzien beeinflusst die Effizienz einer ON-Synthese, sondern auch die Reaktionszeiten der Detritylierung, der Kupplung, des Capping und der Oxidation sind variierbar und somit von großer Bedeutung.

Insgesamt steht somit heutzutage ein breites methodisches Repertoire für die Synthese von ON und ihren modifizierten Analoga zur Verfügung.

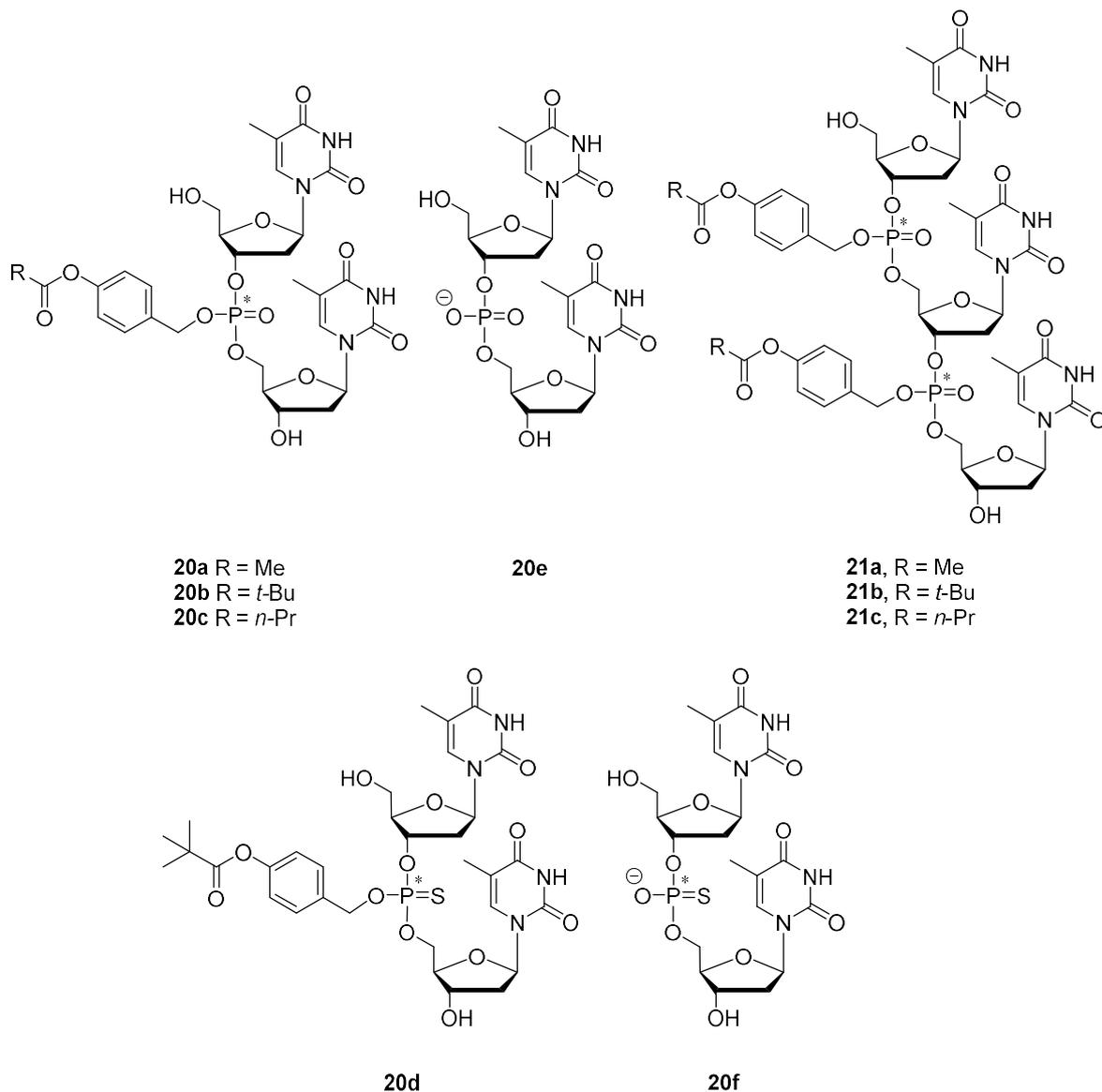
## 3 Zielsetzung und Planung der Arbeit

### 3.1 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Konzept von Pro-Oligonucleotiden, die als mögliche Wirkstoffe in der Antisense-Therapie dienen könnten, etabliert werden. Native anionische Oligonucleotide weisen durch ihre Polarität eine eingeschränkte Zellgängigkeit auf und können somit nicht in Zellen gelangen, um mRNA im Cytoplasma nach dem Antisense-Prinzip (Kap. 2.1) zu binden. Pro-Oligonucleotide mit neutralem Phosphatrückgrat sollten die Zellmembran, besser überwinden können und im Cytoplasma enzymatisch oder chemisch in den Wirkstoff umgewandelt werden (Kap. 2.3). Die Wahl der Maskierungsgruppe fiel auf die Acyloxybenzyl-(AB)-Gruppe, die von MEIER<sup>[101]</sup> und Mitarbeitern für Nucleosiddiphosphat- und Nucleosidtriphosphat-Prodrugs erfolgreich verwendet wurde (Kap. 2.3). Die Aufgabe bestand also darin, dieses Prodrug-Konzept auf ein Pro-Oligonucleotid zu übertragen, um das pharmakokinetische Profil von nativen ON zu verbessern. Als Test-Nucleosid für die Etablierung des Ansatzes wurde Thymidin ausgewählt, da Thymidin, im Gegensatz zu den anderen drei Desoxynucleosiden, keine exocyclische Aminogruppe besitzt. Somit sollte keine Schutzgruppe an der Nucleobase benötigt werden, was die Synthesen erheblich vereinfachen sollte.

Ein wichtiger Aspekt der Aufgabenstellung war die Wahl der Ester-Struktur für die AB-Maskierungsgruppe. Zum einen durfte die Prodrug-Gruppe nicht bereits im enzymfreien Milieu hydrolysiert werden, da sonst eine Anwendung als Wirkstoff nicht möglich wäre, da der Wirkstoff die Zelle nicht erreicht. Zum anderen musste eine hinreichende Stabilität gegenüber einer moderaten Esterase-Aktivität, wie sie im humanen Plasma vorliegt, vorhanden sein. Daneben sollte das Prodrug nach Eindringen in die Zelle rasch in den Wirkstoff umgewandelt werden. Dies erforderte eine geringere Halbwertszeit im humanen Zelllysate als im humanen Plasma. Als erste Zielverbindungen sollten deswegen die Modell-Dimere **20a-d**, die Modell-Trimere **21a-c** und die Referenzverbindungen der Dimere **20e,f** synthetisiert werden (Abb. 3.1). Die Halbwertszeiten in verschiedenen biologischen und enzymfreien Medien sollten bestimmt werden. Mithilfe dieser Ergebnisse sollte entschieden werden, welche Acyloxybenzyl-Maskierungsgruppe

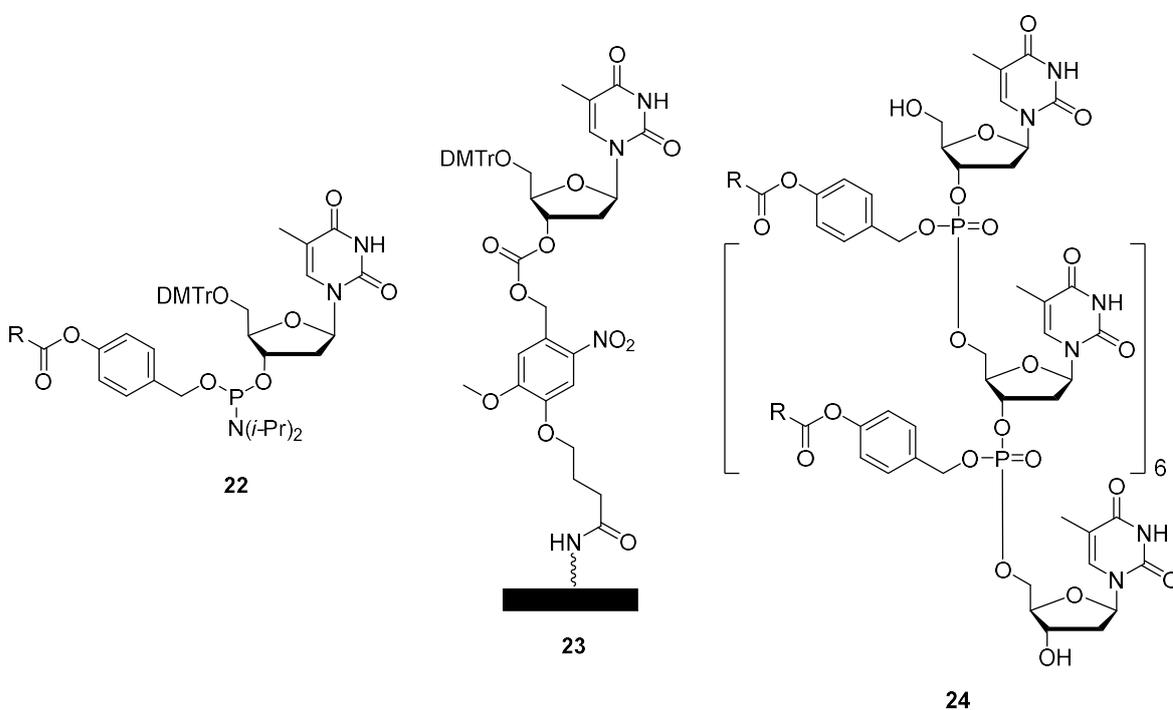
die vielversprechendste ist und welchen Unterschied im Vergleich dazu ein ebenfalls lipophil maskiertes Phosphorthioat ausmacht, von dem literaturbekannt ist, dass es eine höhere Nuclease-Stabilität als native Nucleinsäuren aufweist. Für diese Zwecke wurden als Estergruppen die Acetyl-, die Butyryl- und die Pivaloylgruppe ausgewählt (Abb. 3.1).



**Abb. 3.1:** Modell-Dimere **20a-d**, Modell-Trimere **21a-c** und Referenzverbindungen **20e,f**.

Ein wesentlicher Schritt zur Etablierung der automatisierten Festphasensynthese von ON-Prodrugs war ein unter neutralen Bedingungen spaltbaren Linker darzustellen. Wie bereits erwähnt (Kap.2.4), wird für die automatisierte Festphasensynthese üblicherweise ein Linker verwendet, der unter stark

basischen Bedingungen abgespalten wird. Aufgrund der ausgewählten basenlabilen Maskierungsgruppen der zu verwendenden Phosphoramidite **22** war es für das Erreichen des Zieles dieser Arbeit dringend erforderlich, einen unter milden Bedingungen spaltbaren Linker zu verwenden. Da es keinen kommerziell erhältlichen mild-spaltbaren Linker für die automatisierte Festphasensynthese gibt, sollte der von GREENBERG<sup>[137]</sup> entwickelte photospaltbare Linker synthetisiert werden, der zur Darstellung des Startmaterials **23** die stationäre Phase mit dem Startnucleosid verbinden sollte (Abb. 3.2). Die photolytische Spaltung einer solchen photolabilen Einheit wurde bereits mechanistisch beschrieben (Kap. 2.4).



**Abb. 3.2:** Phosphoramidit **22** und Startmaterial **23** mit photolabilem Linker nach GREENBERG für die Festphasensynthese des Thymidylat-Octamers **24** (R = Me, *t*-Bu, *n*-Pr)

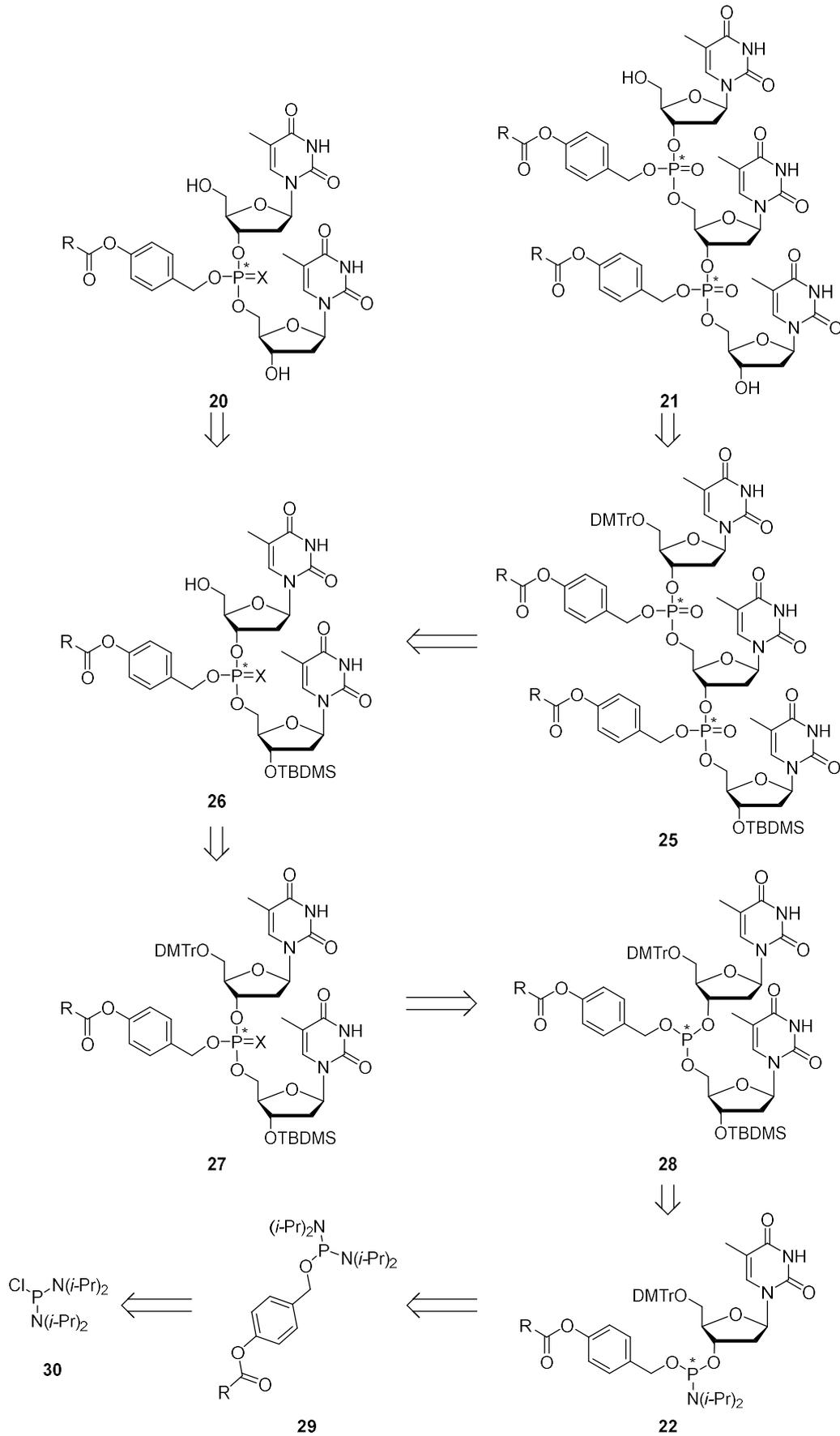
Im weiteren Verlauf sollte die automatisierte Oligonucleotid-Synthese (Abb. 2.19) der basenlabilen Maskierungsgruppe angepasst werden und dazu jeglicher Gebrauch von Basen und Wasser umgangen werden. Abgesehen von der Synthese des photolabilen Linkers sollte hierzu neben dem Cappingmaterial, das standardmäßig 2,6-Lutidin, *N*-Methylimidazol und Essigsäureanhydrid enthält, auch das gängige Oxidationsmittel, bestehend aus Iod, Wasser und Pyridin, ersetzt werden. Als Modell-Oligomer sollte ein T-Octamer **24** dargestellt werden,

dessen sieben Phosphat-Einheiten AB-modifiziert sein sollten (*Abb. 3.2*). Für die Synthese von gemischten Basensequenzen wären mild spaltbare Schutzgruppen für die exocyclischen Aminofunktionen von Adenin, Guanin und Cytosin nötig. Auch hierzu sollten erste explorative Arbeiten durchgeführt werden.

## 3.2 Planung und retrosynthetische Betrachtungen

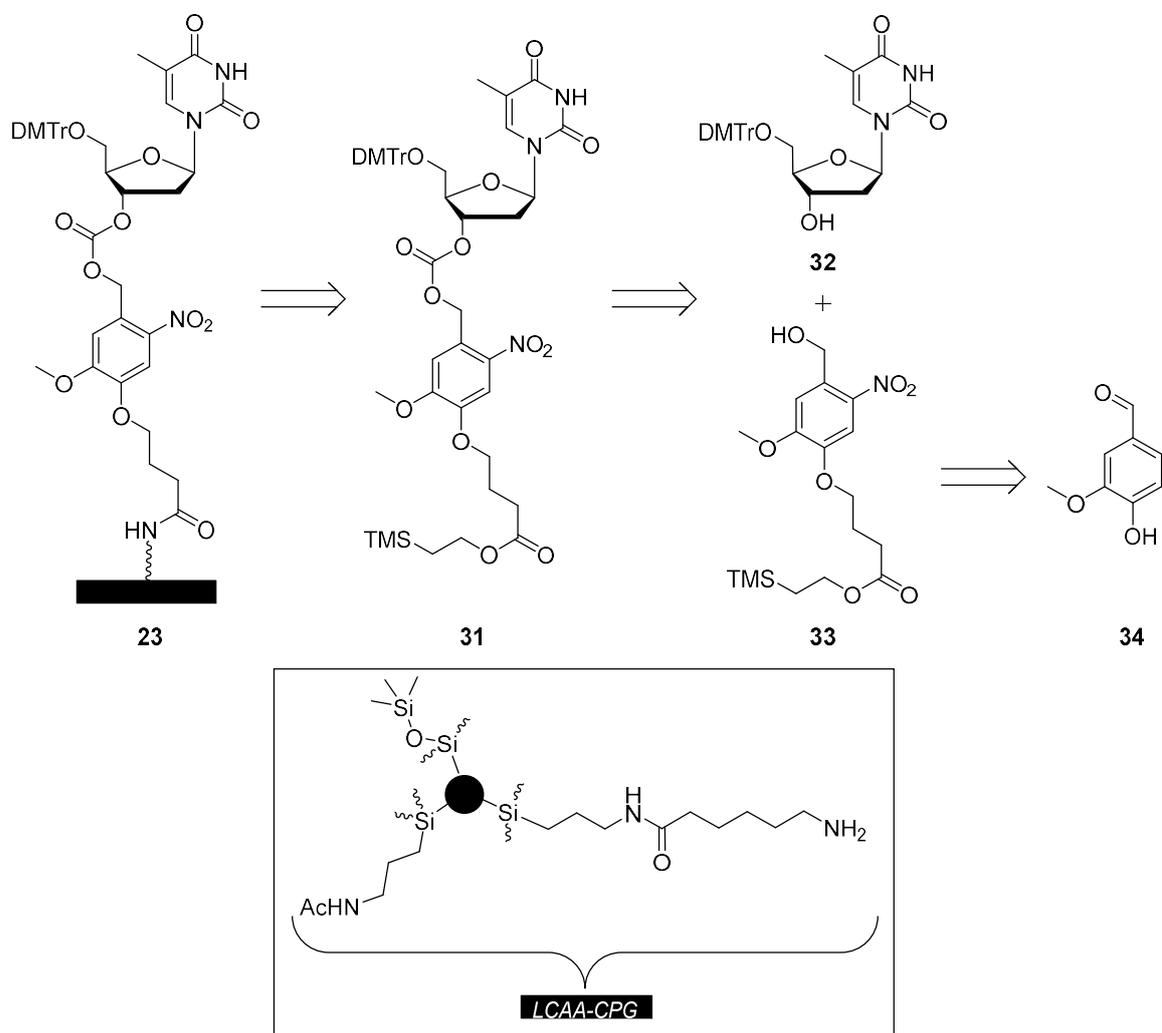
Die Synthese der Modellverbindungen **20a-d** und **21a-c** sollte in Lösung und unter Verwendung üblicher Schutzgruppenstrategie für DNA-Synthese nach folgender Retrosynthese ablaufen (*Abb. 3.3*). Die Modelltrimere **21** sollten sich nach global saurer Entschützung aus den 5'-O-DMTr-3'-O-TBDMS-geschützten Trimeren **25** darstellen lassen. Die Trimere **25** sollten aus den 3'-O-TBDMS-Dimeren **26**, die als Vorstufen für die Modelldimere **20** dienen, und den Phosphoramiditen **22** und durch anschließende Oxidation aufgebaut werden. Für die Darstellung der Modelldimere **20** sollte einzig eine TBDMS-Entschützung ausgehend von den Dimeren **26** oder eine global saure Entschützung ausgehend von den Dimeren **27** folgen. Die benötigte Vorstufe **26** sollte durch eine mild saure DMTr-Entschützung von Dimer **27** dargestellt werden, wobei die TBDMS-Schutzgruppe für die Darstellung der Trimere **25** erhalten bleiben sollte. Durch Oxidation sollte das Phosphat oder Phosphorthioat **27** ausgehend von Phosphit **28** dargestellt werden. Für die Synthese der Phosphite **28** sollten die Phosphoramidite **22**, die ebenfalls für die Oligonucleotid-Synthese am Synthesizer eingesetzt werden sollten, unter mild saurer Aktivierung mit dem zuvor nach einer im Arbeitskreis DUCHO bereits etablierten Synthese dargestellten 3'-O-TBDMS-Thymidin umgesetzt werden. Die Phosphoramidite **22** sollten ebenfalls unter mild saurer Aktivierung durch Substitution der Phosphordiamidite **29** mit 5'-O-DMTr-Thymidin **32** (*Abb. 3.4*), das nach einer im Arbeitskreis DUCHO bekannten Vorschrift synthetisiert werden sollte, dargestellt werden. Um die Phosphordiamidite **29** zu erhalten, sollte das kommerziell erhältliche Bis(diisopropylamino)chlorphosphin **30** mit den zuvor synthetisierten *p*-Acyloxybenzylalkoholen, also den Maskierungsgruppen, umgesetzt werden.

Wie es auch für die herkömmlichen Cyanoethyl-Amidit-Reagenzien der Fall ist, werden die Amidite **22**, die Phosphite **28** und die Phosphate **20**, **26** und **27** aufgrund des Stereozentrums am Phosphoratom als ein Gemisch von zwei Diastereoisomeren erhalten.



**Abb. 3.3:** Retrosynthese der Modellverbindungen **20** und **21** (*R* = Me, *t*-Bu, *n*-Pr; *X* = O, S).

Eine Trennung dieser Diastereomere ( $R_P/S_P$ ) wurde für die Modelldimere **20** angestrebt, um die Isomere getrennt voneinander den Stabilitäts-Testungen zu unterziehen, um mögliche Unterschiede in den Stabilitäten zu untersuchen. Da jede weitere Einführung einer AB-Modifikation in ein Nucleotid-Rückgrat zwei weitere Diastereomere erzeugt, sollten die Trinucleotide **21** als ein Gemisch aus vier Diastereomeren für die Stabilitäts-Testungen eingesetzt werden. Die Testungen sollten für alle synthetisierten Modellverbindungen in enzymfreiem Phosphatpuffer, in humanem und ergänzend auch in bakteriellem Zelllysate und in humanem Plasma durchgeführt werden.

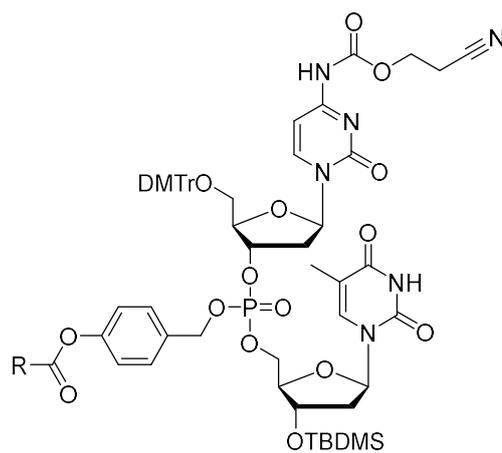


**Abb. 3.4:** Retrosynthese des photolabilen festphasengebundenen Thymidin-Bausteins **23** nach GREENBERG.<sup>[137]</sup>

Der photolabile Linker **33** und das daraus resultierende Startmaterial **23** für die automatisierte Festphasensynthese von Oligonucleotiden sollte angelehnt an die Vorschrift von GREENBERG<sup>[137]</sup> dargestellt werden (*Abb. 3.4*).

Als feste Phase sollte LCAA-CPG (long chain alkyl amine – controlled pore glass) verwendet werden (*Abb. 3.4*). Für den Aufbau des festphasengebundenen Thymidin-Bausteins **23** sollte die Aminofunktion der festen Phase mit der Thymidin-Linker-Einheit **31**, deren Säurefunktion zuvor noch zu einem Aktivester umgesetzt werden sollte, in Gegenwart von Kupplungsreagenzien eine Amidkupplung eingehen. Reste von reaktiven Aminogruppen des CPGs sollten gecappt werden, damit diese keine weiteren Reaktionen während der ON-Synthese eingehen können. Die Darstellung der Thymidin-Linker-Einheit **31** sollte über eine Carbonatsynthese erfolgen. Hierzu sollte das zuvor dargestellte 5'-O-DMTr-Thymidin **32** über eine Carbonat-Einheit mit dem Linker **33** verknüpft werden. Der Linker **33** sollte in mehreren Stufen ausgehend vom kommerziell erhältlichen Vanillin **34** erhalten werden.

Wie schon in der Zielsetzung erwähnt, sollten aufgrund der Basenlabilität der AB-Maskierungseinheiten in der automatisierten Festphasensynthese von Pro-Oligonucleotiden nicht nur die stationäre Phase mit dem photolabilen Linker, sondern auch die Reagenzien für die Oxidation und das Capping ausgetauscht werden.



35

R = Me, *t*-Bu oder *n*-Pr

**Abb. 3.5:** Cytidin<sup>Ceoc</sup>- Thymidin-Prodrug-Modell **35**.

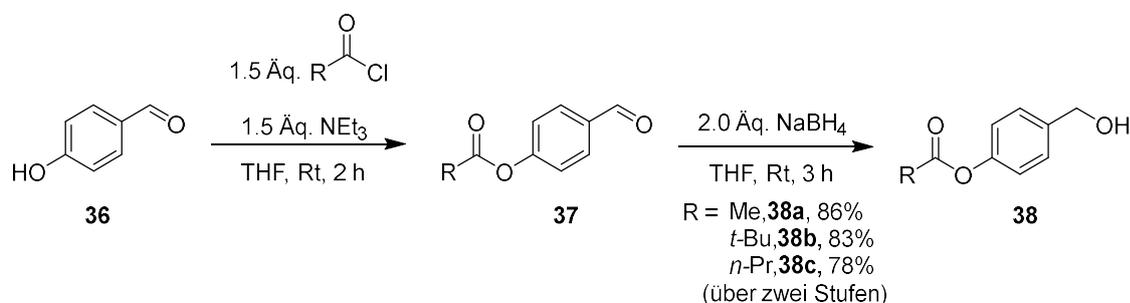
Als mögliches alternatives Oxidationsmittel sollte eine Lösung aus *tert*-Butylhydroperoxid in Toluol untersucht werden und der Capping-Schritt sollte durch einen weiteren Kupplungs-Schritt mit einem reaktiven Phosphoramidit ersetzt werden. Für erste Untersuchungen von mild abspaltbaren Schutzgruppen für die exocyclische Aminofunktion der anderen drei Nucleobasen sollte die von SUTHERLAND<sup>[139]</sup> und Mitarbeitern verwendete Cyanoethyloxycarbonyl-(Ceoc)-Schutzgruppe verwendet werden. Diese Schutzgruppe sollte sich durch die nicht-nucleophile Base DBU abspalten lassen. Hierzu sollte das Cytidin<sup>Ceoc</sup>-Thymidin-Modell-Dimer **35** (*Abb. 3.5*), angelehnt an die zuvor retrosynthetisch beschriebene Synthese von Dinucleotiden, dargestellt werden. Modell-Dimer **35** sollte den SUTHERLAND-Entschützungsbedingungen ausgesetzt werden, um die Kompatibilität dieser Bedingungen gegenüber einer Maskierungsgruppe zu untersuchen.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Synthese und Untersuchungen von lipophil maskierten Di- und Trinucleotiden als Modellverbindungen

#### 4.1.1 Synthese

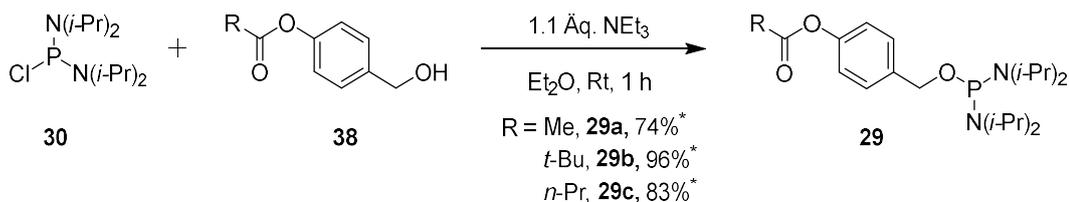
Für die Synthese der Phosphordiamidite **29a-c** (Abb. 4.2) wurden die Alkohole **38a-c** benötigt. Die Synthese der Alkohole **38a-c** erfolgte nach einer Vorschrift von JANDA und Mitarbeitern<sup>[140]</sup> ausgehend von 4-Hydroxybenzaldehyd **36** und ist in Abb. 4.1 dargestellt.



**Abb. 4.1:** Synthese der Acyloxybenzyl-Maskierungseinheiten **38a-c**.

Zu Beginn wurde 4-Hydroxybenzaldehyd **36** mit einem Säurechlorid in Gegenwart von Triethylamin als Base nahezu quantitativ zu den Benzaldehyden **37a-c** verestert. Eine Reinigung war nach diesem Schritt nicht notwendig. Durch Reduzierung der Benzaldehyde **37a-c** mit Natriumborhydrid wurden die Alkohole **38a-c** erhalten. Die Ausbeuten lagen nach zwei Stufen und anschließender Reinigung zwischen 78% und 86%.

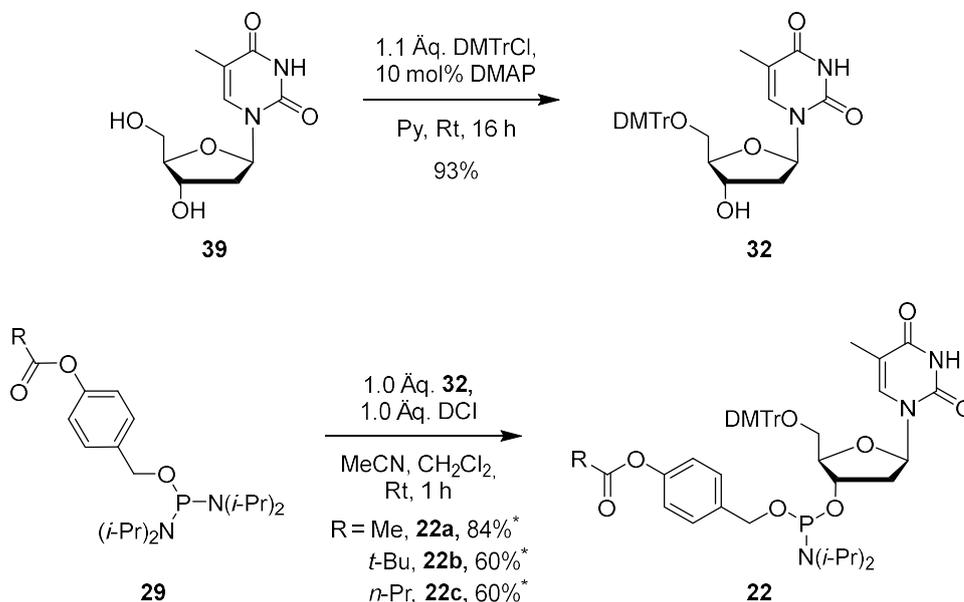
Die Synthese der Phosphordiamidite **29a-c** und Amidite **22a-c** erfolgte ebenfalls nach einer bekannten Syntheseroute (Abb. 4.2).<sup>[141]</sup> Das kommerziell erhältliche Bis(diisopropylamino)chlorphosphin (**30**) wurde hierzu mit den Alkoholen **38a-c** in Gegenwart von Triethylamin umgesetzt, wie in Abb. 4.2 dargestellt ist.



**Abb. 4.2:** Synthese der Phosphordiamidite **29a-c** (\* Ausbeuten durch Integration der  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren berechnet).

Hierbei war die Reihenfolge der Eduktzugabe wichtig, da ein Überschuss an Alkohol **38** zu einer Zweifachsubstitution am Phosphoratom führte. Um dies zu vermeiden wurden das Phosphin **30** und die Base vorgelegt und der Alkohol in Lösung zugetropft. Da es sich sowohl bei den Edukten als auch bei den Produkten um generell oxidationsempfindliche und sehr hygroskopische Verbindungen handelte, die in Gegenwart von Wasser zum jeweiligen H-Phosphonat reagieren, musste unter striktem Wasserausschluss gearbeitet werden. Deshalb bestand die Aufarbeitung einzig in der Fällung des als Nebenprodukt entstandenen Triethylammoniumchlorids mit abs. *n*-Hexan, wobei das Salz über eine Umkehrfritte abfiltriert wurde. Die angegebenen Ausbeuten wurden durch Integration des in  $\text{C}_6\text{D}_6$  gemessenen  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrums des Rohproduktes berechnet. Bei den nicht abtrennbaren Nebenprodukten handelte es sich zum einen um geringe Rückstände des Eduktes **30** und zum anderen um hydrolysierte Formen des Phosphins **30** und der Diamidite **29**. Es konnte im Falle des Diamidits **29a** eine Ausbeute von 74% berechnet werden. Für das Diamidit **29b** konnte sogar eine Ausbeute von 96% berechnet werden. Im Falle des Diamidits **29c** konnte eine Ausbeute von 83% berechnet werden. Es zeigte sich, dass der Einsatz von DIPEA als Base anstelle des Triethylamins die Ausbeute von Diamidit **29a** nicht verbessern konnte. Die Reaktionszeit von 16 h, wie es in der Literatur zu finden war, auf 1 h herabzusetzen, verbesserte jedoch die Ausbeute erheblich. In diesem Fall konnte die Bildung der H-Phosphonate von ca. 30% auf 3%-11% reduziert werden. Eine DC-Reaktionskontrolle wies nach bereits einer Stunde auf einen kompletten Verbrauch des Alkohols **38a** hin.

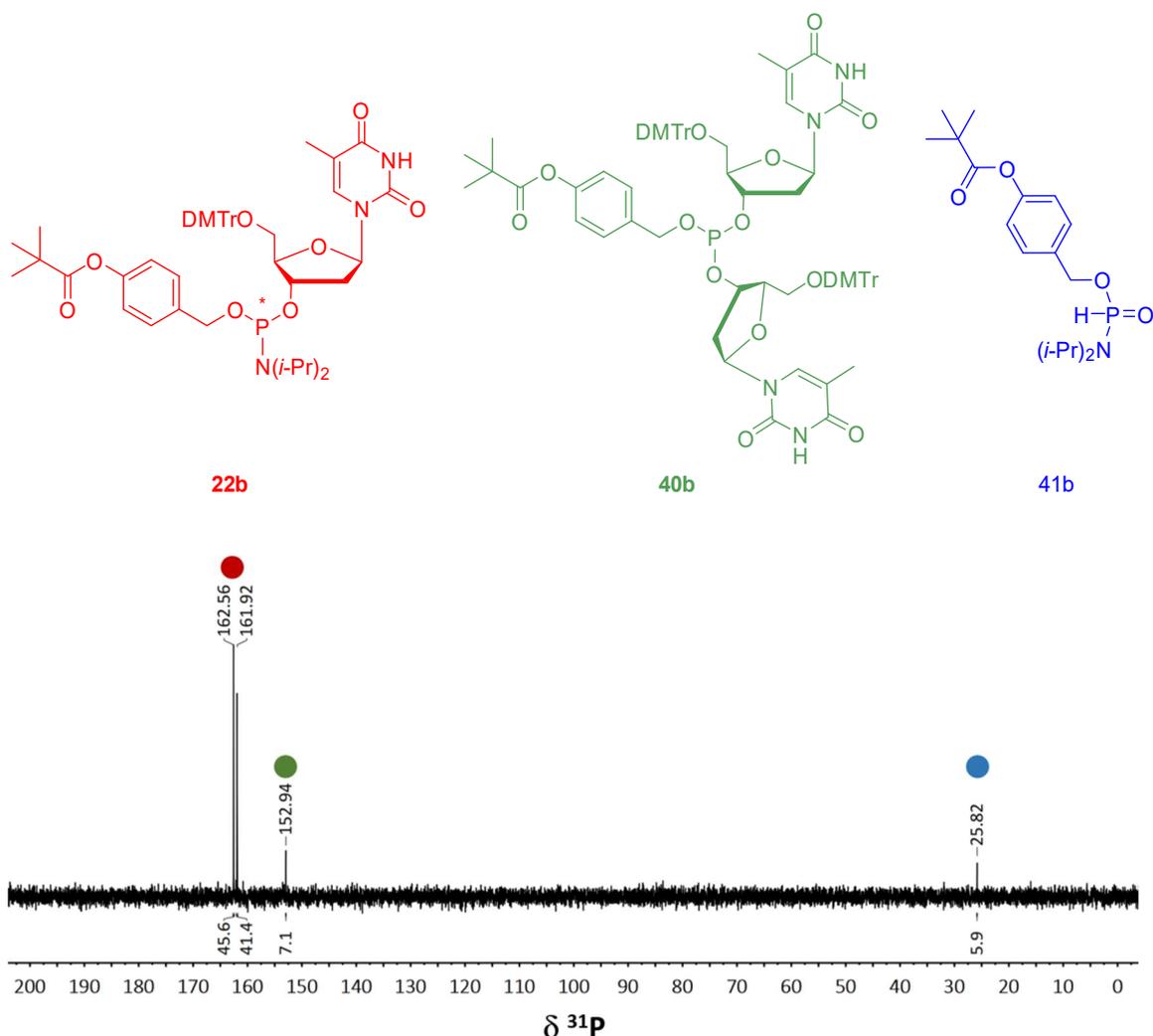
Für die Synthese der Amidite **22a-c** wurde 5'-O-DMTr-Thymidin **32** benötigt, das zuvor nach einer im Arbeitskreis bekannten Vorschrift<sup>[142]</sup> ausgehend von Thymidin **39** synthetisiert wurde.



**Abb. 4.3:** Synthese der Phosphoramidite **22a-c** (\* Ausbeuten durch Integration der <sup>31</sup>P-NMR-Spektren berechnet).

Die Synthese lief in abs. Pyridin in Gegenwart von DMAP ab. Die Verwendung der DMTr-Schutzgruppe ist Standard in der Nucleotidchemie, da sie bereits unter mild-sauren Bedingungen wieder abgespalten werden kann. Diese Tatsache wirkt sich vorteilhaft auf die automatisierte Festphasensynthese von Oligonucleotiden aus, da milde Reagenzien während der Oligonucleotidsynthese die Phosphatester nicht spalten. Außerdem ermöglicht das freiwerdende, farbige Tritylkation beim Detritylierungsschritt eine photochemische Ausbeutenbestimmung des Oligomers. 5'-O-DMTr-Thymidin **32** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 93% erhalten werden. Der Zusatz von 1% Pyridin im Eluenten verhinderte die Abspaltung der DMTr-Gruppen durch das leicht saure Kieselgel. Die Umsetzung von 5'-O-DMTr-Thymidin **32** mit den Diamiditen **29a-c** lieferte die Phosphoramidite **22a-c**. Auch diese Reaktion musste aufgrund der hygroskopischen Verbindungen unter Inertgas ablaufen, jedoch ist das Produkt für begrenzte Zeit an Luft stabil und deswegen chromatographierbar. Als Aktivator wurde, wie auch standardmäßig am DNA-Synthesizer,

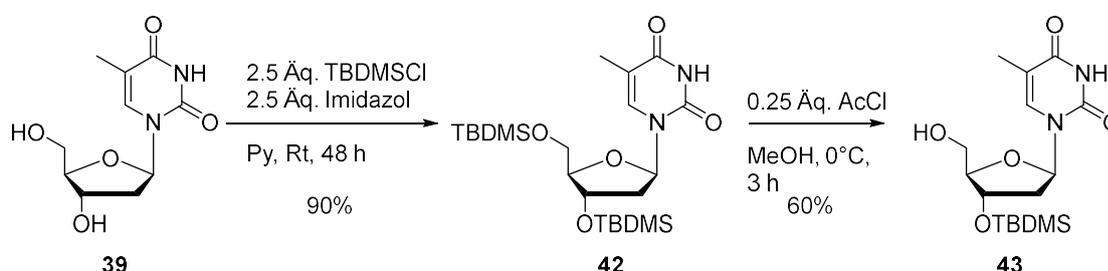
4,5-Dicyanoimidazol (DCI) verwendet. Die besten Ausbeuten wurden bei Verwendung von 1.0 Äq. DCI erhalten. Bei den Versuchen mit 0.5 Äq. und 0.75 Äq. wurden nur Ausbeuten unter 50% erhalten. Auch hier hat sich mithilfe einer DC-Reaktionskontrolle gezeigt, dass die Reaktion bereits nach 1 h beendet war. Damit das Amidit mit so wenig Luft wie möglich in Kontakt kam, wurde eine schnelle säulenchromatographische Reinigung mit wenig Kieselgel durchgeführt. Um die DMTr-Schutzgruppe vor den leicht sauren Eigenschaften des Kieselgels zu schützen, wurde erneut 1% Pyridin als Eluentzusatz zum Laufmittel dazu gegeben. Auf diese Weise wurde das DCI aus dem Reaktionsgemisch entfernt, ohne dass das Amidit gespalten wurde.



**Abb. 4.4:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum von Amidit **22b** in  $\text{C}_6\text{D}_6$  (Integrale auf insgesamt 100 normiert).

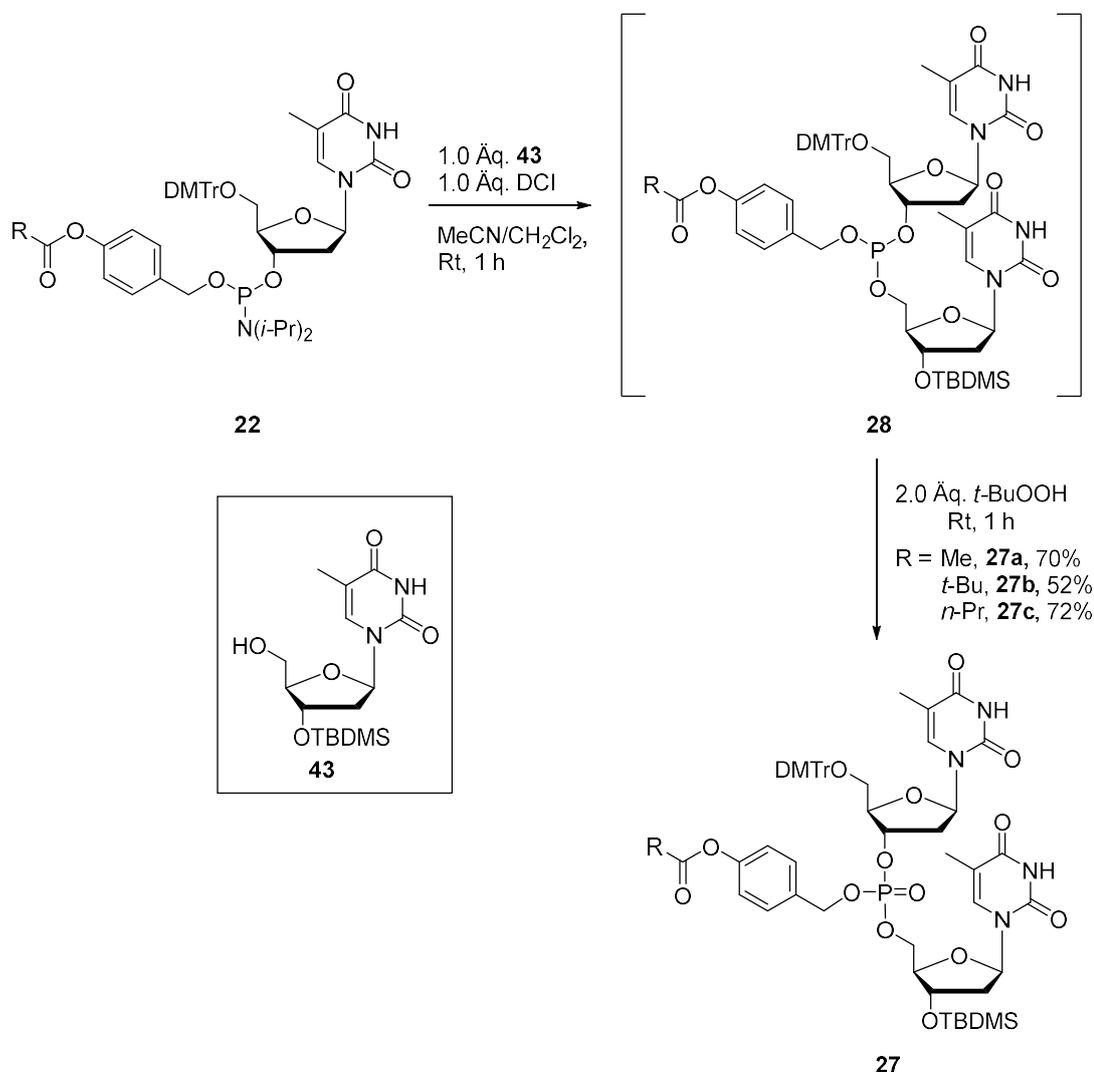
Durch Lösen des Reaktionsgemisches in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und anschließender Fällung des Produktes mit auf  $0^\circ\text{C}$  gekühltem *n*-Hexan wurde die Ausbeute in einigen

Fällen verbessert und die Menge an H-Phosphonaten reduziert. In *Abb. 4.4* ist ein in Benzol- $d_6$  gemessenes  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum von Amidit **22b** nach dieser Kristallisation dargestellt. Die Produktpeaks (*Abb. 4.4*, rot) der beiden Diastereomere ( $R_P/S_P$ ) des Amidits **22b** resonierten bei 162.56 ppm und 161.92 ppm. Des Weiteren weist der Peak bei 25.81 ppm auf das H-Phosphonat **41b** (*Abb. 4.4*, blau) hin, das durch Hydrolyse des Eduktes (Phosphordiamidit **29b**) gebildet wurde. In einigen Fällen wurde ein weiterer Peak bei 152.94 ppm detektiert. Dieser wurde aufgrund der Verschiebung und der Tatsache, dass keine zwei Peaks und somit offensichtlich keine Isomere vorliegen, dem Nebenprodukt **40b** (*Abb. 4.4*, grün) zugeordnet. Hierbei handelt es sich um ein Phosphit, das in einigen Fällen aufgrund geringer Überschüsse von 5'-O-DMTr-Thymidin **32** während der Amiditsynthese gebildet wurde. Somit wurde gezeigt, dass die benötigten Amidite **22a-c** für die automatisierte Oligonucleotid-Synthese synthetisiert und hinreichend gereinigt werden konnten. Im Hinblick auf die Modellverbindungen (*Abb. 4.12*) wurde daraufhin versucht, das Phosphat **27a** in einem Reaktionsansatz ausgehend vom Phosphordiamidit **29a** zu synthetisieren (*Abb. 4.6*). Für die Darstellung der Phosphate **27** wurde 3'-O-TBDMS-Thymidin **43** benötigt, das nach einer bekannten Synthese<sup>[142]</sup> ausgehend von Thymidin(**39** synthetisiert wurde. Wie in *Abb. 4.5* abgebildet ist, wurde Thymidin **39** mit einem Überschuss TBDMSCI und Imidazol zu dem zweifach silylgeschützten Thymidin-Derivat **42** umgesetzt. Für die selektive Entschützung des primären Alkohols wurde eine Methode gewählt, bei der in situ HCl freigesetzt wurde. Hierzu wurde das Thymidin-Derivat **42** in Methanol gelöst und Acetylchlorid zugetropft.



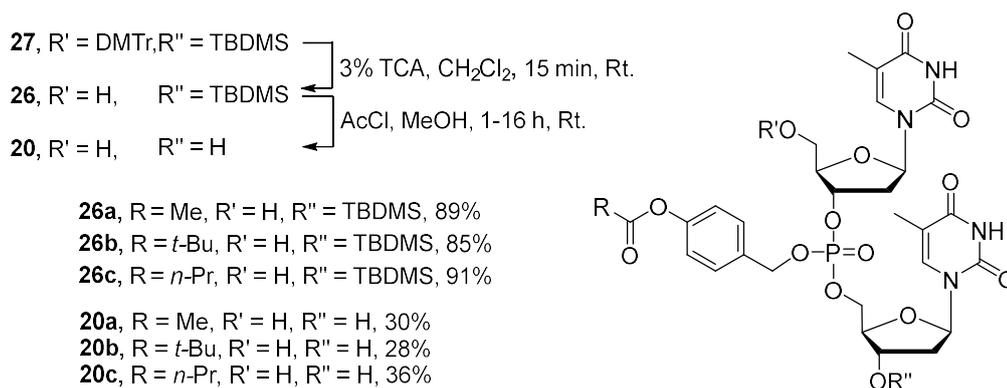
**Abb. 4.5:** Synthese von 3'-O-TBDMS-Thymidin **43**.

Eine DC-Kontrolle zeigte an, wann die Entschützung des sekundären Alkohols begann und wann die Reaktion gestoppt werden musste, um nicht wieder Thymidin (**39**) durch 3'-O-Desilylierung zu erhalten. Deswegen war eine höhere Ausbeute als 60% nicht erreichbar. Bei den ersten Versuchen zur Synthese der Phosphatester wurde versucht, das Phosphat **27a** in einer Einstufenreaktion ausgehend vom Phosphordiamidit **29a** darzustellen. Da es sich bei den Phosphorverbindungen einschließlich den Phosphiten **28** um oxidationsempfindliche und hygroskopische Verbindungen handelte, sollte auf diese Weise die Isolierung und Reinigung der Zwischenprodukte **22** und **28** umgangen werden und die Reaktion direkt bis zum stabilen Phosphatriester ablaufen.



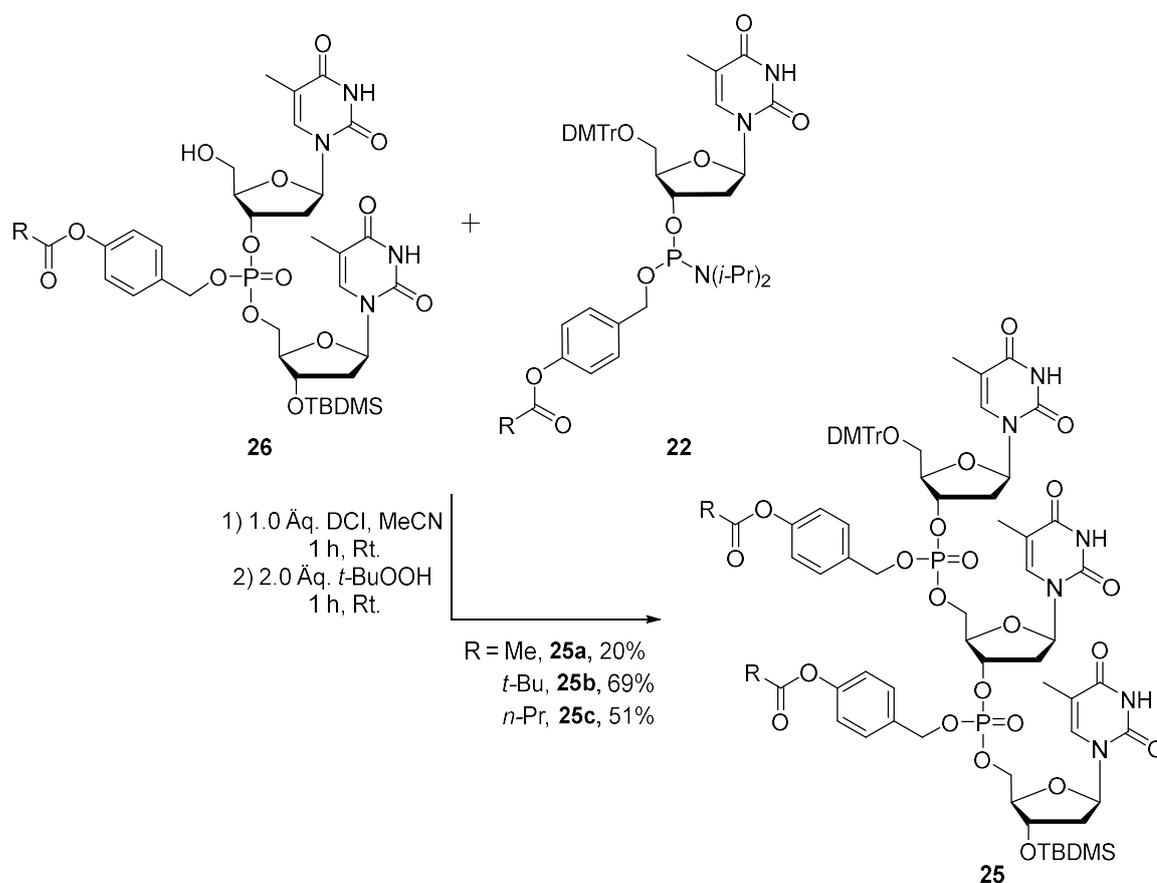
**Abb. 4.6:** Synthese der Phosphate **27a-c**.

Somit konnte der Katalysator DCI zur Vermittlung von zwei Reaktionsschritten dienen. Die Reinigung und Isolierung des Phosphats **27a** erwies sich jedoch als aufwendig und nicht zufriedenstellend, da es nicht gelang, die Nebenprodukte durch säulenchromatographische Reinigung vollständig abzutrennen. Bei den Nebenprodukten handelte es sich vermutlich um 5'-5'- und 3'-3'-verknüpfte Phosphattriester. Ausgehend von diesen Befunden wurde entschieden, die Phosphate **27** mit einem Zwischenschritt über die Amidite **22**, deren Synthesen bereits beschrieben wurden (*Abb. 4.3*), aber weiterhin ohne Isolierung der Phosphite **28** darzustellen. (*Abb. 4.6*). Die so dargestellten Phosphate **27** konnten säulenchromatographisch gereinigt und in Ausbeuten zwischen 52% und 72% über zwei Schritte erhalten werden. Die Basenlabilität wurde deutlich, nachdem versucht wurde, das Reaktionsgemisch vor der Säulenchromatographie mit unterschiedlich konzentrierten Natriumhydrogencarbonat-Lösungen auszuschütteln. Jeglicher Kontakt mit wässrig-basischer Lösung führte zur Abspaltung der Maskierungsgruppe, was nach der chromatographischen Reinigung durch  $^1\text{H-NMR}$  nachgewiesen wurde. Wurde der Schritt des Ausschüttelns übersprungen, konnten nach der Säulenchromatographie die Phosphate **27** isoliert werden. Aufgrund der Tatsache, dass die angestrebten langkettigen ON-Prodrugs im Gegensatz zu den Phosphaten **27** keine lipophilen Schutzgruppen am 3'- und 5'-Ende tragen sollen, wurden Entschützungsversuche mit DC-Kontrolle unternommen, um Modellverbindungen für ON-Prodrugs zu erhalten. Versuche der globalen Entschützung führten unter milden Bedingungen, wie 3% TCA in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , jedoch nur zur DMTr-Entschützung. Diese Reagenzien wurden gewählt, da sie auch am DNA-Synthesizer verwendet werden. Versuche mit fluoridhaltigen Verbindungen, wie TBAF oder  $\text{NH}_4\text{F}$  in THF, führt überwiegend zur Abspaltung der Prodrug-Einheit. Deswegen wurde versucht, die Schutzgruppen in zwei Schritten zu entfernen (*Abb. 4.7*). Da Phosphat **26** für die Synthese der Trinucleotide benötigt wurde, stellte sich diese Variante als äußerst nützlich heraus. Somit wurde zuerst die DMTr-Schutzgruppe entfernt, indem Phosphat **27** für 15 min in einer TCA- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Lösung gerührt wurde. Die Ausbeuten lagen nach chromatographischer Reinigung zwischen 85% und 91%. Die Abspaltung der TBDMS-Gruppe fand in Gegenwart von Acetylchlorid in MeOH statt.



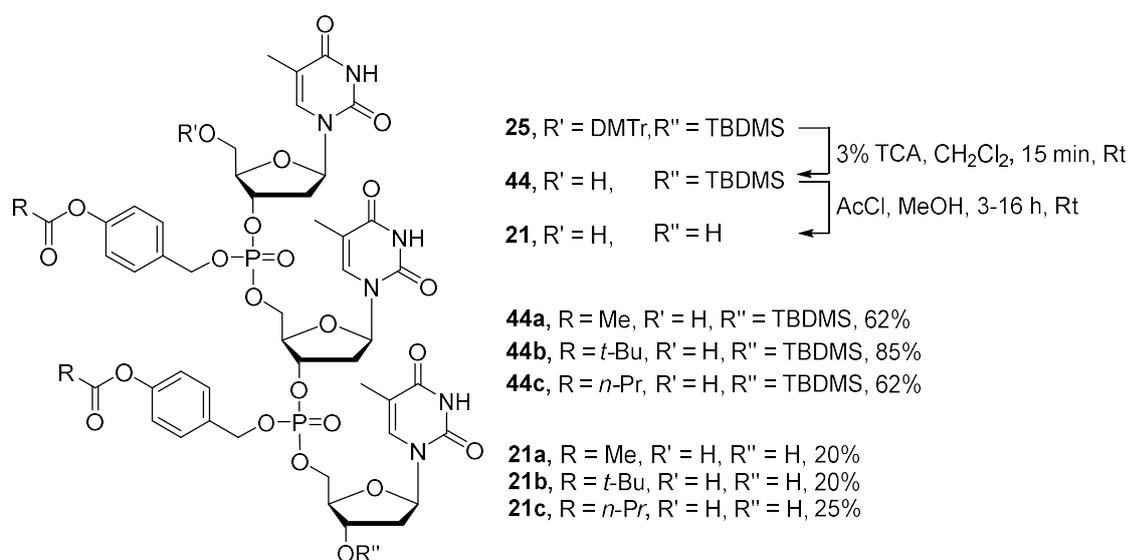
**Abb. 4.7:** Entschützungen zu den Dinucleotid-Modellverbindungen **20a-c**.

Diese milde Spaltungsmethode setzt, wie oben schon erwähnt, HCl in situ frei. Mithilfe einer DC-Kontrolle wurde die Reaktion verfolgt und der Moment abgepasst, an dem die Abspaltung der Maskierungsgruppe begann. Nach präparativer HPLC-Reinigung konnten Ausbeuten von 28% bis 36% erhalten werden (*Abb. 4.7*).



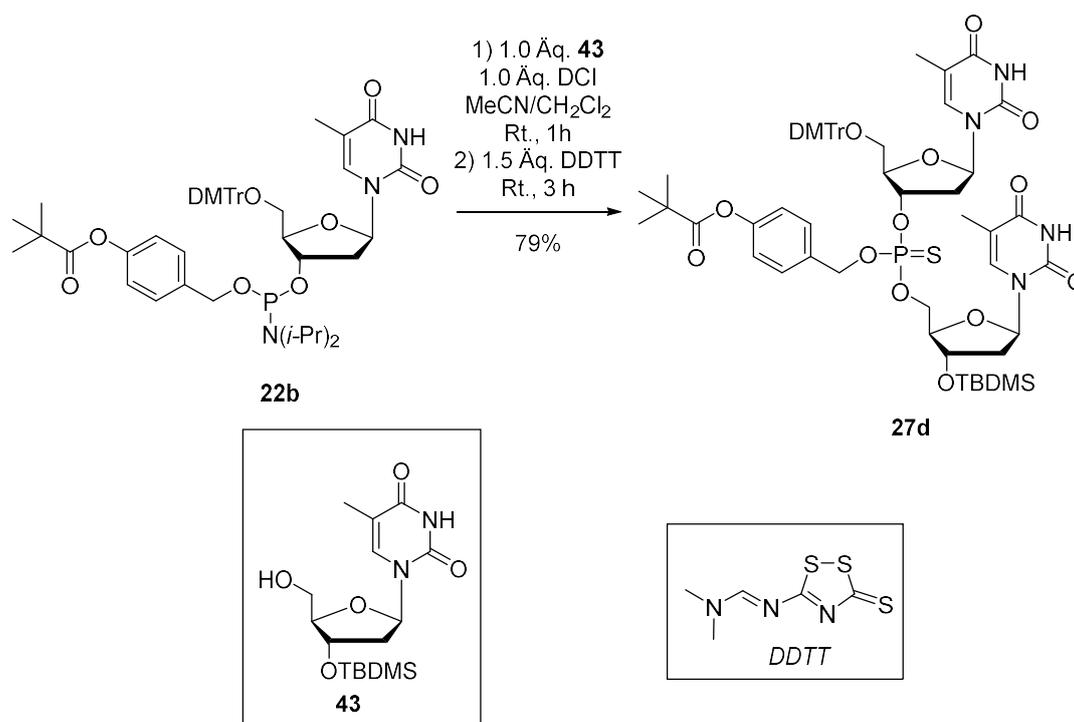
**Abb. 4.8:** Synthese der Trinucleotide **25a-c**.

Für die erhaltenen Modell-Dinucleotide **20a-c** gelang dabei jeweils eine Trennung der Diastereomere  $R_P/S_P$  mittels präparativer HPLC, wobei die Konfiguration am Phosphoratom nicht zugeordnet werden konnte. Die Diastereomere wurden deswegen nach ihrem Elutionsverhalten lediglich mit **fast** und **slow** bezeichnet. Außerdem konnte als Nebenprodukt die Referenzsubstanz **20e** isoliert werden. Die Synthese der Trinucleotid-Modellverbindungen **21a-c** erfolgte auf ähnlichem Weg, wobei jeweils ein Gemisch aus vier Diastereomeren erhalten wurde, die nicht chromatographisch getrennt werden konnten. Hierfür wurde zuerst Phosphat **26** mit Phosphoramidit **22** in Gegenwart von DCI und im zweiten Schritt mit *t*-Butylhydroperoxid zum Phosphat und damit zum Trinucleotid **25** umgesetzt (Abb. 4.8). Das Phosphit als Intermediat wurde erneut nicht isoliert. Die Ausbeuten lagen nach zwei Schritten zwischen 20% und 69%. Wie schon bereits bei den Dinucleotiden wurden auch die Trinucleotide in zwei Schritten entschützt (Abb. 4.9). Die DMTr-Entschützung wurde erneut mit einer TCA-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Lösung durchgeführt. Die Ausbeuten für die Synthese der TBDMS-Trinucleotide **44** lagen zwischen 62% und 85%. Für die Synthese der Modell-Trimere **21** wurde schlussendlich eine TBDMS-Entschützung erneut mit Acetylchlorid in MeOH durchgeführt und die Reaktion ebenfalls per DC-Kontrolle verfolgt. Eine anschließende Reinigung mittels präparativer HPLC lieferte Ausbeuten von 20% bis 25%.



**Abb. 4.9:** Entschützen zu den Trinucleotid-Modellverbindungen **21a-c**.

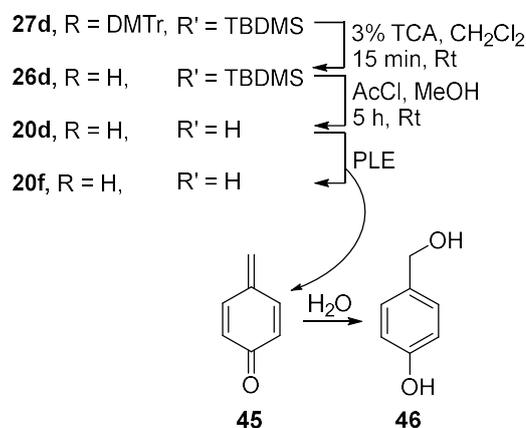
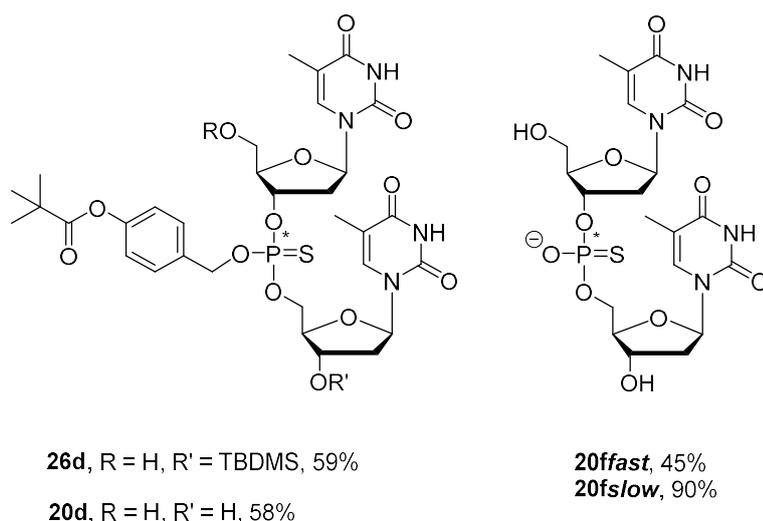
Die Synthese von Verbindung **27d** verlief nach der Vorschrift der Phosphat-Synthese wie bereits oben beschrieben. Der einzige Unterschied lag im Oxidationsmittel. Anstelle der *tert*-Butylhydroperoxid-Lösung wurde DDTT (3-((*N,N*-Dimethylaminomethyliden)amino)-3*H*-1,2,4-dithiazol-5-thion) als Schwefelquelle verwendet (Abb. 4.10).



**Abb. 4.10:** Synthese des Phosphorothioats **27d**.

Das so erhaltene Phosphorothioat **27d** wurde wie oben beschrieben entschützt und die Diastereomere wurden mittels präparativer HPLC getrennt. Das Produkt der Detritylierung konnte in einer Ausbeute von 59% erhalten werden und die TBDMS-Entschützung mit Acetylchlorid in Methanol lieferte die Modellverbindung **20d** in einer Ausbeute von 58% (Abb. 4.11). Nach der Diastereomerentrennung konnten **20d<sub>fast</sub>** und **20d<sub>slow</sub>** erhalten werden. Im Falle der Phosphorothioate war es möglich, nach anschließender Abspaltung der Maskierungsgruppen und Erhalt der Referenzsubstanzen **20f<sub>fast</sub>** und **20f<sub>slow</sub>** (**fast** und **slow** bezogen auf das Verhalten der Edukte **20d<sub>fast/slow</sub>**) zu bestimmen, bei welchem Diastereomer es sich um das *R*<sub>P</sub>- bzw. um das *S*<sub>P</sub>-Isomer handelt. Hierfür musste **20f<sub>fast</sub>** und **20f<sub>slow</sub>** in Gegenwart von Schlangengift-Phosphordiesterase (SVPDE) inkubiert werden, da das

$R_P$ -Diastereomer in diesem Medium 1000-mal schneller hydrolysiert wird als das  $S_P$ -Diastereomer.<sup>[143]</sup> Die genaue Durchführung ist in Kap 7.4.3 beschrieben. Zur Herstellung der Referenzsubstanzen **20fast/slow** (Abb. 4.11) wurden die Dinucleotide **20dfast** und **20dslow** jeweils mit Schweineleber-Esterase (PLE) in Ammoniumbicarbonat-Puffer gerührt. Die Substanzen wurden hierzu portionsweise in gewissen Zeitabständen zu der 37 °C warmen Esterase-Puffer-Lösung gegeben, um das Verhältnis von Edukt und Enzym einigermaßen konstant zu halten. Im Unterschied zu den Stabilitätstests wurde in diesem Fall Ammoniumbicarbonat-Puffer verwendet, da es sich um einen flüchtigen Puffer handelt, der bis auf das enthaltene  $MgCl_2$  vollständig im Vakuum entfernt werden kann. Mittels anschließender präparativer HPLC-Reinigung konnte die Referenzsubstanz **20fast** in einer Ausbeute von 45% und **20slow** in einer Ausbeute von 90% erhalten werden.



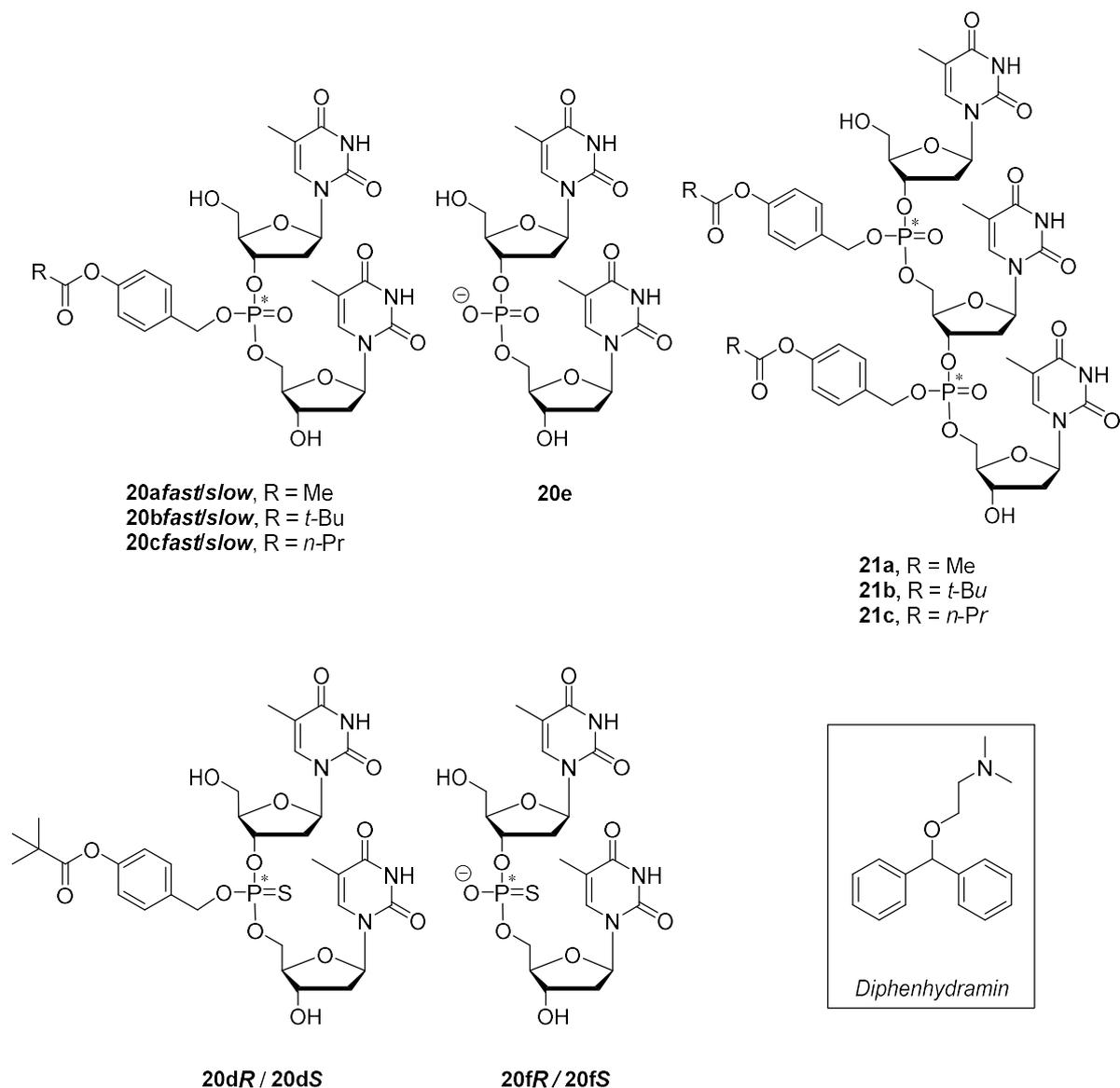
**Abb. 4.11:** Synthese der Dinucleotid-Modellverbindung **20d** und der Referenzsubstanz **20f**.

Es stellte sich heraus, dass es sich bei Verbindung **20ffast** und damit auch bei Verbindung **20dfast** um das  $R_P$ -Isomer handelt, da in Gegenwart von Schlangengift-Phosphodiesterase (SVPDE) eine Halbwertszeit von 12 h für Verbindung **20ffast** bestimmt wurde (Anhang). Bei Verbindung **20fslow** und damit auch bei Verbindung **20dslow** handelt es sich um das  $S_P$ -Isomer, da in dem Mess-zeitraum von 24 h für Verbindung **20fslow** nahezu kein Zerfall beobachtet werden konnte (Anhang).

Bei der Esterhydrolyse der Maskierungseinheit wird ebenfalls das Nebenprodukt **45** freigesetzt (Abb. 4.11). Diese reaktive Verbindung wird dementsprechend auch in Zellen freigesetzt werden, was zu toxischen Nebenwirkungen führen könnte. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass das in der Zelle vorhandenen Wasser und andere Nucleophile das Nebenprodukt **45** u.a. zum Diol **46** umsetzen. Im folgenden Kapitel wird über einen zur Untersuchung der Cytotoxizität durchgeführten MTT-Assay berichtet.

#### 4.1.2 *In-vitro*-Assays

Die synthetisierten Modellverbindungen **20a-d** und **21a-c** und ihre Referenzsubstanzen **20e,f** (Abb. 4.12) wurden auf ihre Stabilitäten bei 37 °C in enzymfreier Phosphatpuffer-Lösung (pH 7.3), in Schweineleberesterase-Puffer-Lösung, in humanem Plasma, in humanem Zelllysate sowie in bakteriellem Zelllysate untersucht. Der nass-chemische Teil der Assays wurde zum größten Teil von Martina Jankowski durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels HPLC-HRMS-Analytik und dem Standard Diphenhydramin (Abb. 4.12). Die resultierenden Diagramme zur Auswertung der Stabilitäts-Untersuchungen in Phosphatpuffer-Lösung, humanem Plasma, in humanem Zelllysate und in bakteriellem Zelllysate befinden sich im Anhang



**Abb. 4.12:** Modell-Dimere **20a-d**, Referenz-Dimere **20e,f** und Modell-Trimere **21a-c**.

Die für die Analytik benötigten Kalibriergeraden wurden jeweils in enzymfreiem Milli-Q-Wasser angesetzt (7.4.3). Für jeden Test wurde eine eigene Kalibriergerade erstellt. Die gemessenen Startkonzentrationen der zu untersuchenden Substanzlösungen lagen in den meisten Fällen über dem berechneten Wert von  $3.3 \mu\text{M}$ , teilweise bei bis zu  $10 \mu\text{M}$ . Somit ist von massenspektrometrischen Matrixeffekten durch die verschiedenen Medien auszugehen. Um Störungen durch derartige Matrixeffekte zu kompensieren, wurde durch eine rechnerische Korrektur die Startkonzentration (bei 0 min) der zu testenden Substanz eines jeden Assays auf  $3.3 \mu\text{M}$  normiert. Die

Konzentrationen der darauffolgenden Proben wurden der Starkkonzentration mit dem gleichen Korrekturfaktor angepasst.

Eine kommerziell erworbene Trinucleotid-Referenzsubstanz (TpTpT), die auch während der Inkubation der Trimer-Modellverbindungen **21a-c** freigesetzt werden sollte, konnte nicht per HPLC-HRMS-Analytik nachgewiesen werden, sondern konnte nur bei Direktinjektion im HRMS detektiert werden. Somit schien das Problem der Detektion des Trinucleotids mittels HPLC-HRMS-Analytik an dessen Elutionsverhalten von der C<sub>18</sub>-Säule zu liegen. Ein Grund hierfür könnte in der hohen Hydrophilie des Trinucleotids und einer dadurch bedingten geringen Retention liegen, sodass das Trinucleotid während der ersten 90 s eluiert, für die aufgrund der Inline-Entsalzung keine MS-Detektion erfolgen kann. Um die Entstehung des Trinucleotids nachzuweisen, könnte in Folgearbeiten mit HPLC-UV-Analytik gearbeitet werden. Eine UV-Detektion sollte das Trinucleotid, auch im Falle einer schnellen Elution, nachweisen können. Da UV-Detektion weniger empfindlich ist als eine Detektion mittels MS, wäre es hierfür angebracht die Assay-Mischungen hoch zu skalieren, sodass nach der Aufarbeitung und erneutem Lösen der Proben für MS-Analytik die Probenkonzentrationen höher sind. Die mittels HPLC-Analytik nachgewiesenen Fraktionen könnten aufgefangen und eingengt werden. Eine anschließende MS-Analyse mittels Direktinjektion sollte die entsprechenden Fraktionen den Trimer-Modellverbindungen und dem Trinucleotid zuordnen können. Ebenfalls wäre eine Co-Injektion der Modellverbindung und des Trinucleotids als Identifikationsnachweis möglich. Außerdem besteht bei der HPLC-UV-Analytik die Möglichkeit, Pufferlösungen als Laufmittel zu verwenden, die das Elutionsverhalten des Trinucleotids beeinflussen und zu dessen Retention führen können.

Zur Bestimmung der Halbwertszeiten wurden die ermittelten Konzentrationen der Modell-Prodrugs **20a-d** und der Referenzsubstanzen **20e,f** gegen die Zeit aufgetragen. Es wurde ein Zerfall erster Ordnung angenommen und entsprechend Exponentialfunktionen gefittet (Anhang). Aus den daraus resultierenden Exponentialgleichungen konnte die Halbwertszeit berechnet werden. Die so ermittelten Stabilitäts-Daten (*Tab. 1*) zeigen, dass alle Prodrugs in enzymfreiem Puffer eine deutlich höhere Halbwertszeit aufweisen als im Zelllysät und im Plasma. Außerdem liegt für alle Prodrugs in Esterase-Puffer-

Lösung eine Halbwertszeit von kleiner 0.15 h vor, weswegen nur für **20bfast/slow** die entsprechenden Diagramme im Anhang als Beispiel dargestellt wurden. Die Modellverbindungen **20e,f** hingegen sind in diesem Medium innerhalb der gemessenen 2.5 h nicht zerfallen. Damit ist eine enzymatische Spaltung der Prodrugs in biologischen Medien anzunehmen.

**Tab. 1:** Halbwertszeiten der Modell-Dimere **20a-d**, der Dinucleotide **20e,f** und der Modell-Trimere **21a-c** in verschiedenen Medien [Puffer = enzymfreie Phosphatpuffer-Lösung (pH 7.3), PLE = Schweineleber-Esterase-Pufferlösung (0.25 u/mL, pH 7.3), HumLys = humanes Zelllysate, HumPlas = humanes Plasma, BakLys = bakterielles Zelllysate; Grün = Referenzsubstanzen].

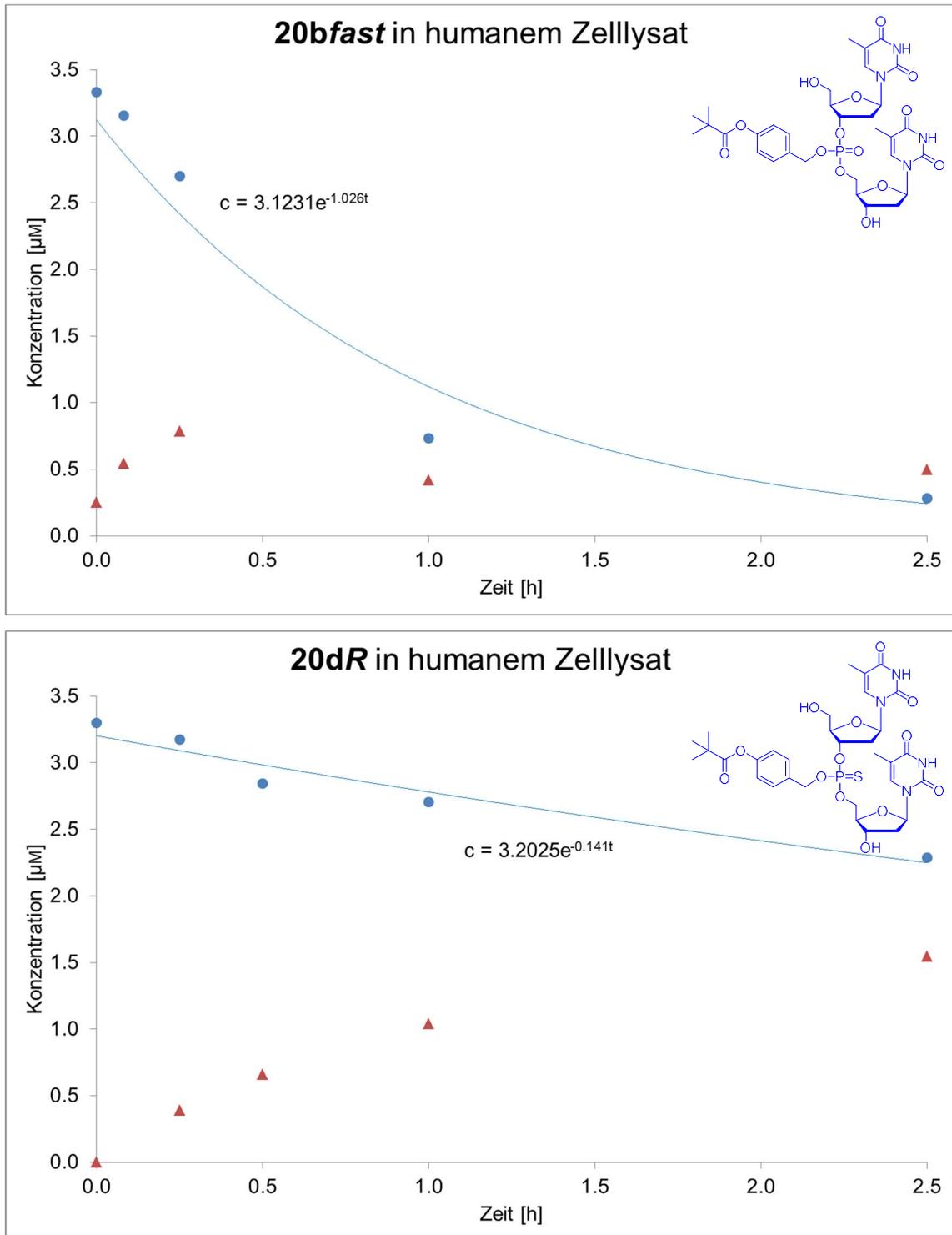
	<b>Puffer</b> [h]	<b>PLE<sup>a</sup></b> [h]	<b>HumLys</b> [h]	<b>HumPlas</b> [h]	<b>BakLys</b> [h]
<b>20afast</b>	4.3	<0.15	<0.15	0.83	1.3
<b>20aslow</b>	4.0	<0.15	<0.15	0.33	0.67
<b>20bfast</b>	21	<0.15	0.65	2.9	1.7
<b>20bslow</b>	20	<0.15	0.71	2.3	1.5
<b>20cfast</b>	15	<0.15	0.23	1.1	<0.15
<b>20cslow</b>	11	<0.15	0.22	0.62	<0.15
<b>20e</b>	>24 <sup>b</sup>	>2.5 <sup>b</sup>	4.7	6.6	5.8
<b>20dR</b>	>24	<0.15	4.8	5.7	4.5
<b>20dS</b>	>24	<0.15	4.3	5.2	3.3
<b>20fR</b>	>24 <sup>b</sup>	>2.5 <sup>b</sup>	19	70	12
<b>20fS</b>	>24 <sup>b</sup>	>2.5 <sup>b</sup>	28	98	26
<b>21a</b>	19	<0.15	0.11	0.18	0.71
<b>21b</b>	>24	<0.15	0.83	2.7	7.4
<b>21c</b>	>24	<0.15	0.63	1.4	0.16

[<sup>a</sup> Nur Einfachmessungen durchgeführt; <sup>b</sup> Innerhalb der gemessenen Zeit kein Zerfall]

Ebenso ist zu beobachten, dass die Stabilitäten der Prodrugs **20a-d** und **21a-c** und der Dinucleotide **20e,f** im Plasma im Vergleich zu humanem Zelllysate durchgehend geringfügig höher lagen, wobei die jeweilige Zusammensetzung und damit auch die Esterase-Aktivitäten nicht bekannt sind. Außerdem handelt es sich um *in-vitro*-Assays, die grundsätzlich einen artifiziellen Charakter besitzen. Im bakteriellen Zelllysate wiesen das Dimer **20a** und das Trimer **21a** größere Halbwertszeiten auf als in humanem Plasma. Das Dimer **20b** wies zwar noch in humanem Plasma eine höhere Halbwertszeit auf, aber das entsprechende Trimer **21b** hatte eine höhere Halbwertszeit im bakteriellen Lysate. Nur das Dimer **20c** und das entsprechende Trimer **21c** wiesen beide im bakteriellen Lysate eine geringere Halbwertszeit auf, was dessen Maskierungsgruppe potenziell interessant für den Einsatz für antibakterielle Wirkstoffe macht. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt jedoch auf Wirkstoffsystemen, die in humanen Zellen aktiv sind. Des Weiteren ist anzumerken, dass die Dimer-Modellverbindungen **20a-c** in enzymfreier Phosphatpuffer-Lösung deutlich hydrolyselabiler sind als die entsprechenden Trimer-Modellverbindungen **21a-c**, was eventuell auf eine höhere Hydrophilie oder verringerte sterische Hinderung der Dimer-Modellverbindungen zurückgeführt werden kann. Im Plasma und in humanem Zelllysate weisen die Trimere **21a-c** im Vergleich zu den jeweiligen Dimeren **20a-c** durchgehend eine identische bzw. erhöhte Halbwertszeit auf. Diese Ergebnisse lassen auf hohe Halbwertszeiten von länger-kettigen Oligonucleotiden (16 bis 20 Nucleobasen) schließen, da die Trinucleotide mit zwei Maskierungsgruppen im Verhalten länger-kettigen ONs ähneln, im Gegensatz zu Dinucleotiden mit nur einer Maskierungsgruppe. Wie in *Tab. 1* dargestellt, sind die Halbwertszeiten der Diastereomere (*fast/slow*) von **20a-c** annähernd identisch, was die Oligonucleotidsynthese der Prodrugs erheblich vereinfacht, da eine Stereokontrolle unter diesen Umständen wenig relevant zu sein scheint. Ebenfalls ist anzumerken, dass die vorliegenden Ester-Einheiten von Verbindungen **20a-c** und **21a-c** unterschiedliche Stabilitäten im Puffer, im humanen Zelllysate und im humanen Plasma aufweisen. In diesen Medien waren die Acetyl-Ester **20a** und **21a** durchgehend am labilsten. Es ist von Vorteil, eine schnelle Spaltung im humanen Zelllysate zu erhalten, jedoch spricht die geringe Halbwertszeit im Puffer und im Plasma gegen eine biologische Anwendbarkeit

der Acetyl-Ester vom Typ **20a** und **21a**. Die Stabilität nimmt von den Butyrylestern **20c** und **21c** zu den Pivaloylestern **20b** und **21b** weiter zu, wobei die Pivaloylester **20b** und **21b** das beste pharmakokinetische Profil aufwiesen. Hiermit ist gemeint, dass eine erheblich höhere Stabilität von Verbindung **21b** in Puffer-Lösung im Vergleich zum Plasma und Zelllysate vorliegt, und dass im Plasma die Stabilität dreimal so hoch ist wie im Lysat. Aus diesem Grund wurde zum einen die Pivaloxybenzyl-Maskierungseinheit zur Maskierungsgruppe der Wahl für die vorliegende Arbeit und zum anderen wurde diese Einheit zum Vergleich auf die Phosphorthioat-Modellverbindungen **20dR,S** übertragen. Die Halbwertszeiten der diastereomerenreinen Phosphorthioate **20dR** und **20dS** sind in den jeweiligen Medien ebenfalls annähernd identisch. Jedoch sind in diesem Fall die Produkte der Spaltung ebenfalls stereogen am Phosphat, und derartige Phosphorthioat-Diastereomere haben *in vivo* unterschiedliche Eigenschaften. Dies erschwert die Oligonucleotidsynthese, da eine Stereokontrolle unter diesen Umständen relevant ist. Die beiden Diastereomere **20dR** und **20dS** weisen im Vergleich zu den Phosphaten **20bfast/slow** im humanen und bakteriellen Zelllysate wesentlich höhere Stabilitäten auf. Aufgrund dieser überraschend hohen Differenz wurde frisches humanes Zelllysate hergestellt, um auszuschließen, dass das bisherige Zelllysate eventuell an Esterase-Aktivität abgenommen hatte. Es stellte sich heraus, dass Tests in frischem humanem Zelllysate die gleichen Halbwertszeiten lieferten, sowohl für Dimer **20b** als auch für Dimer **20d**. Demnach liegt zwischen Dimer **20b** und Dimer **20d** in humanem Lysate ein Unterschied in der Halbwertszeit von ungefähr 4 h vor. Der allgemeine Vorteil von Phosphorthioaten liegt in der hohen Nucleasestabilität. Wird ein AON in der Zelle durch Esterase demaskiert, sollte in dieser Zeit kein signifikanter Abbau des Oligomers durch Nuclease stattfinden, da ansonsten kein Antisense-Mechanismus ablaufen kann.

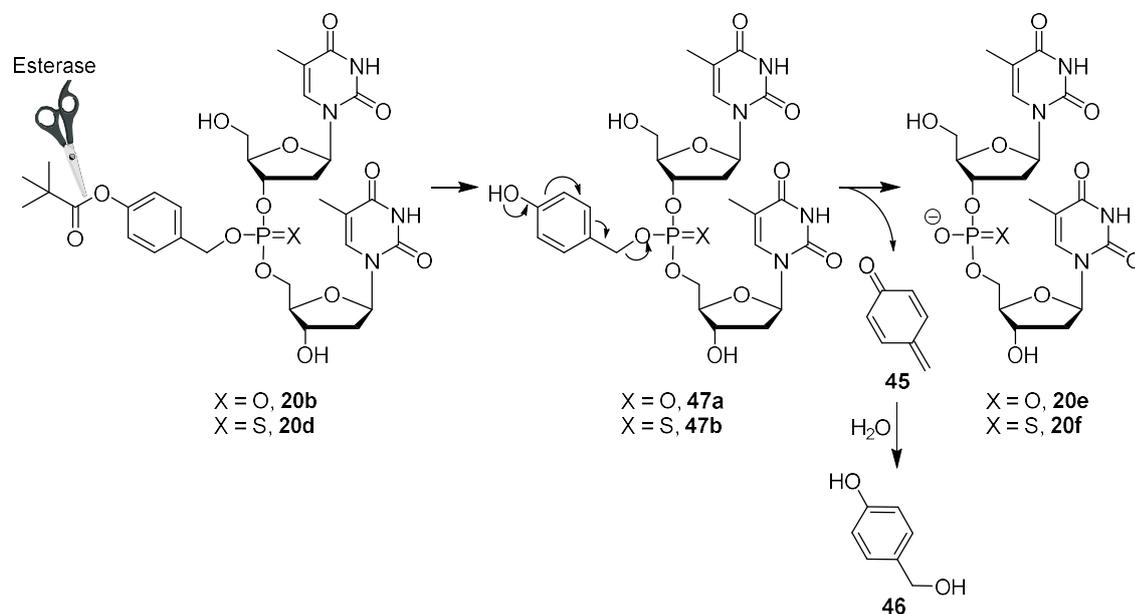
Da die freigesetzten Dinucleotide **20e,f** mittels HPLC-HRMS-Analytik nachgewiesen werden konnten, wurde die Entstehung dieser Dinucleotide aus den Messdaten ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass in humanem Zelllysate im Falle der Phosphorthioate **20d** eine höhere Konzentration an Referenzsubstanz **20f** detektiert wurde, als es für die Referenzsubstanz **20e** von Dimer **20b** der Fall war (*Abb. 4.13*).



**Abb. 4.13:** Stabilitäts-Tests von Verbindung **20bfast** und **20dR** in humanem Zelllysat (blau: Modelldimer; rot: freigesetztes Dinucleotid)

Hier stellte sich die Frage, ob ein schneller Nuclease-Abbau für die geringe Konzentration an freigesetztem Dinucleotid **20e** verantwortlich ist (im Gegensatz zu der hohen Nuclease-Stabilität des Dinucleotids **20f**) oder ob die

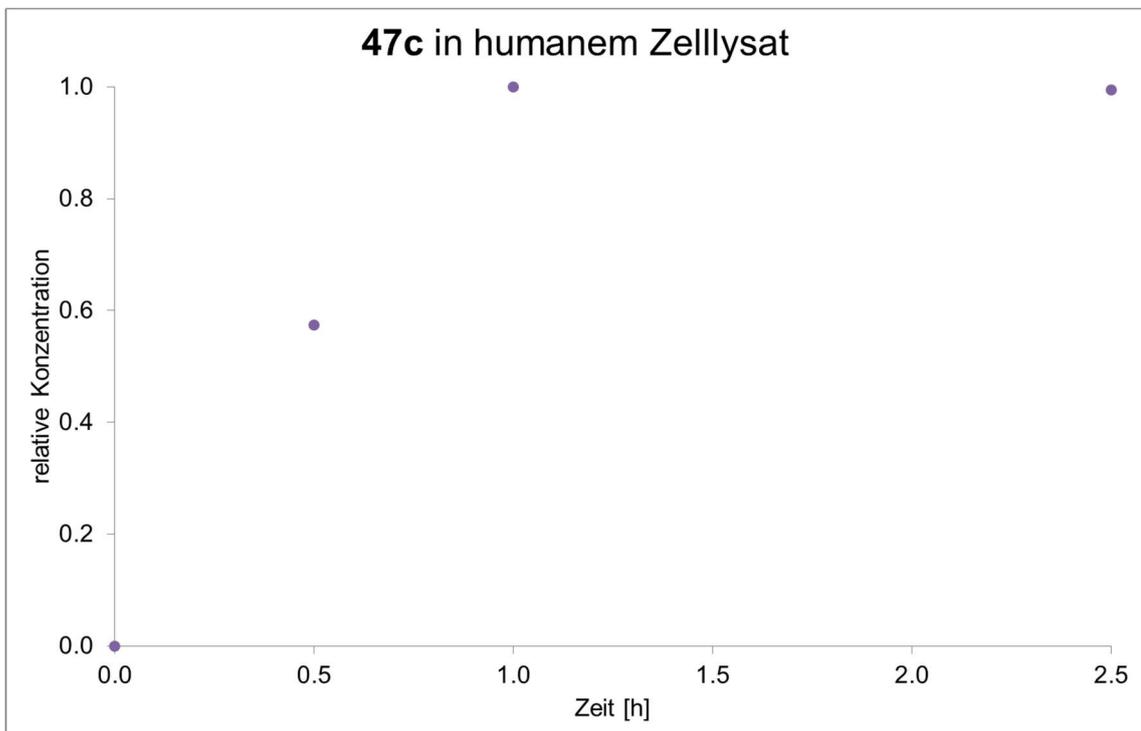
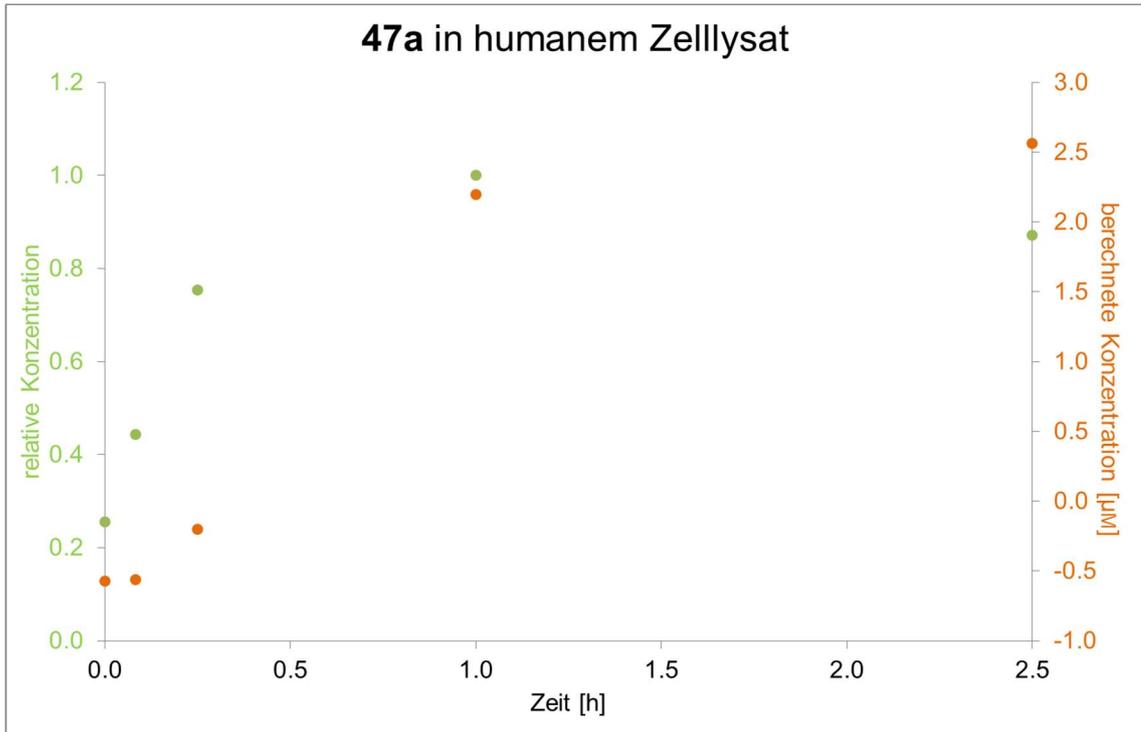
durch Esterase-Abbau gebildeten Intermediate **47a,b** (Abb. 4.14) eine unterschiedliche Lebensdauer aufweisen.



**Abb. 4.14:** Esterase-vermittelter Abbau der Dimer-Modellverbindungen **20b,d** über die Intermediate **47a,b** zu den Dinucleotiden **20e,f**.

Bei der Bestimmung der Intermediate (aus den HPLC-HRMS-Daten) von Dimer **20bfast/slow** und **20dR/S** im humanen Zelllysate fiel auf, dass nur Intermediat **47a**, nicht jedoch das Intermediat **47b**, massenspektrometrisch nachzuweisen war. Konzentrationsbestimmungen der Intermediate wurden nicht durchgeführt, da die entsprechenden synthetischen Referenzen dieser Intermediate (z.B. Verbindung **47a**), die für die Kalibration erforderlich sind, leicht unter Freisetzung des Phosphatdiesters zerfallen und deswegen intrinsisch instabil sind. Daher wurden keine Versuche zu ihrer Synthese unternommen. Es ist anzunehmen, dass das Intermediat **47b**, das durch Zerfall von Dimer **20d** entsteht, zu kurzlebig ist, als dass es massenspektrometrisch detektiert werden konnte (Abb. 4.14). Dies ist ersichtlich, wenn die Konzentrationen von **20dR** und **20fR** betrachtet werden, da die Summe der beiden Konzentrationen ungefähr der Startkonzentration von 3.3  $\mu\text{M}$  entsprach. Wird hingegen die massenspektrometrisch bestimmte relative Konzentration an **47a** bei dem Abbau von **20bfast** betrachtet, fällt auf, dass die Konzentration innerhalb der ersten Stunde stark ansteigt und in den folgenden 1.5 h nur schwach abnimmt (Abb. 4.15, grün). Diese Beobachtung deutet auf eine Art

“Depot-Wirkung“ von Intermediat **47a** hin und könnte erklären, warum die Konzentration von **20e** bei dem Zerfall von **20bfast** nur sehr gering ist.

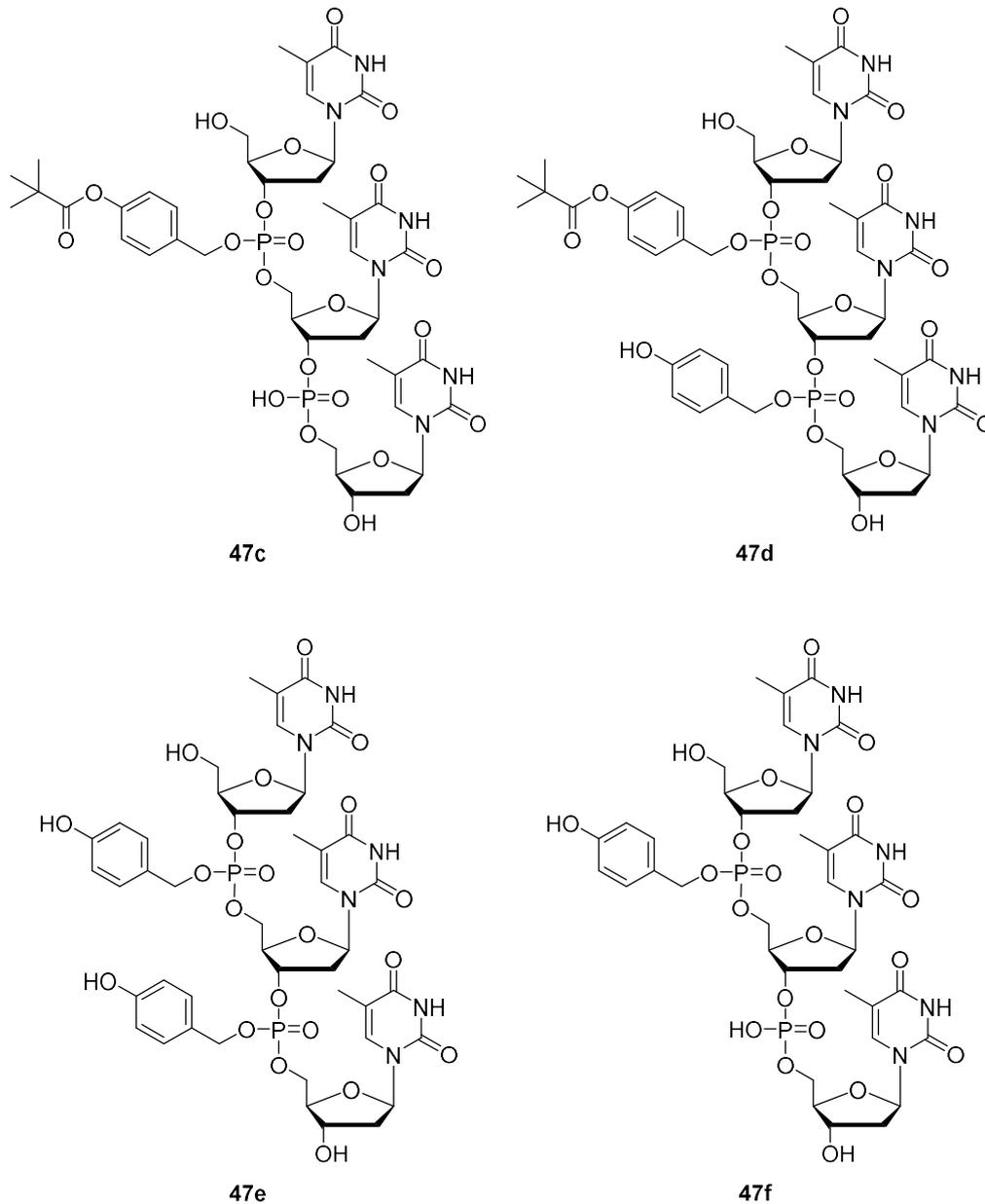


**Abb. 4.15:** Konzentrationen der Intermediate **47a** (grün: gemessene Konzentrationen, 1 h = 1.0; orange: berechnete Konzentrationen entsprechend Differenz aus **20bfast** und **20e**) und **47c** (1 h = 1.0) in humanem Zelllysate.

Der Verlauf der berechneten Konzentration von Intermediat **47a**, die aufgrund der Differenz der Konzentration von **20bfast** und **20e** vorliegen müsste (*Abb. 4.15*, orange), ähnelt recht stark dem Verlauf der gemessenen relativen Konzentration von **47a**, was ebenfalls auf einen langsamen Zerfall des Intermediats **47a** hinweist. Die Folge ist eine sehr langsame Bildung des Dinucleotids **20e**, so dass dessen Entstehung auf einer ähnlichen Zeitskala wie sein Nuclease-vermittelter Abbau erfolgt. Dies würde die gemessene geringe Konzentration von **20e** plausibel erscheinen lassen. In weiterführenden Arbeiten wäre es in diesem Zusammenhang von Bedeutung, die Entstehung des Dinucleotids **20e** bei dem Abbau von **20bfast** in Schweineleber-Esterase-Pufferlösung zu untersuchen. In dieser Lösung befinden sich, im Gegensatz zu humanem Zelllysate, keine Nucleasen, wodurch der Abbau des entstehenden Dinucleotids **20e** nicht stattfinden sollte und ein deutlicher Anstieg der Konzentration des Dinucleotid-Produktes **20e** beobachtet werden sollte.

Nach dem freiwerdenden reaktiven *p*-Chinonmethid **45** und dem daraus wohl gebildeten *p*-Hydroxybenzylalkohol **46** (*Abb. 4.14*) konnte nicht gesucht werden, da deren Massen ( $m/z$ ,  $z = 1$ ) unter  $m/z = 300$  lagen und dieser Bereich bei der HRMS-Analyse der Stabilitäts-Tests nicht gemessen wurde. Gerade in biologischen Medien liegt unterhalb von  $m/z = 300$  eine Vielzahl an Verbindungen vor und die gesuchten Verbindungen könnten somit nicht eindeutig nachgewiesen werden. Weiterhin wurde bei dem Abbau des Modell-Trimers **21b** in humanem Zelllysate, dessen Halbwertszeit in diesem Medium nur um 0.15 h von denen der entsprechenden Dimere **20bfast** und **20bslow** abweicht, nach Intermediaten gesucht. Von den vier möglichen Intermediaten **47c-f** konnte lediglich Intermediat **47c** nachgewiesen werden, dessen Konzentration innerhalb der ersten Stunde schnell zunimmt und dessen Zerfall erneut langsam abläuft (*Abb. 4.15*, *4.16*). Ein Intermediat mit ein oder zwei Hydroxy-Gruppen konnte entgegen der Erwartung nicht detektiert werden. Interessanterweise handelt es sich bei **47c** um das einfach maskierte Intermediat. Im Fall der Trimer-Demaskierung ist also der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Esterase-vermittelte Zerfall der zweiten Maskierungsgruppe und nicht der spontane C-O-Bindungsbruch innerhalb einer Maskierungsgruppe. Somit ist anzunehmen, dass zum einen die Demaskierungen vollständig nacheinander ablaufen und zum anderen, dass bei

längerkettigen ON im Gegensatz zu den Dimeren kein phenolisches Intermediat längerlebig vorliegt. Um diese Hypothesen zu bestätigen, wäre es in Folgearbeiten erforderlich, ein längerkettiges maskiertes ON, wie z.B. ein Pentamer, entsprechend zu untersuchen.



**Abb. 4.16:** Beispiele möglicher Intermediate **47c-f** des Esterase-vermittelten Abbaus der Trimer-Modellverbindung **21b** (mögliche Regioisomere nicht dargestellt).

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit bekannten Erkenntnissen zu Esterase-spaltbaren Prodrugs, da Esterasen anionische Verbindungen tendenziell schlechter als Substrate akzeptieren als elektroneutrale

Verbindungen. Dies lässt sich beispielsweise anhand des Esterase-vermittelten Abbaus von zweifach maskierten Nucleosiddi- und triphosphat-Prodrugs nachvollziehen.<sup>[102]</sup> Eine zukünftige Quantifizierung von Intermediat **47c** sollte nach Synthese der entsprechenden authentischen Referenzverbindung für die MS-Kalibration möglich sein.

Die sehr hohen Stabilitäten der Phosphorthioate **20d** im humanen Lysat sprechen, trotz der hohen Nuclease-Stabilität der Dinucleotide **20f**, gegen den Einsatz als Prodrugs. Hier sind weitere Untersuchungen von anderen Phosphorthioaten wie z.B. einem maskierten Trimer notwendig, um zu untersuchen, ob das zuvor beschriebene Verhalten bezüglich der Stabilitäten und des Verhältnisses von Prodrug-Drug-Konzentrationen auch bei länger-kettigen Phosphorthioaten auftritt. Eine weitere Möglichkeit, die AON vor Nuclease-Abbau zu schützen, wäre die Einführung von Gapmer-Architekturen. Dafür müsste ein maskiertes Oligomer an den Enden von ca. drei LNA-Einheiten "eingerahmt" werden, die ebenfalls eine hohe Nucleasestabilität aufweisen. So wäre das AON ebenso vor Nuclease-Abbau geschützt.

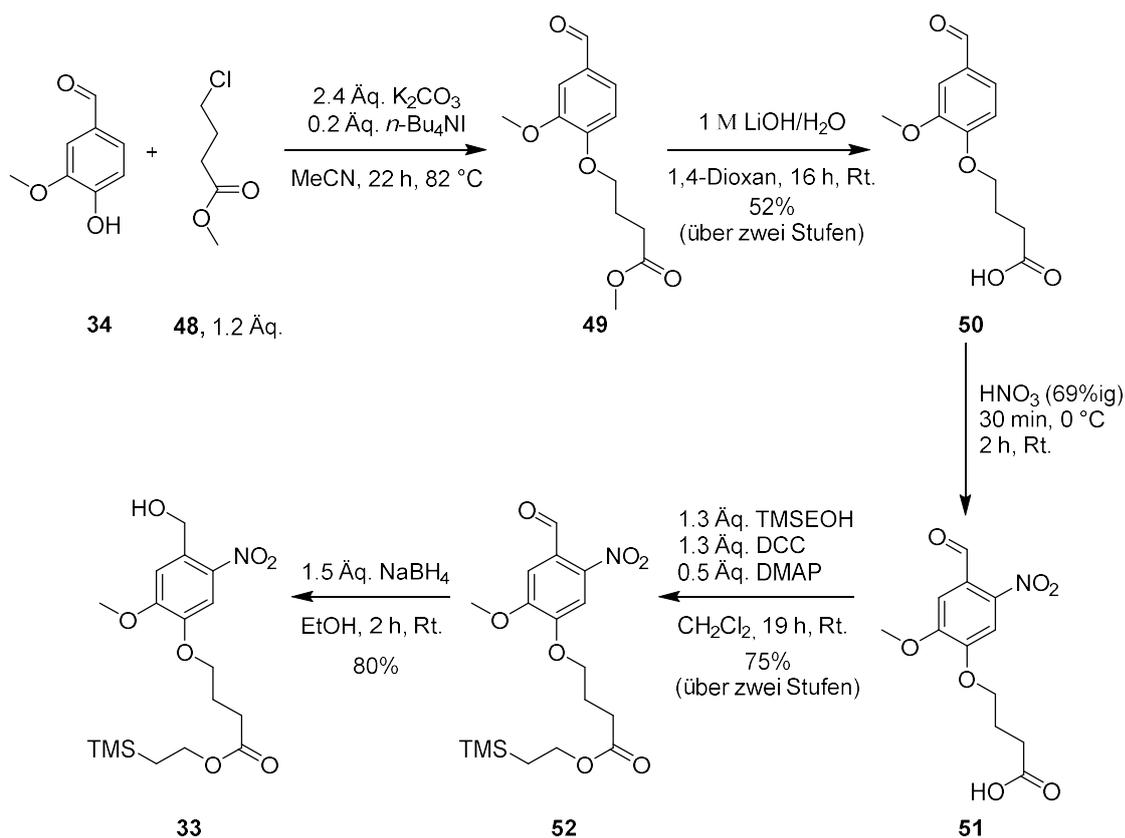
Wie im vorherigen Kapitel erwähnt, wurden ebenfalls MTT-Assays durchgeführt. Diese Assays dienen der Untersuchung der Cytotoxizität des reaktiven Nebenproduktes **45** in humanem Zelllysate. Wie bereits berichtet wird bei der Esterase-vermittelten Hydrolyse der 4-Acyloxybenzylester-Funktion der Maskierungsgruppe ein 4-Hydroxybenzyl-Intermediat (wie Verbindung **47a** oder **47b**) gebildet (*Abb. 4.14*). Es folgt ein spontaner C-O-Bindungsbruch in Benzylposition, was die Bildung der Dinucleotide **20e,f** und des Nebenproduktes **45** zur Folge hat (*Abb. 4.14*). Das reaktive *p*-Chinonmethid **45** könnte im wässrigen Milieu zum unreaktiven *p*-Hydroxybenzylalkohol **46** umgesetzt werden oder eventuell auch cytotoxische Effekte durch Reaktionen mit Proteinen oder anderen Biomolekülen bewirken. Die Assays wurden in Kooperation mit dem Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS) im Arbeitskreis von Prof. Dr. Anna K. H. Hirsch durchgeführt. Verwendet wurden hierfür die humanen Hek-293- und Hep G2-Zellen. Als zu untersuchende Substanzen dienen die Verbindungen **20a<sub>fast</sub>** und **20a<sub>slow</sub>** (als "Quelle" von **45**) in Konzentrationen von 20  $\mu\text{M}$  und 40  $\mu\text{M}$ . In diesen Fällen konnte keine Cytotoxizität gemessen werden (Viabilität ca. 100%). Zum anderen wurde ein Isomergemisch von **20b** in einer Konzentration von

200  $\mu\text{M}$  untersucht. Es konnte ebenfalls keine Cytotoxizität festgestellt werden (Viabilität ca. 100%).

## 4.2 Synthese und Untersuchungen einer festen Phase mit photolabilem Linker

Die in Kap. 4.1 synthetisierten AB-modifizierten Phosphoramidite **22a-c** (Abb. 4.4) sollen standardmäßig über Festphasen-geschützte automatisierte ON-Synthese in ein Oligomer eingebaut werden. Wie schon erwähnt findet die Abspaltung von der standardmäßig verwendeten festen Phase jedoch unter stark basischen Bedingungen (Ammoniumhydroxid-Ethanol 3:1) statt, welche nicht kompatibel mit der Arylester-Einheit in der AB-Modifikation sind. Aus diesem Grund wurde ein von GREENBERG und Mitarbeitern<sup>[137]</sup> entwickelter photospaltbarer Linker als möglicher Ersatz ausgewählt. Die Synthese dieses Linkers und die des Festphasen-gebundenen Thymidin-Bausteins als Startmaterial sind im Folgenden beschrieben.

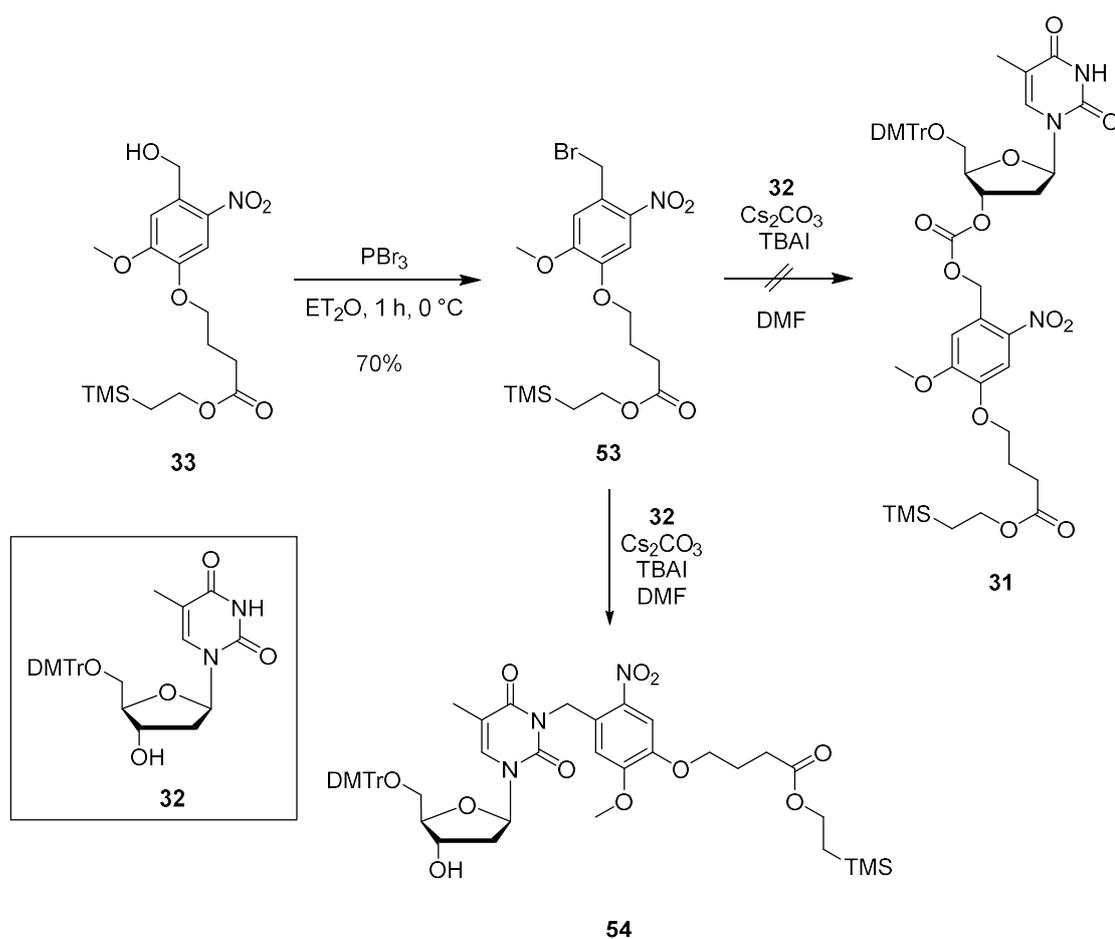
Die Synthese verlief in Anlehnung an die Vorschrift von GREENBERG und Mitarbeitern mit gewissen Anpassungen. Die Synthesesequenz bis zum *o*-Nitrobenzylalkohol-Derivat **33** ist in Abb. 4.17 dargestellt. Im ersten Schritt wurde entsprechend der Literatur Vanillin **34** mit 4-Chlormethylbutyrat **48** in Gegenwart von Calciumcarbonat und *n*-Tetrabutylammoniumiodid zum Ester **49** umgesetzt. Die ursprünglich beschriebene Umkristallisation aus Ethylacetat lieferte nicht das reine Produkt, sondern eine Mischung aus Ester **49** und dem eingesetzten *n*-Tetrabutylammoniumiodid. Erst eine Fällung des Salzes in Toluol lieferte Ester **49** in einer berechneten Ausbeute (laut <sup>1</sup>H-NMR) von 62% mit nur 9% *n*-Tetrabutylammoniumiodid verunreinigt. Anschließend wurde nach Literaturvorschrift eine Verseifung in wässriger Lithiumhydroxidlösung durchgeführt, wodurch Carbonsäure **50** in einer Ausbeute von 85% erhalten wurde.



**Abb. 4.17:** Synthese des *o*-Nitrobenzylalkohol-Derivats **33** ausgehend von Vanillin **34**.

Die Einführung der Nitrogruppe erfolgte durch Nitrierung des Aromaten **50** mit Salpetersäure nach einer Vorschrift von DOUGLAS und Mitarbeitern.<sup>[144]</sup> Der Vorteil hierbei war, dass die Nitroverbindung **51** annähernd isomerenrein mit 80% berechneter Ausbeute (laut <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum) in einem Gemisch aus Isomer **51** (80%) und den zugehörigen zwei Isomeren (20%) erhalten werden konnte, im Gegensatz zu GREENBERGS Vorschrift, bei der ein Verhältnis der Isomere von 4:1:1 erhalten wurde. Im nächsten Schritt wurde wieder in Anlehnung an GREENBERGS Syntheseroute verfahren und Carbonsäure **51** als Isomeregemisch mit Trimethylsilylethanol in Gegenwart von *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und ergänzend noch 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) in abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> umgesetzt, um die Säurefunktion zu schützen. Ester **52** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 94%, bezogen auf die Menge des eingesetzten Isomers **51**, erhalten. Die Zugabe von DMAP ermöglichte es somit die Ausbeute von GREENBERG (56%) deutlich zu erhöhen. Es folgte eine Reduktion des Aldehyds **52** zum *o*-Nitrobenzylalkohol-Derivat **33** mit Natriumborhydrid mit einer Ausbeute von

80%. Der Aufbau der Carbonat-Einheit, also die Verknüpfung zwischen Linker und Startnucleosid, erfolgte nach GREENBERG über den Gebrauch des sehr toxischen Phosgens. Um die Verwendung dieser Verbindung und ihrer Derivate zu umgehen, wurde in ersten Versuchen die Einführung der Carbonat-Einheit in Verbindung **31** durch Verwendung von  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  getestet.<sup>[145]</sup> In einer Appel-Reaktion wurde Alkohol **33** mit Phosphortribromid ( $\text{PBr}_3$ ) zu **53** umgesetzt (Abb. 4.18).



**Abb. 4.18:** Syntheseveruche der Verbindung **31**.

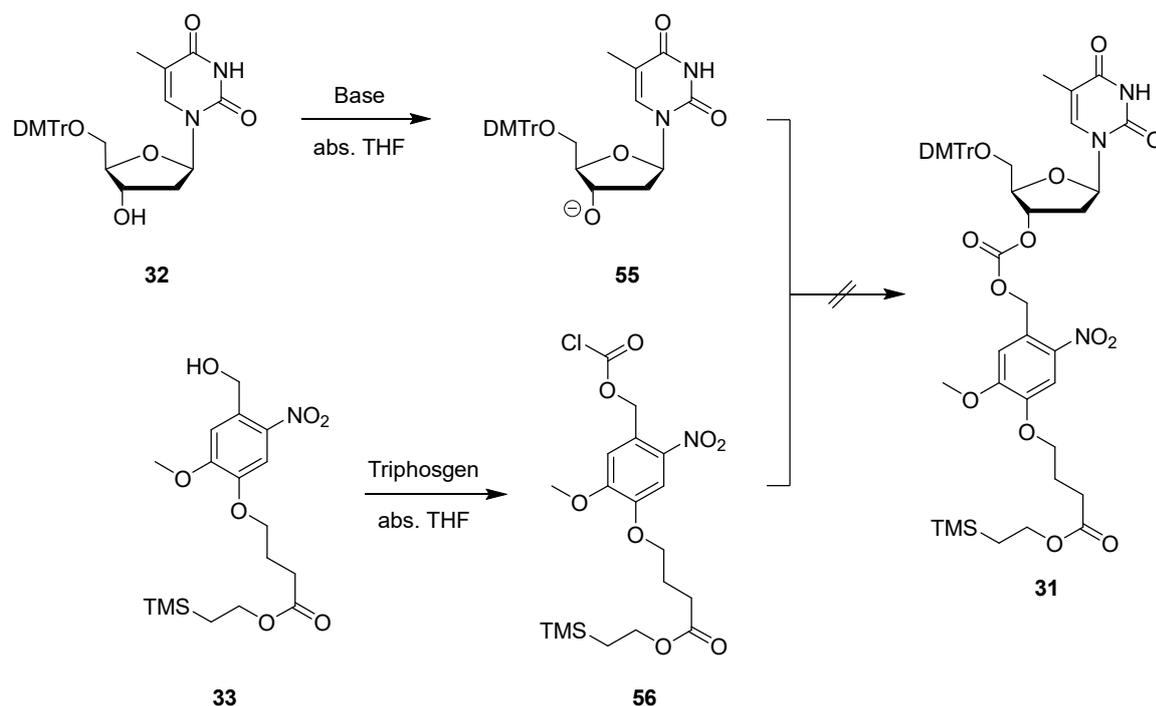
Das in 70% Ausbeute erhaltene Benzylbromid **53** wurde anschließend mit 5'-O-DMTr-Thymidin **32** in Gegenwart von Cäsiumcarbonat ( $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ) und *tert*-Butylammoniumiodid (TBAI) unter unterschiedlichen Reaktionsbedingungen umgesetzt (Tab. 2).

**Tab. 2:** Reaktionsbedingungen für die Synthese von Carbonat **31** in Gegenwart von Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

	Äq. Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Äq. TBAI	T [°C]	t [h]
1	1.2	0.2	100	23
2	3.0	1.0	100	22
3	3.0	1.0	Rt.	48
4	3.0 / CO <sub>2</sub> (Trockeneis)*	1.0	Rt.	25

[\* Einleitung von CO<sub>2</sub> in die Reaktionslösung]

Es wurden Äquivalente des eingesetzten Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.2 oder 3.0 Äq.) und des TBAI (0.2 oder 1.0 Äq.), Zeit und Temperatur (100°C oder Rt.) variiert. Des Weiteren wurden die Reaktionen per LC-MS verfolgt. In Versuch 4 wurde sogar noch CO<sub>2</sub> durch Verwendung von Trockeneis in die Reaktionslösung geleitet. Bei allen vier Ansätzen konnte jedoch nur Verbindung **54** isoliert werden. Das Carbonat **31** wurde nicht detektiert.

**Abb. 4.19:** Syntheseversuche der Verbindung **31** nach GREENBERG.

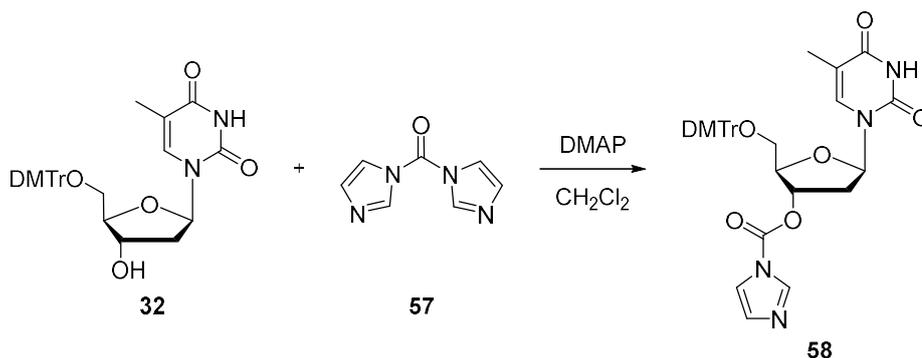
Somit musste auf die Vorschrift von GREENBERG zurückgegriffen werden, wobei anstelle der Phosgen-Toluol-Lösung Triphosgen verwendet wurde, da es sich hierbei um einen wägbaren Feststoff handelt. Außerdem wurde eine Base zur Deprotonierung von 5'-O-DMTr-Thymidin **32** benötigt. Die Reaktionssequenz ist

in *Abb. 4.19* abgebildet und die Reaktionsbedingungen sind in *Tab. 3* zusammengefasst. Die aufgelisteten Versuche liefen unter DC-Kontrolle ab.

**Tab. 3:** Reaktionsbedingungen für die Syntheseversuche der Verbindung **31** nach GREENBERG.

	Äq. Triphosgen	T (33→56) [°C]	t (33→56) [h]	Äq. Base	T (32→55) [°C]	t (32→55) [h]	T (55+56 →31) [°C]	t (55+56 →31) [h]
1	0.33	Rt.	3.5	1.0 (NaH)	Rt.	2.5	Rt.	2.0
2	1.0	Rt.	7.0	1.0 (NaH)	Rt.	6.0	Rt.	16
3	0.5	Rt.	16	1.0 (NaH)	Rt.	1.0	Rt.	2.0
4	0.5 +Py (1.0 Äq.)	0	1.0	2.2 (NaH)	0	0.5	Rt.	24
		20	6.0		Rt.	1.0	40	6.0
		40	2.0					
5	5.0 (Phosgen in Toluol)	Rt.	4.0	3.0 (NaH)	0	0.5	Rt.	2.5
					Rt.	1.0		
6	5.0 (Phosgen in Toluol) +Py (1.0 Äq.)	Rt.	2.0	-	-	-	Rt.	1.0
7	1.0 +Py (2.0 Äq.)	0	3.0	-	-	-	0	1.0
		Rt.	17				Rt.	20
8	1.0 +Py (2.0 Äq.)	0	3.0	2.0 ( <i>n</i> -BuLi)	-78	0.5	0	1.0
		Rt.	17		Rt.	3.0	Rt.	20
9	2.0 +Py (1.0 Äq.)	Rt.	15	1.0 (DIPEA)	0	-	Rt.	24
10	1.0 +DIPEA (2.0 Äq.)	RT.	6.0	2.5 (NaH)	Rt.	1.0	Rt.	3.0

Alle in *Tab. 3* erfassten Versuche für die Synthese von Verbindung **31** blieben ohne Erfolg. Zuerst wurde versucht, mit Triphosgen und Natriumhydrid unter Variation der Reaktionszeiten Carbonat **31** zu synthetisieren (*Tab. 3*, Nr. 1-4). Da kein Produkt isoliert werden konnte, wurde versucht, durch Zugabe von Pyridin und einen Wechsel zu Phosgen in Toluol das Carbonat **31** zu erhalten (*Tab. 3*, Nr. 5,6). Dies war aber erneut nicht möglich. Auch die Ansätze mit *n*-Butyllithium und Diisopropylamin blieben ohne Erfolg (*Tab. 3*, Nr. 8,9). Somit musste auf ein anderes Reagenz zur Carbonatsynthese zurückgegriffen werden. Die Wahl fiel auf 1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI, **57**), das beispielsweise bereits von DAVIS<sup>[146]</sup> und CHIBA<sup>[147]</sup> für die Synthese von Carbonaten verwendet wurde und auf deren Vorschriften die nächsten zwei Schritte basieren. Im ersten Schritt wurde 5'-O-DMTr-Thymidin **32** mit CDI **57** in Gegenwart von DMAP umgesetzt, wodurch das intermediäre Carbamat **58** erhalten werden konnte (*Abb. 4.20*).



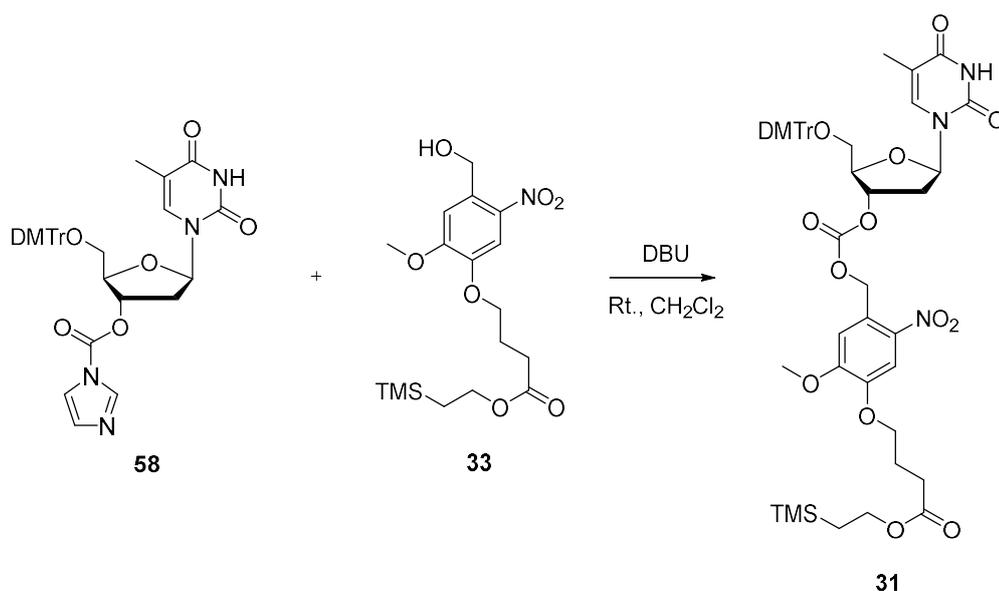
**Abb. 4.20:** Synthese des Carbamats **58**.

Die Reaktionsbedingungen und die eingesetzten Äquivalente sind in *Tab. 4* aufgelistet, wobei die Stoffmenge von 5'-O-DMTr-Thymidin **32** auf 1.0 Äq. gesetzt wurde. Es ist festzustellen, dass längere Reaktionszeiten von 17 h (*Tab. 4*, Nr.1) und erhöhte Temperaturen von 60 °C (*Tab. 4*, Nr.2) ein stark verunreinigtes Produkt (berechnete Ausbeuten um die 50%) lieferten. Die saubersten Rohausbeute (berechnete Ausbeuten um die 90%) wurde bei einer Reaktionszeit von 1-2 h und bei Raumtemperatur erhalten (*Tab. 4*, Nr.3, 2). Diese Stufe wurde nicht chromatographisch gereinigt, sondern direkt weiter umgesetzt.

**Tab. 4:** Synthesebedingungen von Carbamat **58**.

	Äq. <b>57</b>	Äq. <b>DMAP</b>	T [°C]	t [h]	Rohprodukt von <b>58</b>
1	2.0	2.0	Rt.	17	stark verunreinigt
2	1.0	1.0	60	7.0	stark verunreinigt
			Rt.	15	
3	2.0	2.0	Rt.	2.0	gering verunreinigt
4	2.0	2.0	Rt.	1.0	gering verunreinigt

Im darauffolgenden Schritt wurde Carbamat **58** mit der Linkereinheit **33** in Gegenwart von 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) bei Raumtemperatur zu Carbonat **31** umgesetzt (*Abb. 4.21*). Erst nach diesem Schritt fand eine säulenchromatographische Reinigung statt, weswegen die Ausbeuten über zwei Stufen bestimmt wurden (*Tab. 5*). Die unterschiedlichen Reaktionsbedingungen und verwendeten Äquivalente sind in *Tab. 5* aufgelistet.

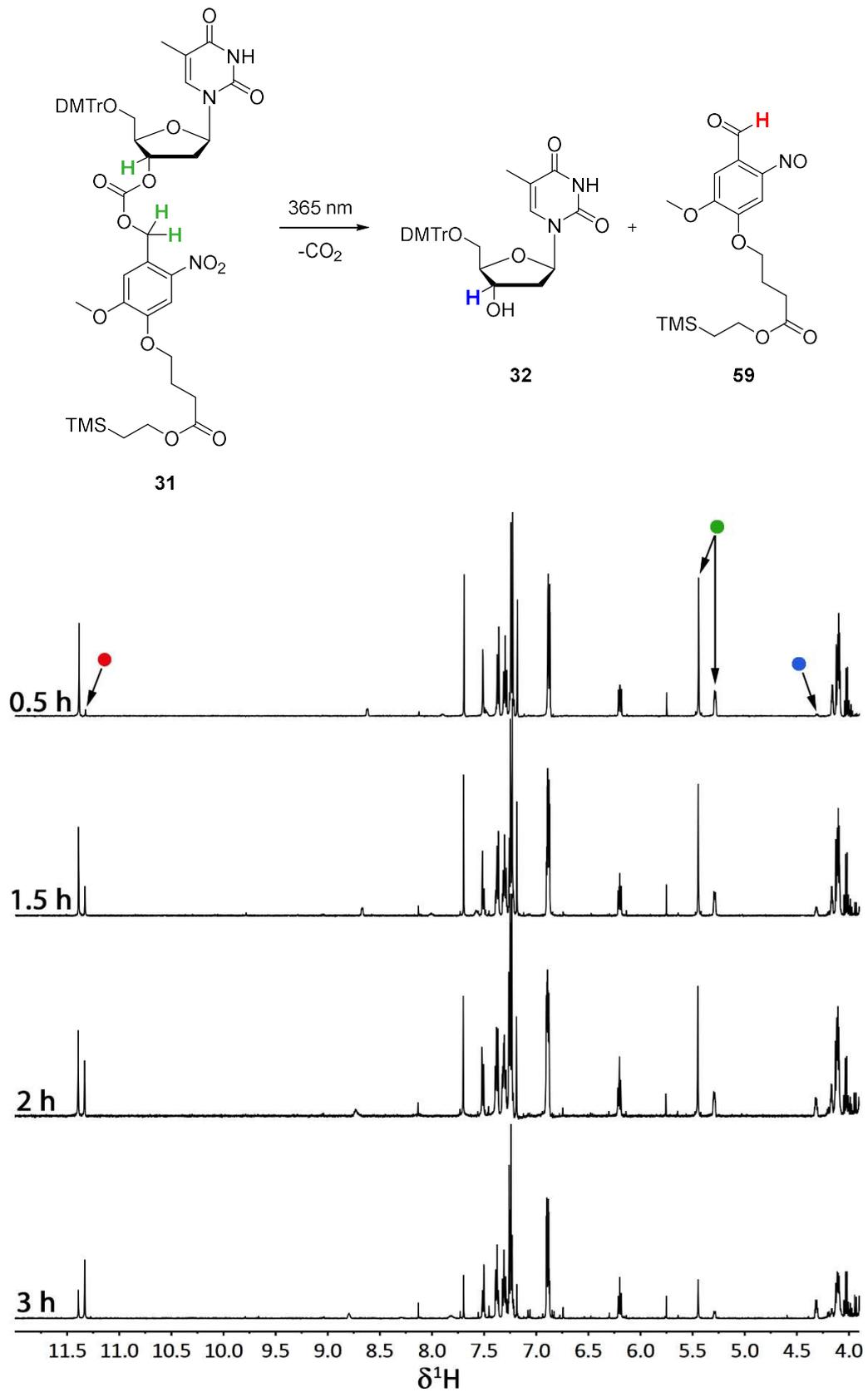
**Abb. 4.21:** Synthese von Carbonat **31**.

Hierbei ist zu erkennen, dass eine lange Reaktionszeit von 17 h (*Tab. 5*, Nr. 1) nicht zum Produkt geführt hat. Jedoch konnte bei kurzen Reaktionszeiten von 3.5-4 h (*Tab. 5*, Nr. 2-4) das Produkt **31** isoliert werden. Die Ausbeute von Carbonat **31** war am größten, wenn eine höhere Stoffmenge der Linkereinheit **33** im Vergleich zum Carbamat **58** eingesetzt wurde (*Tab. 5*, Nr. 3,4).

**Tab. 5:** Synthesebedingungen zur Darstellung von Carbonat **31**.

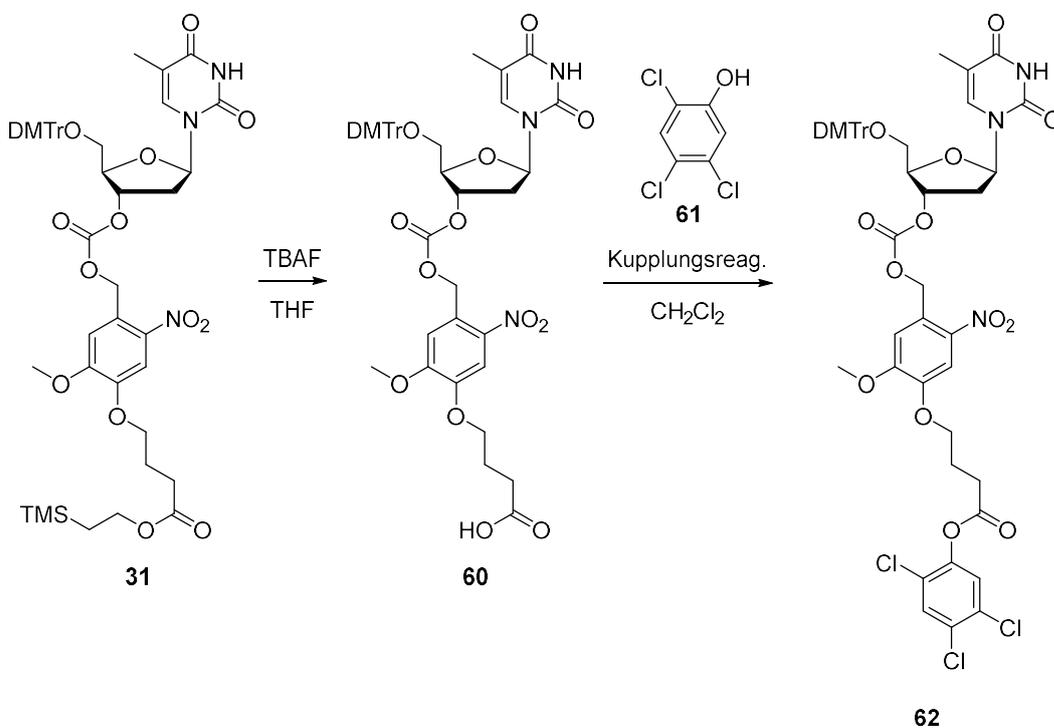
	Äq. <b>58</b>	Äq. <b>33</b>	Äq. <b>DBU</b>	t [h]	Ausbeute über zwei Stufen [%]
1	1.3	1.0	1.2	17	-
2	1.3	1.0	1.0	3.5	56
3	1.0	1.2	1.0	3.5	60
4	1.0	1.2	1.0	4.0	64

Diese erhaltene Kombination **31** aus Linker und Startnucleosid wurde daraufhin auf ihre Photolabilität untersucht. Hierzu wurde, analog zu einer Vorschrift von SUTHERLAND,<sup>[139]</sup> eine 0.1 M Lösung von Carbonat **31** angesetzt, wobei DMSO-d<sub>6</sub> anstelle des DMSO verwendet wurde, um die Spaltung mittels NMR-Spektroskopie zu verfolgen. Die Bestrahlung (Hochleistungs-UV-LED smart der Firma *Opsytec Dr. Gröbel*, Arbeitskreis Kazmaier) fand bei einer Wellenlänge von 365 nm von oben in den Kolben statt und der Kolben wurde mit Aluminiumfolie umwickelt. Nach gewissen Zeitabständen wurde eine Probe entnommen und ein <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum aufgenommen. Das Ergebnis ist in *Abb. 4.22* gezeigt. GREENBERG nutzte als Lösungsmittel ein Gemisch aus MeCN und Wasser (1:1), was sich in diesem Fall jedoch nicht eignete, da die Maskierungsgruppen des später an der festen Phase haftenden Prodrugs nicht in Kontakt mit Wasser kommen sollten.



**Abb. 4.22:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der photolytischen Spaltung von Carbonat **31**.

Bei den markierten Signalen in *Abb. 4.22* handelt es sich zum einen um die Carbonat-Einheit von Edukt **31** (grün) und zum anderen um das Produkt **32** (blau) und den Aldehyd **59** (rot). Es ist eindeutig erkennbar, dass sich im Laufe der Messungen die Integrale der Signale des Carbonats verringern und die der Produkte vergrößern. Nach 1.5 h ist eine Spaltung zu ca. 37% abgelaufen, nach 2 h sind es bereits ca. 58% und nach 3 h sogar nahezu 71%. Ebenfalls ist zu sehen, dass nach 3 h weitere Signale auftauchen, die keiner Verbindung zugeordnet werden können, was auf eine Zersetzung der Verbindungen hinweist. Deswegen ist eine Dauer der Bestrahlung von rund 2 h ideal, da nach 1.5 h auch bereits eine Braunfärbung der DMSO-Lösung einsetzt. In Folgearbeiten können hierzu noch Untersuchungen in anderen Lösungsmitteln, wie MeCN, oder in Lösungsmittelgemischen unternommen werden. Die Beobachtungen decken sich mit denen von GREENBERG.<sup>[137]</sup> Eine Spaltung der Carbonat-Einheit von Verbindung **31** wurde somit auch hier nachgewiesen. Es fehlte nur noch die Knüpfung des Linkers an die feste Phase. Hierfür wurde die Säurefunktion in Verbindung **31** entschützt und daraufhin zu dem Aktivester **62** umgesetzt (*Abb. 4.23*).



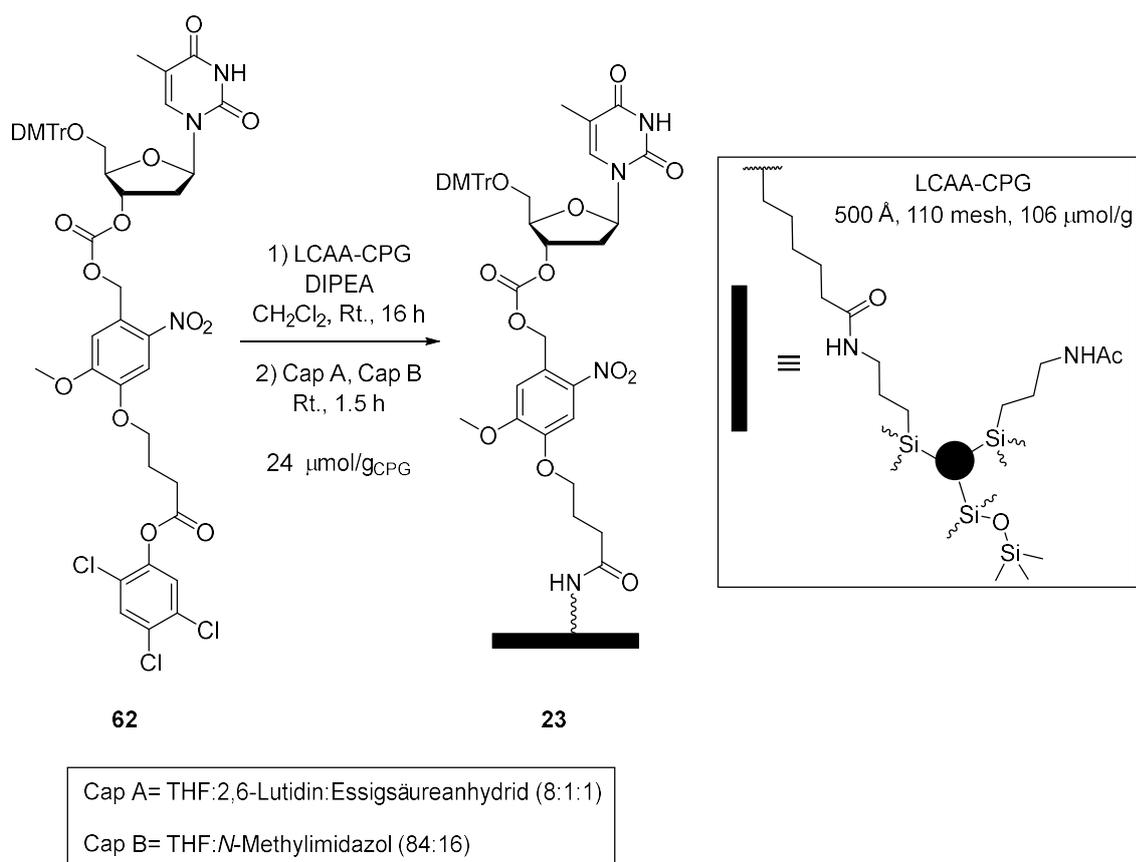
**Abb. 4.23:** Synthese des Aktivesters **62**.

Eine säulenchromatographische Reinigung der Carbonsäure **60**, wie bei GREENBERG beschrieben, war nicht möglich, da die Carbonsäure **60** ohne Säurezusatz auf dem Kieselgel verblieb. Erst durch Zugabe von Ameisensäure war eine Chromatographie möglich, jedoch fand parallel in erheblichen Mengen eine DMTr-Entschützung statt. Deswegen wurde im weiteren Verlauf auf eine Chromatographie verzichtet und Carbonsäure **60** ohne Reinigung weiter umgesetzt. Die verschiedenen Durchführungen sind in *Tab. 6* aufgelistet. Die Entschützung wurde mit unterschiedlichen Äquivalenten *tert*-Butylammoniumfluorid (TBAF, 1 M in THF) und die Aktivestersynthese mit unterschiedlichen Äquivalenten 2,4,5-Trichlorphenol **61** sowie in Gegenwart verschiedener Kupplungsreagenzien durchgeführt. Wie *Tab. 6* zu entnehmen ist, lagen die Ausbeuten nach zwei Stufen nur zwischen 11 und 15%. Die Verwendung von *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) hatte immer Dicyclohexylharnstoff (DCU) als Nebenprodukt (*Tab. 6*, Nr. 1,2) oder eine geringere Ausbeute aufgrund von zwei Chromatographieschritten (*Tab. 6*, Nr. 3) zur Folge.

**Tab. 6:** Bedingungen für die Synthese des Aktivesters **62**.

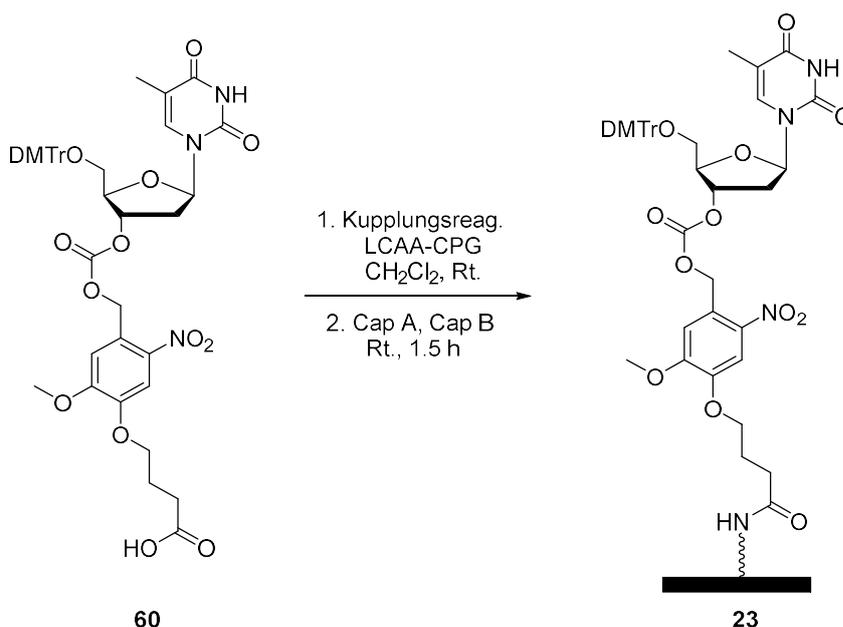
	Äq. TBAF	t (31→60) [h]	Aufarbeitung	Äq. 61	Äq. (DCC/EDC)	t (60→62) [h]	Ausbeute nach zwei Stufen [%]
1	1.2	16	Chromatographie	1.2	1.2 (DCC)	17	mit DCU verunreinigt
2	2.0	48	ausschütteln mit Phosphat-Puffer	1.5	1.2 (DCC) 1.0 (DIPEA)	16	11 (zwei Chromatographie- schritte)
3	1.8	38	ausschütteln mit Phosphat-Puffer	1.5	1.2 (DCC) 1.0 (DIPEA)	16	mit DCU verunreinigt
4	1.8	46	ausschütteln mit Milli-Q-Wasser	2.0	2.0 (EDC)	18	15
5	3.0	38	ausschütteln mit Phosphat-Puffer	1.5	1.2 (EDC)	16	15

Die Versuche, anstelle von DCC 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) zu verwenden, lieferten sauberes Produkt **62** in einer Ausbeute von 15% (Tab. 6, Nr. 4,5). Es deutete nichts darauf hin, dass die Reaktionszeiten, die Äquivalente oder der Austausch von Wasser gegen Phosphat-Puffer in der Aufarbeitung die Ausbeute verbessern könnten. Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum vom Rohprodukt von Carbonsäure **60** wies immer eine erhebliche Menge Produkt auf, was darauf schließen lässt, dass die Synthese des Aktivesters **62** das Problem darstellte. Deswegen wurde im weiteren Verlauf auf einen anderen Weg zurückgegriffen. Zuvor wurde noch versucht, die erhaltene Linker-Nucleosid-Einheit **62** mit der festen Phase LCAA-CPG (long chain alkyl amine - controlled pore glass) zu verknüpfen (Abb. 4.24). Für die Knüpfung des Linkers an die Aminofunktion der festen Phase wurde Aktivester **62** mit LCAA-CPG in Gegenwart von DIPEA umgesetzt.



**Abb. 4.24:** Beladung der festen Phase mit der Linker-Nucleosid-Einheit **62**.

Nach Trocknung der erhaltenen festen Phase **23** folgte ein Capping der freien Aminofunktionen mit den Capping-Reagenzien A und B (Abb. 4.24), welche standardmäßig für das Capping der freien OH-Gruppen in der automatisierten ON-Synthese genutzt werden. Es folgte eine erneute Trocknung der modifizierten festen Phase **23** und eine Bestimmung der Beladung, deren Durchführung in Kap. 4.2.2 im Detail beschrieben wird. Die Beladung lag bei  $24 \mu\text{mol/g}_{\text{CPG}}$ . Vom Hersteller angegeben ist hingegen eine Beladungskapazität von  $30\text{-}60 \mu\text{mol/g}_{\text{CPG}}$ , was auf eine moderat erfolgreiche Beladung hinweist. GREENBERG macht leider keine Angaben zu der Beladung und der genauen Durchführung. SUTHERLAND hingegen nannte eine Beladung von  $33\text{-}56 \mu\text{mol/g}_{\text{CPG}}$ , die durch Knüpfung eines großen Überschusses des Linkers als Aktivester an die feste Phase erfolgte. Da aber im Falle dieser Arbeit die Synthese des Aktivesters ein Problem darzustellen schien, wurde ein anderer Syntheseweg in Betracht gezogen. Hierfür wurde die Carbonsäure **60** direkt in einer Amidkupplung mit LCAA-CPG in Gegenwart verschiedener Kupplungsreagenzien umgesetzt (Abb. 4.25). Wie in Tab. 7 zusammengefasst, lieferte eine Kupplung mit DCC und DMAP eine Beladung von  $73 \mu\text{mol/g}_{\text{CPG}}$  (Tab. 7, Nr. 1). Es war jedoch nicht möglich, die feste Phase DCU-frei zu spülen, weshalb diese verworfen wurde.



**Abb. 4.25:** Beladung der festen Phase mit der Linker-Nucleosid-Einheit **60**.

Stattdessen wurden Kupplungen mit EDC und HOBT durchgeführt, die entweder Filtrationsschritte (*Tab. 7*, Nr. 2) oder Zentrifugationsschritte (*Tab. 7*, Nr. 3). beinhalteten. Ob die unterschiedlichen Beladungen durch die zusätzlichen Schritte oder die verschiedenen Reaktionszeiten zustande kamen, war nicht eindeutig. Bei Versuch 3 wurde aber immerhin eine Beladung von 58  $\mu\text{mol/g}_{\text{CPG}}$  erhalten, mit der weitergearbeitet wurde.

**Tab. 7:** Bedingungen für die Synthese des Festphasen-gebundenen Thymidinbausteins **23**.

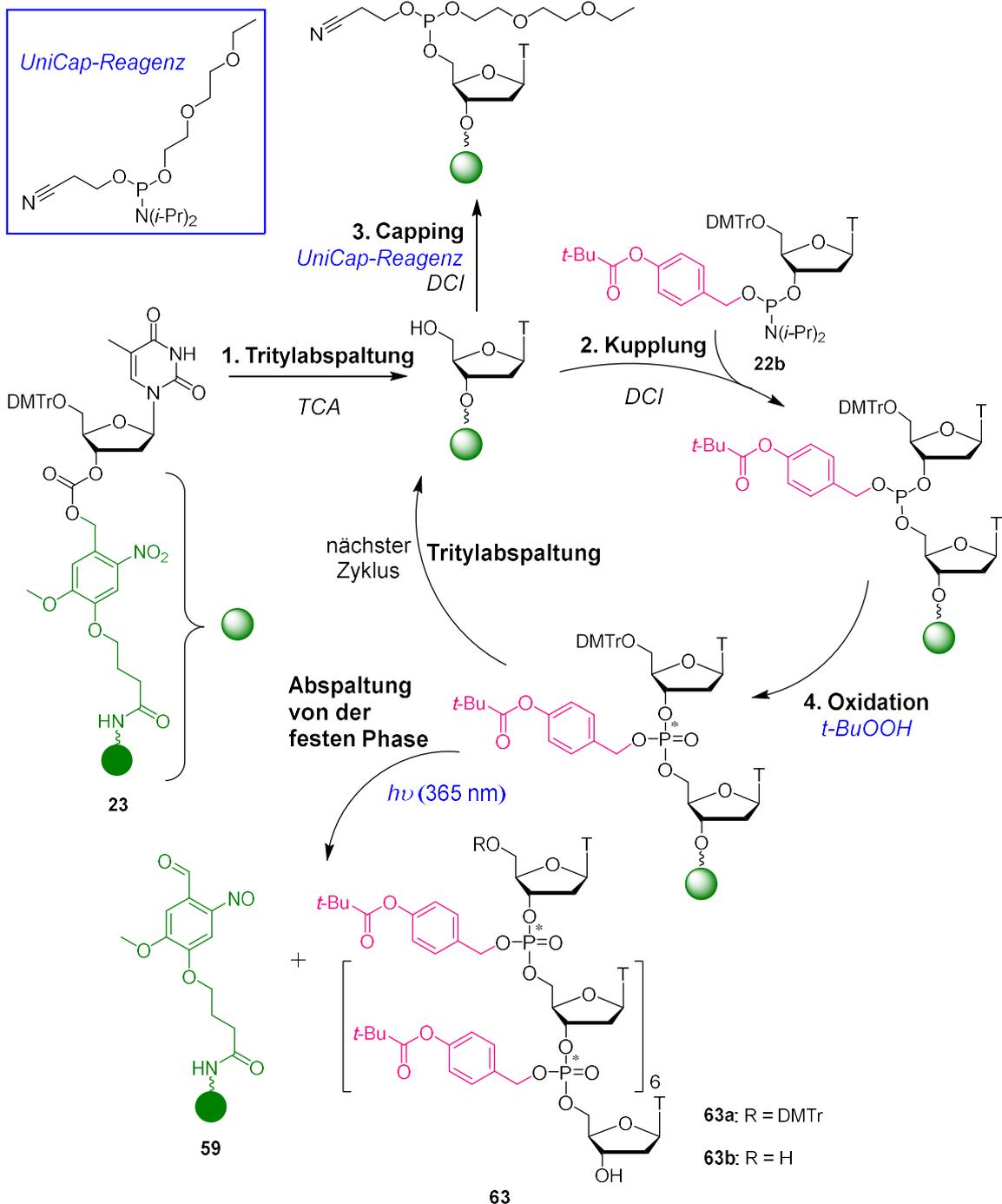
	Äq. DCC/EDC	M / LCAA-CPG [ $\mu\text{mol/g}_{\text{CPG}}$ ]	t [h]	Aufarbeitung	Beladung [ $\mu\text{mol/g}_{\text{CPG}}$ ]
1	1.3 (DCC) 1.0 (DMAP)	800	18	Filtration	73 (DCU-Reste)
2	1.3 (EDC) 1.3 (HOBT)	1000	20	Filtration	30
3	1.3 (EDC) 1.3 (HOBT)	1000	24	Zentrifugation	58

Bei einer Beladung von 58  $\mu\text{mol/g}_{\text{CPG}}$  werden für eine 200 nmol-Säule, wie sie für automatisierte Oligonucleotid-Festphasensynthese eingesetzt wird, 3.5 mg des Festphasen-gebundenen Thymidinbausteins **23** benötigt. Gelagert wurde der Baustein **23** unter Lichtausschluss bei 4 °C und jede verwendete Säule wurde erst direkt vor der Benutzung gepackt.

Die Beladung der festen Phase wurde über einen Trityl-Assay bestimmt. Hierzu wurde eine bestimmte Menge des Festphasen-gebundenen 5'-O-DMTr-Thymidinbausteins **23** mit einer TCA-Lösung (3% m/v in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) versetzt, die auch am DNA-Synthesizer verwendet wird. Die entschützte feste Phase wurde durch Zentrifugation von der Lösung getrennt und der farbige Überstand (Tritylkation) spektrometrisch bei 503 nm in verschiedenen Konzentrationen vermessen. Mithilfe der Gleichung 1 aus der Kalibriergeraden (7.2.5.1) und der gemessenen Absorption (zw. 0.2 und 1.0) ließ sich so die Stoffmenge pro Gramm LCAA-CPG bestimmen.

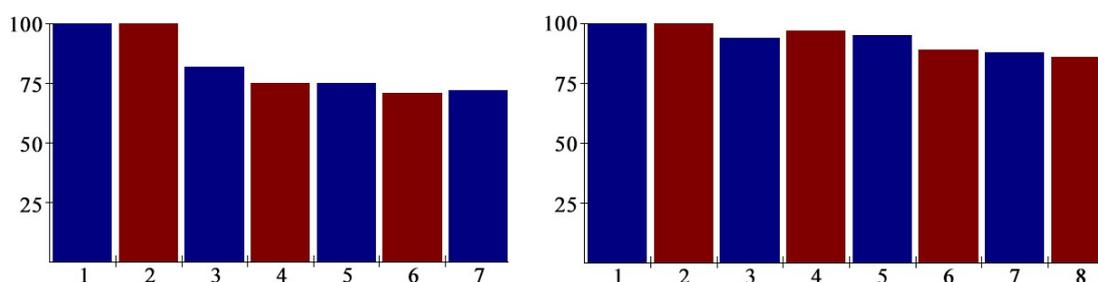
### 4.3 Automatisierte Festphasensynthese eines T-Octamer-Prodrugs

Wie oben bereits erwähnt, wurde die Pivaloyloxybenzyl-Maskierungseinheit als mögliche Prodrug-Gruppe von Pro-Oligonucleotiden für die Antisense-Therapie favorisiert und deswegen für erste Oligonucleotid-Synthesen ausgewählt (Abb. 4.26).



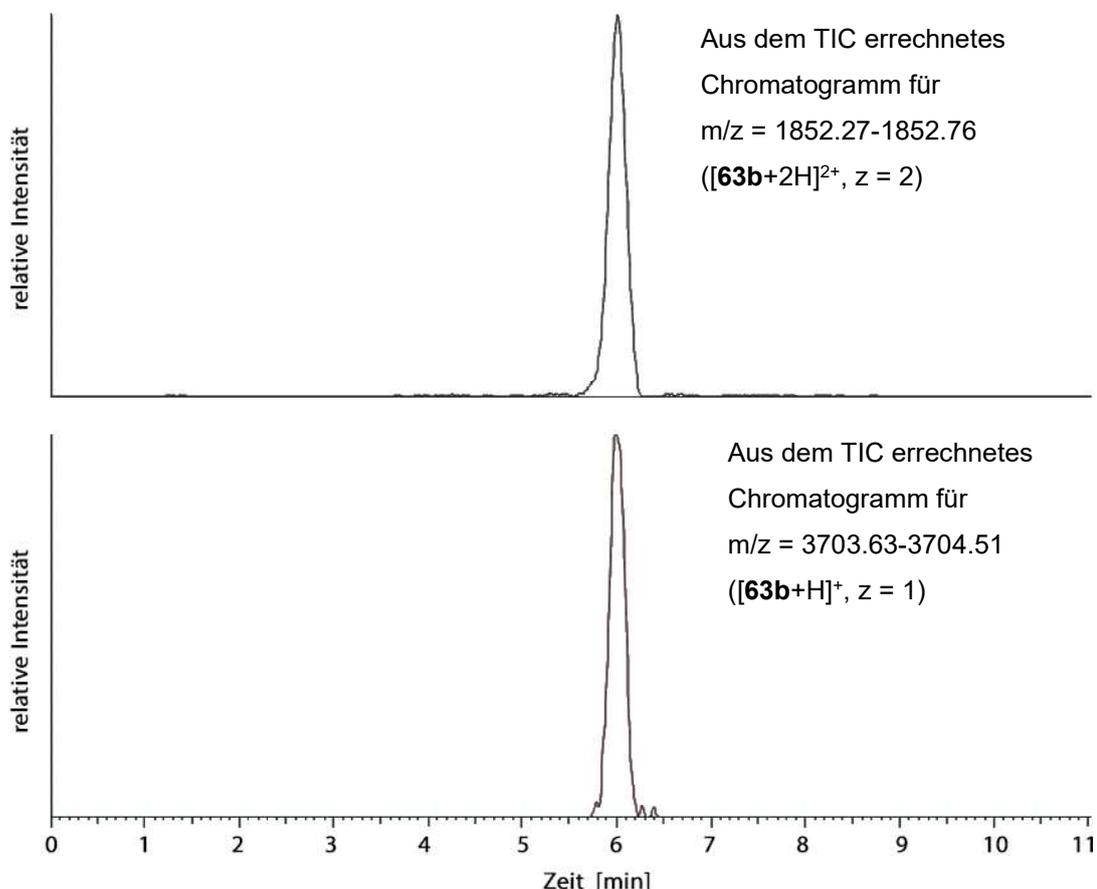
**Abb. 4.26:** Automatisierte Synthese des T-Octamers **63** und dessen Spaltung von der festen Phase.

Bereits 1999 wurden von VASSEUR, IMBACH und Mitarbeitern<sup>[108]</sup> für die Synthese von basenlabilen SATE-Prodrugs Bedingungen gewählt, die basen- und wasserfreies Arbeiten ermöglichten. Zum einen nutzten sie hierzu anstelle des basenlabilen standardmäßig verwendeten Succinyl-Linkers einen milden photolabilen Linker und zum anderen ersetzten sie die wasserhaltige Iodlösung zur Oxidation durch eine milde wasserfreie *tert*-Butylhydroperoxid-Lösung. Des Weiteren untersuchten sie bereits die Verwendung eines Diethyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidits als Cappingmaterial anstelle des standardmäßig verwendeten Gemisches aus Essigsäureanhydrid, 2,6-Lutidin und *N*-Methylimidazol. Da alle drei Optimierungen die SATE-Prodrug-Synthese erheblich verbesserten, wurden auch in der vorliegenden Arbeit ähnliche Bedingungen gewählt. Hierzu zählt unter anderem der Einsatz des kommerziell erhältlichen und reaktiven UniCap-Reagenzes (Abb. 4.26), welches ein Säure- und Basen-freies Cappen möglich machte, und der synthetisierte photolabile Linker (Kap. 4.2). Ebenfalls wurde als Oxidationsmittel eine wasserfreie *tert*-Butylhydroperoxid-Lösung verwendet. Diese milden Bedingungen ermöglichten es, ein AB-Prodrug-Thymidylat-Octamer zu synthetisieren. In anfänglichen Versuchen, in denen die einzelnen Schritte mit ihren Reaktions- und Verweilzeiten noch nicht modifiziert und optimiert wurden, lag die Ausbeute pro Kupplungsschritt zwischen 90% und 95% (Abb. 4.27, links), wohingegen bei Verwendung von Standardamiditen der Umsatz je Zyklus grundsätzlich bei ca. 99% liegt.



**Abb. 4.27:** Grafische Darstellung der Ausbeuten der einzelnen Schritte bei automatisierten ON-Prodrug-Synthesen (links: Synthese eines T-Octamers **63a** vor Modifizierung der Syntheseschritte mit durchschnittlicher Ausbeute pro Kupplungsschritt von 94% und einer rechnerischen Gesamtausbeute von 72%; rechts: Synthese eines T-Octamers **63b** nach Modifizierung der Syntheseschritte mit durchschnittlicher Ausbeute pro Kupplungsschritt von 98% und einer rechnerischen Gesamtausbeute von 86%).

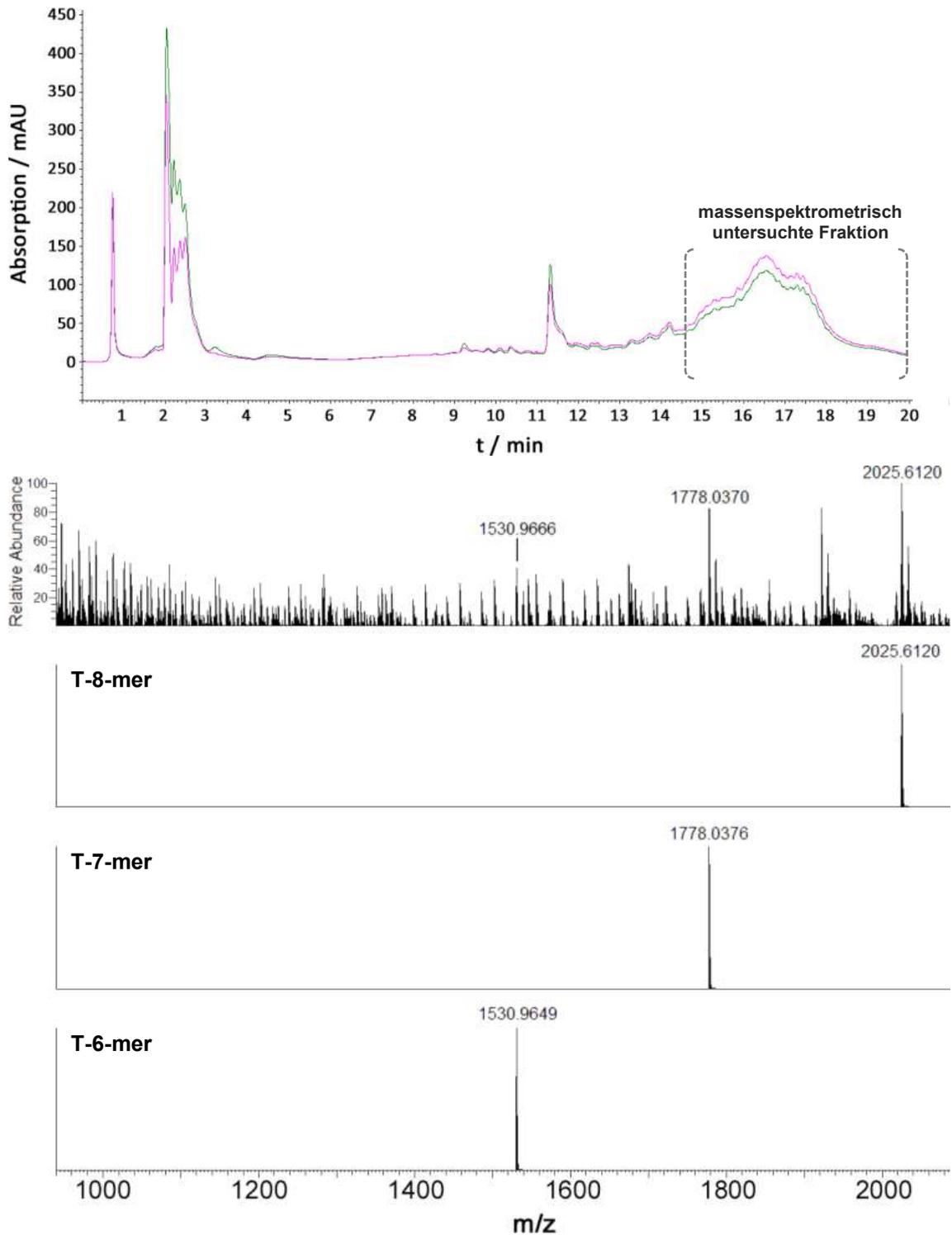
Erste HPLC-HRMS-Untersuchungen des Rohproduktes der synthetisierten T-Octamere nach der Abspaltung vom Träger wiesen bereits das erwartete T-Octamer **63b** (DMTr-Off, Abb. 4.28) nach.



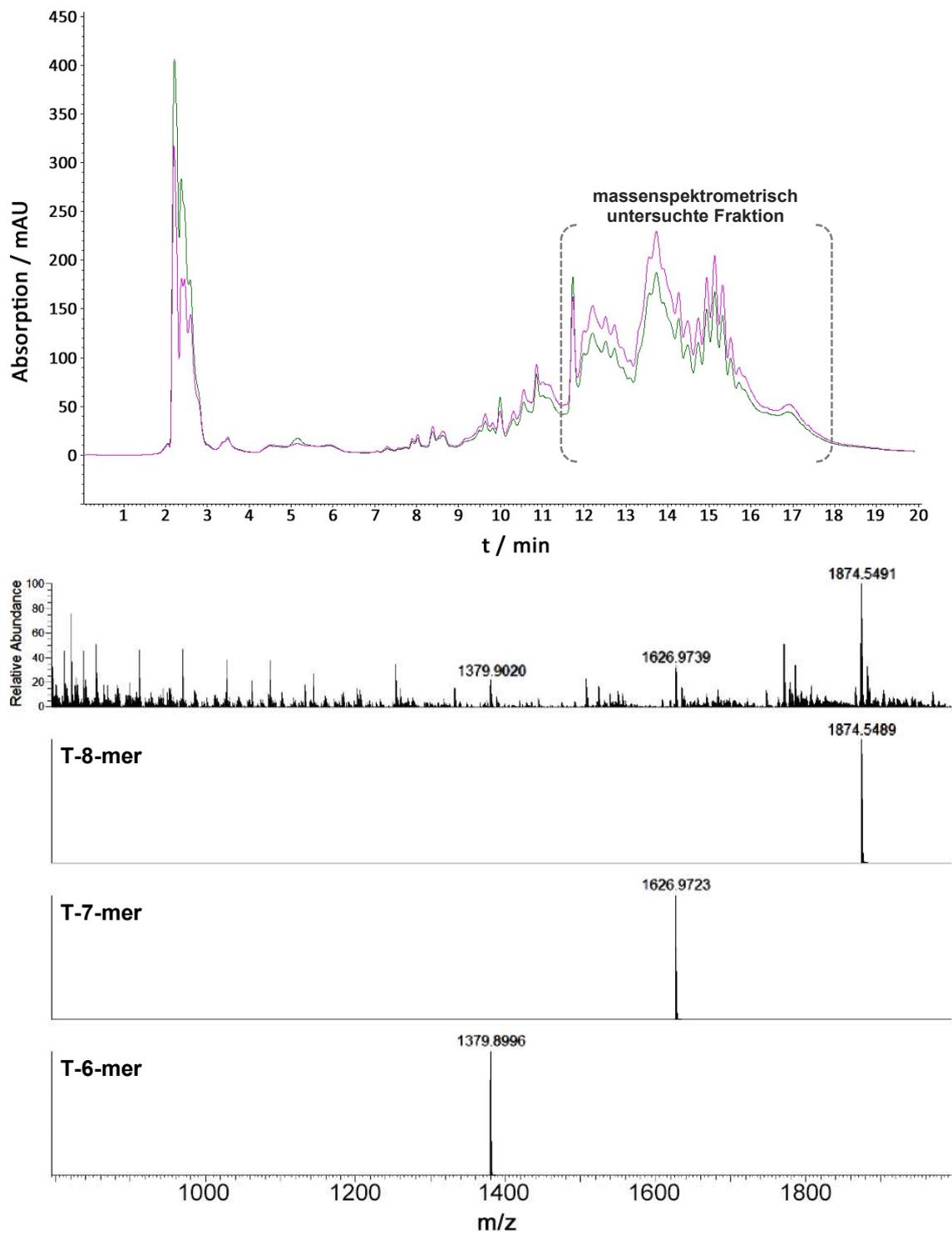
**Abb. 4.28:** HPLC-Chromatogramm des Thymidylat-Octamers **63b** errechnet aus dem TIC (oben:  $[\mathbf{63b}+2\text{H}]^{2+}$  ( $z = 2$ ), berechnete Masse:  $m/z = 1852.0630$ ; unten:  $[\mathbf{63b}+\text{H}]^+$  ( $z = 1$ ), berechnete Masse:  $m/z = 3703.1188$ ).

Zur Verbesserung der Ausbeute wurden daraufhin die einzelnen Schritte modifiziert. Die Wartezeit (Delay) wurde bei der Detritylierung mit TCA-Lösung von 5 s auf 4 s herabgesetzt und die Oxidationszeit mit der *tert*-Butylhydroperoxid-Lösung, die anstelle einer wässrigen Iod-Lösung verwendet wurde, von 9 s auf 30 s erhöht. Der eigentliche Kupplungsschritt des synthetisierten Phosphoramidits wurde von einem auf drei Zyklen erhöht, sodass das Säulenmaterial mehrfach mit frischem Amidit in Kontakt kam. Diese Anpassungen machten es möglich, die AB-modifizierten-T-Octamere **63a** und **63b** in hohen Ausbeuten darzustellen. Laut DNA-Synthesizer lag die durchschnittliche Ausbeute pro Kupplungsschritt nun zwischen 96% und 98%

(Abb. 4.27, rechts) anstatt wie zuvor zwischen 90% und 95% (Abb. 4.27, links) und die Totalausbeute konnte von durchschnittlich 70% auf bis zu 86% erhöht werden. Das Startmaterial besaß eine Nucleosidbeladung von 58  $\mu\text{mol/g}_{\text{CPG}}$  und die Säule wurde mit 200 nmol (3.5 mg) gepackt. Das bedeutet, dass nach der Festphasensynthese eine ungefähre Stoffmenge von 144 nmol bis 172 nmol T-Octamer erwartet werden konnte. Anschließend wurde das Säulenmaterial in DMSO suspendiert und für 1.5 h-2 h unter Rühren bestrahlt ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ). Es folgte eine Reinigung mittels analytischer HPLC (Methode 1: DMTr-Off, Methode 2: DMTr-On. Für beiden Methoden wurde ein Lösungsmittelgemisch aus  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$  verwendet und es wurde mit einem Gradienten von 20% MeCN/80%  $\text{H}_2\text{O}$  zu 50% MeCN/50%  $\text{H}_2\text{O}$  über 3 min gefahren. Anschließend stieg in den nächsten 9 min der Gradient von 50% MeCN/50%  $\text{H}_2\text{O}$  auf 99% MeCN/1%  $\text{H}_2\text{O}$ . Der Unterschied der Methoden lag darin, dass in Methode 2 5 min länger mit dem Gradienten 99% MeCN/1%  $\text{H}_2\text{O}$  gefahren wurde, um sicher zu gehen, dass das gewünschte T-Octamer vollständig von der Säule gespült wurde. Die beiden Verbindungen T-Octamer **63a** und T-Octamer **63b** unterschieden sich bei gleichem Lösungsmittelgradienten kaum in ihrer Retentionszeit. Das T-Octamer **63a** (Abb. 4.29, oben) besaß eine  $t_{\text{R}}$  von 15-20 min und das T-Octamer **63b** (Abb. 4.30, oben) eine  $t_{\text{R}}$  von 11.5-18 min. Die Zeiten weisen darauf hin, dass beide Verbindungen erst bei ca. 99% MeCN eluierten, so dass keine Trennung von den Abbruchfragmenten stattfinden konnte. Ein Unterschied in der Retentionszeit würde die Abtrennung des erwarteten Oligomers von seinen gecappten Abbruchfragmenten ermöglichen. Außerdem ist ein weiteres Problem, dass, wie schon erwähnt, die gewünschten Produkte jeweils als ein Gemisch aus  $2^7 (=128)$  Diastereomeren anfallen, die zu einem breiten Signal führen können.



**Abb. 4.29:** T-Octamer **63a** (oben: HPLC-Chromatogramm; unten: HRMS-Spektrum und berechnete Massen  $[M+2Na]^{2+}$  ( $z = 2$ ) der T-6 bis T-8-mer).

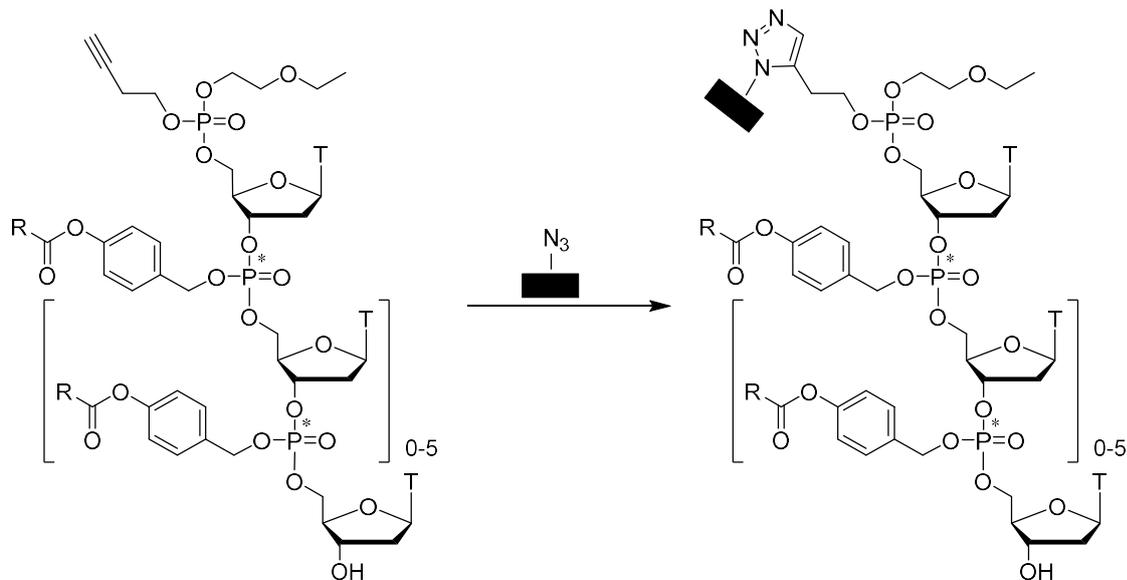


**Abb. 4.30:** T-Octamer **63b** (oben: HPLC-Chromatogramm; unten: HRMS-Spektrum und berechnete Massen  $[M+2Na]^{2+}$  ( $z = 2$ ) der T-6 bis T-8-mer).

Eine hochaufgelöste massenspektrometrische Analyse (Abb. 4.29, unten) vom T-Octamer **63a** weist eindeutig das erwartete Ziel-Octamer (berechnet:  $m/z = 2025.6120$ , gefunden:  $m/z = 2025.6120$   $[M+2Na]^{2+}$ ; berechnet:

$m/z = 1357.7366$ , gefunden:  $m/z = 1357.7704$   $[M+3Na]^{3+}$ ) nach. Des Weiteren sind in der HPLC-Fraktion die Masse von verkürzten Abbruchfragmenten, dem 7-mer<sub>DMTr</sub> (berechnet:  $m/z = 1778.0376$ ; gefunden:  $m/z = 1778.0370$   $[M+2Na]^{2+}$ ) und 6-mer<sub>DMTr</sub> (berechnet:  $m/z = 1531.9649$ ; gefunden:  $m/z = 1531.9666$   $[M+2Na]^{2+}$ ) eindeutig zu finden. Es handelt sich hierbei um Fragmente, die bei der automatisierten DNA-Synthese ohne Capping entstehen und mittels HPLC nicht abgetrennt werden können, da sie ebenfalls eine DMTr-Gruppe tragen. Gecappte, verkürzte Nucleotid-Stränge konnten nicht in dieser Fraktion nachgewiesen werden. Im Falle vom T-Octamer **63b** konnte auch hier das Ziel-Octamer (berechnet:  $m/z = 1874.5489$ ; gefunden:  $m/z = 1874.5491$   $[M+2Na]^{2+}$ ) in der besagten HPLC-Fraktion nachgewiesen werden (*Abb. 4.30*, unten). Ebenso wie beim T-Octamer **63a** sind erneut die Massen vom verkürzten 7-mer (berechnet:  $m/z = 1626.9723$ ; gefunden:  $m/z = 1629.9739$   $[M+2Na]^{2+}$ ) und 6-mer (berechnet:  $m/z = 1379.8996$ ; gefunden:  $m/z = 1379.9020$   $[M+2Na]^{2+}$ ) eindeutig zu finden, jedoch keine verkürzte Form, die gecappt vorliegt. Es ist eindeutig zu erkennen, dass das Capping in den letzten zwei Synthese-Ansätzen nicht ablief. Da dies nicht an dem Katalysator DCI liegen konnte, da die Amiditkupplung zuvor in guten Ausbeuten abgelaufen waren, musste es an der Qualität des kommerziell erhaltenen UniCap-Reagenzes gelegen haben. In weiteren Oligonucleotid-Synthesen sollte das UniCap-Reagenz vor Benutzung NMR-spektroskopisch untersucht werden. Trotzdem wurde zur Konzentrationsbestimmung des Gemisches aus T-Octamer **63a** und seinen Abbruchfragmenten eine Detritylierung durchgeführt, welches ebenfalls in Kapitel 4.2 im Einzelnen beschrieben ist. Die Stoffmenge des T-Octamers **63a** und seiner Abbruchfragmente betrug nach Bestrahlung, HPLC-Reinigung und Detritylierung ca. 20 nmol. Um eine Trennung der Abbruchfragmente und des gewünschten Oligonucleotids zu erhalten, wäre es möglich, von einer RP-C<sub>18</sub>-Säule auf eine RP-Phenyl-Hexyl-Säule zu wechseln, da eine geringere Wechselwirkung der Prodrugs mit der stationären Phase erwartet wird. Des Weiteren könnten über Click-Chemie die Abbruchfragmente an eine feste Phase gebunden werden (*Abb. 2.31*). Hierzu müsste ein UniCap-ähnliches Phosphoramidit synthetisiert werden, das eine Alkin-Funktion trägt. Nachdem der CPG-Träger entfernt worden wäre, wäre es möglich das Gemisch aus dem gewünschten Oligomer

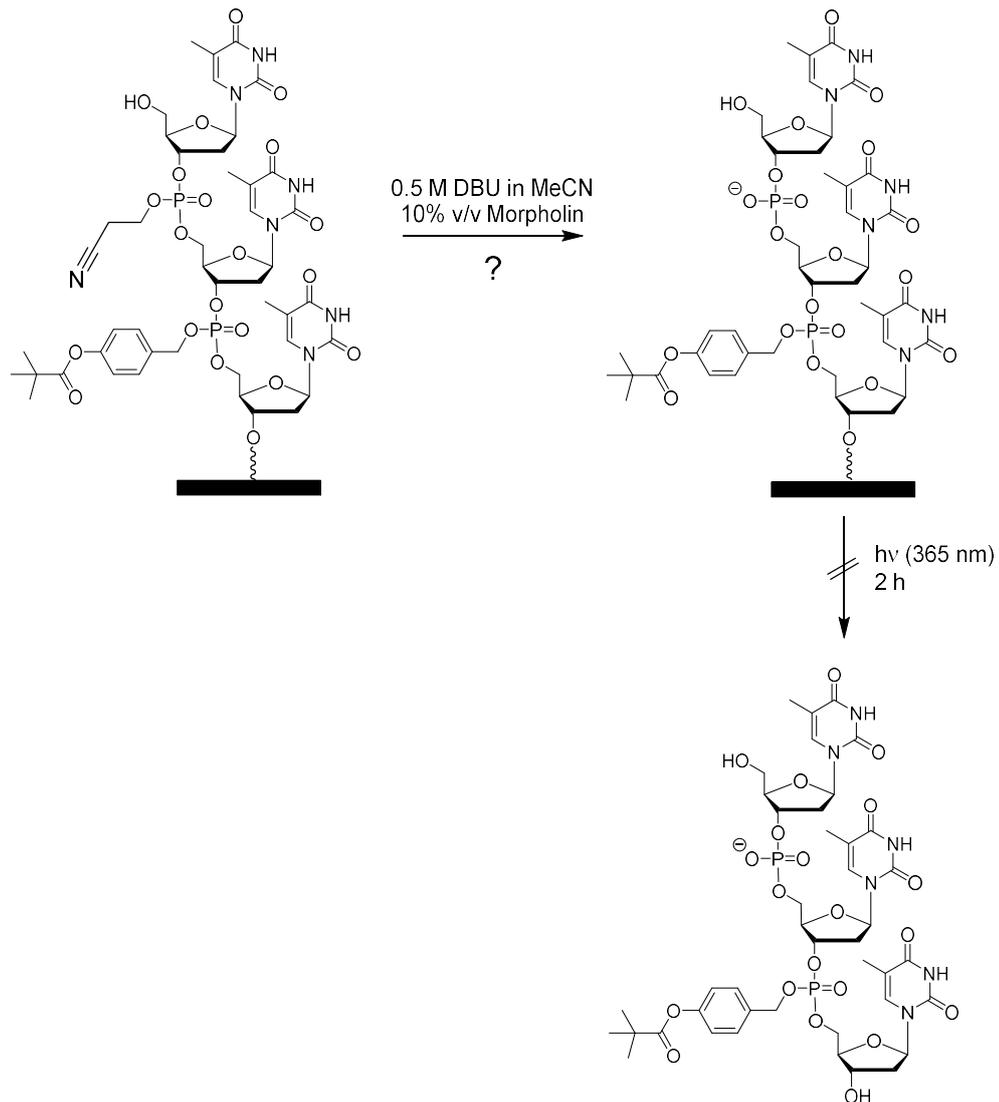
und den Abbruchfragmenten, die die Alkin-Funktion tragen, mit einer festen Phase zu versetzen, die Azid-Funktionen trägt. Auf diese Weise wären nach einer Click-Reaktion einzig die Abbruchfragmente an der festen Phase gebunden und vor der HPLC-Reinigung könnte bereits eine Trennung durch Filtration stattfinden, da nur noch das gewünschte Oligonucleotid in Lösung vorliegen würde.



**Abb. 2.31:** Knüpfung der Abbruchfragmente eines T-Octamers an eine feste Phase.

Im weiteren Verlauf wurde ein Vorversuch für partiell Prodrug-modifizierte Sequenzen durchgeführt. Als Modell wurde deswegen ein T-Trimer am DNA-Synthesizer dargestellt, welches eine Maskierungsgruppe und eine Cyanoethylgruppe trug (Abb. 4.32). Als feste Phase wurde die photospaltbare Variante gewählt. So konnten in einem Schritt die Maskierungsgruppe und der Linker den Entschützungs-Bedingungen der Cyanoethyl-Schutzgruppe nach SUTHERLAND<sup>[139]</sup> ausgesetzt werden. Für die Synthese und Reinigung einer partiell Prodrug-modifizierten Sequenz müssen beide Gruppen den Bedingungen standhalten. Aus diesem Grund wurde das dargestellte Trimer in einer DBU-Morpholin-Lösung für 3 h bei 40 °C gerührt, bevor es von der festen Phase abgespalten wurde. Das Trimer sollte dabei an der festen Phase haften bleiben, sodass die überschüssigen Reagenzien einfach abfiltriert werden konnten. Erst anschließend fand die photochemische Spaltung des Linkers statt. Eine anschließende Gelelektrophorese sollte das Trimer reinigen. Auf

dem Gel war leider keine Bande erkennbar, was entweder darauf schließen lässt, dass der Linker den Bedingungen nicht standgehalten hat oder dass das Trimer einfach zu klein für eine gelelektrophoretische Reinigung war. In Folgearbeiten könnte eine  $^{31}\text{P}$ -NMR-spektroskopische Untersuchung den Umsatz nachweisen, ohne dass die Gelelektrophorese zum Einsatz kommen muss. Hierfür ist jedoch eine Vergrößerung des Ansatzes notwendig.



**Abb. 4.32:** Versuch zur Synthese eines T-Trimers mit nur einer Maskierungsgruppe.

## 4.4 Synthese einer C-T-Dimer-Modellverbindung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die T-Octamer **63a** und **63b** synthetisiert werden konnten, wurde versucht, eine unter milden Bedingungen spaltbare Schutzgruppe für die exocyclischen Aminogruppen der drei anderen Nucleobasen zu identifizieren. Auf diesem Weg wäre es möglich, eine gemischte Sequenz zu synthetisieren. Da photolabile Schutzgruppen häufig nicht vollständig abgespalten werden, wurde auf die von SUTHERLAND und Mitarbeitern<sup>[139]</sup> entwickelte Schutzgruppe zurückgegriffen, die durch die starke nicht-nucleophile Base DBU in Gegenwart von Morpholin abgespalten werden kann. Deswegen wurde eine nicht-automatisierte Synthese einer Dimer-Modellverbindung mit Maskierungsgruppe, Thymidin und einer der anderen drei Nucleobasen (Adenin, Cytosin und Guanin) angestrebt, die als Testsubstanz dienen sollte. Als zu testende Nucleobase wurde Cytosin gewählt. Der zweifach geschützte Cytidin-Baustein **69** wurde wie folgt synthetisiert (Abb. 4.33). Zuerst wurde die Schutzgruppe für die Nucleobase dargestellt, indem 3-Hydroxypropionitril **64** über 2 h bei 0 °C zu einer Triphosgen-THF-Lösung getropft wurde. Die Zugabe über einen längeren Zeitraum verringerte die Entstehung des Nebenproduktes **66**.

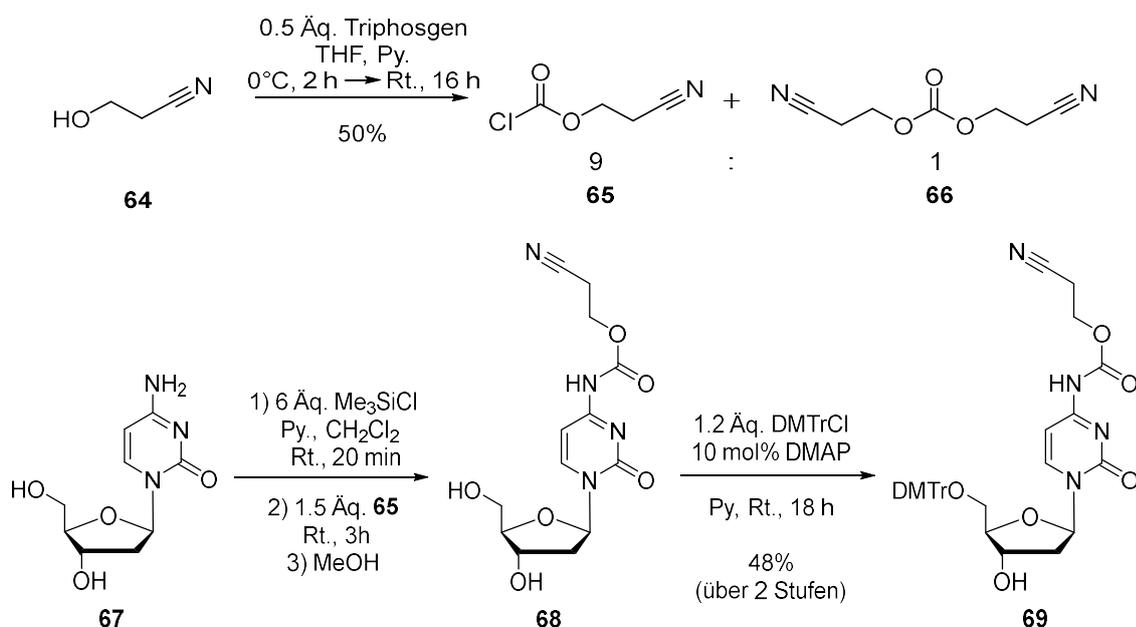
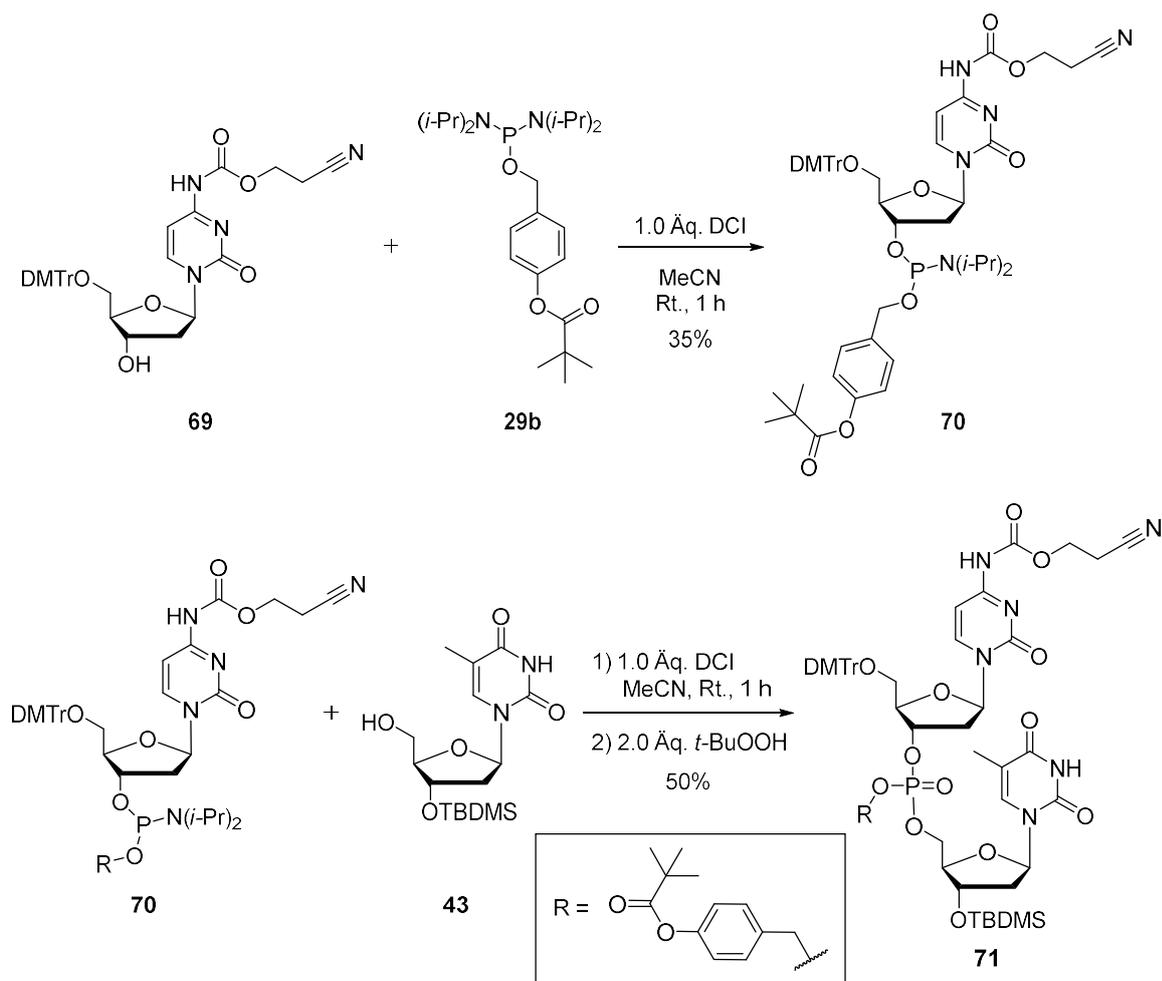


Abb. 4.33: Synthese des Cytidinderivats **69**.

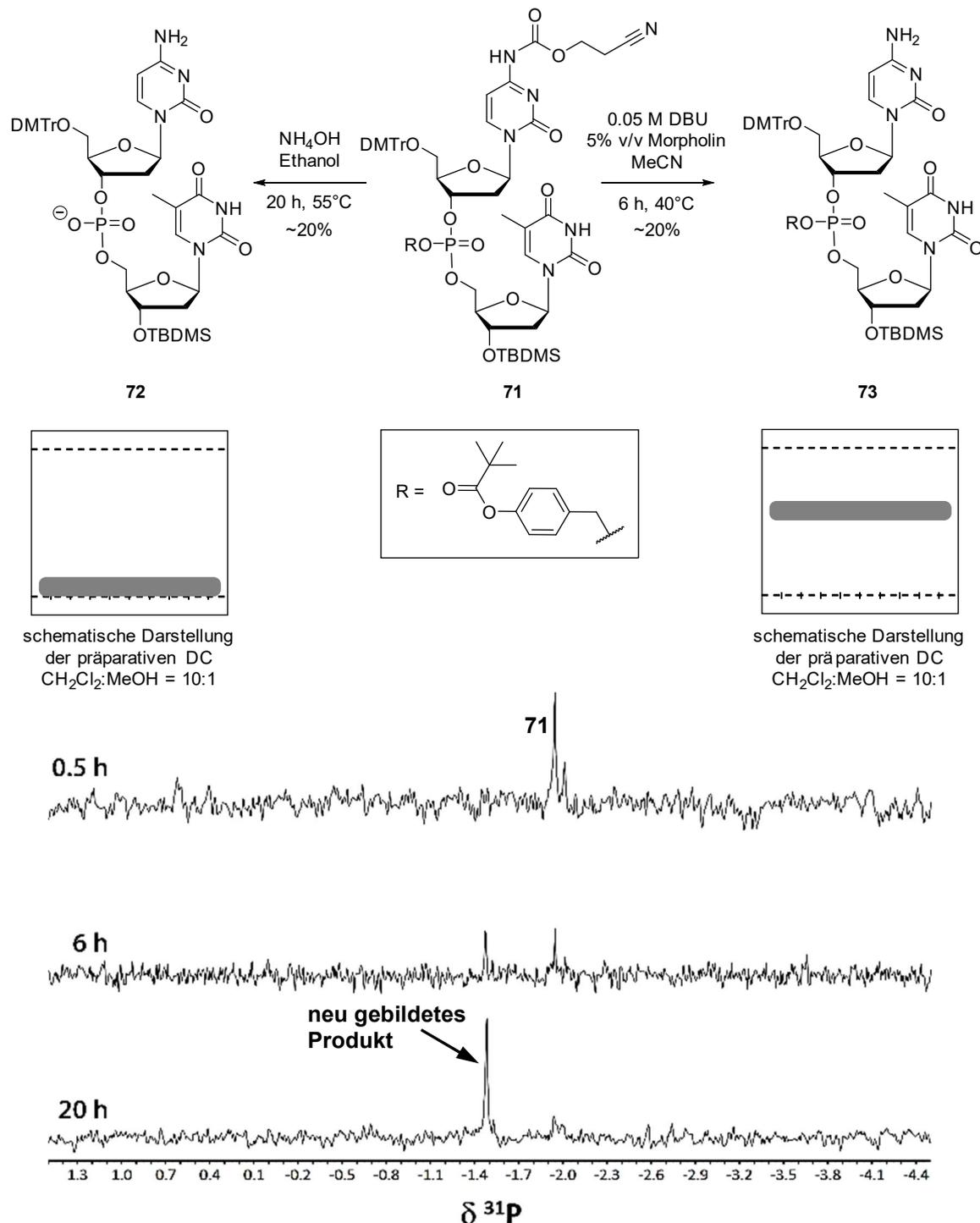
Zur Reinigung wurde das angefallene Pyridiniumchlorid abfiltriert. Die so erhaltene Schutzgruppe **65** wurde daraufhin mit Cytidin **67**, dessen freien OH-Gruppen zuvor durch transiente Schützungen mit Trimethylsilyl-Gruppen blockiert worden waren, umgesetzt. Nach Entfernen der Silyl-Gruppen wurde *N*-Cyanoethoxycarbonylcytidin **68** erhalten, das im nächsten Schritt an der 5'-Position DMTr-geschützt wurde. Es war nicht möglich, das als Nebenprodukt erhaltene Pyridiniumchlorid vom *N*-Cyanoethoxycarbonylcytidin **68** abzutrennen, weder durch Säulen-chromatographie noch durch Umkristallisation in Wasser, wie von SUTHERLAND für das *N*-Cyanoethoxycarbonylguanosin beschrieben wurde. Durch das Kochen wurde das Produkt zerstört. Deswegen wurde das Gemisch aus *N*-Cyanoethoxycarbonylcytidin **68** und Pyridiniumchlorid im nächsten Schritt eingesetzt, und durch säulenchromatographische Reinigung von *N*-Cyanoethoxycarbonyl-5'-O-DMTr-Cytidin **69** konnte das Pyridiniumchlorid abgetrennt werden und der geschützte Cytidin-Baustein **69** über zwei Stufen in einer Ausbeute von 48% erhalten werden (*Abb. 4.33*). Um die Kompatibilität der Pivaloyl-ester-Maskierungsgruppe gegenüber den SUTHERLAND-Bedingungen zu testen wurde das C-T-Dimer auf dem zuvor beschriebenen Syntheseweg für Dinucleotide dargestellt (*Abb. 4.34*). Im ersten Schritt wurde *N*-Cyanoethoxycarbonyl-5'-O-DMTr-Cytidin **69** mit dem Phosphordiamidit **29b** in Gegenwart von DCI zu Phosphoramidit **70** umgesetzt. Nach der chromatographischen Reinigung wurde eine Fällung von Amidit **70** in *n*-Hexan durchgeführt. So konnte Amidit **70** in einer Ausbeute von 35% erhalten werden. Daraufhin wurde das Phosphat **71** über die Phosphit-Zwischenstufe durch Umsetzung von Amidit **70** mit 3'-O-TBDMS-Thymidin **43** und anschließende Oxidation mit *tert*-Butylhydroperoxid-Lösung (5 M in Decan) synthetisiert und in einer Ausbeute von 50% isoliert. Da die TBDMS- und die DMTr-Schutzgruppen für die nächsten Untersuchungen keinen Einfluss hatten, wurden sie in diesem Fall nicht entfernt.



**Abb. 4.34:** Synthese der C-T-Modellverbindung **71**.

In den folgenden zwei Testansätzen wurde untersucht, inwieweit die Pivalylester-Maskierungsgruppe im Phosphat **71** bestimmten basischen Bedingungen standhält (Abb. 4.35, oben). Hierzu wurde das Phosphat **71** zum einen den Standard-Abspaltungsbedingungen für die Cyanoethyl-Schutzgruppe ( $\text{NH}_4\text{OH}$ , Ethanol, 20 h, 40 °C) ausgesetzt. Eine anschließende Reinigung mittels präparativer DC mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (10:1) als Laufmittel und die darauffolgende Isolierung durch Extraktion der UV-intensivsten Bande mit MeCN lieferte einzig das entschützte und demaskierte Phosphat **72**. Bereits das Verhalten dieser UV-intensivsten Bande ließ auf eine polare Verbindung schließen, da ein  $R_f$ -Wert von lediglich 0.05 vorlag. Im Gegensatz dazu konnte unter Verwendung modifizierter SUTHERLAND-Bedingungen (0.05 M DBU, 5% v/v Morpholin, 6 h, 40 °C) bei gleichen Bedingungen der präparativen DC das Phosphat **73** isoliert werden. In diesem Fall besaß die UV-intensivste

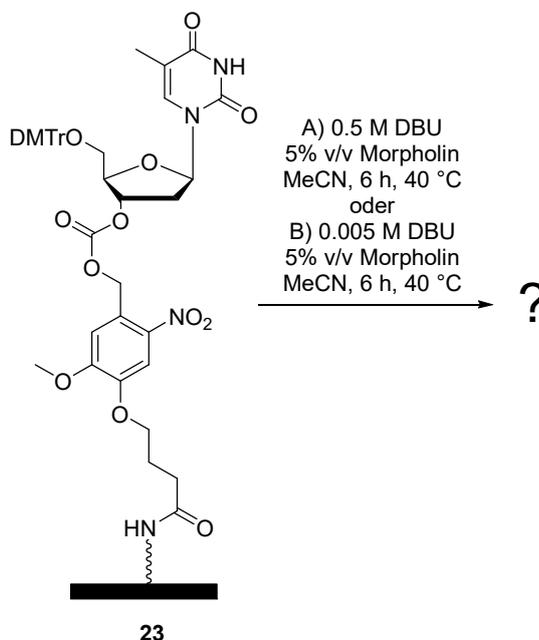
Bande einen  $R_f$ -Wert von 0.61. Die geringen Ausbeuten von je 20% könnten auf Fehler bei der Einwaage oder Verluste bei der Aufarbeitung aufgrund sehr kleiner Ansatzgrößen zurückzuführen sein. Phosphat **71** konnte in beiden Fällen nicht isoliert werden, was auf einen quantitativen Umsatz schließen lässt. Des Weiteren wurde eine  $^{31}\text{P}$ -NMR-spektroskopische Untersuchung der Reaktion von Dimer **71** zu Dimer **73** in  $\text{MeCN-d}_3$  durchgeführt um zu ermitteln, ob es sich um eine einheitliche Umsetzung handelt (*Abb. 4.35*, unten). Hierzu wurde Dimer **71** unter den modifizierten SUTHERLAND-Bedingungen in einem NMR-Röhrchen in einem konzentrierteren Ansatz, da ein NMR-Röhrchen ein bestimmtes Volumen vorgibt, unter Inertgas mit DBU (0.5 M) und Morpholin (5% v/v) versetzt. Das Röhrchen wurde für 20 h bei 40 °C im NMR-Spektrometer gelagert und alle 30 min wurde ein  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum aufgenommen. Diese Untersuchung deutete an, dass das Diastereomergemisch von Edukt **71** (-1.98 ppm und -2.00 ppm) nach 20 h vollständig abreagiert war und ausschließlich ein Peak bei -1.48 ppm beobachtet werden konnte. Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass in dieser Zeit keine weitere Phosphorverbindung gebildet wurde. Die Reaktionszeiterhöhung von 6 h auf 20 h kann darauf zurückgeführt werden, dass das Reaktionsgemisch im NMR-Röhrchen, im Gegensatz zu der Reaktion im Kolben, nicht gerührt wurde. Eine Analyse des Produktes per  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie konnte nicht mit Sicherheit bestätigen, dass es sich bei dem Produkt um Verbindung **73** handelt, da die Produktsignale von Signalen der Reagenzien teilweise überlagert wurden. Um sicherzustellen, dass es sich bei dem entstandenen Produkt um Dimer **73** handelt, sollte in Folgearbeiten erneut als Referenz Dimer **72** und **73**, dessen  $^{31}\text{P}$ -NMR-Verschiebungen nahe beieinander liegen, synthetisiert werden. Mithilfe der Referenzen **72** und **73** wäre eine Reaktionsverfolgung sowohl mittels NMR- als auch mittels HPLC-MS-Analytik möglich. Wenn es sich bei dem Produkt um Dimer **72** handeln sollte, müsste für das NMR-Experiment eine geringere Konzentration an Reagenzien gewählt werden oder die Reaktion im Kolben wiederholt werden. Hierfür müsste für eine Reaktionskontrolle Proben in gewissen Zeitabständen für NMR- und HPLC-MS-Analyse entnommen werden um den Verlauf der Umsetzung exakt zu analysieren.



**Abb. 4.35:** Stabilitätstests der Maskierungsgruppe unter basischen Bedingungen (oben);  $^{31}\text{P}$ -NMR-spektroskopische Untersuchung der Reaktion von Dimer **71** in  $\text{MeCN-d}_3$  (unten).

Damit war ein Hinweis erhalten worden, dass die Pivalylester-Maskierungsgruppe den Bedingungen für die Nucleobasen-Entschützung nach SUTHERLAND unter bestimmten Kriterien standhalten konnte. Daraufhin wurde ebenfalls die Stabilität des Linkers mit seiner Carbonat-Einheit gegenüber diesen Bedingungen, in konzentrierter und verdünnter Form wie zuvor

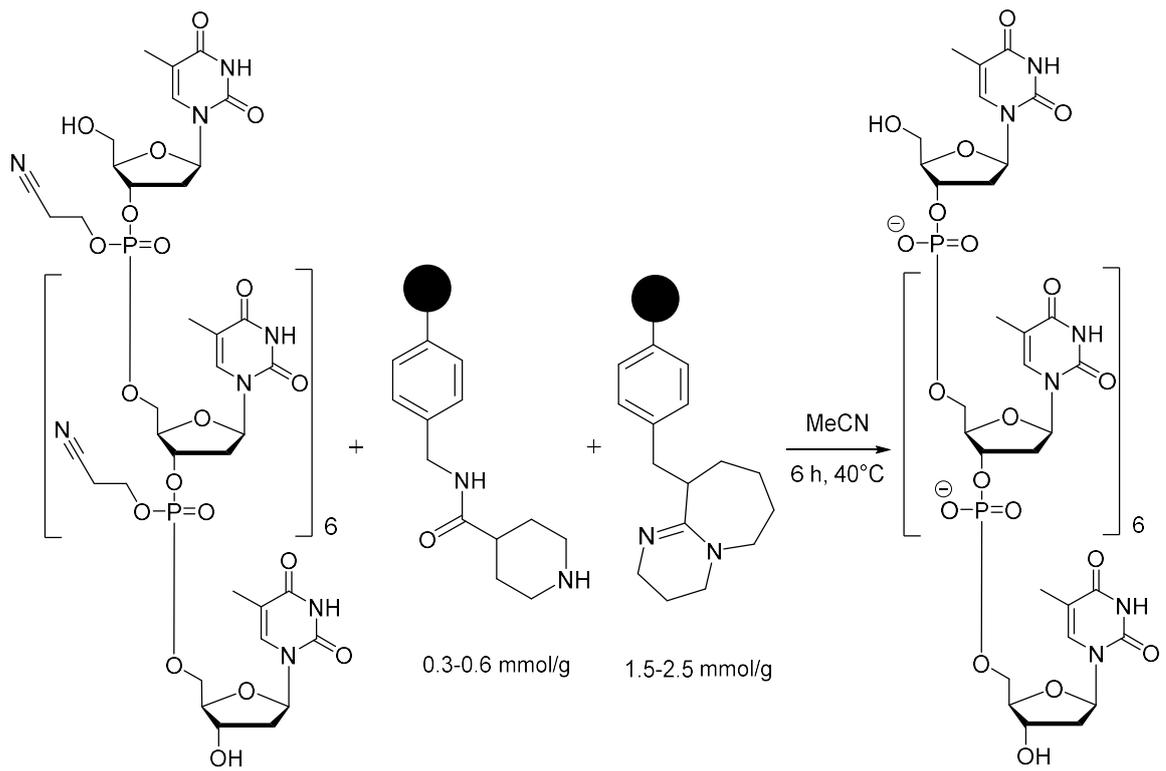
verwendet, untersucht. Zum einen wurde das Startmaterial **23** (200 nmol) einer 0.5 M DBU-Lösung und 5% v/v Morpholin und zum anderen einer verdünnten Variante mit 0.005 M DBU-Lösung und 0.05% v/v Morpholin bei gleichem Volumen der Lösungen ausgesetzt (Abb. 4.36).



**Abb. 4.36:** Startmaterial **23** unter basischen Bedingungen.

Die Reaktionen fanden unter Argon in DNA-Synthesizer-Säulen statt, die aber an zwei 1 mL-Spritzen angeschlossen waren, was eine Bewegung der Reagenzlösung über die Säule und das Startmaterial **23** möglich machte. Somit konnten Standardbedingungen simuliert werden. Nach 6 h wurden die Säulen jeweils mit MeCN und CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gespült und getrocknet. Das Startmaterial **23** besaß eine Beladung von 58 µmol/g. Die Detritylierung der zwei Testansätze ergab im Fall A keine Beladung und im Fall B eine Beladung von 25 µmol/g. Die Beladung hat sich somit sogar im Falle der verdünnten Variante B mehr als halbiert und im Falle A ist von einer vollständigen Linker-Spaltung auszugehen. Daraus folgt, dass die modifizierten SUTHERLAND-Bedingungen nicht mit dem Linker kompatibel sind und dass eine mögliche Entschützung der Nucleobasen bei einer gemischten Sequenz und gleichzeitiger Knüpfung des ON an der feste Phase nicht möglich sein wird, da das ON abgespalten wird. Dies erschwert die Abtrennung des DBUs, des Morpholins und des Nebenproduktes, welches durch Reaktion von Morpholin mit der abgespaltenen Acrylonitril-Gruppe

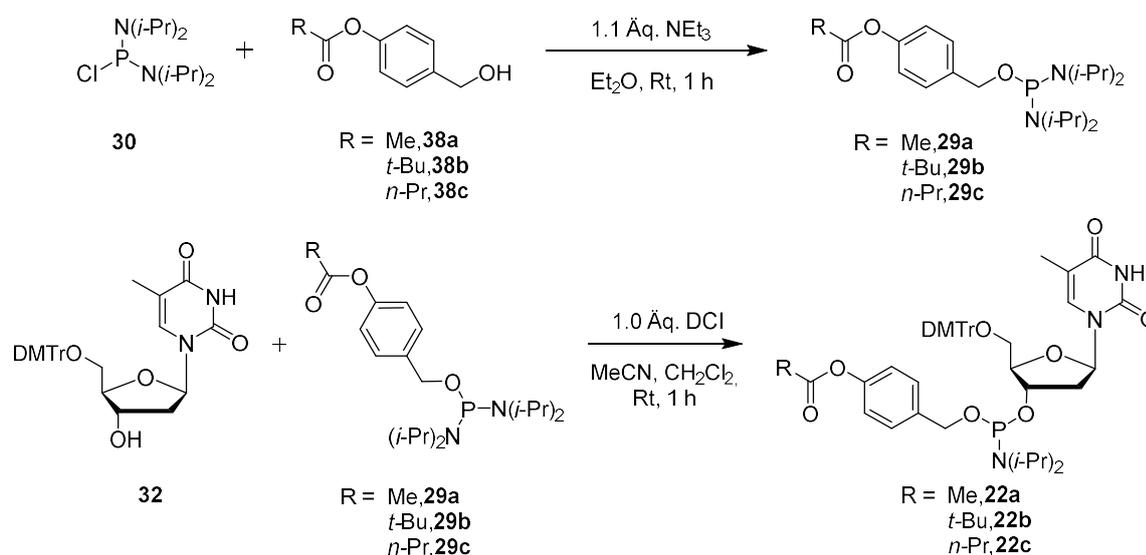
entsteht. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Reagenzien in Festphasen-gebundener Form einzusetzen. Hierzu wurden kommerziell erhältliches DBU-Harz mit Divinylbenzol-Linker (1.5-2.5 mmol/g, *Bachem*) und 4-Piperidylformylaminomethyl-Harz (0.3-0.6 mmol/g, *Sigma-Aldrich*) verwendet (*Abb. 4.37*). Es wurde ein unmodifiziertes T-Octamer am DNA-Synthesizer dargestellt. Die Synthese lieferte das T-Octamer in eine Ausbeute von 98% pro Schritt und eine Gesamtausbeute von 85%. Eine anschließende Bestrahlung ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ , 2 h) lieferte das gewünschte Octamer in einer Ausbeute von 113 nmol, was UV-spektrometrisch bestimmt wurde. Die anschließende Reaktion wurde annähernd unter den modifizierten SUTHERLAND-Bedingungen durchgeführt. Der Unterschied lag in der Festphasenbindung der Reagenzien, damit diese nach der Reaktion abfiltriert werden konnten. Sowohl das Festphasen-gebundene DBU als auch das Festphasen-gebundene Piperidin, das anstelle des Morpholins verwendet wurde, wurden im hohen Überschuss (x20), wie es auch schon zuvor der Fall war, eingesetzt. Das in MeCN (2 mL) suspendierte Reaktionsgemisch wurde unter Stickstoff für 6 h bei 40 °C langsam gerührt, damit das Harz nicht mechanisch beschädigt wurde. Nach einer Filtration des Reaktionsgemisches und Waschen des Rückstandes mit MeCN (3 mL) und Wasser (3 mL) wurde die Lösung im Vakuum eingeeengt. Eine massenspektrometrische Analyse konnte jedoch weder das anionische Produkt-Oligomer noch das neutrale Edukt-Oligomer nachweisen. Daraus lässt sich schließen, dass zum einen das Edukt-Oligomer umgesetzt worden sein muss, und zum anderen scheint das anionische Oligomer an den kationisch geladenen funktionellen Gruppen an der festen Phase haften geblieben zu sein. In weiteren Untersuchungen wäre es möglich, den Versuch zu wiederholen und anstelle des Wassers das Harz mit einer wässrigen NaCl-Lösung zu waschen, um das anionische Oligomer von der Harzoberfläche zu lösen. Ebenfalls wäre es möglich, als zu testendes Oligomer ein maskiertes T-Octamer unter den gleichen Bedingungen zu synthetisieren, das eine UniCap-Gruppe trägt. Die Festphasen-gebundenen Reagenzien sollten die Cyanoethyl-Gruppe der UniCap-Einheit abspalten und so nur eine negative Ladung erzeugen. Eine Abtrennung des Oligomers von der festen Phase wäre damit erleichtert.



**Abb. 4.37:** Cyanoethyl-Entschützung mit Festphasen-gebundenen Reagenzien.

## 5 Zusammenfassung

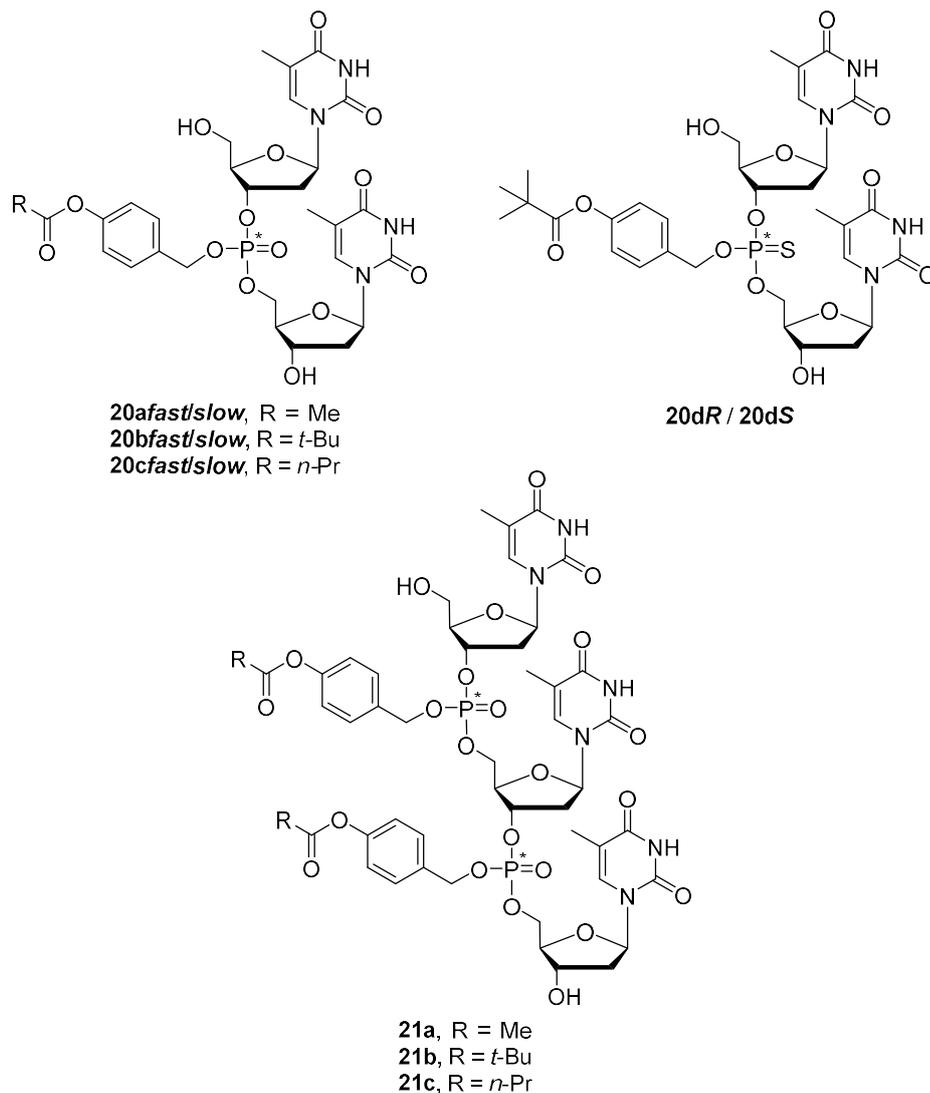
In der vorliegenden Arbeit sollte die Synthese neuartiger Prodrugs von einzelsträngigen Oligonucleotiden mit potenzieller Antisense-Aktivität entwickelt werden. Hiermit sollte ein grundlegender Beitrag zur Entwicklung von modifizierten Oligonucleotiden mit therapeutischem Potenzial geleistet werden. Im Rahmen eines ersten Teilprojektes wurden Acyloxybenzyl-(AB)-modifizierte Modell-Oligomere (Dimere und Trimere) dargestellt, um generell die potenzielle Nützlichkeit der AB-Modifikation in der Konzeption von Pro-Oligonucleotiden zu belegen. Hierzu wurden die Phosphordiamidite **29a-c** und darauf aufbauend die Phosphoramidite **22a-c**, die später auch für die automatisierte DNA-Synthese verwendet wurden, synthetisiert (Abb. 5.1).



**Abb. 5.1:** Synthese der Phosphoramidite **22a-c**.

Die Synthesen der Modellverbindungen erfolgten in Lösung unter Verwendung üblicher Schutzgruppenstrategien. Für die Modell-Dimere **20a-d** (Abb. 5.2) fand eine Trennung der Diastereomere (mit unterschiedlicher Konfiguration am Phosphattriester) mittels präparativer HPLC statt. Da die Konfiguration am Phosphattriester nicht zugeordnet werden konnte, wurden die Diastereomere bezogen auf ihr Elutionsverhalten als **fast** und **slow** bezeichnet. Bei den Phosphorthioaten **20d** hingegen war eine Bestimmung der Konfiguration (*R/S*) mittels SVP (Snake-Venom-Phosphodiesterase) möglich. Bei den Modell-

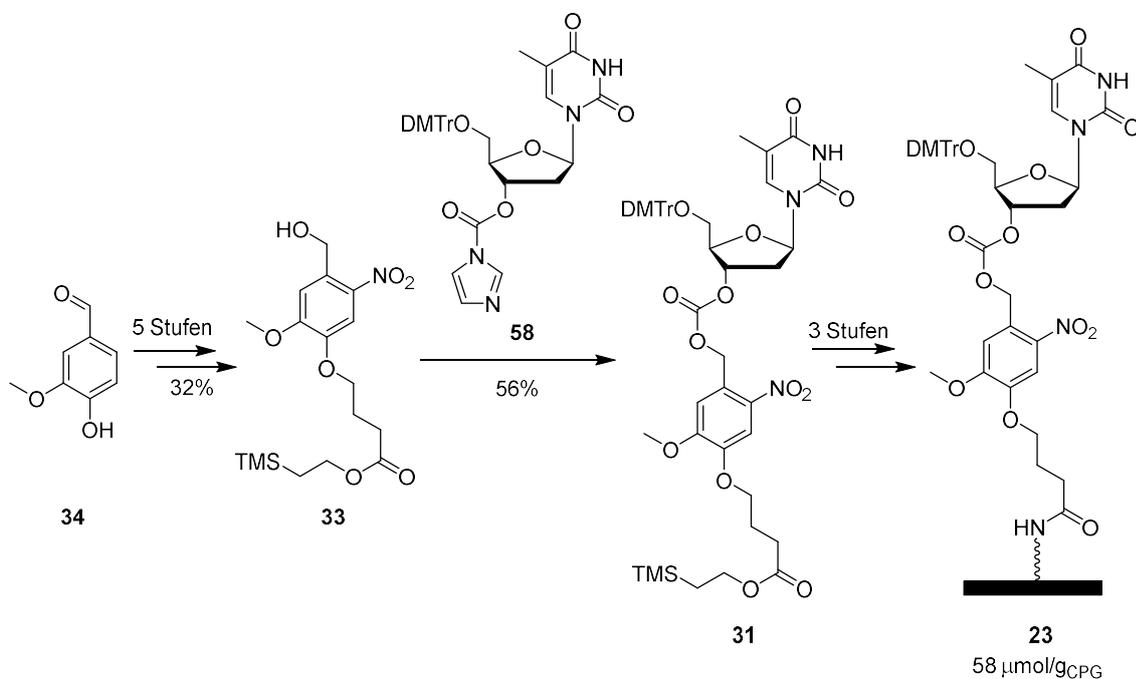
Trimeren **21a-c** fiel ein Gemisch aus vier Diastereomeren an, die chromatographisch nicht getrennt wurden. Die so erhaltenen Modellverbindungen (*Abb. 5.2*) wurden Stabilitätstests in enzymfreier Phosphatpuffer-Lösung, in Schweineleber-Esterase-Pufferlösung, in humanem Plasma und Zelllysat und in bakteriellem Zelllysat unterzogen.



**Abb. 5.2:** Dimer- und Trimer-Modellverbindungen.

Aus den ermittelten Stabilitäten ergab sich, dass eine AB-Modifikation der Phosphateinheit zu Prodrugs ein vielversprechendes pharmakokinetisches Profil aufweist. Insbesondere die Pivaloyloxybenzyl-Maskierungseinheit in den Verbindungen **20b** und **21b** wies Stabilitäten auf, die für eine Verwendung in Prodrug-Ansätzen sprechen.

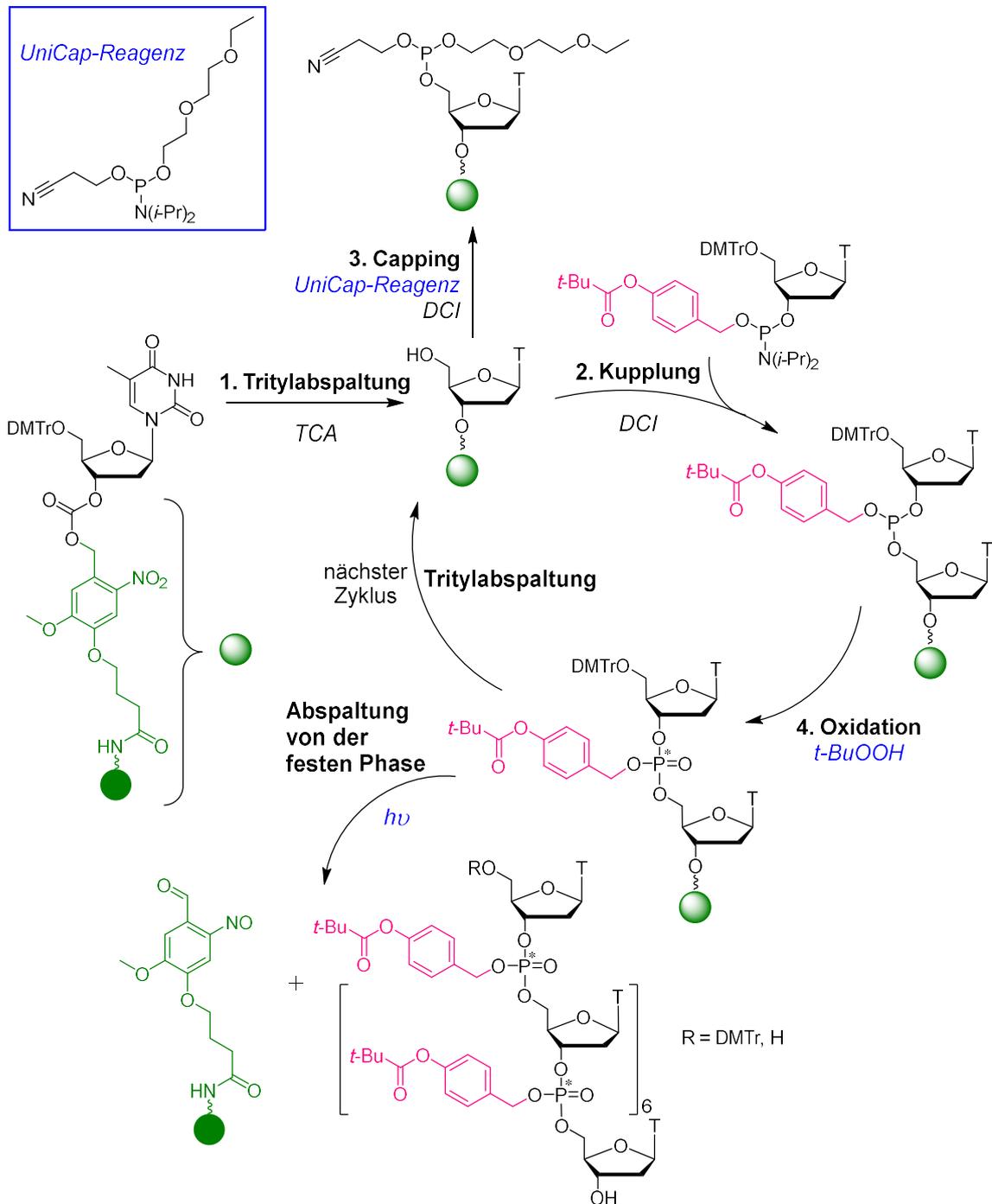
Für die Synthese von AB-modifizierten ON-Prodrugs musste die automatisierte DNA-Synthese unter außerordentlich milden Bedingungen erfolgen. Hierzu wurde zum einen ein mild spaltbarer photolabiler Linker für die automatisierte Festphasensynthese, angelehnt an eine Vorschrift von GREENBERG<sup>[137]</sup> und Mitarbeitern, synthetisiert. Dadurch ist eine Oligonucleotid-Synthese ohne stark basische Bedingungen für die Abspaltung von der festen Phase möglich. Stark basische Bedingungen wären inkompatibel mit der Arylester-Einheit in der AB-Struktur. Die Synthese des Festphasen-gebundenen Thymidin-Bausteins **23**, der als Startmaterial für die automatisierte ON-Synthese diente, ist in *Abb. 5.3* dargestellt.



**Abb. 5.3:** Synthese des photospaltbaren Linkers **33** und Aufbau des Startmaterials **23**.

Ausgehend von Vanillin **34** wurde in fünf Stufen ein *o*-Nitrobenzylalkohol-Derivat **33** dargestellt. Der Aufbau der Carbonat-Einheit in Verbindung **31** bereitete Probleme, weswegen anstelle von (Tri-)Phosgen 1,1'-Carbonyldimidazol verwendet und Carbamat **58** synthetisiert wurde. Die Reaktion von Linker-Einheit **33** mit Carbamat **58** lieferte schließlich Carbonat **31**. In weiteren drei Stufen wurde die Thymidin-Linker-Einheit **31** in den Festphasen-gebundenen Thymidin-Baustein **23** überführt. In darauffolgenden Untersuchungen wurde die Photolabilität bestätigt und es wurden Festphasen-

Beladungen von bis zu  $58 \mu\text{mol/g}_{\text{CPG}}$  (maximale Beladungskapazität laut Hersteller:  $60 \mu\text{mol/g}_{\text{CPG}}$ ) erreicht.



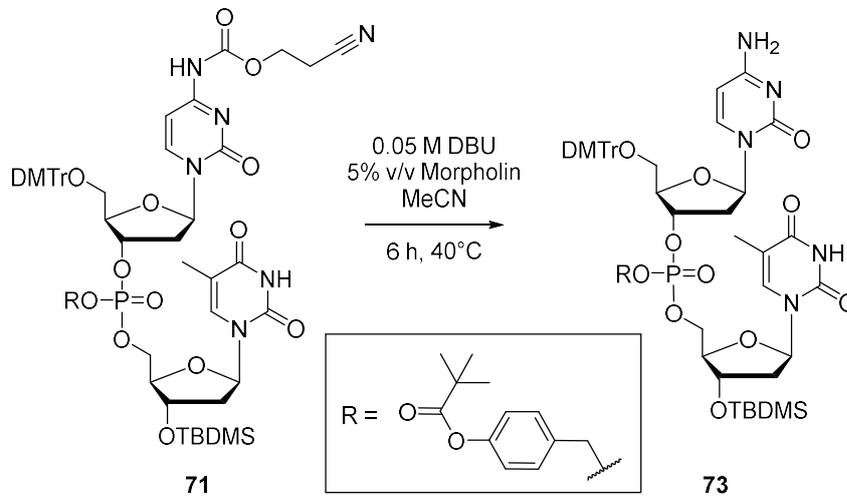
**Abb. 5.4:** Automatisierte Festphasensynthese eines ON-Octamers unter milden Bedingungen.

Des Weiteren wurde für die Synthese unter außerordentlich milden Bedingungen (Abb. 5.4) *tert*-Butylhydroperoxid-Lösung anstelle einer wasserhaltigen Iodlösung zur Oxidation verwendet, um eine Hydrolyse der

AB-Maskierungseinheit zu verhindern. Außerdem wurde das Standard-Capping-Reagenz, das Essigsäureanhydrid zur Acetylierung enthält, durch ein sterisch wenig gehindertes Phosphoramidit ersetzt. Somit wurde als Capping ein weiterer Kupplungsschritt mit dem kommerziell verfügbaren reaktiven UniCap-Amidit durchgeführt. Die darauffolgende Abspaltung vom Träger fand photochemisch statt ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ , UV-LED smart der Firma Opsytec Dr. Gröbel). In ersten Versuchen wurde das erhaltene Rohprodukt mittels HRMS untersucht. Es konnte sowohl die Masse des gewünschten AB-modifizierten Thymidylat-Octamers als auch die der gecappten Abbruchfragmente nachgewiesen werden. In weiteren Untersuchungen, die sich der chromatographischen Reinigung des Produktes widmeten, konnten nur nicht-gecappte Abbruchfragmente identifiziert werden und eine Trennung mit einer RP-C<sub>18</sub>-Säule war nicht möglich. Trotzdem lässt sich mit den erhaltenen Ergebnissen zeigen, dass die Darstellung AB-modifizierter Thymidylat-Octamere unter den außerordentlich milden Bedingungen möglich ist.

Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Synthese einer gemischten Sequenz unter außerordentlich milden Bedingungen möglich ist. Hierzu wurde eine Schutzgruppe für die exocyclischen Aminogruppen der anderen drei Nucleobasen (Adenin, Cytosin und Guanin) benötigt, die sich unter milden Bedingungen abspalten lässt. Am vielversprechendsten erschien die von SUTHERLAND<sup>[139]</sup> und Mitarbeitern verwendete Cyanoethyloxycarbonyl-(Ceoc)-Schutzgruppe, die sich durch die starke nicht-nucleophile Base DBU abspalten lässt. Hierbei war zu beachten, dass das Morpholin im Reaktionsgemisch, das zum Abfangen des freigesetzten Acrylnitrils diente, ein Problem darstellen könnte. Untersuchungen eines synthetisierten Thymidin-Cytidin-Modell-Dimers **71** zeigten eine Kompatibilität der SUTHERLAND-Bedingungen und der Maskierungsgruppe (*Abb. 5.5*), jedoch wurde der photochemisch spaltbare Carbonat-Linker unter diesen Bedingungen ebenfalls gespalten. Deswegen wäre es nach bisherigem Stand nicht möglich, ein Oligomer, das noch auf der festen Phase gebunden ist, mit dem DBU-Morpholin-Gemisch für die Entschützung zu versetzen und anschließend durch Filtration und Waschen zu reinigen. In weiteren Versuchen wurde untersucht, ob nach der photochemischen Abspaltung das gelöste Oligomer mit harzgebundenen

Reagenzien umgesetzt werden und ebenfalls durch Filtration eine Trennung stattfinden könnte. Hierbei sollte das Oligomer in Lösung zurückbleiben.

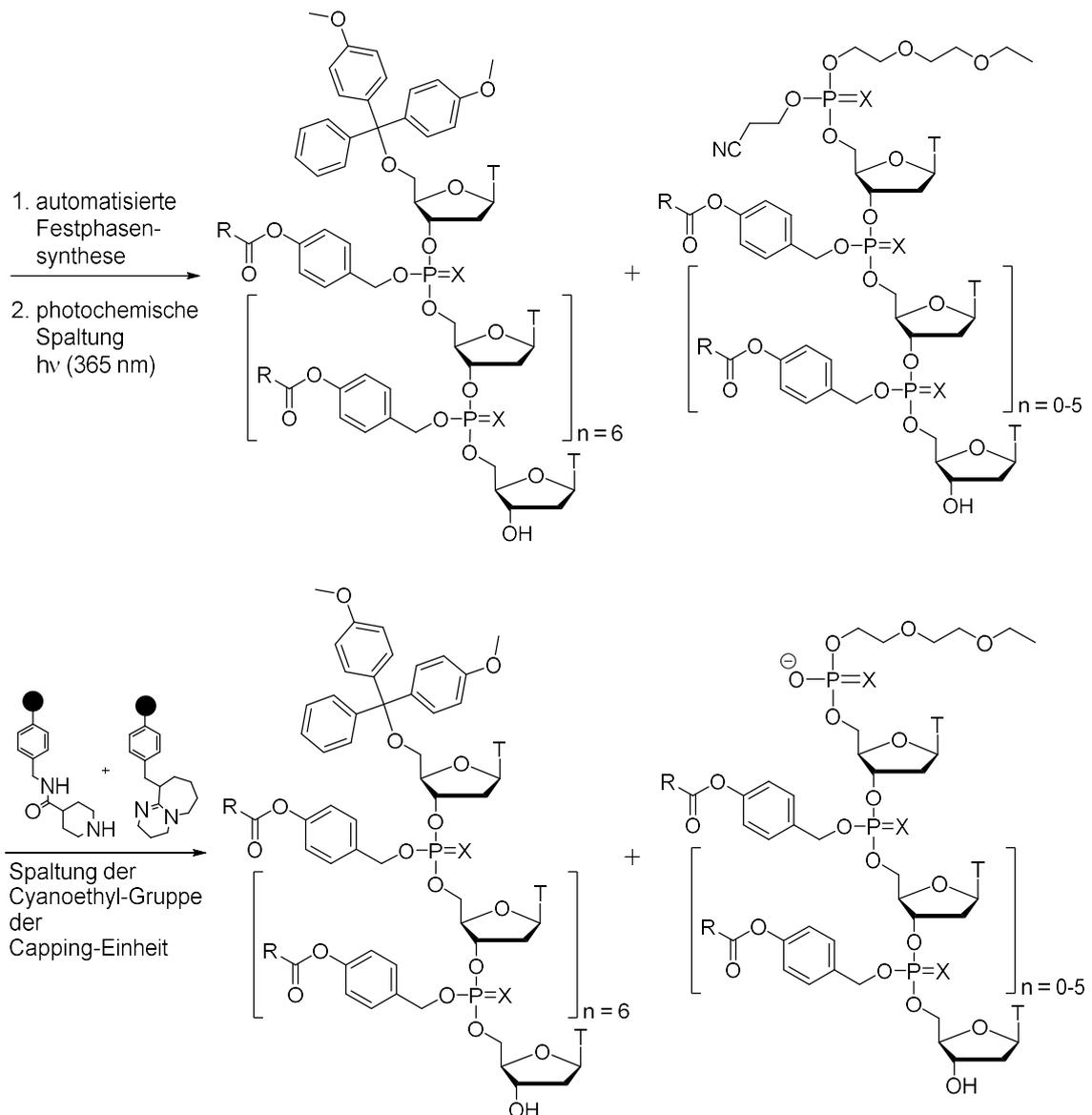


**Abb. 5.5:** Synthese von Verbindung **73** ausgehend von Verbindung **71** unter modifizierten SUTHERLAND-Bedingungen.

Findet keine Trennung der Oligonucleotide und der basischen Reagenzien vor der HPLC-Reinigung statt, kann eine Aufkonzentration der Reagenzien die Maskierungsgruppen spalten. Weitere Untersuchungen ergaben, dass ein am Rückgrat Cyanoethyl-maskiertes Thymidylat-Octamer nach der Umsetzung mit Festphasen-gebundenem DBU und Piperidin-Derivat nicht erneut isolierbar war, ebenso wie das erwartete anionische, demaskierte Octamer als Produkt der Entschützung. Hier sind weitere Untersuchungen erforderlich, um eine mögliche Umsetzung nachzuweisen und um zu entscheiden, ob eine Aufarbeitung der Oligomere über diese Strategie möglich ist.

## 6 Ausblick

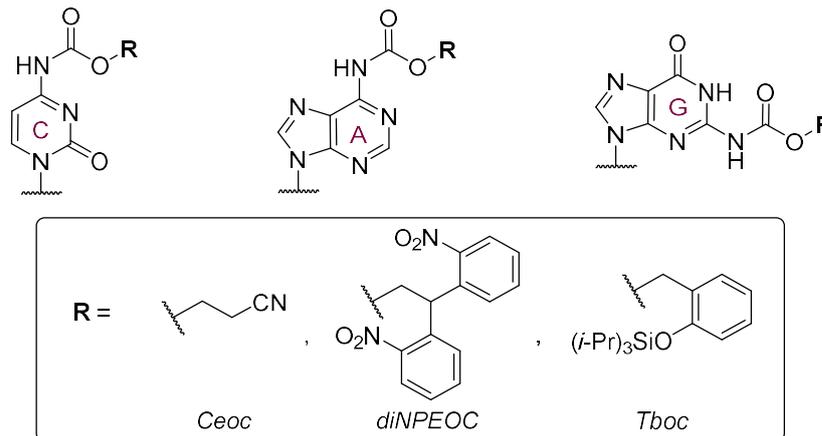
Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit soll die Synthese AB-modifizierter ON zunächst für T-Octamere optimiert werden. Hierzu gehören unter anderem die Wartezeiten (Delay) bei der automatisierten Synthese, die zugunsten hoher Ausbeuten angepasst werden muss. Außerdem ist ein wichtiger Schritt die chromatographische Reinigung. Da die maskierten ON keine negativen Ladungen tragen, muss diese mittels präparativer RP-HPLC erfolgen. Eine modifizierte Vorschrift für die Synthese des T-Octamers ist in *Abb. 6.1* gezeigt. Ein Vorteil dieser Vorschrift für die chromatographische Reinigung könnte sein, nach automatisierter Festphasensynthese und photochemischer Spaltung von der festen Phase, auf der einen Seite ein lipophiles Oligomer mit DMTr-Schutzgruppe und auf der anderen Seite die Abbruchfragmente mit einer negativen Ladung am 5'-Ende zu erhalten (*Abb. 6.1*). Dadurch sollte die Reinigung der Produkte erheblich erleichtert werden, da die anionischen Abbruchfragmente früher und im zeitlichen Abstand zu den elektroneutralen Produkten eluiert werden sollten. Des Weiteren soll auf eine RP-Phenyl-Hexyl-Säule gewechselt werden, da eine geringere Wechselwirkung der Prodrugs mit der stationären Phase erwartet wird und diese damit eine niedrigere Retentionszeit aufweisen sollten, als es bei den Versuchen in dieser Arbeit der Fall war. Ebenso wäre es möglich, anstelle des UniCap-Reagenzes ein ähnliches Phosphoramidit zu verwenden, das jedoch anstelle der Cyanoethyl-Gruppe eine photolabile Gruppe trägt. Auf diesem Weg wäre es möglich, anionische Abbruchfragmente direkt bei der Bestrahlung zu erhalten. Die optimierte Synthese- und Reinigungsstrategie soll dann auch auf gemischte Basensequenzen (mit Ceoc-geschützten Basen) übertragen werden (s.u.). Grundsätzlich ist bei der Etablierung der Synthesestrategie zu beachten, dass ON-Zielstrukturen, wie z.B. ein T-16mer, mit lipophilen Maskierungsgruppen entweder als Phosphate oder als entsprechende Phosphorthioate dargestellt werden können. Dies muss noch entschieden werden, da bisher noch nicht hinreichend geklärt ist, ob die Esterase-vermittelte Hydrolyse und anschließende Freisetzung des nativen ON mit seinem Phosphat-Rückgrat aus einem Prodrug schneller abläuft als der Nuclease-vermittelte Abbau des freigesetzten ON.



**Abb. 6.1:** Strategie für die zukünftige Synthese eines AB-modifizierten T-Octamers mit geladenen Abbruchfragmenten als Nebenprodukten (R = Alkyl; X = O, S; T = Thymin).

Ist dies nicht der Fall, gibt es zwei Möglichkeiten, das Antisense-Oligonucleotid vor Nuclease-Abbau zu schützen. Zum einen ist es möglich auf die bereits erwähnten Nuclease-resistenten Phosphorthioate oder zum anderen auf die Synthese von Gapmeren auszuweichen (*Abb. 6.2*). Für den ersten Fall muss in der automatisierten Synthese im Oxidationsschritt lediglich das Schwefelungsreagenz DDTT in Lösung anstelle von *tert*-Butylhydroperoxid-Lösung zum Einsatz kommen. Im zweiten Fall könnten LNAs (*Abb. 6.2*, T<sup>LN</sup>) verwendet werden, die ebenfalls Nuclease-stabil sind und die native ON-Sequenz einrahmen und damit schützen könnten.





**Abb. 6.3:** Mild spaltbare Schutzgruppen für die Nucleobasen Cytosin (C), Adenin (A) und Guanin (G).

Ebenfalls wird interessant sein, durch automatisierte Synthese erhaltene 16mer-ON-Prodrugs mit gemischten Basensequenzen (z.B. 5'-(TGCAACGT)<sub>2</sub>-3') als Phosphat, Phosphorthioat und als Gapmer einer vollständigen Charakterisierung bezüglich der *in-vitro*-Pharmakokinetik und potenzieller RNase-H-Aktivierung zu untersuchen. Die Bestimmung des T<sub>m</sub>-Wertes ist ebenfalls interessant, um zu untersuchen, ob bereits das Prodrug Affinität zu einem komplementären RNA-Strang und damit einhergehend Antisense-Aktivität aufweist. Längerfristig sollen dann AB-modifizierte ON-Prodrugs mit biologisch relevanten Sequenzen synthetisiert und untersucht werden.

## 7 Experimentaltteil

### 7.1 Allgemeines

#### 7.1.1 Allgemeine Arbeitsweisen

Alle Reaktionen wurden, wenn nicht anders angegeben, unter Inertgasatmosphäre mithilfe der Schlenktechnik durchgeführt. Als Inertgas wurde an Phosphor(V)-oxid und Orangegel getrocknetes Stickstoff- oder Argongas verwendet. Außerdem wurden alle Glasgeräte vor der Benutzung unter Vakuum ausgeheizt. Für Reaktionen bei tiefen Temperaturen ( $T \leq 0 \text{ °C}$ ) wurden geeignete Kältemischungen (Eis in Wasser ( $0 \text{ °C}$ ), Eis und Natriumchlorid in Wasser ( $-10 \text{ °C}$ )) eingesetzt.

#### 7.1.2 Edukte und Reagenzien

Alle Edukte und Reagenzien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen *ABCR*, *Acros Organics*, *Alfa Aesar*, *Fluka*, *GL Biochem*, *Glen Research*, *Honeywell*, *Iris Biotech*, *Merck*, *Roth*, *Sigma-Aldrich* und *VWR* oder vom Zentralen Chemikalienlager der Universität des Saarlandes in Synthesequalität bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Nucleoside wurden von der Firma *Chempur* erworben.

#### 7.1.3 Lösungsmittel

Die Lösungsmittel *Dichlormethan* ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), *Ethylacetat* (*EtOAc*) und *Petrolether 40/60 (PE)* wurden in technischer Qualität bezogen und vor ihrer Verwendung destilliert. Andere Lösungsmittel wurden mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“ bezogen und in der kommerziell erhältlichen Form ohne weitere Reinigung eingesetzt.

#### 7.1.4 Absolute Lösungsmittel

Für Reaktionen unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss wurden absolute Lösungsmittel verwendet. Die Lösungsmittel *Tetrahydrofuran*, *Diethylether*, *Acetonitril* und *Dichlormethan* wurden mittels einer MB SPS 800 der Firma *MBraun* getrocknet und bei Bedarf über Molekularsieb ( $3 \text{ Å}$ ) aufbewahrt. *n-Hexan* wurde mit dem Reinheitsgrad „97+%, for HPLC“ erworben, entgast und über Molekularsieb ( $4 \text{ Å}$ ) aufbewahrt.

*Pyridin* wurde längere Zeit über Calciumhydrid getrocknet, unter Inertgas destilliert und über Molekularsieb (4 Å) aufbewahrt.

*Toluol* wurde absolutiert von der Firma *Acros Organics* mit einer Reinheit von 99.85% „Extra Dry over Molecular Sieve, AcroSeal®“ erworben.

*Triethylamin* wurde mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“ erworben, entgast und über Molekularsieb (4 Å) aufbewahrt.

### 7.1.5 Chromatographie

**Säulenchromatographie:** Das Kieselgel (Si 60, Korngröße: 40-63 µm) für säulenchromatographische Trennungen wurde von der Firma *VWR* bezogen.

**Dünnschichtchromatographie (DC):** Als DC-Platten wurde kieselgelbeschichtete (60) Aluminiumfolie mit Fluoreszenzindikator (UV-Licht bei 254 nm) von *VWR* bei Kammersättigung verwendet. Die Detektion UV-aktiver Verbindungen erfolgte über Bestrahlung der Platten mit UV-Licht bei 254 nm. Zum Anfärben nicht UV-aktiver Verbindungen wurden folgende Färbereagenzien verwendet:

**Vanillin-Schwefelsäure-Lösung:** Vanillin (4 g), konz. Schwefelsäure (25 mL) und Eisessig (80 mL) in Methanol (680 mL).

**Ninhydrin-Lösung:** Ninhydrin (300 µL) und Essigsäure (3 mL) in Butanol (100 mL).

**Kaliumpermanganat-Lösung:** Kaliumpermanganat (1 g), Kaliumcarbonat (6 g) und NaOH (5%ig, 1.5 mL) in Wasser (100 mL).

**Analytische Flüssigkeitschromatographie (LC):** Analytische LC-Messungen zur Reaktionskontrolle und zur Charakterisierung von Substanzen wurden an einem *Thermo Scientific Spectra System* durchgeführt. Dieses System bestand aus der Säule *Accucore™ RP-C18* (2 µm, 100 x 3 mm), einem SN 4000 Controller, einem SCN 1000 Mischer, einem P4000 Pumpsystem, einem AS3000 Autosampler und einem UV2000 Detektor. An dieses System angeschlossen war ein Surveyor MSQ Plus ESI-Massenspektrometer der Firma *Finnigan*. Als mobile Phase wurden Gemische aus Milli-Q-Wasser und Acetonitril oder aus Milli-Q-Wasser und Methanol mit dem Reinheitsgrad „HPLC

grade“ verwendet. In einigen Fällen wurde Trifluoressigsäure (TFA) als Additiv für bessere Ionisierbarkeit zugegeben.

### **Semipräparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC):**

Reinigungen durch semipräparative HPLC erfolgten an einer Agilent 1200 Series der Firma *Agilent Technologies*. Als Säule wurde eine LichroCart® Purospher® RP-18e (5 µm, 10 x 250 mm) von der Firma *VWR* verwendet. Als mobile Phase wurde ausschließlich ein Gemisch aus Milli-Q-Wasser und Acetonitril mit dem Reinheitsgrad „HPLC grade“ eingesetzt. In einigen Fällen wurde als Additiv TFA zugegeben. Die Retentionszeiten ( $t_R$ ) wurden ohne Bereinigung der Totzeit bestimmt.

### **Analytische und semipräparative HPLC-Methoden:**

HPLC-Anlage: Agilent 1200 Series der Firma *Agilent Technologies*, Detektor: MWD (254.16/280.16), Flussrate: 3 mL/min, Säule: LiChroCART® Purospher® RP-18e (5 µm, 10 x 250 mm) von der Firma *VWR*.

a) Eluenten: A – Wasser, B – Acetonitril

#### Methode 1

(Dateiname: AH\_GRAD\_ACN20\_20MIN\_Flow0.8\_T8mer\_DMTR-off)

t [min]	0	3	12	18	19	20
B [%]	20	50	99	99	20	20

#### Methode 2

(Dateiname: AH\_GRAD\_ACN20\_25MIN\_Flow0.8\_T8mer\_DMTR-on)

t [min]	0	3	12	23	24	25
B [%]	20	50	99	99	20	20

#### Methode 3

(Dateiname: VB\_GRAD\_30ACN\_30MIN)

t [min]	0	20	22	25	30
B [%]	30	100	100	5	5

## Methode 4

(Dateiname: VB\_GRAD\_40ACN\_30MIN)

t [min]	0	20	22	25	30
B [%]	40	100	100	5	5

## Methode 5

(Dateiname: VB\_ISO\_30\_ACN\_45MIN)

t [min]	0	4	33	37	41	45
B [%]	10	30	30	0	0	10

## Methode 6

(Dateiname: VB\_ISO\_35ACN\_45MIN)

t [min]	0	4	33	37	41	45
B [%]	10	35	35	0	0	10

## Methode 7

(Dateiname: VB\_ISO\_40ACN\_45MIN)

t [min]	0	4	33	37	41	45
B [%]	10	40	40	0	0	10

## Methode 8

(Dateiname: VB\_ISO\_ACN40\_45MIN)

t [min]	0	35	37	40	41	45
B [%]	40	40	0	0	40	40

b) Eluenten: A – Wasser (0.1% TFA), B – Acetonitril (0.1% TFA)

## Methode 9

(Dateiname: GRAD\_ACN5\_ISO\_ACN100\_45MIN)

t [min]	0	33	37	40	45
B [%]	5	100	100	5	5

c) Eluenten: A – Wasser, B – Methanol

Methode 10

(Dateiname: VB\_MEOH40GRAD\_26)

t [min]	0	26	27	28.5	30
B [%]	40	100	100	5	5

HPLC-MS-Anlage: *Thermo Scientific UltiMate 3000*, Detektor: DAD-3000(RS) und MWD-3000(RS), Flussrate: 0.5 mL/min, Säule: *Accucore™ RP-Phenyl-X* (2 µm, 100 x 3 mm); *Thermo Scientific Q Exactive*, Detektor: Orbitrap™.

Eluenten: A – Wasser (0.1% HCOOH), B – MeCN (0.1% HCOOH)

Methode 11

(Dateiname: Stabtest\_Master)

t [min]	0	5.5	7	7.2	8
B [%]	5	100	100	5	5

### 7.1.6 Instrumentelle Analytik

**Kernresonanzspektroskopie (NMR):** NMR-Spektren wurden an folgenden Geräten der Firma *Bruker* aufgenommen: *Avance-500 Ultra Shield™* mit einem B-ACS 60 Autosampler, *Avance-DRX-500* sowie an einem *Avance-III-500* mit TCI Cryo-Probenkopf ( $^1\text{H-NMR}$ : 500 MHz,  $^{13}\text{C-NMR}$ : 126 MHz,  $^{31}\text{P-NMR}$ : 162 MHz). Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben. Die Restprotonensignale der verwendeten deuterierten Lösungsmittel dienten als interner Standard:

$\text{C}_6\text{D}_6$ :	7.16 ppm
$\text{CDCl}_3$ :	7.26 ppm
Deuteriumoxid:	4.80 ppm
$\text{DMSO-d}_6$ :	2.50 ppm
Methanol- $\text{d}_4$ :	4.87 ppm
Pyridin- $\text{d}_5$ :	8.74 ppm

Für eine einwandfreie Zuordnung der Signale wurden zusätzlich neben den eindimensionalen Spektren auch  $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ - und  $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren ( $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -COSY,  $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -HSQC und  $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ -HMBC) gemessen. Die Multiplizitäten der Signale in den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurden wie folgt bezeichnet: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), quin (Quintett), m (Multipllett) sowie deren Kombinationen (z.B. ddd (Dublett vom Dublett vom Dublett)). Da die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren  $^1\text{H}$ -Breitband-entkoppelt aufgenommen wurden, liegen nur Singuletts als Signalform vor, die deswegen nicht mehr explizit erwähnt werden. Ausnahme ist hier die  $^{13}\text{C}$ - $^{31}\text{P}$ -Kopplung, die vereinzelt bei Verbindungen zu Multiplizitäten im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum führt. Die skalaren Kopplungskonstanten  $J$  sind in Hertz (Hz) angegeben. Die koppelnden Kerne wurden im Falle von  $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ -Korrelationen nicht bezeichnet. Zur Bezeichnung diastereotoper Protonen oder Kohlenstoffatome wurden der tiefgestellte Index „a“ für das hochfeldverschobene und „b“ für das tieffeldverschobene Signal verwendet. Alle NMR-Spektren wurden bei Raumtemperatur gemessen.

**Massenspektrometrie (MS):** ESI-Massenspektren wurden an einem *Thermo Scientific* Spectra System bestehend aus einem SN 4000 Controller, einem SCM 1000 Mischer, einem P4000 Pumpsystem, einem AS3000 Autosampler, einem UV2000 Detektor sowie einem Surveyor MSQ Plus ESI-Massenspektrometer der Firma *Finnigan* aufgenommen. Die Spektren der hochauflösenden ESI-Massenspektrometrie (ESI-HRMS) wurden am Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS) an einem Time-of-flight-(TOF)-Massenspektrometer maXis 4G der Firma *Bruker* aufgenommen. Weitere hochaufgelöste Massen (ESI-HRMS) wurden in der Fachrichtung Pharmazie der Universität des Saarlandes an einem *Thermo Scientific* UltiMate 3000 mit einem DAD-3000(RS) und MWD-3000(RS) Detektor, einer Accucore™ RP-Phenyl-X (2  $\mu\text{m}$ , 100 x 3 mm) Säule und einem *Thermo Scientific* Q Exactive ESI-Massenspektrometer mit einem Orbitrap™-Detektor aufgenommen. An diesem Gerät wurden ebenfalls die Stabilitätsmessungen durchgeführt und die synthetisierten Oligonucleotide vermessen.

**Infrarotspektroskopie (IR):** Die IR-Spektren wurden an einem Fouriertransformations-Infrarot-(FTIR)-Spektrometer ALPHA der Firma *Bruker* mit einer integrierten PlatinumATR<sup>®</sup>-Einheit der Firma *Bruker* gemessen. Angegeben sind die Wellenzahlen  $\tilde{\nu}$  in  $\text{cm}^{-1}$  zu den ca. 10 Banden mit den stärksten Absorptionsintensitäten.

**UV/Vis-Spektroskopie:** Die UV/Vis-Spektren wurden mithilfe eines Cary Series 100 UV-Vis Spektrophotometers der Firma *Agilent Technologies* aufgenommen. Als Lösungsmittel wurden Milli-Q-Wasser, DMSO oder Methanol (Reinheitsgrad: „zur Analyse“) verwendet. Die Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 800 nm bis 200 nm gemessen.

**Polarimetrie:** Drehwertmessungen von stereoisomerenreinen optisch aktiven Verbindungen wurden an dem Polarimeter P3000 der Firma *Krüß* durchgeführt. Als Lösungsmittel wurden Milli-Q-Wasser oder Methanol (Reinheitsgrad: „zur Analyse“) verwendet, wobei jeweils ungefähr 10 mg der zu analysierenden Substanz in 1.5 mL Lösungsmittel gelöst wurden. Die Konzentration  $c$  ist in g/dL angegeben. Alle Drehwerte wurden bei 20 °C mit einer LED (589 nm) gemessen und sind als spezifische Drehwerte  $\alpha$   $[(^\circ \cdot \text{mL})/(\text{g} \cdot \text{dm})]$  angegeben.

**Schmelzpunktbestimmung:** Die Schmelzpunkte wurden unter Verwendung der Schmelzpunktbestimmungsapparatur Stuart<sup>®</sup> melting point apparatus SMP3 der Firma *Bibby Stuart Scientific* gemessen.





**Tab. 12:** Parameter für die Kupplung des UniCap-Phosphoramidits am DNA-Synthesizer H-8.

Schritte	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Zeit (0.1 s)</b>	2					10	2	3		20
<b>Quelle</b>	TET					GAS	ACN	ACN		GAS
<b>Mix</b>										
<b>Ziel</b>	COL					COL	M_W	COL		COL
<b>Säule für Säule</b>	ON	ON				ON		ON	ON	
<b>Wartezeit (1 s)</b>			3		60					
<b>Einschub</b>				2						

**Tab 13:** Parameter für den Einschub 2 der Kupplung des UniCap-Phosphoramidits.

Schritte	1	2	3	4	5	6	7
<b>Zeit (0.1 s)</b>	4	3		3		10	20
<b>Quelle</b>	TET	S_1		S_1		ACN	GAS
<b>Mix</b>		TET		TET			
<b>Ziel</b>	COL	COL		COL		M_W	M_W
<b>Säule für Säule</b>	ON	ON					
<b>Wartezeit (1 s)</b>			30		30		
<b>Einschub</b>							

Die Sequenz konnte entweder DMTr-On oder DMTr-Off gefahren werden, was bedeutet, dass das letzte gekuppelte Nucleosid entweder eine 5'-O-DMTr-Gruppe trägt (On) oder nicht (Off). Meist wurde ein Oligonucleotid mit DMTr-Gruppe synthetisiert. Zum einen sollte diese später bei der HPLC-Reinigung eine bessere Trennung zwischen Abbruchfragmenten und der gewünschten Sequenz mit lipophiler Schutzgruppe erzielen. Zum anderen sollte eine DMTr-Entschützung (Detritylierung) nach der HPLC-Reinigung für eine Bestimmung der Gesamtausbeute durchgeführt werden.

### 7.2.3 Abspaltung vom Träger

Die Abspaltung vom Träger erfolgte durch Bestrahlung mit einer Hochleistungs-UV-LED smart der Firma *Opsytec Dr. Gröbel* bei einer Wellenlänge von 365 nm im Arbeitskreis Kazmaier. Die Bestrahlungsstärke (maximal  $>25000\text{mW/cm}^2$ ) wurde auf 70% geregelt. Das jeweilige Oligonucleotid wurde in einem Eppendorfgefäß in DMSO gelöst ( $\sim 1\text{ mM}$ ). Das offene Eppendorfgefäß wurde mit Aluminiumfolie umwickelt und für 1.5 h bis 2 h unter Rühren von oben bestrahlt. Anschließend wurde die feste Phase durch Zentrifugation von der Lösung des Oligomers in DMSO getrennt.

### 7.2.4 HPLC-Reinigung

Das in DMSO gelöste Oligonucleotid wurde mit dem gleichen Volumen einer Milli-Q-Wasser/MeCN-Mischung (80:20) versetzt. Die Reinging erfolgte mittels semipräparativer HPLC mit einer *LiChroCART*<sup>®</sup> RP-18e (5  $\mu\text{m}$ ) Purposer<sup>®</sup> STAR-Säule der Firma *VWR*. Für die verwendeten Methoden 1 und 2 dienten als Laufmittel Milli-Q-Wasser und MeCN (Reinheitsgrad „HPLC grade“). Nach der Reinigung wurde das Lösungsmittel der produkthaltigen Fraktion mittels Gefriertrocknung entfernt.

### 7.2.5 Ausbeutenbestimmung

Das gereinigte Oligonucleotid wurde mit einer TCA-Lösung (3 g in 100 mL) versetzt. Mit einem UV-Vis-Spektrometer wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 503 nm gemessen. Die Absorption sollte hierbei zwischen 0.2 und 1.0 liegen. Mithilfe der zuvor gemessenen Kalibriergeraden (7.2.5.1) konnte aus der Absorption die Stoffmengenkonzentration bestimmt werden.

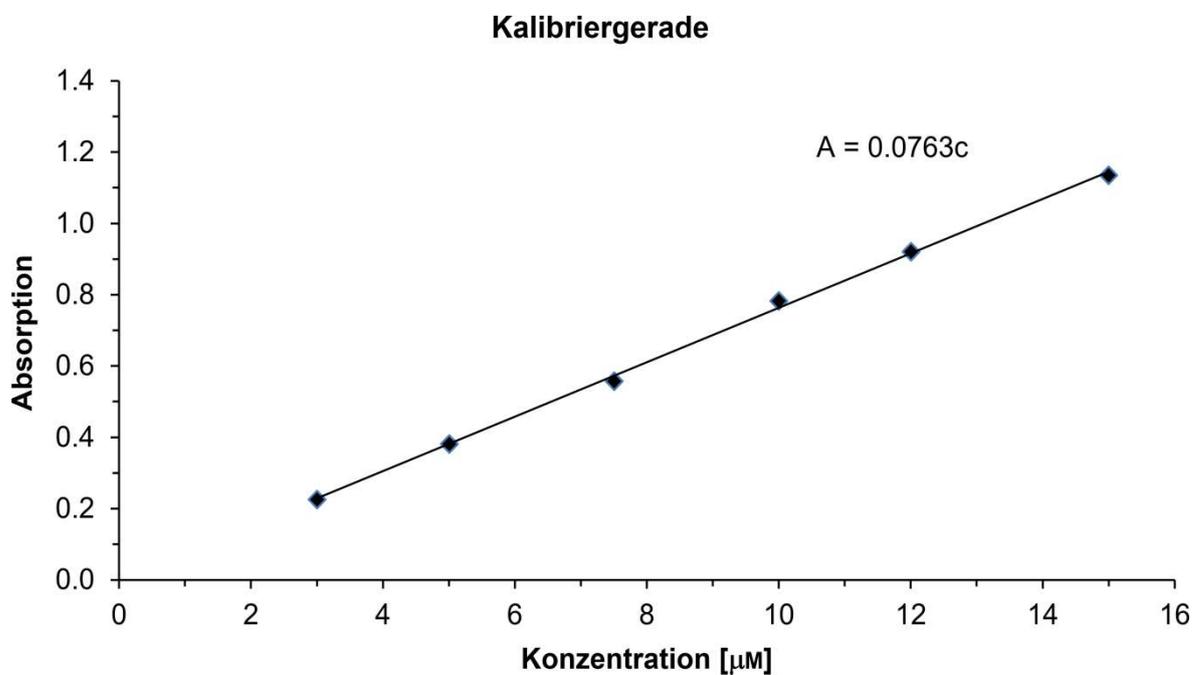
#### 7.2.5.1 Kalibriergerade

Für die Messung der Kalibriergeraden wurden verschiedene Konzentrationen von 5'-O-DMTr-Thymidin in einer TCA-Lösung (3 g in 100 mL) angesetzt und die Absorptionen des dabei entstandenen Dimethoxytrityl-Kations bei 503 nm (maximale Absorption) drei Mal gemessen. Hieraus wurde der Mittelwert gebildet. Die Messwerte sind in *Tab. 14* zusammengefasst.

**Tabelle 14:** Absorptionswerte des Dimethoxytrityl-Kations.

Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Absorption
15	1.1345
12	0.9212
10	0.7839
7.5	0.5583
5	0.3802
3	0.2245

Durch das Auftragen der Messpunkte ergab sich eine Kalibriergerade mit entsprechender Geradengleichung (*Abb. 7.1*).

**Abb. 7.1:** Kalibriergerade der Detritylierung.

Durch Umstellen der Geradengleichung (*Gleichung 1*) lässt sich die Konzentration der zu untersuchenden Substanz aus der gemessenen Absorption berechnen. Bei bekanntem Volumen lässt sich so auch die Stoffmenge bestimmen.

$$c [\mu\text{M}] = A / 0.0763$$

**Gleichung 1:** Konzentration in Abhängigkeit von der Absorption.

## 7.3 Gelelektrophorese

Für die Reinigung mittels Gelelektrophorese wurden ein 20%iges Polyacrylamidgel (PAGE) angesetzt. Hierzu wurde 37.8 g Harnstoff und 45 mL Acrylamid in 9 mL eines zehnfach konzentrierten TBE-Puffers (7.3.1) gelöst. Die Lösung wurde mit Milli-Q-Wasser auf 90 mL aufgefüllt und mit 70  $\mu$ L TMEDA (*N,N,N',N'*-Tetramethylethan-1,2-diamin) und 500  $\mu$ L APS (Radikalstarter Ammoniumperoxodisulfat, 10% in Milli-Q-Wasser) versetzt. Die Mischung wurde unmittelbar daraufhin langsam zwischen die Glasplatten (20 x 31 cm) des Gelelektrophoreseaufbaus (C. B. S. *SCIENTIFIC*, LSG-400-20) gegossen. Zur Polymerisation wurde der Aufbau für mindestens 1 h bei Raumtemperatur aufbewahrt. Daraufhin wurde das Rohprodukt (ca. 20 nmol pro Kammer) mit Loading Dye (6x, *Thermo Fisher Scientific*) vermischt und aufgetragen. Die Gerätekamern, die sich an den Enden des Gels befanden, wurden mit 0.5 x TBE-Puffer (zwanzigfache Verdünnung des zehnfach konzentrierten TBE-Puffers) gefüllt. Die Laufzeit betrug 2-3 h bei 35 W. Anschließend wurde das Gel von der Glasplatte genommen und auf eine Folie gelegt, die sich auf einer DC-Platte (Fluoreszenzindikator) befand. Die Detektion erfolgte mittels UV-Lampe (260 nm) durch Fluoreszenzlöschung.

### 7.3.1 10 x TBE-Puffer

Für den zehnfach konzentrierten TBE-Puffer wurde Tris(hydroxymethyl)aminomethan (108 g), Borsäure (55 g) und EDTA (0.5 M, 40 mL) gemischt und mit Milli-Q-Wasser auf 1 L aufgefüllt.

## 7.4 Pharmakokinetische in-vitro-Assays

### 7.4.1 Herstellung von Medien

#### 7.4.1.1 Humanes Plasma

Das humane Plasma mit Lithium-Heparin (vermischte Geschlechter, vereinigt, nicht gefiltert) wurde von der Firma *BIOTREND* bezogen und mit Milli-Q-Wasser 1:10 verdünnt.

#### 7.4.1.2 Humanes Zelllysät

Zur Gewinnung des humanen Lysats wurden U937-Zellen in RPMI-Medium der Firma *Thermo Fischer Scientific* in einer Petrischale ausgesät und für 11 d bei 37°C im Inkubator wachsen gelassen. Währenddessen wurde zweimal eine Teilung der Zellmenge auf zwei Petrischalen vorgenommen und dabei das Medium erneuert. Durch Zentrifugation (4000 g, 4 °C) wurde das Medium vom Zellpellet getrennt und der Überstand entfernt. Das so erhaltene Pellet wurde mit PBS-Puffer (pH 7.4) der Firma *Thermo Fischer Scientific* gewaschen und anschließend in PBS-Puffer (45 mL) aufgenommen. Es wurden 150,000,000 Zellen gezählt und durch Zentrifugation (4000 g, 4 °C) die Zellen vom Puffer getrennt. Das so erhaltene Zellpellet wurde bei 0 °C mit Lyse-Puffer (40 mL, 7.4.2.2) und einer Tablette des Protease-Inhibitor-Cocktails von der Firma *Roche* versetzt. Es fand eine Zellyse auf Eis per Ultraschall statt (fünf Zyklen und 20% Leistung mit 15 s Pulszeit und jeweils 45 s Pause). Durch erneute Zentrifugation (17000 g, 4 °C) wurde der Zellrückstand als Pellet vom Zelllysät getrennt. Der Überstand wurde in Eppendorf-Caps aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

#### 7.4.1.3 Bakteriellcs Zelllysät

Zur Gewinnung des bakteriellen Lysats wurden DH5 $\alpha$ -Zellen (*E. coli*) in RPMI-Medium der Firma *Thermo Fischer Scientific* in einer Petrischale ausgesät und solange wachsen gelassen, bis eine optische Dichte von 0.6 gemessen wurde (ca. 4 h). Durch Zentrifugation (3800 g, 4°C) wurden die Zellen vom Medium getrennt. Das so erhaltene Zellpellet wurde bei 0 °C mit Natriumphosphat-Puffer (10 mL, 7.4.2.4) und einer fünftel Tablette des Protease-Inhibitor-Cocktails von

der Firma *Roche* versetzt. Die Lyse erfolgte per Ultraschall (10 Zyklen, 80% Leistung mit 15 s Pulszeit und jeweils 45 s Pause). Durch erneute Zentrifugation (3260 g, 4°C) wurde der Zellrückstand als Pellet vom Zelllysat getrennt. Der Überstand wurde in Eppendorf-Caps aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

#### **7.4.1.4 Schweineleber-Esterase (PLE)**

Für den Esterase-Assay wurde PLE (1.12 mg, 18 U/mg) der Firma *Sigma Aldrich* in Esterase-Puffer (814 µL, 7.4.2.3) gelöst. Es lag somit eine Konzentration von 0.025 U/µL vor.

#### **7.4.1.5 Schlangengift-Phosphodiesterase (SVPDE)**

Für den SVPDE-Assay wurde SVPDE (0.4 U) der Firma *Sigma Aldrich* in Milli-Q-Wasser (800 µL) gelöst. Die so erhaltene Stamm-Lösung enthielt 0.0025 U in 5 µL und diese 5 µL wurden mit Glycin-Puffer (1345 µL, 7.4.2.6) auf 1350 µL verdünnt. In 27 µL dieser verdünnten Lösung lagen somit 0.00005 U vor.

### **7.4.2 Verwendete Puffer**

#### **7.4.2.1 Phosphatpuffer**

Für die Herstellung eines 50 mM Phosphatpuffers wurden Dinatriumhydrogenphosphat (547 mg, 3.85 mmol) und Kaliumdihydrogenphosphat (155 mg, 1.15 mmol) in Milli-Q-Wasser (50 mL) gelöst und mit Milli-Q-Wasser auf 100 mL aufgefüllt. Der pH-Wert wurde entweder mit Phosphorsäure oder mit einer 0.1 M wässrigen NaOH-Lösung auf 7.3 eingestellt.

#### **7.4.2.2 Lyse-Puffer**

Für 10 mL des Lyse-Puffers wurden ein 1 M Tris-HCl-Puffer (pH 7.5, 500 µL), NaCl (58.4 mg), 1 M DTT-Lösung (Dithiothreitol, 10 µL), Glycerol (500 µL) und 250 mM PMSF-Lösung (8 µL) in Milli-Q-Wasser (5 mL) gelöst und mit Milli-Q-Wasser auf 10 mL aufgefüllt.

### 7.4.2.3 Esterase-Puffer

Für die Herstellung eines 0.032 M Esterase-Puffers wurden Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) (387 mg, 3.20 mmol) und  $\text{MgCl}_2$  (143 mg, 1.50 mmol) in Milli-Q-Wasser (100 mL) gelöst und der pH-Wert mit einer 0.1 M wässrigen NaOH-Lösung oder einer 1.0 M HCl auf 7.3 eingestellt.

### 7.4.2.4 Natriumphosphat-Puffer

Für die Herstellung eines 0.05 M Natriumphosphat-Puffers wurden Dinatriumhydrogenphosphat (1.78 g, 12.5 mmol), Natriumdihydrogenphosphat (1.50 g, 12.5 mmol) und  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  (102 mg, 0.502 mmol) in Milli-Q-Wasser (300 mL) gelöst und mit Milli-Q-Wasser auf 500 mL aufgefüllt.

### 7.4.2.5 Tris-HCl-Puffer

Für einen 1 M Tris-HCl-Puffer wurde Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) (12.1 g, 100 mmol) in Milli-Q-Wasser (50 mL) gelöst und mit Milli-Q-Wasser auf 100 mL aufgefüllt. Der pH-Wert von 7.5 wurde durch Zugabe von 1M HCl eingestellt.

### 7.4.2.6 Glycin-Puffer

Für einen 200 mM Glycin-Puffer wurden Glycin (1.50 g, 20.0 mmol) und  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  (305 mg, 1.50 mmol) in Milli-Q-Wasser (100 mL) gelöst und der pH-Wert von 9.0 wurde durch Zugabe einer 1 M wässrigen NaOH-Lösung eingestellt.

### 7.4.2.7 Ammoniumbicarbonat-Puffer

Für einen 32 mM Ammoniumbicarbonat-Puffer wurden  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (1.26 g, 16.0 mmol) und  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  (1.00 g, 4.92 mmol) in Milli-Q-Wasser (200 mL) gelöst und mit Milli-Q-Wasser auf 500 mL aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mit Ameisensäure auf 7.3 eingestellt.

### 7.4.3 Durchführung

Zu jedem Assay wurde eine frisch hergestellte Kalibriergerade in Milli-Q-Wasser vermessen. Hierzu wurde zuerst die 20 mM Stammlösung (in DMSO) der jeweiligen Probe mit Milli-Q-Wasser zu einer 100  $\mu\text{M}$  Lösung verdünnt. In weiteren Verdünnungsschritten wurden nun Konzentrationen von 15  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 1.5  $\mu\text{M}$ , 0.75  $\mu\text{M}$  und 0.3  $\mu\text{M}$  erhalten, die die Kalibrierpunkte darstellten. Anschließend wurden 30  $\mu\text{L}$  jedes dieser Kalibrierpunkte mit 60  $\mu\text{L}$  der Stopplösung (1.5  $\mu\text{M}$  Diphenhydramin-Lösung als interner Standard in MeCN) versetzt. Folgende Endkonzentrationen wurden somit für die Kalibriergerade erhalten: 5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$ , 0.25  $\mu\text{M}$  und 0.1  $\mu\text{M}$ . Die finale Konzentration des internen Standards Diphenhydramin betrug 1  $\mu\text{M}$ .

Für die Assays wurden zu sechs verschiedenen Inkubationszeitpunkten (abhängig vom Medium) jeweils Duplikate gemessen. Für Messungen in Phosphat-Puffer und in der SVPDE-Lösung wurden folgende Zeitpunkte gewählt: 0 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h. Für Messungen in humanem und bakteriellem Lysat, humanem Plasma und in Gegenwart von Esterase wurden folgende Zeitpunkte gewählt: 0<sub>1</sub> min (Zugabe von Stopplösung vor zu testender Substanz), 0<sub>2</sub> min (Zugabe von Stopplösung nach zu testender Substanz, innerhalb von 5 s), 15 min, 30 min, 60 min und 150 min. Die Inkubationstemperatur betrug stets 37 °C.

Pro Assay wurden 12 Eppendorf-Caps benötigt und in den Caps wurden 27  $\mu\text{L}$  biologisches Medium vorgelegt. Die zu testende Substanz (3  $\mu\text{L}$  einer 100  $\mu\text{M}$  wässrigen Lösung) wurde zugegeben, ausgenommen für den Zeitpunkt 0<sub>1</sub> min. In der so erhaltenen Lösung lag eine Substanzkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  vor. Nach Erreichen der jeweiligen Zeitpunkte wurde immer zu zwei Caps die Stopplösung (60  $\mu\text{L}$  einer 1.5  $\mu\text{M}$  Diphenhydramin-Lösung als interner Standard in MeCN) gegeben. Die finale Substanz-Konzentration lag somit bei 3.3  $\mu\text{M}$  und die von Diphenhydramin bei 1.0  $\mu\text{M}$ . Nach Zugabe der Stopplösung wurden die Caps 1 min bei 17000 g zentrifugiert und der Überstand für die HPLC-HRMS-Analyse in Messvials überführt. Es wurden die HPLC-Methode 11 (7.1.5) verwendet. Zur Bestimmung der Halbwertszeiten wurden die ermittelten Konzentrationen gegen die Zeit aufgetragen. Es wurde ein Zerfall erster

Ordnung angenommen und entsprechend Exponentialfunktionen gefittet. Aus den daraus resultierenden Exponentialgleichungen konnte die Halbwertszeit berechnet werden.

## 7.5 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

### 7.5.1 Synthese von 4-Acyloxybenzylalkoholen (AAV 1)

Die nachfolgende Reaktionssequenz wurde nicht unter Inertgasbedingungen durchgeführt. Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von Benzaldehyd (1.0 Äq.) in THF (3.5 L/mol<sub>Benzaldehyd</sub>) wurden vorsichtig Triethylamin (1.5 Äq.) und Acetylchlorid (1.5 Äq.) getropft und es wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung (ca. 3.5 L/mol<sub>Benzaldehyd</sub>) und Ethylacetat (ca. 3.5 L/mol<sub>Benzaldehyd</sub>) versetzt und die Phasen wurden getrennt. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (2 x ca. 2.5 L/mol<sub>Benzaldehyd</sub>) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (ca. 2.5 L/mol<sub>Benzaldehyd</sub>) und ges. NaCl-Lösung (ca. 2.5 L/mol<sub>Benzaldehyd</sub>) gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Es wurde eine braune Flüssigkeit erhalten.

Zu einer Lösung dieser braunen Flüssigkeit in THF (3.5 L/mol<sub>Benzaldehyd</sub>) wurde bei 0°C NaBH<sub>4</sub> (2.0 Äq.) zugegeben und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Ethylacetat (ca. 3.5 L/mol<sub>Benzaldehyd</sub>) versetzt und ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung (ca. 2.5 L/mol<sub>Benzaldehyd</sub>) wurde langsam zugetropft. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit Ethylacetat (2 x ca. 2.5 L/mol<sub>Benzaldehyd</sub>) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (ca. 2.5 L/mol<sub>Benzaldehyd</sub>) und ges. NaCl-Lösung (ca. 2.5 L/mol<sub>Benzaldehyd</sub>) gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Die Zielverbindung wurde durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel erhalten, wobei je nach Produkt unterschiedliche Eluenten verwendet wurden.

### 7.5.2 Synthese von Phosphordiamiditen (AAV 2)

Zu einer Lösung von Bis(diisopropylamino)chlorphosphin (1.1 Äq.) in abs. Diethylether (3 L/mol<sub>Phosphin</sub>) wurden abs. Triethylamin (1.1 Äq.) und der jeweilige Alkohol (1.0 Äq., gelöst in 0.3 L/mol abs. Diethylether) getropft. Das Gemisch wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in abs. *n*-Hexan (ca. 3 L/mol<sub>Alkohol</sub>) suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde unter Schutzgas filtriert und das

Filtrat im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit der Phosphoramidite wurde auf weitere Reinigungen und nach NMR-spektroskopischer Identifizierung auf weitere Charakterisierungen verzichtet.

### 7.5.3 Synthese von Phosphoramiditen (AAV 3)

Zu einer Lösung vom Rohprodukt des jeweiligen Phosphordiamidits (1.15 Äq.) in abs. MeCN (7 L/mol<sub>Diamidit</sub>) wurden 4,5-Dicyanoimidazol (1.0 Äq.) und 5'-O-Dimethoxytritylthymidin **32** (1.0 Äq.) gegeben. Nachdem das Reaktionsgemisch 1 h bei Raumtemperatur gerührt worden war, wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Zielverbindung wurde durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel als Gemisch aus Produkt, hydrolysiertem Edukt und hydrolysiertem Produkt und einem weiteren Nebenprodukt erhalten (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 40:1 + 1% Pyridin). Deswegen und aufgrund des Diastereomergemisches (*R<sub>P</sub>/S<sub>P</sub>*) war eine vollständige NMR-spektroskopische Charakterisierung nicht möglich.

### 7.5.4 Synthese von maskierten Dinucleotiden (AAV 4)

Das jeweilige Rohprodukt des Phosphoramidits (1.15 Äq.) wurde in abs. Acetonitril (6 L/mol<sub>Amidit</sub>) gelöst. 4,5-Dicyanoimidazol (1.0 Äq.) und 3'-O-*tert*-Butyldimethylsilylthymidin **43** (1.0 Äq., in 0.5 L/mol abs. Acetonitril gelöst) wurden zugegeben. Das Gemisch wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf 0°C gekühlt. *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan, 2.0 Äq.) oder 3-((*N,N*-Dimethyl-aminomethyliden)amino)-3*H*-1,2,4-dithiazol-5-thion (2.0 Äq., in 2.5 L/mol abs. Pyridin) wurde zugetropft und das Reaktionsgemisch wurde für weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Die Zielverbindung wurde durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 30:1 + 0.5% NEt<sub>3</sub>/Pyridin) als ein Gemisch aus zwei Diastereomeren (*R<sub>P</sub>/S<sub>P</sub>*) erhalten, weswegen eine <sup>13</sup>C-NMR-spektroskopische Identifizierung nicht durchgeführt wurde.

### 7.5.5 Dimethoxytrityl-Entschützung (AAV 5)

Die Reaktion wurde nicht unter Inertgasbedingungen durchgeführt. Das jeweilige Phosphat (1.0 Äq.) wurde in Dichlormethan (11 L/mol<sub>Phosphat</sub>) gelöst und Trichloressigsäure (1.5 Äq.) wurde zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Zielverbindung wurde durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 20:1) als ein Gemisch aus zwei bzw. vier Diastereomeren erhalten.

### 7.5.6 Synthese von maskierten Trinucleotiden (AAV 6)

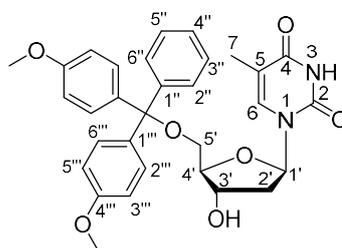
Das jeweilige Phosphoramidit (1.0 Äq.) und das jeweilige Phosphat (1.0 Äq.) wurden je mit abs. Pyridin (ca. 3 L/mol), abs. Toluol (ca. 3 L/mol) und abs. Acetonitril (ca. 3 L/mol) coevaporiert. Das Amidit wurde in abs. Acetonitril (14 L/mol<sub>Amidit</sub>) vorgelegt. Das Phosphat (in 5 L/mol abs. Acetonitril) und 4,5-Dicyanoimidazol (1.0 Äq.) wurden zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde bei 0°C *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan, 2.0 Äq.) zugetropft. Die Lösung wurde weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und die Zielverbindung wurden durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 20:1 + 0.5% NEt<sub>3</sub>) als ein Gemisch aus vier Diastereomeren erhalten, weswegen eine <sup>13</sup>C-NMR-spektroskopische Identifizierung nicht durchgeführt wurde.

### 7.5.7 *tert*-Butyldimethylsilyl-Entschützung (AAV 7)

Das jeweilige Nucleotid (1.0 Äq.) wurde in abs. Methanol (12 L/mol<sub>Nucleotid</sub>) gelöst. Acetylchlorid (0.75 M in abs. Methanol, 0.5 Äq.) wurde bei 0°C hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3-16 h (DC-Kontrolle) bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Zielverbindung wurde durch Reinigung mittels semipräparativer HPLC oder durch säulenchromatographische Reinigung erhalten und im Falle der Dimere wurden die Diastereomere mittels semipräparativer HPLC getrennt.

## 7.6 Synthesen

### 7.6.1 5'-O-Dimethoxytritylthymidin 32



**32**

Thymidin (3.40 g, 14.0 mmol) wurde 3 h im Vakuum getrocknet und in abs. Pyridin (20 mL) gelöst. Das Gemisch wurde mit *N,N*-Dimethylaminopyridin (150 mg, 1.23 mmol) und 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (5.10 g, 15.0 mmol) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in Ethylacetat (100 mL) aufgenommen. Die resultierende Lösung wurde mit ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (100 mL), Wasser (100 mL) und ges.  $\text{NaCl}$ -Lösung (100 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE:EtOAc 1:1 + 0.5% Pyridin → EtOAc + 0.5% Pyridin).

**Ausbeute (32):** 7.29 g (13.2 mmol, 94%) eines farblosen Feststoffes.

**DC:**  $R_f = 0.07$  (PE:EtOAc 1:1+ 0.5% Pyridin).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.89 (s, 1H, NH), 7.58 (s, 1H, 6-H), 7.43-7.36 (m, 2H, 2''-H, 6''-H), 7.33-7.25 (m, 7H, 3''-H, 4''-H, 5''-H, 2'''-H, 6'''-H), 6.87-6.80 (m, 4H, 3'''-H, 5'''-H), 6.44-6.39 (m, 1H, 1'-H), 4.60-4.54 (m, 1H, 3'-H), 4.09-4.04 (m, 1H, 4'-H), 3.78 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.47(dd,  $J = 10.5$  Hz,  $J = 3.1$  Hz, 1H, 5'-H<sub>a</sub>), 3.36 (dd,  $J = 10.5$  Hz,  $J = 3.1$  Hz, 1H, 5'-H<sub>b</sub>), 3.05 (s, 1H, OH), 2.43 (ddd,  $J = 13.5$  Hz,  $J = 6.3$  Hz,  $J = 3.1$  Hz, 1H, 2'-H<sub>a</sub>), 2.34-2.27 (m, 1H, 2'-H<sub>b</sub>), 1.48 (s, 3H, 7-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 163.87 (C-4), 150.52 (C-2), 149.85 (C-4'''), 136.20 (C-6), 135.77 (C<sub>q</sub>), 135.57 (C-1'''), 135.52 (C-1'''), 130.22 (C-2'''), C-6'''), 128.36 (C-3'', C-5''), 128.13 (C-2'', C-6''), 123.92 (C-4''), 113.43 (C-3''',

C5'''), 111.34 (C-5), 87.09 (C-1''), 86.34 (C-4'), 84.88 (C-1'), 72.47 (C-3'), 63.70 (C-5'), 55.39 (-OCH<sub>3</sub>), 41.13 (C-2'), 11.97 (C-7).

**Drehwert:**  $[\alpha]^{20}_D = 5.6$  ( $c = 2.7$ , MeOH).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 118$  °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3489, 3210, 2854, 1686, 1543, 1273, 1210, 789, 598, 442.

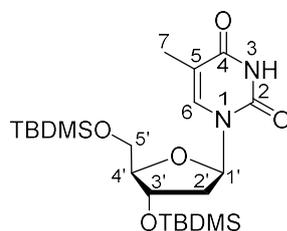
**UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{max} = 239, 269$ .

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>31</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (544.60)

ber.: 545.2282 [M+H]<sup>+</sup>

gef.: 545.2266 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.6.2 3',5'-Bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)thymidin **42**



**42**

Thymidin (10.0 g, 41.0 mmol) wurde 3 h im Vakuum getrocknet und in abs. Pyridin (100 mL) gelöst. Anschließend wurden Imidazol (7.03 g, 103 mmol) und *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (15.5 g, 103 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde auf 0°C gekühlt und langsam mit Wasser (50 mL) versetzt. Das Lösungsmittelgemisch wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat (500 mL) gelöst und mit ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (3 x 250 mL) und ges. NaCl-Lösung (100 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (*n*-Hex:EtOAc 4:1 → 1:1).

**Ausbeute (42):** 17.5 g (37.2 mmol, 91%) eines farblosen Feststoffes.

**DC:**  $R_f = 0.52$  (*n*-Hex:EtOAc 1:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 8.54 (s, 1H, NH), 7.46 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H, 6-H), 6.32 (dd,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 5.8$  Hz, 1H, 1'-H), 4.41-4.38 (m, 1H, 3'-H), 3.92

(q,  $J = 2.5$  Hz, 1H, 4'-H), 3.86 (dd,  $J = 11.4$  Hz,  $J = 2.5$  Hz, 1H, 5'-H<sub>a</sub>), 3.76 (dd,  $J = 11.4$  Hz,  $J = 2.5$  Hz, 1H, 5'-H<sub>b</sub>), 2.24 (ddd,  $J = 13.1$  Hz,  $J = 5.8$  Hz,  $J = 2.5$  Hz, 1H, 2'-H<sub>a</sub>), 1.97-2.02 (m, 1H, 2'-H<sub>b</sub>), 1.91 (d,  $J = 1.2$  Hz, 3H, 7-H), 0.92 (s, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.89 (s, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.11 (s, 3H, SiCH<sub>3</sub>), 0.10 (s, 3H, SiCH<sub>3</sub>), 0.08 (s, 3H, SiCH<sub>3</sub>), 0.07 (s, 3H, SiCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 163.59 (C-4), 150.15 (C-2), 135.47 (C-6), 110.79 (C-5), 87.83 (C-4'), 84.82 (C-1'), 72.25 (C-3'), 62.97 (C-5'), 41.36 (C-2'), 25.91 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.73 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 18.39 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.99 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 12.50 (C-7), -4.66 (SiCH<sub>3</sub>), -4.85 (SiCH<sub>3</sub>), -5.39 (SiCH<sub>3</sub>), -5.47 (SiCH<sub>3</sub>).

**Drehwert:**  $[\alpha]^{20}_D = 13.5$  ( $c = 1.3$ , MeOH).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 118$  °C.

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3030, 2973, 2856, 1688, 1256, 1062, 831, 776, 425.

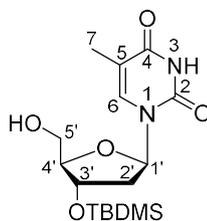
**UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{max} = 211, 266$ .

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** C<sub>31</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (470.76)

ber.: 471.2705 [M+H]<sup>+</sup>

gef.: 471.2688 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.6.3 3'-O-tert-Butyldimethylsilylthymidin 43



**43**

Zu einer auf -10°C gekühlten Lösung von **42** (16.9 g, 35.9 mmol) in Methanol (360 mL) wurde Acetylchlorid (710 mg, 0.645 mL, 9.05 mmol) getropft. Das Reaktionsgemisch wurde ca. 3 h bei 0°C gerührt und die Reaktion dünnschichtchromatographisch verfolgt (PE/EtOAc 1:1). Es wurde ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (50 mL) hinzugegeben und weitere 15 min gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit Ethylacetat (250 mL) versetzt. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase wurde mit ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (100 mL), Wasser (100 mL) und ges. NaCl-Lösung (100 mL) gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit.

Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE:EtOAc 1:1).

**Ausbeute (43):** 7.76 g (21.8 mmol, 61%) eines weißen Feststoffes.

**DC:**  $R_f = 0.14$  (PE:EtOAc 1:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 9.33 (s, 1H, NH), 7.39 (d,  $J = 1.1$  Hz, 1H, 6-H), 6.14 (dd,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 6.7$  Hz, 1H, 1'-H), 4.50-4.45 (m, 1H, 3'-H), 3.93-3.90 (m, 1H, 4'-H), 3.90-3.87 (m, 1H, 5'-H<sub>a</sub>), 3.77-3.70 (m, 1H, 5'-H<sub>b</sub>), 2.32 (dt,  $J = 13.4$  Hz,  $J = 6.7$  Hz, 1H, 2'-H<sub>a</sub>), 2.21 (ddd,  $J = 13.4$  Hz,  $J = 6.7$  Hz,  $J = 3.8$  Hz, 1H, 2'-H<sub>b</sub>), 1.88 (d,  $J = 1.1$  Hz, 3H, 7-H), 0.88 (s, 9H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.07 (s, 6H,  $\text{SiCH}_3$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 163.81 (C-4), 150.43 (C-2), 137.19 (C-6), 111.16 (C-5), 87.71 (C-1'), 87.17 (C-4'), 71.74 (C-3'), 62.18 (C-5'), 40.58 (C-2'), 25.85 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 18.10 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 12.66 (C-7), -4.56 ( $\text{SiCH}_3$ ), -4.71 ( $\text{SiCH}_3$ ).

**Drehwert:**  $[\alpha]^{20}_D = 19.0$  (c = 1.5, MeOH).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 107$  °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3479, 3012, 2855, 2837, 1692, 1666, 1251, 1092, 1032, 827, 426.

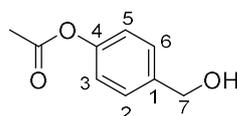
**UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 212, 237, 267$ .

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_7$  (356.49)

ber.: 357.1840 [M+H]<sup>+</sup>

gef.: 357.1834 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 7.6.4 4-Acetoxybenzylalkohol **38a**



**38a**

Die Synthese der Verbindung **38a** erfolgte gemäß AAV 1 (7.5.1). Es wurden 5.00 g (41.4 mmol) Benzaldehyd, 150 mL THF, 6.17 g (8.60 mL, 61.5 mmol) Triethylamin, 4.83 g (4.40 mL, 61.5 mmol) Acetylchlorid, 150 mL THF und

3.10 g (82.2 mmol) NaBH<sub>4</sub> eingesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (*n*-Hex:EtOAc 2:1).

**Ausbeute (38a):** 5.88 g (35.4 mmol, 86%) eines farblosen Feststoffes.

**DC:**  $R_f = 0.15$  (*n*-Hex:EtOAc 2:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.39-7.36 (m, 2H, H-3, H-5), 7.09-7.06 (m, 2H, H-2, H-6), 4.69 (s, 2H, H-7), 2.30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 169.79 ((C=O)CH<sub>3</sub>), 150.17 (C-4), 138.64 (C-1), 128.22 (C-2, C-6), 121.81 (C-3, C-5), 64.85 (C-7), 21.25 (CH<sub>3</sub>).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 38$  °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3323, 2927, 2857, 1748, 1185, 1011, 909, 834, 493.

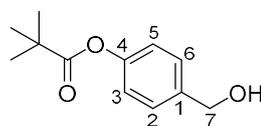
**UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{max} = 234, 264$ .

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub> (166.06)

ber.: 167.0703 [M+H]<sup>+</sup>

gef.: 167.0704 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.6.5 4-Pivaloyloxybenzylalkohol 38b



**38b**

Die Synthese der Verbindung **38b** erfolgte gemäß AAV 1 (7.5.1). Es wurden 5.00 g (41.4 mmol) Benzaldehyd, 150 mL THF, 6.17 g (8.60 mL, 61.5 mmol) Triethylamin, 7.38 g (7.50 mL, 61.5 mmol) Pivaloylchlorid, 150 mL THF und 3.10 g (82.2 mmol) NaBH<sub>4</sub> eingesetzt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (*n*-Hex:EtOAc 3:1).

**Ausbeute (38b):** 7.09 g (34.0 mmol, 83%) eines farblosen Feststoffes.

**DC:**  $R_f = 0.14$  (*n*-Hex:EtOAc 3:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.37-7.34 (m, 2H, H-3, H-5), 7.05-7.01 (m, 2H, H-2, H-6), 4.66 (s, 2H, H-7), 1.36 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 177.33 ( $(\underline{\text{C}}\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 150.63 (C-4), 138.40 (C-1), 128.13 (C-2, C-6), 121.70 (C-3, C-5), 64.85 (C-7), 39.20 ( $\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$ ), 27.26 ( $\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 65^\circ\text{C}$ .

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3275, 2968, 1741, 1277, 1163, 1119, 999, 896, 506.

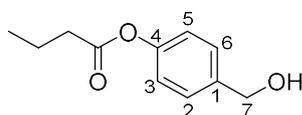
**UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 216, 265$ .

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{O}_3$  (208.11)

ber.: 209.1172 [M+H]<sup>+</sup>

gef.: 209.1173 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.6.6 4-Butyryloxybenzylalkohol **38c**



**38c**

Die Synthese der Verbindung **38c** erfolgte gemäß AAV 1 (7.5.1). Es wurden 5.00 g (41.4 mmol) Benzaldehyd, 150 mL THF, 6.17 g (8.60 mL, 61.5 mmol) Triethylamin, 6.55 g (6.36 mL, 61.5 mmol) Butyrylchlorid, 150 mL THF und 3.10 g (82.2 mmol)  $\text{NaBH}_4$  eingesetzt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (*n*-Hex:EtOAc 3:1).

**Ausbeute (38c):** 6.18 g (32.0 mmol, 78%) eines farblosen Öls.

**DC:**  $R_f = 0.19$  (*n*-Hex:EtOAc 3:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.39-7.35 (m, 2H, H-3, H-5), 7.08-7.05 (m, 2H, H-2, H-6), 4.67 (s, 2H, H-7), 2.54 (t, 2H,  $J = 7.4$  Hz,  $(\text{CO})\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.78 (tq, 2H,  $J = 7.4$  Hz,  $J = 7.4$  Hz,  $(\text{CO})\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3$ ), 1.04 (t,  $J = 7.4$  Hz,  $(\text{CO})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 172.38 ( $(\underline{\text{C}}\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 150.28 (C-4), 138.51 (C-1), 128.20 (C-2, C-6), 121.84 (C-3, C-5), 64.90 (C-7), 36.35 ( $(\text{CO})\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 18.59 ( $((\text{CO})\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3)$ ), 13.77 ( $(\text{CO})\text{CH}_2\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3340, 2955, 2929, 1753, 1688, 1198, 1122, 831, 776, 425.

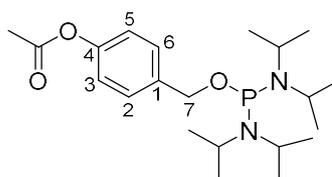
**UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 233, 264$ .

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3$  (194.09)

ber.: 195.1016 [M+H]<sup>+</sup>

gef.: 195.1016 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.6.7 4-Acetyloxybenzylphosphordiamidit **29a**



**29a**

Die Synthese der Verbindung **29a** erfolgte gemäß AAV 2 (7.5.2). Es wurden 885 mg (3.32 mmol) Phosphin, 9 mL Diethylether, 452  $\mu$ L (329 mg, 3.30 mmol) Triethylamin und 503 mg (3.03 mmol) Alkohol **38a** eingesetzt.

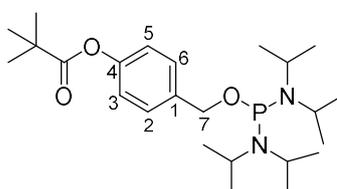
**Ausbeute (29a):** 1.08 g eines farblosen, hochviskosen Öls, laut  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum ca. 90% **29a** und 10% Nebenprodukte (100% Ausbeute: 1.20 g).

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.28 (d, 2H,  $J = 8.5$  Hz, H-3, H-5), 7.02 (d, 2H,  $J = 8.5$  Hz, H-2, H-6), 4.85-4.62 (m, 2H, H-7), 3.59-3.45 (m, 4H,  $\text{N}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_2$ ), 1.78 (s, 3H,  $(\text{CO})\text{CH}_3$ ), 1.24-1.12 (m, 24H,  $\text{N}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_2$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 168.41 ( $(\text{CO})\text{CH}_3$ ), 150.51 (C-4), 138.22 (d,  $J = 9.8$  Hz, C-1), 128.35 (C-2, C-6), 121.71 (C-3, C-5), 66.18 (d,  $J = 23.0$  Hz, C-7), 44.88 (d,  $J = 12.6$  Hz,  $\text{NCH}(\text{CH}_3)_2$ ), 24.74 (d,  $J = 8.3$  Hz,  $\text{NCH}(\text{CH}_3)_2$ ), 24.17 (d,  $J = 5.9$  Hz,  $\text{NCH}(\text{CH}_3)_2$ ), 20.56 ( $(\text{CO})\text{CH}_3$ ).

$^{31}\text{P-NMR}$  (162 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 135.86.

### 7.6.8 4-Pivaloyloxybenzylphosphordiamidit **29b**



**29b**

Die Synthese der Verbindung **29b** erfolgte gemäß AAV 2 (7.5.2). Es wurden 2.15 g (8.11 mmol) Phosphin, 20 mL Diethylether, 1.13 mL (820 mg, 8.11 mmol) Triethylamin und 1.53 g (7.37 mmol) Alkohol **38b** eingesetzt.

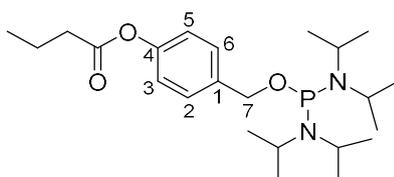
**Ausbeute (29b):** 3.17 g eines farblosen, hochviskosen Öls, laut  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum ca. 97% **29b** und 3% Nebenprodukte (100% Ausbeute: 3.23 g).

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.31 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-3, H-5), 7.02 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-2, H-6), 4.66-4.62 (m, 2H, H-7), 3.61-3.50 (m, 4H,  $\text{N}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_2$ ), 1.24-1.20 (m, 33H,  $\text{N}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_2$ ,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 176.21 ( $(\text{CO})\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 150.85 (C-4), 138.09 (d,  $J = 9.8$  Hz, C-1), 128.35 (C-2, C-6), 121.69 (C-3, C-5), 66.22 (d,  $J = 23.2$  Hz, C-7), 44.87 (d,  $J = 12.6$  Hz,  $\text{NCH}(\text{CH}_3)_2$ ), 39.07 ( $(\text{CO})\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 27.20 ( $(\text{CO})\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 24.75 (d,  $J = 8.3$  Hz,  $\text{NCH}(\text{CH}_3)_2$ ), 24.18 (d,  $J = 5.9$  Hz,  $\text{NCH}(\text{CH}_3)_2$ ).

$^{31}\text{P-NMR}$  (162 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 135.94.

### 7.6.9 4-Butyryloxybenzylphosphordiamidit **29c**



**29c**

Die Synthese der Verbindung **29c** erfolgte gemäß AAV 2 (7.5.2). Es wurden 940 mg (4.46 mmol) Phosphin, 15 mL Diethylether, 621  $\mu\text{L}$  (450 mg, 4.46 mmol) Triethylamin und 786 mg (4.05 mmol) Alkohol **38c** eingesetzt.

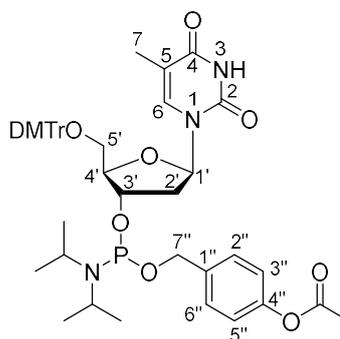
**Ausbeute (29c):** 1.72 g eines farblosen, hochviskosen Öls, laut  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum ca. 83% **29c** und 17% Nebenprodukte (100% Ausbeute: 1.72 g).

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.33 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H, H-3, H-5), 7.09 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H, H-2, H-6), 4.65-4.64 (m, 2H, H-7), 3.57-3.53 (m, 4H,  $\text{N}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)_2$ ), 2.16 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H,  $(\text{CO})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.55 (tq,  $J = 7.3$  Hz,  $J = 7.3$  Hz, 2H,  $(\text{CO})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.23 (d,  $J = 6.7$  Hz, 12H,  $\text{NCH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1.20 (d,  $J = 6.7$  Hz, 12H,  $\text{NCH}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.80 (t, 3H,  $J = 7.3$  Hz,  $(\text{CO})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>): δ [ppm] = 171.25 (O(CO)CH<sub>2</sub>), 150.59 (C-4), 138.20 (d, *J* = 9.8 Hz, C-1), 128.35 (C-2, C-6), 121.76 (C-3, C-5), 66.30 (d, *J* = 23.2 Hz, C-7), 44.88 (d, *J* = 12.6 Hz, N(CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 36.16 ((CO)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 18.63 (-(CO)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 24.75 (d, *J* = 8.3 Hz, NCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 24.18 (d, *J* = 5.9 Hz, NCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 13.63 ((CO)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>): δ [ppm] = 135.66.

### 7.6.10 5'-O-DMTr-thymidinyolphosphoramidit **22a**



**22a**

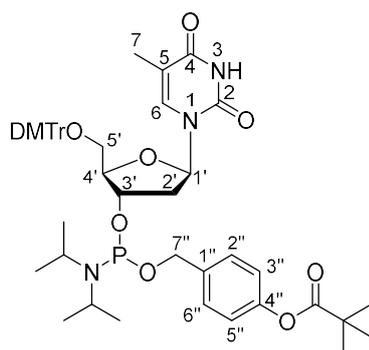
Die Synthese der Verbindung **22a** erfolgte gemäß AAV 3 (7.5.3). Es wurden 330 mg (~830 μmol) Diamidit **29a** (Menge bestimmt laut <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum), 6 mL MeCN, 83.2 mg (704 μmol) DCI und 381 mg (701 μmol) 5'-O-DMTr-Thymidin **32** eingesetzt.

**Ausbeute (22a):** 516 mg eines farblosen Feststoffes, laut <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum ca. 70% **22a** und 30% hydrolysiertes Edukt (100% Ausbeute: 587 mg).

**DC:** *R<sub>f</sub>* = 0.47 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 30:1 + 1% Pyridin).

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>): δ [ppm] = 162.63, 162.30.

### 7.6.11 5'-O-DMTr-thymidinylphosphoramidit **22b**



**22b**

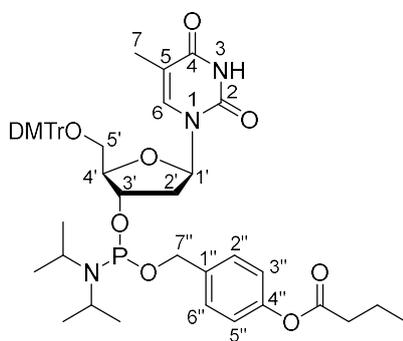
Die Synthese der Verbindung **22b** erfolgte gemäß AAV 3 (7.5.3). Es wurden 286 mg (~650  $\mu\text{mol}$ ) Diamidit **29b** (Menge bestimmt laut  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum), 5 mL MeCN, 67.0 mg (570  $\mu\text{mol}$ ) DCI und 309 mg (567  $\mu\text{mol}$ ) 5'-O-DMTr-Thymidin **32** eingesetzt.

**Ausbeute (22b):** 429 mg eines farblosen Feststoffes, laut  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum ca. 69% **22b**, 7% Nebenprodukt, 20% hydrolysiertes Edukt und 4% hydrolysiertes Produkt (100% Ausbeute: 505 mg).

**DC:**  $R_f = 0.41$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH 30:1 + 1% Pyridin).

**$^{31}\text{P}$ -NMR** (162 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 162.70, 162.07.

### 7.6.12 5'-O-DMTr-thymidinylphosphoramidit **22c**



**22c**

Die Synthese der Verbindung **22c** erfolgte gemäß AAV 3 (7.5.3). Es wurden 738 mg (~1.7 mmol) Diamidit **29c** (Menge bestimmt laut  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum),

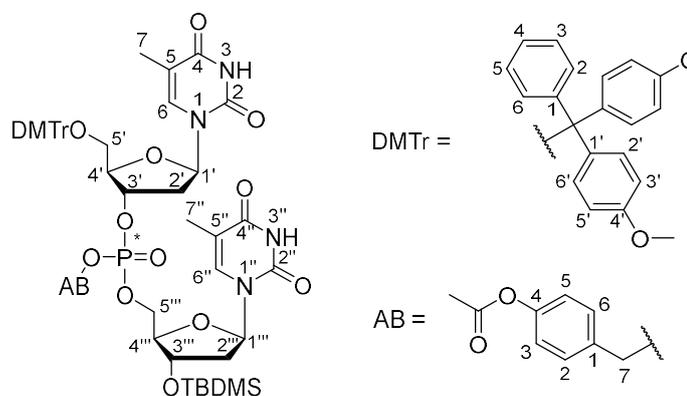
10 mL MeCN, 180 mg (1.53 mmol) DCI und 823 mg (1.51 mmol) 5'-O-DMTr-Thymidin **32** eingesetzt.

**Ausbeute (22c):** 992 mg eines farblosen Feststoffes, laut  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum ca. 56% **22c**, 5% Nebenprodukt, 22% hydrolysiertes Edukt und 8% hydrolysiertes Produkt (100% Ausbeute: 1.31 g).

**DC:**  $R_f = 0.47$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  30:1 + 1% Pyridin).

$^{31}\text{P}$ -NMR (162 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 162.55, 162.12.

### 7.6.13 Geschütztes Dinucleotid-Prodrug **27a**



**27a**

Die Synthese der Verbindung **27a** erfolgte gemäß AAV 4 (7.5.4). Es wurden 1.18 g (~1.4 mmol) Amidit **22a** (Menge bestimmt laut  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum), 9 mL MeCN, 145 mg (1.23 mmol) DCI, 440 mg (1.23 mmol) 3'-O-TBDMS-Thymidin **43** in 1 mL MeCN und 410  $\mu\text{L}$  (2.46 mmol, 5.5 M) *t*-BuOOH-Lösung eingesetzt.

**Ausbeute (27a):** 959 mg (0.863 mmol, 70%) eines farblosen Feststoffes als Gemisch aus zwei Diastereomeren (d.r. ~1:1).

**DC:**  $R_f = 0.22$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  20:1).

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 11.39 (s, 2x 1H, NH), 11.34 (s, 1H, NH), 11.31 (s, 1H, NH), 7.49-7.42 (m, 2x 2H, 6-H, 6''-H), 7.37-7.34 (m, 2x 4H, DMTr-2'-H, DMTr-6'-H), 7.32-7.27 (m, 2x 2H, AB-3-H, AB-5-H), 7.26-7.20 (m,

2x 5H, DMTr-2-H, DMTr-3-H, DMTr-4-H, DMTr-5-H, DMTr-6-H), 7.11-7.07 (m, 2x 2H, AB-2-H, AB-6-H), 6.91-6.83 (m, 2x 4H, DMTr-3'-H, DMTr-5'-H), 6.24-6.17 (m, 2x 1H 1'-H), 6.17-6.10 (m, 2x 1H, 1'''-H), 5.08-4.99 (m, 2x 3H, AB-7-H, 3'-H), 4.37-4.33 (m, 2x 1H, 3'''-H), 4.19-4.07 (m, 2x 3H, 5'''-H, 4'-H), 3.91-3.84 (m, 2x 1H, 4'''-H), 3.73 (s, 3H, DMTr-OCH<sub>3</sub>), 3.72 (s, 3H, DMTr-OCH<sub>3</sub>), 3.72 (s, 3H, DMTr-OCH<sub>3</sub>), 3.71 (s, 3H, DMTr-OCH<sub>3</sub>), 3.27-3.18 (m, 2x 2H, 5'-H), 2.47-2.34 (m, 2x 2H, 2'-H), 2.26 (s, 2x 3H, AB-CH<sub>3</sub>), 2.22-2.15 (m, 2H, 2'''-H), 2.07-2.00 (m, 2H, 2'''-H), 1.71, 1.44 (s, 2x 6H, 7-H, 7''-H), 0.84 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.84 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.05 (s, 3H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.04 (s, 2x 3H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.03 (s, 3H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = -1.88, -1.90.

**Schmelzpunkt:** T<sub>m</sub> = 79 °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3167, 2929, 1687, 1468, 1251, 1001, 831, 417.

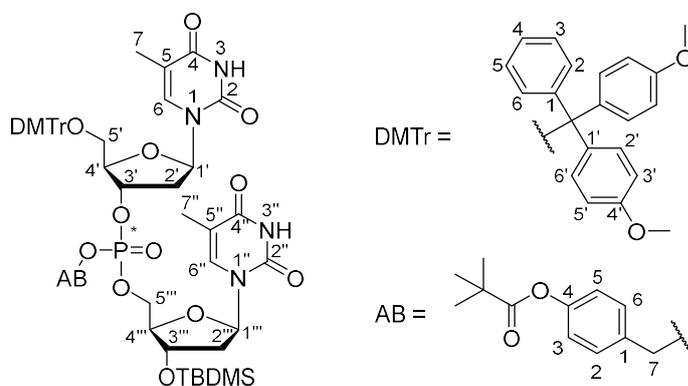
**UV/Vis** (MeOH): λ<sub>max</sub> = 212, 264.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>56</sub>H<sub>67</sub>N<sub>4</sub>O<sub>16</sub>PSi (1110.41)

ber.: 1111.4132 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 1111.4109 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.6.14 Geschütztes Dinucleotid-Prodrug 27b



**27b**

Die Synthese der Verbindung **27b** erfolgte gemäß AAV 4 (7.5.4). Es wurden 216 mg (~0.24 mmol) Amidit **22b** (Menge bestimmt laut <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum), 3 mL MeCN, 25 mg (0.21 mmol) DCI, 76 mg (0.21 mmol) 3'-O-TBDMS-Thymidin **43** in 0.5 mL MeCN und 71 μL (0.43 mmol, 5.5 M) *t*-BuOOH-Lösung eingesetzt.

**Ausbeute (27b):** 128 mg (0.111 mmol, 52%) eines farblosen Feststoffes als Gemisch aus zwei Diastereomeren (d.r. ~1:1).

**DC:**  $R_f = 0.31$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 20:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 11.38 (s, 2x 1H, NH), 11.33 (s, 1H, NH), 11.32 (s, 1H, NH), 7.48-7.43 (m, 2x 2H, 6-H, 6''-H), 7.37-7.34 (m, 2x 4H, DMTr-2'-H, DMTr-6'-H), 7.32-7.27 (m, 2x 2H, AB-3-H, AB-5-H), 7.26-7.20 (m, 2x 5H, DMTr-2-H, DMTr-3-H, DMTr-4-H, DMTr-5-H, DMTr-6-H), 7.07-7.03 (m, 2x 2H, AB-2-H, AB-6-H), 6.91-6.83 (m, 2x 4H, DMTr-3'-H, DMTr-5'-H), 6.24-6.17 (m, 2x 1H 1'-H), 6.17-6.10 (m, 2x 1H, 1'''-H), 5.08-4.99 (m, 2x 3H, AB-7-H, 3'-H), 4.36-4.31 (m, 2x 1H, 3'''-H), 4.19-4.07 (m, 2x 3H, 5'''-H, 4'-H), 3.91-3.84 (m, 2x 1H, 4'''-H), 3.72 (s, 6H, DMTr-OCH<sub>3</sub>), 3.71 (s, 6H, DMTr-OCH<sub>3</sub>), 3.27-3.15 (m, 2x 2H, 5'-H), 2.47-2.33 (m, 2x 2H, 2'-H), 2.21-2.13 (m, 2H, 2'''-H), 2.07-2.00 (m, 2H, 2'''-H), 1.72, 1.44 (s, 2x 6H, 7-H, 7''-H), 1.28 (s, 2x 9H, AB-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.84 (s, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.84 (s, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.05 (s, 3H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.04 (s, 2x 3H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.03 (s, 3H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = -1.87, -1.89.

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 81$  °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3217, 2943, 1654, 1510, 1203, 998, 853, 433.

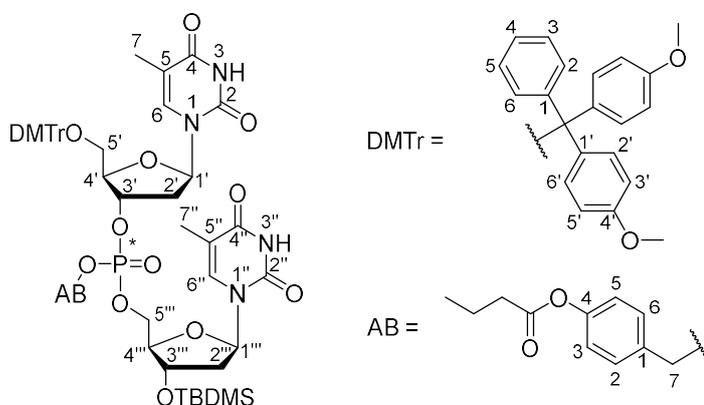
**UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{max} = 214, 265$ .

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>59</sub>H<sub>73</sub>N<sub>4</sub>O<sub>16</sub>PSi (1152.45)

ber.: 1153.4601 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 1153.4598 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.6.15 Geschütztes Dinucleotid-Prodrug 27c



**27c**

Die Synthese der Verbindung **27c** erfolgte gemäß AAV 4 (7.5.4). Es wurden 524 mg (~0.60 mmol) Amidit **22c** (Menge bestimmt laut  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum), 5 mL MeCN, 62 mg (0.53 mmol) DCI, 188 mg (0.525 mmol) 3'-O-TBDMS-Thymidin **43** in 0.7 mL MeCN und 175  $\mu\text{L}$  (1.05 mmol, 5.5 M) *t*-BuOOH-Lösung eingesetzt.

**Ausbeute (27c):** 430 mg (0.378 mmol, 72%) eines farblosen Feststoffes als Gemisch aus zwei Diastereomeren (d.r. ~1.1:0.9).

**DC:**  $R_f = 0.24$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH 20:1 + 0.5%  $\text{NEt}_3$ ).

**$^1\text{H}$ -NMR** (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 11.39 (s, 2x 1H, NH), 11.33 (s, 2x 1H, NH), 7.48-7.44 (m, 2x 2H, 6-H, 6''-H), 7.41-7.34 (m, 2x 4H, DMTr-2'-H, DMTr-6'-H), 7.33-7.27 (m, 2x 2H, AB-3-H, AB-5-H), 7.26-7.19 (m, 2x 5H, DMTr-2-H, DMTr-3-H, DMTr-4-H, DMTr-5-H, DMTr-6-H), 7.12-7.06 (m, 2x 2H, AB-2-H, AB-6-H), 6.91-6.83 (m, 2x 4H, DMTr-3'-H, DMTr-5'-H), 6.17-6.10 (m, 2x 1H, 1'-H), 6.23-6.17 (m, 2x 1H, 1'''-H), 5.08-4.93 (m, 2x 3H, AB-7-H, 3'-H), 4.37-4.33 (m, 2x 1H, 3'''-H), 4.19-4.08 (m, 2x 3H, 5'''-H, 4'-H), 3.91-3.84 (m, 2x 1H, 4'''-H), 3.72 (s, 6H, DMTr-OCH<sub>3</sub>), 3.71 (s, 6H, DMTr-OCH<sub>3</sub>), 3.27-3.17 (m, 2x 2H, 5'-H), 2.55 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H, AB-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 2.55 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H, AB-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 2.46-2.34 (m, 2x 2H, 2'-H), 2.21-2.14 (m, 2H, 2'''-H), 2.07-2.02 (m, 2H, 2'''-H), 1.73-1.70 (m, 6H, 7-H, 7''-H), 1.45-1.41 (m, 6H, 7-H, 7''-H), 1.64 (tq,  $J = 7.3$  Hz,  $J = 7.3$  Hz, 2x 2H, AB-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 0.96 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2x 3H, AB-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 0.84 (s, 2x 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.05 (s, 3H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) 0.04 (s, 2x 3H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.03 (s, 3H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**$^{31}\text{P}$ -NMR** (162 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = -1.87, -1.88.

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 74$  °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3165, 3045, 2930, 2837, 1685, 1508, 1464, 1249, 1002, 829, 415.

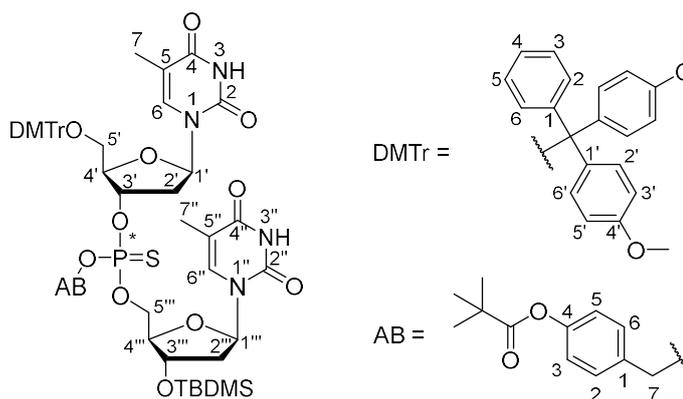
**UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 206, 229, 264$ .

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $\text{C}_{58}\text{H}_{71}\text{N}_4\text{O}_{16}\text{PSi}$  (1138.44)

ber.: 1139.4445 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 1139.4453 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.6.16 Geschütztes Dinucleotid-Phosphorthioat-Prodrug 27d



**27d**

Die Synthese der Verbindung **27d** erfolgte gemäß AAV 4 (7.5.4). Es wurden 2.40 g (2.72 mmol) Amidit **22b** (Menge bestimmt laut  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum), 17 mL MeCN, 280 mg (2.37 mmol) DCI, 850 mg (2.37 mmol) 3'-O-TBDMS-Thymidin **43** in 2 mL MeCN und 993 mg (4.74 mmol) DDTT in 12 mL Pyridin eingesetzt.

**Ausbeute (27d):** 2.18 g (1.87 mmol, 79%) eines gelben Feststoffes als Gemisch aus zwei Diastereomeren (d.r. ~1:1).

**DC:**  $R_f = 0.24$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH 30:1).

**$^1\text{H}$ -NMR** (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 11.39 (s, 1H, NH), 11.39 (s, 1H, NH), 11.33 (s, 1H, NH), 11.33 (s, 1H, NH), 7.48-7.40 (m, 2x 2H, 6-H, 6''-H), 7.40-7.27 (m, 2x 7H, AB-3-H, AB-5-H, DMTr-2-H, DMTr-3-H, DMTr-4-H, DMTr-5-H, DMTr-6-H), 7.26-7.20 (m, 2x 4H, DMTr-2'-H, DMTr-6'-H), 7.08-7.01 (m, 2x 2H, AB-2-H, AB-6-H), 6.90-6.85 (m, 2x 4H, DMTr-3'-H, DMTr-5'-H), 6.18 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2x 1H 1'-H), 6.13 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2x 1H, 1'''-H), 5.24-5.18 (m, 2x 1H, 3'-H), 5.15-4.99 (m, 2x 2H, AB-7-H), 4.38-4.32 (m, 2x 1H, 3'''-H), 4.20-4.08 (m, 2x 3H, 5'''-H, 4'-H), 3.92-3.85 (m, 2x 1H, 4'''-H), 3.73 (s, 3H, DMTr-OCH<sub>3</sub>), 3.72 (s, 3H, DMTr-OCH<sub>3</sub>), 3.72 (s, 3H, DMTr-OCH<sub>3</sub>), 3.71 (s, 3H, DMTr-OCH<sub>3</sub>), 3.26-3.16 (m, 2x 2H, 5'-H), 2.32-2.25 (m, 2H, 2'-H), 2.46-2.40 (m, 2H, 2'-H), 2.23-1.99 (m, 2x 2H, 2'''-H), 1.74 (d,  $J = 1.1$  Hz, 3H, 7-H, 7''-H), 1.73 (d,  $J = 1.1$  Hz, 3H, 7-H, 7''-H), 1.46-1.40 (m, 6H, 7-H, 7''-H), 1.28 (s, 2x 9H, AB-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.84

(s, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.83 (s, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.06 (s, 3H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.06 (s, 3H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.05 (s, 3H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.04 (s, 3H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

<sup>31</sup>P-NMR (202 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 67.37, 67.27.

**Schmelzpunkt:** T<sub>m</sub> = 85 °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3180, 3054, 2930, 1685, 1249, 992, 828, 703 416.

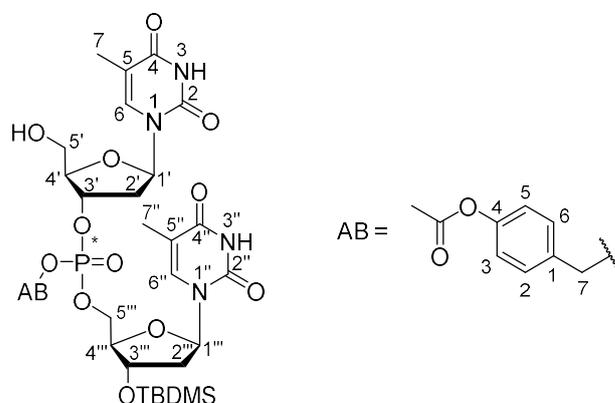
**UV/Vis** (MeOH): λ<sub>max</sub> = 207, 257, 263.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>59</sub>H<sub>73</sub>N<sub>4</sub>O<sub>15</sub>PSSi (1168.43)

ber.: 1169.4373 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 1169.4344 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.6.17 Geschütztes Dinucleotid-Prodrug 26a



**26a**

Die Synthese der Verbindung **26a** erfolgte gemäß AAV 5 (7.5.5). Es wurden 205 mg (183 μmol) Phosphat **27a**, 2 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und 44.3 mg (270 μmol) TCA eingesetzt.

**Ausbeute (26a):** 92.1 mg (113 μmol, 62%) eines farblosen Feststoffes als Gemisch aus zwei Diastereomeren (d.r. ~1.1:0.9).

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.12 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 20:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 11.35 (s, 1H, NH), 11.35 (s, 1H, NH), 11.34 (s, 1H, NH), 11.33 (s, 1H, NH), 7.67-7.65 (m, 2H, 6-H, 6''-H), 7.50-7.47 (m, 2H, 6-H, 6''-H), 7.47-7.42 (m, 2x 2H, AB-3-H, AB-5-H), 7.17-7.10 (m, 2x 2H, AB-2-H, AB-6-H), 6.22-6.13 (m, 2x 2H, 1'-H, 1'''-H), 5.23 (t, J = 2.7 Hz, 1H, OH), 5.22 (t, J = 2.7 Hz, 1H, OH), 5.13-5.06 (m, 2x 2H, AB-7-H), 4.99-4.92 (m, 2x 1H, 3'-H), 4.42-4.36 (m, 2x 1H, 3'''-H), 4.22-4.11 (m, 2x 2H, 5'''-H), 4.06-4.00 (m,

2x 1H, 4'-H) , 3.95-3.90 (m, 2x 1H, 4'''-H), 3.62-3.53 (m, 2x 2H, 5'-H), 2.35-2.17 (m, 2x 6H, 2'-H, 2'''-H<sub>a</sub>, AB-CH<sub>3</sub>), 2.10-2.03 (m, 2x 1H, 2'''-H<sub>b</sub>), 1.80-1.74 (m, 2x 6H, 7-H, 7''-H), 0.87 (s, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.86 (s, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.08 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.07 (s, 3H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.07 (s, 3H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 169.15 (AB-O(CO)CH<sub>3</sub>), 169.16 (AB-O(CO)CH<sub>3</sub>), 163.68 (C-4,C-4''), 150.58 (AB-C-4), 150.46 (AB-C-4), 150.44, 150.43 (C-2, C-2''), 135.79 (C-6, C-6''), 135.77 (C-6, C-6''), 133.36 (AB-C-1), 133.31 (AB-C-1), 129.30 (AB-C-2, AB-C-6), 129.34 (AB-C-2, AB-C-6), 122.02 (AB-C-3, AB-C-5), 109.91, 109.91, 109.80, 109.78 (C-5, C-5''), 85.20, 85.15, 84.28, 84.22 (C-4', C-4''), 84.03, 84.00, 83.51, 83.50 (C-1', C-1''), 78.58 (d, *J* = 5.3 Hz, C-3'), 78.48 (d, *J* = 5.3 Hz, C-3'), 71.64 (C-3'''), 71.60 (C-3'''), 68.44 (AB-C-7), 68.39 (AB-C-7), 66.79 (C-5'''), 60.93 (C-5'), 38.72, 38.68, 37.47, 37.45 (C-2', C-2''), 25.65 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 20.88 (AB-CH<sub>3</sub>), 17.65 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 12.32, 12.12, 12.10 (C-7, C-7''), -4.84 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -4.97 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

Wenn möglich wurden die jeweiligen Signale der beiden Diastereomere angegeben.

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = -1.90.

**Schmelzpunkt:** T<sub>m</sub> = 74 °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3028, 2930, 1682, 1273, 1194, 1001, 832, 777, 558.

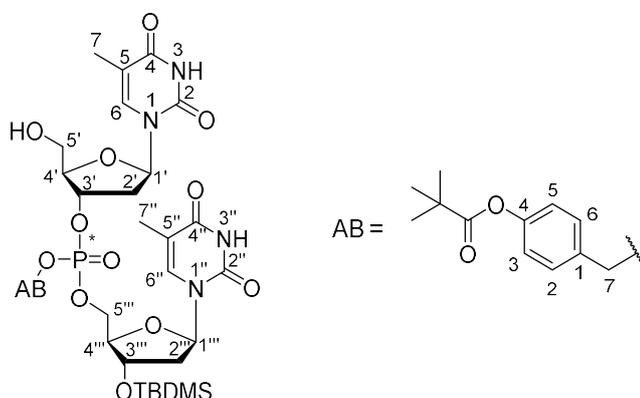
**UV/Vis** (MeOH): λ<sub>max</sub> = 264.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>35</sub>H<sub>49</sub>N<sub>4</sub>O<sub>14</sub>PSi (808.28)

ber.: 809.2825 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 809.2833 [M+H]<sup>+</sup>.

## 7.6.18 Geschütztes Dinucleotid-Prodrug 26b



**26b**

Die Synthese der Verbindung **26b** erfolgte gemäß AAV 5 (7.5.5). Es wurden 135 mg (117  $\mu\text{mol}$ ) Phosphat **27b**, 1.5 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und 30.0 mg (176  $\mu\text{mol}$ ) TCA eingesetzt.

**Ausbeute (26b):** 85.4 mg (100  $\mu\text{mol}$ , 85%) eines farblosen Feststoffes als Gemisch aus zwei Diastereomeren (d.r.  $\sim 1:1$ ).

**DC:**  $R_f = 0.11$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  20:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 11.33 (s, 2x 2H, NH), 7.67-7.65 (m, 2H, 6-H, 6''-H), 7.50-7.46 (m, 2H, 6-H, 6''-H), 7.46-7.43 (m, 2x 2H, AB-3-H, AB-5-H), 7.13-7.08 (m, 2x 2H, AB-2-H, AB-6-H), 6.22-6.13 (m, 2x 2H, 1'-H, 1''-H), 5.23 (s, 2x 1H, OH), 5.13-5.06 (m, 2x 2H, AB-7-H), 4.99-4.92 (m, 2x 1H, 3'-H), 4.41-4.35 (m, 2x 1H, 3'''-H), 4.21-4.11 (m, 2x 2H, 5'''-H), 4.06-4.00 (m, 2x 1H, 4'-H), 3.94-3.88 (m, 2x 1H, 4'''-H), 3.62-3.53 (m, 2x 2H, 5'-H), 2.35-2.27 (m, 2x 2H, 2'-H), 2.10-2.03 (m, 2x 2H, 2'''-H), 1.80-1.71 (m, 2x 6H, 7-H, 7''-H), 1.29 (s, 9H, AB- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.29 (s, 9H, AB- $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.86 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.85 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.08 (s, 6H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.07 (s, 3H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.06 (s, 3H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\text{CH}_3)_2$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 176.33 (AB- $(\text{CH}_3)_3\text{C}(\underline{\text{C}}\text{O})$ ), 163.69 (C-4, C-4''), 150.89 (AB-C-4), 150.88 (AB-C-4), 150.46, 150.43 (C-2, C-2''), 135.94, 135.90, 135.79, 135.76 (C-6, C-6''), 133.36 (AB-C-1), 133.31 (AB-C-1), 129.38 (AB-C-2, AB-C-6), 129.33, (AB-C-2, AB-C-6), 121.90 (AB-C-3, AB-C-5), 109.90, 109.79, 109.76 (C-5, -5''), 85.19, 84.28, 84.22 (C-4', C-4'''), 84.04, 84.02, 83.51, 83.50 (C-1', C-1'''), 78.58 (d,  $J = 5.7$  Hz, C-3'), 78.48 (d,  $J = 5.7$  Hz, C-3''), 71.65 (C-3'''), 71.61 (C-3'''), 68.49-68.46 (m, AB-C-7), 66.80, 66.78 (C-5'''), 60.93 (C-5'), 38.71, 38.68, 37.45, 37.41 (C-2', C-2''', AB- $(\text{CH}_3)_3\text{C}(\underline{\text{C}}\text{O})$ ), 26.76 (AB- $(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3\text{C}(\text{CO})$ ), 25.65 ( $(\text{CH}_3)_2\text{SiC}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ), 17.65 ( $(\text{CH}_3)_2\text{SiC}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ), 12.31, 12.12, 12.10 (C-7, C-7''), -4.84 ( $(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), -4.97 ( $(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ).

Wenn möglich wurden die jeweiligen Signale der beiden Diastereomere angegeben.

**$^{31}\text{P-NMR}$**  (162 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = -1.86, -1.88.

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 89^\circ\text{C}$ .

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3462, 2962, 1656, 1256, 1197, 1000, 830, 777.

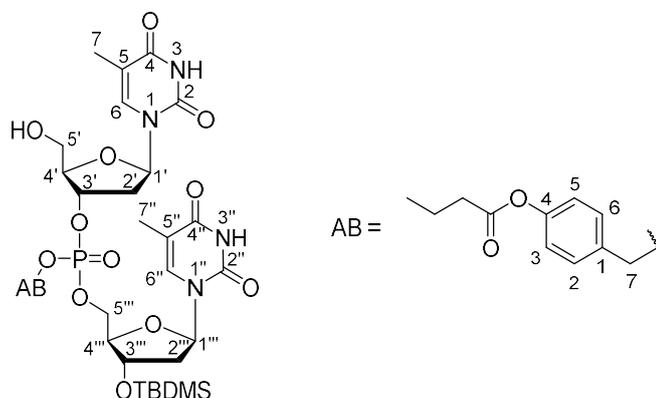
**UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{\max} = 264$ .

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>38</sub>H<sub>55</sub>N<sub>4</sub>O<sub>14</sub>PSi (850.32)

ber.: 851.3294 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 851.3300 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.6.19 Geschütztes Dinucleotid-Prodrug **26c**



**26c**

Die Synthese der Verbindung **26c** erfolgte gemäß AAV 5 (7.5.5). Es wurden 228 mg (200  $\mu$ mol) Phosphat **27c**, 2.0 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und 50.0 mg (300  $\mu$ mol) TCA eingesetzt.

**Ausbeute (26c):** 152 mg (182  $\mu$ mol, 91%) eines farblosen Feststoffes als ein Gemisch aus zwei Diastereomeren (d.r. ~1:1).

**DC:**  $R_f = 0.19$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 20:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 11.34 (s, 2x 2H, NH), 7.68-7.65 (m, 2H, 6-H, 6''-H), 7.49-7.46 (m, 2H, 6-H, 6''-H), 7.46-7.43 (m, 2x 2H, AB-3-H, AB-5-H), 7.17-7.10 (m, 2x 2H, AB-2-H, AB-6-H) 6.21-6.14 (m, 2x 2H, 1'-H, 1'''-H), 5.25-5.20 (m, 2x 1H, OH), 5.14-5.07 (m, 2x 2H, AB-7-H), 4.98-4.91 (m, 2x 1H, 3'-H), 4.41-4.36 (m, 2x 1H, 3'''-H), 4.22-4.12 (m, 2x 2H, 5'''-H), 4.06-4.00 (m, 2x 1H, 4'-H), 3.94-3.90 (m, 2x 1H, 4'''-H), 3.62-3.53 (m, 2x 2H, 5'-H), 2.55 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H, AB-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 2.55 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H, AB-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 2.35-2.25 (m, 2x 2H, 2'-H), 2.24-2.18 (m, 2H, 2'''-H), 2.09-2.03 (m, 2H, 2'''-H), 1.80-1.74 (m, 2x 6H, 7-H, 7''-H), 1.65 (tq,  $J = 7.3$  Hz,  $J = 7.3$  Hz, 2H, AB-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 1.65 (tq,  $J = 7.3$  Hz,  $J = 7.3$  Hz, 2H, AB-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 0.96 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H, AB-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 0.96 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H, AB-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 0.85 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.85 (s, 9H,

$(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\text{CH}_3)_2$ , 0.07 (s, 6H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.07 (s, 3H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.06 (s, 3H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\text{CH}_3)_2$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 171.59 (AB- $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2(\underline{\text{C}}\text{O})$ ), 163.64 (C-4, C-4''), 150.56 (AB-C-4), 150.44 (AB-C-4), 150.41, 150.39 (C-2, C-2''), 135.91, 135.87, 135.76, 135.74 (C-6, C-6''), 133.32 (AB-C-1), 133.27 (AB-C-1), 129.33 (AB-C-2, AB-C-6), 129.29 (AB-C-2, AB-C-6), 121.98 (AB-C-3, AB-C-5), 109.88, 109.77, 109.74 (C-5, C-5''), 85.18 (C-4'), 85.13 (C-4'), 84.28 (C-4'''), 84.22 (C-4'''), 84.04 (C-1'), 84.02 (C-1'), 83.55 (C-1'''), 83.50 (C-1'''), 78.55 (d,  $J = 5.7$  Hz, C-3'), 78.45 (d,  $J = 5.7$  Hz, C-3'), 71.63 (C-3'''), 71.59 (C-3'''), 68.43-68.39 (m, AB-C-7), 66.83-66.71 (m, C-5'''), 60.92 (C-5'), 38.71 (C-2'''), 38.68 (C-2'''), 37.42 (C-2'), 35.26 (AB- $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2(\underline{\text{C}}\text{O})$ ), 25.62 ( $(\text{CH}_3)_2\text{Si}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ), 17.84 (AB- $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2(\underline{\text{C}}\text{O})$ ), 17.62 ( $(\text{CH}_3)_2\text{Si}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$ ), 13.37 (AB- $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2(\underline{\text{C}}\text{O})$ ), 12.27, 12.08, 12.06 (C-7, C-7''), -4.87 ( $(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ), -4.99 ( $(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ).

Wenn möglich wurden die jeweiligen Signale der beiden Diastereomere angegeben.

**$^{31}\text{P-NMR}$**  (162 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = -1.88, -1.89.

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 98$  °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3065, 3023, 2941, 2837, 1685, 1508, 1464, 1249, 986, 829, 415.

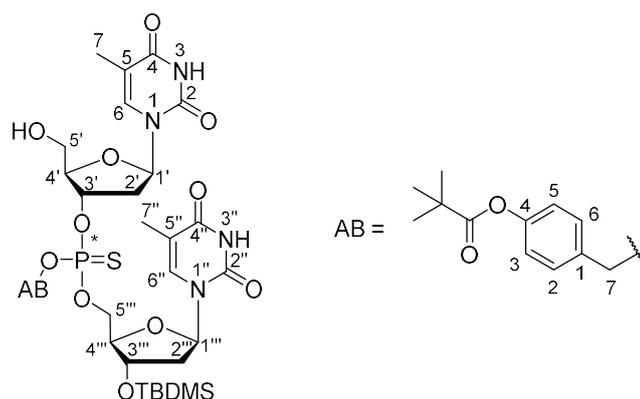
**UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 264$ .

**HRMS** (ESI $^+$ ):  $\text{C}_{37}\text{H}_{53}\text{N}_4\text{O}_{14}\text{PSi}$  (836.31)

ber.: 837.3138 [M+H] $^+$ ,

gef.: 837.3142 [M+H] $^+$ .

## 7.6.20 Geschütztes Dinucleotid-Phosphorthioat-Prodrug 26d



**26d**

Die Synthese der Verbindung **26d** erfolgte gemäß AAV 5 (7.5.5). Es wurden 1.17 g (1.00 mmol) Phosphat **27d**, 10.0 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und 246 mg (1.50 mmol) TCA eingesetzt.

**Ausbeute (26d):** 580 mg (670 μmol, 67%) eines farblosen Feststoffes als Gemisch aus zwei Diastereomeren (d.r. ~1.1:0.9).

**DC:**  $R_f = 0.22$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 20:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 11.35 (s, 2x 1H, NH), 11.34 (s, 1H, NH), 11.33 (s, 1H, NH), 7.70-7.66 (m, 2H, 6-H, 6''-H), 7.47-7.45 (m, 2H, 6-H, 6''-H), 7.45-7.42 (m, 2x 2H, AB-3-H, AB-5-H), 7.13-7.08 (m, 2x 2H, AB-2-H, AB-6-H), 6.22-6.14 (m, 2x 2H, 1'-H, 1'''-H), 5.24 (s, 2x 1H, OH), 5.19-5.11 (m, 2x 2H, AB-7-H), 5.12-5.05 (m, 2x 1H, 3'-H), 4.44-4.35 (m, 2x 1H, 3'''-H), 4.26-4.15 (m, 2x 2H, 5'''-H), 4.08-4.02 (m, 2x 1H, 4'-H), 3.96-3.88 (m, 2x 1H, 4'''-H), 3.62-3.54 (m, 2x 2H, 5'), 2.32-2.14 (m, 2x 3H, 2'-H, 2'''-H<sub>a</sub>), 2.10-2.02 (m, 2x 1H, 2'''-H<sub>b</sub>), 1.81-1.72 (m, 2x 6H, 7-H, 7''-H), 1.29 (s, 9H, AB-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.28 (s, 9H, AB-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.86 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.85 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.07 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.06 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 176.25 (AB-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C(CO)), 163.62 (C-4, C-4''), 150.90 (AB-C-4), 150.88 (AB-C-4), 150.42, 150.38, 150.36 (C-2, C-2''), 135.80, 135.79, 135.72, 135.66 (C-6, C-6''), 133.03 (AB-C-1), 132.97 (AB-C-1), 129.44, 129.37 (AB-C-2, AB-C-6), 121.86, 121.85 (AB-C-3, AB-C-5), 109.87, 109.84, 109.77, 109.72 (C-5, C-5''), 85.12, 85.11 (C-4'), 84.03, 83.99

(C-4'''), 83.62, 83.57 (C-1', C-1'''), 79.70 (C-3'), 79.60 (C-3''), 71.72 (C-3'''), 71.61 (C-3'''), 69.13 (AB-C-7), 69.04 (AB-C-7), 67.31 (C-5'''), 67.26 (C-5'''), 60.97 (C-5'), 38.79 (C-2'''), 37.52 (C-2'''), 37.23 (AB-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C(CO)), 37.45 (C-2'), 37.32 (C-2'), 26.70 (AB-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C(CO)), 25.60 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.59 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.60 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 12.26, 12.12, 12.10 (C-7, C-7''), -4.86 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.98 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

Wenn möglich wurden die jeweiligen Signale der beiden Diastereomere angegeben.

<sup>31</sup>P-NMR (202 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 66.89, 66.74.

**Schmelzpunkt:** T<sub>m</sub> = 72 °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3166, 3054, 2930, 1682, 1469, 1106, 993, 830, 417.

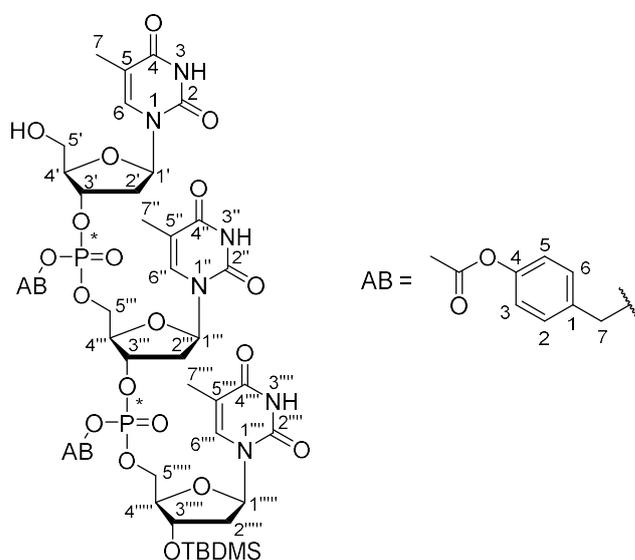
**UV/Vis** (H<sub>2</sub>O): λ<sub>max</sub> = 217, 263.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>38</sub>H<sub>55</sub>N<sub>4</sub>O<sub>14</sub>PSi (866.30)

ber.: 867.3066 [M+H]<sup>+</sup>

gef.: 867.3032 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.6.21 Geschütztes Trinucleotid-Prodrug 44a



Die Synthese der Verbindung **44a** erfolgte gemäß AAV 5 (7.5.5). Es wurden 110 mg (70.0 μmol) Phosphat **25a**, 1.0 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und 18.0 mg (105 μmol) TCA eingesetzt.

**Ausbeute (44a):** 57.2 mg (45.4  $\mu\text{mol}$ , 65%) eines farblosen Feststoffes als ein Gemisch aus vier Diastereomeren (d.r.  $\sim 1:1:1:1$ ).

**DC:**  $R_f = 0.16$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  20:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 11.34, 11.32 (s, 4x 3H, NH), 7.68-7.65, 7.51-7.45 (m, 4x 3H, 6-H, 6''-H, 6'''-H), 7.46-7.43 (m, 4x 4H, AB-3-H, AB-5-H), 7.15-7.09 (m, 4x 4H, AB-2-H, AB-6-H), 6.22-6.13 (m, 4x 3H, 1'-H, 1''-H, 1'''-H), 5.23-5.18 (m, 4x 1H, OH), 5.13-5.05 (m, 4x 4H, AB-7-H), 5.03-4.93 (m, 4x 2H, 3'-H, 3''-H), 4.40-4.35 (m, 4x 1H, 3'''-H), 4.29-4.18 (m, 4x 4H, 5'''-H, 5''''-H), 4.18-4.13 (m, 4x 1H, 4'''-H), 4.06-4.00 (m, 4x 1H, 4'-H), 3.94-3.90 (m, 4x 1H, 4''''-H), 3.60-3.51 (m, 4x 2H, 5'-H), 2.39-2.26 (m, 4x 4H, 2'-H, 2''-H), 2.26, 2.25, 2.25, 2.25, 2.24, 2.24 (4x 6H, AB- $\text{CH}_3$ ), 2.23-2.16 (m, 2x 2H, 2''''-H), 2.09-2.02 (m, 2x 2H, 2''''-H), 1.80-1.72 (m, 4x 9H, 7-H, 7'''-H, 7''''-H), 0.85 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.84 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.84 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.83 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.07, 0.06, 0.06, 0.06, 0.05, 0.05 (4x 6H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\text{CH}_3)_2$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 169.15, 163.80, 163.79, 150.62, 150.58, 150.55, 150.50, 129.37, 129.33, 129.28, 122.04, 109.92, 84.08, 84.03, 83.55, 79.23, 68.47, 68.42, 54.98, 25.65, 20.88, 17.65, 12.35, 12.15, 12.03, -4.85, -4.97.

Eine genaue Zuordnung wurde nicht vorgenommen.

**$^{31}\text{P-NMR}$**  (162 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = -1.81, -1.85, -1.98, -2.01.

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 112$  °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2929, 1664, 1193, 1001, 832, 778, 491.

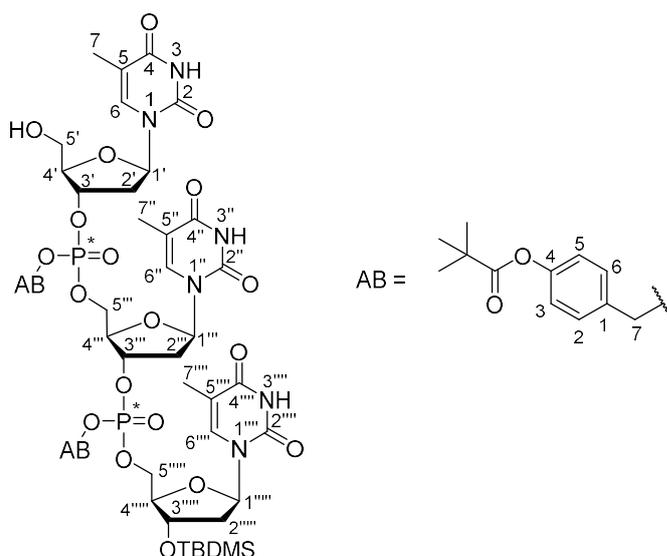
**UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 264$ .

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $\text{C}_{54}\text{H}_{70}\text{N}_6\text{O}_{23}\text{P}_2\text{Si}$  (1260.37)

ber.: 1261.3810 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 1261.3840 [M+H]<sup>+</sup>.

## 7.6.22 Geschütztes Trinucleotid-Prodrug **44b**



Die Synthese der Verbindung **44b** erfolgte gemäß AAV 5 (7.5.5). Es wurden 43.1 mg (25.9  $\mu\text{mol}$ ) Phosphat **25b**, 1.0 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und 7.0 mg (40.0  $\mu\text{mol}$ ) TCA eingesetzt.

**Ausbeute (44b):** 32.9 mg (24.6  $\mu\text{mol}$ , 95%) eines farblosen Feststoffes als ein Gemisch aus vier Diastereomeren (d.r. ~1:1:1:1).

**DC:**  $R_f = 0.13$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH 20:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 11.35, 11.33, 11.32, (s, 4x 3H, NH), 7.68-7.65 (m, 2x 3H, 6-H, 6''-H, 6'''-H), 7.52-7.47 (m, 2x 3H, 6-H, 6''-H, 6'''-H), 7.47-7.41 (m, 4x 4H, AB-3-H, AB-5-H), 7.13-7.05 (m, 4x 4H, AB-2-H, AB-6-H), 6.23-6.14 (m, 4x 3H, 1'-H, 1''-H, 1'''-H), 5.26 (s, 4x 1H, OH), 5.15-5.06 (m, 4x 4H, AB-7-H), 5.05-4.93 (m, 4x 2H, 3'-H, 3''-H), 4.40-4.35 (m, 4x 1H, 3''''-H), 4.31-4.11 (m, 4x 5H, 5''-H, 5'''-H, 4''-H), 4.07-4.00 (m, 4x 1H, 4'-H), 3.94-3.89 (m, 4x 1H, 4''''-H), 3.62-3.51 (m, 4x 2H, 5'-H), 2.40-2.23 (m, 4x 4H, 2'-H, 2''-H), 2.23-2.15 (m, 4x 1H, 2''''-H<sub>a</sub>), 2.09-2.01 (m, 4x 1H, 2''''-H<sub>b</sub>), 1.81-1.69 (m, 4x 9H, 7-H, 7''-H, 7'''-H), 1.31-1.25 (m, 4x 18H, AB-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.88-0.81 (m, 4x 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.08-0.03 (m, 4x 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 176.33 (AB-CH<sub>3</sub>(C=O)), 163.67, 163.62 (m, C-4, C-4'', C-4'''), 150.91 150.86 (AB-C-4), 150.46, 150.37 (C-2,

C-2", C-2'''), 135.89, 135.76 (C-6, C-6", C-6'''), 133.30 (AB-C-1), 133.30, 133.25, 133.15 (AB-C-1), 129.38, 129.34, 129.27 (AB-C-2, AB-C-6), 121.86 (AB-C-3, AB-C-5), 110.12, 110.08, 109.88, 109.80, 109.75 (C-5, C-5", C-5'''), 85.17 (C-4'), 85.13 (C-4'), 84.25 (C-4'''), 84.20 (C-4'''), 84.11, 84.04, 83.54 (C-1', C-1'', C-1'''), 82.29 (C-4'''), 82.25 (C-4'''), 79.21 (C-3'''), 78.73 (C-3'), 78.61 (C-3'), 77.04 (C-3'''), 76.91 (C-3'''), 68.68-68.33 (m, AB-CH<sub>2</sub>), 66.86 (C-5'''), 66.52 (C-5'''), 60.95 (C-5'), 38.71 (C-2'''), 38.69 (C-2'''), 38.55 (C-2'''), 37.44 (C-2'), 37.42 (C-2'), 36.66-36.41 (m, C-2'''), 26.74 (AB-CH<sub>3</sub>), 26.72 (AB-CH<sub>3</sub>), 25.61 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.61 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 12.30, 12.11, 12.10, 12.05 (C-7, C-7", C-7'''), -4.88 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -4.90 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), -5.00 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = -1.78, -1.85, -1.98, -2.02, -2.04, -2.06.

**Schmelzpunkt:** T<sub>m</sub> = 109 °C.

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2956, 1655, 1253, 1197, 997, 829, 777, 490.

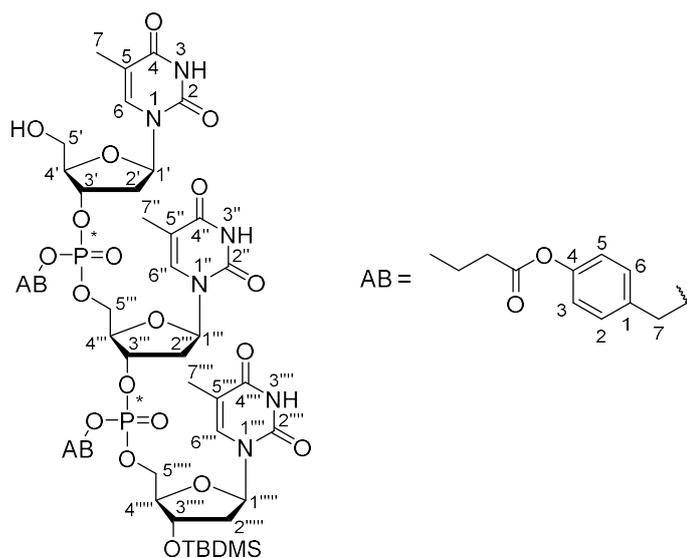
**UV/Vis (MeOH):** λ<sub>max</sub> = 263.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** C<sub>60</sub>H<sub>82</sub>N<sub>6</sub>O<sub>23</sub>P<sub>2</sub>Si (1344.47)

ber.: 1345.4749 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 1345.4782 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.6.23 Geschütztes Trinucleotid-Prodrug 44c



**44c**

Die Synthese der Verbindung **44c** erfolgte gemäß AAV 5 (7.5.5). Es wurden 39.0 mg (24.1  $\mu\text{mol}$ ) Phosphat **25c**, 1.0 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und 6.0 mg (36  $\mu\text{mol}$ ) TCA eingesetzt.

**Ausbeute (44c):** 22.2 mg (17.1  $\mu\text{mol}$ , 71%) eines farblosen Feststoffes als ein Gemisch aus vier Diastereomeren (d.r.  $\sim 1:1:1:1$ ).

**DC:**  $R_f = 0.19$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  20:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 11.37 (s, 2x 1H, NH), 11.36 (s, 2x 1H, NH), 11.34 (s, 2x 1H, NH), 11.33 (s, 2x 1H, NH), 11.32 (s, 2x 1H, NH), 11.31 (s, 2x 1H, NH), 7.68-7.64 (m, 2x 3H, 6-H, 6''-H, 6'''-H), 7.50-7.46 (m, 2x 3H, 6-H, 6''-H, 6'''-H), 7.46-7.41 (m, 4x 4H, AB-3-H, AB-5-H), 7.16-7.09 (m, 4x 4H, AB-2-H, AB-6-H), 6.22-6.14 (m, 4x 3H, 1'-H, 1''-H, 1'''-H), 5.25-5.19 (m, 4x 1H, OH), 5.14-5.04 (m, 4x 4H, AB-7-H), 5.03-4.91 (m, 4x 2H, 3'-H, 3''-H), 4.41-4.35 (m, 4x 1H, 3''''-H), 4.30-4.11 (m, 4x 5H, 5'''-H, 5''''-H, 4'''-H), 4.06-4.04 (m, 4x 1H, 4'-H), 3.94-3.89 (m, 4x 1H, 4''''-H), 3.61-3.51 (m, 4x 2H, 5'-H), 2.58-2.51 (m, 4x 4H, AB- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$ ), 2.41-2.24 (m, 4x 4H, 2'-H, 2''-H), 2.23-2.15 (m, 4x 1H, 2''''-H<sub>a</sub>), 2.10-2.02 (m, 4x 1H, 2''''-H<sub>b</sub>), 1.81-1.71 (m, 4x 9H, 7-H, 7'''-H, 7''''-H), 1.69-1.59 (m, 4x 4H, AB- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$ ), 0.99-0.92 (m, 4x 6H, AB- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$ ), 0.86, 0.85, 0.85, 0.84, 0.84 (4x 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.07, 0.07, 0.06, 0.06, 0.06, 0.05, 0.05, 0.05 (4x 6H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\text{CH}_3)_2$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 171.69, 163.67, 150.68, 150.46, 135.90, 135.77, 135.76, 129.32, 212.99, 109.91, 109.81, 109.77, 85.19, 84.10, 83.55, 71.64, 68.47, 60.96, 60.94, 60.93, 54.94, 37.27, 25.62, 17.68, 17.64, 17.62, 13.39, 12.30, 12.10, 12.09, 12.07, 12.04, -4.85, -4.87, -4.97, -5.00.

Eine genaue Zuordnung wurde nicht vorgenommen.

**$^{31}\text{P-NMR}$**  (203 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = -1.81, -1.86, -1.90, -1.98, -2.02.

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 98$  °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3178, 3054, 2956, 2930, 1751, 1685, 1274, 1006, 836, 419.

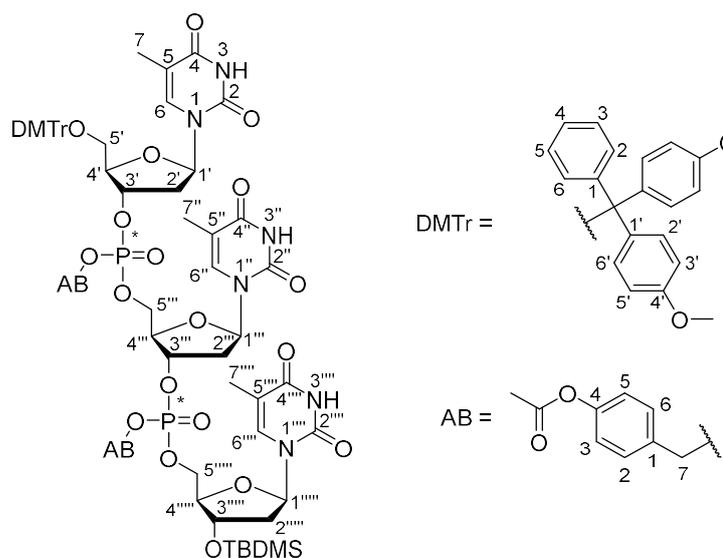
**UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 205, 265$ .

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $\text{C}_{58}\text{H}_{78}\text{N}_6\text{O}_{23}\text{P}_2\text{Si}$  (1316.44)

ber.: 1317.4436 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 1317.4432 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.6.24 Geschütztes Trinucleotid-Prodrug **25a**



Die Synthese der Verbindung **25a** erfolgte gemäß AAV 6 (7.5.6). Es wurden 258 mg (~300  $\mu\text{mol}$ ) Amidit **22a** (Menge bestimmt laut  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum), 13 mL MeCN, 36.4 mg (308  $\mu\text{mol}$ ) DCI, 250 mg (308  $\mu\text{mol}$ ) Phosphat **26a** in 2 mL MeCN und 110  $\mu\text{L}$  (614  $\mu\text{mol}$ , 5.5 M) *t*-BuOOH-Lösung eingesetzt.

**Ausbeute (25a):** 120 mg (76.8  $\mu\text{mol}$ , 25%) eines farblosen Feststoffes als ein Gemisch aus vier Diastereomeren (d.r. ~1:1:1:1).

**DC:**  $R_f = 0.20$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH 20:1).

**$^1\text{H}$ -NMR** (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 11.39, 11.37, 11.33 (s, 4x 3H, NH), 7.48-7.19 (m, 4x 16H, 6-H, 6''-H, 6'''-H, AB-3-H, AB-5-H, DMTr-2-H, DMTr-3-H, DMTr-4-H, DMTr-5-H, DMTr-6-H, DMTr-2'-H, DMTr-6'-H), 7.15-7.03 (m, 4x 4H, AB-2-H, AB-6-H), 6.91-6.81 (m, 4x 4H, DMTr-3'-H, DMTr-5'-H), 6.22-6.12 (m, 4x 3H, 1'-H, 1''-H, 1'''-H), 5.12-4.87 (m, 4x 6H, AB-7-H, 3'-H, 3''-H), 4.40-4.35 (m, 4x 1H, 3''''-H), 4.26-4.08 (m, 4x 6H, 4'-H, 4''-H, 5'-H, 5''-H), 3.95-3.89 (m, 4x 1H, 4''''-H), 3.71, 3.70, 3.70 (s, 4x 6H, DMTr-OCH<sub>3</sub>), 3.27-3.15 (m, 4x 2H, 5'-H), 2.47-2.04 (m, 4x 12H, 2'-H, 2''-H, 2'''-H, AB-CH<sub>3</sub>), 1.78-1.67 (m, 2x 9H, 7-H, 7''-H, 7'''-H), 1.45-1.40 (m, 2x 9H, 7-H, 7''-H, 7'''-H), 0.83 (s, 2x 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.83 (s, 2x 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.05, 0.05, 0.04, 0.04 (s, 4x 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**$^{31}\text{P}$ -NMR** (162 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = -1.80, -1.82, -1.97, -1.99.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3178, 3048, 2953, 2930, 1684, 1250, 1195, 1001, 830, 417.

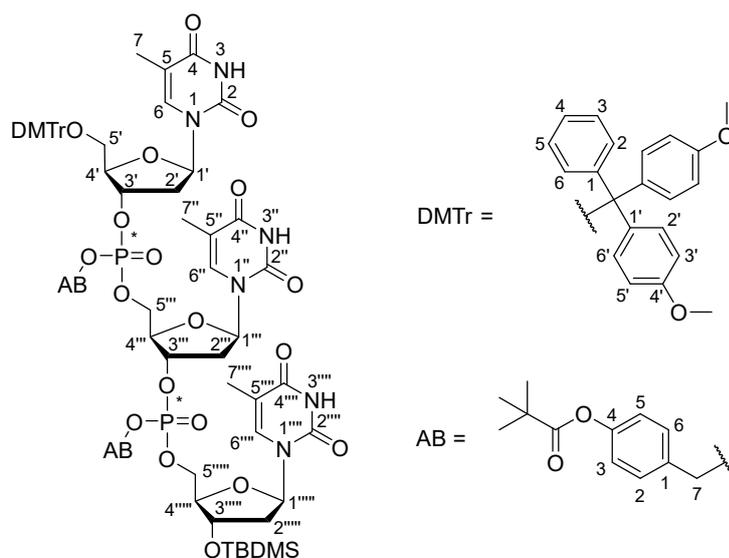
**UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  = 206, 265.

**HRMS** (ESI $^+$ ):  $\text{C}_{75}\text{H}_{88}\text{N}_6\text{O}_{25}\text{P}_2\text{Si}$  (1562.50)

ber.: 1563.5116 [M+H] $^+$ ,

gef.: 1563.5093 [M+H] $^+$ .

### 7.6.25 Geschütztes Trinucleotid-Prodrug **25b**



**25b**

Die Synthese der Verbindung **25b** erfolgte gemäß AAV 6 (7.5.6). Es wurden 29.0 mg ( $\sim 33 \mu\text{mol}$ ) Amidit **22b** (Menge bestimmt laut  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum), 1 mL MeCN, 4.2 mg ( $33 \mu\text{mol}$ ) DCI, 28.0 mg ( $32.5 \mu\text{mol}$ ) Phosphat **26b** in 0.5 mL MeCN und 12  $\mu\text{L}$  ( $65 \mu\text{mol}$ , 5.5 M) *t*-BuOOH-Lösung eingesetzt.

**Ausbeute (25b):** 40.7 mg ( $24.7 \mu\text{mol}$ , 76%) eines farblosen Feststoffes als ein Gemisch aus vier Diastereomeren (d.r.  $\sim 1:1:1:1$ ).

**DC:**  $R_f$  = 0.12 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH 20:1).

**$^1\text{H}$ -NMR** (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 11.38, 11.36, 11.32, 11.32 (s, 4x 3H, NH), 7.50-7.00 (m, 4x 20H, 6-H, 6''-H, 6'''-H, AB-2-H, AB-3-H, AB-5-H, AB-6-H, DMTr-2-H, DMTr-3-H, DMTr-4-H, DMTr-5-H, DMTr-6-H, DMTr-2'-H, DMTr-6'-H), 6.91-6.83 (m, 4x 4H, DMTr-3'-H, DMTr-5'-H), 6.24-6.12 (m, 4x 3H, 1'-H, 1''-H, 1'''-H), 5.15-4.96 (m, 4x 6H, AB-7-H, 3'-H, 3''-H), 4.41-4.39 (m,

4x 1H, 3''''-H), 4.29-4.08 (m, 4x 6H, 4'-H, 4'''-H, 5'''-H, 5''''-H), 3.95-3.89 (m, 4x 1H, 4''''-H), 3.71 (s, 4x 6H, DMTr-OCH<sub>3</sub>), 3.27-3.15 (m, 4x 2H, 5'-H), 2.08-2.00 (m, 2x 6H, 2'-H, 2'''-H, 2''''-H), 2.47-2.15 (m, 2x 6H, 2'-H, 2'''-H, 2''''-H), 1.80-1.67 (m, 2x 9H, 7-H, 7'''-H, 7''''-H), 1.44-1.39 (m, 2x 9H, 7-H, 7'''-H, 7''''-H), 1.28 (s, 2x 18H, AB-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.28 (s, 2x 18H, AB-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.84 (s, 4x 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.05 (m, 2x 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.05 (m, 2x 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

<sup>31</sup>P-NMR (162 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = -1.77, -1.82, -1.97, -2.00.

IR (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3165, 2944, 2921, 1688, 1250, 1200, 1003, 832, 653, 417.

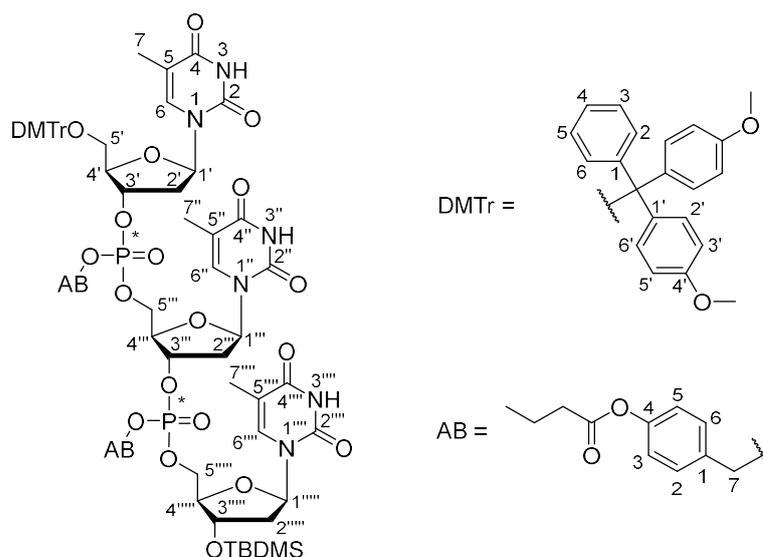
UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\max}$  = 211, 265.

HRMS (ESI<sup>+</sup>): C<sub>81</sub>H<sub>100</sub>N<sub>6</sub>O<sub>25</sub>P<sub>2</sub>Si (1646.60)

ber.: 1647.6055 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 1647.6059 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.6.26 Geschütztes Trinucleotid-Prodrug 25c



**25c**

Die Synthese der Verbindung **25c** erfolgte gemäß AAV 6 (7.5.6). Es wurden 52.6 mg (60.7  $\mu$ mol) Amidit **22c** (Menge bestimmt laut <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum), 1 mL MeCN, 7.0 mg (61  $\mu$ mol) DCI, 51.0 mg (60.7  $\mu$ mol) Phosphat **26c** in 0.5 mL MeCN und 22.0  $\mu$ L (122  $\mu$ mol, 5.5 M) *t*-BuOOH-Lösung eingesetzt.

**Ausbeute (25c):** 46.3 mg (28.5  $\mu$ mol, 47%) eines farblosen Feststoffes als ein Gemisch aus vier Diastereomeren (d.r. ~1:1:1:1).



**HPLC** (Reinigung):  $t_R = 5.8$  min (**20e**), 15.9 min (**20a**) (Methode 3, Injektionskonzentration: 50.0 mg in H<sub>2</sub>O:MeCN 95:5 (300  $\mu$ L)).

**Ausbeute (20a)**: 30 mg (44  $\mu$ mol, 30%) eines farblosen Feststoffes als ein Gemisch aus zwei Diastereomeren (d.r.~1:1).

**Ausbeute (20e)**: 11 mg (20  $\mu$ mol, 14%) eines farblosen Feststoffes.

**HPLC** (Diastereomerentrennung):  $t_R = 38.4$  min (**20afast**) und 44.5 min (**20aslow**) (Methode 6, Injektionskonzentration: 30 mg in H<sub>2</sub>O:MeCN 95:5 (200  $\mu$ L)).

**Ausbeute (20afast)**: 1.3 mg (1.9  $\mu$ mol, 1.3%) eines farblosen Feststoffes.

**Ausbeute (20aslow)**: 1.7 mg (2.5  $\mu$ mol, 1.7%) eines farblosen Feststoffes.

**20afast:**

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 11.32 (s, 2H, NH), 7.65 (d,  $J = 1.0$  Hz, 1H, 6-H), 7.47 (d,  $J = 1.0$  Hz, 1H, 6''-H), 7.46-7.43 (m, 2H, AB-3-H, AB-5-H), 7.15-7.12 (m, 2H, AB-2-H, AB-6-H), 6.22-6.15 (m, 2H, 1'-H, 1'''-H), 5.50-5.41 (m, 1H, 5'-OH), 5.28-5.19 (m, 1H, 3'''-OH), 5.12-5.06 (m, 2H, AB-CH<sub>2</sub>), 4.98-4.92 (m, 1H, 3'-H), 4.26-4.13 (m, 3H, 3'''-H, 5'''-H), 4.06-4.03 (m, 1H, 4'-H), 3.94-3.90 (m, 1H, 4'''-H), 3.62-3.52 (m, 2H, 5'-H), 2.31-2.19, 2.14-2.05 (m, 7H, 2'-H, 2'''-H, AB-CH<sub>3</sub>), 1.77 (d,  $J = 0.78$  Hz, 3H, 7-H), 1.75 (d,  $J = 0.78$  Hz, 3H, 7''-H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 169.15 (AB-CH<sub>3</sub>(CO)), 163.79 (C-4, C-4''), 150.55 (AB-C-4, C-2, C-2''), 135.81 (C-6''), 135.76 (C-6), 133.35 (d,  $J = 6.8$  Hz, AB-C-1), 129.33 (AB-C-2, AB-C-6), 121.99 (AB-C-3, AB-C-5), 109.88 (C-5), 109.74, (C-5''), 85.14 (d,  $J = 5.7$  Hz, C-4'), 84.22 (d,  $J = 7.3$  Hz, C-4'''), 83.87, 83.48 (C-1', C-1'''), 78.43 (d,  $J = 5.2$  Hz, C-3'), 69.96 (C-3'''), 68.34 (d,  $J = 5.0$  Hz, AB-CH<sub>2</sub>), 67.39 (d,  $J = 5.2$  Hz, C-5'''), 60.93 (C-5'), 38.55, 37.39 (C-2', C-2'''), 20.85 (AB-CH<sub>3</sub>), 12.32, 12.09 (C-7, C-7'').

**<sup>31</sup>P-NMR** (203 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = -1.88.

**Drehwert**:  $[\alpha]^{20}_D = 9.2$  (c = 1.4, H<sub>2</sub>O).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3350, 2918, 2850, 1667, 1590, 1345, 1008, 831.

**UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{\max} = 266$ .

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>29</sub>H<sub>35</sub>N<sub>4</sub>O<sub>14</sub>P (694.19)

ber.: 695.1960 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 695.1947 [M+H]<sup>+</sup>.

**20as/low:**

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 11.32 (s, 2H, NH), 7.65 (d,  $J = 1.0$  Hz, 1H, 6-H), 7.48 (d,  $J = 1.0$  Hz, 1H, 6''-H), 7.47-7.43 (m, 2H, AB-3-H, AB-5-H), 7.17-7.13 (m, 2H, AB-2-H, AB-6-H), 6.22-6.16 (m, 2H, 1'-H, 1'''-H), 5.50-5.40 (m, 1H, 5'-OH), 5.29-5.16 (m, 1H, 3'''-OH), 5.12-5.07 (m, 2H, AB-CH<sub>2</sub>), 4.95 (t,  $J = 5.9$  Hz, 1H, 3'-H), 4.26-4.14 (m, 3H, 3'''-H, 5'''-H), 4.05-4.01 (m, 1H, 4'-H), 3.95-3.90 (m, 1H, 4'''-H), 3.60-3.52 (m, 2H, 5'-H), 2.34-2.05, (m, 7H, 2'-H, 2'''-H, AB-CH<sub>3</sub>), 1.79-1.72 (m, 6H, 7-H, 7''-H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 169.16 (AB-CH<sub>3</sub>(CO)), 163.77 (C-4, C-4''), 150.54 (AB-C-4, C-2, C-2''), 135.76 (C-6, C-6''), 133.35 (d,  $J = 6.8$  Hz, AB-C1), 129.28 (AB-C-2, AB-C-6), 121.99 (AB-C-3, AB-C-5), 109.87, 109.76 (C-5, C-5''), 85.15 (d,  $J = 5.6$  Hz, C-4'), 84.22 (d,  $J = 7.1$  Hz, C-4'''), 83.90, 83.54 (C-1', C-1'''), 78.57 (d,  $J = 5.2$  Hz, C-3'), 69.95 (C-3'''), 68.31 (d,  $J = 5.4$  Hz, AB-CH<sub>2</sub>), 67.39 (d,  $J = 5.4$  Hz, C-5'''), 60.94 (C-5'), 38.60, 37.40 (C-2', C-2'''), 20.86 (AB-CH<sub>3</sub>), 12.31, 12.07 (C-7, C-7'').

**<sup>31</sup>P-NMR** (203 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = -1.89.

**Drehwert:**  $[\alpha]^{20}_D = 12.4$  (c = 0.33, H<sub>2</sub>O).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3362, 2919, 2850, 1665, 1592, 1351, 1003, 697.

**UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{\max} = 266$ .

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>29</sub>H<sub>35</sub>N<sub>4</sub>O<sub>14</sub>P (694.19)

ber.: 695.1960 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 695.1950 [M+H]<sup>+</sup>.

**20e:**

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 11.35 (s, 1H, NH), 11.31 (s, 1H, NH), 7.68 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H, 6-H), 7.60 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H, 6-H), 6.22-6.16 (m, 2H, 1'-H, 1'''-H), 4.95 (t,  $J = 6.3$  Hz, 1H, 3'-H), 4.26-4.22 (m, 1H, 3'''-H), 4.12-4.00 (m, 3H, 4'-H, 5'''-H), 3.93-3.89 (m, 1H, 4'''-H), 3.60-3.57 (m, 2H, 5'-H), 2.35-2.29, 2.28-2.20 (m, 2H, 2'-H), 2.16-2.05 (m, 2H, 2'''-H), 1.78 (d,  $J = 1.2$  Hz, 3H, 7-H), 1.77 (d,  $J = 1.2$  Hz, 3H, 7''-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 163.69, 163.66 (C-4, C-4''), 150.54, 150.53 (C-2, C-2''), 135.79 (C-6, C-6''), 109.84, 109.68 (C-5, C-5''), 85.47 (d,  $J = 5.7$  Hz, C-4'), 84.64 (d,  $J = 7.8$  Hz, C-4'''), 83.82, 83.60 (C-1', C-1'''), 77.04 (d,  $J = 5.1$  Hz, C-3'), 70.23 (C-3'''), 66.21, 66.19 (C-5'''), 61.08 (C-5'), 38.84 (C-2'''), 37.68 (C-2'), 12.28, 12.07 (C-7, C-7'').

**$^{31}\text{P-NMR}$**  (203 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = -2.14.

**Drehwert:**  $[\alpha]^{20}_D = 15.2$  ( $c = 0.98$ , MeOH).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 90$  °C.

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3004, 2763, 1682, 1273, 1000, 763, 486, 419.

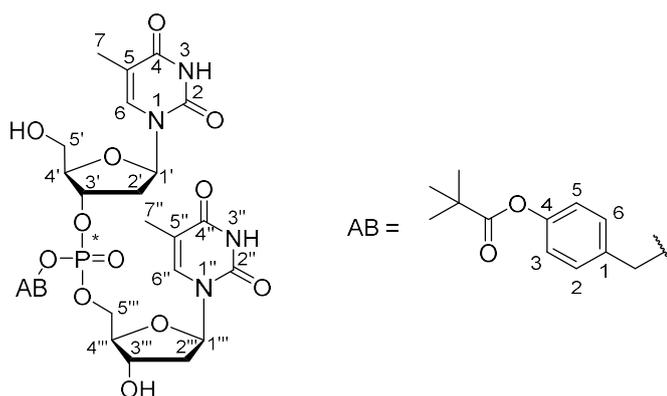
**UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 264$ .

**HRMS (ESI $^+$ ):**  $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{P}$  (546.14)

ber.: 547.1436 [M+H] $^+$ ,

gef.: 547.1430 [M+H] $^+$ .

### 7.6.28 Dinucleotid-Prodrug **20b**



**20b**

Die Synthese der Verbindung **20b** erfolgte gemäß AAV 7 (7.5.7). Es wurden 20.0 mg (23.2  $\mu\text{mol}$ ) Dinucleotid **26b**, 1 mL MeOH und 16  $\mu\text{L}$  (12  $\mu\text{mol}$ ) Acetylchlorid in MeOH eingesetzt. Die Reaktion wurde 10 h gerührt.

**HPLC** (Reinigung):  $t_R = 16.2$  min (Methode 10, Injektionskonzentration: 17.1 mg in  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$  95:5 (250  $\mu\text{L}$ )).

**Ausbeute (20b):** 4.8 mg (6.5  $\mu\text{mol}$ , 28%) eines farblosen Feststoffes als ein Gemisch aus zwei Diastereomeren (d.r.~1:1).

**HPLC** (Diastereomerentrennung):  $t_R = 21.3$  min (**20bfast**) und 23.9 min (**20bslow**) (Methode 5, Injektionskonzentration: 4.8 mg in H<sub>2</sub>O:MeCN 95:5 (150  $\mu$ L)).

**Ausbeute (20bfast)**: 2.2 mg (3.0  $\mu$ mol, 13%) eines farblosen Feststoffes.

**Ausbeute (20bslow)**: 1.6 mg (2.2  $\mu$ mol, 10%) eines farblosen Feststoffes.

**20bfast:**

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 11.21 (s, 2H, NH), 7.65, 7.47 (s, 2H, 6-H, 6''-H), 7.47-7.43 (m, 2H, AB-3-H, AB-5-H) 7.13-7.08 (m, 2H, AB-2-H, AB-6-H), 6.23-6.15 (m, 2H, 1'-H, 1''-H), 5.52-5.42 (m, 1H, 5'-OH), 5.29-5.18 (m, 1H, 3'''-OH), 5.13-5.06 (m, 2H, AB-CH<sub>2</sub>), 4.98-4.92 (m, 1H, 3'-H), 4.26-4.12 (m, 3H, 3'''-H, 5'''-H), 4.06-4.01 (m, 1H, 4'-H), 3.95-3.89 (m, 1H, 4'''-H), 3.61-3.52 (m, 2H, 5'-H), 2.30-2.21 (m, 2H, 2'-H), 2.17-2.05 (m, 2H, 2'''-H), 1.79-1.72 (m, 6H, 7-H, 7''-H), 1.29 (s, 9H, AB-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 176.34 (AB-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C(CO)), 163.79 (C-4, C-4''), 150.85 (AB-C-4), 150.55, 150.51 (C-2, C-2''), 135.83, 135.78 (C-6, C-6''), 133.35 (d,  $J = 6.5$  Hz, AB-C-1), 129.35 (AB-C-2, AB-C-6), 121.87 (AB-C-3, AB-C-5), 109.88, 109.73 (C-5, C-5''), 85.17, 85.13 (C-4', C-4'''), 84.25, 84.20 (C-1', C-1'''), 78.44 (d,  $J = 5.0$  Hz, C-3'), 69.96 (C-3'''), 68.36 (d,  $J = 5.2$  Hz, AB-CH<sub>2</sub>), 67.38 (d,  $J = 5.6$  Hz, C-5'''), 60.93 (C-5'), 38.55 (C-2'''), 38.49 (AB-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C(CO)), 37.35 (C-2'), 26.75 (AB-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C(CO)), 12.32, 12.10, (C-7, C-7'').

**<sup>31</sup>P-NMR** (203 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = -2.10.

**Drehwert**:  $[\alpha]^{20}_D = 15.0$  ( $c = 0.18$ , H<sub>2</sub>O).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3407, 3177, 3071, 2930, 1681, 1469, 1273, 1108, 1003, 766.

**UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{max} = 266$ .

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>32</sub>H<sub>41</sub>N<sub>4</sub>O<sub>14</sub>P (736.24)

ber.: 737.2430 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 737.2401 [M+H]<sup>+</sup>.

**20bslow:**

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 11.32 (s, 2H, NH), 7.66-7.63, 7.49-7.46 (m, 2H, 6-H, 6''-H), 7.46-7.43 (m, 2H, AB-3-H, AB-5-H) 7.14-7.09 (m, 2H,

AB-2-H, AB-6-H), 6.23-6.15 (m, 2H, 1'-H, 1''-H), 5.59-5.37 (m, 1H, 5'-OH), 5.35-5.17 (m, 1H, 3'''-OH), 5.13-5.06 (m, 2H, AB-CH<sub>2</sub>), 4.97-4.93 (m, 1H, 3'), 4.26-4.13 (m, 3H, 3'''-H, 5'''-H), 4.05-4.00 (m, 1H, 4'-H), 3.94-3.90 (m, 1H, 4'''-H), 3.60-3.51 (m, 2H, 5'-H), 2.34-2.23 (m, 2H, 2'-H), 2.17-2.08 (m, 2'''-H), 1.78-1.71 (m, 6H, 7-H, 7''-H), 1.29 (s, 9H, AB-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 176.36 (AB-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C(CO)), 164.06, 163.96 (C-4,C-4''), 150.84 (AB-C-4), 150.63 (C-2, C-2''), 135.73, 135.68 (C-6, C-6''), 133.36 (d, *J* = 6.9 Hz, AB-C1), 129.29 (AB-C-2, AB-C-6), 121.87 (AB-C-3, AB-C-5), 109.87, 109.75 (C-5, C-5''), 85.14 (d, *J* = 5.7 Hz, C-4'), 84.22 (d, *J* = 7.2 Hz, C-4'''), 83.93, 83.57 (C-1', C-1'''), 78.60 (d, *J* = 5.3 Hz, C-3'), 69.96 (C-3'''), 68.31 (d, *J* = 5.3 Hz, AB-CH<sub>2</sub>), 67.33 (d, *J* = 5.4 Hz, C-5'''), 60.95 (C-5'), 38.65 (C-2'''), 38.57 (AB-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C(CO)), 37.41 (C-2'), 26.75 (AB-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C(CO)).

<sup>31</sup>P-NMR (203 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = -2.12.

**Drehwert:** [ $\alpha$ ]<sup>20</sup><sub>D</sub> = 12.6 (c = 0.15, H<sub>2</sub>O).

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3401, 3189, 2974, 1683, 1273, 1109, 1003, 492.

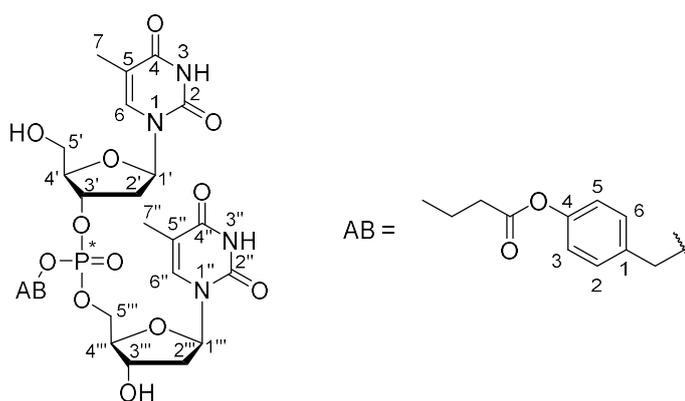
**UV/Vis (MeOH):**  $\lambda_{\max}$  = 266.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** C<sub>32</sub>H<sub>41</sub>N<sub>4</sub>O<sub>14</sub>P (736.24)

ber.: 737.2430 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 737.2410 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.6.29 Dinucleotid-Prodrug 20c



**20c**

Die Synthese der Verbindung **20c** erfolgte gemäß AAV 7 (7.5.7). Es wurden 11.6 mg (13.9  $\mu$ mol) Dinucleotid **26c**, 1 mL MeOH und 10  $\mu$ L (7.0  $\mu$ mol) Acetylchlorid in MeOH eingesetzt. Die Reaktion wurde 3 h gerührt.

**HPLC** (Reinigung):  $t_R = 15.8$  min (Methode 3, Injektionskonzentration: 14.3 mg in H<sub>2</sub>O:MeCN 95:5 (250  $\mu$ L)).

**Ausbeute (20c)**: 3.7 mg (5.0  $\mu$ mol, 36%) eines farblosen Feststoffes als ein Gemisch aus zwei Diastereomeren (d.r.  $\sim$ 1:1).

**HPLC** (Diastereomerentrennung):  $t_R = 25.4$  min (**20cfast**) und 27.9 min (**20cslow**) (Methode 7, Injektionskonzentration: 3.7 mg in H<sub>2</sub>O:MeCN 95:5 (150  $\mu$ L)).

**Ausbeute (20cfast)**: 0.3 mg (0.4  $\mu$ mol, 3%) eines farblosen Feststoffes.

**Ausbeute (20cslow)**: 0.5 mg (0.7  $\mu$ mol, 6%) eines farblosen Feststoffes.

**20cfast:**

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 7.67-7.62 (m, 2H, 6-H), 7.48-7.42 (m, 3H, 6''-H, AB-3-H, AB-5-H), 7.15-7.10 (m, 2H, AB-2-H, AB-6-H), 6.23-6.15 (m, 2H, 1'-H, 1'''-H), 5.14-5.06 (m, 2H, AB-OCH<sub>2</sub>), 4.98-4.92 (m, 1H, 3'-H), 4.27-4.14 (m, 3H, 3'''-H, 5'''-H), 4.06-4.02 (m, 1H, 4'-H), 3.95-3.89 (m, 1H, 4'''-H), 3.62-3.53 (m, 2H, 5'-H), 2.56 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H, AB-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 2.30-2.24 (m, 2H, 2'-H), 2.17-2.05 (m, 2H, 2'''-H), 1.79-1.73 (m, 6H, 7-H, 7''-H), 1.65 (tq,  $J = 7.3$  Hz,  $J = 7.3$  Hz, 2H, AB-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 0.97 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H, AB-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 171.67 (AB-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(C=O)), 164.16 (C-4, C-4''), 150.90, 150.80 (C-2, C-2''), 150.56 (AB-C-4), 135.76, 135.71 (C-6, C-6''), 133.36 (d,  $J = 6.7$  Hz, AB-C-1), 129.38 (AB-C-2, AB-C-6), 122.01 (AB-C-3, AB-C-5), 109.90, 109.76 (C-5, C-5''), 85.14 (d,  $J = 5.4$  Hz, C-4'), 84.21 (d,  $J = 7.6$  Hz, C-4'''), 83.92 (C-1'), 83.61 (C-1'''), 78.50 (d,  $J = 5.4$  Hz, C-3'), 70.00 (C-3'''), 68.38 (d,  $J = 5.4$  Hz, AB-CH<sub>2</sub>O), 67.41 (d,  $J = 5.4$  Hz, C-5'''), 60.97 (C-5'), 38.58 (C-2'''), 37.42 (C-2'), 35.27 (AB-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CO)), 17.86 (AB-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CO)), 13.41 (AB-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CO)), 12.42, 12.18 (C-7, C-7'').

**<sup>31</sup>P-NMR** (202 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = -1.90.

**Drehwert**:  $[\alpha]^{20}_D = 2.7$  (c = 0.23, H<sub>2</sub>O).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3419, 3155, 2972, 1655, 1467, 995, 960, 557.

**UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  = 266.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>31</sub>H<sub>39</sub>N<sub>4</sub>O<sub>14</sub>P (722.20)

ber.: 723.2273 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 723.2250 [M+H]<sup>+</sup>.

**20cslow:**

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 11.29 (s, 2H, NH), 7.64 (s, 1H, 6-H), 7.46-7.43 (m, 3H, 6''-H, AB-3-H, AB-5-H), 7.16-7.11 (m, 2H, AB-2-H, AB-6-H), 6.22-6.16 (m, 2H, 1'-H, 1'''-H), 5.12-5.07 (m, 2H, AB-CH<sub>2</sub>O-), 4.97-4.93 (m, 1H, 3'-H), 4.26-4.15 (m, 3H, 3'''-H, 5'''-H), 4.05-4.00 (m, 1H, 4'-H), 3.95-3.90 (m, 1H, 4'''-H), 3.59-3.52 (m, 2H, 5'-H), 2.56 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H, AB-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CO)), 2.35-2.24 (m, 2H, 2'-H), 2.16-2.06 (m, 2H, 2'''-H), 1.79-1.73 (m, 6H, 7-H, 7''-H), 1.65 (tq,  $J$  = 7.3 Hz,  $J$  = 7.3 Hz, 2H, AB-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CO)), 0.97 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 3H, AB-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CO)).

**<sup>13</sup>C-NMR** (176 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 171.62 (AB-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CO)), 164.05 (C-4, C-4''), 150.70 (C-2, C-2''), 150.52 (AB-C-4), 135.69, 135.64 (C-6, C-6''), 133.34 (d,  $J$  = 6.7 Hz, AB-C-1), 129.28 (AB-C-2, AB-C-6), 121.97 (AB-C-3, AB-C-5), 109.85, 109.73 (C-5, C-5''), 85.12 (d,  $J$  = 5.4 Hz, C-4'), 84.20 (d,  $J$  = 7.3 Hz, C-4'''), 83.93 (C-1'), 83.60 (C-1'''), 78.59 (d,  $J$  = 5.1 Hz, C-3'), 69.96 (C-3'''), 68.31 (d,  $J$  = 5.1 Hz, AB-CH<sub>2</sub>O), 67.33 (d,  $J$  = 5.5 Hz, C-5'''), 60.95 (C-5'), 38.60 (C-2'''), 37.40 (d,  $J$  = 3.2 Hz, C-2'), 35.26 (AB-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CO)), 17.83 (AB-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CO)), 13.37 (AB-CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>(CO)), 12.36, 12.10, (C-7, C-7'').

**<sup>31</sup>P-NMR** (202 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = -1.91.

**Drehwert:**  $[\alpha]^{20}_D$  = 2.0 (c = 0.15, H<sub>2</sub>O).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3368, 3059, 2963, 1665, 1354, 1202, 1000, 493.

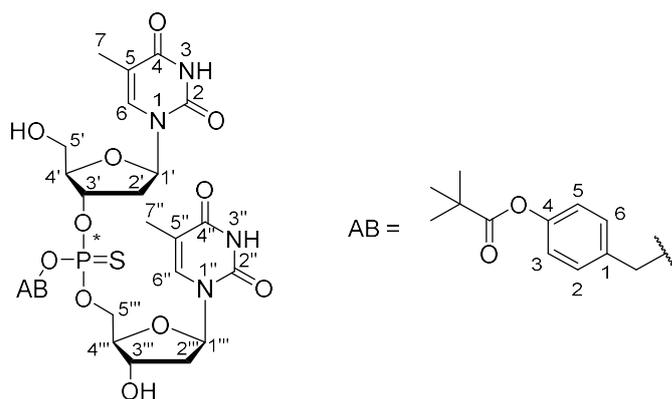
**UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  = 266.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>31</sub>H<sub>39</sub>N<sub>4</sub>O<sub>14</sub>P (722.20)

ber.: 723.2273 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 723.2248 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.6.30 Dinucleotid-Phosphorothioat-Prodrug 20d



**20d**

Die Synthese der Verbindung **20d** erfolgte gemäß AAV 7 (7.5.7). Es wurden 494 mg (570  $\mu\text{mol}$ ) Dinucleotid **26d**, 10 mL MeOH und 380  $\mu\text{L}$  (285  $\mu\text{mol}$ ) Acetylchlorid in MeOH eingesetzt. Die Reaktion wurde 5 h gerührt. Die Zielverbindung wurde durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel erhalten ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH 10:1).

**Ausbeute (20d):** 250 mg (330  $\mu\text{mol}$ , 58%) eines farblosen Feststoffes.

**DC:**  $R_f = 0.36$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH = 10:1).

**HPLC** (Diastereomerentrennung):  $t_R = 26.8$  min (**20dfast**) und 32.8 min (**20dslow**) (Methode 8, Injektionskonzentration: 210 mg in  $\text{H}_2\text{O}$ :MeCN 1:1 (2.4 mL)).

**Ausbeute (20dfast):** 76.3 mg (101  $\mu\text{mol}$ , 23%) eines farblosen Feststoffes.

**Ausbeute (20dslow):** 69.8 mg (92.8  $\mu\text{mol}$ , 21%) eines farblosen Feststoffes.

#### **20dfast:**

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 11.33 (s, 1H, NH), 11.31 (s, 1H, NH), 7.67 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H, 6-H), 7.47-7.43 (m, 3H, 6''-H, AB-3-H, AB-5-H), 7.12-7.08 (m, 2H, AB-2-H, AB-6-H), 6.22-6.14 (m, 2H, 1'-H, 1''-H), 5.44 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1H, 3'''-OH), 5.24 (t,  $J = 5.2$  Hz, 1H, 5'-OH), 5.16-5.11 (m, 2H, AB-CH<sub>2</sub>), 5.09-5.05 (m, 1H, 3'), 4.28-4.16 (m, 3H, 3'''-H, 5'''-H), 4.06 (dd,  $J = 5.2$  Hz,  $J = 3.4$  Hz, 1H, 4'-H), 3.95 (dd,  $J = 8.5$  Hz,  $J = 3.7$  Hz, 1H, 4'''-H),

3.62-3.54 (m, 2H, 5'-H), 2.30-2.18 (m, 2H, 2'-H), 2.15-2.06 (m, 2'''-H), 1.76 (d,  $J = 1.1$  Hz, 3H, 7-H), 1.77 (d,  $J = 1.1$  Hz, 3H, 7''-H), 1.29 (s, 9H, AB-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 176.30 (AB-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C(CO)), 163.65, 163.64 (C-4, C-4''), 150.88 (AB-C-4), 150.43, 150.40 (C-2, C-2''), 135.76, 135.73 (C-6, C-6''), 133.05 (d,  $J = 7.6$  Hz, AB-C-1), 129.44 (AB-C-2, AB-C-6), 121.87 (AB-C-3, AB-C-5), 109.87, 109.72 (C-5, C-5''), 85.06 (d,  $J = 5.5$  Hz, C-4'), 84.10 (d,  $J = 8.6$  Hz, C-4'''), 83.90 (C-1'''), 83.64 (C-1'), 79.52 (d,  $J = 4.9$  Hz, C-3'), 70.09 (C-3'''), 69.02 (d,  $J = 4.9$  Hz, AB-CH<sub>2</sub>), 67.92 (d,  $J = 5.8$  Hz, C-5'''), 60.98 (C-5'), 38.62 (C-2'''), 38.52 (AB-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C(CO)), 37.29 (d,  $J = 4.0$  Hz, C-2'), 26.72 (AB-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C(CO)), 12.28, 12.12 (C-7, C-7'').

**<sup>31</sup>P-NMR** (203 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 66.68.

**Drehwert:**  $[\alpha]^{20}_D = 8.0$  (c = 1.3, MeOH).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 116^\circ\text{C}$ .

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3180, 2972, 2930, 1685, 1468, 1275, 1111, 831, 559, 416.

**UV/Vis** (H<sub>2</sub>O/MeCN 60/40):  $\lambda_{\text{max}} = 217, 266$ .

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>32</sub>H<sub>41</sub>N<sub>4</sub>O<sub>13</sub>PS (752.21)

ber.: 753.2201 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 753.2195 [M+H]<sup>+</sup>.

#### **20ds/low:**

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 11.33 (s, 1H, NH), 11.30 (s, 1H, NH), 7.67 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H, 6-H), 7.47-7.43 (m, 3H, 6''-H, AB-3-H, AB-5-H), 7.13-7.10 (m, 2H, AB-2-H, AB-6-H), 6.22-6.16 (m, 2H, 1'-H, 1''-H), 5.44 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1H, 3'''-OH), 5.23 (t,  $J = 5.1$  Hz, 1H, 5'-OH), 5.17-5.12 (m, 2H, AB-CH<sub>2</sub>), 5.10-5.05 (m, 1H, 3'-H), 4.29-4.16 (m, 3H, 3'''-H, 5'''-H), 4.03 (dd,  $J = 5.1$  Hz,  $J = 3.5$  Hz, 1H, 4'-H), 3.95 (dd,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 4.1$  Hz, 1H, 4'''-H), 3.62-3.53 (m, 2H, 5'-H), 2.33-2.23 (m, 2H, 2'-H), 2.17-2.06 (m, 2H, 2'''-H), 1.75 (d,  $J = 1.1$  Hz, 3H, 7''-H), 1.77 (d,  $J = 1.1$  Hz, 3H, 7-H), 1.29 (s, 9H, AB-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 176.31 (AB-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C(CO)), 163.63 (C-4, C-4''), 150.86 (AB-C-4), 150.43, 150.38 (C-2, C-2''), 135.71, 135.67 (C-6, C-6''), 133.04 (d,  $J = 7.7$  Hz, AB-C-1), 129.35 (AB-C-2, AB-C-6), 121.86 (AB-C-3, AB-C-5), 109.85, 109.75 (C-5, C-5''), 85.06 (d,  $J = 5.7$  Hz, C-4'), 84.10 (d,  $J = 8.5$  Hz, C-4'''), 83.92 (C-1'''), 83.61 (C-1'), 78.66 (d,  $J = 5.0$  Hz, C-3'), 70.05 (C-3'''), 68.91 (d,  $J = 4.8$  Hz, AB-CH<sub>2</sub>), 67.91 (d,  $J = 5.7$  Hz, C-5'''), 60.98 (C-5'), 38.71 (C-2'''), 38.54 (AB-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C(CO)), 37.38 (d,  $J = 3.7$  Hz, C-2'), 26.73 (AB-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C(CO)), 12.28, 12.09 (C-7, C-7'').

**$^{31}\text{P}$ -NMR** (203 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 66.60.

**Drehwert:**  $[\alpha]^{20}_D = 20.8$  ( $c = 1.3$ , MeOH).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 117$  °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3180, 2962, 2931, 1682, 1469, 1274, 1108, 995, 831, 559, 417.

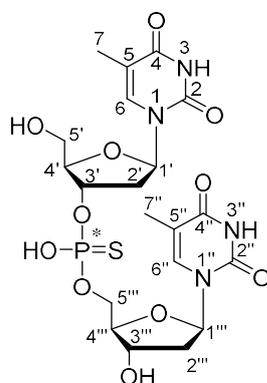
**UV/Vis** ( $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$  60/40):  $\lambda_{\text{max}} = 214, 271$ .

**HRMS** (ESI $^+$ ):  $\text{C}_{32}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_{13}\text{PS}$  (752.21)

ber.: 753.2201 [M+H] $^+$ ,

gef.: 753.2195 [M+H] $^+$ .

### 7.6.31 Referenzverbindungen **20ffast** und **20fslow**



**20ffast und 20fslow**

Die folgenden Synthesen wurden nicht unter Inertgas durchgeführt. Das diastereomerenreine Dinucleotid-Phosphorothioat-Prodrug **20dfast** bzw. **20dslow** (je 15.0 mg, 20.0  $\mu\text{mol}$ ) wurden jeweils in DMSO (4 mL) gelöst und innerhalb einer Stunde je zu einer 37 °C warmen Lösung aus Ammoniumbicarbonat-Puffer (32 mM, pH 7.3, 50 mL) und Schweineleber-Esterase (PLE) (1.00 mg, 18 U) getropft. Die Gemische wurden weitere 10 min bei 37 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Für die Fällung der Esterase wurden die Rückstände je in Wasser (1 mL) gelöst und mit Acetonitril (2 mL) versetzt. Die entstandenen Feststoffe wurden jeweils durch Zentrifugation (4000 g, 2 min, Rt.) vom Lösungsmittel getrennt, der jeweilige Überstand entnommen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Zielverbindungen wurden mittels HPLC-Reinigung erhalten.

**20ffast:**

**HPLC:**  $t_R = 11.6$  min (Methode 9, Injektionskonzentration: 10.1 mg in H<sub>2</sub>O:MeCN 90:10 (200  $\mu$ L).

**Ausbeute (20ffast):** 5.2 mg (9.2  $\mu$ mol, 45%) eines farblosen Feststoffes.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 11.34 (s, 1H, NH), 11.30 (s, 1H, NH), 7.71, 7.59 (s, 2H, 6-H, 6''-H), 6.18, 6.21 (dd,  $J = 8.2$  Hz,  $J = 6.0$  Hz, 2H, 1'-H, 1'''-H), 4.99-4.93 (m, 1H, 3'-H), 4.26 (dt,  $J = 5.8$  Hz,  $J = 3.0$  Hz, 1H, 3'''-H), 4.08-4.01 (m, 3H, 4'-H, 5'''-H), 3.95-3.90 (m, 1H, 4'''-H), 3.64-3.56 (m, 2H, 5'-H), 2.31 (ddd,  $J = 13.6$  Hz,  $J = 5.6$  Hz,  $J = 1.6$  Hz, 1H, 2'-H<sub>a</sub>), 2.26-2.19 (m, 1H, 2'-H<sub>b</sub>), 2.15-2.03 (m, 2H, 2'''-H), 1.77, 1.81 (d,  $J = 1.1$  Hz, 6H, 7-H, 7''-H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 163.72, 163.68 (C-4, C-4''), 150.45 (C-2, C-2''), 135.82 (C-6, C-6''), 109.89, 109.63 (C-5, C-5''), 85.48 (d,  $J = 5.5$  Hz, C-4'), 84.84 (d,  $J = 9.1$  Hz, C-4'''), 83.85 (C-1'''), 83.71 (C-1'), 77.37 (d,  $J = 4.9$  Hz, C-3'), 70.65 (C-3'''), 66.31 (d,  $J = 5.7$  Hz, C-5'''), 61.23 (C-5'), 39.17 (C-2'''), 37.82 (d,  $J = 3.4$  Hz, C-2'), 12.30, 12.14 (C-7, C-7'').

**<sup>31</sup>P-NMR** (203 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 60.25.

**Drehwert:**  $[\alpha]^{20}_D = 21.7$  (c = 0.33, MeOH).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 110$  °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3162, 3012, 2946, 1664 (br.), 1473, 1274, 990, 824, 558.

**UV/Vis** (H<sub>2</sub>O/MeCN 60/40):  $\lambda_{max} = 205, 267$ .

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>20</sub>H<sub>27</sub>N<sub>4</sub>O<sub>11</sub>PS (562.11) ber.: 563.1207 [M+H]<sup>+</sup>,  
gef.: 563.1188 [M+H]<sup>+</sup>.

**20fslow:**

**HPLC:**  $t_R = 11.4$  min (Methode 9, Injektionskonzentration: 14.9 mg in H<sub>2</sub>O:MeCN 90:10 (200  $\mu$ L).

**Ausbeute (20fslow):** 10.2 mg (18.1  $\mu$ mol, 91%) eines farblosen Feststoffes.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 11.33 (s, 1H, NH), 11.28 (s, 1H, NH), 7.71, 7.61 (s, 2H, 6-H, 6''-H), 6.25-6.15 (m, 2H, 1'-H, 1'''-H), 4.99-4.93 (m, 1H, 3'-H), 4.21 (dt, *J* = 5.7 Hz, *J* = 2.8 Hz, 1H, 3'''-H), 4.10-3.98 (m, 3H, 4'-H, 5'''-H), 3.95-3.90 (m, 1H, 4'''-H), 3.65-3.57 (m, 2H, 5'-H), 2.29 (ddd, *J* = 14.1 Hz, *J* = 5.7 Hz, *J* = 1.3 Hz, 1H, 2'-H<sub>a</sub>), 2.25-2.17 (m, 1H, 2'-H<sub>b</sub>), 2.15-2.08 (m, 1H, 2'''-H<sub>a</sub>), 2.06 (ddd, *J* = 13.1 Hz, *J* = 6.1 Hz, *J* = 2.8 Hz, 1H, 2'''-H<sub>b</sub>), 1.77, 1.81 (s, 6H, 7-H, 7''-H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 163.72, 163.66 (C-4, C-4''), 150.45 (C-2, C-2''), 135.84, 135.80 (C-6, C-6''), 109.88, 109.63 (C-5, C-5''), 85.65 (d, *J* = 5.2 Hz, C-4'), 84.89 (d, *J* = 8.6 Hz, C-4'''), 83.84 (C-1'''), 83.75 (C-1'), 77.38 (d, *J* = 4.7 Hz, C-3'), 70.67 (C-3'''), 67.17 (d, *J* = 5.5 Hz, C-5'''), 61.25 (C-5'), 39.35 (C-2'''), 37.72 (d, *J* = 4.4 Hz, C-2'), 12.29, 12.09 (C-7, C-7'').

**<sup>31</sup>P-NMR** (203 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 59.93.

**Drehwert:**  $[\alpha]^{20}_D = -8.3$  (c = 0.33, MeOH).

**Schmelzpunkt:** *T*<sub>m</sub> = 118 °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3162, 3012, 2946, 1664 (br.), 1473, 1274, 990, 824, 558.

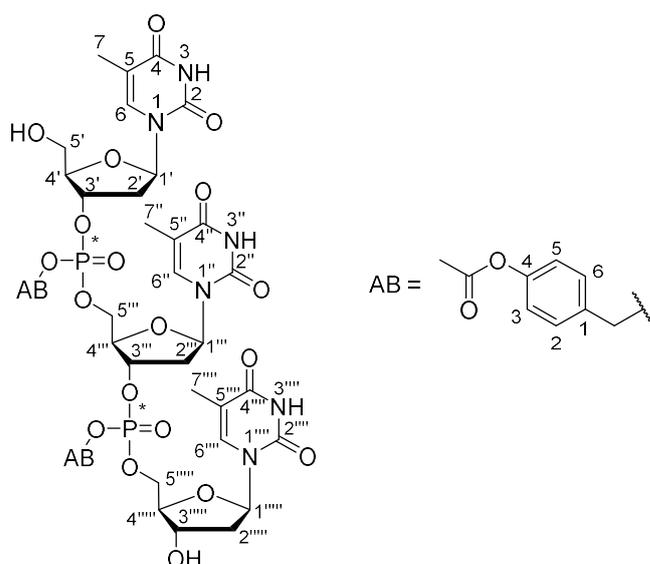
**UV/Vis** (H<sub>2</sub>O/MeCN 60/40):  $\lambda_{\max}$  = 205, 267.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>20</sub>H<sub>27</sub>N<sub>4</sub>O<sub>11</sub>PS (562.11)

ber.: 563.1207 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 563.1188 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.6.32 Trinucleotid-Prodrug 21a



Die Synthese der Verbindung **21a** erfolgte gemäß AAV 7 (7.5.7). Es wurden 14.0 mg (11.2  $\mu\text{mol}$ ) Trinucleotid **44a**, 1 mL MeOH und 7  $\mu\text{L}$  (5  $\mu\text{mol}$ ) Acetylchlorid in MeOH eingesetzt. Die Reaktion wurde 4 h gerührt.

**HPLC:**  $t_R = 14.1$  min (Methode 4, Injektionskonzentration: 14.0 mg in  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$  95:5 (300  $\mu\text{L}$ )).

**Ausbeute (21a):** 2.5 mg (2.2  $\mu\text{mol}$ , 20%) eines farblosen Feststoffes als ein Gemisch aus vier Diastereomeren (d.r.  $\sim 1:1:1:1$ ).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 11-35, 11-33 (s, 4x 3H, NH), 7.68-7.64, 7.51-7.46 (m, 4x 3H, 6-H, 6''-H, 6'''-H), 7.46-7.40 (m, 4x 4H, AB-3-H, AB-5-H), 7.15-7.10 (m, 4x 4H, AB-2-H, AB-6-H), 6.23-6.14 (m, 4x 3H, 1'-H, 1''-H, 1'''-H), 5.48-5.42 (m, 4x 1H, 5'-OH), 5.25-5.19 (m, 4x 1H, 3''''-OH), 5.13-5.05 (m, 4x 4H, AB- $\text{CH}_2$ ), 5.03-4.93 (m, 4x 2H, 3'-H, 3''-H), 4.30-4.14 (m, 4x 6H, 3''''-H, 4''-H, 5''-H, 5''''-H), 4.06-4.00 (m, 4x 1H, 4'-H), 3.95-3.90 (m, 4x 1H, 4''''-H), 3.61-3.51 (m, 4x 2H, 5'-H), 2.41-2.20 (m, 4x 10H, 2'-H, 2''-H, AB- $\text{CH}_3$ ), 2.16-2.05 (m, 4x 2H, 2''''-H), 1.81-1.70 (m, 4x 9H, 7-H, 7''-H, 7'''-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 169.15 (AB- $\text{CH}_3(\underline{\text{CO}})$ ), 163.54-163.70 (m, C-4, C-4'', C-4'''), 150.56 (AB-C-4), 150.50-150.33 (m, C-2, C-2'', C-2'''), 135.82, 135.78 (C-6, C-6'', C-6'''), 133.31 (AB-C-1), 133.26 (AB-C-1), 129.33, 129.28 (AB-C-2, AB-C-6), 121.99 (AB-C-3, AB-C-5), 110.10, 110.07, 109.87, 109.78, 109.74 (C-5, C-5'', C-5'''), 85.19, 85.15 (C-4'), 84.22, 84.18 (C-4''''), 83.93, 83.54 (C-1', C-1'', C-1'''), 82.28, 82.17 (C-4'''), 78.68 (d,  $J = 4.0$  Hz, C-3'), 78.55 (d,  $J = 4.0$  Hz, C-3''), 76.99 (d,  $J = 4.3$  Hz, C-3'''), 76.86 (d,  $J = 4.3$  Hz, C-3'''), 69.98 (d,  $J = 2.3$  Hz, C-3''''), 68.59-68.30 (m, AB- $\text{CH}_2$ ), 67.46 (d,  $J = 6.0$  Hz, C-5''''), 66.57, 66.54 (d,  $J = 4.5$  Hz, C-5'''), 60.91 (C-5'), 38.60 (C-2''''), 37.54 (C-2''''), 37.40, 36.55 (C-2', C-2'''), 20.83 (AB- $\text{CH}_3$ ), 12.28, 12.06, 12.03 (C-7, C-7'', C-7''').

**$^{31}\text{P-NMR}$**  (202 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = -1.84, -1.87, -1.98, -2.00, -2.03.

**Drehwert:**  $[\alpha]^{20}_D = 25.5$  ( $c = 0.10$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 122$  °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3356, 2919, 2850, 1691, 1466, 1197, 1009, 431.

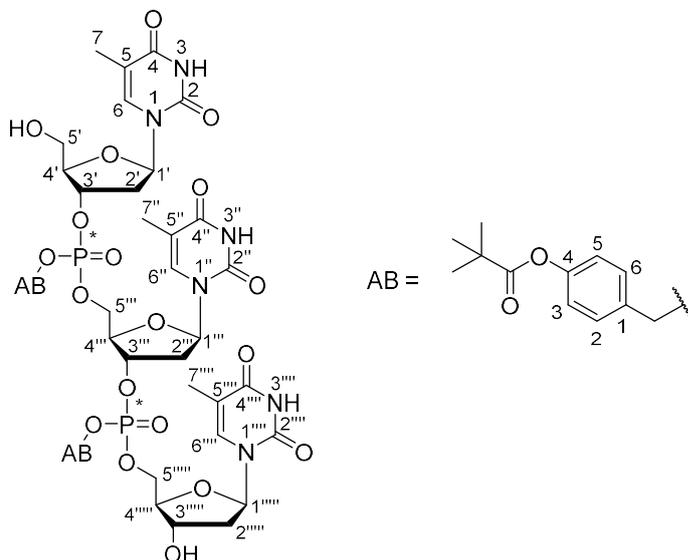
**UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 265$ .

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>48</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>O<sub>23</sub>P<sub>2</sub> (1146.29)

ber.: 1147.2945 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 1147.2943 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.6.33 Trinucleotid-Prodrug **21b**



**21b**

Die Synthese der Verbindung **21b** erfolgte gemäß AAV 7 (7.5.7). Es wurden 19.5 mg (14.5  $\mu$ mol) Trinucleotid **44b**, 1 mL MeOH und 10  $\mu$ L (6.9  $\mu$ mol) Acetylchlorid in MeOH eingesetzt. Die Reaktion wurde 4 h gerührt.

**HPLC:**  $t_R$  = 20.8 min (Methode 4, Injektionskonzentration: 17.8 mg in H<sub>2</sub>O:MeCN 95:5 (300  $\mu$ L)).

**Ausbeute (21b):** 3.6 mg (2.9  $\mu$ mol, 20%) eines farblosen Feststoffes als ein Gemisch aus vier Diastereomeren (d.r. ~1:1:1:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 11.41-11.26 (m, 3H, NH), 7.68-7.63, 7.51-7.46 (m, 4x 3H, 6-H, 6''-H, 6'''-H), 7.46-7.40 (m, 4x 4H, AB-3-H, AB-5-H), 7.13-7.05 (m, 4x 4H, AB-2-H, AB-6-H), 6.24-6.14 (m, 4x 3H, 1'-H, 1''-H, 1'''-H), 5.47-5.42 (m, 4x 1H, 5'-OH), 5.20 (t,  $J$  = 5.0 Hz, 4x 1H, 3''''-OH), 5.15-5.04 (m, 4x 4H, AB-CH<sub>2</sub>), 5.03-4.93 (m, 4x 2H, 3'-H, 3''-H), 4.30-4.14 (m, 4x 6H, 3''''-H, 4'''-H, 5'''-H, 5''''-H), 4.06-3.99 (m, 4x 1H, 4'-H), 3.95-3.90 (m, 4x 1H, 4''''-H), 3.61-3.51 (m, 4x 2H, 5'-H), 2.41-2.20 (m, 4x 4H, 2'-H, 2''-H), 2.16-2.05 (m,

4x 2H, 2''''-H), 1.81-1.70 (m, 4x 9H, 7-H, 7''-H, 7''''-H), 1.29 (s, 18H, AB-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.28 (s, 2x 18H, AB-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.28 (s, 18H, AB-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 176.33 (AB-CH<sub>3</sub>(C=O)), 163.71-163.55 (m, C-4, C-4'', C-4'''), 150.85 (AB-C-4), 150.49-150.31 (m, C-2, C-2'', C-2'''), 135.95-135.67 (m, C-6, C-6'', C-6'''), 133.30 (AB-C-1), 133.25 (AB-C-1), 129.35, 129.29 (AB-C-2, AB-C-6), 121.86 (AB-C-3, AB-C-5), 110.08, 110.05, 109.85, 109.77, 109.73 (C-5, C-5'', C-5'''), 85.11 (d, *J* = 5.1 Hz, C-4'), 84.19 (d, *J* = 7.2 Hz, C-4'''), 84.06, 83.95, 83.53 (C-1', C-1'', C-1'''), 82.25 (dd, *J* = 6.2 Hz, *J* = 6.2 Hz, C-4'''), 78.69 (d, *J* = 5.0 Hz, C-3'), 78.56 (d, *J* = 4.5 Hz, C-3'), 77.00 (d, *J* = 4.2 Hz, C-3'''), 76.90-76.78 (m, C-3'''), 69.98 (d, *J* = 2.2 Hz, C-3'''''), 68.60-68.32 (m, AB-CH<sub>2</sub>), 67.46 (d, *J* = 4.7 Hz, C-5'''''), 67.43 (d, *J* = 4.7 Hz, C-5'''''), 66.67-66.44 (m, C-5'''), 60.92 (C-5'), 38.60 (C-2'''''), 38.55 (C-2'''''), 37.39 (C-2'), 37.36 (C-2'), 36.64-36.42 (m, C-2'''), 26.73 (AB-CH<sub>3</sub>), 12.28, 12.08, 12.06, 12.04 (C-7, C-7'', C-7''').

**<sup>31</sup>P-NMR** (202 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = -1.82, -1.84, -1.89, -1.98, -2.00, -2.03, -2.06.

**Drehwert:** [ $\alpha$ ]<sup>20</sup><sub>D</sub> = 14.3 (c = 0.11, H<sub>2</sub>O).

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3063, 2978, 1664, 1270, 1107, 995, 767, 464, 417.

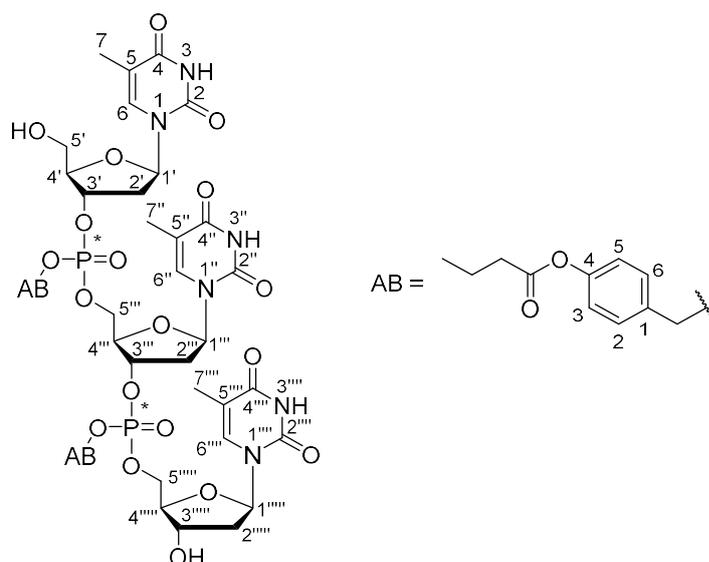
**UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{\max}$  = 267.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>54</sub>H<sub>68</sub>N<sub>6</sub>O<sub>23</sub>P<sub>2</sub> (1230.38)

ber.: 1231.3884 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 1231.3861 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.6.34 Trinucleotid-Prodrug **21c**



**21c**

Die Synthese der Verbindung **21c** erfolgte gemäß AAV 7 (7.5.7). Es wurden 10.4 mg (7.63  $\mu\text{mol}$ ) Trinucleotid **44c**, 1 mL MeOH und 6  $\mu\text{L}$  (4  $\mu\text{mol}$ ) Acetylchlorid in MeOH eingesetzt. Die Reaktion wurde 5 h gerührt.

**HPLC:** ( $t_R$  = 17.2 min (Methode 4, Injektionskonzentration: 10.3 mg in  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$  95:5 (200  $\mu\text{L}$ )).

**Ausbeute (21c):** 2.3 mg (1.9  $\mu\text{mol}$ , 25%) eines farblosen Feststoffes als ein Gemisch aus vier Diastereomeren (d.r.  $\sim 1:1:1:1$ ).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 11.32 (s, 3H, NH), 7.68-7.63, 7.51-7.46 (m, 4x 3H, 6-H, 6''-H, 6'''-H), 7.46-7.40 (m, 4x 4H, AB-3-H, AB-5-H), 7.16-7.08 (m, 4x 4H, AB-2-H, AB-6-H), 6.22-6.15 (m, 4x 3H, 1'-H, 1''-H, 1'''-H), 5.49-5.41 (m, 4x 1H, 5'-OH), 5.25-5.18 (m, 4x 1H, 3'''-OH), 5.13-5.05 (m, 4x 4H, AB-CH<sub>2</sub>O), 5.02-4.90 (m, 4x 2H, 3'-H, 3'''-H), 4.30-4.13 (m, 4x 6H, 3'''-H, 4'''-H, 5'''-H, 5''''-H), 4.05-3.99 (m, 4x 1H, 4'-H), 3.95-3.90 (m, 4x 1H, 4''''-H), 3.59-3.53 (m, 4x 2H, 5'-H), 2.58-2.53 (m, 4x 4H, AB-CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.34-2.22 (m, 4x 4H, 2'-H, 2'''-H), 2.13-2.06 (m, 4x 2H, 2''''-H), 1.81-1.70 (m, 4x 9H, 7-H, 7''-H, 7'''-H), 1.69-1.60 (m, 4x 4H, AB-CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.00-0.92 (m, 4x 6H, AB-CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 171.63 (AB-CH $_2$ (C=O)), 163.88-163.60 (m, C-4, C-4'', C-4'''), 150.54 (AB-C-4), 150.51-150.33 (m, C-2, C-2'', C-2'''), 135.92-135.64 (m, C-6, C-6'', C-6'''), 133.30 (AB-C-1), 133.25 (AB-C-1), 129.36, 129.30 (AB-C-2, AB-C-6), 121.98 (AB-C-3, AB-C-5), 110.09, 110.06, 109.86, 109.77, 109.73 (C-5, C-5'', C-5'''), 85.22-85.08 (m, C-4'), 84.16 (C-4'''''), 83.94, 83.54 (C-1', C-1''', C-1'''''), 81.97 (C-4'''), 78.38 (C-3'), 76.67 (C-3'''), 69.98 (d,  $J = 1.7$  Hz, C-3'''''), 68.56-68.36 (m, AB-CH $_2$ ), 67.03 (C-5'''''), 66.89 (C-5'''), 60.96 (C-5'), 60.92 (C-5'), 38.60-38.55 (m, C-2'''''), 37.41-37.37 (m, C-2'), 36.64-36.42 (m, C-2'''), 35.25 (AB-CH $_3$ -CH $_2$ -CH $_2$ ), 17.83 (AB-CH $_3$ -CH $_2$ -CH $_2$ ), 13.38 (AB-CH $_3$ -CH $_2$ -CH $_2$ ), 12.29, 12.07 (C-7, C-7'', C-7''''').

**$^{31}\text{P-NMR}$**  (202 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = -2.11, -2.13, -2.18, -2.22, -2.25.

**Drehwert:**  $[\alpha]^{20}_D = 19.7$  ( $c = 0.10$ , H $_2$ O).

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3175, 3066, 2964, 1684, 1509, 1272, 1001, 491.

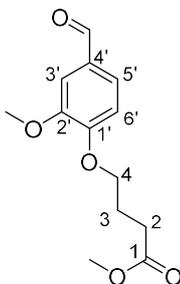
**UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 267$ .

**HRMS (ESI $^+$ ):** C $_{52}$ H $_{64}$ N $_6$ O $_{23}$ P $_2$  (1202.35)

ber.: 1203.3571 [M+H] $^+$ ,

gef.: 1203.3551 [M+H] $^+$ .

### 7.6.35 Methyl-4-(4-formyl-2-methoxyphenoxy)butanoat 49



**49**

Vanillin (4.00 g, 26.3 mmol) und 4-Chlorbuttersäuremethylester (4.30 g, 4.00 mL, 31.6 mmol) wurden in abs. MeCN (80 mL) gelöst. K $_2$ CO $_3$  (8.80 g, 63.1 mmol) und *n*-Bu $_4$ Ni (2.00 g, 5.41 mmol) wurden zugeben. Das Gemisch wurde 22 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen des Gemisches auf Raumtemperatur wurden Diethylether (100 mL) und Wasser (100 mL) zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit Diethylether (2 x 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung (100 mL) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das

Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand aus Ethylacetat (5 mL) umkristallisiert. Der Niederschlag wurde mit 0 °C kaltem Ethylacetat (2.0 mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Anschließend wurde der Rückstand in Toluol (3.0 mL) suspendiert, der Niederschlag abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingeeengt.

**Ausbeute (49):** 5.12 g eines beigen Feststoffes, laut  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ca. 90% **49** und 10% Tetrabutylammonium-Salze (100% Ausbeute: 6.63 g).

Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 9.85 (s, 1H, CHO), 7.43 (dd,  $J = 8.1$  Hz,  $J = 1.9$  Hz, 1H, 5'-H), 7.41 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H, 3'-H), 6.98 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, 6'-H), 4.16 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H, 4-H), 3.92 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{OAr}$ ), 3.69 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}(\text{CO})$ ), 2.56 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H, 2-H), 2.23-2.17 (m, 2H, 3-H).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 191.05 (CHO), 172.53 ( $\text{CH}_3\text{O}(\underline{\text{C}}\text{O})$ ), 153.99 (C-1'), 150.08 (C-2'), 130.32 (C-4'), 126.89 (C-5'), 111.75 (C-6'), 109.48 (C-3'), 68.01 (C-4), 56.15 ( $\text{CH}_3\text{OAr}$ ), 51.84 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{O}(\text{CO})$ ), 30.46 (C-2), 24.41 (C-3).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 66$  °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3075, 2931, 2849, 1730, 1679, 1585, 1469, 1027, 727.

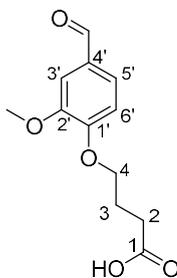
**UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 212, 230, 278, 304$ .

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>):  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_5$  (252.10)

ber.: 253.1071  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,

gef.: 253.1068  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### 7.6.36 4-(4-Formyl-2-methoxyphenoxy)buttersäure **50**



**50**

Die nachfolgende Reaktion wurde nicht unter Inertgasbedingungen durchgeführt. Der Ester **49** (5.12 g, mit ca. 10% Tetrabutylammonium-Salzen verunreinigt) wurde in Dioxan (70 mL) vorgelegt und LiOH-Lösung (1 M, 33 mL) wurde zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde für 17 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit HCl-Lösung (10%) auf pH 3 eingestellt. Die wässrige Phase wurde mit Wasser (80 mL) verdünnt und mit Ethylacetat (2 x 80 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung (50 mL) gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

**Ausbeute (50):** 4.06 g (17.1 mmol, 65% über zwei Stufen) eines gelben Feststoffes.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 9.80 (s, 1H, CHO), 7.52 (dd, *J* = 8.2 Hz, *J* = 1.9 Hz, 1H, 5'-H), 7.45 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, 3'-H), 7.12 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, 6'-H), 4.15 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, 4-H), 3.90 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 2.53 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, 2-H), 2.15-2.08 (m, 2H, 3-H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 184.13 (CHO), 178.45 (COOH), 156.56 (C-1'), 150.36 (C-2'), 131.82 (C-4'), 126.84 (C-5'), 112.79 (C-6'), 111.13 (C-3'), 68.84 (C-4), 56.18 (CH<sub>3</sub>O), 33.15 (C-2), 24.59 (C-3).

**Schmelzpunkt:** T<sub>m</sub> = 149 °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2959, 2831, 1708, 1670, 1583, 1461, 1258, 1128, 1010, 858, 625.

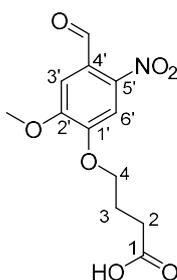
**UV/Vis** (MeOH): λ<sub>max</sub> = 206, 230, 275, 304.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub> (238.08)

ber.: 239.0914 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 239.0905 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.6.37 4-(4-Formyl-2-methoxy-5-nitrophenoxy)buttersäure **51**



**51**

Verbindung **50** (998 mg, 4.19 mmol) wurde unter Lichtausschluss und Rühren bei 0°C mit eisgekühlter HNO<sub>3</sub> (69%, 5.0 mL) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Lichtausschluss 30 min bei 0°C und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Gemisch mit Eiswasser (10 mL) versetzt, der Rückstand abfiltriert und dieser mit Eiswasser (7 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand ohne weitere Reinigung umgesetzt.

**Ausbeute (51):** 1.22 g eines gelben Feststoffes, laut <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum ca. 80% **51** und 20% Isomere (100% Ausbeute: 1.22 g).

In den NMR-Spektren ist das Hydrat von Verbindung **51** nachgewiesen.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] = 7.56 (s, 1H, 6'-H), 7.29 (s, 1H, 3'-H), 5.95 (s, 1H, HC(OH)<sub>2</sub>), 4.11 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, 4-H), 3.94 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 2.52 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, 2-H), 2.15-2.06 (m, 2H, 3-H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ [ppm] = 175.39 (COOH), 154.29 (C-2'), 149.40 (C-1'), 142.61 (C-5'), 128.58 (C-4'), 110.86 (C-6'), 110.52 (C-3'), 101.29 (HC(OH)<sub>2</sub>), 68.52 (C-4), 56.78 (CH<sub>3</sub>O), 31.28 (C-2), 25.55 (C-3).

**Schmelzpunkt:** *T*<sub>m</sub> = 148 °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2947, 2865, 1688, 1511, 1331, 1281, 1218, 1058, 876, 734.

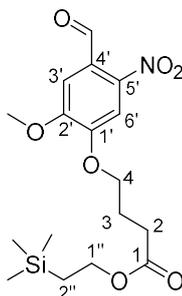
**UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{\max}$  = 204, 222, 261, 308, 334.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>7</sub> (283.07)

ber.: 284.0765 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 284.0755 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.6.38 2-(Trimethylsilyl)ethyl-4-(4-formyl-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoat **52**

**52**

Ein Gemisch aus der Carbonsäure **51** und ihren Isomeren (3.51 g, 11.7 mmol), DCC (3.10 g, 15.2 mmol) und DMAP (707 mg, 5.80 mmol) wurden in abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) gelöst und 2-Trimethylsilylethanol (1.82 g, 2.11 mL, 15.4 mmol) wurde zugetropft. Das Gemisch wurde 19 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE:EtOAc 4:1).

**Ausbeute (52):** 4.24 g (11.1 mmol, 75% über zwei Stufen) eines gelben Öls.

**DC:**  $R_f = 0.31$  (PE:EtOAc 1:4).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 10.44 (s, CHO), 7.61 (s, 1H, 6'-H), 7.40 (s, 1H, 3'-H), 4.23-4.17 (m, 4H, 4-H, 1''-H), 4.00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 2.54 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H, 2-H), 2.25-2.18 (m 2H, 3-H), 1.01-0.96 (m, 2H, 2''-H), 0.04 (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 187.73 (CHO), 172.82 (COO), 153.48 (C-2'), 151.75 (C-1'), 143.81 (C-5'), 128.48 (C-4'), 109.89 (C-6'), 108.14 (C-3'), 68.67 (C-4), 62.89 (C-1''), 56.62 (CH<sub>3</sub>O), 30.52 (C-2), 24.12 (C-3), 17.35 (C-2''), -1.52 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 71$  °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2952, 1730, 1686, 1568, 1513, 1322, 1285, 1228, 1057, 737.

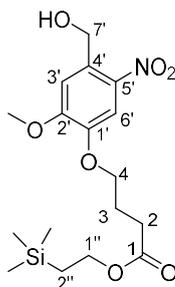
**UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{max} = 204, 236, 273$ .

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>7</sub>Si (383.14)

ber.: 383.1473 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 383.1469 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.6.39 2-(Trimethylsilyl)ethyl-4-(4-(hydroxymethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoat **33**



**33**

Der Aldehyd **52** (4.06 g, 10.5 mmol) wurde in abs. Ethanol (80 mL) gelöst und die Lösung auf 0°C gekühlt. NaBH<sub>4</sub> (600 mg, 15.7 mmol) wurde zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Ethylacetat (100 mL) und ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung (40 mL) wurden zugegeben und die Phasen wurden getrennt. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (80 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (80 mL) und ges. NaCl-Lösung (80 ml) gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE:EtOAc 3:2).

**Ausbeute (33):** 3.21 g (8.32 mmol, 80%) eines gelbbraunen Schaums.

**DC:** R<sub>f</sub> = 0.28 (PE:EtOAc 3:2).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.71 (s, 1H, 6'-H), 7.14 (s, 1H, 3'-H), 4.95 (d, J = 6.5 Hz, 2H, 7'-H), 4.22-4.16 (m, 2H, 1''-H), 4.13 (t, J = 6.8 Hz, 2H, 4-H), 3.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 2.60 (t, J = 6.5 Hz, 1H, OH), 2.53 (t, J = 7.3 Hz, 2H, 2-H), 2.21-2.18 (m, 2H, 3-H), 1.01-0.97 (m, 2H, 2''-H), 0.04 (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 173.17 (COO), 154.45 (C-2'), 147.42 (C-1'), 139.89 (C-5'), 132.39 (C-4'), 111.46 (C-6'), 109.73 (C-3'), 68.50 (C-4), 63.07 (C-1''), 62.97 (C-7'), 56.55 (CH<sub>3</sub>O), 30.87 (C-2), 24.44 (C-3), 17.49 (C-2''), -1.35 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 85\text{ °C}$ .

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3548, 2957, 1731, 1578, 1318, 1266, 1173, 939, 834, 754, 693.

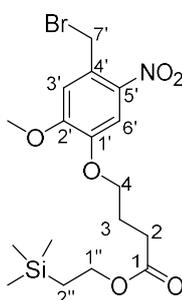
**UV/Vis (MeOH):**  $\lambda_{\text{max}}$  = 206, 216, 241, 300, 342.

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{NO}_7\text{Si}$  (385.49)

ber.: 386.1630 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 386.1625 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.6.40 2-(Trimethylsilyl)ethyl-4-(4-(bromomethyl)-2-methoxy-5-nitrophenoxy)butanoat **53**



**53**

Der Alkohol **33** (70.4 mg, 182  $\mu\text{mol}$ ) wurde in abs. Diethylether (2.0 mL) gelöst und auf 0°C gekühlt.  $\text{PBr}_3$  (60 mg, 20  $\mu\text{L}$ , 0.22 mmol) wurde zugetropft und das Gemisch wurde 1 h bei 0°C gerührt. Zu dieser Reaktionslösung wurden 5 °C kaltes Wasser (10 mL) und Diethylether (10 mL) gegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde erneut mit Diethylether (10 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (8 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE:EtOAc 2:1).

**Ausbeute (53):** 38.1 mg (85.2  $\mu\text{mol}$ , 47%) eines gelben Öls.

**DC:**  $R_f = 0.34$  (PE:EtOAc 2:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.67 (s, 1H, 6'-H), 6.93 (s, 1H, 3'-H), 4.86 (s, 2H, 7'-H), 4.22-4.16 (m, 2H, 1''-H), 4.13 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H, 4-H), 3.97 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ), 2.52 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H, 2-H), 2.20-2.17 (m, 2H, 3-H), 1.01-0.97 (m, 2H, 2''-H), 0.04 (s, 9H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ).

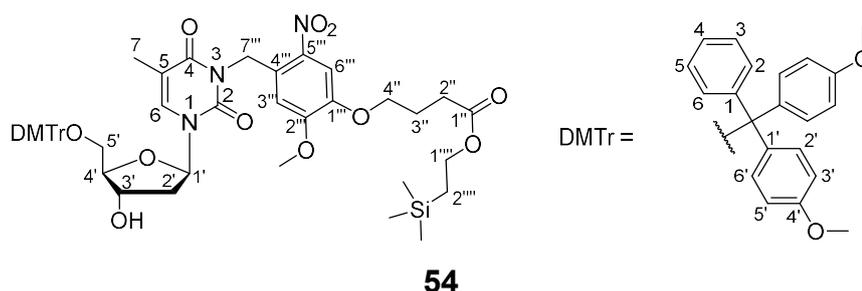
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 173.10 (COO), 153.71 (C-2'), 148.37 (C-1'), 127.57 (C-4'), 114.00 (C-3'), 109.94 (C-6'), 68.51 (C-4), 62.99 (C-1''), 56.61 ( $\text{CH}_3\text{O}$ ), 30.82 (C-2), 30.28 (C-7'), 24.39 (C-3), 17.49 (C-2''), -1.35 ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ). Das Signal für C-6 fehlt.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{BrNO}_6\text{Si}$  (447.07)

ber.: 470.06  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,

gef.: 470.01  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

### 7.6.41 3-N-funktionalisiertes 5'-O-DMTr-Thymidin-Derivat **54**



5'-O-DMTr-Thymidin **43** (20.3 mg, 37.3  $\mu\text{mol}$ ) wurde in abs. DMF (2.0 mL) vorgelegt und  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (36.0 mg, 110  $\mu\text{mol}$ ) und TBAI (12.2 mg, 37.7  $\mu\text{mol}$ ) wurden zugegeben. Verbindung **53** (32.0 mg, 71.6  $\mu\text{mol}$ ) wurde in abs. DMF (1.0 mL) gelöst und zu der Reaktionslösung getropft. Das Gemisch wurde 20 h bei 100°C gerührt. Anschließend wurden Wasser (15 mL) und Ethylacetat (20 mL) zugegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (15 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (15 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE:EtOAc 1:3).

**Ausbeute (54):** 27.8 mg (29.1  $\mu\text{mol}$ , 84%) eines orangen Schaums.

**DC:**  $R_f = 0.34$  (PE:EtOAc 2:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.60 (s, 1H, 6-H), 7.57 (s, 1H, 6'''-H), 7.42-7.37 (m, 2H, DMTr-2-H, DMTr-6-H), 7.32-7.25 (m, 7H, DMTr-3-H, DMTr-4-H, DMTr-5-H, DMTr-2'-H, DMTr-6'-H), 6.85-6.81 (m, 4H, DMTr-3'-H, DMTr-5'-H), 6.70 (s, 1H, 3'''-H), 6.41-6.37 (m, 1H 1'-H), 5.55-5.46 (m, 2H, 7'''-H),

4.58-4.53 (m, 1H, 3'-H), 4.22-4.16 (m, 2H, 1''''-H), 4.09 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H, 4-H), 4.04-4.01 (m, 1H, 4'-H), 3.81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.79 (s, 6H, DMTr-OCH<sub>3</sub>), 3.47 (dd,  $J = 10.4$  Hz,  $J = 3.2$  Hz, 2H, 5'-H<sub>a</sub>), 3.36 (dd,  $J = 10.4$  Hz,  $J = 3.2$  Hz, 2H, 5'-H<sub>b</sub>), 2.50 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H, 2'''-H), 2.39 (ddd,  $J = 13.5$  Hz,  $J = 6.1$  Hz,  $J = 3.0$  Hz, 1H, 2'-H<sub>a</sub>), 2.30-2.27 (m, 1H, 2'-H<sub>b</sub>), 2.19-2.12 (m, 2H, 3'''-H), 1.77 (d,  $J = 3.8$  Hz, 1H, OH), 1.55 (7-H (unter dem Wasserpeak)), 1.02-0.96 (m, 2H, 2''''-H), 0.04 (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

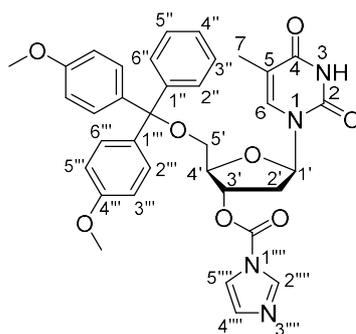
**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 173.16 (COO), 163.56 (C-4), 158.88 (DMTr-OCH<sub>3</sub>), 153.59 (C-2'''), 150.99 (C-2), 147.85 (C-1'''), 144.43 (C-6), 142.06 (C-5'''), 135.48 (DMTr-C-1'), 134.31 (DMTr-C-1), 130.19 (DMTr-C-2', DMTr-C-6'), 128.22 (DMTr-C-5, DMTr-C-3), 128.15 (DMTr-C-6, DMTr-C-2), 127.31 (DMTr-C-4), 126.96 (C-4'''), 113.42 (DMTr-C-3', DMTr-C-5'), 110.60 (C-5), 110.47 (C-3'''), 109.56 (C-6'''), 87.12 (DMTr-C<sub>q</sub>), 86.11 (C-4'), 85.44 (C-1'), 72.51 (C-3'), 68.51 (C-4''), 63.58 (C-5'), 62.93 (C-1''''), 56.43 (OCH<sub>3</sub>), 55.40 (DMTr-OCH<sub>3</sub>), 41.47 (C-2'), 41.16 (C-7'''), 30.87 (C-2''), 24.42 (C-2'''), 17.47 (C-2''''), 12.80 (C-7), -1.36 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>48</sub>H<sub>57</sub>N<sub>3</sub>O<sub>13</sub>Si (911.36)

ber.: 934.36 [M+Na]<sup>+</sup>,

gef.: 934.51 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 7.6.42 Thymidin-abgeleitetes Carbamat 58



**58**

5'-O-DMTr-Thymidin **32** (2.76 g, 5.10 mmol) wurde in abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5.0 mL) vorgelegt und CDI (1.68 g, 10.2 mmol) und DMAP (1.25 g, 10.2 mmol) wurden zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde ges. NH<sub>4</sub>Cl-Lösung (10 mL) zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase erneut mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8 mL) extrahiert. Die

vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Aufgrund der generellen Instabilität von Imidazolyl-Carbamaten und der geplanten direkten Umsetzung von Verbindung **58** wurde auf eine vollständige Charakterisierung verzichtet.

**Ausbeute (58):** 3.04 g eines farblosen Schaums, laut <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum ca. 95% Verbindung **58** (100% Ausbeute: 3.27 g).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.63-8.60 (m, 1H, NH), 8.16-8.13 (m, 1H, 2''''-H), 7.60 (s, 1H, 6-H), 7.42-7.40 (m, 1H, 5''''-H), 7.40-7.37 (m, 2H, 2''-H, 6''-H), 7.33-7.26 (m, 7H, 3''-H, 4''-H, 5''-H, 2'''-H, 6'''-H), 7.10 (dd, *J* = 1.7 Hz, *J* = 0.8 Hz, 1H, 4''''-H), 6.88-6.81 (m, 4H, 3'''-H, 5'''-H), 6.49-6.46 (m, 1H 1'-H), 5.66-5.62 (m, 1H, 3'-H), 4.33-4.30 (m, 1H, 4'-H), 3.79 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.59 (dd, *J* = 10.7 Hz, *J* = 2.6 Hz, 1H, 5'-H<sub>a</sub>), 3.52 (dd, *J* = 10.7 Hz, *J* = 2.6 Hz, 1H, 5'-H<sub>b</sub>), 2.69 (ddd, *J* = 14.3 Hz, *J* = 5.5 Hz, *J* = 0.7 Hz, 1H, 2'-H<sub>a</sub>), 2.61-2.53 (m, 1H, 2'-H<sub>b</sub>), 1.44 (s, 3H, 7-H).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 163.21 (C-4), 158.85 (C-4'''), 150.17 (C-2), 149.82 (O(CO)N), 144.01 (C-1''), 137.10 (C-2'''), 135.94 (C-6), 134.99 (C<sub>a</sub>-1'''), 135.97 (C<sub>b</sub>-1'''), 131.11 (C-4''''), 130.05, 130.02 (C-3'', C-5''), 128.11, 128.04 (C-2'', C-6''), 127.35 (C-2''', C-6'''), 123.72 (C-4''), 117.01 (C-5'''), 113.38 (C-3''', C5'''), 111.91 (C-5), 106.55 (C<sub>q</sub>), 87.44 (C-1'), 84.27 (C-4'), 79.53 (C-3'), 63.49 (C-5'), 55.26 (OCH<sub>3</sub>), 37.84 (C-2'), 11.71 (C-7).

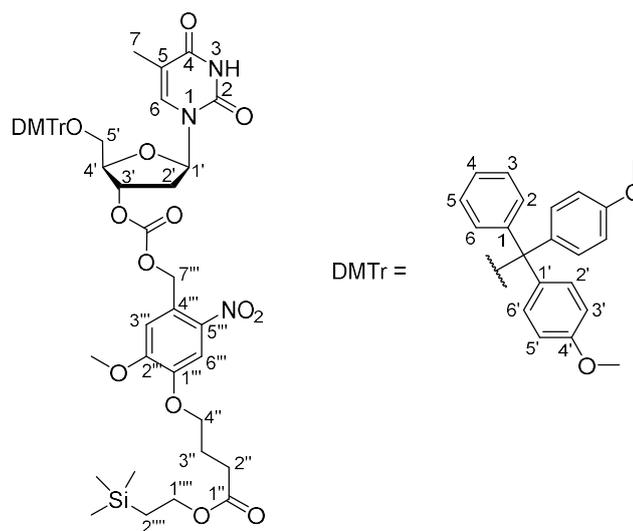
**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  = 2961, 2836, 1759, 1686, 1605, 1508, 1243, 1174, 998, 826, 584.

**MS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>35</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> (638.24)

ber.: 639.24 [M+H]<sup>+</sup>

gef.: 639.21 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.6.43 Thymidin-abgeleitetes Carbonat **31**



#### Variante 1:

Der Alkohol **33** (100 mg, 260  $\mu\text{mol}$ ) wurde in abs. THF (2.0 mL) gelöst und Triphosgen (25.6 mg, 86.2  $\mu\text{mol}$ ) wurde zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur 3.5 h gerührt. In der Zwischenzeit wurde 5'-O-DMTr-Thymidin **32** (141 mg, 260  $\mu\text{mol}$ ) in abs. THF (1.5 mL) gelöst und NaH (60% Dispersion in Mineralöl, 10 mg, 0.26 mmol) zugegeben. Dieses Gemisch wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der beiden Reaktionen wurde die Lösung von deprotoniertem **32** zum initialen Reaktionsgemisch getropft und die so erhaltene Lösung 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde ges.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (5.0 mL) zugegeben und mit Ethylacetat (2 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE:EtOAc:MeOH 30:30:1).

**Ausbeute (31):** 8.1 mg (8.4  $\mu\text{mol}$ , 3%) eines farblosen Schaums.

**DC:**  $R_f = 0.32$  (PE:EtOAc:MeOH 30:30:1).

*Variante 2:*

Alkohol **33** (2.16 g, 5.60 mmol) und DBU (71 mg, 0.70 mL, 4.7 mmol) wurden in abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) vorgelegt. Das Carbamat **58** (3.05 g, 4.73 mmol) wurde zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Gemisch mit Wasser (70 mL) gewaschen und die wässrige Phase mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE:EtOAc 1:1 → EtOAc).

**Ausbeute (31):** 2.87 g (3.00 mmol, 64%) eines beigen Schaums.

**DC:**  $R_f = 0.18$  (PE:EtOAc 1:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 8.67 (s, 1H, NH), 7.74 (s 1H, 5'''-H), 7.62 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H, 6-H), 7.40-7.36 (m, 2H, DMTr-2-H, DMTr-6-H), 7.33-7.23 (m, 7H, DMTr-3-H, DMTr-4-H, DMTr-5-H, DMTr-2'-H, DMTr-6'-H), 7.05 (s, 1H, 3'''-H), 6.87-6.80 (m, 4H, DMTr-3'-H, DMTr-5'-H), 6.49 (dd,  $J = 9.3$  Hz,  $J = 5.4$  Hz, 1H, 1'-H), 5.57 (s, 2H, 7'''-H), 5.40 (d,  $J = 5.8$  Hz, 1H, 3'-H), 4.26-4.23 (m, 1H, 4'-H), 4.21-4.16 (m, 2H, 1''''-H), 4.16-4.12 (m, 2H, 4''-H), 3.98 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.79 (s, 6H, DMTr-OCH<sub>3</sub>), 3.53 (dd,  $J = 10.6$  Hz,  $J = 2.5$  Hz, 1H, 5'-H<sub>a</sub>), 3.47 (dd,  $J = 10.6$  Hz,  $J = 2.5$  Hz, 1H, 5'-H<sub>b</sub>), 2.58 (dd,  $J = 13.8$  Hz,  $J = 5.4$  Hz, 1H, 2'-H<sub>a</sub>), 2.52 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H, 2''-H), 2.50-2.43 (m, 1H, 2'-H<sub>b</sub>), 2.21-2.18 (m, 2H, 3''-H), 1.38 (d,  $J = 1.2$  Hz, 3H, 7-H), 1.01-0.97 (m, 2H, 2''''-H), 0.04 (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 173.13 (COO), 163.58 (C-4), 158.94 (DMTr-C-4'), 154.30 (C-2'''), 154.09 (O(CO)O), 150.44 (C-2), 149.94 (C-1'''), 147.80 (DMTr-C-1), 144.23 (C-5'''), 139.55 (DMTr-C-1'), 136.11 (C-6), 135.40 (DMTr-C-2), 135.21, 135.15 (DMTr-C-2, DMTr-C-6), 130.22, 130.18 (DMTr-C-3, DMTr-C-5), 128.21 (DMTr-C-2', DMTr-C-6'), 127.43 (C-4'''), 126.25 (DMTr-C-4), 113.47 (DMTr-C-3', DMTr-C-5'), 111.90 (C-5), 110.04 (C-3'''), 109.59 (C-6'''), 87.44 (DMTr-C<sub>q</sub>), 84.40 (C-1'), 83.95 (C-4'), 79.56 (C-3'), 68.45 (C-4''), 66.91 (C-7'''), 63.89 (C-5'), 62.92 (C-1''''), 56.75 (OCH<sub>3</sub>), 55.40 (DMTr-OCH<sub>3</sub>), 38.02 (C-2'), 30.80 (C-2''), 24.35 (C-3''), 17.45 (C-2''''), 11.74 (C-7), -1.37 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**Drehwert:**  $[\alpha]^{20}_D = -12.3$  ( $c = 0.84$ , MeOH).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 90$  °C.

**IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3063, 2953, 1749, 1686, 1508, 1245, 1173, 1062, 829, 701, 584.

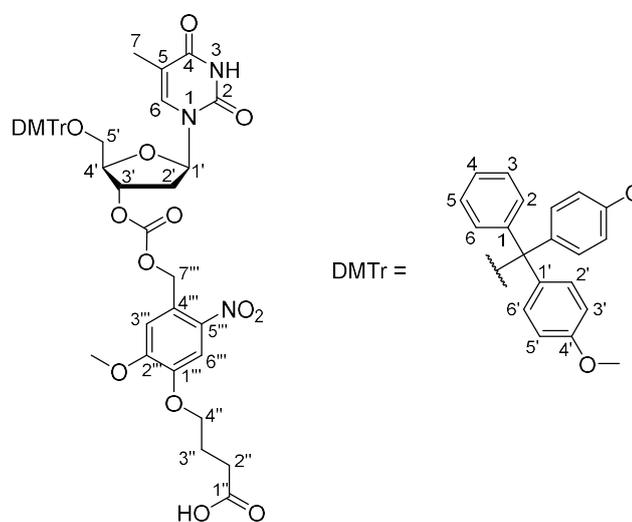
**UV/Vis (MeOH):**  $\lambda_{\text{max}} = 205, 236, 273, 336$ .

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $\text{C}_{49}\text{H}_{57}\text{N}_3\text{O}_{15}\text{Si}$  (955.36)

ber.: 956.3632 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 956.3629 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.6.44 Thymidin-abgeleitetes Carbonat 60



Der Ester **31** (400 mg, 418  $\mu\text{mol}$ ) wurde in abs. THF (8.0 mL) vorgelegt und die Mischung auf  $-10$  °C gekühlt. Anschließend wurde TBAF (1M in THF, 753  $\mu\text{L}$ , 753  $\mu\text{mol}$ ) zugetropft, das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt und für 20 h gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und Ethylacetat (15 mL) und Phosphatpuffer (20 mL) wurden zugegeben. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit Ethylacetat (10 mL) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigungen umgesetzt und auf eine vollständige Charakterisierung verzichtet.

**Ausbeute (60):** 350 mg eines gelben Schaums, laut  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ca. 80% Verbindung **60** und 20% Tetrabutylammonium-Salze (100% Ausbeute: 357 mg).



NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE:EtOAc: 2:1 → 1:2). Des Weiteren wurde die isolierte Fraktion, ein Gemisch aus Produkt **62** und DCU, in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.0 mL) gelöst und 7 h bei -25°C gelagert. Die erhaltenen Kristalle wurden abfiltriert, mit 5 °C kalter CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.0 mL) gewaschen und das Filtrat wurde vom Lösungsmittel befreit.

**Ausbeute (62):** 23.4 mg eines beigen Schaums, laut <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum ca. 92% Verbindung **62** und 8% DCU (100% Ausbeute: 86.7 mg).

*Variante 2: mit EDC*

Ein Gemisch aus Carbonsäure **60** (70.3 mg, 82.1 µmol) und TBAF wurde in abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.0 mL) vorgelegt und 2,4,5-Trichlorphenol (32.0 mg, 163 µmol) und EDC·HCl (31.4 mg, 164 µmol) wurden zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Wasser (5.0 mL) zugegeben und die Phasen wurden getrennt. Die wässrige Phase wurde mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5.0 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung (10.0 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE:EtOAc: 2:1 → 1:2).

**Ausbeute (62):** 16.4 mg (15.8 µmol, 19%) eines beigen Schaums.

**DC:** *R*<sub>f</sub> = 0.42 (PE:EtOAc 1:2).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.31 (s, 1H, NH), 7.76 (s 1H, 6'''-H), 7.62 (d, *J* = 1.0 Hz 1H, 6-H), 7.55 (s, 1H, 3''''-H), 7.40-7.35 (m, 2H, DMTr-2-H, DMTr-6-H), 7.32-7.23 (m, 8H, 6'''-H, DMTr-3-H, DMTr-4-H, DMTr-5-H, DMTr-2'-H, DMTr-6'-H), 7.07 (s, 1H, 3'''-H), 6.86-6.81 (m, 4H, DMTr-3'-H, DMTr-5'-H), 6.49 (dd, *J* = 9.3 Hz, *J* = 5.3 Hz, 1H 1'-H), 5.58 (s, 2H, 7'''-H), 5.40 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H, 3'-H), 4.25-4.23 (m, 1H, 4'-H), 4.20 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, 4''-H), 3.99 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.79 (s, 6H, DMTr-OCH<sub>3</sub>), 3.53 (dd, *J* = 10.6 Hz, 2.6 Hz, 1H, 5'-H<sub>a</sub>), 3.47 (dd, *J* = 10.6 Hz, 2.3 Hz, 1H, 5'-H<sub>b</sub>), 2.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H,

2''-H), 2.58 (dd,  $J = 14.0$  Hz, 5.5 Hz, 1H, 2'-H<sub>a</sub>), 2.51-2.43 (m, 1H, 2'-H<sub>b</sub>), 2.33 (tt,  $J = 6.8$  Hz,  $J = 6.8$  Hz, 2H, 3''-H), 1.37 (d,  $J = 1.0$  Hz, 3H, 7-H).

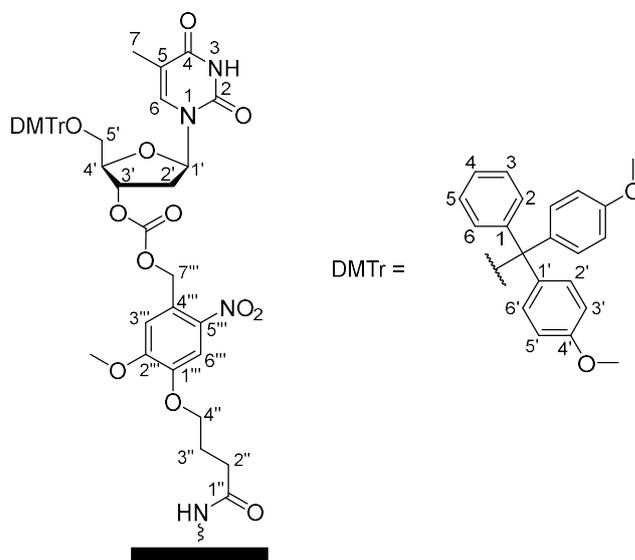
**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 170.12 (COO), 163.46 (C-4), 158.94 (DMTr-C-4'), 154.35 (C-2'''), 154.08 (O(CO)O), 150.35 (C-2), 147.65 (C-1'''), 145.85 (DMTr-C-1), 144.23 (C-5'''), 139.53 (DMTr-C-1'), 135.42 (C-6), 135.21 (DMTr-C-2), 135.15 (DMTr-C-2, DMTr-C-6), 131.64 (C-1''''), 131.20 (C-5''''), 130.80 (C4''''), 130.24, 130.19 (DMTr-C-3, DMTr-C-5), 128.23 (DMTr-C-2', DMTr-C-6'), 127.45 (C-4'''), 126.58 (C-2''''), 126.21 (DMTr-C-4), 125.46 (C-6''''), 113.49 (DMTr-C-3', DMTr-C-5'), 111.91 (C-5), 110.12 (C-3'''), 109.79 (C-6'''), 87.46 (DMTr-C<sub>q</sub>), 84.41 (C-1'), 83.97 (C-4'), 79.61 (C-3'), 68.16 (C-4''), 66.90 (C-7'''), 63.90 (C-5'), 56.79 (OCH<sub>3</sub>), 55.42 (DMTr-OCH<sub>3</sub>), 38.03 (C-2'), 30.52 (C-2''), 24.28 (C-3''), 11.74 (C-7).

**MS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>50</sub>H<sub>46</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>15</sub> (1033.20)

ber.: 1056.19 [M+Na]<sup>+</sup>,

gef.: 1056.30 [M+Na]<sup>+</sup>.

### 7.6.46 Thymidin-beladener CPG-Träger 23



**23**

#### Variante 1: mit DCC

Die Carbonsäure **60** (340 mg, 397  $\mu$ mol) wurde in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8.0 mL) vorgelegt und DCC (106 mg, 516  $\mu$ mol), DMAP (50.4 mg, 412  $\mu$ mol) sowie LCAA-CPG (500 mg, 800  $\mu$ mol/g) wurden zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Rückstand abfiltriert, mit

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL), MeCN (10 mL), Wasser (10 mL), MeCN (10 mL) und erneut mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Zu dem trockenen Rückstand (470 mg) wurden daraufhin die Lösungen Cap A (THF:2,6-Lutidin:Essigsäureanhydrid 8:1:1, 2.0 mL) und Cap B (THF:*N*-Methylimidazol 84:16, 2.0 mL) gegeben und die Suspension wurde 1.5 h gerührt. Anschließend wurde der Rückstand abfiltriert, mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

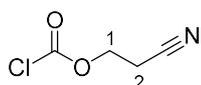
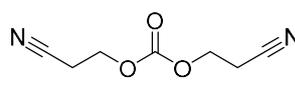
**Ausbeute (23):** 406 mg (73 μmol/g, <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum einer Waschlösung mit CDCl<sub>3</sub> zeigt DCU-Rückstände) eines beige Pulvers.

#### *Variante 2: mit EDC*

Die Carbonsäure **60** (340 mg, 397 μmol) wurde in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8.0 mL) vorgelegt und EDC·HCl (99.5 mg, 519 μmol), HOBT (70.4 mg, 521 μmol) sowie LCAA-CPG (400 mg, 1000 μmol/g) wurden zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Rückstand durch Zentrifugation (4000 g, 2 min, Rt.) vom Lösungsmittel getrennt, mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8.0 mL), MeCN (8.0 mL), Wasser (8.0 mL), MeCN (8.0 mL), erneut mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8.0 mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Zu dem trockenen Rückstand wurden dann die Lösungen Cap A (THF:2,6-Lutidin:Essigsäureanhydrid 8:1:1, 2.0 mL) und Cap B (THF:*N*-Methylimidazol 84:16, 2.0 mL) gegeben und die Suspension wurde 1.5 h gerührt. Anschließend wurde der Rückstand durch Zentrifugation (4000 g, 3 min, Rt.) vom Lösungsmittel getrennt, mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

**Ausbeute (23):** 369 mg (58 μmol/g) eines weißen Pulvers.

### 7.6.47 2-Cyanoethylchlorformiat **65**

**65****66**

Triphosgen (1.00 g, 3.37 mmol) wurde in abs. THF (8.0 mL) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. 3-Hydroxypropionitril (481 mg, 460 μL, 6.72 mmol) wurde in abs.

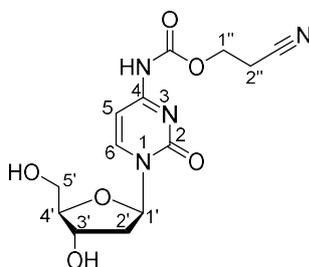
THF (5.0 mL) gelöst und über 2 h unter Rühren zu der Triphosgen-Lösung getropft. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 17 h gerührt. Anschließend wurde das Gemisch auf 0 °C gekühlt und abs. Pyridin (795 mg, 813  $\mu$ L, 9.78 mmol) wurde zugetropft. Das Gemisch wurde erneut auf Raumtemperatur erwärmt und 1 h gerührt. Der Rückstand wurde abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingeeengt. Aufgrund der Instabilität und der geplanten direkten Umsetzung von Verbindung **65** wurde auf eine vollständige Charakterisierung verzichtet.

**Ausbeute (65):** 422 mg eines orangen Öls, laut  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ca. 91% Produkt **65** und 9% Nebenprodukt **66** (100% Ausbeute: 880 mg).

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 3.09 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H, 1-H), 1.15 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H, 2-H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 150.15 (O(CO)Cl), 115.76 (CN), 65.20 (C-1), 16.83 (C-2).

#### 7.6.48 4-*N*-(2-Cyanoethoxycarbonyl)-2'-desoxycytidin **68**



**68**

2'-Desoxycytidin (627 mg, 2.76 mmol) wurde mit abs. Pyridin (3.0 mL) coevaporiert und anschließend in abs. Pyridin (8.0 mL) und  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5.0 mL) gelöst. Trimethylsilylchlorid (1.20 g, 1.40 mL, 11.0 mmol) wurde zugetropft und das Gemisch wurde 20 min bei Raumtemperatur gerührt. 2-Cyanoethylchlorformiat **65** (480 mg, 3.61 mmol) wurde in abs.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4.0 mL) gelöst und zu dem Reaktionsgemisch getropft. Die Lösung wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt und danach wurde MeOH (8.0 mL) zugetropft. Das

Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 10:1).

**Ausbeute (68):** 1.25 g eines gelben Schaums, laut <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum ca. 50%/50% (mol-%) Gemisch aus Produkt **68** und Pyridiniumchlorid (100% Ausbeute: 893 mg).

Das Gemisch aus Produkt **68** und Pyridiniumchlorid wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt und deswegen wurde auf eine vollständige Charakterisierung verzichtet.

**DC:** *R<sub>f</sub>* = 0.29 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 10:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 8.34 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, 6-H) 7.00 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, 5-H), 6.09 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H, 1'-H), 4.30 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, 1''-H), 4.22 (dt, *J* = 6.0 Hz, *J* = 3.7 Hz, 1H, 3'-H), 3.85 (q, *J* = 3.7 Hz, 1H, 4'-H), 3.61 (dd, *J* = 12.0 Hz, *J* = 3.7 Hz, 1H, 5'-H<sub>a</sub>), 3.56 (dd, *J* = 12.0 Hz, *J* = 3.7 Hz, 1H, 5'-H<sub>b</sub>), 2.93 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, 2''-H), 2.27 (ddd, *J* = 13.2 Hz, *J* = 6.0 Hz, *J* = 3.9 Hz, 1H, 2'-H<sub>a</sub>), 2.05-1.98 (m, 1H, 2'-H<sub>b</sub>).

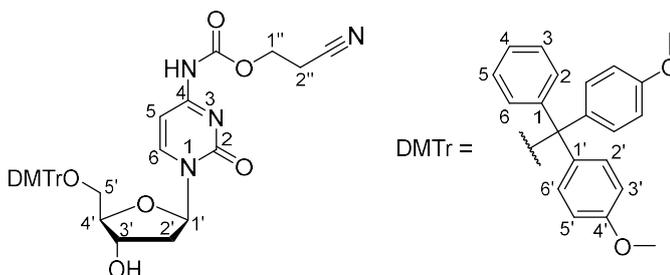
**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 162.38 (C-4), 153.99 (C-2), 152.67 (N(CO)O), 144.90 (C-6), 118.39 (C≡N), 94.34 (C-5), 87.88 (C-4'), 86.08 (C-1'), 69.81 (C-3'), 60.77 (C-5'), 60.16 (C-1''), 40.77 (C-2'), 17.62 (C-2'').

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> (324.11)

ber.: 325.1143 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 325.1136 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.6.49 4-*N*-(2-Cyanoethoxycarbonyl)-5'-*O*-DMTr-2'-desoxycytidin **69**



Das Gemisch aus 4-*N*-geschütztem 2'-Desoxycytidin **68** und Pyridiniumchlorid (1.54 g) wurden mit abs. Pyridin (2.0 mL) coevaporiert und anschließend in abs. Pyridin (13.0 mL) gelöst. DMTrCl (850 mg, 2.51 mmol) und DMAP (29.7 mg, 243  $\mu$ mol) wurden zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Ethylacetat (30 mL) aufgenommen und ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (30 mL) wurde zugegeben. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (20 mL) und ges. NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE:EtOAc 1:1 + 0.5% Pyridin + 2.5% MeOH → EtOAc:MeOH 10:1 → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 10:1).

**Ausbeute (69):** 627 mg (1.00 mmol, 48% über zwei Stufen) eines farblosen Feststoffes.

**DC:**  $R_f = 0.05$  (PE:EtOAc = 1:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 8.33-8.21 (m, 1H, 6-H), 7.43-7.36 (m, 2H, DMTr-2-H, DMTr-6-H), 7.32-7.26 (m, 7H, DMTr-3-H, DMTr-4-H, DMTr-5-H, DMTr-2'-H, DMTr-6'-H), 6.97 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, 5-H), 6.86-6.82 (m, 4H, DMTr-3'-H, DMTr-5'-H), 6.26 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H, 1'-H), 4.53-4.48 (m, 1H, 3'-H), 4.38 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H, 1''-H), 4.13-4.10 (m, 1H, 4'-H), 3.80 (s, 6H, DMTr-OCH<sub>3</sub>), 3.52 (dd,  $J = 10.8$  Hz,  $J = 3.1$  Hz, 1H, 5'-H<sub>a</sub>), 3.42 (dd,  $J = 10.8$  Hz,  $J = 3.6$  Hz, 1H, 5'-H<sub>b</sub>), 2.94 (s, 1H, OH), 2.77 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H, 2''-H), 2.75-2.68 (m, 1H, 2'-H<sub>a</sub>), 2.30-2.23 (m, 1H, 2'-H<sub>b</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 162.10 (C-4), 158.83 (C-2), 158.82 (DMTr-C-4'), 149.94 (N(CO)O), 144.33 (C-6), 136.14 (DMTr-C-1), 135.58 (DMTr-C-1'), 135.46 (DMTr-C-1'), 130.21, 130.17 (DMTr-C-3, DMTr-C-5), 129.26 (C-5), 128.27, 128.17 (DMTr-C-2, DMTr-C-6), 127.29 (DMTr-C-4), 123.89 (DMTr-C-2', DMTr-C-6'), 116.53 (CN), 113.45 (DMTr-C-3', DMTr-C-5'), 87.16 (C-1'), 86.44 (C-4'), 70.79 (C-3'), 62.64 (C-5'), 60.27 (C-1''), 55.39 (DMTr-OCH<sub>3</sub>), 42.04 (C-2'), 18.22 (C-2'').

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3255, 2931, 1750, 1648, 1499, 1175, 1030, 789, 725, 582.

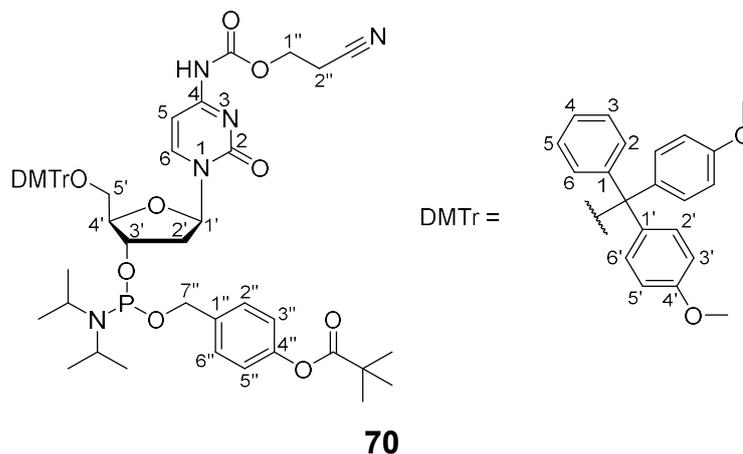
**UV/Vis** (MeOH):  $\lambda_{\max} = 216, 236, 284, 303$ .

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> (626.23)

ber.: 627.2449 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 627.2438 [M+H]<sup>+</sup>.

### 7.6.50 2'-Desoxycytidin-abgeleitetes Phosphoramidit **70**



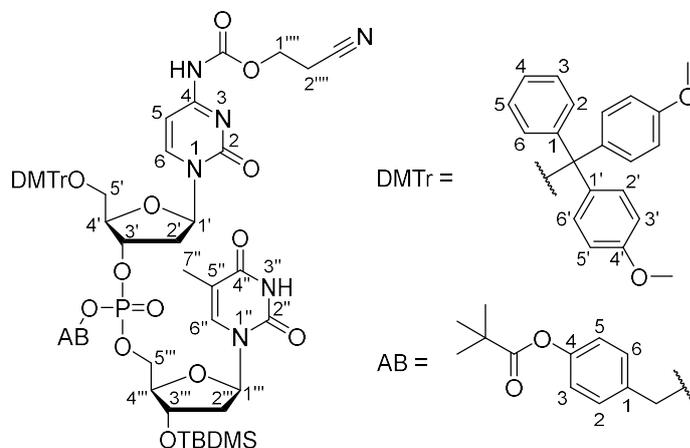
Geschütztes 2'-Desoxycytidin **69** (590 mg, 950  $\mu\text{mol}$ ) wurde in einem Gemisch aus abs. MeCN (4.0 mL) und abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) gelöst. Diamidit **29b** (420 mg, 950  $\mu\text{mol}$ , in 2 mL abs. MeCN) und DCI (110 mg, 950  $\mu\text{mol}$ ) wurden zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 30:1 + 1% Pyridin). Daraufhin wurde eine Fällung des Produktes durchgeführt. Hierfür wurde die entsprechende Säulenfraktion (398 mg) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.0 mL) gelöst und zu 0 °C kaltem *n*-Hexan (17 mL) getropft. Das Gemisch wurde 10 min bei -25 °C gelagert und anschließend wurde das Produkt durch Zentrifugation (4000 g, 10 min, 0°C) vom Lösungsmittel getrennt. Der Rückstand wurde im Vakuum getrocknet.

**Ausbeute (70):** 317 mg eines farblosen Feststoffes als ein Gemisch aus zwei Diastereomeren (d.r. ~1:1), laut <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum ca. 80% Produkt **70** (100% Ausbeute: 906 mg).

**DC:**  $R_f = 0.30$  (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 30:1 + 1% Pyridin).

$^{31}\text{P-NMR}$  (202 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 162.66, 162.07.

### 7.6.51 Geschütztes C-T-Dinucleotid-Prodrug **71**



**71**

3'-O-TBDMS-Tyridin **43** (100 mg, 281  $\mu\text{mol}$ ) wurde in abs. MeCN (2.0 mL) vorgelegt und DCI (33.2 mg, 281  $\mu\text{mol}$ ) und Phosphoramidit **70** (260 mg, 279  $\mu\text{mol}$ , in 3.0 mL abs. MeCN) wurden zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf 0°C gekühlt. Eine *t*-BuOOH-Lösung (5.5 M in *n*-Decan, 0.10 mL, 0.56 mmol) wurde zugetropft und das Gemisch weitere 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH 30:1 + 0.5% Pyridin).

**Ausbeute (71):** 161 mg (130  $\mu\text{mol}$ , 47%) eines farblosen Feststoffes als ein Gemisch aus zwei Diastereomeren (d.r. ~1.1:0.9).

**DC:**  $R_f$  = 0.20 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH 30:1).

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 9.08 (s, 1H, NH), 8.72 (s, 1H, NH), 8.16-8.01 (m, 2x 1H, 6-H), 7.37-7.26 (m, 2x 7H, 6''-H, DMTr-2'-H, DMTr-6'-H, AB-3-H, AB-5-H), 7.26-7.20 (m, 2x 5H, DMTr-2-H, DMTr-3-H, DMTr-4-H, DMTr-5-H, DMTr-6-H), 7.03-6.96 (m, 2x 2H, AB-2-H, AB-6-H), 6.96-6.86 (m, 2x 1H, 5-H), 6.86-6.79 (m, 2x 4H, DMTr-3'-H, DMTr-5'-H), 6.28-6.17 (m, 2x 2H 1'-H, 1''-H), 5.14-5.10 (m, 2x 1H, 3'-H), 5.04-4.91 (m, 2x 2H, AB-CH<sub>2</sub>), 4.38-

4.30 (m, 2x 3H, 3'''-H, 1''''-H), 4.23-4.18 (m, 2x 1H, 4'''-H), 4.17-4.05 (m, 2x 2H, 5'''-H), 3.98-3.91 (m, 2x 2H, 4'-H), 3.80-3.75 (m, 2x 6H, DMTr-OCH<sub>3</sub>), 3.48-3.32 (m, 2x 2H, 5'''-H), 2.73 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2x 2H, 2''''-H), 2.42-2.20 (m, 2x 2H, 2'-H), 2.12-2.04 (m, 2x 1H, 2'''-H<sub>a</sub>), 2.00-1.94 (m, 2x 1H, 2'''-H<sub>b</sub>), 1.87-1.81 (m, 2x 3H, 7''-H), 1.33 (s, 2x 6H, AB-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.33 (s, 2x 3H, AB-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.86 (s, 2x 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.07, 0.06, 0.06, 0.05 (s, 2x 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 176.81 (AB-O(CO)), 163.66 (C-4''), 163.57 (C-4), 158.71 (DMTr-C4'), 158.68 (DMTr-C4'), 151.56 (C-2), 151.48 (C-2''), 150.08 (N(CO)O), 143.89 (DMTr-C-1), 143.86 (C-6), 135.63 (C-5), 135.06 (C-1'), 134.84 (C-1'), 132.45 (AB-C-4), 130.06, 129.96 (DMTr-C-3, DMTr-C-4, DMTr-C-6, DMTr-C-7), 129.34, 129.19 (AB-C-3, AB-C-5), 128.02 (DMTr-C-2', DMTr-C-6'), 127.18 (DMTr-C-5), 122.01, 121.92 (AB-C-2, AB-C-6), 116.41 (-CN), 113.31 (DMTr-C-3', DMTr-C-5'), 110.97 (C-5''), 87.16 (DMTr-C<sub>q</sub>), 85.38 (C-5), 86.88, 85.06 (C-1', C-1'''), 84.83, 84.77 (C-4', C-4'''), 77.49 (C-3'''), 77.26 (C-3'''), 71.44 (C-3'), 71.42 (C-3'), 69.40 (d,  $J = 5.9$  Hz, AB<sub>a</sub>-CH<sub>2</sub>), 69.26 (d,  $J = 5.4$  Hz, AB<sub>b</sub>-CH<sub>2</sub>), 66.86 (C-5'), 62.31 (C-5'), 61.92 (C-5'), 60.08 (C-1'''), 55.18 (DMTr-OCH<sub>3</sub>), 53.39 (AB-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 40.42 (C-2', C-2'''), 39.01 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 27.03 (AB-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.61 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 17.92 (C-2''''), 17.82 (C-2''''), 12.42 (C-7''), 12.36 (C-7''), -4.75 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -4.92 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -4.89 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**<sup>31</sup>P-NMR** (202 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = -1.56, -1.58.

**Drehwert:**  $[\alpha]^{20}_D = 22.0$  (c = 3.1, MeOH).

**Schmelzpunkt:**  $T_m = 95$  °C.

**IR** (ATR):  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3181, 3055, 2955, 2931, 1749, 1683, 1624, 1507, 1250, 1197, 1002, 832, 583.

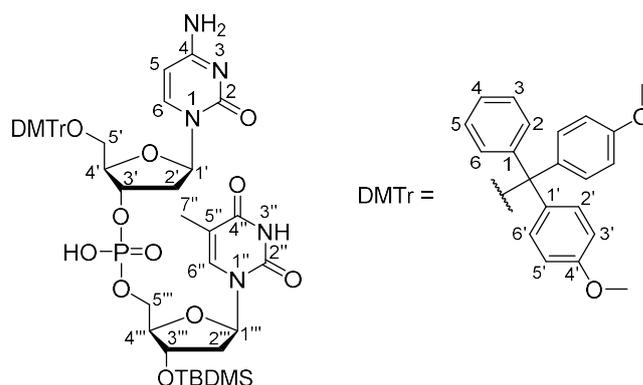
**UV/Vis** (H<sub>2</sub>O/MeCN 60/40):  $\lambda_{max} = 204, 236, 273$ .

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>62</sub>H<sub>75</sub>N<sub>6</sub>O<sub>17</sub>PSi (1234.47)

ber.: 1235.4768 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 1235.4753 [M+H]<sup>+</sup>.

## 7.6.52 Geschütztes C-T-Dinucleotid 72



72

Das Phosphat **71** (10.3 mg, 8.34  $\mu\text{mol}$ ) wurde in einer Mischung aus Ammoniumhydroxid-Lösung (28%  $\text{NH}_3$ , 3.0 mL) und Ethanol (1.0 mL) gelöst und 20 h bei 55°C inkubiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde mittels präparativer DC gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 10:1$ ). Die Extraktion erfolgte mit Methanol (4 mL).

**Ausbeute (72):** 2.3 mg (2.4  $\mu\text{mol}$ , 28%) eines farblosen Feststoffes.

**DC:**  $R_f = 0.02$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} 10:1$ ).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.89-7.86 (m, 1H, 6''-H), 7.59 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H, 6-H), 7.39-7.27 (m, 4H, DMTr-2'-H, DMTr-6'-H), 7.27-7.17 (m, 5H, DMTr-2-H, DMTr-3-H, DMTr-4-H, DMTr-5-H, DMTr-6-H), 6.89-6.84 (m, 4H, DMTr-3'-H, DMTr-5'-H), 6.22-6.16 (m, 2H 1'-H, 1'''-H), 5.49 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H, 5-H), 4.72-4.66 (m, 1H, 3'-H), 4.42-4.39 (m, 1H, 3'''-H), 4.11-4.07 (m, 1H, 4'-H), 3.83-3.80 (m, 1H, 4'''-H), 3.75-3.71 (m, 6H, DMTr-OCH<sub>3</sub>), 3.24 (dd,  $J = 10.4$  Hz,  $J = 4.7$  Hz, 1H, 5'-H<sub>a</sub>), 3.18-3.12 (m, 1H, 5'-H<sub>b</sub>), 2.35-2.29 (m, 1H, 2'-H<sub>a</sub>), 2.19-2.11 (m, 1H, 2'''-H<sub>a</sub>), 2.09-2.00 (m, 1H, 2'-H<sub>b</sub>), 1.96-1.90 (m, 1H, 2'''-H<sub>b</sub>), 1.74 (d,  $J = 1.1$  Hz, 3H, 7''-H), 0.84 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.04 (s, 3H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\text{CH}_3)_2$ ), 0.03 (s, 3H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}(\text{CH}_3)_2$ ).

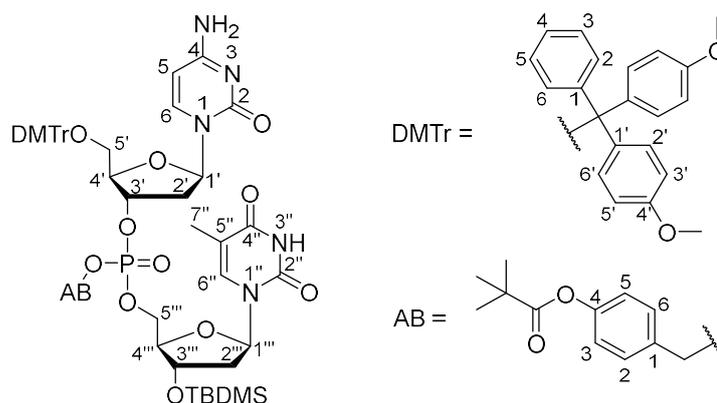
Das 5'''-H-Signal wurde nicht gefunden.

**$^{31}\text{P-NMR}$**  (202 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = -1.82.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $\text{C}_{46}\text{H}_{58}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{PSi}$  (947.35)

ber.: 948.36  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,

gef.: 948.54  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

7.6.53 Basen-entschütztes C-T-Dinucleotid-Prodrug **73****73**

Das Phosphat **71** (12.1 mg, 9.80  $\mu\text{mol}$ ) wurde im Vakuum getrocknet. Anschließend wurde eine Lösung von DBU (2.0 mL, 100  $\mu\text{mol}$ , 0.05 M in abs. MeCN mit 5% v/v Morpholin) zugegeben und das Gemisch wurde 6 h bei 40°C gerührt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer DC gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  10:1). Die Extraktion erfolgte mit einem Lösungsmittelgemisch aus MeCN und  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1, 4 mL).

**Ausbeute (73):** 2.1 mg (1.9  $\mu\text{mol}$ , 20%) eines farblosen Feststoffes als ein Gemisch aus zwei Diastereomeren (d.r. ~1.2:0.8).

**DC:**  $R_f = 0.43$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  10:1).

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.79 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, 6-H), 7.77 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, 6-H), 7.38-7.27 (m, 2x 7H, 6''-H, DMTr-2'-H, DMTr-6'-H, AB-3-H, AB-5-H), 7.25-7.20 (m, 2x 5H, DMTr-2-H, DMTr-3-H, DMTr-4-H, DMTr-5-H, DMTr-6-H), 7.06-6.97 (m, 2x 2H, AB-2-H, AB-6-H), 6.87-6.80 (m, 4H, DMTr-3'-H, DMTr-5'-H), 6.26-6.17 (m, 2H, 1'-H, 1'''-H), 5.62 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H, 5-H), 5.55 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H, 5-H), 5.13-5.07 (m, 2x 1H, 3'-H), 5.05-4.90 (m, 2x 2H, AB-CH<sub>2</sub>), 4.39-4.34 (m, 2x 1H, 3'''-H), 4.18-4.04 (m, 2x 3H, 4'-H, 5'''-H), 3.97-3.91 (m, 2x 1H, 4'''-H), 3.79 (s, 3H, DMTr-OCH<sub>3</sub>), 3.79 (s, 3H, DMTr-OCH<sub>3</sub>), 3.78 (s, 3H, DMTr-OCH<sub>3</sub>), 3.77 (s, 3H, DMTr-OCH<sub>3</sub>), 3.43 (dd,  $J = 10.7$  Hz,  $J = 3.2$  Hz, 2x 1H, 5'-H<sub>a</sub>), 3.32 (dd,  $J = 10.7$  Hz,  $J = 3.2$  Hz, 2x 1H, 5'-H<sub>b</sub>), 2.82-2.69 (m, 2x 2H, 2'-H), 2.30-2.19 (m, 2x 2H, 2'''-H), 1.87 (d,  $J = 1.2$  Hz, 3H, 7''-H), 1.86 (d,  $J = 1.2$  Hz, 3H, 7'''-H), 1.34 (s, 2x 9H, AB-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.87 (s, 9H,

(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.87 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.07 (s, 2x 3H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0.06 (s, 2x 3H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

<sup>31</sup>P-NMR (202 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = -1.64, -1.68.

**MS** (ESI<sup>+</sup>): C<sub>58</sub>H<sub>72</sub>N<sub>5</sub>O<sub>15</sub>PSi (1137.45)

ber.: 1138.46 [M+H]<sup>+</sup>,

gef.: 1138.79 [M+H]<sup>+</sup>.

## Literatur

- [1] J. D. Stanaway, A. D. Flaxman, M. Naghavi, C. Fitzmaurice, T. Vos, I. Abubakar, L. J. Abu-Raddad, R. Assadi, N. Bhala, B. Cowie, et al., The global burden of viral hepatitis from 1990 to 2013: findings from the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet* **2016**, *388*, 1081–1088.
- [2] World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018, *Press Release N° 263* (12.September 2018).
- [3] H. Steudel, A. Kossel, Ueber das Thymin. *Z. für Physiol. Chem.* **1900**, *29*, 303–304.
- [4] A. Kossel, H. Steudel, Ueber das Cytosin. *Z. für Physiol. Chem.* **1902**, *37*, 377–380.
- [5] A. Kossel, H. Steudel, Ueber einen basischen Bestandtheil thierischer Zellen. *Z. für Physiol. Chem.* **1902**, *37*, 177–179.
- [6] R. Altmann, Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen, Veit, Leipzig, **1890**.
- [7] P. A. Levene, The Structure of yeast Nucleic Acid IV. Ammonia Hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **1919**, *40*, 415–424.
- [8] O. T. Avery, C. M. MacLeod, M. McCarty, Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types: Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii. *J. Exp. Med.* **1944**, *79*, 137–158.
- [9] E. Chargaff, Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. *Experientia* **1950**, *6*, 201–209.
- [10] R. E. Franklin, R. G. Gosling, Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate. *Nature* **1953**, *171*, 740.
- [11] J. D. Watson, F. H. C. Crick, Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **1953**, *171*, 737–738.
- [12] B. D. Hall, S. Spiegelman, Sequence Complementarity of T2-DNA and T2-Specific RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1961**, *47*, 137–146.
- [13] A. Rich, A Hybrid Helix Containing Both Deoxyribose and Ribose Polynucleotides and Its Relation to the Transfer of Information Between the Nucleic Acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1960**, *46*, 1044–1053.
- [14] A. H.-J. Wang, G. J. Quigley, F. J. Kolpak, J. L. Crawford, J. H. van Boom, G. van der Marel, A. Rich, Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution. *Nature* **1979**, *282*, 680.
- [15] M. H. Caruthers, Chemical synthesis of DNA and DNA analogs. *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 278–284.
- [16] P. C. Zamecnik, M. L. Stephenson, Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1978**, *75*, 280–284.
- [17] E. Uhlmann, A. Peyman, Antisense oligonucleotides: a new therapeutic principle. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 543–584.
- [18] V. K. Sharma, P. Rungta, A. K. Prasad, Nucleic acid therapeutics: basic concepts and recent developments. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 16618–16631.
- [19] L. E. Xodo, S. Cogoi and V. Rapozzi, Anti-Gene Strategies to Down-Regulate Gene Expression in Mammalian Cells. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 805 - 819.

- [20] R. W. Wagner, Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature* **1994**, *372*, 333.
- [21] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **1998**, *391*, 806–811.
- [22] C. C. Mello, Zurück zur RNAi-Welt: Gedanken zur Genexpression und Evolution (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7114–7124; Return to the RNAi world: Rethinking gene expression and evolution. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6985–6994.
- [23] J. Kurreck, RNA-Interferenz: von den Grundlagen zur therapeutischen Anwendung. *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1404–1426; RNA Interference: From Basic Research to Therapeutic Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1378–1398.
- [24] S. Akhtar, R. Kole, R. L. Juliano, Stability of antisense DNA oligodeoxynucleotide analogs in cellular extracts and sera. *Life Sci.* **1991**, *49*, 1793–1801.
- [25] V. K. Sharma, R. K. Sharma, S. K. Singh, Antisense oligonucleotides: modifications and clinical trials. *MedChemComm* **2014**, *5*, 1454–1471.
- [26] J. Guhaniyogi, G. Brewer, Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene* **2001**, *265*, 11–23.
- [27] J. Kondo, W. Adachi, S. Umeda, T. Sunami, A. Takénaka, Crystal structures of a DNA octaplex with I-motif of G-quartets and its splitting into two quadruplexes suggest a folding mechanism of eight tandem repeats. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 2541–2549.
- [28] S. Burge, G. N. Parkinson, P. Hazel, A. K. Todd, S. Neidle, Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5402–5415.
- [29] A. H. Dalpke, K. Heeg, CpG-DNA as immune response modifier. *Int. J. Med. Microbiol.* **2004**, *294*, 345–354.
- [30] R. B. Wallace, J. Shaffer, R. F. Murphy, J. Bonner, T. Hirose, K. Itakura, Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to  $\Phi$  X 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res.* **1979**, *6*, 3543–3558.
- [31] S. M. Freier, R. Kierzek, J. A. Jaeger, N. Sugimoto, M. H. Caruthers, T. Neilson, D. H. Turner, Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1986**, *83*, 9373–9377.
- [32] M. Mäe, Ü. Langel, Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, *6*, 509–514.
- [33] K. E. Lundin, O. Gissberg, C. I. E. Smith, Oligonucleotide Therapies: The Past and the Present. *Hum. Gene Ther.* **2015**, *26*, 475–485.
- [34] A. Rich, DNA comes in many forms. *Gene* **1993**, *135*, 99–109.
- [35] J. K. Watts, B. D. Johnston, K. Jayakanthan, A. S. Wahba, B. M. Pinto, M. J. Damha, Synthesis and Biophysical Characterization of Oligonucleotides Containing a 4'-Selenonucleotide. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8578–8579.

- [36] L. H. Koole, J. Plavec, H. Liu, B. R. Vincent, M. R. Dyson, P. L. Coe, R. T. Walker, G. W. Hardy, S. G. Rahim, J. Chattopadhyaya, Conformation of two 4'-thio-2'-deoxynucleoside analogs studied by 500-MHz proton NMR spectroscopy and x-ray crystallography. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9936–9943.
- [37] N. Inoue, N. Minakawa, A. Matsuda, Synthesis and properties of 4'-ThioDNA: unexpected RNA-like behavior of 4'-ThioDNA. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 3476–3483.
- [38] S. M. Freier, K.-H. Altmann, The ups and downs of nucleic acid duplex stability: Structure-stability studies on chemically-modified DNA:RNA duplexes. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4429–4443.
- [39] B. Cuenoud, F. Casset, D. Hüsken, F. Natt, R. M. Wolf, K.-H. Altmann, P. Martin, H. E. Moser, Zweifache Erkennung von doppelsträngiger DNA durch 2'-Aminoethoxy-modifizierte Oligonucleotide. *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1350–1353; Dual Recognition of Double-Stranded DNA by 2'-Aminoethoxy-Modified Oligonucleotides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1288–1291.
- [40] A. A. Koshkin, S. K. Singh, P. Nielsen, V. K. Rajwanshi, R. Kumar, M. Meldgaard, C. E. Olsen, J. Wengel, LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3607–3630.
- [41] S. K. Singh, A. A. Koshkin, J. Wengel, P. Nielsen, LNA (locked nucleic acids): Synthesis and high-affinity nucleic acid recognition. *Chem. Commun.* **1998**, 455–456.
- [42] S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, K. Morio, Y. In, T. Ishida, T. Imanishi, Synthesis of 2'-O,4'-C-methyleneuridine and -cytidine. Novel bicyclic nucleosides having a fixed C<sub>3</sub>, -endo sugar pucker. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8735–8738.
- [43] H. Liu, J. Gao, S. R. Lynch, Y. D. Saito, L. Maynard, E. T. Kool, A Four-Base Paired Genetic Helix with Expanded Size. *Science* **2003**, *302*, 868–871.
- [44] B. D. Heuberger, C. Switzer, An Alternative Nucleobase Code: Characterization of Purine–Purine DNA Double Helices bearing Guanine–Isoguanine and Diaminopurine 7-Deaza-Xanthine Base Pairs. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2779–2783.
- [45] Y. Doi, J. Chiba, T. Morikawa, M. Inouye, Artificial DNA Made Exclusively of Nonnatural C-Nucleosides with Four Types of Nonnatural Bases. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8762–8768.
- [46] J. Kumamoto, F. H. Westheimer, The Hydrolysis of Mono- and Dibenzyl Phosphates. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 2515–2518.
- [47] A. P. Spork, C. Ducho, Novel 5'-deoxy nucleosyl amino acid scaffolds for the synthesis of muraymycin analogues. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2323–2326.

- [48] K. Sato, R. Tawarada, K. Seio, M. Sekine, Synthesis and Structural Properties of New Oligodeoxynucleotide Analogues Containing a 2',5'-Internucleotidic Squaryldiamide Linkage Capable of Formation of a Watson-Crick Base Pair with Adenine and a Wobble Base Pair with Guanine at the 3'-Downstream Junction Site. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 2142–2150.
- [49] S. Spitzer, F. Eckstein, Inhibition of deoxyribonucleases by phosphorothioate groups in oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 11691–11704.
- [50] M. Stessl, C. R. Noe, J. Winkler, From Nucleic Acids Sequences to Molecular Medicine - Off-Target Effects and Safety Aspects of Phosphorothioate Oligonucleotides, *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, **2012**, 67–83.
- [51] C. A. Stein, C. Subasinghe, K. Shinozuka, J. S. Cohen, Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 3209–3221.
- [52] D. A. Brown, S. H. Kang, S. M. Gryaznov, L. DeDionisio, O. Heidenreich, S. Sullivan, X. Xu, M. I. Nerenberg, Effect of phosphorothioate modification of oligodeoxynucleotides on specific protein binding. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 26801–26805.
- [53] C. M. Yamada, D. J. Dellinger, M. H. Caruthers, Synthesis and Biochemical Evaluation of Phosphonoformate Oligodeoxyribonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5251–5261.
- [54] D. Sheehan, B. Lunstad, C. M. Yamada, B. G. Stell, M. H. Caruthers, D. J. Dellinger, Biochemical properties of phosphonoacetate and thiophosphonoacetate oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 4109–4118.
- [55] S. K. Miroshnichenko, O. A. Patutina, E. A. Burakova, B. P. Chelobanov, A. A. Fokina, V. V. Vlassov, S. Altman, M. A. Zenkova, D. A. Stetsenko, Methyl phosphoramidate antisense oligonucleotides as an alternative to phosphorothioates with improved biochemical and biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116*, 1229–1234.
- [56] A. De Mesmaeker, R. Haener, P. Martin, H. E. Moser, Antisense Oligonucleotides. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 366–374.
- [57] P. S. Miller, J. Yano, E. Yano, C. Carroll, K. Jayaraman, P. O. P. Ts'o, Nonionic nucleic acid analogues. Synthesis and characterization of dideoxyribonucleoside methylphosphonates. *Biochemistry* **1979**, *18*, 5134–5143.
- [58] S. A. Benner, D. Hutter, Phosphates, DNA, and the Search for Nonterrestrial Life: A Second Generation Model for Genetic Molecules. *Bioorg. Chem.* **2002**, *30*, 62–80.
- [59] C. Dupouy, N. Iché-Tarrat, M.-P. Durrieu, F. Rodriguez, J.-M. Escudier, A. Vigroux, Watson-Crick Base-Pairing Properties of Nucleic Acid Analogues with Stereocontrolled  $\alpha$  and  $\beta$  Torsion Angles ( $\alpha,\beta$ -D-CNAs). *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3705–3709; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3626–3627.
- [60] A. Boissonnet, C. Dupouy, P. Millard, M.-P. Durrieu, N. Tarrat, J.-M. Escudier,  $\alpha,\beta$ -D-CNA featuring canonical and noncanonical  $\alpha/\beta$  torsional angles behaviours within oligonucleotides. *New J. Chem.* **2011**, *35*, 1528–1533.

- [61] H. Ozaki, M. Kitamura, K. Yamana, A. Murakami, T. Shimidzu, Syntheses and Properties of Oligothymidylate Analogs Containing Stereoregulated Phosphoromorpholidate and Phosphodiester Linkages in an Alternating Manner. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1990**, *63*, 1929–1936.
- [62] A. D. Mesmaeker, A. Waldner, J. Lebreton, P. Hoffmann, V. Fritsch, R. M. Wolf, S. M. Freier, Amidverbrückung, eine neue Art der Modifizierung von Oligonucleotidrückgraten. *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 237–240; Amides as a New Type of Backbone Modification in Oligonucleotides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 226–229.
- [63] J. Lebreton, A. Waldner, V. Fritsch, R. M. Wolf, A. De Mesmaeker, Comparison of two amides as backbone replacement of the phosphodiester linkage in oligodeoxynucleotides. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5225–5228.
- [64] A. D. Mesmaeker, J. Lebreton, A. Waldner, V. Fritsch, R. M. Wolf, S. M. Freier, Amides as Substitute for the Phosphodiester Linkage in Antisense Oligonucleotides. *Synlett* **1993**, *1993*, 733–736.
- [65] J. Lebreton, A. De Mesmaeker, A. Waldner, V. Fritsch, R. M. Wolf, S. M. Freier, Synthesis of thymidine dimer derivatives containing an amide linkage and their incorporation into oligodeoxyribonucleotides. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 6383–6386.
- [66] C. Selvam, S. Thomas, J. Abbott, S. D. Kennedy, E. Rozners, Amides as Excellent Mimics of Phosphate Linkages in RNA. *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 2116–2118; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2068–2070.
- [67] R. L. Letsinger, S. A. Bach, J. S. Eadie, Effects of pendant groups at phosphorus on binding properties of d-ApA analogues. *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 3487–3499.
- [68] R. L. Letsinger, C. N. Singman, G. Histan, M. Salunkhe, Cationic oligonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4470–4471.
- [69] N. Mignet, S. M. Gryaznov, Zwitterionic oligodeoxyribonucleotide N3'→P5' phosphoramidates: Synthesis and properties. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 431–438.
- [70] T. Michel, C. Martinand-Mari, F. Debart, B. Lebleu, I. Robbins, J.-J. Vasseur, Cationic phosphoramidate  $\alpha$ -oligonucleotides efficiently target single-stranded DNA and RNA and inhibit hepatitis C virus IRES-mediated translation. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 5282–5290.
- [71] G. Deglane, S. Abes, T. Michel, A. Laurent, M. Naval, C. Martinand-Mari, P. Prevot, E. Vives, I. Robbins, I. Barvik, et al., Combining a cationic phosphoramidate backbone and  $\alpha$ -anomeric nucleosides provides oligonucleotides with improved hybridization and cell uptake properties. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **2015**, *7*, 143–147.
- [72] S. Chaturvedi, T. Horn, R. L. Letsinger, Stabilization of Triple-Stranded Oligonucleotide Complexes: Use of Probes Containing Alternating Phosphodiester and Stereo-Uniform Cationic Phosphoramidate Linkages. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 2318–2323.
- [73] C. P. Bailey, D. L. Weeks, J. M. Dagle, Cationic oligonucleotides can mediate specific inhibition of gene expression in *Xenopus* oocytes. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 4860–4867.
- [74] T. Michel, F. Debart, J.-J. Vasseur, Efficient guanidination of the phosphate linkage towards cationic phosphoramidate oligonucleotides. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6579–6582.

- [75] R. O. Dempcy, O. Almarsson, T. C. Bruice, Design and synthesis of deoxynucleic guanidine: a polycation analogue of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 7864–7868.
- [76] A. Blaskó, R. O. Dempcy, E. E. Minyat, T. C. Bruice, Association of Short-Strand DNA Oligomers with Guanidinium-Linked Nucleosides. A Kinetic and Thermodynamic Study. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7892–7899.
- [77] D. P. Arya, T. C. Bruice, Replacement of the Negative Phosphodiester Linkages of DNA by Positive S-Methylthiourea Linkers: A Novel Approach to Putative Antisense Agents. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6619–6620.
- [78] D. P. Arya, T. C. Bruice, Positively Charged Deoxynucleic Methylthioureas: Synthesis and Binding Properties of Pentameric Thymidyl Methylthiourea. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12419–12427.
- [79] D. P. Arya, T. C. Bruice, Solid-phase synthesis of oligomeric deoxynucleic-thiourea (DNT) and deoxynucleic S-methylthiourea (DNmt): a neutral/polycationic analogue of DNA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 691–693.
- [80] B. A. Linkletter, I. E. Szabo, T. C. Bruice, Solid-Phase Synthesis of Deoxynucleic Guanidine (DNG) Oligomers and Melting Point and Circular Dichroism Analysis of Binding Fidelity of Octameric Thymidyl Oligomers with DNA Oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3888–3896.
- [81] D. P. Arya, T. C. Bruice, Triple-helix formation of DNA oligomers with methylthiourea-linked nucleosides (DNmt): A kinetic and thermodynamic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 4384–4389.
- [82] D. P. Arya, T. C. Bruice, Fidelity of Deoxynucleic S-Methylthiourea (DNmt) Binding to DNA Oligomers: Influence of C Mismatches. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10680–10684.
- [83] D. Stein, E. Foster, S.-B. Huang, D. Weller, J. Summerton, A Specificity Comparison of Four Antisense Types: Morpholino, 2'-O-Methyl RNA, DNA, and Phosphorothioate DNA. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1997**, *7*, 151–157.
- [84] S. Pérez-Rentero, J. Alguacil, J. Robles, Novel oligonucleotide analogues containing a morpholinoamidine unit. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 1171–1179.
- [85] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* **1991**, *254*, 1497–1500.
- [86] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson–Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* **1993**, *365*, 566.
- [87] P. E. Nielsen, Structural and biological properties of peptide nucleic acid (PNA). *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*, 105–110.
- [88] E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, PNAs: synthetische Polyamidnucleinsäuren mit außergewöhnlichen Bindungseigenschaften. *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2954–2983; PNA: Synthetic Polyamide Nucleic Acids with Unusual Binding Properties. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2796–2823.
- [89] S. Shakeel, S. Karim, A. Ali, Peptide nucleic acid (PNA) — a review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2006**, *81*, 892–899.

- [90] V. V. Demidov, M. D. Frank-Kamenetskii, Two sides of the coin: affinity and specificity of nucleic acid interactions. *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29*, 62–71.
- [91] A. Albert, Chemical Aspects of Selective Toxicity. *Nature* **1958**, *182*, 421.
- [92] A. Grajkowski, C. Ausín, J. S. Kauffman, J. Snyder, S. Hess, J. R. Lloyd, S. L. Beaucage, Solid-Phase Synthesis of Thermolytic DNA Oligonucleotides Functionalized with a Single 4-Hydroxy-1-butyl or 4-Phosphato-/Thiophosphato-1-butyl Thiophosphate Protecting Group. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 805–815.
- [93] X. Wang, M. Feng, L. Xiao, A. Tong, Y. Xiang, Postsynthetic Modification of DNA Phosphodiester Backbone for Photocaged DNAzyme. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 444–451.
- [94] N. Zhang, C. Tan, P. Cai, P. Zhang, Y. Zhao, Y. Jiang, The design, synthesis and evaluation of hypoxia-activated pro-oligonucleotides. *Chem. Commun.* **2009**, 3216–3218.
- [95] H. Saneyoshi, K. Iketani, K. Kondo, T. Saneyoshi, I. Okamoto, A. Ono, Synthesis and Characterization of Cell-Permeable Oligonucleotides Bearing Reduction-Activated Protecting Groups on the Internucleotide Linkages. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27*, 2149–2156.
- [96] H. Saneyoshi, Y. Hiyoshi, K. Iketani, K. Kondo, A. Ono, Bioreductive deprotection of 4-nitrobenzyl group on thymine base in oligonucleotides for the activation of duplex formation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 5632–5635.
- [97] U. Pradere, E. C. Garnier-Amblard, S. J. Coats, F. Amblard, R. F. Schinazi, Synthesis of Nucleoside Phosphate and Phosphonate Prodrugs. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 9154–9218.
- [98] G. Tosquellas, K. Alvarez, C. Dell'Aquila, F. Morvan, J.-J. Vasseur, J.-L. Imbach, B. Rayner, The pro-oligonucleotide approach: Solid phase synthesis and preliminary evaluation of model pro-dodecathymidylates. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 2069–2074.
- [99] R. P. Iyer, D. Yu, S. Agrawal, Prodrugs of Oligonucleotides: The Acyloxyalkyl Esters of Oligodeoxyribonucleoside Phosphorothioates. *Bioorg. Chem.* **1995**, *23*, 1–21.
- [100] R. P. Iyer, N. Ho, D. Yu, S. Agrawal, Bioreversible oligonucleotide conjugates by site-specific derivatization. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 871–876.
- [101] R. P. Mauritz, F. S. Schmelz, C. Meier, Elucidation of the Hydrolytical Properties of  $\alpha$ -Hydroxybenzylphosphonates as a New Potential Pro-Oligonucleotide Concept. *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18*, 1417–1418.
- [102] H. J. Jessen, T. Schulz, J. Balzarini, C. Meier, Bioreversible Maskierung von Nucleosiddiphosphaten. *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8847–8850; Bioreversible protection of nucleoside diphosphates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8719–8722.
- [103] I. Pavlovic, D. T. Thakor, L. Bigler, M. S. C. Wilson, D. Laha, G. Schaaf, A. Saiardi, H. J. Jessen, Prometabolites of 5-Diphospho-myo-inositol Pentakisphosphate. *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 9758–9762; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *10*, 9622–9626.
- [104] E. Vivès, C. Dell'Aquila, J.-C. Bologna, F. Morvan, B. Rayner, J.-L. Imbach, Lipophilic pro-oligonucleotides are rapidly and efficiently internalized in HeLa cells. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 4071–4076.

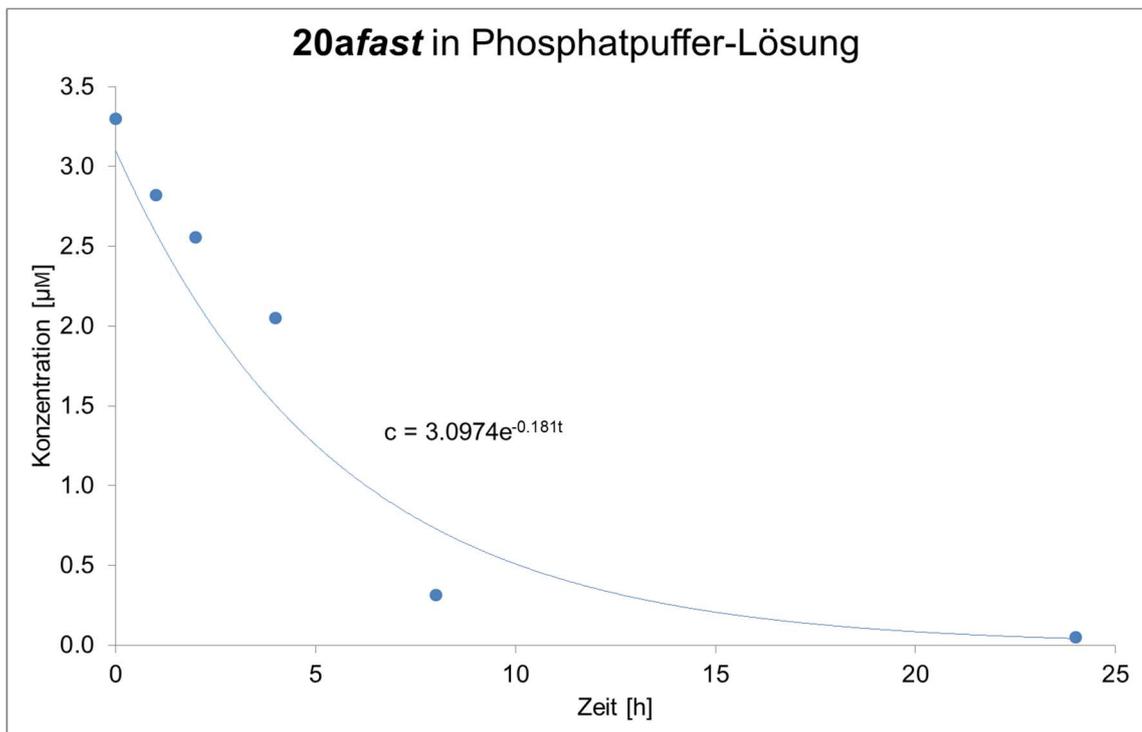
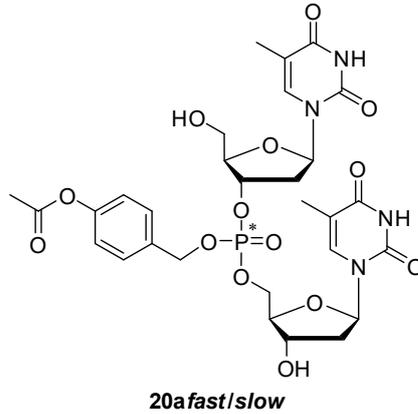
- [105] J.-C. Bologna, E. Vivès, J.-L. Imbach, F. Morvan, Uptake and Quantification of Intracellular Concentration of Lipophilic Pro-Oligonucleotides in HeLa Cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2002**, *12*, 33–41.
- [106] T. Lioux, I. Lefebvre, J. J. Vasseur, J. L. Imbach, Prooligonucleotide metabolism in a crude cell extract followed by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, *13*, 1645–1649.
- [107] J.-C. Brès, F. Morvan, I. Lefebvre, J.-J. Vasseur, A. Pompon, J.-L. Imbach, Kinetics study of the biotransformation of an oligonucleotide prodrug in cells extract by matrix-assisted laser desorption–ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* **2001**, *753*, 123–130.
- [108] K. Alvarez, J.-J. Vasseur, T. Beltran, J.-L. Imbach, Photocleavable Protecting Groups as Nucleobase Protections allowed the Solid-Phase Synthesis of Base-Sensitive SATE-Prooligonucleotides. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6319–6328.
- [109] N. Spinelli, A. Meyer, Y. Hayakawa, J.-L. Imbach, J.-J. Vasseur, Use of Allylic Protecting Groups for the Synthesis of Base-Sensitive Prooligonucleotides. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 49–56.
- [110] T. Guerlavais-Dagland, A. Meyer, J.-L. Imbach, F. Morvan, Fluoride-Labile Protecting Groups for the Synthesis of Base-Sensitive Methyl-SATE Oligonucleotide Prodrugs. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2327–2335.
- [111] B. R. Meade, K. Gogoi, A. S. Hamil, C. Palm-Apergi, A. van den Berg, J. C. Hagopian, A. D. Springer, A. Eguchi, A. D. Kacsinta, C. F. Dowdy, et al., Efficient delivery of RNAi prodrugs containing reversible charge-neutralizing phosphotriester backbone modifications. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 1256–1261.
- [112] A. Khvorova, M. F. Osborn, M. R. Hassler, Taking charge of siRNA delivery. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 1197–1198.
- [113] C. Ducho, Enzymatically Cleavable siRNA Prodrugs: a New Paradigm for the Intracellular Delivery of RNA-Based Therapeutics. *ChemMedChem* **2015**, *10*, 1625–1627.
- [114] N. Parey, C. Baraguey, J.-J. Vasseur, F. Debart, First Evaluation of Acyloxymethyl or Acylthiomethyl Groups as Biolabile 2'-O-Protections of RNA. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3869–3872.
- [115] A. R. Martin, T. Lavergne, J.-J. Vasseur, F. Debart, Assessment of new 2'-O-acetalester protecting groups for regular RNA synthesis and original 2'-modified proRNA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 4046–4049.
- [116] A. Biscans, M. Bos, A. R. Martin, N. Ader, G. Sczakiel, J.-J. Vasseur, C. Dupouy, F. Debart, Direct Synthesis of Partially Modified 2'-O-Pivaloyloxymethyl RNAs by a Base-Labile Protecting Group Strategy and their Potential for Prodrug-Based Gene-Silencing Applications. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2674–2679.
- [117] A. Biscans, J.-R. Bertrand, J. Dubois, J. Rüger, J.-J. Vasseur, G. Sczakiel, C. Dupouy, F. Debart, Lipophilic 2'-O-Acetal Ester RNAs: Synthesis, Thermal Duplex Stability, Nuclease Resistance, Cellular Uptake, and siRNA Activity after Spontaneous Naked Delivery. *ChemBioChem* **2016**, *17*, 2054–2062.
- [118] H. G. Khorana, Total synthesis of a gene. *Science* **1979**, *203*, 614–625.

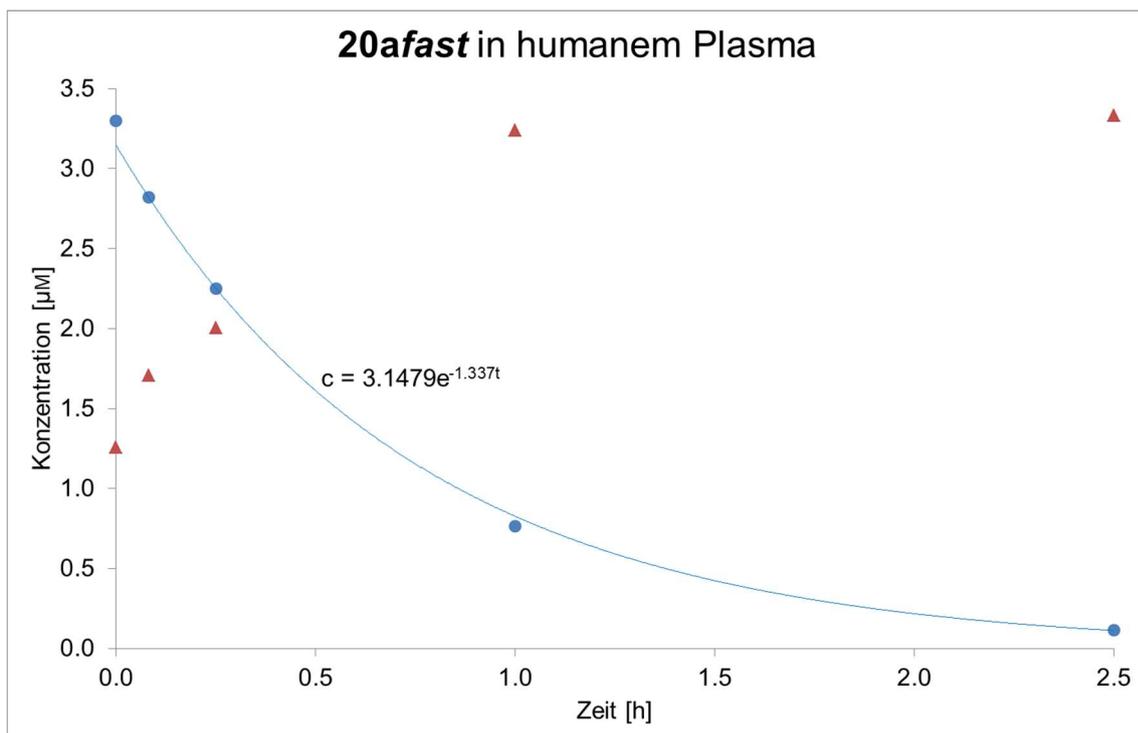
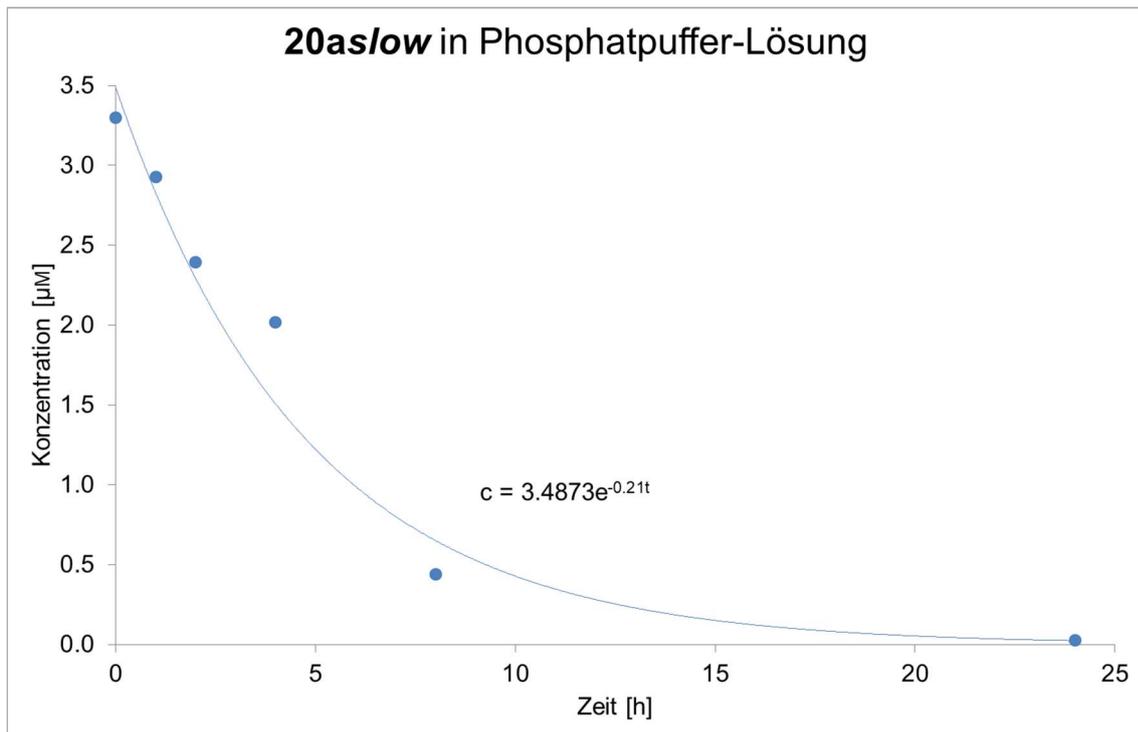
- [119] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, Deoxynucleoside phosphoramidites—A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859–1862.
- [120] S. L. Beaucage, R. P. Iyer, Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 2223–2311.
- [121] S. L. Beaucage, R. P. Iyer, The Functionalization of Oligonucleotides Via Phosphoramidite Derivatives. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 1925–1963.
- [122] S. L. Beaucage, R. P. Iyer, The synthesis of modified oligonucleotides by the phosphoramidite approach and their applications. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 6123–6194.
- [123] T. Suzuki, S. Ohsumi, K. Makino, Mechanistic studies on depurination and apurinic site chain breakage in oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4997–5003.
- [124] J. Salon, B. Zhang, Z. Huang, Mild Detritylation of Nucleic Acid Hydroxyl Groups by Warming Up. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2011**, *30*, 271–279.
- [125] L. C. J. Gillet, J. Alzeer, O. D. Schäerer, Site-specific incorporation of N - (deoxyguanosin-8-yl)-2-acetylaminofluorene (dG-AAF) into oligonucleotides using modified 'ultra-mild' DNA synthesis. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 1961–1969.
- [126] Y. Hayakawa, M. Uchiyama, R. Noyori, Nonaqueous oxidation of nucleoside phosphites to the phosphates. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4191–4194.
- [127] J. G. Hill, B. E. Rossiter, K. B. Sharpless, Anhydrous tert-butyl hydroperoxide in toluene: the preferred reagent for applications requiring dry TBHP. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3607–3608.
- [128] R. P. Iyer, W. Egan, J. B. Regan, S. L. Beaucage, 3H-1,2-Benzodithiole-3-one 1,1-dioxide as an improved sulfurizing reagent in the solid-phase synthesis of oligodeoxyribonucleoside phosphorothioates. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1253–1254.
- [129] A. P. Guzaev, Reactivity of 3H-1,2,4-dithiazole-3-thiones and 3H-1,2-dithiole-3-thiones as sulfurizing agents for oligonucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 434–437.
- [130] R. J. T. Mikkelsen, K. E. Grier, K. T. Mortensen, T. E. Nielsen, K. Qvortrup, Photolabile Linkers for Solid-Phase Synthesis. *ACS Comb. Sci.* **2018**, *20*, 377–399.
- [131] C. H. Bamford, R. G. W. Norrish, 359. Primary photochemical reactions. Part VII. Photochemical decomposition of isovaleraldehyde and di-n-propyl ketone. *J. Chem. Soc. Resumed* **1935**, 1504–1511.
- [132] D. H. Rich, S. K. Gurwara, Removal of protected peptides from an ortho-nitrobenzyl resin by photolysis. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1973**, 610–611.
- [133] M. M. Greenberg, Photochemical cleavage of oligonucleotides from solid phase supports. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 251–254.
- [134] M. M. Greenberg, J. L. Gilmore, Cleavage of Oligonucleotides from Solid-Phase Supports Using o-Nitrobenzyl Photochemistry. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 746–753.
- [135] T. J. Matray, M. M. Greenberg, Site-Specific Incorporation of the Alkaline Labile, Oxidative Stress Product (5R)-5,6-Dihydro-5-hydroxythymidine in an Oligonucleotide. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6931–6932.

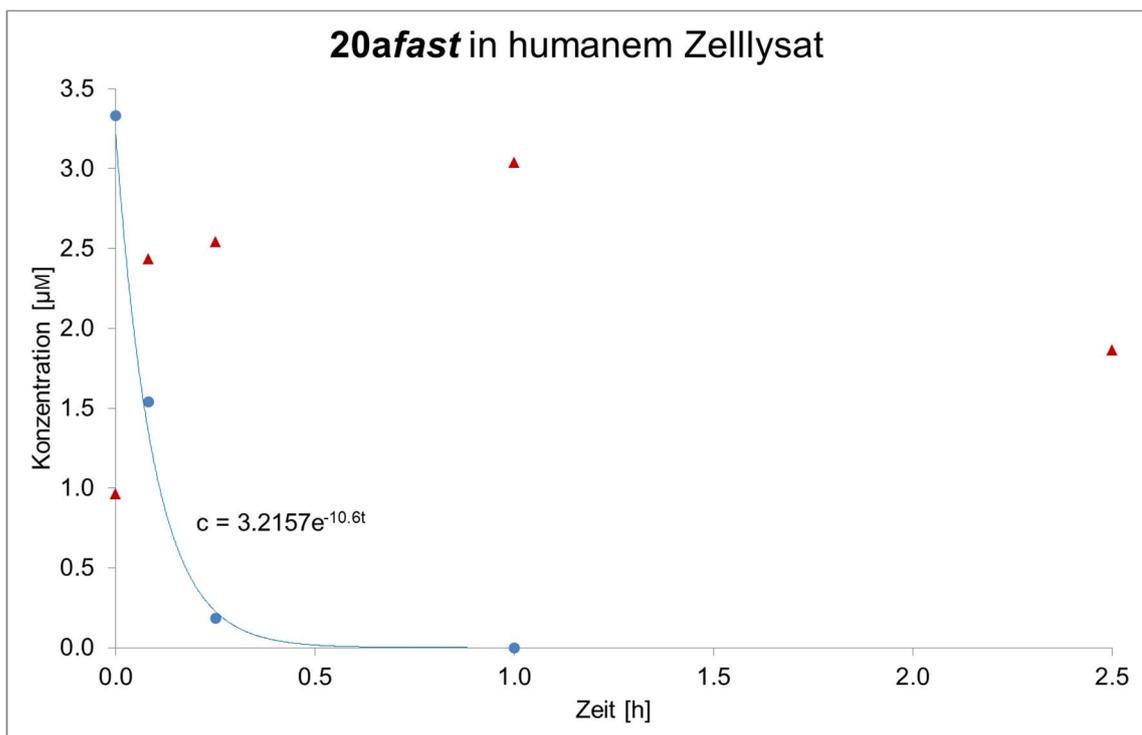
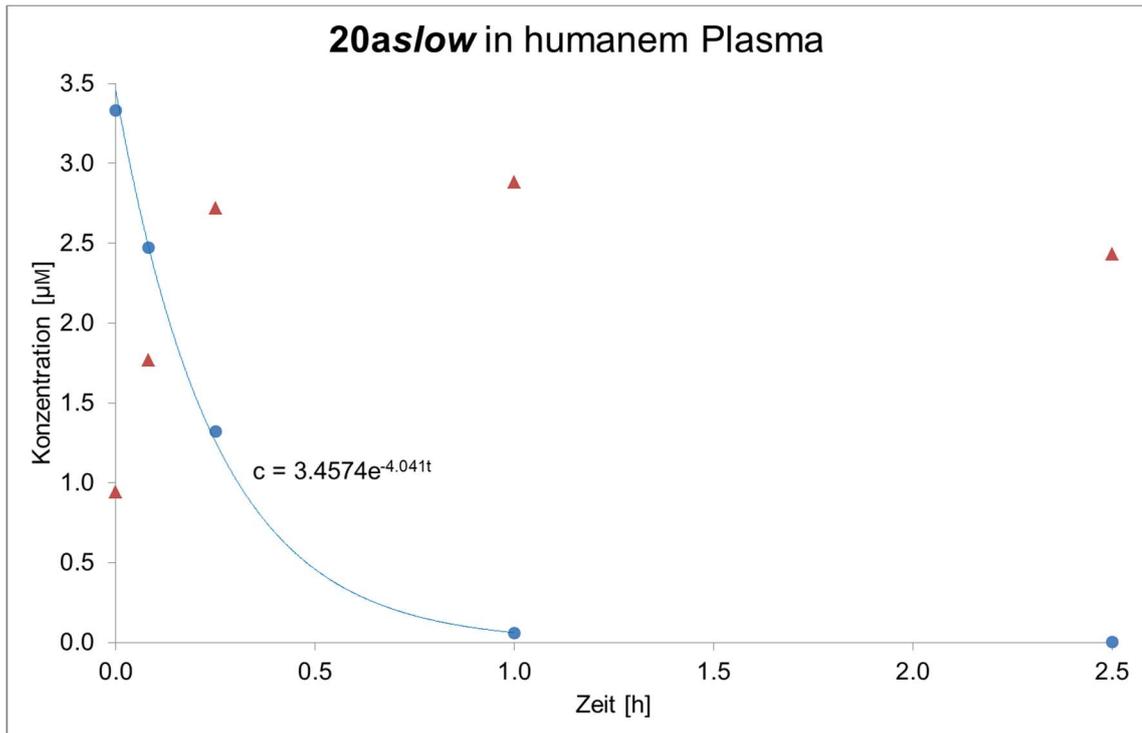
- [136] D. J. Yoo, M. M. Greenberg, Synthesis of Oligonucleotides Containing 3'-Alkyl Carboxylic Acids Using Universal, Photolabile Solid Phase Synthesis Supports. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3358–3364.
- [137] H. Venkatesan, M. M. Greenberg, Improved Utility of Photolabile Solid Phase Synthesis Supports for the Synthesis of Oligonucleotides Containing 3'-Hydroxyl Termini. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 525–529.
- [138] R. Johnsson, J. G. Lackey, J. J. Bogojeski, M. J. Damha, New light labile linker for solid phase synthesis of 2'-O-acetalester oligonucleotides and applications to siRNA prodrug development. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 3721–3725.
- [139] J. Xu, C. D. Duffy, C. K. W. Chan, J. D. Sutherland, Solid-Phase Synthesis and Hybridization Behavior of Partially 2'/3'-O-Acetylated RNA Oligonucleotides. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 3311–3326.
- [140] J. S. Zakhari, I. Kinoyama, M. S. Hixon, A. M. Di, D. Globisch, K. D. Janda, Formulating a new basis for the treatment against botulinum neurotoxin intoxication: 3,4-Diaminopyridine prodrug design and characterization. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 6203–6209.
- [141] S. Hamamoto, H. Takaku, New Approach to the Synthesis of Deoxyribonucleoside Phosphoramidite Derivatives. *Chem. Lett.* **1986**, *15*, 1401–1404.
- [142] B. Schmidt Gall, Nucleosylaminosäuren als Bausteine zur Synthese modifizierter Oligonucleotide. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen, **2014**.
- [143] P. M. Burgers, F. Eckstein, A study of the mechanism of DNA polymerase I from *Escherichia coli* with diastereomeric phosphorothioate analogs of deoxyadenosine triphosphate. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 6889–6893.
- [144] M. S. Padilla, C. A. Farley, L. E. Chatkewitz, D. D. Young, Synthesis and incorporation of a caged tyrosine amino acid possessing a bioorthogonal handle. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 4709–4712.
- [145] F. Chu, E. E. Dueno, K. W. Jung, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> promoted O-alkylation of alcohols for the preparation of mixed alkyl carbonates. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 1847–1850.
- [146] S. P. Rannard, N. J. Davis, Controlled Synthesis of Asymmetric Dialkyl and Cyclic Carbonates Using the Highly Selective Reactions of Imidazole Carboxylic Esters. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 933–936.
- [147] Y. Matsuno, T. Shoji, S. Kim, K. Chiba, Synthetic Method for Oligonucleotide Block by Using Alkyl-Chain-Soluble Support. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 800–803.
- [148] A. Stutz, C. Höbartner, S. Pitsch, Novel Fluoride-Labile Nucleobase-Protecting Groups for the Synthesis of 3'(2')-O-Aminoacylated RNA Sequences. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 2477–2503.

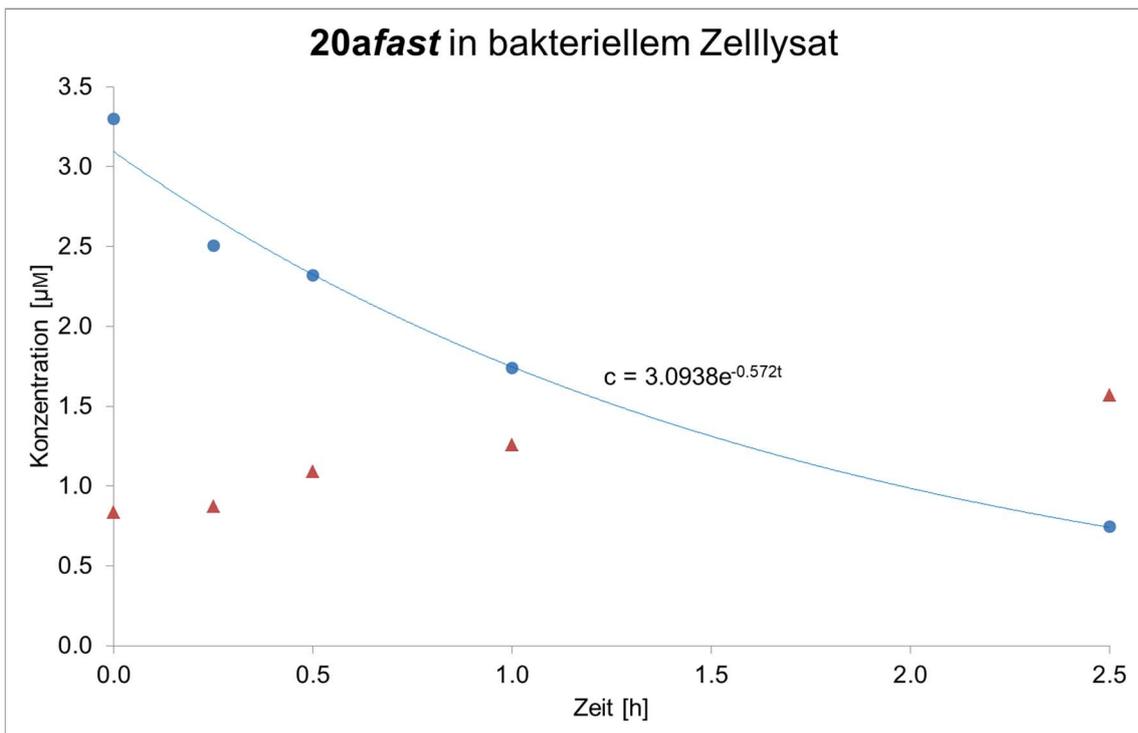
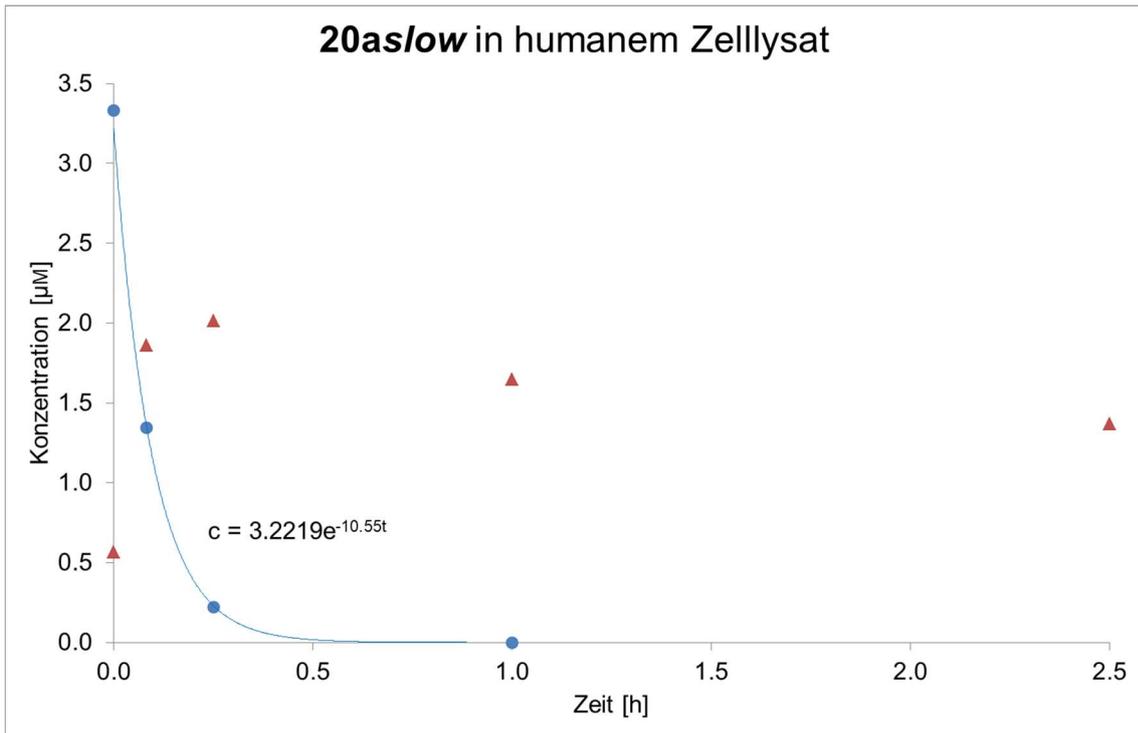
## Anhang

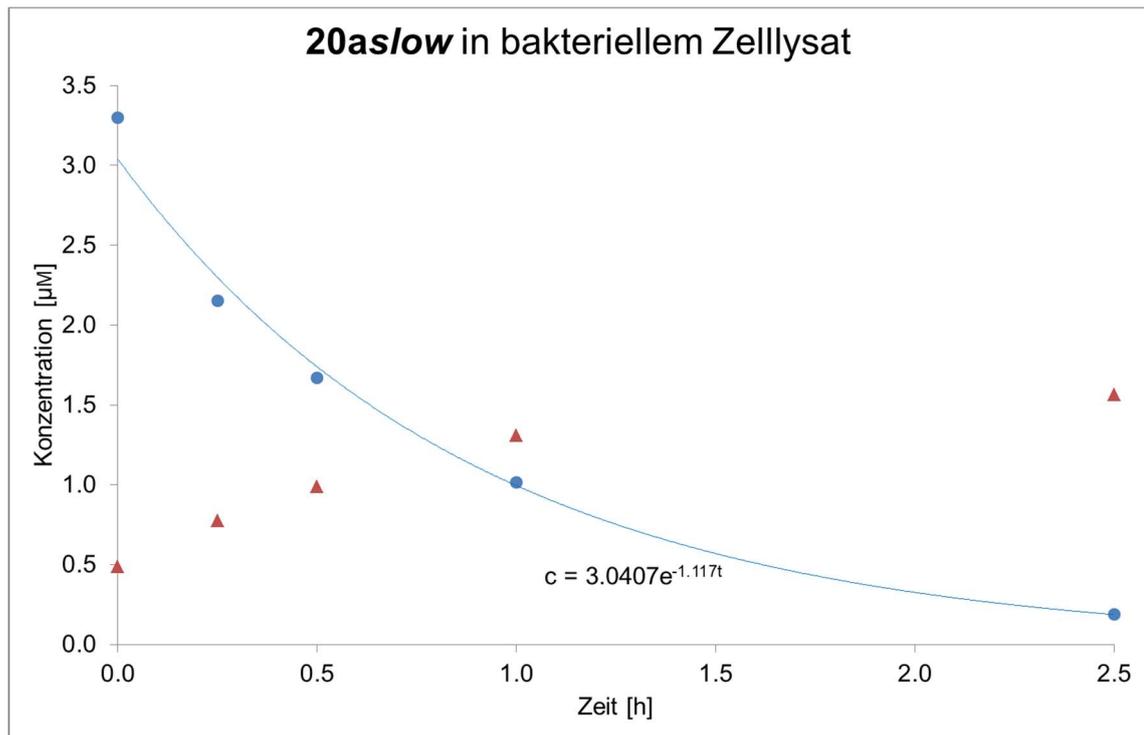
**Anhang I:** Stabilitäts-Tests von Verbindungen **20afast** und **20aslow** in Phosphatpuffer-Lösung, humanem Plasma, humanem Zelllysat und bakteriellem Zelllysat (blau: Modelldimer; rot: freigesetztes Dinucleotid)



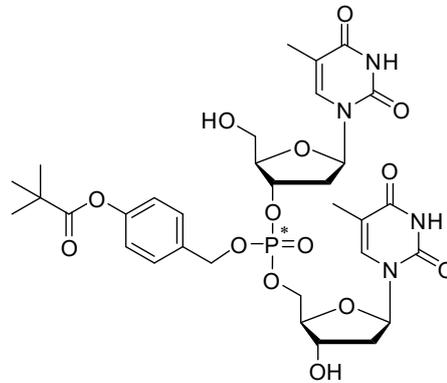




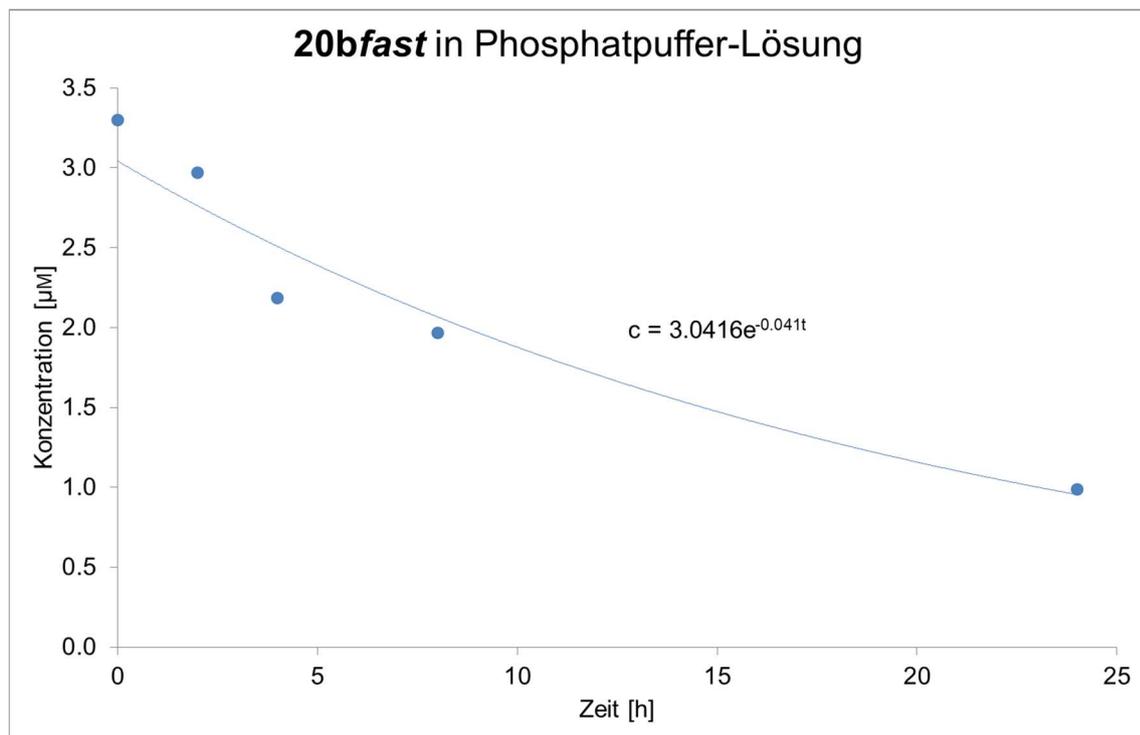


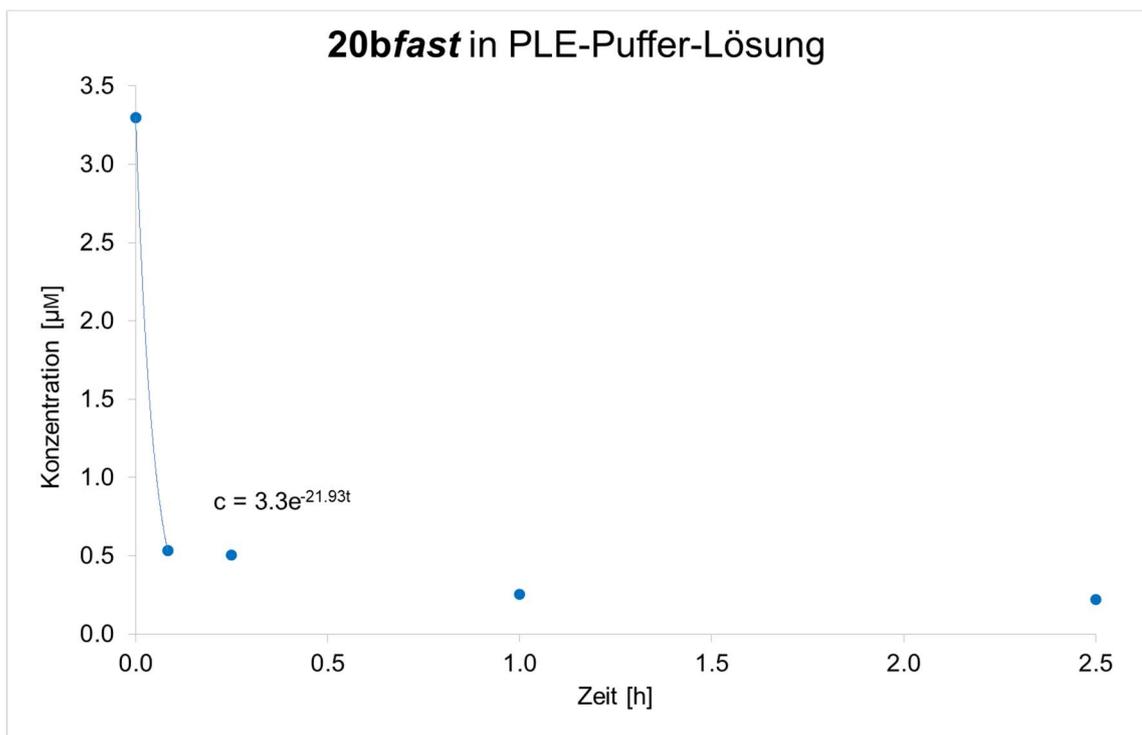
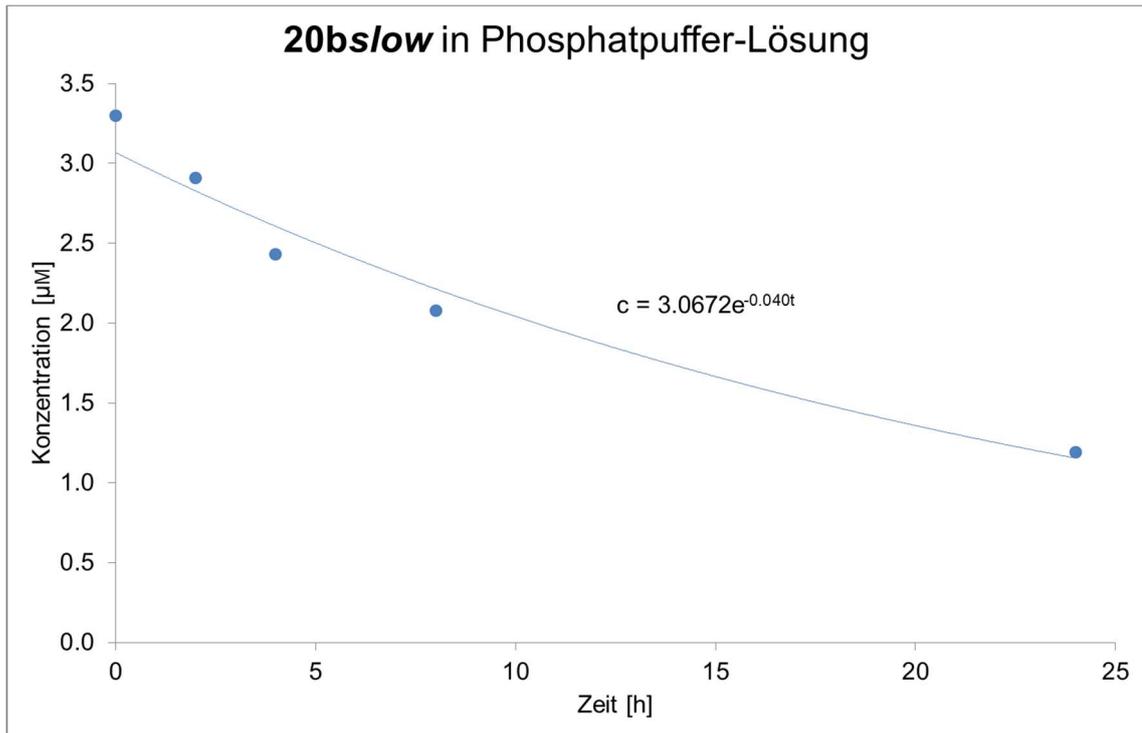


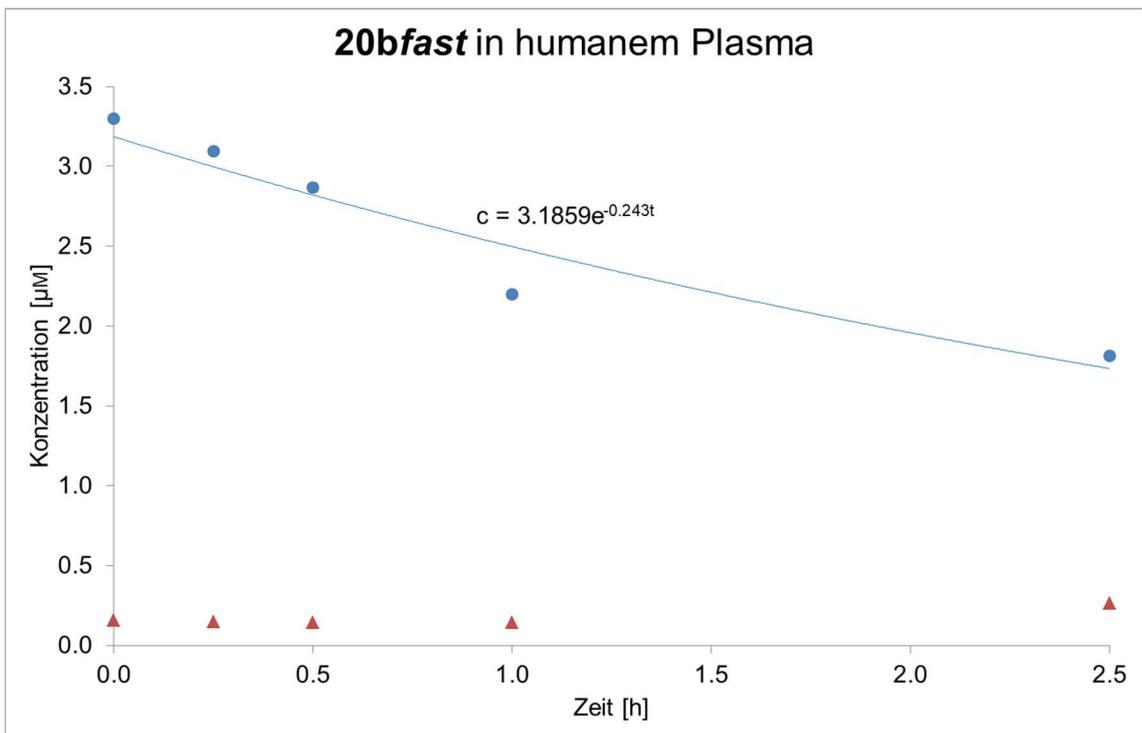
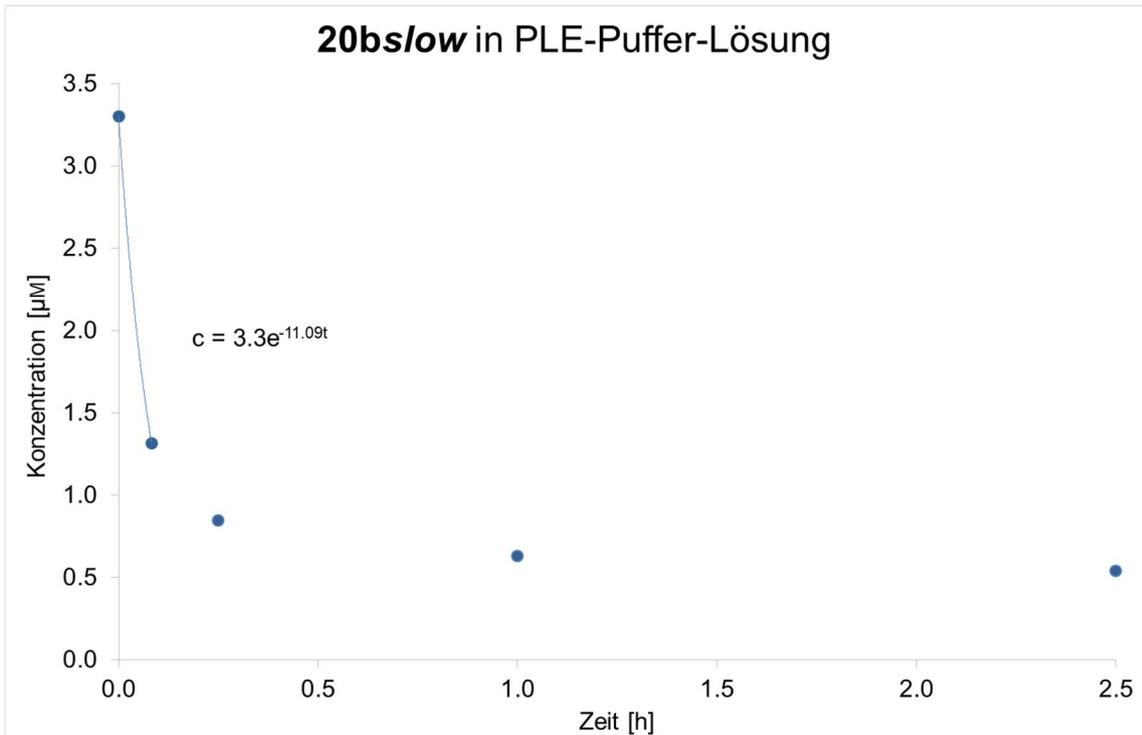
**Anhang II:** Stabilitäts-Tests von Verbindungen **20bfast** und **20bslow** in Phosphatpuffer-Lösung, Schweineleber-Esterase-(PLE)-Puffer-Lösung humanem Plasma, humanem Zelllysate und bakteriellem Zelllysate (blau: Modelldimer; rot: freigesetztes Dinucleotid)

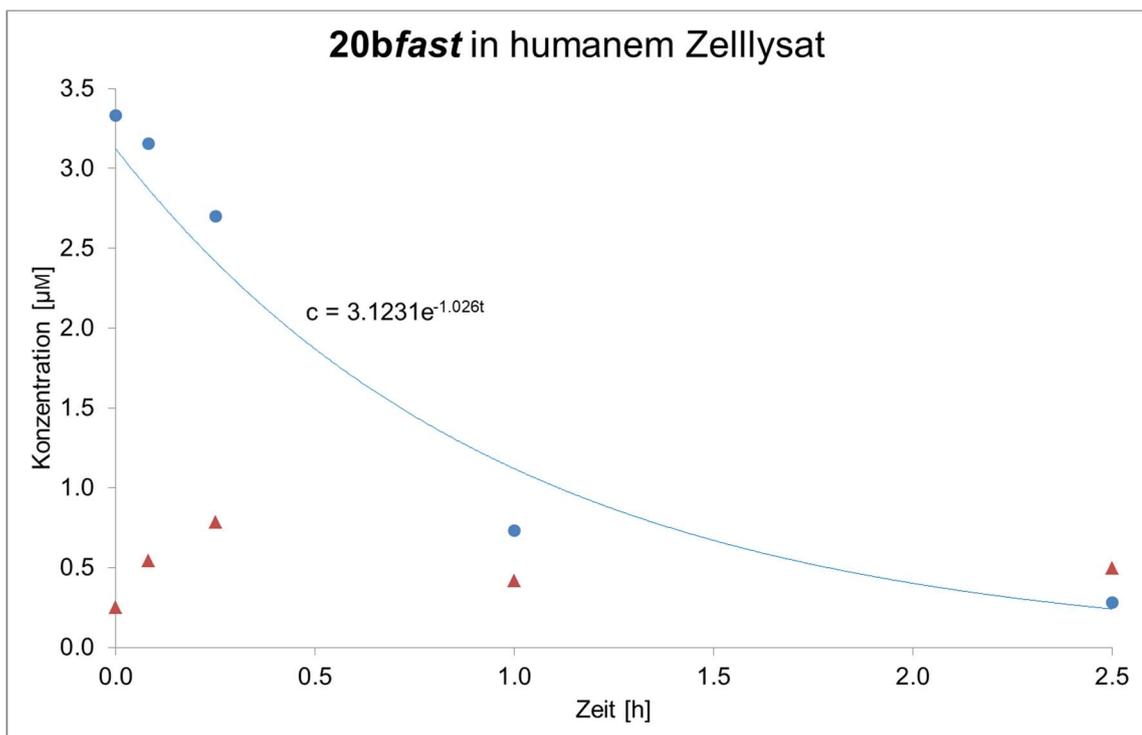
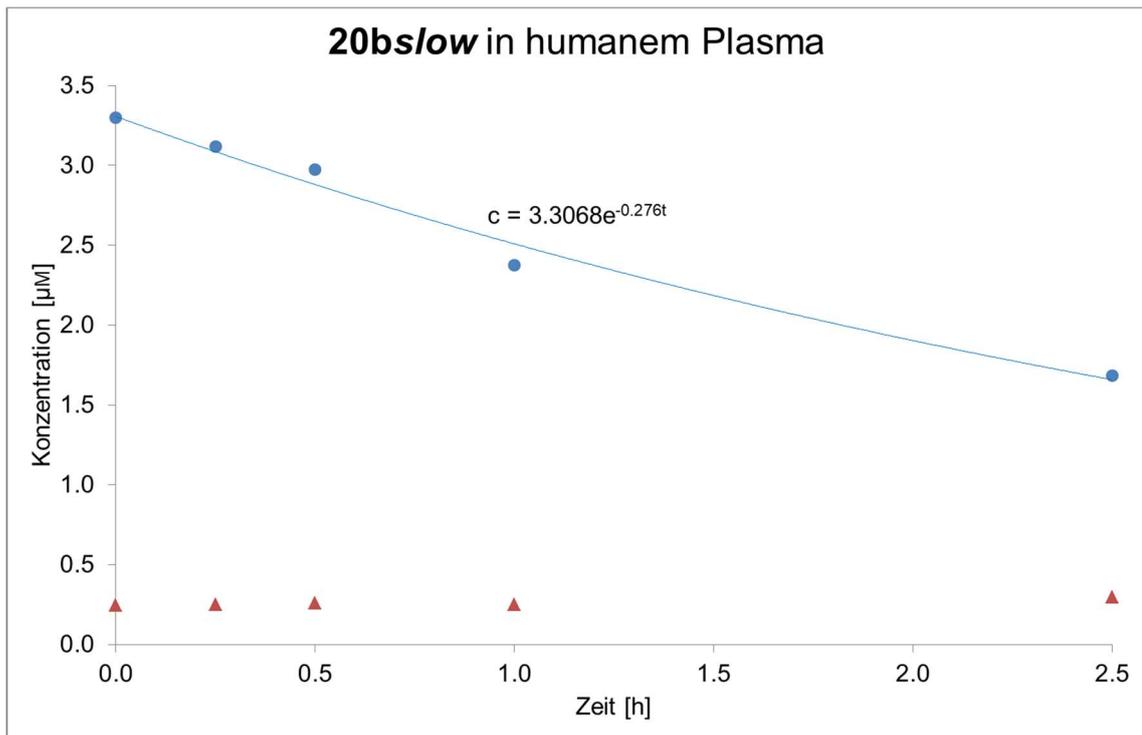


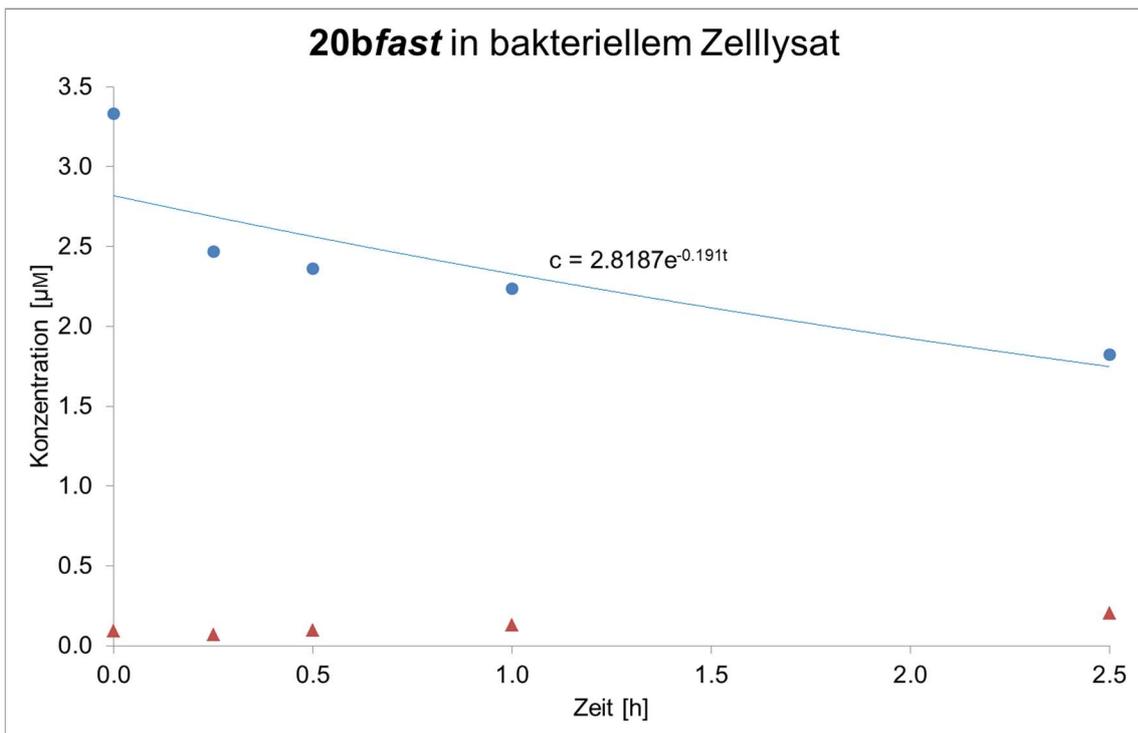
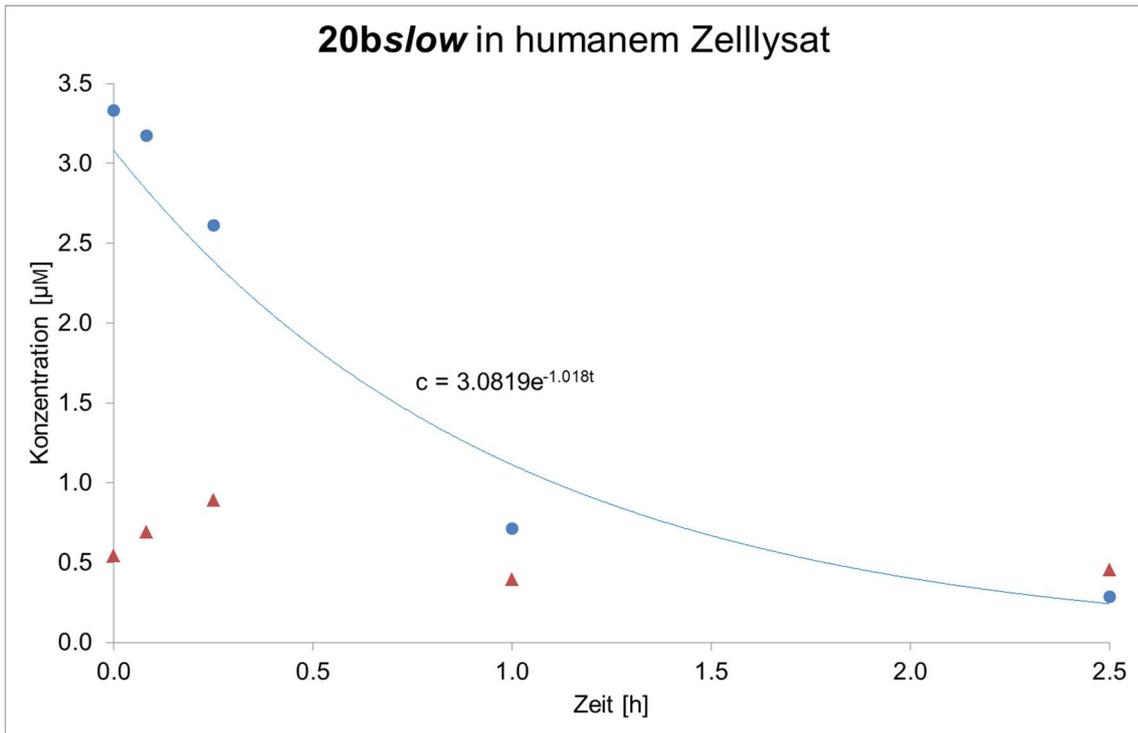
**20bfast/slow**

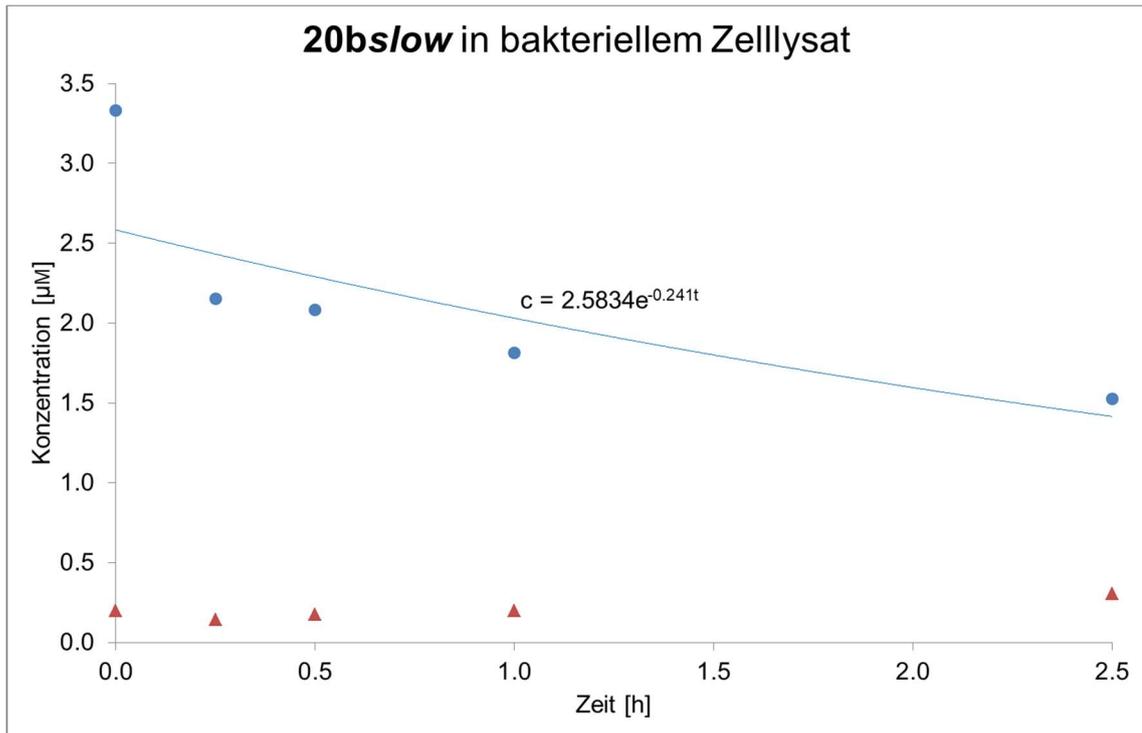




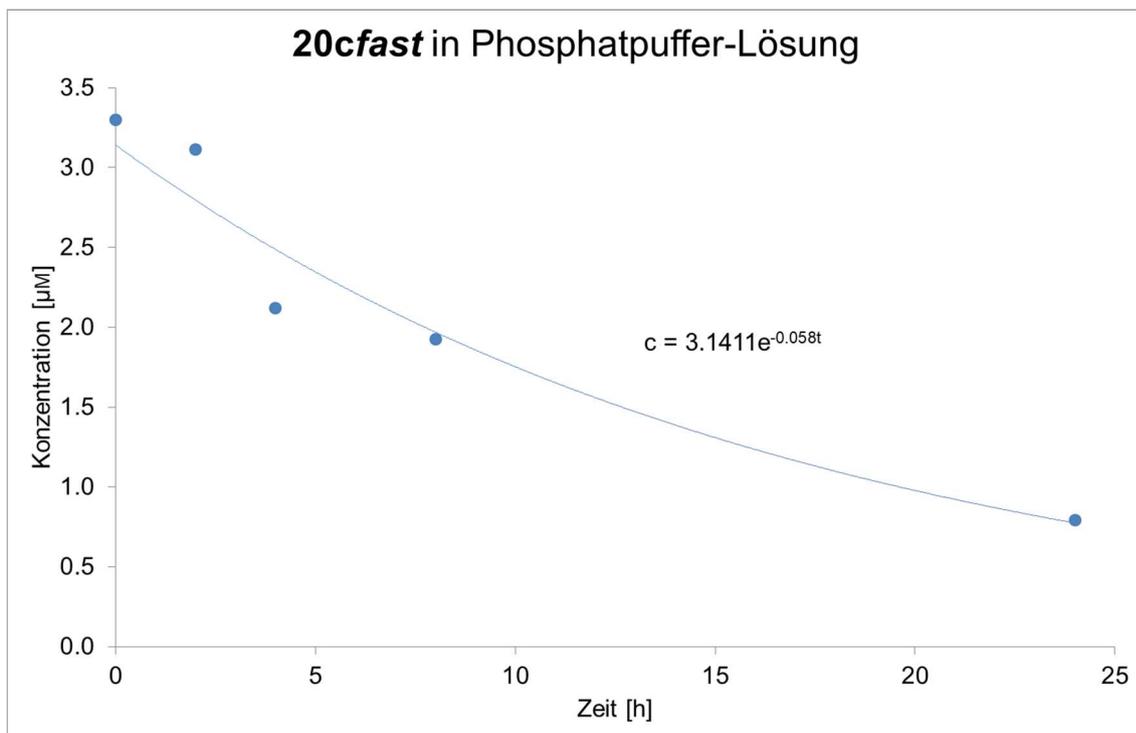
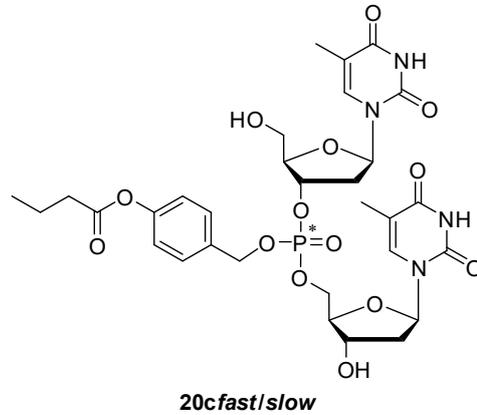


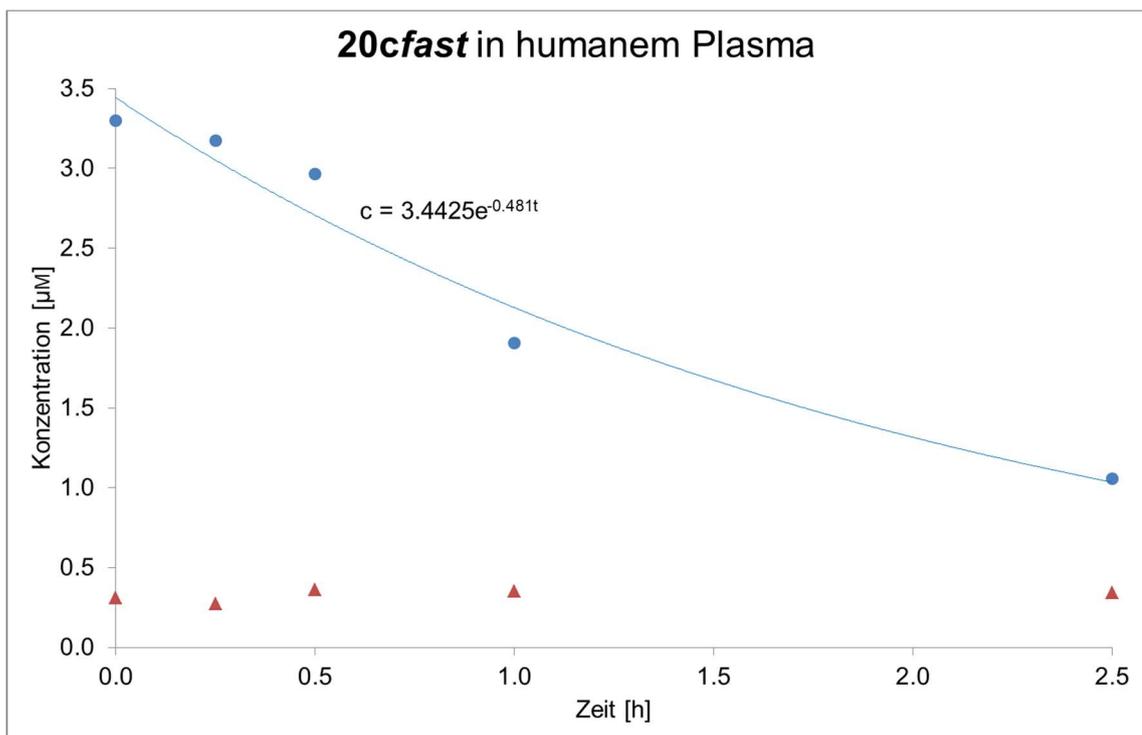
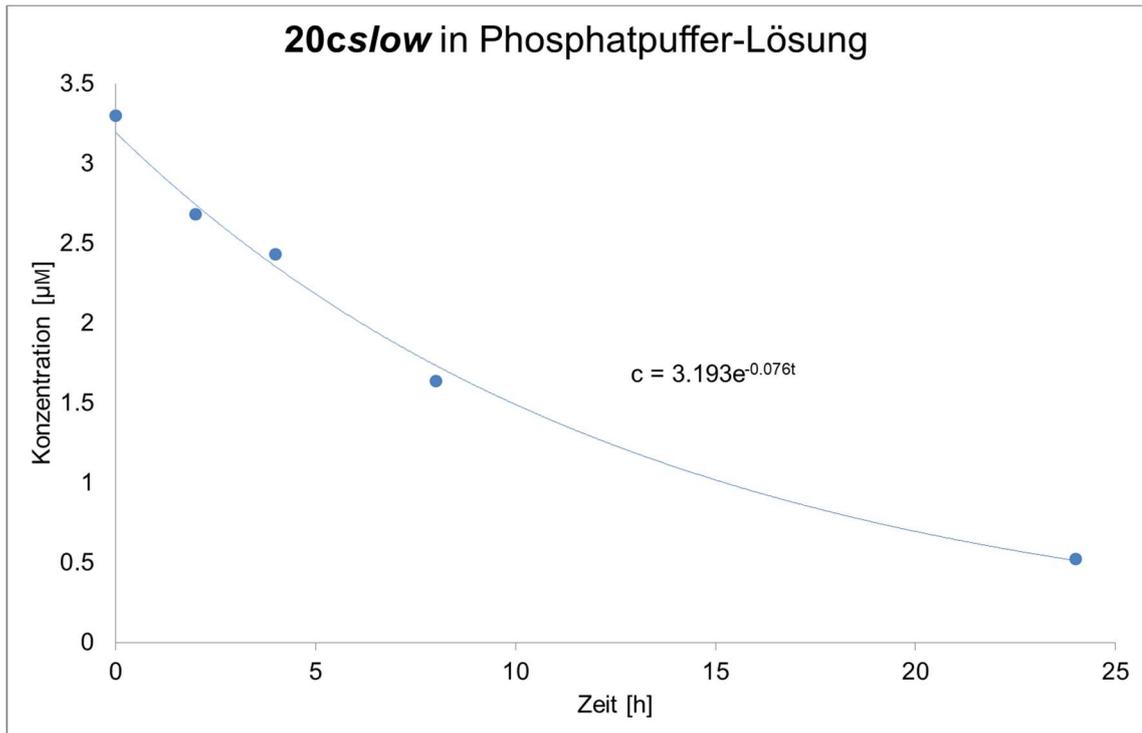


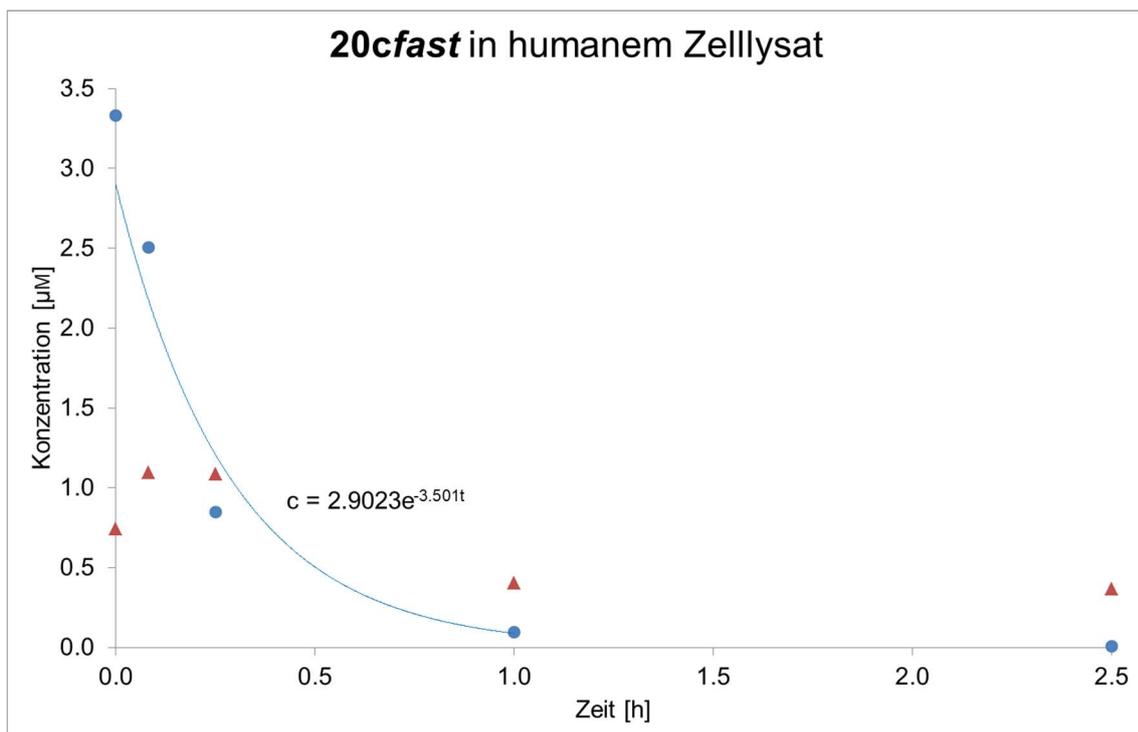
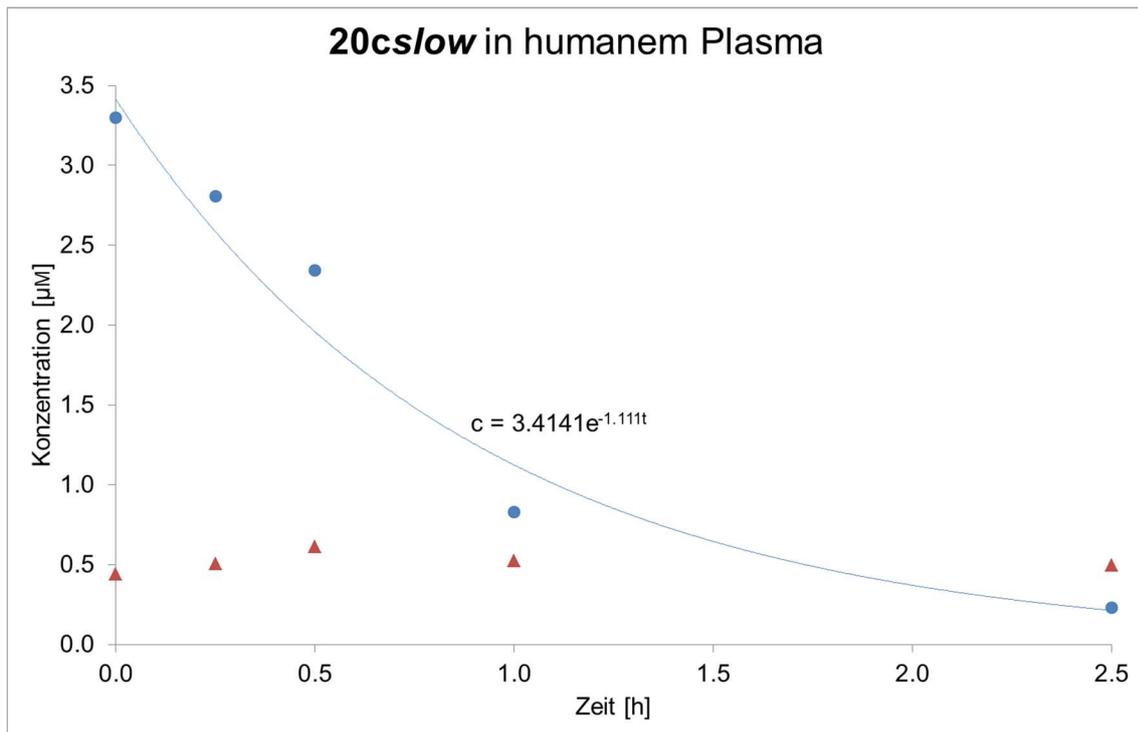


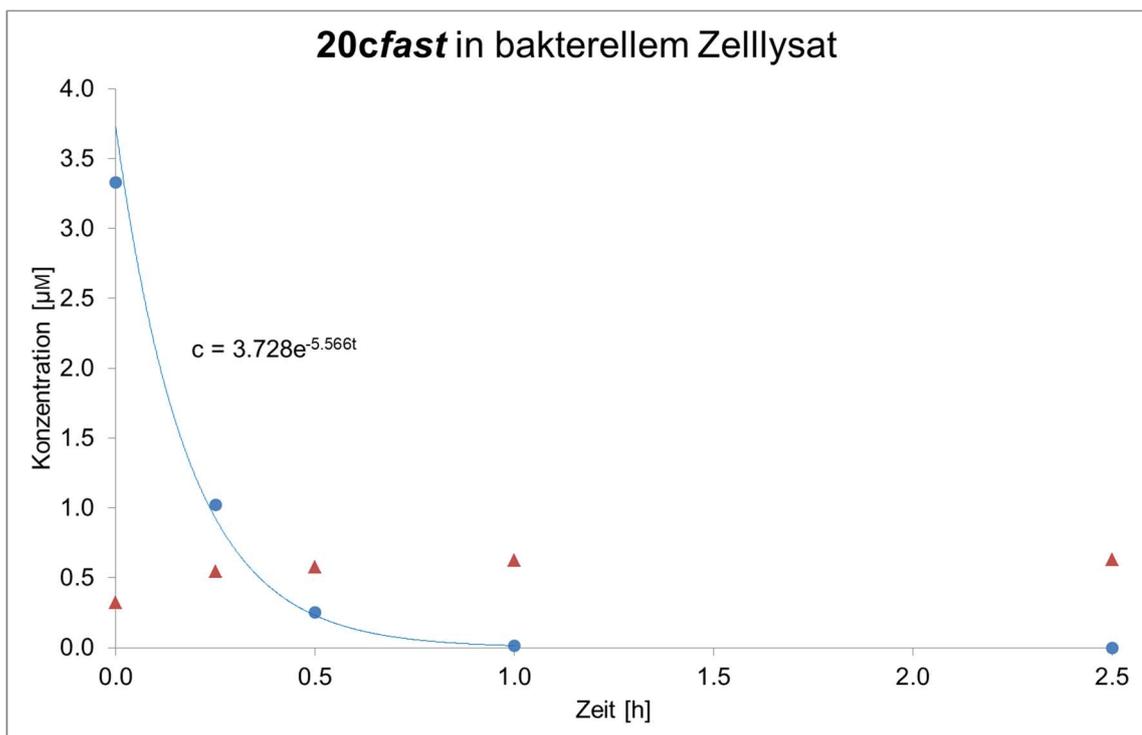
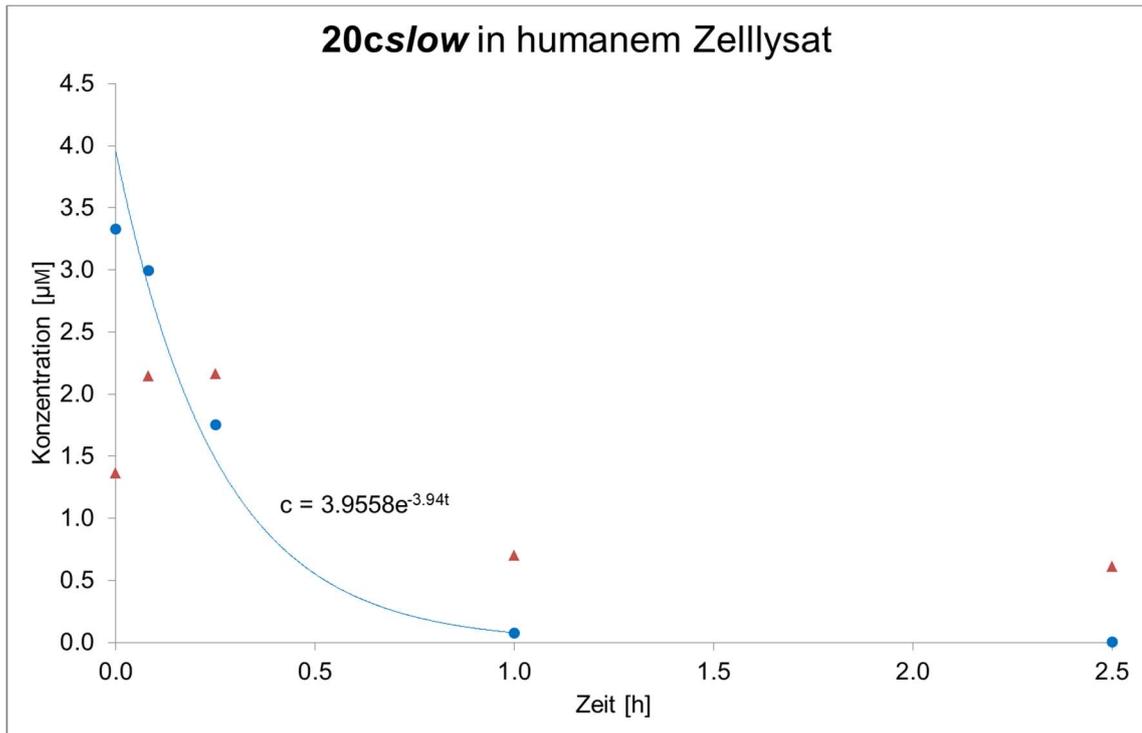


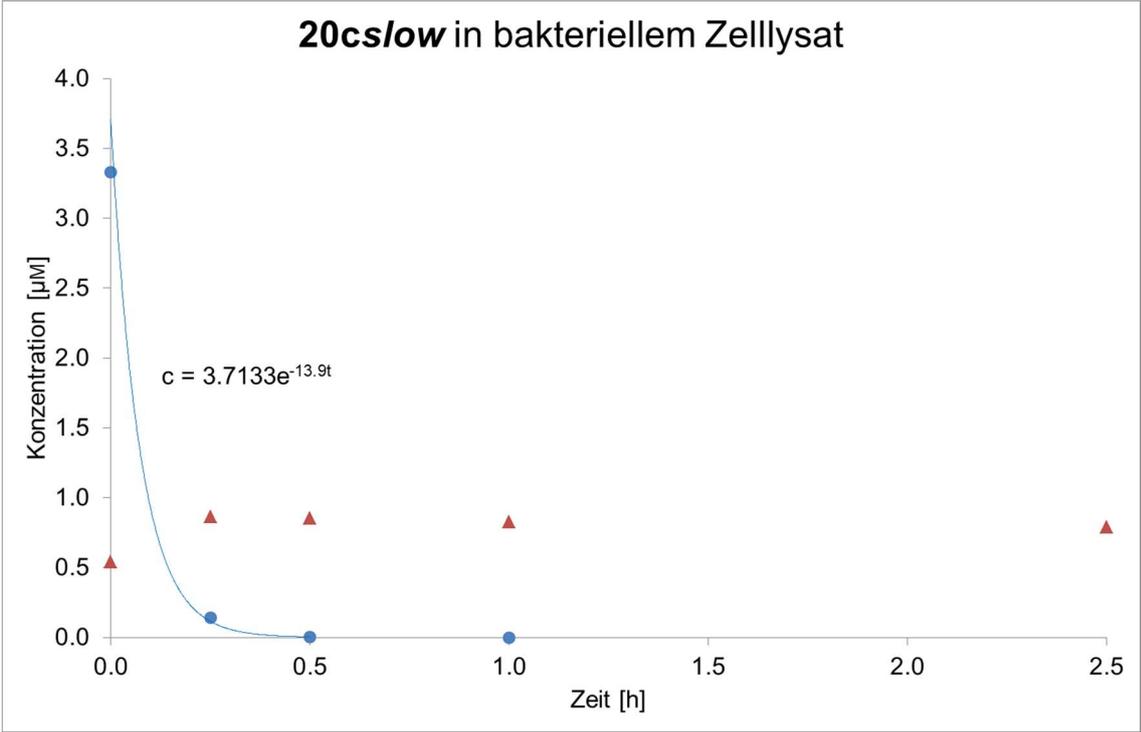
**Anhang III:** Stabilitäts-Tests von Verbindungen **20cfast** und **20cslow** in Phosphatpuffer-Lösung, humanem Plasma, humanem Zelllysate und bakteriellem Zelllysate (blau: Modelldimer; rot: freigesetztes Dinucleotid)



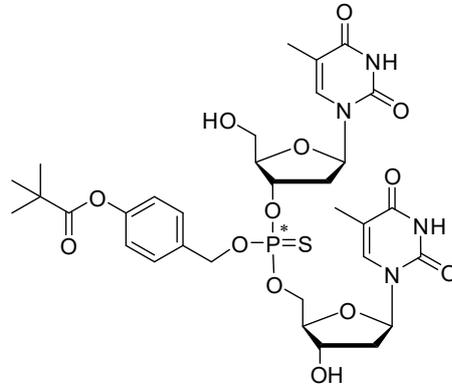




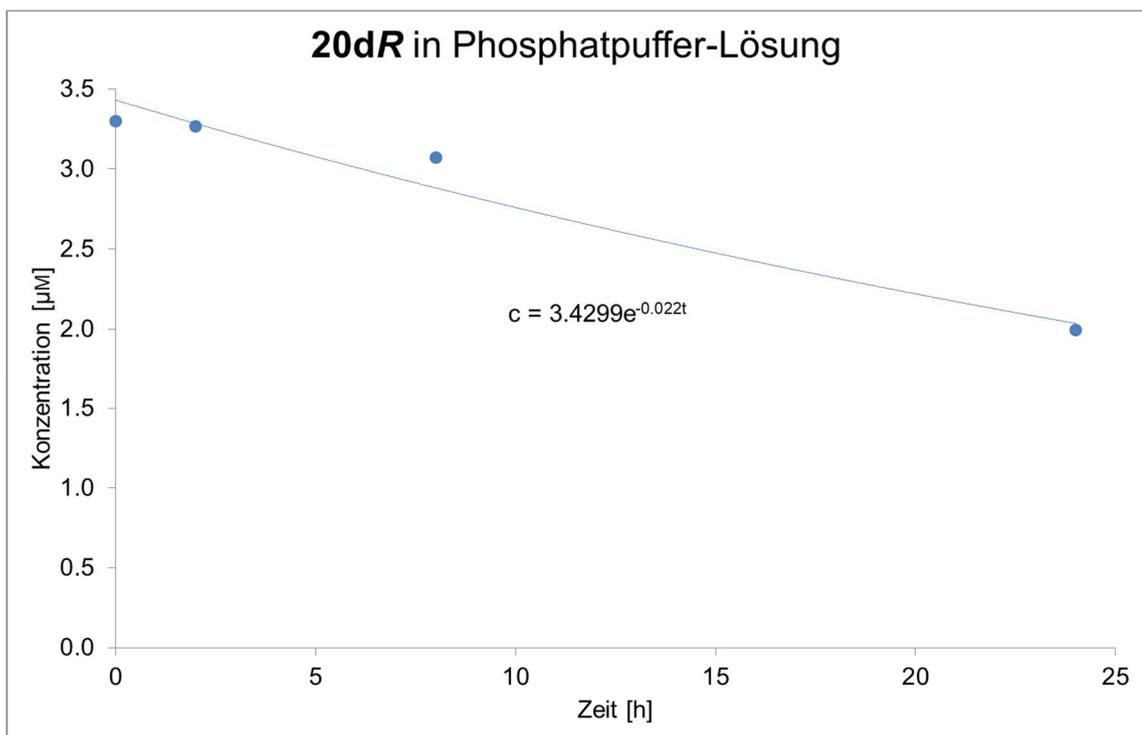


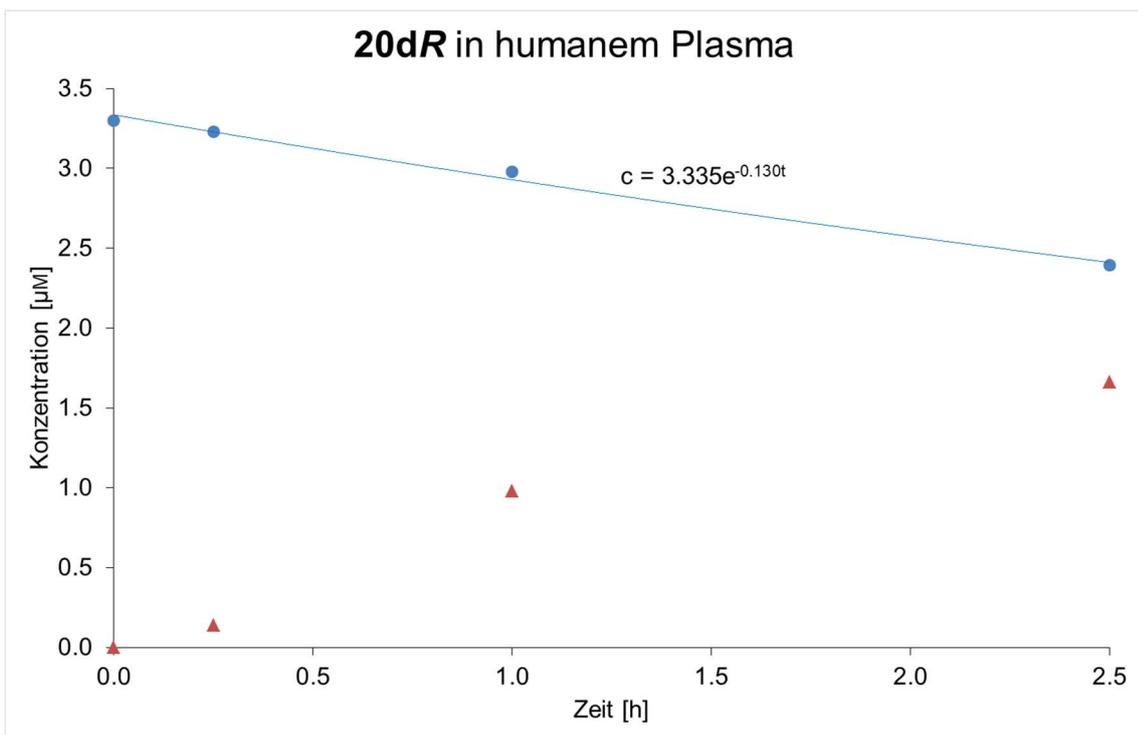
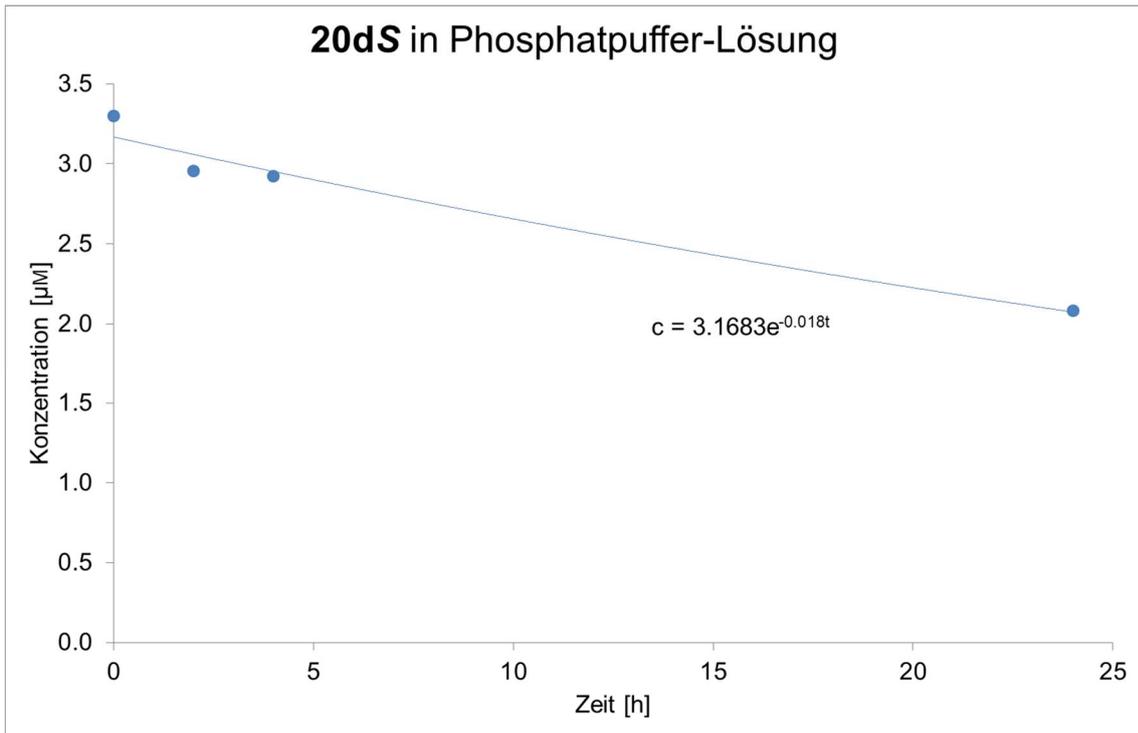


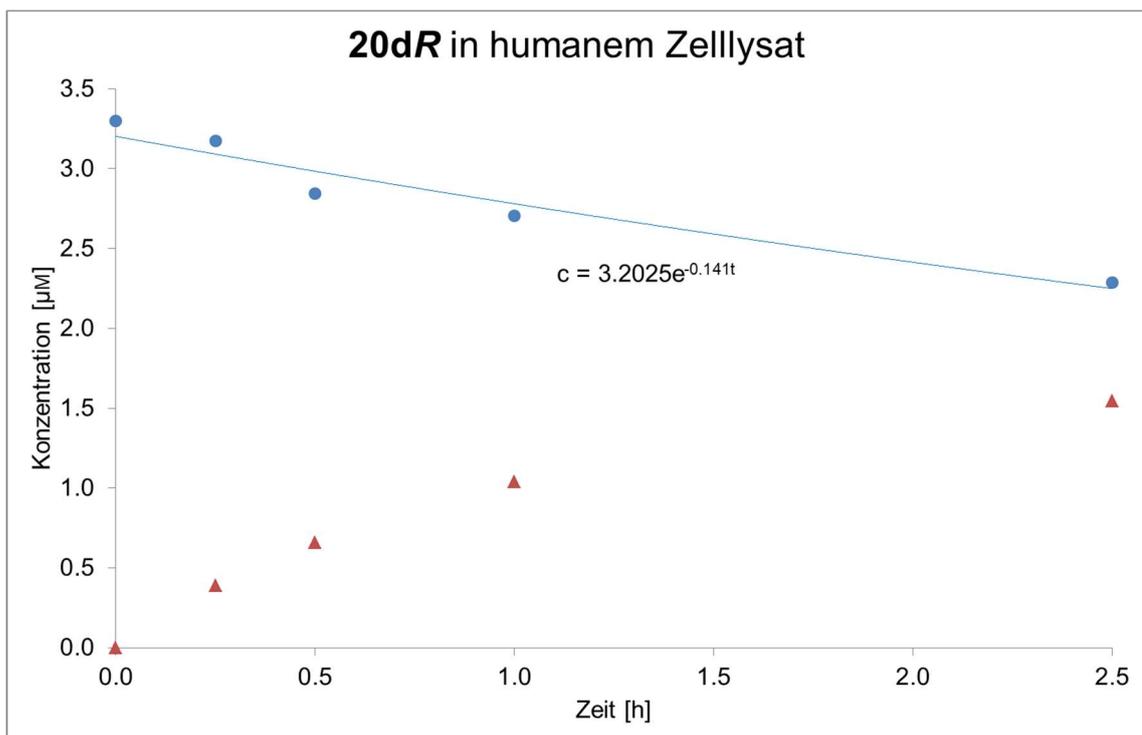
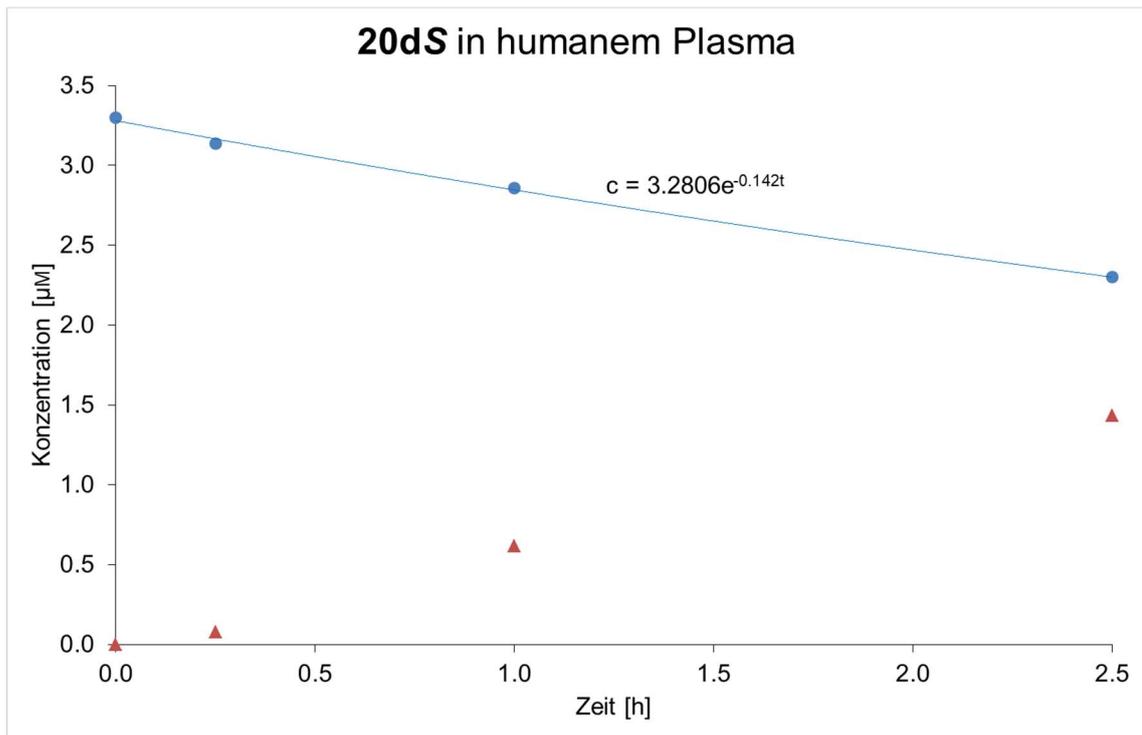
**Anhang IV:** Stabilitäts-Tests von Verbindungen **20dR** und **20dS** in Phosphatpuffer-Lösung, humanem Plasma, humanem Zelllysate und bakteriellem Zelllysate (blau: Modelldimer; rot: freigesetztes Dinucleotid)

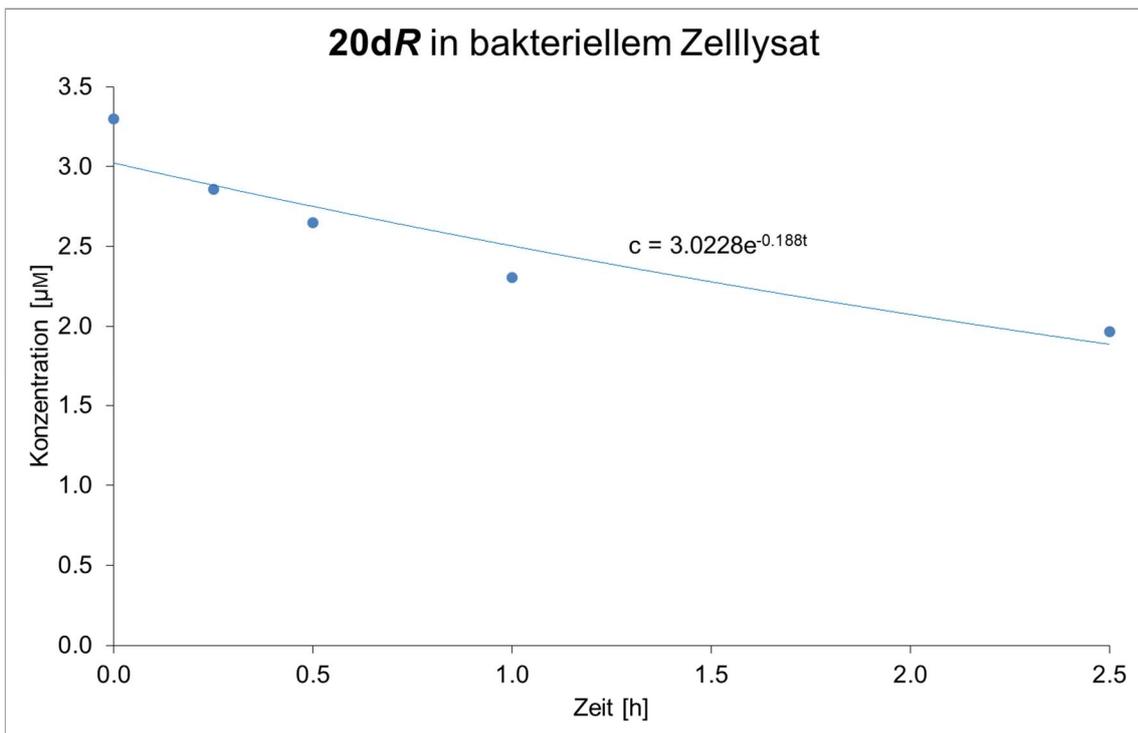
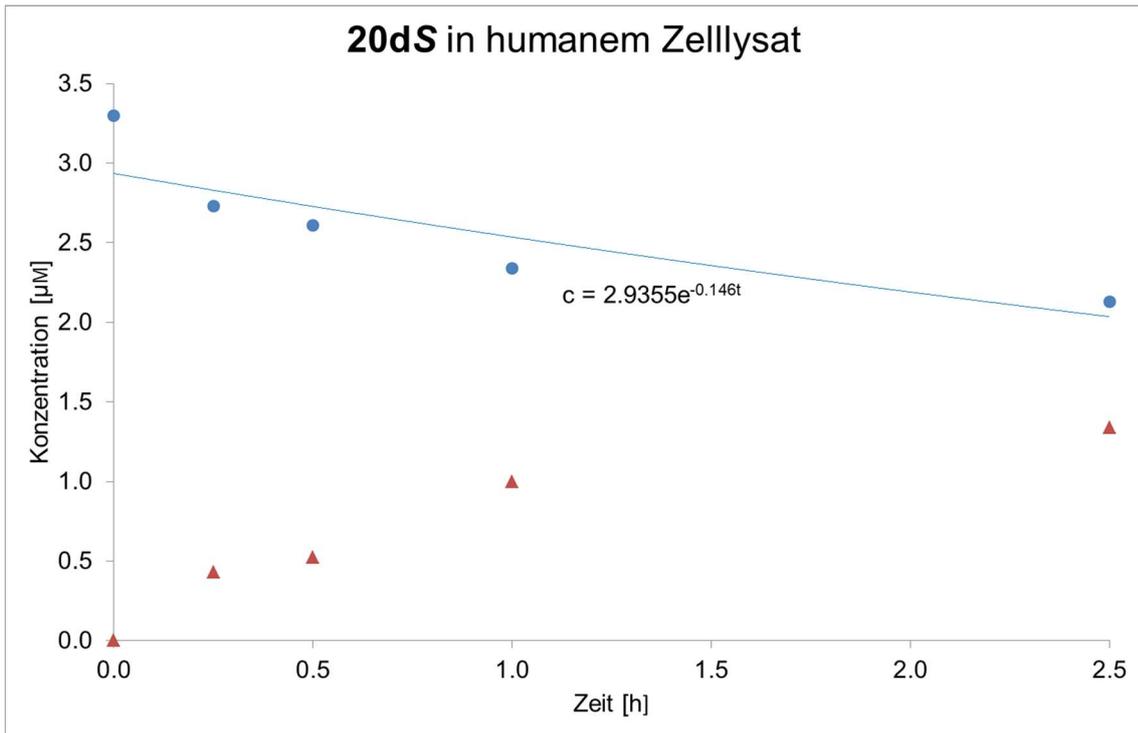


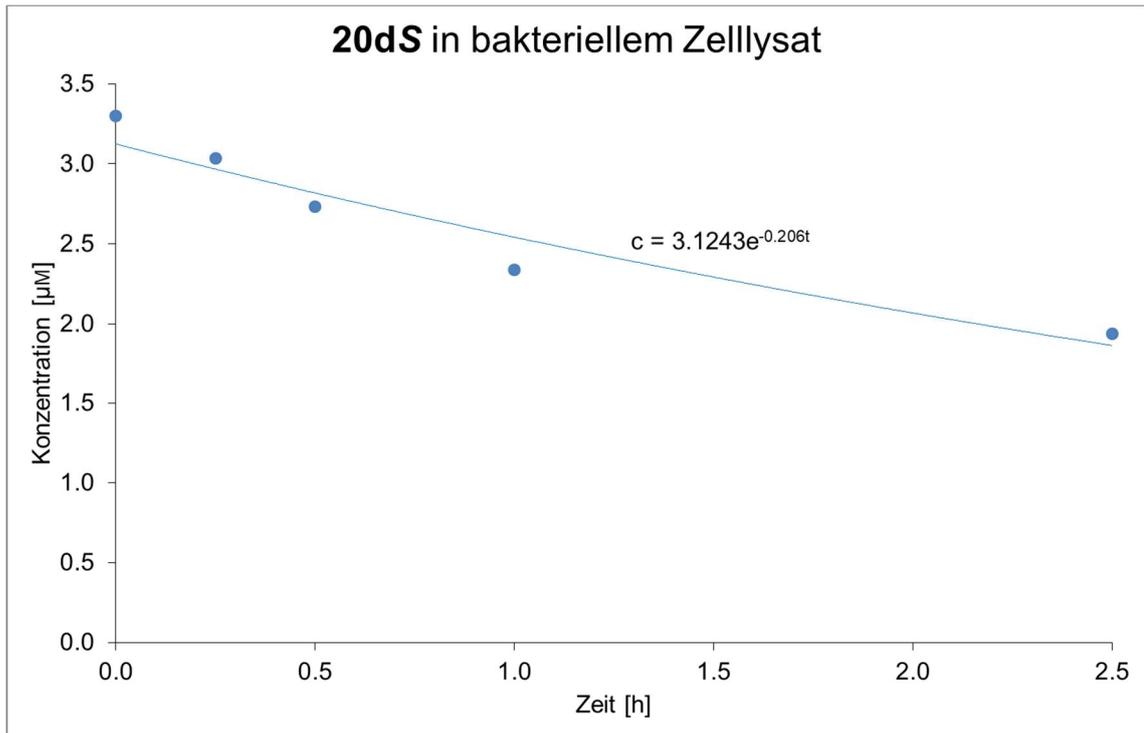
**20dR/S**



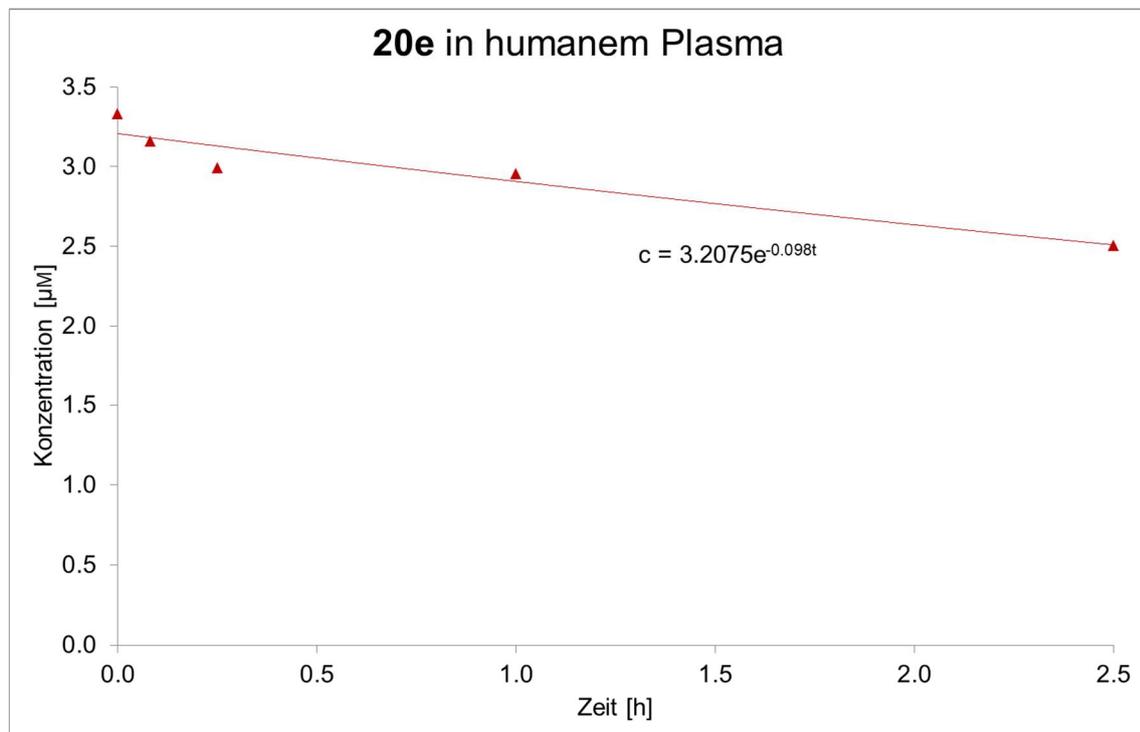
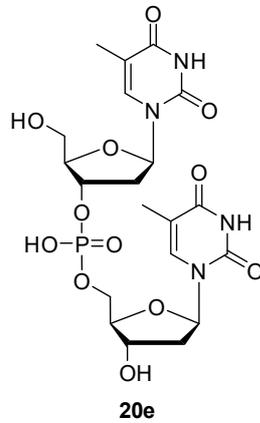


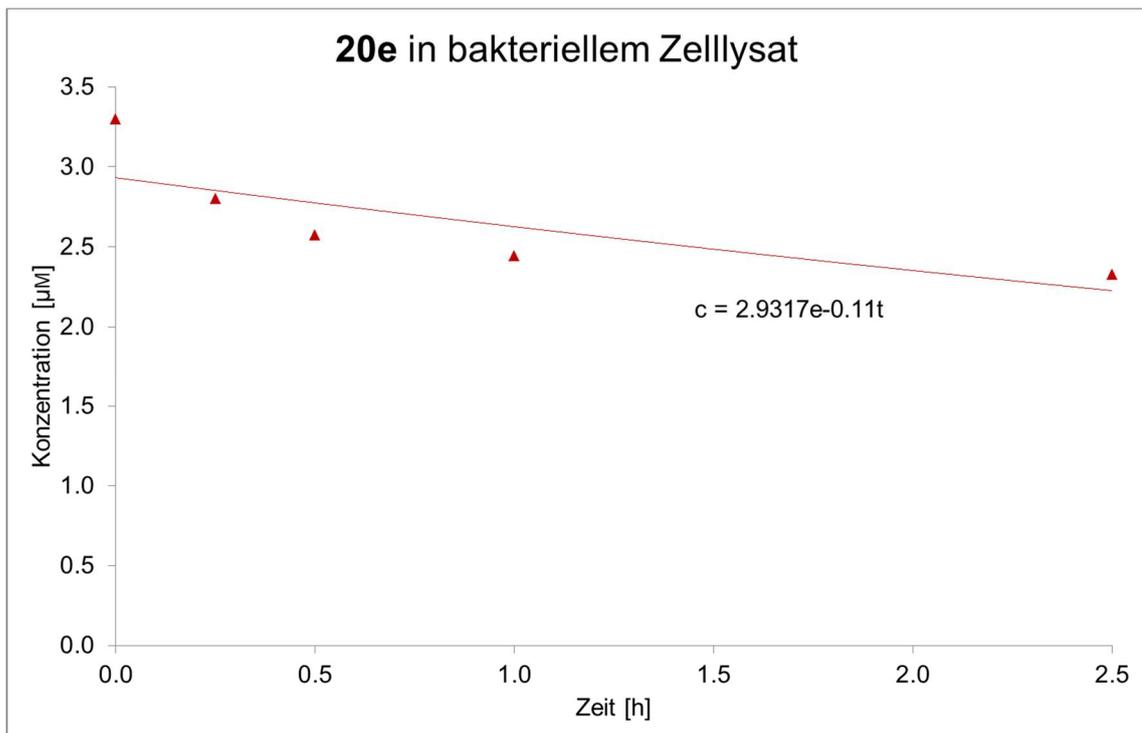
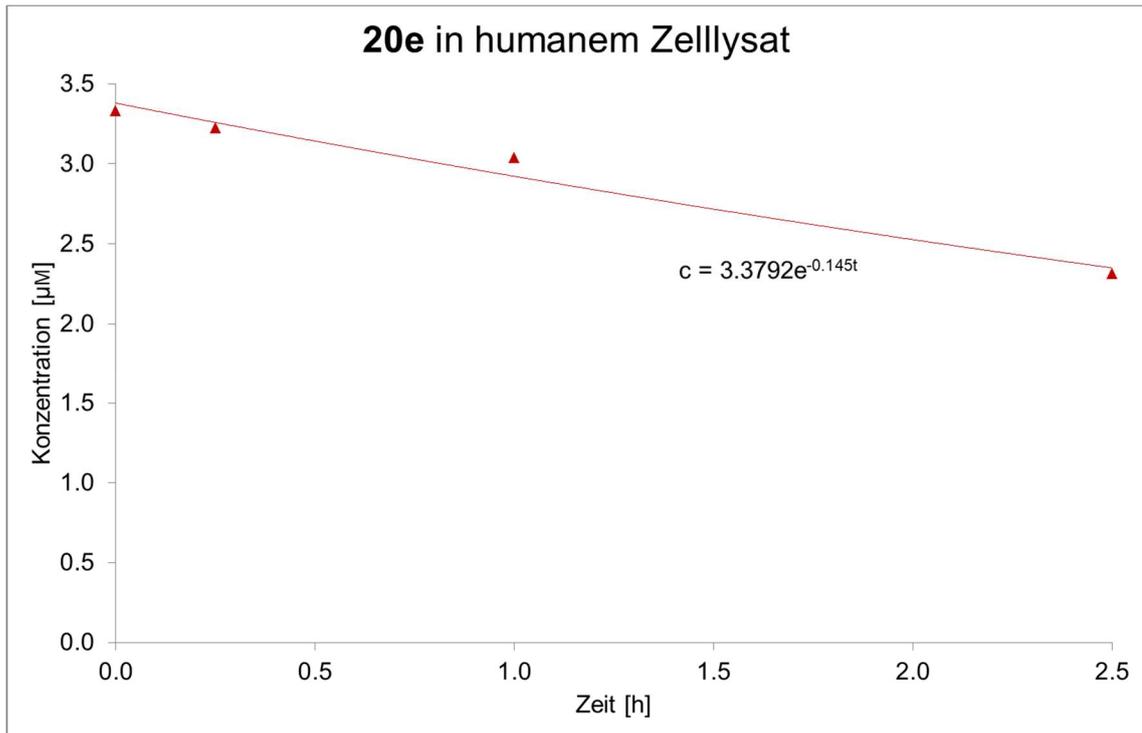




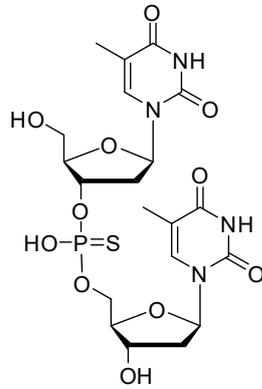


**Anhang V:** Stabilitäts-Tests von Verbindung **20e** in humanem Plasma, humanem Zelllysatz und bakteriellem Zelllysatz.

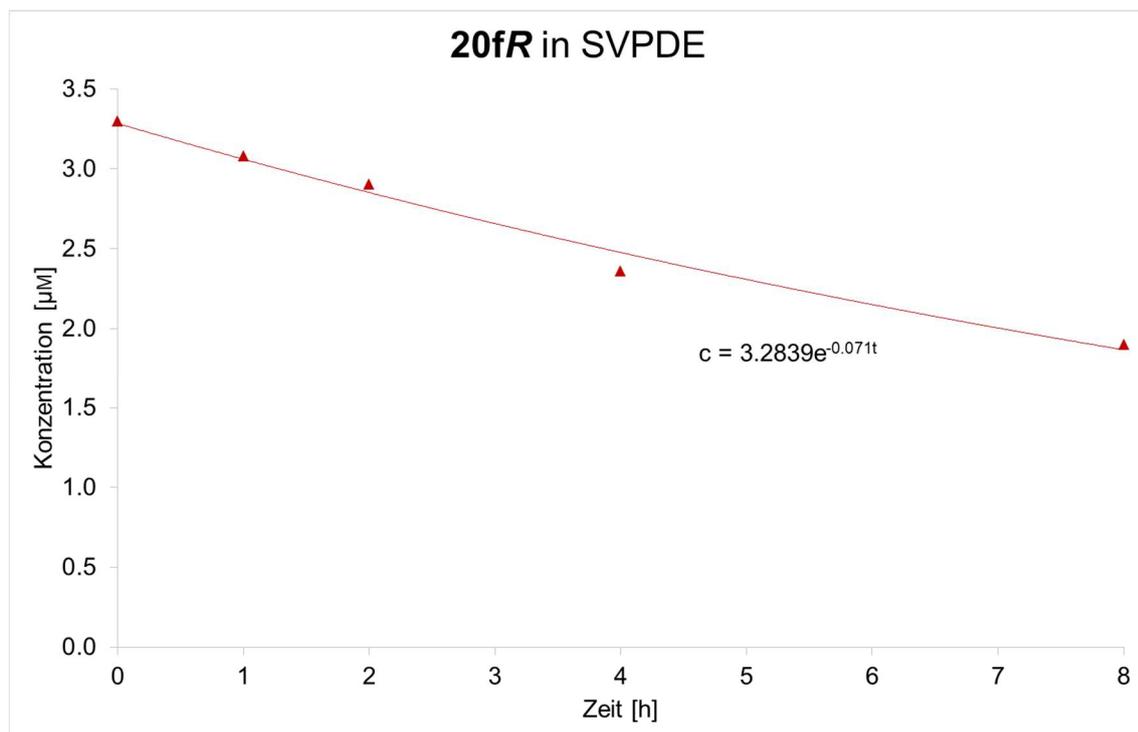


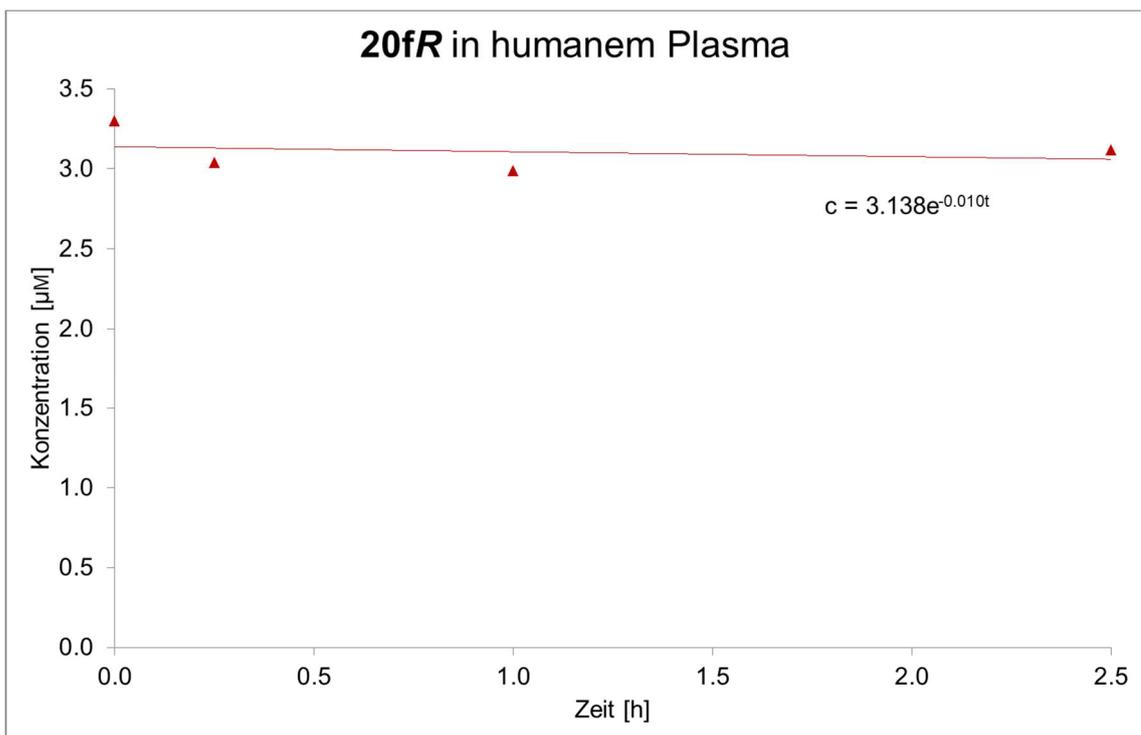
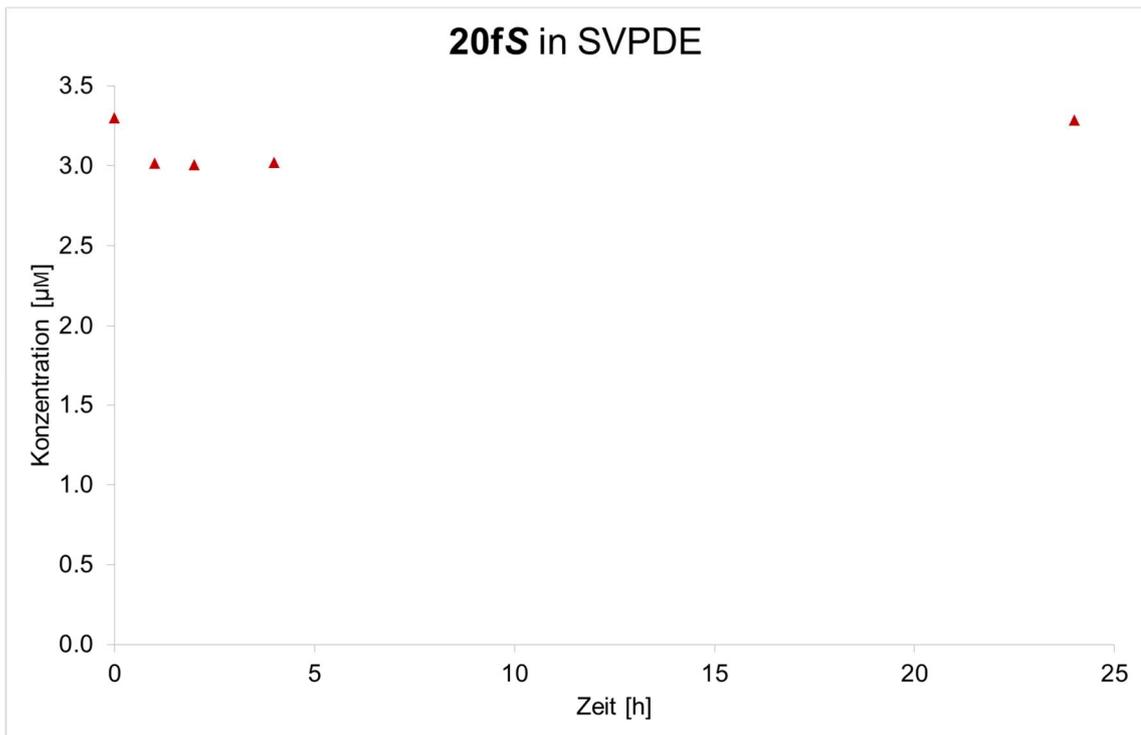


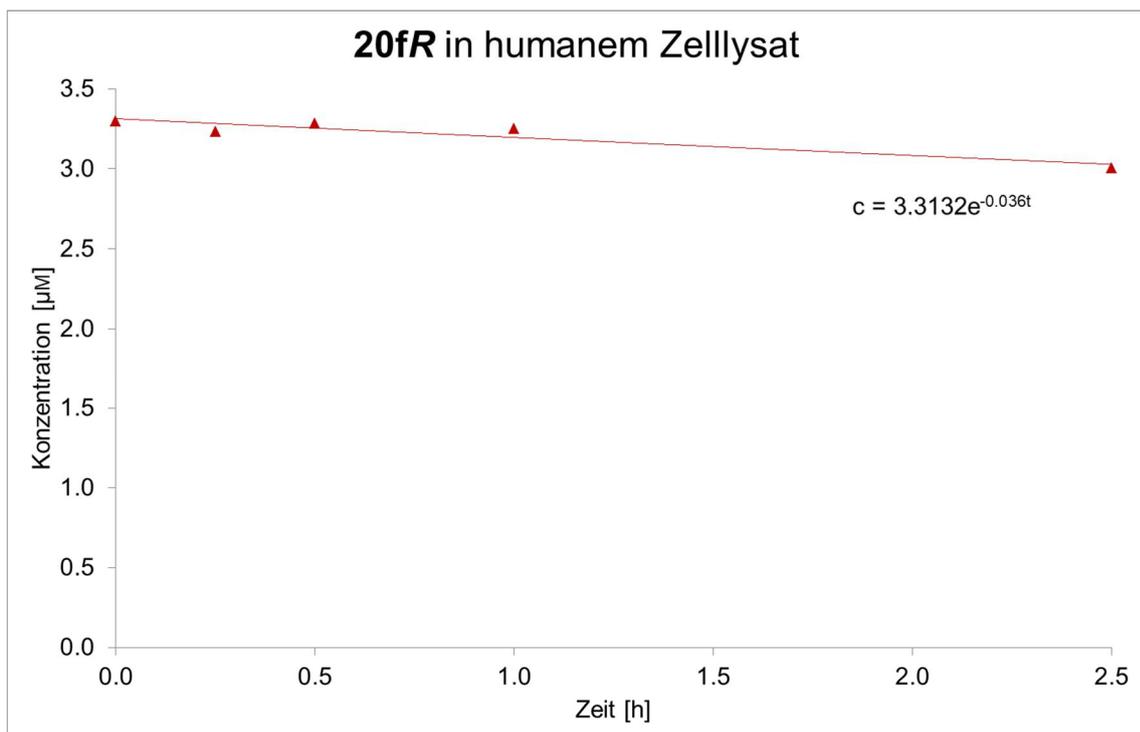
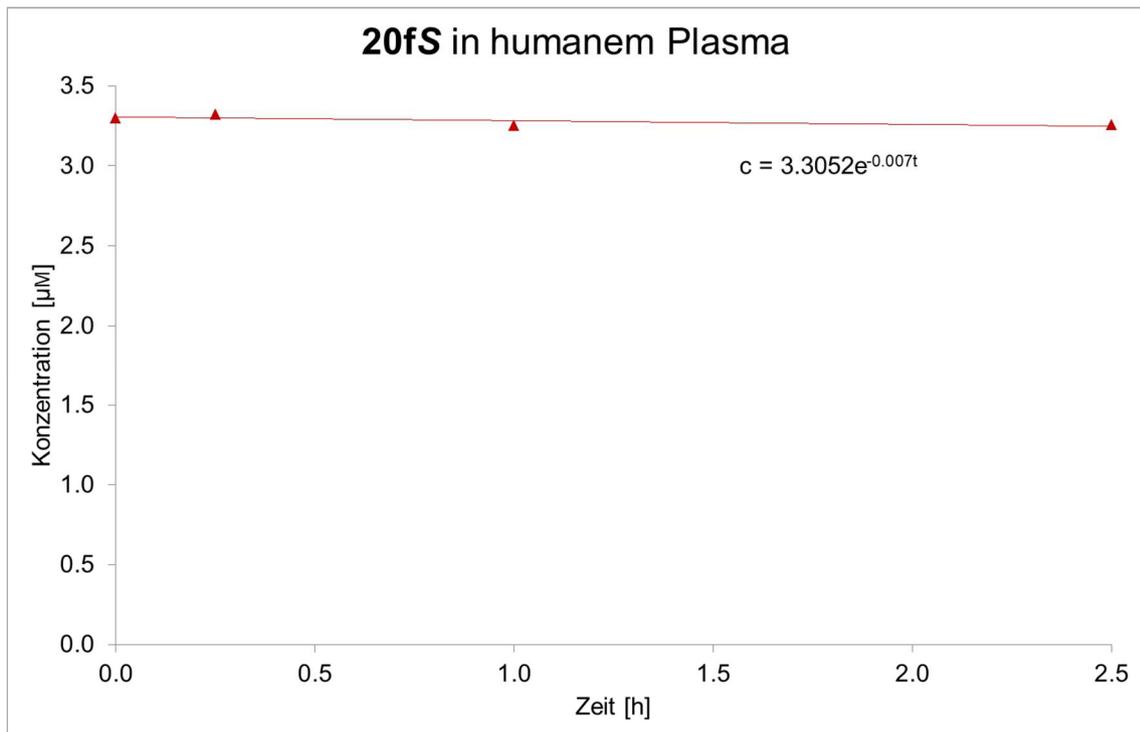
**Anhang VI:** Stabilitäts-Tests von Verbindungen **20fR** und **20fS** in Schlangengift-Phosphodiesterase (SVPDE), humanem Plasma, humanem Zelllysate und bakteriellem Zelllysate.

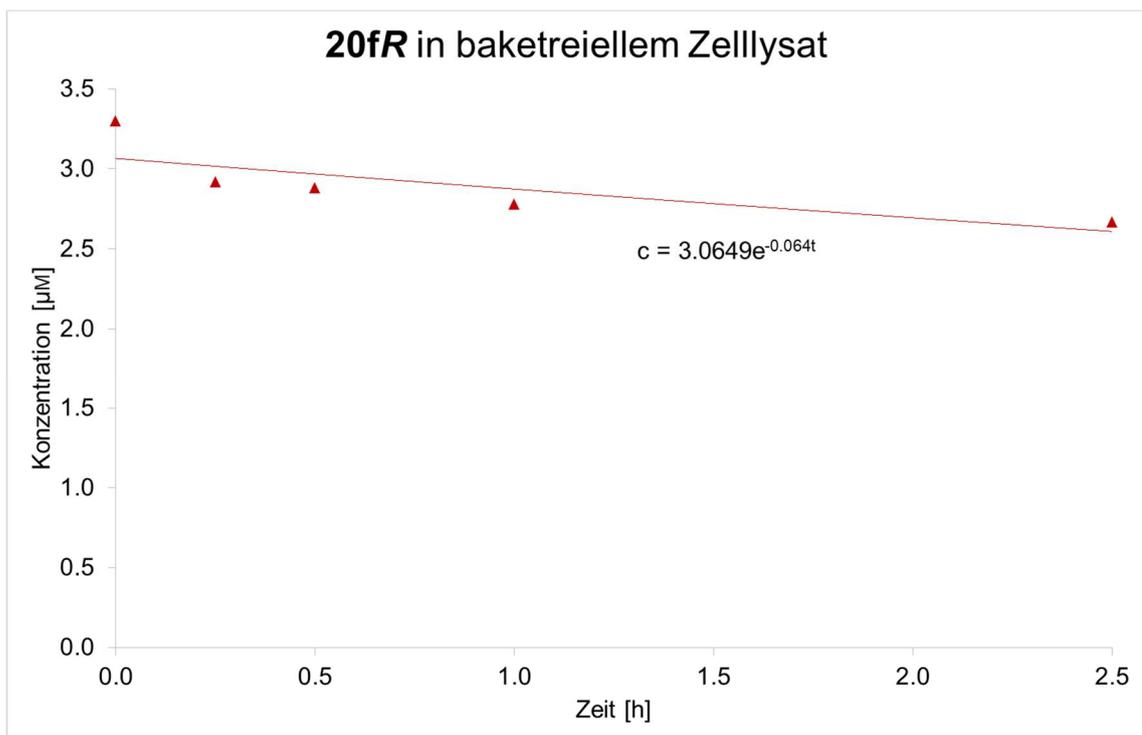
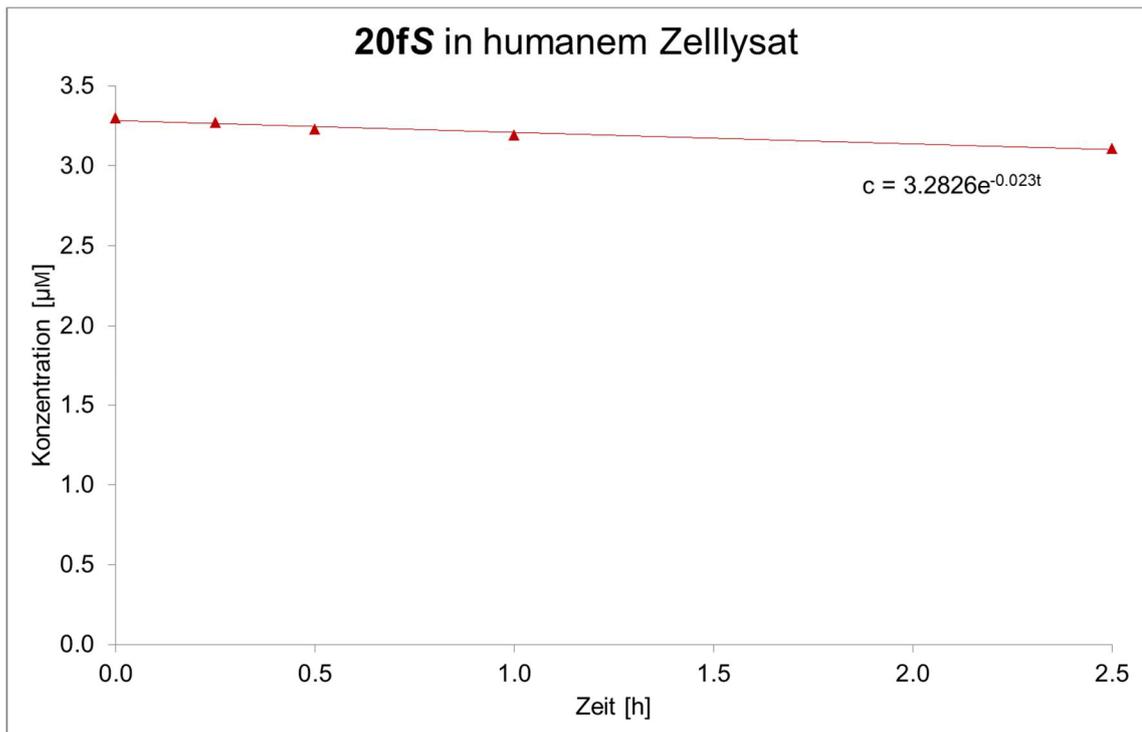


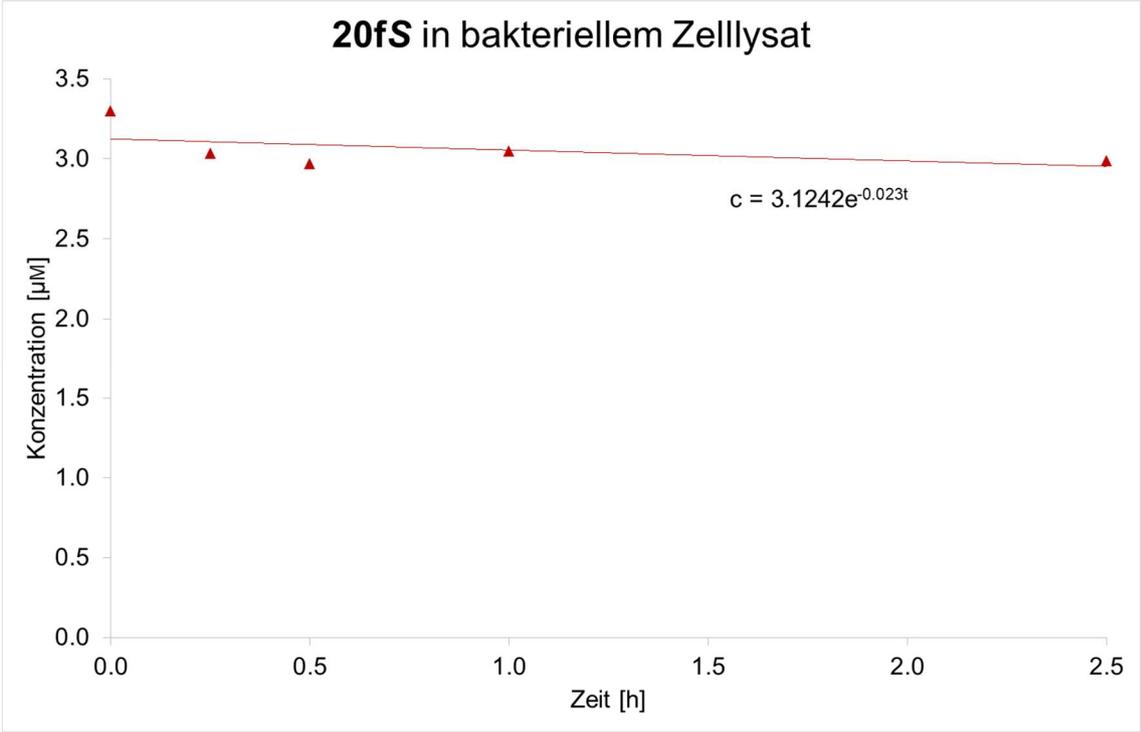
**20fR/S**



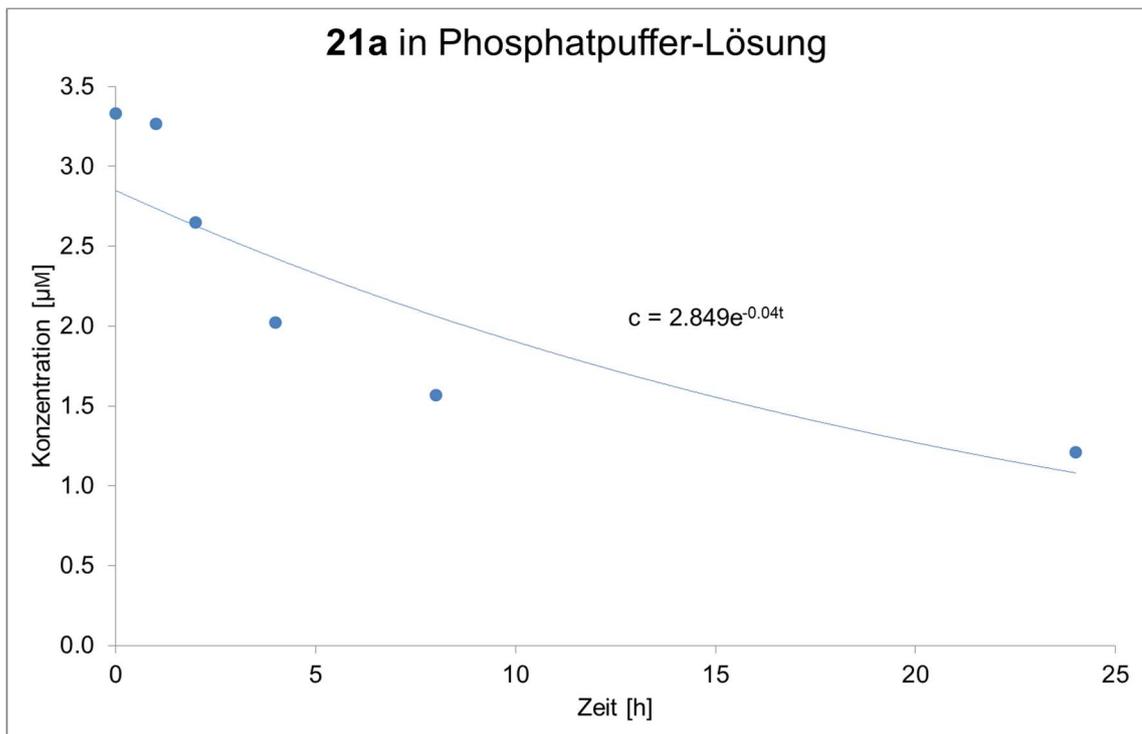
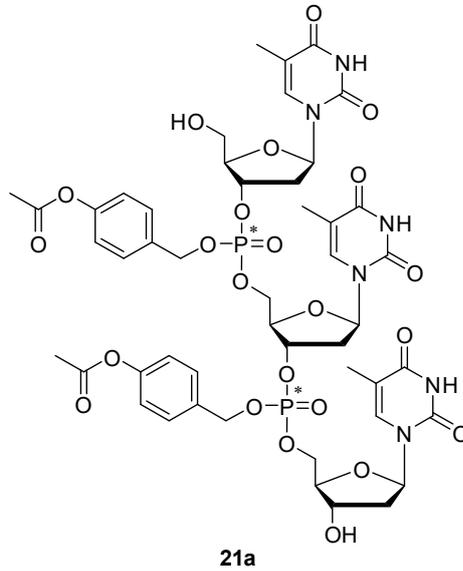


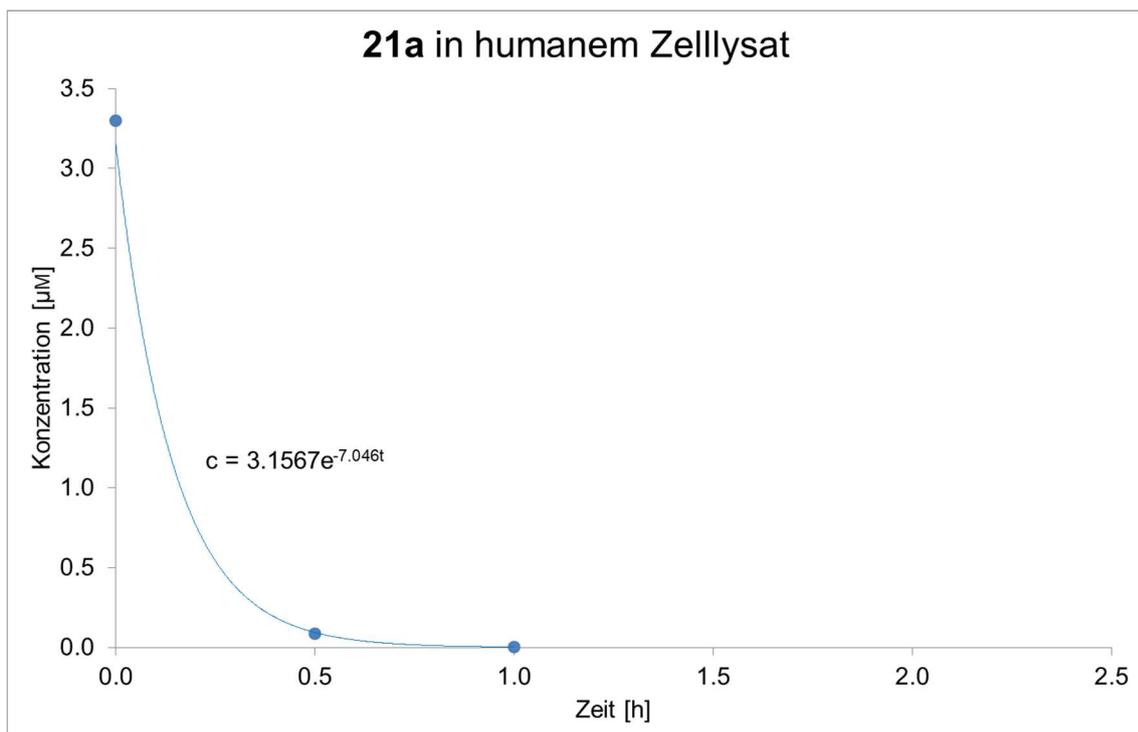
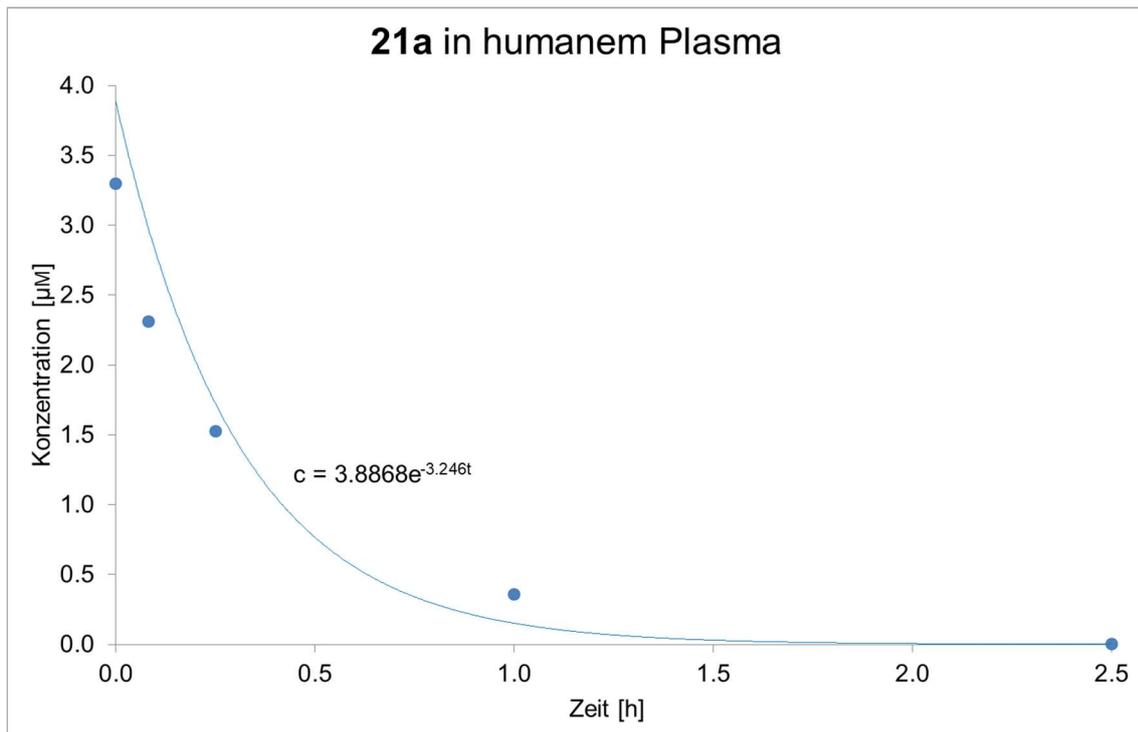


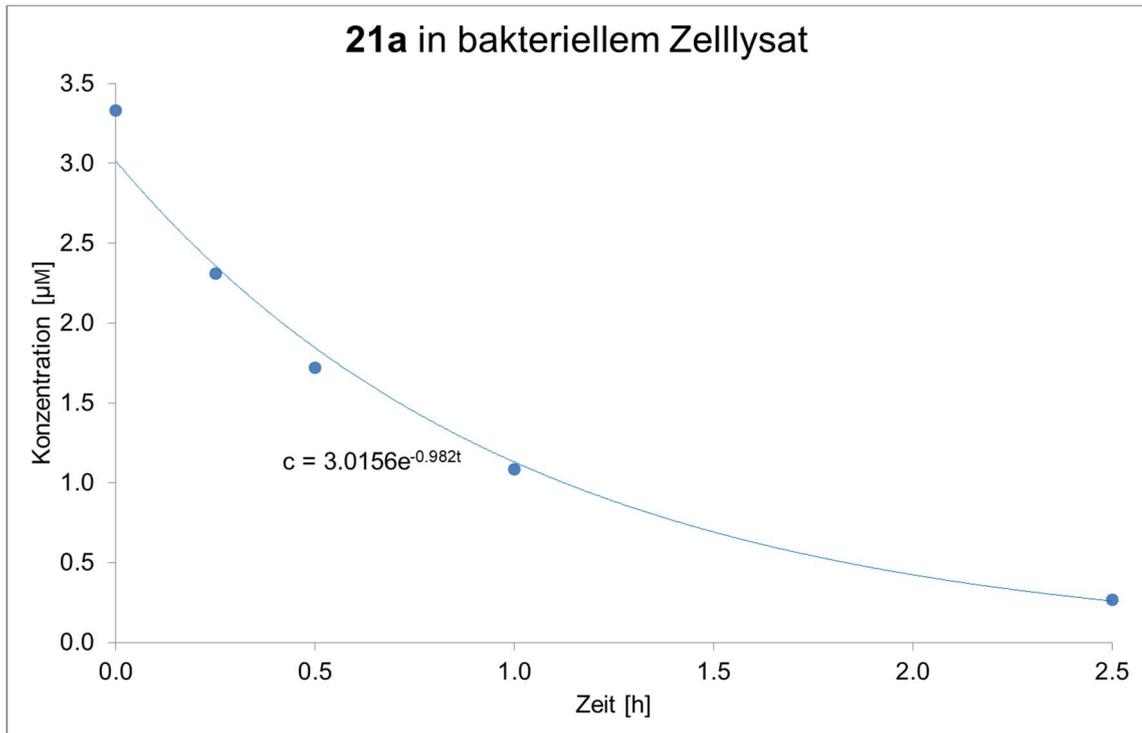




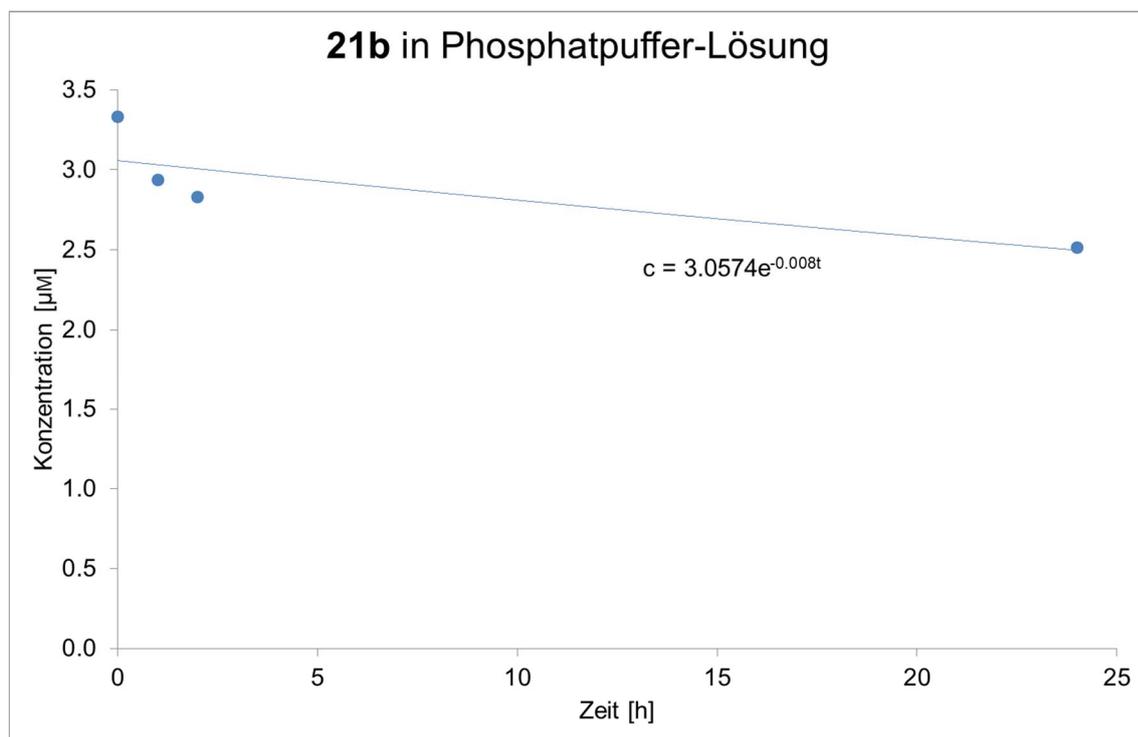
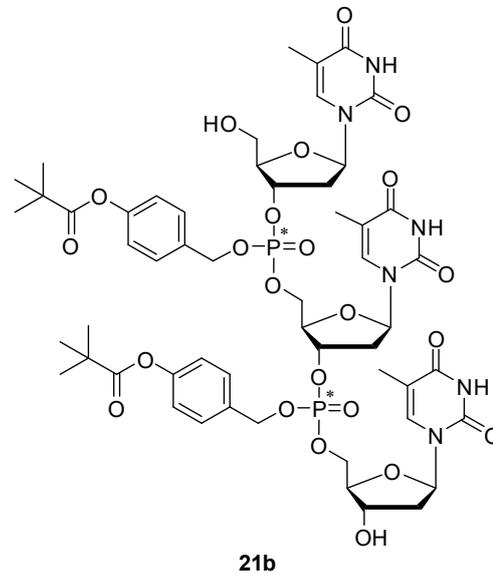
**Anhang VII:** Stabilitäts-Tests von Verbindung **21a** in Phosphatpuffer-Lösung, humanem Plasma, humanem Zelllysatz und bakteriellem Zelllysatz.

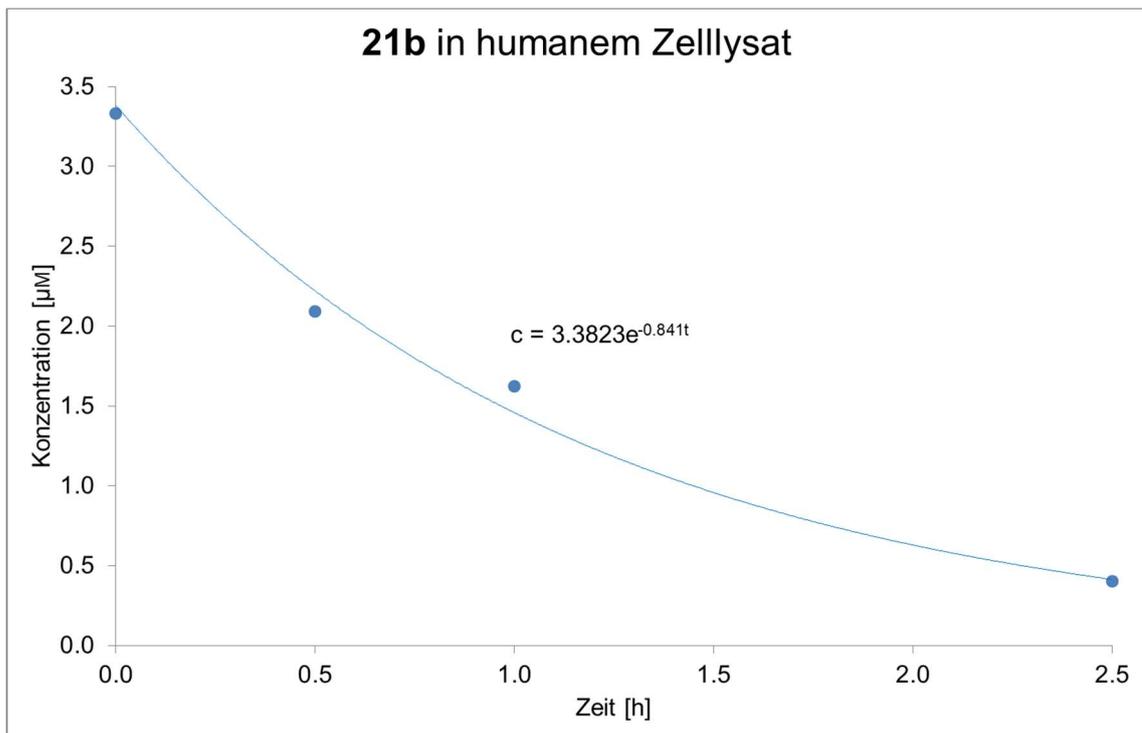
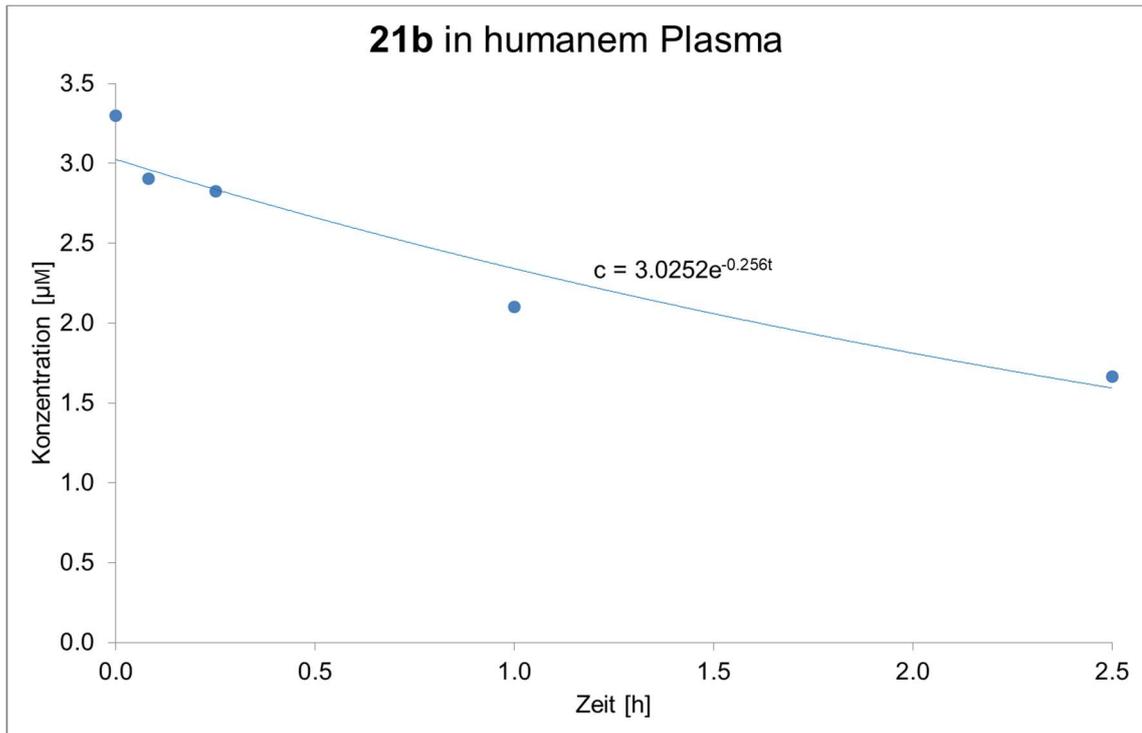


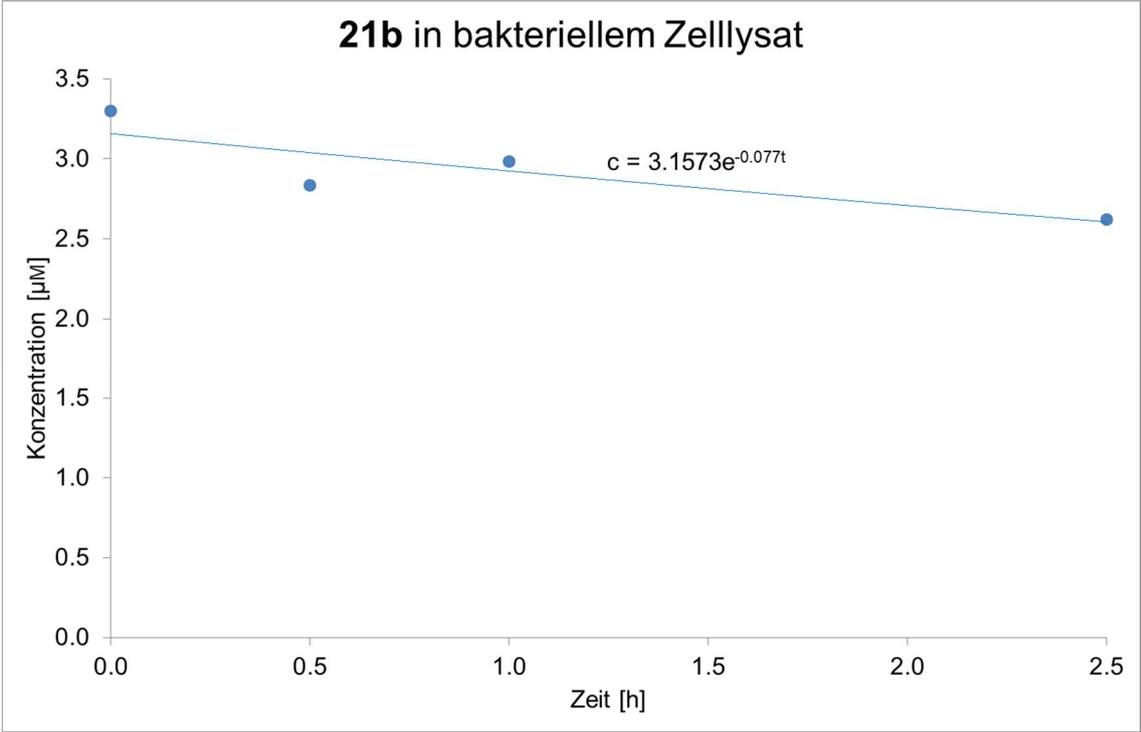




**Anhang VIII:** Stabilitäts-Tests von Verbindung **21b** in Phosphatpuffer-Lösung, humanem Plasma, humanem Zelllysate und bakteriellem Zelllysate.







**Anhang IX:** Stabilitäts-Tests von Verbindung **21c** in Phosphatpuffer-Lösung, humanem Plasma, humanem Zelllysate und bakteriellem Zelllysate.

