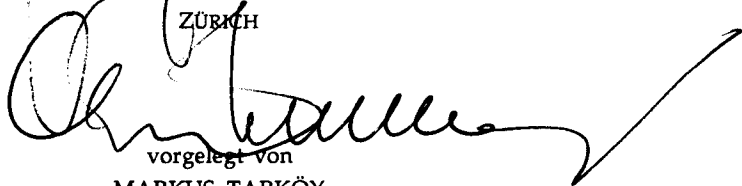


Diss. ETH Nr. 10109

**NUKLEINSÄURE-ANALOGA MIT KONFORMATIONELL
EINGESCHRÄNKTEM ZUCKER-PHOSPHAT-RÜCKGRAT (BICYCLO-DNS):
SYNTHESE UND EIGENSCHAFTEN ADENIN- UND THYMINHALTIGER
BICYCLOOLIGONUKLEOTIDE**

ABHANDLUNG
zur Erlangung des Titels eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH



vorgelegt von
MARKUS TARKÖY
dipl. Chem. ETH
geboren am 24. Juni 1964
von Zürich

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. A. Eschenmoser, Referent
Dr. C. Leumann, Korreferent

Zürich 1993

*Meinen lieben Eltern in
grosser Dankbarkeit gewidmet*

Herrn Dr. Christian Leumann,
unter dessen Leitung ich dieses spannende Thema bearbeiten durfte, möchte ich
ganz herzlich für das mir entgegengebrachte Vertrauen danken. Seine
rücksichtsvolle Art –wie auch sein Enthusiasmus, der äusserst ansteckend
wirkte– werden mir in bester Erinnerung bleiben.

Herrn Prof. Dr. A. Eschenmoser
danke ich für die Möglichkeit, diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe
durchzuführen. Damit verbunden waren somit die Benutzung der gesamten
'gruppeninternen' Infrastruktur, wie auch finanzielle Zuwendungen. Sein
Interesse an dieser Arbeit, die abgekoppelt von den eigenen Forschungsarbeiten
durchgeführt wurde, war nichtsdestotrotz bis am Schluss vorhanden, was ich
sehr geschätzt habe.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Atmosphäre, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Speziell danken möchte ich dem unermüdlich harten Kern: Reto Fischer, Fredy Giger, Peter Lohse, Christoph Spinner und Andy Helg. Mit ihnen konnte man das eine oder andere 'Ross' stehlen.

Frau Dr. D. Felix, welche zum frisch gekochten Tee immer eine Geschichte zu erzählen wusste, hat mich in die Kunst der Gaschromatographie eingeführt. Dafür möchte ich Ihr ganz herzlich danken.

Herr Dr. J. Schreiber, der uns allzu früh verlassen hat, wird mir durch seine hervorragenden Kenntnisse in der HPL Chromatographie und seine immense Hilfsbereitschaft in dankbarer Erinnerung bleiben.

Frau und Herrn Zass möchte ich für Ihre Unterstützung in administrativer wie auch in 'computerrecherchenmässiger' Hinsicht meinen grossen Dank aussprechen.

Zum Schluss möchte ich nicht versäumen, meinen ehemaligen Laborkollegen, die mich ertragen mussten, zu danken. Es sind dies Kaspar Zimmermann, Tom Oberhauser und Fritz Kreppelt.

Der Gruppe Leumann, bestehend aus Marianne Erni, Martin Bolli und Roger Kappeler (mein Ex-Lehrling, der für mich grosse Nachschubansätze gekocht hat), danke ich für ihre unermüdliche Motivierungsarbeit während des Zusammenschreibens, aber auch für ihre spontanen, konstruktiven (?) Bemerkungen bei allfälligen kleineren Zwischenfällen.

Diese Arbeit wurde vom Stipendienfonds der Basler Chemischen Industrie und vom Schweizerischen Nationalfonds unterstützt.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert oder zur Publikation eingereicht:

M. Tarköy, M. Bolli, B. Schweizer, C. Leumann, *Helv. Chim. Acta* **76**, 481 (1993)

M. Tarköy, C. Leumann, *Angew. Chem.* eingereicht März 1993

ALLGEMEINER TEIL

Zusammenfassung	V
Summary	VII
1. Einführung	1
1.1 "Antisense": eine Strategie	1
1.2 Anforderungen an ein "antisense" Oligonukleotid	2
1.2.1 Änderungen am Phosphatrückgrat	4
1.2.2 Strukturelle Variation der Zuckerkomponente	5
1.3 Gründe zur Entwicklung eines bicyclischen Nukleinsäureanalogons	7
1.3.1 Vorstellungen und Erwartungen	9
2. Synthese des bicyclischen Ribozuckers und der Bausteine für die Oligonukleotidsynthese	12
2.1 Synthese des bicyclischen Zuckergerüsts	12
2.1.1 Herstellung des geschützten Ketons 3,3-Dimethyl-2,4-dioxabicyclo[3.3.0]-6-on	14
2.1.2 Darstellung von 3',3'-Dimethyl-2',4'-dioxabicyclo[3.3.0]oct-6'-ylidenessigsäureethylester mittels einer Wittig-Horner Reaktion	16
2.1.3 Basenkatalysierte Isomerisierung zum 3',3'-Dimethyl-2',4'-dioxabicyclo[3.3.0]oct-6'-en-6'-yl-essigsäureethylester	17
2.1.4 Epoxidierung mit m-Chlorperbenzoesäure zum 6',7'-epoxy-3',3'-dimethyl-2',4'-dioxabicyclo[3.3.0]oct-6'-yl-essigsäureethylester	18
2.1.5 Kinetische Racematspaltung des Esters (\pm)- 9 mit Schweineleberesterase	20
2.1.6 Bestimmung der absoluten Konfiguration anhand des Diols (+)- 11 durch Veresterung mit (-)-Camphansäurechlorid	21
2.1.7 Oxidation der primären Hydroxylgruppe zum 6'-Hydroxy-3',3'-dimethyl-2',4'-dioxabicyclo[3.3.0]oct-6'-yl-acetaldehyd	23
2.1.8 Ringschluss zum bicyclischen Zuckerbaustein: 3,5,8-triacetoxy-2-oxabicyclo[3.3.0]octan	24
2.2 Nukleosidierungen von 3,5,8-triacetoxy-2-oxabicyclo[3.3.0]octan mit Benzoyladenin und Thymin	25
2.3 Über die Auftrennung in die einzelnen Anomeren	26
2.4 Charakterisierung der anomerenreinen Bicyclconukleoside	29

2.5	Zur Konformation der β -konfigurierten Bicyclonukleoside	33
2.5.1	Röntgenstrukturanalyse des β -Bicyclothymidins	33
2.5.2	Vergleich der Zuckerkonformation in Lösung und im Kristall	35
2.5.3	Über die Orientierung der Base relativ zum Zuckergerüst	39
2.6	Bausteine zur automatisierten Synthese von DNS an einer Festphase	40
2.7	Automatisierten Synthese der Oligonukleotide an einer Festphase	44
2.7.1	Charakterisierung der Decameren von bcA ₁₀ und bcT ₁₀ mittels "time of flight" Massenspektren	49
3.	Eigenschaften der neuartigen bicyclischen Adenosin- und Thymidin-Oligomere	52
3.1	Paarung von bcT ₁₀ und bcA ₁₀ mit den jeweiligen komplementären Homopolymeren poly dA, poly A und poly U	52
3.1.1	Die beiden Einzelstränge bcT ₁₀ und bcA ₁₀	52
3.1.2	Komplexierung mit poly dA, poly A und poly U	56
3.2	Paarung von bcA ₁₀ und bcT ₁₀ mit DNS Komplementärsequenzen gleicher Länge	62
3.2.1	dA ₁₀ und bcT ₁₀	62
3.2.2	Die alternierende (bcT-dT) ₅ Sequenz	66
3.2.3	Duplexdestabilisierung durch Basenfehlpaarung	67
3.3	Der stabile Duplex bcA ₁₀ :bcT ₁₀	68
3.4	Untersuchungen zur Paarungsstöchiometrie in Komplexen von bcA ₁₀ und bcT ₁₀ mit den entsprechenden natürlichen Komplementärsträngen, sowie mit sich selbst	71
3.4.1	Mischkurventechnik	72
3.4.2	Polyacrylamidgelelektrophorese	78
3.5	Zur Thermodynamik der Assoziatbildung zwischen bicyclischer und natürlicher DNS	81
3.5.1	Kurze Erläuterung der beiden verwendeten Messmethoden	82
3.5.2	Thermodynamische Untersuchungen anhand der vier möglichen Duplexe gebildet aus bcA ₁₀ , bcT ₁₀ , dA ₁₀ und dT ₁₀	84
3.6	Nukleasenresistenz der Sequenz bcT ₁₀ verglichen mit dT ₁₀	89
3.7	Ausblick	91

EXPERIMENTELLER TEIL

4. Allgemeine Angaben zum Experimentellen Teil	93
4.1 Verwendete Instrumente, Apparaturen und Materialien	93
4.2 Definitionen	101
4.3 Lösungsmittel und Reagenzien	102
4.4 Abkürzungen	104
4.5 Gene-Assembler Protokoll	105
4.6 Bemerkungen zur Nomenklatur	109
5. Synthese des Zuckerbausteines	110
5.1 (1R/S,5R/S)-3,3-Dimethyl-2,4-dioxabicyclo[3.3.0]oct-6-on (\pm)-6	110
5.2 E&Z-(1'R/S,5'S/R)-(3',3'-Dimethyl-2',4'-dioxabicyclo[3.3.0]oct-6'-yliden) essigsäureethylester (\pm)-7	112
5.3 (1'R/S,5'S/R)-(3',3'-Dimethyl-2',4'-dioxabicyclo[3.3.0]oct-6'-enyl) essigsäureethylester (\pm)-8	115
5.4 (1'R/S,5'S/R,6'R und S,7'R und S)-(6',7'-Epoxy-3',3'-dimethyl-2',4'-dioxabicyclo[3.3.0]oct-6'-yl) essigsäureethylester (\pm)-9	117
5.5 (1'R,5'R,6'R,7'R)-(6',7'-Epoxy-3',3'-dimethyl-2',4'-dioxabicyclo[3.3.0]oct-6'-yl) essigsäure 10	120
5.6 (1'R,5'R,6'S)-2-(6'-Hydroxy-3',3'-dimethyl-2',4'-dioxabicyclo[3.3.0]oct-6'-yl) ethan-1-ol (-)-11	122
5.7 (S)-Camphansäure-2-((1'S,5'S,6'R)-6'-hydroxy-3',3'-dimethyl-2',4'-dioxabicyclo[3.3.0]oct-6'-yl) ethylester 12	124
5.8 (1'R,5'R,6'S)-(6'-Hydroxy-3',3'-dimethyl-2',4'-dioxabicyclo[3.3.0]oct-6'-yl) acetaldehyd 13	129
5.9 (1R,3R/S,5S,8R)-3,5,8-triacetoxy-2-oxabicyclo[3.3.0]octan 14	131
6. Synthese der Nucleoside und der Bausteine für die Oligonucleotidsynthese an einer Festphase	133
6.1 (5'R)-1-(3',5'-O-Diacetyl-2'-deoxy-3',5'-ethano- α,β -D-ribofuranosyl) thymin 15 α/β	133
6.2 (5'R)-N ⁶ -Benzoyl-9-(3',5'-O-Diacetyl-2'-deoxy-3',5'-ethano- α,β -D-ribofuranosyl) adenin 16 α/β	135
6.3 (5'R)-1-(5'-O-tert. butyldimethylsilyl-2'-deoxy-3',5'-ethano- $\alpha+\beta$ -D-ribofuranosyl) thymin 17 $\alpha+17\beta$	137

IV

6.4 (5'R)-N ⁶ -Benzoyl-9-(5'-O-tert. butyldimethylsilyl-2'-deoxy-3',5'-ethano- α + β -D-ribofuranosyl) adenin 18 α +18 β	140
6.5 (5'R)-1-(2'-deoxy-3',5'-ethano- β -D-ribofuranosyl) thymin 19 β	143
6.6 (5'R)-1-(2'-deoxy-3',5'-ethano- α -D-ribofuranosyl) thymin 19 α	148
6.7 (5'R)-N ⁶ -Benzoyl-9-(2'-deoxy-3',5'-ethano- β -D-ribofuranosyl) adenin 20 β	150
6.8 (5'R)-9-(2'-deoxy-3',5'-ethano- β -D-ribofuranosyl) adenin 21 β	152
6.9 (5'R)-N ⁶ -Benzoyl-9-(2'-deoxy-3',5'-ethano- α -D-ribofuranosyl) adenin 20 α	154
6.10 (5'R)-9-(2'-deoxy-3',5'-ethano- α -D-ribofuranosyl) adenin 21 α	156
6.11 (5'R)-1-(2'-deoxy-5'-O-[(4,4'-dimethoxytriphenyl)methyl]-3',5'-ethano- β -D-ribofuranosyl) thymin 22 β	158
6.12 (5'R)-N ⁶ -Benzoyl-9-(2'-deoxy-5'-O-[(4,4'-dimethoxytriphenyl)methyl]-3',5'-ethano- β -D-ribofuranosyl) adenin 23 β	160
6.13 (5'R)-1-(3'-O-[(2-cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphino]-2'-deoxy-5'-O-[(4,4'-dimethoxytriphenyl)methyl]-3',5'-ethano- β -D-ribofuranosyl) thymin 24 β	162
6.14 (5'R)-N ⁶ -Benzoyl-9-(3'-O-[(2-cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphino]-2'-deoxy-5'-O-[(4,4'-dimethoxytriphenyl)methyl]-3',5'-ethano- β -D-ribofuranosyl) adenin 25 β	164
6.15 (5'R)-1-(3'-O-[(allyloxy)(diisopropylamino)phosphino]-2'-deoxy-5'-O-[(4,4'-dimethoxytriphenyl)methyl]-3',5'-ethano- β -D-ribofuranosyl) thymin 26 β	166
6.16 (5'R)-1-(2'-deoxy-5'-O-[(4,4'-dimethoxytriphenyl)methyl]-3',5'-ethano-3'-O-[4-O-(4-nitrophenyl)succinyl]- β -D-ribofuranosyl) thymin 27 β	168
6.17 (5'R)-N ⁶ -Benzoyl-9-(2'-deoxy-5'-O-[(4,4'-dimethoxytriphenyl)methyl]-3',5'-ethano-3'-O-[4-O-(4-nitrophenyl)succinyl]- β -D-ribofuranosyl) adenin 28 β	170
6.18 Herstellung der festphasengebundenen Nukleoside	172
6.19 Automatisierte Oligonukleotidsynthese an einer Festphase	172
7. Literatur	173
8. Lebenslauf	177

Zusammenfassung

Angeregt durch Arbeiten von *Eschenmoser* [16] zur Homo-DNS (Oligo 2',3'-dideoxy- β -D-glucopyrano-Nukleotide), in welchen erstmals, vergleichsweise zu natürlicher DNS, entropische Stabilisierung der Duplexierung beobachtet wurde, haben wir einen neuen Nucleosidtyp –Bicyclonucleoside (5',8'-dihydroxy-2'-oxabicyclo[3.3.0]oct-3'-yl = 2'-deoxy-3',5'-ethano- β -D-ribofurano-Nucleoside)– synthetisiert. Durch die Einführung einer Ethylenbrücke zwischen der C(3') und C(5') Position werden zwei der sechs für die Konformation der repetitiven Nucleotideinheit in einem DNS-Duplex verantwortlichen Torsionswinkel δ und γ in ihrer Rotationsfreiheit weitgehend eingeschränkt, bei möglichst unveränderter Geometrie. Extrapoliert auf ein Bicyclo-Oligonucleotid darf man deshalb einen höheren Präorganisationsgrad des Einzelstranges zur Duplexierung erwarten. Oligonucleotid-Analoga, die stabilere Duplexe mit natürlicher DNS bzw. RNS eingehen, sind im Rahmen der "antisense" Strategie von Bedeutung.

Ausgehend von racemischem Keton (\pm)-6 wurde in mehreren Transformationen (inkl. Racematspaltung) das bicyclische Kohlenhydratgerüst 14 in enantiomerenreiner Form aufgebaut. Die absolute Konfiguration des Zuckers wurde anhand des Camphansäurederivates des Synthesezwischenproduktes (+)-11 mittels Röntgenstrukturanalyse sichergestellt. Die Konfiguration an den neu entstandenen Chiralitätszentren (3'S und 5'R) wurde so gewählt, dass die gebildete Struktur geometrisch einer repetitiven Nucleotideinheit in einem DNS-Duplex nahekommt.

Die Synthese, der in dieser Arbeit untersuchten Adenin- (20 α und 20 β) und Thymin-haltigen Bicyclonucleoside (19 α und 19 β) gelang nach dem von *Vorbrüggen* [38] entwickelten Eintopfverfahren. Es wurden jeweils die α - wie auch β -Anomeren der entsprechenden Nucleoside isoliert; mit $^1\text{H-NMR}$ NOE-Differenz Spektroskopie konnte die Zuordnung der relativen Konfiguration am anomeren Zentrum eindeutig bestimmt werden. Eine Röntgenstrukturanalyse des Bicyclothymidinmonomeren 19 β zeigte auf, dass der Zucker eine 1'-exo Konformation einnimmt, wobei die Winkel $\gamma=149.3^\circ$ und $\delta=126.5^\circ$ betragen ($\gamma=172.8^\circ$ und $\delta=156.2^\circ$ im dT). Die Oligomersynthese wurde nach der Phosphoramiditmethode [50] an einer Festphase durchgeführt. Die Decameren von Bicyclothymidin (bcT₁₀) und Bicyclodeoxyadenosin (bcA₁₀) wurden dabei unter anderem mit massenspektroskopischen Methoden charakterisiert.

Mittels UV-, CD-Spektroskopie, Polyacrylamidgelelektrophorese und DSC Messungen ("Differential scanning calorimetry") haben wir die Paarungseigenschaften dieser bicyclischen Oligonukleotide untersucht und dabei folgendes festgestellt:

- A) Die von bcT₁₀ gebildeten Komplexe mit komplementärer DNS sind weniger stabil als die von bcA₁₀ gebildeten. Letztere sind sogar im Vergleich zu den aus natürlicher DNS erhaltenen Assoziaten stabiler.
- B) bcT₁₀ bildet vergleichbar starke Assoziate mit poly A wie natürliches dT₁₀. Jedoch sind die Komplexe zwischen bcA₁₀ und poly U deutlich stabiler als das entsprechende natürliche DNS-RNS Hybrid. bcT₁₀ bindet bevorzugt an komplementäre RNS als an entsprechende DNS.
- C) Paarungssysteme von bicyclischen A- bzw. T-Decameren, in welchen mindestens ein Strang bicyclischer Natur ist, können –im Gegensatz zu natürlichen– unter quasi physiologischen Bedingungen (0.15M NaCl) Triplexstrukturen ausbilden.
- D) In Duplexen, welche mindestens einen bicyclischen Einzelstrang enthalten, wird der Beitrag des Entropieterms ΔS und des Enthalpieterms ΔH zur freien Paarungsenthalpie ΔG vergleichsweise zum natürlichen Duplex betragsmäßig kleiner. Dabei trägt die Entropie ΔS zu einer Stabilisierung, jedoch der Enthalpieterm ΔH zu einer Destabilisierung der Duplexierung bei.
- E) Im Vergleich zu dT₁₀ zeigt bcT₁₀ eine erhöhte Nukleasenresistenz. Das Bicyclothymidin-Decamere wird von einer 5'-exo-Nuklease (calf spleen) als sehr schlechtes Substrat erkannt (~14000 x schlechter als dT₁₀). Eine unspezifische exo-endo-Nuklease (S1) baut das dT₁₀ circa 100 mal schneller ab als das bicyclische Oligomere. Wird eine 3'-exo-Nuklease (snake venom) eingesetzt, so ist das Decamere des Bicyclothymidins immerhin um einen Faktor 3 stabiler.

Summary

Stimulated by the achievements of *Eschenmoser* [16] in the synthesis of Homo-DNA (oligo 2',3'-dideoxy- β -D-glucopyrano-nucleotides), where it was first recognised that an entropic stabilisation of the complexing process is taking place, we have synthesised a new type of nucleoside, the bicyclonucleosides (5',8'-dihydroxy-2'-oxabicyclo[3.3.0]oct-3'-yl-nucleosides = 2'-deoxy-3',5'-ethano- β -D-ribofuranonucleosides). By the introduction of an ethylene-bridge between the position C(3') and C(5'), two out of six torsion angles γ and δ , responsible for the conformation of a repetitive nucleoside unit in a DNA duplex, are largely restricted in their degree of rotational freedom. Thus one can expect from a bicyclic system that the single strand possesses a higher degree of preorganisation in the complex forming process. Oligonucleotide analogues which are binding strongly to natural DNA or RNA play an important role in the 'antisense strategy'.

Starting with the racemic ketone (\pm)-6 the enantiomerically pure bicyclic carbohydrate skeleton 14 was built up in several steps (incl. racemic resolution). The absolute configuration of the sugar was established by x-ray analysis of the Camphanic acid derivative from the intermediate (+)-11. The configurations of the newly formed chiral centres (3'S and 5'R) were chosen in such a manner that the new structure closely resembled the geometry of a repetitive nucleoside-unit in a DNA duplex.

The synthesis of Adenine- (20 α and 20 β) and Thymine-bicyclonucleosides (19 α and 19 β) was successful according to the one-pot procedure of *Vorbriiggen* [38]. Both α - and β -anomers of the corresponding nucleosides were isolated. The relative configuration at the anomeric center was established by $^1\text{H-NMR}$ NOE-difference spectroscopy. X-ray structural analysis of 19 β revealed the 1'-exo conformation of the sugar with angles $\gamma=149.3^\circ$ and $\delta=126.5^\circ$ (dT has $\gamma=172.8^\circ$ and $\delta=156.2^\circ$). The solid-phase synthesis of the oligomer was performed according to the phosphoramidite method [50]. The resulting decamers of bicyclothymidine (bcT₁₀) and bicyclocodeoxyadenosine (bcA₁₀) were characterised by time of flight mass-spectrometry.

The pairing properties of the oligonucleotides were investigated by UV-, CD-spectroscopy, polyacrylamide-gel electrophoresis as well as DSC measurements ('differential scanning calorimetry') and the following results were obtained:

VIII

- A) Complexes formed from bcT₁₀ and complementary DNA are less stable than structures resulting from bcA₁₀ and DNA. In comparison to the natural duplexes the latter is even more stable.
- B) bcT₁₀ yields similarly bounded associate molecules with poly A as the ones formed by natural dT₁₀. Complexes between bcA₁₀ and poly U are remarkably more stable than the comparable natural DNA-RNA hybrid. The oligonucleotide bcT₁₀ is preferentially binding better to RNA than it does to DNA.
- C) Paired systems from bicyclic A- and T-decamers, consisting at least of one bicyclic single strand, are able to form triplex structures under nearly physiological conditions (0.15M NaCl) contrary to natural systems.
- D) In duplexes which contained at least one bicyclic single strand, the contribution of entropy (ΔS) and enthalpy (ΔH) to the free energy of pairing (ΔG) is diminished as compared to the natural duplex. Thus the entropy (ΔS) brings about stabilisation of the complex whereas the enthalpy (ΔH) is destabilising the complexing process.
- E) Under the same conditions, the resistance of bcT₁₀ to nucleases is higher compared with dT₁₀. It turned out that a 5'-exo nuclease (calf spleen) recognizes bcT₁₀ as an unsuitable substrate (about 14000 x less than dT₁₀). On the other hand a non-specific exo-endo nuclease (S1) degrades dT₁₀ about 100 times faster than it does the corresponding bicyclic oligomer. Finally the decamer of the bicyclothyridine is about 3 times more stable to 3'-exo nuclease (snake venom) than dT₁₀.

ALLGEMEINER TEIL

1. Einführung

Die Entdeckung der helikalen Duplex-Struktur der DNS durch *Watson* und *Crick* [1], und die daraus abgeleiteten Basenpaarungsregeln, muss als ein Meilenstein der biologischen Wissenschaften bezeichnet werden. Da die DNS als Speichermedium der Erbinformation die zentrale Rolle in der belebten Natur spielt, und weil es möglich ist, den Ursprung gewisser Krankheiten –speziell Erbkrankheiten und einige Tumorformen– auf ein bestimmtes Gen zurückzuführen, sind viele Forschungsarbeiten in dieser Sparte auch von einem medizinisch-therapeutischen Hintergrund motiviert. Aufbauend auf den spezifischen Basenpaarungsregeln von *Watson* und *Crick* hat sich das Gebiet der "antisense" Chemie entwickelt, welches auf der molekularen Ebene der DNS oder RNS Einfluss zu nehmen versucht: es sollen die für eine "falsche", das heisst krankheitsauslösende, Produktion an Aminosäuresequenzen verantwortlichen DNS Stücke, unter Ausnützung des *Watson-Crick'schen Komplementaritätsprinzipes*, erkannt und das entsprechende Gen an der Expression gehindert werden.

1.1 "Antisense": eine Strategie

Die "antisense" Strategie will selektiv die Genexpression inhibieren. Diese Unterdrückung kann auf dem Niveau der Proteinbiosynthese prinzipiell in zwei Teilschritten erzielt werden:

1. **Inhibierung der Transkription:** Anlagerung eines antisense Oligonukleotids am abzulesenden DNS-Duplex unter Ausbildung einer Triplexstruktur
2. **Inhibierung der Translation:** Anlagerung eines antisense Oligonukleotids an die Boten RNS (b-RNS) unter Ausbildung eines Duplexes

Durch eine lokale Triplexierung der DNS-Duplexstruktur kann einerseits die Replikation (Zellteilung) oder aber die Synthese der Boten RNS (Ablesevorgang

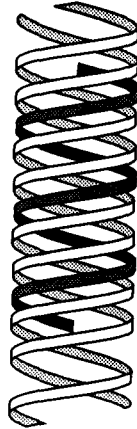
= Transkription) verunmöglicht werden [2]. Eine weitere Variante bietet die Duplexierung der neu synthetisierten Boten RNS (Abb.1). *Zamecnik* und *Stephenson* [3] zeigten (1978) in ihren Arbeiten, dass ein tridecameres Oligodeoxyribonukleotid fähig ist, sich sequenzspezifisch an ein virales RNS Stück zu hybridisieren und die Translation desselben zu unterbinden.

Bei der "antisense" Strategie ist es dank definierten Basenpaarungsregeln möglich, gezielt und somit auch rational eine bestimmte Wirkung zu erzielen. Die strukturellen Anforderungen an ein entsprechendes Oligonukleotid bleiben –im Gegensatz zum Beispiel einer Enzym- oder Proteininhibition– immer dieselben. Was sich ändert, sind die spezifische Basensequenz und -länge einer Zielsequenz und nur an dieses muss ein neuer, potentieller Komplexbildner angepasst werden. Die Möglichkeit der einfachen Herstellung von Oligonukleotiden, dank der automatisierten Syntheseverfahren, führte in den letzten paar Jahren, auch aufgrund des durchschaubaren Struktur/Wirkung-Prinzips des "antisense" Konzeptes, zu einer enormen Ausweitung dieses Forschungsgebietes.

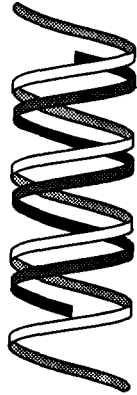
1.2 Anforderungen an ein "antisense" Oligonukleotid

Um im Inneren einer Zelle ihre Aufgabe wahrnehmen zu können, muss ein "antisense" Oligonukleotid, unter der Voraussetzung der Existenzfähigkeit in einem solchen biologischen Umfeld, hauptsächlich drei Kriterien genügen. Erstens muss die Resistenz gegenüber zelleigener Nukleasen gewährleistet sein. Zweitens soll die Paarungsfähigkeit bei gleichbleibender oder besserer Selektivität verstärkt werden. Aus der Sicht der Chemie sind diese beiden Punkte von besonderem Interesse. Jedoch nicht weniger wichtig ist die dritte, biologische Anforderung, dass nämlich ein potenter Transportmechanismus in die Zelle hinein besteht. Wie kann nun ein Oligonukleotid an solche Randbedingungen angepasst werden? Am aussichtsreichsten wohl durch zielgerichtete Änderungen an den Hauptkomponenten eines DNS Einzelstranges. Die Struktur eines DNS Einzelstranges lässt sich in drei Hauptkomponenten zerlegen, wobei jede dieser Komponenten –die internukleosidische Phosphodiestergruppierung, die Zuckerkomponente und in geringerem Ausmasse die Nukleinbasen– sich für eine Modifikation eignen. In diesem Zusammenhang sind schon verschiedene Arbeiten ausgeführt worden [4].

DNS

antisense
Oligonukleotid

Inhibierung der
Transkription



Inhibierung der
Translation

b-RNS

antisense
Oligonukleotid

Abb.1 Verallgemeinerte Darstellung der Antisense Strategie zur Unterbindung der Proteinbiosynthese.

1.2.1 Änderungen am Phosphatrückgrat

Bei neutralem pH liegt die Phosphodiestergruppierung als einfach negativ geladene Spezies vor. Wird beispielsweise die Ladung durch den Ersatz einer isosterischen, ladungsneutralen Funktionalität eliminiert, so erwartet man eine gegenüber den natürlichen DNS-Duplexen **enthalpisch** begünstigte Assoziatbildung, was auf das Wegfallen der Abstossung der negativen Ladungen zwischen den Phosphatgruppen der beiden Stränge im Duplex zurückzuführen ist (Abb.2).

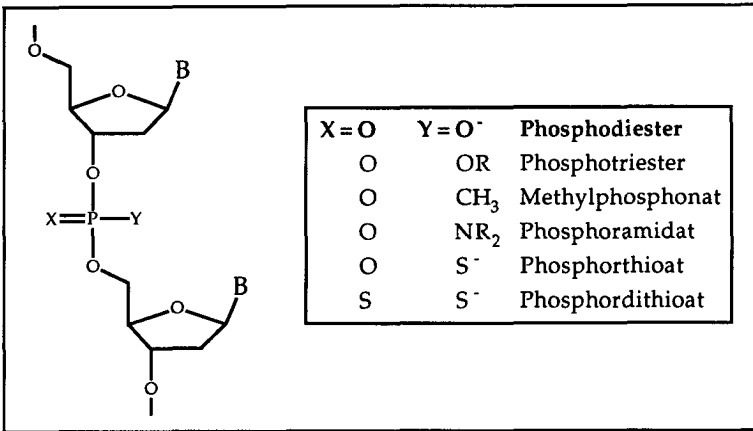
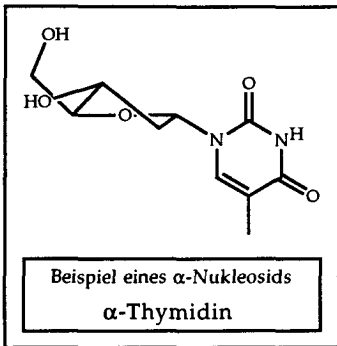


Abb.2 Einige der vielen Möglichkeiten einer veränderten Phosphodiesterfunktionalität

Oligonukleotide mit Methyl- bzw. Ethyl-Phosphotriestereinheiten wurden erstmals von *Miller et al.* [5] synthetisiert. Dabei stellte sich heraus, dass diese Derivate einerseits gegenüber *exo*-Nukleasen resistent sind und dass die Duplex-Stabilitäten von solchen Oligonukleotiden mit RNS ähnlich waren zu jenen der vergleichbaren natürlichen DNS-RNS Hybride. Der Paarungsenthalpiebeitrag pro mol Basenpaar war aber noch negativer als in natürlichen DNS-RNS Hybriden [6]. Der Ersatz eines nicht bindenden Sauerstoffatoms der Phosphodiestergruppe durch eine Methylgruppe, von *Miller et al.* [7] experimentell realisiert, führte zum Methylphosphonat (Abb.2). Diese zeigten ähnliche Paarungsstabilitäten wie die aus natürlicher DNS mit RNS gebildeten Duplexe. Interessant ist, dass bei tiefer Salzkonzentration die gebildeten Assoziat durchwegs stabiler sind. Die unter anderem von *Froehler* [8] eingeführte Phosphoramidateinheit als inter-

nukleosidische Verknüpfung (Abb.2) erwies sich gegenüber endo- wie auch exo-Nukleasen als resistent. Hingegen waren die untersuchten Komplexe, verglichen mit dem natürlichen System, schwächer. Alle diese, mit ungeladenen internukleosidischen Einheiten verknüpften Nukleotide, wiesen in ihren Duplexen praktisch keine Stabilitätsänderung bei unterschiedlicher Ionenstärke des Mediums auf. Ein Problem stellt die häufig geringe Löslichkeit komplett ladungsneutraler Makromoleküle in wässriger Umgebung dar. Es wurden auch einige Modifikationen mit der Absicht der erhöhten Resistenz gegenüber Nukleasen in Angriff genommen. Zu dieser Klasse gehören die Thiophosphate [9] und Dithiophosphate [10]. Solcherart modifizierte Oligonukleotide bilden mit komplementären DNS- und RNS-Sequenzen Komplexe mit verminderter bzw. leicht erhöhter thermodynamischer Stabilität. Alle in Abbildung 2 dargestellten Oligonukleotid Analoga (mit Ausnahme der Dithioate) werden unter den gängigen Synthesemethoden als Diastereomeregemische erhalten (neues Chiralitätszentrum am Phosphoratom). Bei einer Anzahl n -modifizierter Phosphodiestergruppierungen führt dies zu 2^n Diastereomeren. Dies ist mit grosser Wahrscheinlichkeit ein Grund für die, in den meisten Fällen beobachtete, schwächere bis gleichbleibende thermodynamische Stabilität solcher Komplexe.

1.2.2 Strukturelle Variation der Zuckerkomponente



Unter den Oligonukleotidanaloga mit veränderter Zuckerkomponente verdienen solche aus α -Nukleosiden besondere Beachtung. Als erster hat *Sequin* [11] vorgeschlagen, dass α -Oligonukleotide mit einem β -Oligonukleotidkomplement ein Assoziat bilden können, unter der Voraussetzung einer parallelen Anordnung beider Stränge. Dieser Sachverhalt konnte später durch Arbeiten von *Hélène*, *Imbach* und *Thuong* bestätigt werden [12]. Die α -DNS besitzt ausserdem eine hohe Resistenz gegenüber Nukleasen.

Hybride aus α -DNS mit komplementärer β -DNS weisen ähnliche thermodynamische Stabilitäten wie die entsprechenden reinen β -Duplexe auf. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die Stabilität solcher Assoziatsequenzabhängig ist [13].

Ein weiteres Beispiel einer **enthalpischen** Duplex-Stabilisierung stellt der Ersatz der Nukleobase Adenin durch Diaminopurin dar. Dabei wird die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen von zwei (im natürlichen A·T Basenpaar) auf drei (im Diaminopurin·T Basenpaar) erhöht, was sich in einer stärkeren Affinität zum Thymin auswirkt (in Abbildung 3 wiedergegeben).

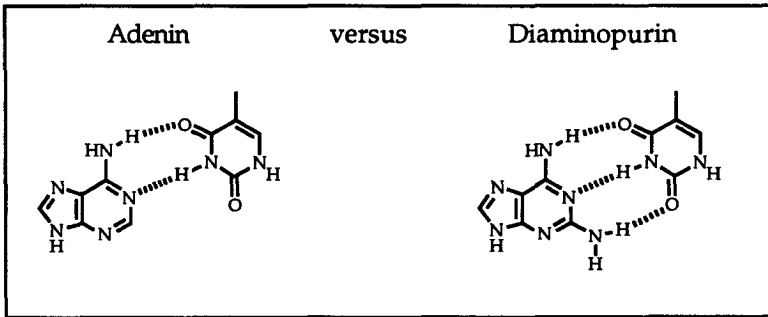


Abb.3 Veränderte Nukleinbasen verstärken normale Duplexe durch eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung

Kürzlich sind durch Arbeiten von *Nielsen et al.* [14] auch "antisense" Analoga bekanntgeworden, in welchen das Zuckerphosphatrückgrat vollständig durch ein achirales Peptid Rückgrat (PNS) ersetzt wurde. Anhand solcherart modifizierter T-Decameren stellten sie fest, dass in Duplexen mit einem komplementärem DNS Oligonukleotid die thermodynamischen Stabilitäten deutlich grösser waren als in vergleichbaren natürlichen Duplexen. Sie führen dies auf das ladungsneutrale Rückgrat und die durch die Amidgruppierungen eingeschränkte Flexibilität zurück. Offensichtlich entspricht die energetisch günstigste Konformation einer solchen, die geometrisch für eine Paarungsprozess geeignet ist. Eine wesentliche Rolle spielt aber auch das am C-Terminus sitzende Lysin, welches die Assoziation an den DNS Strang begünstigt und gleichzeitig die Selbstaggregation verringert [15]. Eine Darstellung dieser neuartigen Peptidnukleinsäure ist in Abbildung 4 gezeigt.

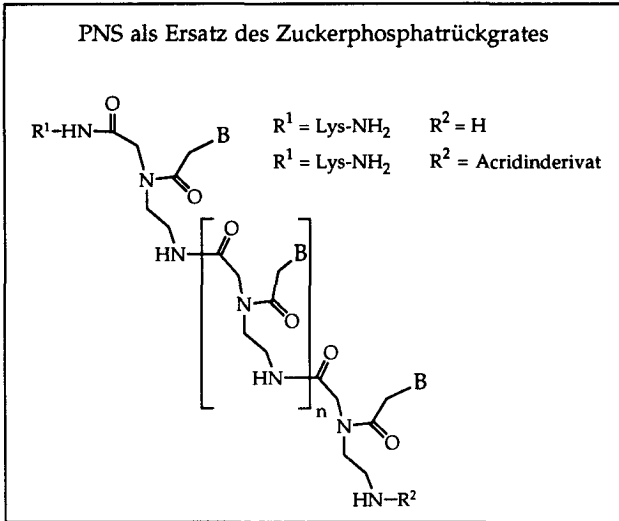


Abb.4 Vollständige Substitution des Zuckerphosphatrückgrates mit einem achiralen Peptidrückgrat.

1.3 Gründe zur Entwicklung eines bicyclischen Nukleinsäureanalogons

Bisherige Arbeiten zur Verstärkung der Paarungsstabilität zielten insbesondere auf die Begünstigung des Enthalpieterms einer Komplexierung hin. Dass eine Assoziation von Oligonukleotidsträngen auch **entropisch** stabilisiert werden kann, zeigen die Arbeiten von *Eschenmoser* [16] zur Homo-DNS (Abb.5). Homo-DNS-Duplexe sind vergleichsweise zu entsprechenden natürlichen DNS-Duplexen thermodynamisch stabiler. Diese erhöhte Stabilität ist auf einen verglichen zu den natürlichen Duplexen (betragsmässig) deutlich geringeren Entropieterm zurückzuführen. Dies lässt sich empirisch mit dem konformationell fixierteren Pyranosesessel im Vergleich zum flexibleren Furanosering erklären. Wie sich herausstellte, besitzt Homo-DNS jedoch keine Affinität zu natürlicher DNS und RNS¹.

¹ Homo DNS wurde nicht mit dem Hintergrund einer potentiellen Verwendbarkeit im "antisense"-Bereich entwickelt, sondern aufgrund von Überlegungen und Experimenten, die ihre Wurzeln in der präbiologischen Chemie haben.

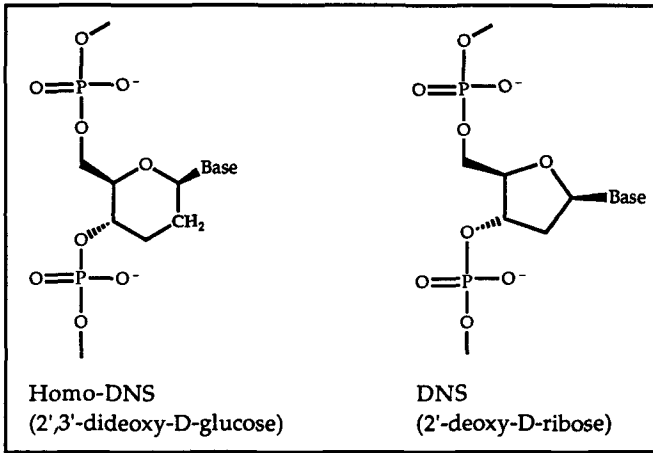


Abb.5 Homo-DNS ist aus 2',3'-dideoxy- β -D-glucopyrano-Nukleotiden aufgebaut und besitzt im Vergleich zu natürlicher DNS eine Methylengruppe mehr.

Experimente von *Schneider* und *Benner* [17] an Oligonukleotiden, welche acyclische, aus Glycerin abgeleitete Nucleosideinheiten enthalten, untermauern diese These. Das Paarungsverhalten solcher Oligonukleotide mit komplementärer DNS ist im Vergleich zu den reinen DNS-Duplexen deutlich schwächer. Auch eine in der Arbeitsgruppe von Prof. Eschenmoser von *Peng* [18] durchgeführte Untersuchung an Oligonukleotiden, bestehend aus acyclischen Nucleosideinheiten bis zu einer Kettenlänge eines 12-mers, zeigte, dass keine Affinität mehr zu komplementärer natürlicher DNS vorhanden war. Die Erhöhung der konformationellen Flexibilität führt, wie in obigen Fällen demonstriert, zu einer deutlichen Schwächung bzw. Verunmöglichung der Paarung.

Um das Konzept der im Falle der Homo-DNS aufgefundenen entropischen Stabilisierung der Basenpaarung auch auf Oligonukleotide auszudehnen, welche an komplementäre DNS und RNS paaren können, haben wir einen "neuen" Nucleosidtyp entwickelt (Bicyclonucleoside, Abb.6).

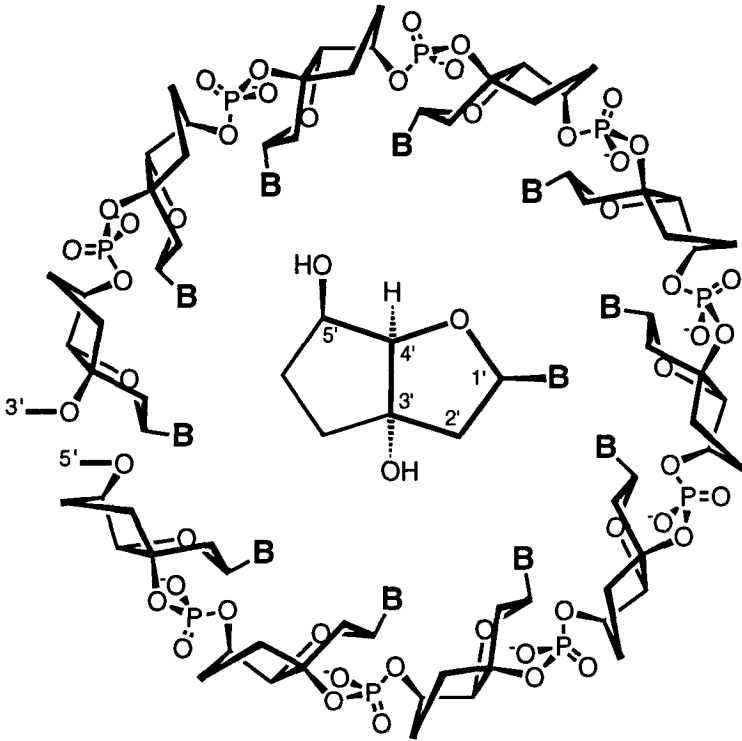


Abb.6 Bicyclo-DNS: Ein neuartiger Nucleosidtyp mit konformationell fixiertem Zuckerphosphatrückgrat

1.3.1 Vorstellungen und Erwartungen

Bicyclonucleoside unterscheiden sich von natürlicher DNS durch eine Ethylenbrücke zwischen den Zentren 3' und 5'. Durch diese neue cyclische Verbrückung werden zwei der sechs für die Konformation der repetitiven Nucleotideinheit in einem DNS-Duplex verantwortlichen Torsionswinkel δ und γ (vgl. Abb.7) in ihrer Rotationsfreiheit weitgehend eingeschränkt.

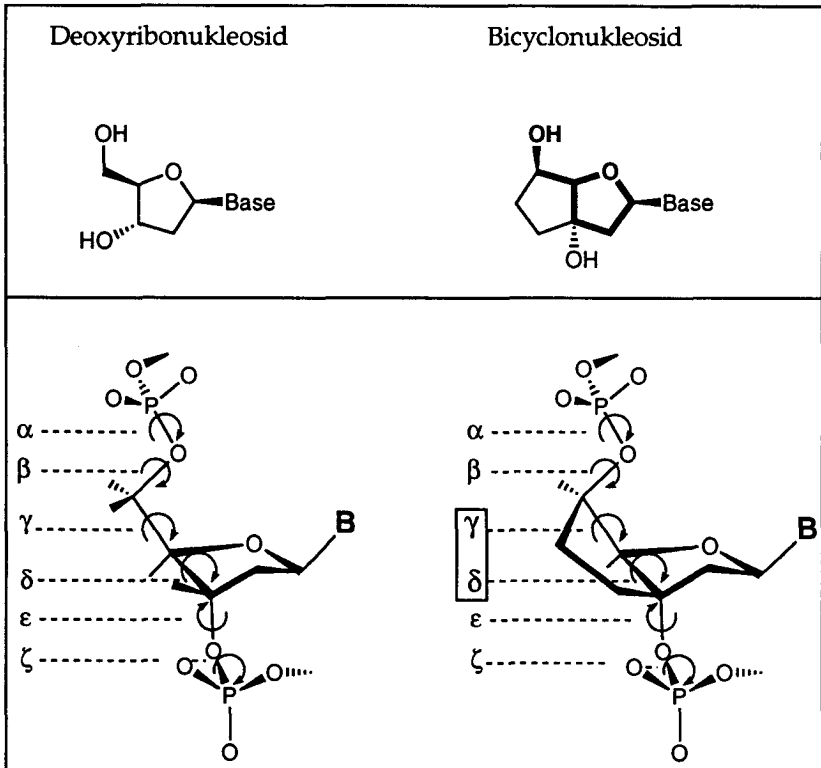


Abb.7 Das Grundgerüst der natürlichen Ribofuranose findet sich auch im bicyclischen Zucker wieder. Die C3' und C5' Positionen werden mittels einer Ethylenbrücke verknüpft, was zu einer konformationellen Fixierung der beiden Torsionswinkel γ und δ führt.

Extrapoliert auf ein Bicyclo-Oligonukleotid darf man deshalb einen höheren Präorganisationsgrad des Einzelstranges zur Duplexierung erwarten. Dieser Umstand müsste sich in einer betragsmässig geringeren Entropieänderung bei einer Duplexierung ausdrücken und könnte somit zu stabileren Assoziaten führen.

Aus Modellbetrachtungen geht hervor, dass die Furanoseeinheit in den bicyclischen Nucleosiden, als Konsequenz der Einführung eines Substituenten in C3' Stellung, einen S (C2'-endo-C3'-exo) gegenüber einem N (C3'-endo-C2'-

exo) Konformationstyp bevorzugen sollte. Letzterer Fall führt nämlich zu einer pseudodiaxialen Wechselwirkung zwischen der C2'-C3' und C1'-N Bindung² (Abb.8). Die Konfiguration am C5' im bicyclischen System wurde so gewählt, dass die Geometrie des Bicyclo-DNS Rückgrates, demjenigen der natürlichen DNS so gut wie möglich entspricht.

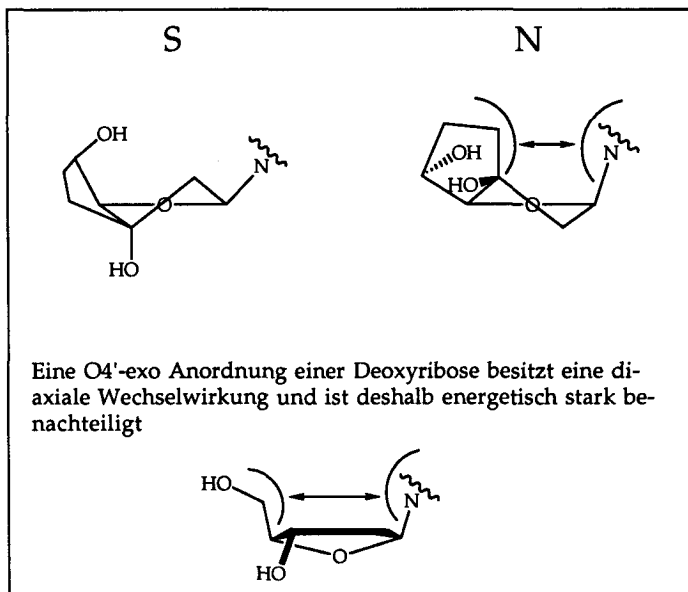


Abb.8 Vergleich einer S- bzw. N-Anordnung des Bicyclothimidins. In einer N-Anordnung wäre eine ungünstige Wechselwirkung zwischen dem neu eingeführten C3'-Substituent und der Base zu erwarten.

² Eine Präzedenz für diese Betrachtungsweise ergibt sich in der Reihe der natürlichen Deoxyribonukleotide. Rechnungen von Warshel und Olson [19] zeigen, dass die O4'-exo Konformation (Abb.8) die energiereichste Konformation im Pseudorotationszyklus darstellt. Verantwortlich dafür dürfte die pseudodiaxiale Anordnung der C4'-C5' und C1'-N Bindung sein.

2. Synthese des bicyclischen Ribozuckers und der Bausteine für die Oligonukleotidsynthese

2.1 Synthese des bicyclischen Zuckergerüsts

Eine retrosynthetische Analyse des 3',5'-verbrückten D-Ribofuranose Bausteins ist in Abbildung 9 gezeigt. Dabei lässt sich der bicyclische Zucker auf ein Cyclopentanonderivat, welches in α - und β -Stellung mit einer Hydroxylgruppe funktionalisiert ist (dem späteren O5' und O4'), zurückführen. Ausgehend von dieser Grundstruktur wären zur Einführung eines C₂-Bausteins mehrere Möglichkeiten denkbar. Eine direkte Addition einer C₂-Einheit an das Keton durch eine Aldol- oder Grignard-Reaktion würde aus stereochemischen Gründen bevorzugt von der exo Seite des bicyclischen Gerüsts erfolgen und somit zu einer unerwünschten stereochemischen Konfiguration am C3' Zentrum der daraus ableitbaren Nukleoside führen.

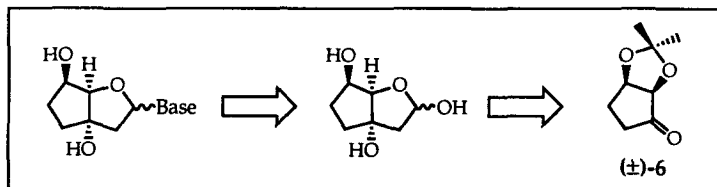


Abb.9 Eine retrosynthetische Betrachtung führt zu einem Cyclopentanonderivat als Vorläufer.

Eine Wittig Reaktion mit einem geeigneten C₂-Baustein hingegen erzeugt, unter gleichzeitiger Erweiterung des C-Gerüsts um zwei Kohlenstoffatome, eine Doppelbindung. Die Epoxidierung dieser Doppelbindung, die erwartungsgemäß von der exo Seite erfolgen sollte, gefolgt von selektiver, reduktiver Öffnung des Oxiranringes, dürfte zum Produkt mit der erwünschten Konfiguration am quaternären Kohlenstoffatom führen. Das Keton (±)-6 wurde in racemischer Form schon in der Literatur beschrieben [20]. Durch dessen Verwendung als Ausgangsmaterial musste im Verlauf der weiteren Reaktionssequenz eine Racematspaltung in Betracht gezogen werden. Der letztlich beschrittene Syntheseweg zum bicyclischen Zuckerderivat (Abb.9 Mitte) ist in Abbildung 10 wiedergegeben.

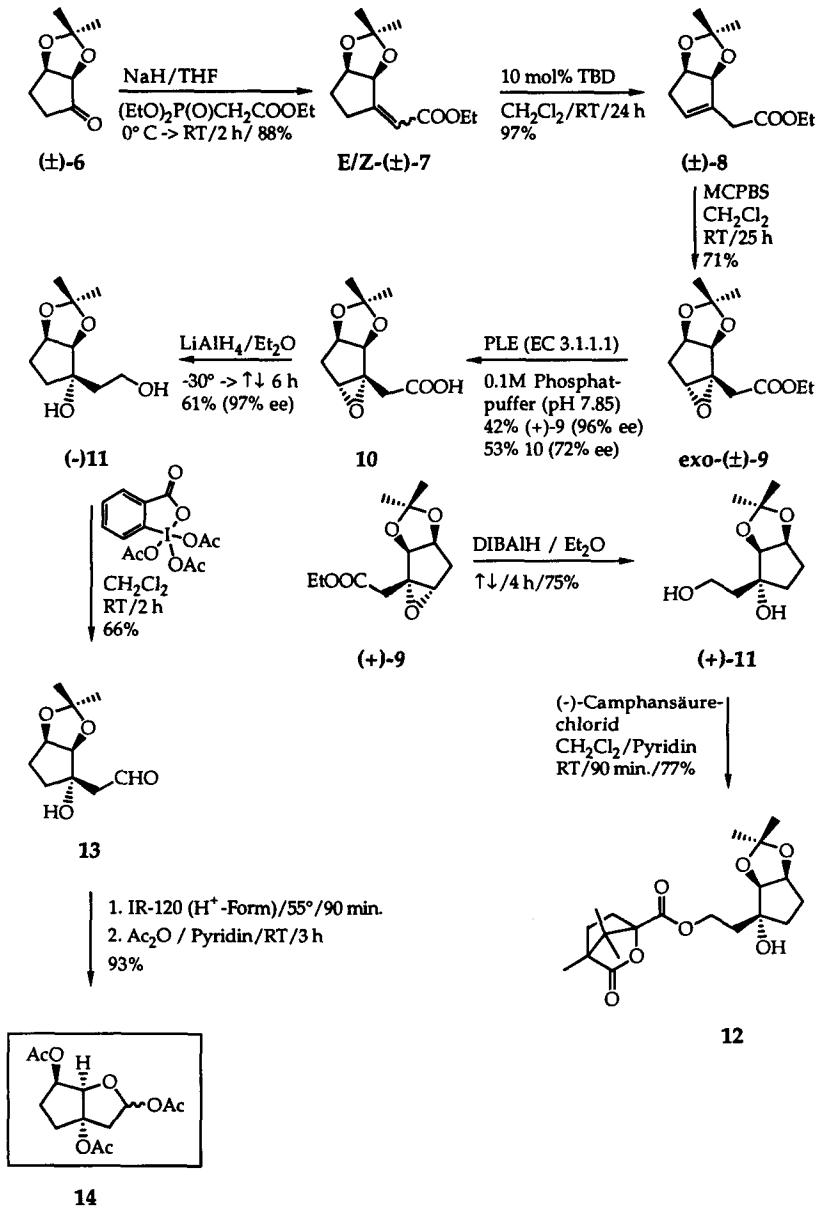


Abb.10 Syntheschema zum triacetylierten bicyclischen Zuckerbaustein 14

2.1.1 Herstellung des geschützten Ketons 3,3-Dimethyl-2,4-dioxa-bicyclo [3.3.0]octan-6-on (\pm)6

Das α,β -dihydroxy Cyclopentanonderivat (\pm)6 wurde erstmals von *Cocu* [21] (Abb.11) in racemischer Form hergestellt und diente uns als Syntheseausgangsmaterial. Die Synthese konnte auf dem beschriebenen Weg durchgeführt werden, wobei geringfügige Modifikationen für Reaktionsgrößen im 1 mol Masstab notwendig waren.

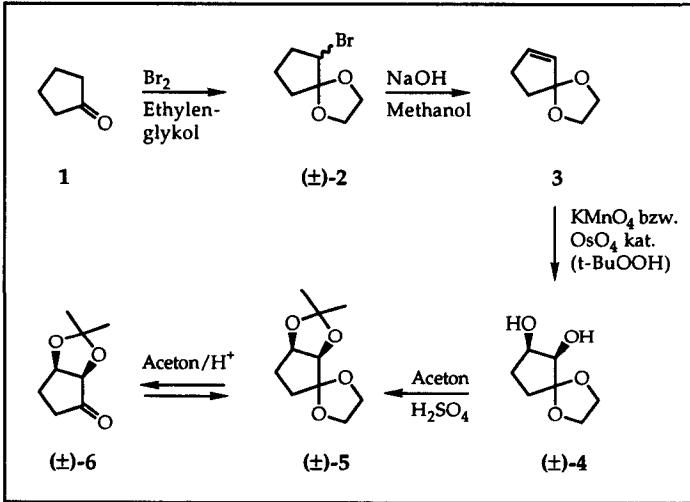


Abb.11 Herstellung des acetalgeschützten α,β -dihydroxy-cyclopentanons (\pm)6

Behandlung von Cyclopentanon mit Brom in Ethylenglykol führte selektiv zum monobromierten, geschützten 6-bromo-1,4-dioxaspiro[4.4]nonan (\pm)2 in guten Ausbeuten. Die Ansatzgrösse konnte im Bereich von 2-3 mol gewählt werden. Die nachfolgende Dehydrobromierung mit Natriumhydroxid in Methanol bei Rückflusstemperatur lieferte das 1,4-dioxa-spiro[4.4]non-6-en 3, das bei gleicher Ansatzgrösse in 72% Ausbeute isoliert werden konnte [22]. Problematischer gestaltete sich die Reaktionsführung bei der Umsetzung des Olefins 3 zum Dihydroxyderivat (\pm)4. Die Hydroxylierung mit stöchiometrischen Mengen von Kaliumpermanganat erwies sich in grossen Ansätzen, nicht zuletzt wegen des Filtrationsproblems vom anfallenden Braunstein, als kompliziert. Selbst der Ersatz des Wasser/Ethanol Mediums durch ein Wasser/Aceton Gemisch (bessere

Löslichkeit von KMnO_4 [23]) und eine dadurch mögliche Verkleinerung des Reaktionsvolumens lieferte keine wesentliche Verbesserung. Trotz gemäss Dünnschichtchromatogramm vollständigem Umsatz des Eduktes wurden nur Ausbeuten von nicht mehr als 60% erzielt. Wahrscheinlich wird ein Teil des gebildeten Produktes bei dieser heterogenen Reaktion am entstehenden Mangan-dioxid irreversibel adsorbiert. Der Übergang zur Hydroxylierung mit katalytischen Mengen Osmiumtetroxid und tert. Butylhydroperoxid (70% in Wasser) als Reoxidans [24] konnte die Ausbeute der Hydroxylierung zwar nicht verbessern, ermöglichte aber eine deutlich einfachere Aufarbeitung des Reaktionsgemisches und erlaubte die Reaktion in höherer Konzentration durchzuführen³. Das Reaktionsprodukt 6,7-Dihydroxy-1,4-dioxaspiro[4.4]nonan (\pm)-4 konnte im allgemeinen durch Kristallisation in reiner Form erhalten werden.

Die Acetalisierung des Diols (\pm)-4 erfolgte in Aceton unter Schwefelsäurekatalyse während 4 Stunden. In Abänderung zur Methode von *Cocu et al.* [20] wurde das vollständig geschützte Cyclopentanonderivat (\pm)-5 als circa 0.1M Lösung in Aceton mit konzentrierter Schwefelsäure oder einem sauren Ionenaustauscherharz bei RT während etwa 24 Stunden gerührt. Nach dieser Zeit hatte sich ein aus dem Dünnschichtchromatogramm abgeschätztes Verhältnis Edukt zu Produkt von circa 40:60 eingestellt. Auch bei Verlängerung der Reaktionszeit und erhöhter Katalysatorzugaben konnte keine Änderung des Edukt zu Produkt Verhältnisses erzielt werden. Dies deutet auf die Einstellung eines thermodynamischen Gleichgewichtes hin, welches für das deketalisierte Produkt eine ungünstige Lage aufweist. Nach Aufarbeitung und Destillation des Edukt/Produkt Gemisches –zur Abtrennung von Acetonkondensationsprodukten– konnte das Keton (\pm)-6 durch selektive Kristallisation in reiner Form erhalten werden. In späteren Versuchen wurde das Dihydroxyderivat (\pm)-4 mit einem sauren Ionenaustauscherharz ohne Isolation der diacetalisierten Verbindung (\pm)-5 zum Keton (\pm)-6 umgesetzt. Das Keton (\pm)-6 konnte auf diese Weise im circa 30 g Massstab erhalten werden. Die Totalausbeute über die Reaktionssequenz ausgehend vom Cyclopentanon zum Keton (\pm)-6 liegt zwischen 11% und 18%.

³ Versuche von *Meili* [25] –im Rahmen einer Diplomarbeit– zur direkten Umsetzung von 2-Cyclopentanon mit Osmiumtetroxid und diversen Reoxidationsmitteln zum cis α,β -dihydroxycyclopentanon und anschliessender Acetalisierung ergaben das gewünschte Keton (\pm)-6 in Ausbeuten von nur maximal 12%.

2.1.2 Darstellung von 3',3'-Dimethyl-2',4'-dioxabicyclo[3.3.0]oct-6'-yliden-essigsäureethylester (\pm)-7 mittels einer Wittig-Horner Reaktion

BASE	E/Z Verhältnis
NaH	1:1
NaH + LiCl Zusatz	1:1.7
HMDS/ <i>n</i> -BuLi	1.75:1
HMDS/ <i>n</i> -BuLi + LiCl Zusatz	1.56:1

Tab.1 Einfluss von LiCl und Base auf das E/Z Verhältnis des α,β -ungesättigten Esters(\pm)-7

Die Umsetzung des Ketons (\pm)-6 mit dem Anion von Phosphonoessigsäuretriethylester in THF (für eine Übersicht siehe [26]) lieferte ein E/Z Gemisch des α,β -ungesättigten Ethylesters (\pm)-7 in einer Ausbeute von mehr als 90%. Mittels $^1\text{H-NMR}$ Differenz-NOE-Spektren konnten die beiden (ausschliesslich zu analytischen Zwecken chromatographisch getrennten) Isomeren eindeutig bestimmt werden. Der bei der Chromatographie an Silikagel apolarer laufende Ethylester (\pm)-7 zeigte bei Einstrahlung auf das olefinische Proton bei 6.14 ppm einen deutlichen NOE

am Dublett bei 4.35 ppm, das der chemischen Verschiebung des H-C(5') Protons entspricht (Abb.12 oben). Dasselbe Experiment beim polareren Isomeren durchgeführt zeigte nur einen NOE auf das Multiplett bei 1.72 ppm, welches der Resonanz des H-C(7') Protons entspricht (Abb.12 unten). Daraus liess sich für das apolarere Isomere die E- und für das polarere die Z-Konstitution ableiten.

Die Art der verwendeten Base bei der Deprotonierung des Phosphonoessigsäuretriethylesters hatte einen Einfluss auf das E/Z Verhältnis im Ester (\pm)-7. Wurde das Horner Wittig Reagens mit Natriumhydrid deprotoniert, dann konnte (\pm)-7 in einem E/Z Verhältnis von 1:1 isoliert werden. Der Zusatz von Lithiumchlorid zur Reaktion führte zu einer leichten Bevorzugung des Z-Isomeren. Unter Verwendung des Lithiumhexamethyldisilazids als Base wurde das E-Isomere in leichter Präferenz gebildet. Eine Zugabe von LiCl bewirkte praktisch keine Änderung. Der stereochemische Verlauf der beschriebenen Reaktion ist unabhängig von der Art der verwendeten Kationen, was sich in der relativ geringen Variation der Verhältnisse der Verbindung (\pm)-7 zeigt (Tab.1). Dies steht im Gegensatz zu Beobachtungen bei der klassischen Wittig-Reaktion, wo Salzeffekte einen wesentlichen Einfluss auf die Produkteverteilung besitzen [27].

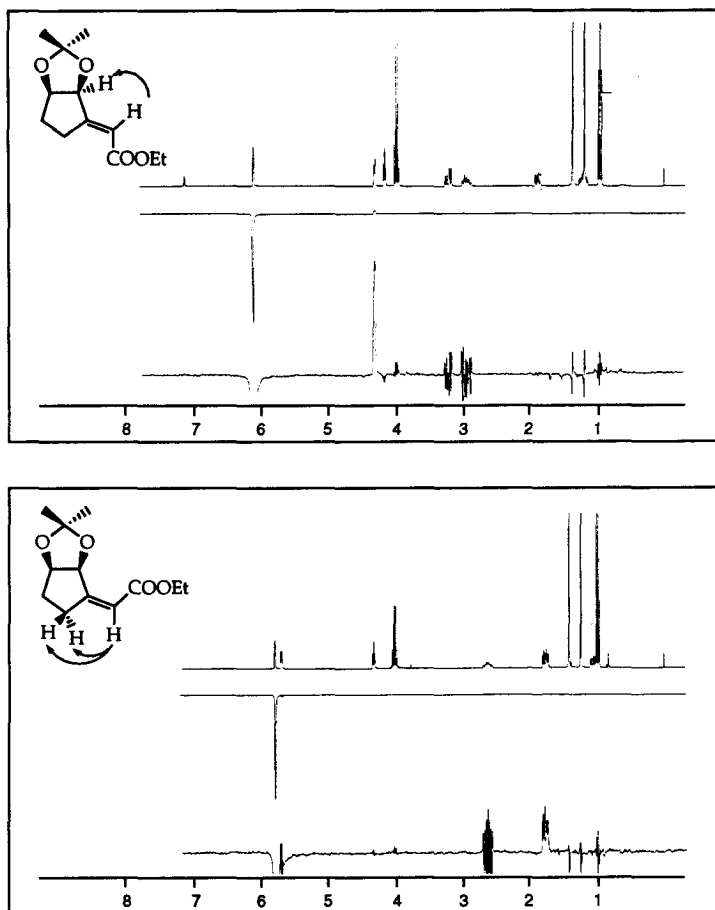


Abb.12 NOE-Differenz Spektren (300MHz, C_6D_6) des E- (oben) und Z-(unten) α,β -ungesättigten Ethylesters (\pm)7. Es wurde auf das olefinische Proton eingestrahlt.

2.1.3 Basenkatalysierte Isomerisierung zum 3',3'-Dimethyl-2',4'-dioxabicyclo [3.3.0]oct-6'-en-6'-yl-essigsäureethylester (\pm)8

Die zufällige, jedoch durchaus willkommene Beobachtung, dass bei einem Basenüberschuss in der beschriebenen Horner-Wittig Reaktion mit dem Keton (\pm)-6 ein neues, von den E- und Z-Estern (\pm)-7 unterschiedliches Produkt ent-

stand, nämlich der dekonjugierte β,γ -ungesättigte Ethylester (\pm)-8, eliminierte einerseits die stereochemische Heterogenität an der Doppelbindung und führte andererseits zu einem leichter epoxidierbaren Produkt⁴. Durch Umsetzung des E/Z Gemisches (\pm)-7 mit einer starken organischen Base (1,8-diazabicyclo[5.4.0] undec-7-en = DBU; 1,5,7-triazabicyclo [4.4.0] dec-5-en = TBD) in einem aprotischen Lösungsmittel (CH_2Cl_2 , Benzol) lässt sich dieses in den zu (\pm)-7 tautomeren β,γ -ungesättigten Ethylester (\pm)-8 umwandeln, was in praktisch quantitativen Ausbeuten gelingt. Das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum zeigt zwei Dubletts bei 3.17 ppm und 3.22 ppm ($J=16.3$ Hertz), die den Methylenprotonen in alpha Stellung zu den Esterfunktionen entsprechen. Das olefinische Proton wurde aufgrund des Konjugationsverlustes mit der Carbonylgruppe des Ethylesters um circa 0.2 ppm (Z) und circa 0.5 ppm (E) nach höherem Feld verschoben und zeigte eine Resonanz bei 5.61 ppm. Aus $^1\text{H-NMR}$ Spektren von (\pm)-8 konnten die Eduktisomeren E/Z-(\pm)-7 zu einem Anteil von 5% nachgewiesen werden. Unter der Annahme, dass sich ein thermodynamisches Gleichgewicht einstellt, kann die Bevorzugung der Produktbildung gemäss der Beziehung $\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K$ ausgedrückt werden. Die Rechnung ergibt, dass bei Normalbedingungen das dekonjugierte System (\pm)-8 um circa 1.7 kcal/mol gegenüber (\pm)-7 bevorzugt ist.

Die Reaktionssequenz von (\pm)-6 nach (\pm)-8 lässt sich auch in einem Schritt durchführen, ohne dass das Estergemisch (\pm)-7 isoliert werden muss, wenn die Umsetzung des Phosphonoessigsäuretriethylesters mit dem Keton (\pm)-6 unter Zusatz von einem Überschuss TBD durchgeführt wird [25].

2.1.4 Epoxidierung mit m-Chlorperbenzoesäure zum 6',7'-epoxy-3',3'-dimethyl-2',4'-dioxabicyclo[3.3.0]oct-6'-yl-essigsäureethylester (\pm)-9

Der β,γ -ungesättigte Ethylester (\pm)-8 lässt sich in vier Tagen mit 3-Chlorperbenzoesäure zu den Epoxiden (\pm)-9 umsetzen. Die Epoxidierung verlief dabei stereoselektiv in einem endo- zu exo-Verhältnis von 1:16, in einer Gesamtausbeute von 81%. Das unerwünschte, auf Silikagel polarer laufende endo-Epoxid, welches in 5% Ausbeute anfiel, konnte chromatographisch abgetrennt werden. Das exo-Epoxid (\pm)-9 fiel in einer Ausbeute von 76% an. Die Zuordnung der beiden endo- und exo-Epoxide (\pm)-9 gelang mit einem $^1\text{H-NMR}$ -Differenz-NOE-Experiment: Einstrahlung auf die Resonanz des Protons am Epoxidring, ergab im

⁴ Die Epoxidierung des α,β ungesättigten Ethylesters (\pm)-7 mit Peressigsäure lieferte das gewünschte exo-Epoxid in Ausbeuten von rund 50%.

polarer laufenden Diastereomeren einen NOE am Signal des H-C(5') (Abb.13 oben), im Falle des apolaren Epoxids konnte jedoch kein solcher NOE beobachtet werden (Abb.13 unten). Daraus lässt sich für das polarere die exo- und für das apolarere die endo-Konstitution ableiten.

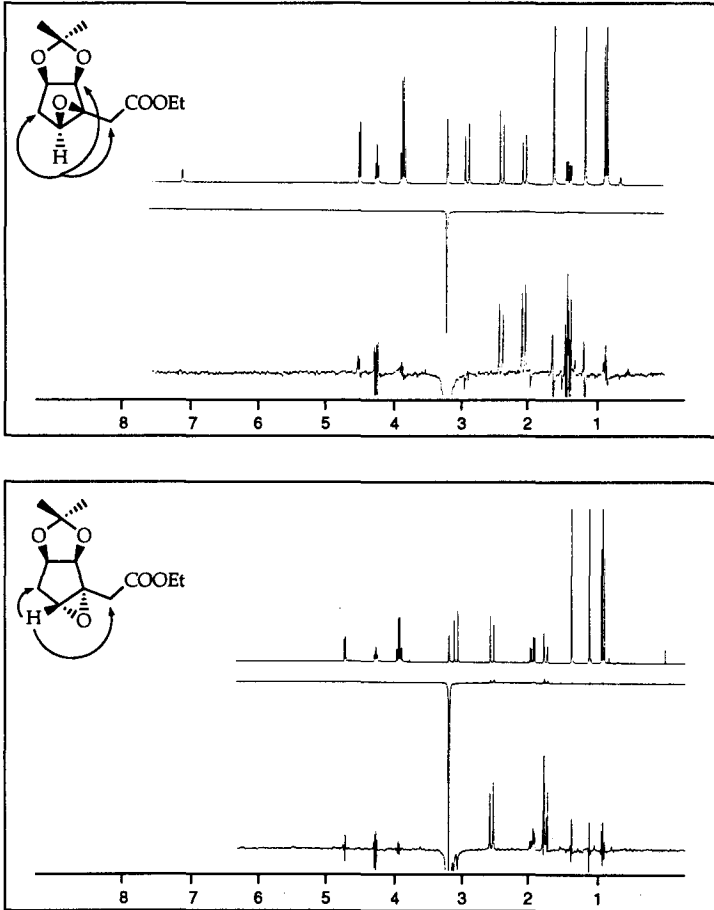
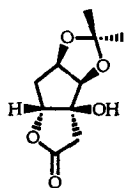


Abb.13 NOE Spektren (300MHz, C₆D₆) des endo-(oben) und exo-(unten) Epoxyethylesters (±)9. Eingestrahlt wurde auf das H-C(7') Proton. Nur das endo-Produkt zeigte einen positiven NOE-Effekt am H-C(5').

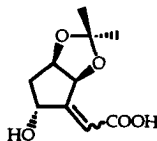
2.1.5 Kinetische Racematspaltung des Esters (\pm)-9 mit Schweineleberesterase

Durch die Verwendung von racemischem Ausgangsmaterial musste das Problem der Racematspaltung gelöst werden. Die Umesterung der Carbonylfunktion von 7, 8 oder 9 mit einem chiralen, enantiomerenreinen Alkohol beispielsweise würde zwei Diastereomere ergeben, welche unter geeigneten Umständen chromatographisch getrennt werden könnten. Viel eleganter und zeitsparender schien es, eine enzymkatalysierte, partielle Esterhydrolyse durchzuführen. Erste Versuche mit α -Chymotrypsin (α -Chy) und Schweineleberesterase (PLE) zur kinetischen Racematspaltung des β,γ -ungesättigten Essigsäureethylester (\pm)-8 zeigten entweder keine (α -Chy) oder unbefriedigende (PLE: 28%-61% ee) Enantiomerenüberschüsse⁵. Basierend auf Arbeiten von Tamm *et al.* [28], welche die kinetische Racematspaltung von β,γ -Epoxyestern mit PLE in guten Enantiomerenüberschüssen von 74%-99% ee beschreiben, haben wir in der Folge das *exo*- β,γ -Epoxid (\pm)-9 als Substrat gewählt. Die Umsetzung dieses Epoxids (\pm)-9 erfolgte mit PLE in 0.1M Phosphatpuffer bei einem konstanten pH von 7.85 (reguliert durch die Zugabe von 1M Natronlauge) [29]. Nach Beigabe von 50% der stöchiometrischen Menge an Base wurde die Reaktion abgebrochen, der Ester und die Säure extraktiv getrennt, wobei 42% des Esters (+)-9 (96% ee, $[\alpha]_D^{25} = +28.4^\circ$ ($c=1.09$ Methanol)), sowie 53% der Säure 10 (72% ee, indirekt bestimmt aus dem Reduktionsprodukt (-)-11) erhalten wurden⁶.

- 5 Die Enantiomerenüberschüsse wurden anhand des nicht umgesetzten Esters (+)-9 mittels GLC an einer chiralen Säule bestimmt. Die genauen Spezifikationen entnehme man den allgemeinen Erläuterungen des Experimentellen Teils.
- 6 Bei der Extraktion der Epoxysäure (-)-10 konnten wir in einem Ansatz ein Nebenprodukt isolieren, welchem wir gemäss ¹H-NMR und IR die nachfolgende Struktur A zugeordnet haben:



A



B

Enstanden ist diese vermutlich unter den sauren Extraktions-Bedingungen, wobei das protonierte Epoxid unter Ausbildung eines tertiären Kations am C(6') geöffnet wurde. De-

2.1.6 Bestimmung der absoluten Konfiguration anhand des Diols (+)-11 durch Veresterung mit (-)-Camphansäurechlorid

Die noch ungeklärte Frage nach der absoluten Konfiguration der optisch aktiven Verbindungen wurde mittels einer Röntgenstrukturanalyse (von Dr. B. Schweizer ETHZ, Universitätstr.16, 8092 Zürich gelöst) beantwortet. Zu diesem Zwecke wurde das Diol (+)-11 mit chiralem Camphansäurechlorid bekannter absoluter Konfiguration umgesetzt und der resultierende Ester 12 (Abb.14a) kristallisiert. Das Diol (+)-11 wurde durch Reduktion des aus der Racematspaltung unveränderten Esters (+)-9 mit Diisobutylaluminiumhydrid in 75% Ausbeute erhalten (95% ee, $[\alpha]_D^{25} = +44.3^\circ$ ($c=0.56$ Methanol)). Die Röntgenstrukturanalyse (Abb.14b) dieses Camphansäurederivates zeigte, dass das Diol (+)-11 die (1'S, 5'S, 6'R) Konfiguration aufweist. Für die weiteren Umsetzungen wurde das Diol (-)-11 mit der gewünschten absoluten Konfiguration eingesetzt⁷.

Bemerkenswert ist, dass die asymmetrische Einheit im Kristall von 12 zwei symmetrisch unabhängige Camphansäureestermoleküle enthält, die sich im wesentlichen nur im Torsionswinkel C(O)-O-CH₂-CH₂ unterscheiden: Molekül 1 (Abb.14b oben) weist einen Torsionswinkel von -77.1° auf, Molekül 2 (Abb.14b unten) hingegen einen solchen von 141.5° . Die Torsion ist dabei im ersteren Fall energetisch günstiger [30]. Dies bewirkt vermutlich, dass im ORTEP Bild des Moleküls 2 (Abb.14b unten) die Ordnung der erwähnten Zentren kleiner ist, was durch die grösseren und verzerrteren Ellipsoide dargestellt ist.

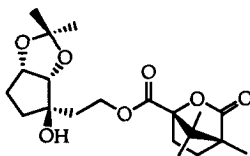


Abb.14a Darstellung des Esters 12, entstanden aus der Umsetzung des Diols (+)-11 und dem (S)-Camphansäurechlorid, wie aus der Kristallstrukturanalyse hervorgegangen.

protonierung in alpha Stellung zur Carbonsäuregruppe erzeugte eine Doppelbindung (Struktur B), die nun durch reversible Anlagerung von H₂O (von der endo- wie auch der exo-Seite) und anschliessender Veresterung der Carbonsäurefunktion mit der an C(7') sitzenden Hydroxylfunktion stereospezifisch zum abgebildeten γ -Lacton A führte.

- 7 Die Weiterverwendung des Diols (+)-11 in der nachfolgenden Reaktionssequenz würde zum 3',5'-verbrückten L-Desoxy-ribose Zucker führen.

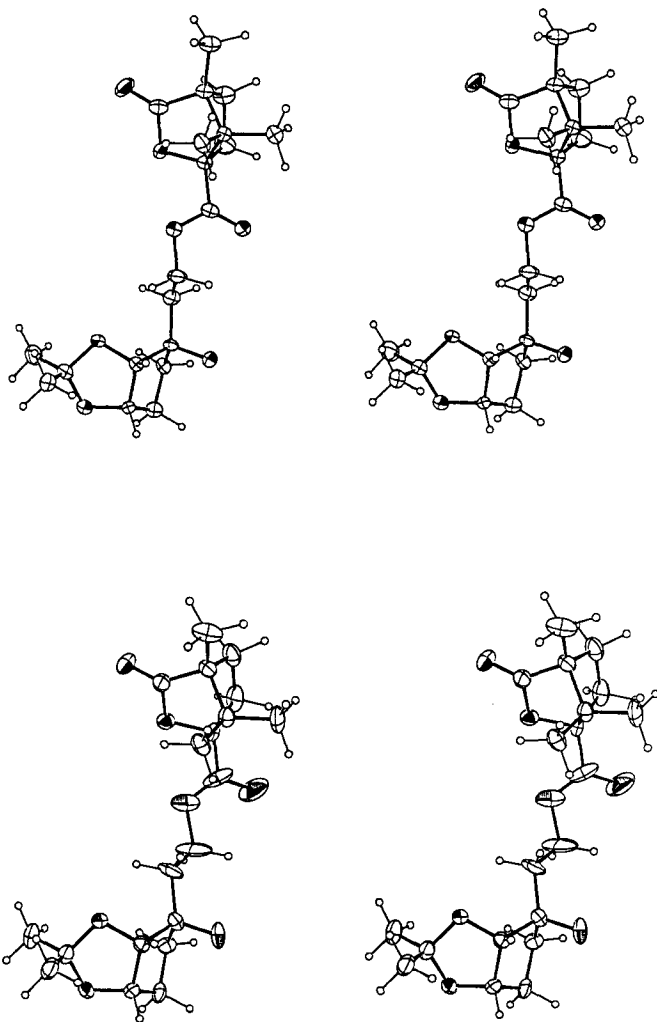
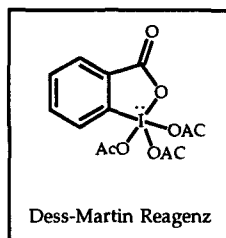


Abb. 14b ORTEP Plot (Ellipsoide auf dem 25% Wahrscheinlichkeitsniveau) der beiden in der Elementarzelle auftretenden symmetrieunabhängigen Camphansäureestermoleküle **12**. Molekül **1** (oben) besitzt gegenüber Molekül **2** (unten) eine energetisch günstigere Konformation in der Esterseitenkette.

2.1.7 Oxidation der primären Hydroxylgruppe zum 6'-hydroxy-3',3'-dimethyl-2',4'-dioxo-bicyclo[3.3.0]oct-6'-yl-acetaldehyd

Die Oxidation der primären Alkoholfunktion des, durch Reduktion der Epoxysäure **10** mit LiAlH_4 erhaltenen, Diols (-)-**11** zum Aldehyd **13** wurde nach verschiedenen Methoden versucht. Die Oxidation nach Swern mit *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid bzw. Oxalylchlorid als Aktivierungsreagenz [31] führte zu keiner vollständigen Umwandlung des Eduktes. Die Umsetzung des Diols (-)-**11** in DMF mit dem von von *Ley* [32] entwickelten Perruthenatkatalysator in Gegenwart von stöchiometrischen Mengen von *N*-Methyl-morpholin-*N*-oxid als Reoxidans ergab nach DC zwar einen vollständigen Umsatz, jedoch konnte der Aldehyd **13** in nur circa 50% Ausbeute isoliert werden. Das von *Dess* und *Martin* [33] hergestellte Triacetoxyperjodinan (Abb. Dess-Martin Reagenz) erwies sich als das Reagenz der Wahl⁸. Die Reaktionsführung gestaltete sich sehr einfach und die erzielten Ausbeuten waren generell grösser als 90% (quantitativer Umsatz gemäss DC). Der nach Aufarbeitung erhaltene Aldehyd **13** konnte in dieser Qualität direkt in der nachfolgenden Reaktionssequenz eingesetzt werden. Nur für die Gewinnung der analytischen Daten wurde das Aldol **13** einer Destillation unterworfen, wobei eine teilweise Zersetzung in Kauf genommen werden musste. Im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum konnte bei 9.33 ppm das Triplet des Aldehyd Protons mit einer Kopplung von 1 Hertz zu den Methylenprotonen in α -Stellung zur Carbonylfunktion beobachtet werden.



⁸ Die Herstellung des Triacetoxyperjodins gelang nicht immer in gleichermassen reproduzierbarer Qualität (vgl. dazu [34]). *Plumb* und *Harper* [35] berichteten weiter über eine nicht zu vernachlässigende Explosivität des Reagenzes und seiner Zwischenstufe auf Schlag-, sowie hohe Temperatureinwirkung.

2.1.8 Ringschluss zum bicyclischen Zuckerbaustein:

3,5,8-triacetoxy-2-oxabicyclo[3.3.0]octan

Die Behandlung des Aldehyds **13** mit saurem Ionenaustauscherharz IR-120 (H⁺-Form) führte zur Spaltung der Acetalschutzgruppe, wobei das intermediär entstehende γ,δ -Dihydroxyacetaldehyd-Derivat spontan zum bicyclischen System isomerisierte. Das ungereinigte Rohprodukt wurde in Pyridin bei 0° C während drei Stunden mit Essigsäureanhydrid und katalytischen Mengen 4-Dimethylaminopyridin behandelt. Nach Aufarbeitung und chromatographischer Reinigung konnte der bicyclische Zuckerbaustein **14**, als ein aus dem ¹H-NMR Spektrum bestimmtes 1:1 Diastereomerenmisch, in 93% Ausbeute erhalten werden.

In Nachschubansätzen, in welchen die Reaktionssequenz von (-)-**11** nach **14** ohne Isolierung der Zwischenprodukte erfolgte, wurden Ausbeuten von 70-80% bezogen auf das Diol (-)-**11** erzielt.

2.2 Nucleosidierungen von 3,5,8-triacetoxy-2-oxa-bicyclo[3.3.0]octan mit Benzoyladenin und Thymin

Nucleoside wurden erstmals durch Umsetzung von Silber- bzw. Quecksilbersalzen der entsprechenden Basen mit 1'-halogenierten Zuckern hergestellt [36]. Die Verwendung silylgeschützter Basen [37] in der Nucleosidsynthese führte zur Unterdrückung der O-Nucleophilie und somit zur Verminderung der Nebenproduktbildung. *Vorbrüggen* [38] entwickelte die ganze Reaktionsfolge zu einem Eintopfverfahren: dabei wird die entsprechende Nucleobase (wo nötig acylgeschützt) in situ silyliert und dann mit dem peracylierten Zucker unter Lewis-säure-Katalyse zum Gemisch der α - und β -Nucleoside umgesetzt.

Für die Herstellung der Bicyclonucleoside haben wir die Variante von *Vorbrüggen* verwendet, wie in Abbildung 15 gezeigt.

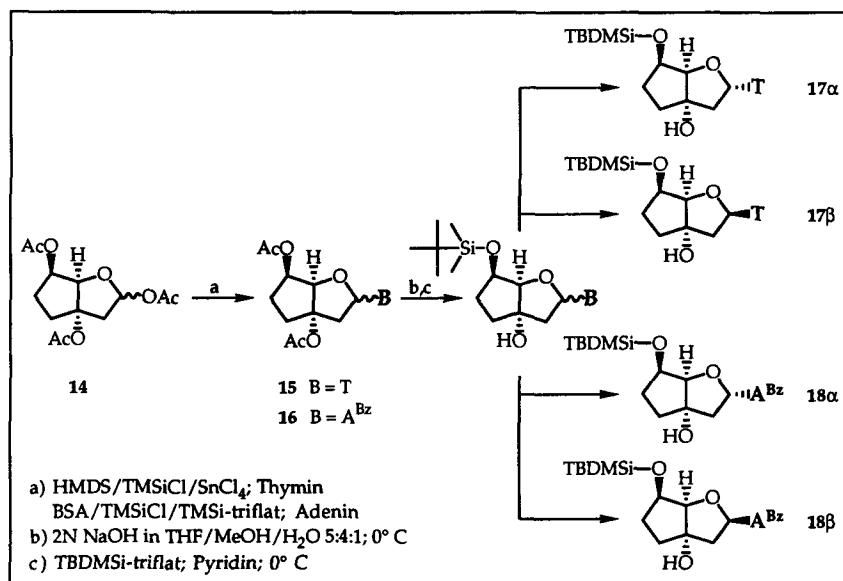


Abb.15 Nucleosidierungsbedingungen und Weg zur Anomerentrennung

Thymin wurde mit *N,N*-Bis-(trimethylsilyl)-amin (HMDS) und Trimethylchlorosilan silyliert und unter Beigabe von SnCl_4 und dem bicyclischen Zuckerderivat **14** bei Raumtemperatur zum Gemisch der diacetylierten α - und β -Bicyclothyminidine **17** in einer Ausbeute von 70-80% umgesetzt. Wir isolierten nur die Nukleosidisomeren mit natürlicher Verknüpfung von Base und Zucker (N^1). Aus dem $^1\text{H-NMR}$ bestimmte man ein Anomerenverhältnis $\alpha:\beta$ von 1:2 (Abb.15 a).

Silylierung des N^6 -Benzoyl geschützten Adenins in Acetonitril mit *N,O*-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid (BSA) und anschließende Umsetzung mit dem Zucker **14** unter Trimethylsilyltriflat Katalyse lieferte, nach chromatographischer Reinigung, das α,β -Gemisch des diacetylierten Bicyclodeoxyadenosins **18** in rund 80% Ausbeute. Das aus dem $^1\text{H-NMR}$ bestimmte $\alpha:\beta$ Anomerenverhältnis betrug 3:2. Unter diesen Reaktionsbedingungen konnte kein N^7 -Nukleosid isoliert werden (Abb. 15 b). Zur spektroskopischen Unterscheidung von N^7 - und N^9 -Nukleosiden vergleiche Kapitel 2.4.

2.3 Über die Auftrennung in die einzelnen Anomeren

Eine Trennung der Anomeren auf der Stufe der acetylierten Nukleoside ($15\alpha/\beta$ und $16\alpha/\beta$) gelang weder durch chromatographische Methoden noch durch Kristallisation. Man hoffte aber, dass die Anomeren der entsprechenden deacetylierten Nukleoside ($19\alpha/\beta$ und $20\alpha/\beta$) durch fraktionierende Kristallisation getrennt werden könnten. Kristallisationsversuche mit dem deacetylierten α,β -Bicyclothyminidgemisch **19** führten zu keiner nennenswerten Anreicherung eines der beiden Anomeren im Kristall. Auch die an der 5'-Hydroxylfunktion tritylierten Anomerengemische **22** und **23** (siehe Abb.24 oben) konnten chromatographisch nicht in die einzelnen Anomeren aufgetrennt werden. Die Beobachtung, dass die Einführung einer sterisch anspruchsvollen *t*-Butyldimethylsilylfunktionalität in die sekundäre Alkoholgruppe die chromatographischen Eigenschaften der beiden Anomeren von sowohl $17\alpha/\beta$ wie auch $18\alpha/\beta$ stark beeinflusste, führte schliesslich zum Erfolg. Obwohl die Einführung und Abspaltung des Silylethers mit einem synthetischen Mehraufwand verbunden war, stellte sich dieser Weg als präparativ gangbar heraus.

Die Hydrolyse der Acetatfunktionen der beiden Nucleoside und anschliessende Silylierung der sekundären Hydroxylgruppe mit tert-Butyl-dimethyl-silyltri-fluormethansulfonat (TBDMSi-triflat) konnte beim Bicyclothymidin **15 α / β** und dem N⁶-Benzoylbicyclodeoxyadenosin **16 α / β** in gleicher Weise durchgeführt werden. Mit 0.2M Natronlauge, in einem Lösungsmittelgemisch von Tetrahydrofuran/Methanol/Wasser (5:4:1), wurden die beiden Acetatgruppen des entsprechenden Nucleosids verseift. Nach Neutralisation mit Ammoniumchlorid und chromatographischer Reinigung erhielt man die deacetylierten Produkte (70-90% Ausbeute), welche direkt in Pyridin mit TBDMSi-triflat silyliert wurden. Dabei wurde keine Silylierung der tertiären Hydroxylfunktion beobachtet. Auf diese Art konnten beide α,β -Gemische **17 α / β** und **18 α / β** der entsprechenden Nucleoside in silylierter Form als weisser Schaum in Ausbeuten von 65-85% über zwei Stufen erhalten werden (Abb.15 **b** und **c**).

Die O(5')-silylierten Bicyclodeoxyadenosinderivate **18 α / β** konnten mittels normaler säulenchromatographischer Trennung in die Anomeren aufgetrennt werden. Im entsprechenden Gemisch **17 α / β** jedoch wurden mit konventioneller chromatographischen Trennverfahren eine beträchtliche Menge an Mischfraktionen erhalten. Diese Schwierigkeit, verbunden mit hohem Zeitaufwand und teilweisem Substanzverlust, bewogen uns, ein Trennsystem auf einem präparativen HPLC-System zu suchen⁹. Die auf die Säule aufgegebenen Probenmengen lagen dabei in der Grössenordnung von 200-250 mg (vgl. Abb.16).

⁹ Wertvolle Anregungen von Dr. J. Schreiber erleichterten die Aufgabe. Bezüglich Säulenmaterial und -dimension vergleiche man die allgemeinen Bemerkungen des Experimentellen Teils

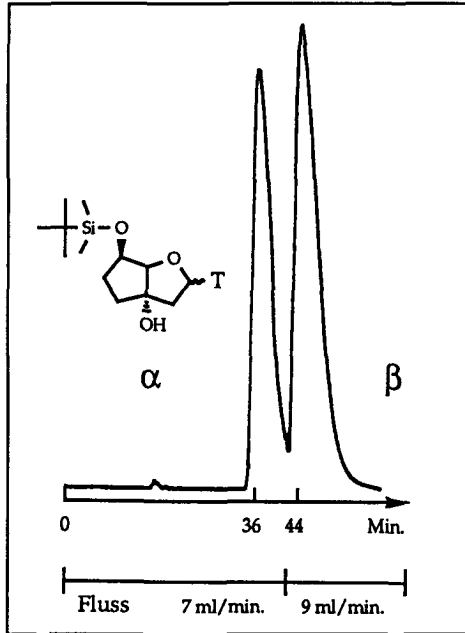


Abb.16 Chromatogramm einer präparativen Injektion von α,β -bicyclo-thymidin 17 α /17 β . Als Laufmittelgemisch wurde ein Gemisch aus tert. Butyl-methylether/Pentan/Acetonitril im Verhältnis 15:4:1 verwendet. Detektion bei 280nm.

Die Ausbeuten über die beiden Stufen Hydrolyse der Acetatfunktion und Silylierung –mit Anomerentrennung– betragen durchschnittlich 80%. Das anomere Proton der beiden β -Verbindungen 17 β und 18 β entspricht dem X Teil eines ABX Systems und koppelt zu seinen benachbarten H₂C(2') Protonen mit Kopplungskonstanten von rund J=5 und 9 Hertz. Im α Isomeren war zwar auch ein dxd Kopplungsmuster des H-C(1') zu sehen, jedoch waren hier die Kopplungskonstanten deutlich unterschiedlich mit rund J=2.5-3.8 und 7-8 Hertz (Tabelle 2). Die Zuordnung der Konfiguration am anomeren Zentrum C(1') erfolgte mittels NOE-Spektroskopie analog wie bei den Verbindungen 19 α , 19 β , 20 α und 20 β (vgl. Kapitel 2.4, sowie Experimenteller Teil).

		H ₂ C(2')	H-C(1')
TBDMSi _b cT	α	2.49 [d br.; J=14.5] 2.61 [dxd; J=7.9, 14.5]	6.05 [dxd; J=2.5, 7.8]
	β	1.63-2.12 [m] 2.67 [dxd; J=5.0, 13.6]	6.39 [dxd; J=4.9, 9.3]
TBDMSi _b cABz	α	2.82-2.92 [m]	6.34 [dxd; J=3.8, 7.3]
	β	2.37 [dxd; J=9.1, 13.6] 2.84 [dxd; J=5.4, 13.5]	6.57 [dxd; J=5.3, 9.0]

Tab.2 Chemische Verschiebungen, Kopplungsmuster und -konstanten von H₂C(2') und H-C(1') Protonen der silylierten Verbindungen 17α/β und 18α/β.

Die Silylschutzgruppen wurden in allen vier Nucleosiden mit Tetrabutylammoniumfluorid-Trihydrat (TBAF) in THF bei Raumtemperatur gespalten. Dabei wurde ein Überschuss von 0.2 bis 1 Äquivalenten an TBAF eingesetzt. Nach chromatographischer Reinigung und Kristallisation (Entfernung der Tetrabutylammoniumsalze) konnten die entsprechenden desilylierten anomererenreinen Nucleoside 19α, 19β, 20α und 20β in Ausbeuten von circa 80% erhalten werden.

2.4 Charakterisierung der anomererenreinen Bicyclonucleoside

Die Zuordnung der Konfiguration am anomeren Zentrum von 19α, 19β, 20α und 20β wurde durch ¹H-NMR NOE-Differenz Experimente getroffen. Einstrahlung auf das Signal des H-C(1') (6.20 ppm in 19β Abb.17 oben und 6.17 ppm in 19α Abb.17 unten) ergab nur im Falle von 19β ein NOE am Signal des H-C(4') (4.09 ppm). Wurde hingegen auf die Resonanz des H-C(4') in 19β (4.09 ppm) bzw. 19α (4.39 ppm) eingestrahlt, so wurde ausschliesslich im Falle von 19α ein NOE am H-C(6) der Base beobachtet (nicht abgebildet, vgl. Experimenteller Teil). Daraus lässt sich für das 19β die β- und für das 19α die α-Konfiguration bestimmen.

Die Unterscheidung von α- und β-Anomeren des Bicyclodeoxyadenosins 20 konnte in analoger Weise durchgeführt werden. Die Sättigung des entsprechenden Signals von H-C(1') in 20β (6.55 ppm Abb.18 oben) und 20α (6.66 ppm Abb.18 unten) lieferte wiederum nur im Falle von 20β einen NOE auf das Multiplett bei einer chemischen Verschiebung von 4.12-4.17 ppm, das dem H-

C(4') und H-C(5') entspricht. In beiden Fällen konnte zusätzlich ein NOE auf das H-C(8) Basenproton bei 8.70 (20 β) und 8.78 ppm (20 α) beobachtet werden. Damit kann die jeweilige Konfiguration am entsprechenden Nucleosid eindeutig bestätigt werden.

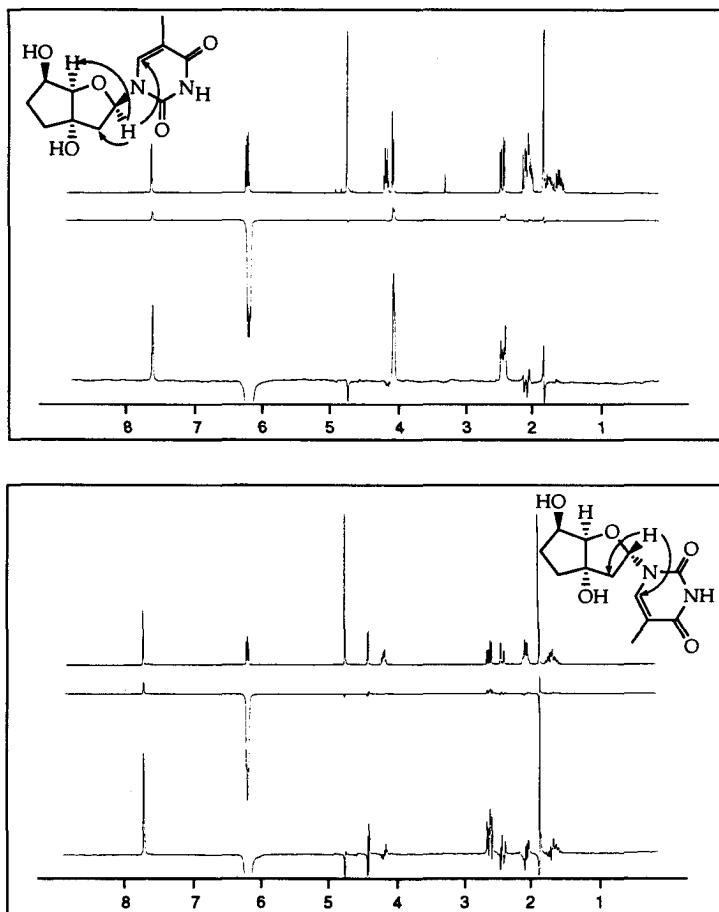


Abb.17 NOE-Differenz Spektrum des β - (oben) und α -Bicyclohydridins (unten) in D₂O (300 MHz). Eingestrahlt wurde auf H-C(1'), wobei nur im β -Fall ein NOE auf das H-C(4') beobachtet werden konnte.

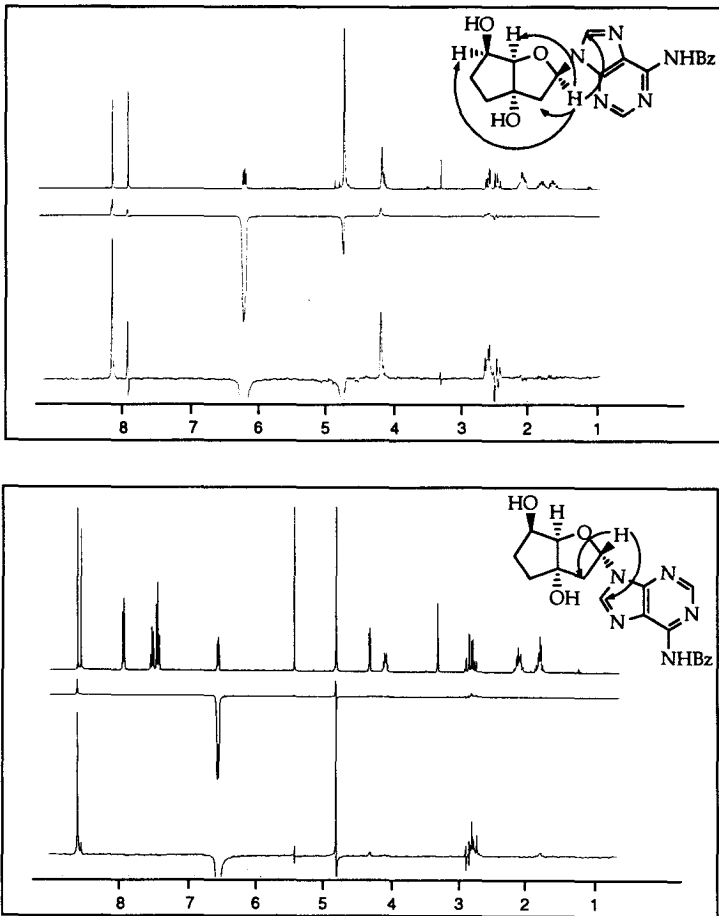


Abb.18 NOE-Differenz Spektrum (300MHz, CD_3OD) von 20β - (oben) bzw. 20α -Bicyclo-deoxyadenosin (unten). Eingestrahlt wurde jeweils auf das anomere H-C(1') Proton. Nur im β -Fall wird ein NOE-Effekt zum H-C(4')/H-C(5') beobachtet.

Die Darstellung der von Schutzgruppen befreiten Bicyclo-deoxyadenosine 21α und 21β gelang durch Behandlung der Benzoylderivate 20α und 20β mit konzentriertem Ammoniak (68% 21α ; 85% 21β). Diese Nucleoside dienen uns als Referenzsubstanzen im HPLC, sowie zur Bestimmung der molaren UV

Extinktionswerte (ϵ). Ferner kann von 21α und 21β mittels ^{13}C -NMR Spektroskopie –durch Vergleich mit NMR Werten von Adenosin [39]– eine Aussage über die Verknüpfung von Zucker und Base (N^7/N^9) gemacht werden.

Die grössten Unterschiede bezüglich Adenosin und seinem N^7 -verknüpften Konstitutionsisomeren zeigen sich in den chemischen Verschiebungen von C(4) und C(5) der Nucleobase (Tab.3). Diese Zentren entsprechen den beiden α -Stellen des Substitutionsortes der Base, wo man auch die grösste Änderung erwarten würde.

Verbindung	C(2)	C(4)	C(5)	C(6)	C(8)	Ref.
7-(β -D-ribofuranosyl)-adenin	152.8	160.7	110.2	151.7	144.6	[39]
9-(β -D-ribofuranosyl)-adenin	152.6	149.2	119.5	156.3	140.2	[39]
α -bcA ^{Bz} 20 α	153.0	151.2	125.2	151.2	145.0	
β -bcA ^{Bz} 20 β	153.2	151.2	125.3	153.2	144.3	
α -bcA 21 α	154.7	150.3	121.3	157.9	143.7	
β -bcA 21 β	155.0	150.9	121.0	157.8	142.5	

Tab.3 Übersicht über literaturbekannte ^{13}C chemische Verschiebungen von N^7 - und N^9 -Adenosin im Vergleich zu den bicyclischen Derivaten.

In den bicyclischen Adenosinderivaten 20α , 20β , 21α und 21β stimmen die chemischen Verschiebungen des C(4)- bzw. C(5)-Kohlenstoffs befriedigend mit denjenigen des natürlich konfigurierten N^9 -Adenosin überein. Daher kann ihnen die N^9 -Konstitution zugeordnet werden.

2.5 Zur Konformation der β -konfigurierten Bicyclonucleoside

2.5.1 Röntgenstrukturanalyse des β -Bicyclothymidins

Zur Bestimmung der bevorzugten Konformation der bicyclischen β -Nucleoside wurde am Beispiel von Bicyclothymidin **19 β** eine Röntgenkristallstrukturanalyse –von Dr. B. Schweizer ETHZ, Universitätstr.16, 8092 Zürich in verdankenswerterweise gelöst– durchgeführt. (Stereobild eines ORTEP-Plots Abb.19).

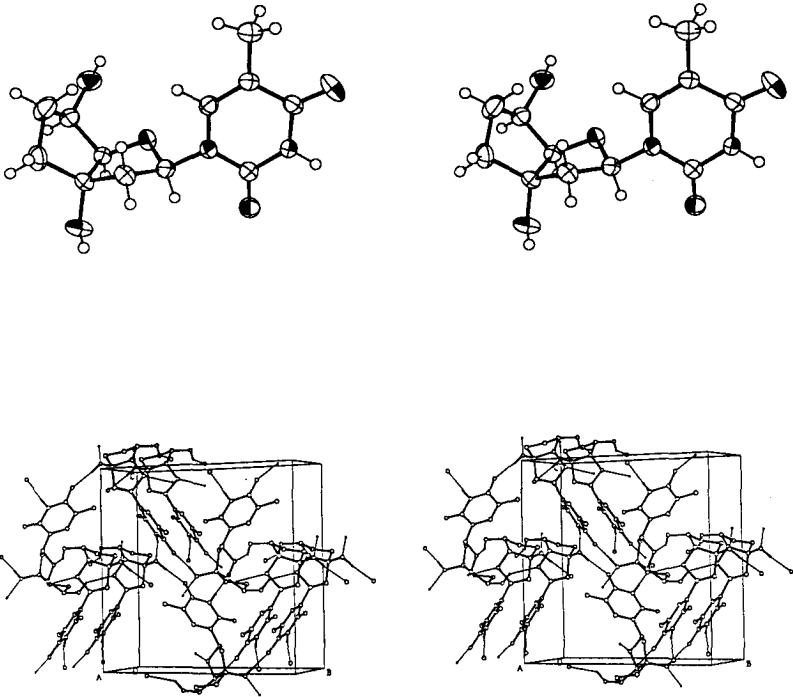


Abb.19 Stereobild eines ORTEP-Plots von Bicyclothymidin **19 β** (Ellipsoide auf dem 50% Wahrscheinlichkeitsniveau gezeichnet). Die Heteroatome sind dabei der Anschaulichkeit halber als ausgeschnittene, schraffierte Ellipsoide dargestellt (oben). Stereobild der asymmetrischen Einheitszelle (unten).

Sowohl die Konstitution, wie auch die Konformation des Bicyclothymidins 19 β entsprachen der erwarteten Vorstellung. Der Zucker liegt in einer C1'-exo (1E) Konformation vor, wobei das C1' um 0.62 Å aus der von den Atomen C2'-C3'-C4'-O4' gebildeten Ebene herausragt¹⁰; der Pseudorotationswinkel P entspricht 128.2°. Die Torsion ν_3 (C2'-C3'-C4'-O4') zeigt durch einen Winkel von 3.2°, dass die vier Atome beinahe in einer Ebene liegen, und somit eine ekliptische Konformation in diesem Bereich vorliegt ($\delta=126.5^\circ$). Die sekundäre Hydroxylgruppe am carbocyclischen Fünfring steht in einer equatorialen Lage (pseudo antiperiplanar zur C3'-C4' Bindung) und der Winkel γ beträgt 149.3°. Die Torsion um die glykosidische Bindung (χ) von -112.8° entspricht einer anti-Anordnung von Zucker und Base. Es werden keine Wasserstoffbrücken zwischen den Basen verschiedener Moleküle beobachtet, jedoch findet man intermolekulare H-Brücken einerseits zwischen Base/Zucker (O(3') \cdots HN(3) und O(4') \cdots H-O(3')) und andererseits zwischen Zucker/Zucker (O(4') \cdots H-O(5')) Resten (vgl. Abb.19 unten).

Zu Vergleichszwecken wurden die Kristallstrukturen von 2'-Deoxythymidin (Thd) [41] und 2'-Deoxy-3'-methylthymidin (3'-Me-Thd) [42] herangezogen. Das Deoxythymidin liegt in einer C3'-exo (3E) Konformation vor. Das 3'-Me-Thd besitzt dagegen eine C2'-endo-C1'-exo (2_1T) Konformation (vgl. Abb.20).

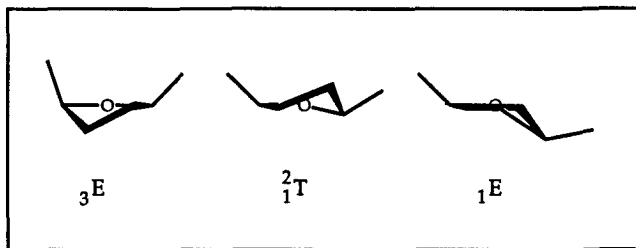


Abb.20 Zuckerkonformationen von 2'-Deoxy-thymidin, 2'-Deoxy-3'-methyl-thymidin und Bicyclothymidin 19 β

¹⁰ Zu Nomenklatur und Symbolik der Nucleosidkonformation vgl. [40]

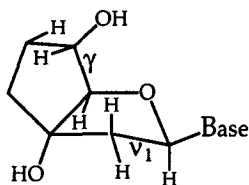
Im natürlichen Thd beträgt der Winkel γ 172.8°. Das 3'-Me-Thd hingegen zeigt einen Winkel von 50.1°. Der entsprechende Winkel im Bicyclothymidin 19 β von 149.3° entspricht damit innerhalb der geometrischen Einschränkung durch den Ring dem natürlichen Thymin. Vergleicht man den Torsionswinkel χ , welcher die Torsion um die glykosidische Bindung (gebildet aus O4'-C1 und N1-C2) beschreibt, so findet man in allen drei Strukturen eine anti-Anordnung der Basen. Die beiden 3'-substituierten Nucleoside zeigen eine gute Übereinstimmung: χ beträgt -116.6° im Falle von 3'-Me-Thd und -112.8° in 19 β . Der Winkel im Thymin ist um rund 25° verschieden, er beträgt -139.4° (Tabelle 4).

Nucleosid	Furanose Ring	γ (O5'-C5'-C4'-C3')	δ (C5'-C4'-C3'-O3')	χ (O4'-C1'-N1-C2)
Thd	C3'-exo (3E)	172.8°	156.2°	-139.4°
3'-Me-Thd	C2'-endo- C1'-exo ($\begin{smallmatrix} 2 \\ 1 \end{smallmatrix}$ T)	50.1°	140.7°	-116.6°
bcT 19 β	C1'-exo (1E)	149.3°	126.5°	-112.8°

Tab.4 Zuckerkonformation, Torsionswinkel γ , δ und χ Winkel

2.5.2 Vergleich der Zuckerkonformation in Lösung und im Kristall

Mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie können dihedrale Winkel aus den Kopplungskonstanten bestimmt werden. Mittels der Karplus-Beziehung [43] lassen sich –angewendet auf die Nucleosidstruktur nach *Altona* [44]– die Torsionswinkel der vicinalen Protonen berechnen. Da jedoch im Bicyclo-Fall das C3'-Atom kein Wasserstoffatom mehr trägt, führt dies zu einer Kopplungsbarriere. Es ist daher nur möglich ν_1 zu bestimmen. Im Bicyclothymidin 19 β lässt sich auch noch der Winkel γ berechnen, während in 20 β und 21 β dies nicht möglich war (Signalüberlappung im $^1\text{H-NMR}$).



$${}^3J_{\text{HH}} = 7.76 \cos^2 \phi - 1.10 \cos \phi + 1.4$$

	${}^3J_{\text{H}(1')\text{-H}\alpha(2')}$ (ϕ in $^\circ$)	${}^3J_{\text{H}(1')\text{-H}\beta(2')}$ (ϕ in $^\circ$)	${}^3J_{\text{H}(4')\text{-H}(5')}$ (ϕ in $^\circ$)	${}^3J_{\text{H}(5')\text{-H}(6')}$ (ϕ in $^\circ$)	ν_1	γ
bcT 19 β	5.2 (39 $^\circ$)	10.1 (172 $^\circ$)	5.3 ($\pm 38^\circ$)	9.5 (162 $^\circ$)	39 $^\circ$	158 $^\circ$
bcA ^{Bz} 20 β	5.6 (36 $^\circ$)	9.6 (164 $^\circ$)			36 $^\circ$	
bcA 21 β	5.3 (38 $^\circ$)	10.0 (170 $^\circ$)			38 $^\circ$	
Aus Röntgenstruktur-Analyse bestimmte Winkel von Bicyclothymidin 19 β						
ν_0 -42.4 $^\circ$	ν_1 43.1 $^\circ$	ν_2 -27.2 $^\circ$	ν_3 3.2 $^\circ$	ν_4 23.9 $^\circ$	γ 149.3 $^\circ$	δ 126.5 $^\circ$
					χ -112.8 $^\circ$	

Abb.21 Vergleich der aus Kopplungskonstanten ermittelten Torsionswinkel des bicyclischen Zuckers mit der aus Kristallstruktur bestimmten Winkel (bcT). Angegeben sind die Kopplungskonstanten in Hertz und die entsprechenden Winkel in Grad. Die verwendete quadratische Gleichung findet sich in [45].

Prinzipiell würde man aus der obigen quadratischen Gleichung für eine bestimmte Kopplung zwei Lösungen erwarten (positiv und negativ); jedoch kann aus der Kenntnis anderer Torsionswinkel diese Zweideutigkeit beseitigt werden. Die Rechnung ergibt beispielsweise in 19 β für die Torsion zwischen H(1') und den beiden H(2') Atomen Winkel von 39 $^\circ$ und 172 $^\circ$ (vgl. Abb.21). Durch die bicyclische Fixierung der Ribosestruktur wäre ein Winkel von -172 $^\circ$ unmöglich, auch würde ein negativer Winkel von -39 $^\circ$ keine Torsion mehr von 172 $^\circ$ erlauben. Eine Mehrdeutigkeit jedoch besteht in der beobachteten Torsion zwischen H(4') und H(5'). Da C(5') im bicyclischen Fall ein sekundäres Zentrum ist, entsteht eine Informationslücke, das Vorzeichen kann vorerst nicht bestimmt werden. Weil wir aber zwischen H(5') und H(6') einen Winkel von 162 $^\circ$ beobachten, das für den carbocyclischen Ring eine C(6')-endo-Konformation bezüglich des Riboserings festlegt, können wir für die Torsion zwischen H(4') und H(5') einen positiven Drehsinn festlegen.

Die gute Übereinstimmung der Winkel sowohl in Lösung wie im Kristall zeigt, dass man von der strukturellen Äquivalenz der beiden Zustände ausgehen kann. Grundsätzlich könnte das $^1\text{H-NMR}$ dem gemittelten Spektrum mehrerer, sich im Gleichgewicht befindlicher Konformere entsprechen. Falls dies richtig wäre, müssten sich bei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommene $^1\text{H-NMR}$ Spektren deutlich unterscheiden, da durch die Temperaturänderung eine Änderung der Population von verschiedenen Konformeren erzwungen wird. Dies konnten wir jedoch am Beispiel von Bicyclothymidin **19 β** anhand von, in einem Temperaturintervall von -80° und $+40^\circ$ (in 20° Schritten) aufgenommenen, $^1\text{H-NMR}$ Spektren ausschliessen (Abb.22). Die Kopplungsmuster und die chemische Verschiebung der relevanten Protonen sind keiner Änderung unterworfen. Dies ist ein deutlicher Hinweis dafür, dass das Bicyclothymidin **19 β** nur in einer Konformation vorliegt.

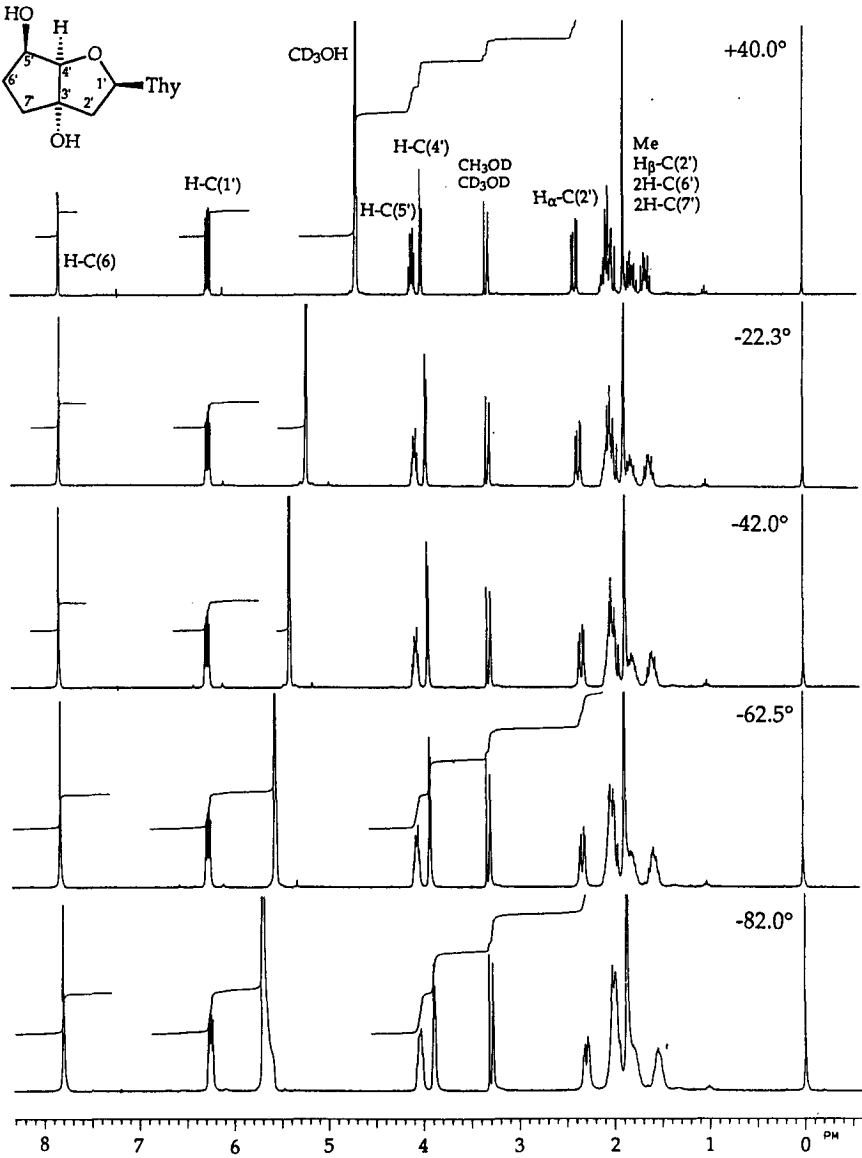


Abb.22 Bei verschiedenen Temperaturen aufgenommene $^1\text{H-NMR}$ Spektren (CD_3OD) von Bicyclothymidin 19 β

2.5.3 Über die Orientierung der Base relativ zum Zuckergerüst

In Lösung ist eine freie Drehbarkeit der Nukleobase um die glykosidische Bindung möglich. Insbesondere erweisen sich zwei Typen (*syn* bzw. *anti*) als thermodynamisch günstig. Mit Hilfe der NOE-Spektroskopie kann eine Aussage über die Orientierung der Base gemacht werden [46].

Steht die Base fixiert in *anti*-Anordnung zum Furanosering, dann lässt sich in der β -Reihe bei einer Einstrahlung auf entweder H-C(6) oder H-C(8) der entsprechenden Pyrimidin- oder Purinbase ein starker NOE zum H $_{\beta}$ -C(2'), jedoch keiner zum H-C(1') erwarten. Umgekehrt wird man bei einer fixierten *syn*-Anordnung, durch Sättigung des H-C(6) oder H-C(8), einen NOE am Signal des anomeren Protons und einen NOE an der H $_{\alpha}$ -C(2') Resonanz, nicht aber am H $_{\beta}$ -C(2'), beobachten [47] (Abb.23).

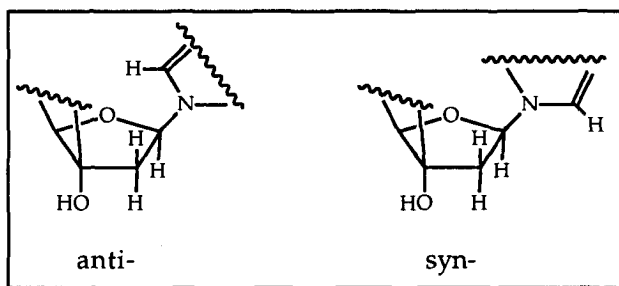


Abb.23 Das Prinzip der Bestimmung der relativen Basenorientierung mittels $^1\text{H-NMR}$ Differenz-NOE-Spektroskopie ist dargestellt. Sättigung von H-C(6) bzw. H-C(8) im *anti*- und *syn*-Fall lassen unter der Annahme einer strikten Fixierung nur wenige mögliche NOE-Effekte erwarten.

In Lösung treten in den Nucleosiden 19 β und 21 β beide Konformationen auf. Dies ergibt sich aus der NOE Spektroskopie: bei Sättigung des H-C(6) oder H-C(8) wird immer eine Wechselwirkung mit dem H $_{\beta}$ -C(2'), aber auch mit dem H-C(1') festgestellt (Tab.5). Aufgrund der beobachteten relativen Verhältnisse zwischen den NOE's an H $_{\beta}$ -C(2') und H-C(1') ergibt sich, dass das Pyrimidinnucleosid 19 β einen höheren *anti*-Anteil als das Purinnucleosid 21 β aufweist.

eingest. NOE	bcT 19 β H-C(6)	bcA 21 β H-C(8)
H-C(1')	m	st
H α C(2')	s neg. ¹¹	
H β C(2')	m	m
H γ C-C(5)	st	

Tab.5 Die beobachteten NOE-Effekte, welche bei der Sättigung des entsprechenden Basenprotons aufgetreten sind. Horizontal sind die Protonen angegeben, auf welche eingestrahlt wurde; vertikal sind die NOE auf die entsprechenden Protonen aufgelistet (st stark, m mittel, s schwach).

2.6 Bausteine zur automatisierten Synthese von DNS an einer Festphase

Zur Synthese von Oligonukleotiden bieten sich verschiedene Methoden an, die sich unter anderem im Oxidationsgrad des am 3'-Ende sitzenden Phosphoratoms unterscheiden. Bei der Phosphorsäuretriestermethode [48] werden phosphorhaltige Bausteine benötigt, die Phosphor im fünfwertigen Oxidationszustand aufweisen. Die Phosphittriestersynthese, sowie ihre Varianten, nämlich die H-Phosponat- [49] und die Phosphoramiditmethode [50], starten mit Synthesebausteinen, die einen dreiwertigen Phosphor enthalten. Obwohl bei dieser Variante noch ein zusätzlicher Oxidationsschritt im Syntheseyklus nötig ist, hat sich die Phosphoramiditmethode durchgesetzt, die an einer Festphase mit Hilfe eines DNS Synthesizers durchgeführt wird. Dafür wird eine trägergebundene Starteinheit und eine Verlängerungseinheit –ein Phosphoramiditbenötigt. Als Trägermaterial hat sich der CPG Träger (controlled pore glass) bewährt, welcher mit einem "linker" an das entsprechende Monomere zur Starteinheit verknüpft wird. Bei der Wahl der späteren Phosphatschutzgruppe hielt man sich an die Methode von Köster [51] (cyanoethyl).

¹¹ Dies ist ein indirekter NOE via das H β -C(2').

Tritylierung der im bicyclischen Fall sekundären 5'-Hydroxylfunktion in **19 β** und **20 β** mit Dimethoxytritylchlorid nach Standardverfahren [52] führte nach DC Kontrollen zu keinem Umsatz. Das war der Grund, weshalb beide Nukleoside **19 β** und **20 β** in Pyridin bei Raumtemperatur mit einem Überschuss (2.1-5.3 eq.) des reaktiveren Dimethoxytrityltrifluormethansulfonates¹² an der 5'-Hydroxylgruppe geschützt wurden. Nach Extraktion und Chromatographie an Silikagel erhielt man die Tritylderivate **22 β** und **23 β** in Ausbeuten von >80% (Abb.24 oben).

Die Herstellung der cyanoethyl-geschützten Phosphoramiditbausteine wurde ebenfalls analog zu [52] durchgeführt: die tritylierten Verbindungen **22 β** und **23 β** wurden in Acetonitril unter Beigabe von 4 eq. N,N-Diisopropyl-ethylamin gelöst und mit 2 eq. des Cyanoethoxy-N,N-diisopropyl-chlorophosphins bei Raumtemperatur zu den entsprechenden Synthesebausteinen **24 β** und **25 β** umgesetzt (Abb.24 oben). Im Falle des Bicyclothymidins wurde in Anlehnung an ein Verfahren von *Noyori et al.* [54] durch Behandlung des tritylierten Nukleosid **22 β** mit 3eq. des Allyloxy-N,N-diisopropylamino-chlorophosphins das allyloxy-geschützte Phosphoramidit **26 β** hergestellt, das nach chromatographischer Reinigung in rund 87% Ausbeute als farbloser Schaum isoliert werden konnte (Abb.24 oben). Die Phosphoramidite fielen dabei jeweils in einem, aus dem ¹H-NMR bestimmten, 1:1 Diastereomerengemisch an. Im ³¹P-NMR Spektrum wurden jeweils zwei Signale mit gleicher Intensität im Bereich von 141 bis 143 ppm beobachtet.

¹² Von *Bolli* [53] durch Umsetzung von Dimethoxytritylchlorid mit Silbertrifluormethansulfonat in Nadeln mit metallisch grünem Glanz erhalten.

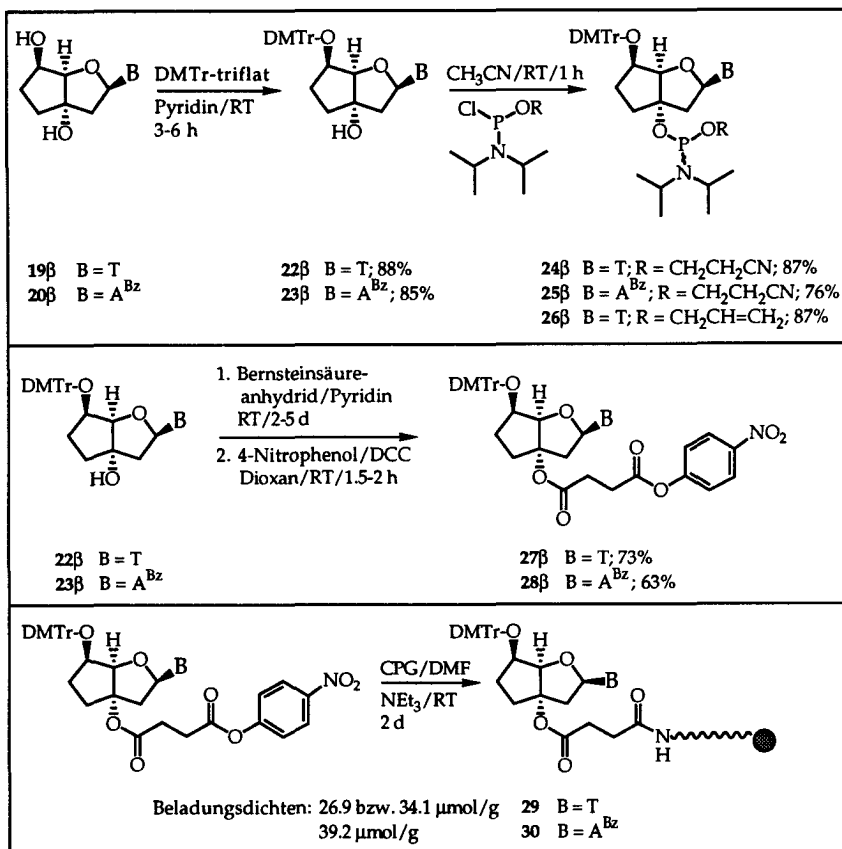


Abb.24 Darstellung der Phosphoramiditbausteine **24β**, **25β** und **26β** (oben) sowie der für die Kopplung an CPG benötigten Nitrophenylester **27β** und **28β** (mitte). Die trägergebundenen Starteinheiten **29** und **30** sind unten gezeigt.

Für die beiden Phosphoramidite **24β** und **26β** konnten im ^{13}C -NMR Spektrum einzelne Phosphor-Kohlenstoff Kopplungen¹³ bestimmt werden (Abb.25, die mit einem Punkt bezeichneten Atome zeigen eine auflösbare Kopplung zum Phosphor mit den jeweils angegebenen Kopplungskonstanten).

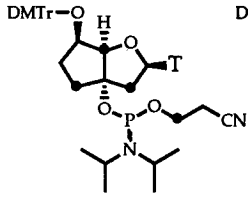
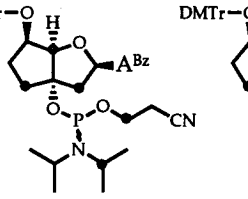
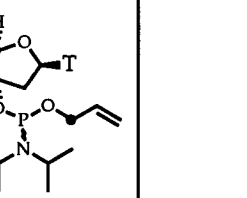
			
24β	25β	26β	
^3J (P-C(2'))	7 Hz	7 Hz	—
^3J (P-C(4'))	7 Hz	7 Hz	6 Hz
^3J (P-C(7'))	10 Hz	10 Hz	10 Hz
^2J (P-OCH ₂)	9 Hz	12 Hz	11 Hz
^2J (P-C _{iPr})	—	4 Hz	—

Abb.25 Vergleich der verschiedenen C-P Kopplungskonstanten der hergestellten bicyclischen Phosphoramidite **24β**, **25β** und **26β**.

Umsetzung von **22β** und **23β** mit Bernsteinsäureanhydrid in Pyridin unter DMAP-Katalyse lieferte die an der 3'-Hydroxylfunktion veresterten Bernsteinsäurehalbester, welche direkt ohne weitere Reinigung mit Nitrophenol und DCC als Aktivierungsreagenz in die entsprechenden Nitrophenylester **27β** (73%) und **28β** (63%) überführt wurden (Abb.24 mitte). Die Reaktion der Nitrophenylester **27β** und **28β** mit long chain alkylamino-CPG (controlled pore glass) erfolgte nach bekannten Protokollen [52] und ergab ein mit den Monomeren verknüpftes Trägermaterial **29** und **30** (Abb.24 unten), das in der Festphasen DNS-Synthese eingesetzt wurde, mit Beladungsdichten von 24-39μmol Nucleosid pro Gramm Trägermaterial.

¹³ Oft war es nicht möglich die Kopplungskonstanten zu bestimmen (Signalüberlappung).

2.7 Automatisierte Synthese der Oligonukleotide an einer Festphase

Die Synthese der Oligomeren wurde maschinell an einem "Pharmacia Gene-Assembler Plus" durchgeführt. Dabei konnten die Synthesen sowohl im 1.3 μ mol wie auch im 10 μ mol Massstab durchgeführt werden. Der Vorteil der grösseren Ansätze bestand darin, dass viel weniger Überschuss an Phosphoramidit benötigt wurde. Nur gerade die vierfache Menge musste in einer 10 μ mol Synthese eingesetzt werden, gegenüber der mehr als 10-fachen Menge in einem 1.3 μ mol Ansatz. Für die Messung der biophysikalischen Eigenschaften, insbesondere der DSC Experimente, bestand ein Bedürfnis für die Herstellung der Oligonukleotide in grösserer Menge (10 μ mol).

Zur Synthese der bicyclischen Oligonukleotide konnten die Protokolle des Herstellers für die Synthese der natürlichen Oligonukleotide verwendet werden, wobei einzig die Detritylierungszeiten und die Kopplungszeiten verlängert wurden (genaue Daten vgl. Tab.6). Nachfolgend wird der Synthesevorgang kurz beschrieben (Abb.27). Im ersten Schritt des Synthesesyklus wird mit Dichlorsäure die Dimethoxytritylgruppe der Starteinheit abgespalten (①). In einem nächsten Schritt wird die Phosphoramiditlösung mit Tetrazol als Aktivator mit der 5'-Hydroxylfunktion vom terminalen Nucleosid am Träger zur Reaktion gebracht (②). Nicht alle Hydroxylfunktionen werden jedoch mit dem Phosphoramidit reagieren. Dies ist der Grund, weshalb ein sogenannter "capping"-Schritt durchgeführt wird; die verbleibenden Hydroxylfunktionen werden mit Essigsäureanhydrid und N,N-Dimethylamino-pyridin acetyliert (③), um im nächsten Synthesesyklus die Bildung von kürzeren Oligomeren und somit die Nebenproduktbildung zu minimieren. Die Phosphitfunktion wird am Schluss mit Jod in Wasser zu einem Phosphorsäuretriester oxidiert (④) und ein neuer Zyklus, startend mit der Entfernung der 5'-OH Schutzgruppe, kann beginnen. In den durchgeführten Synthesen wurden gemäss Tritylassay Kopplungsausbeuten von >98% erzielt.

In Abbildung 26 sind die synthetisierten Sequenzen aufgelistet. Eine tabellarische Übersicht über Ansatzgrösse, Detritylierungszeit, Entschützungsbedingungen, HPLC chromatographische Trennungen und optische Dichten findet sich auf Seite 47 (Tab.6).

5' -bc (T-T-T-T-T-T-T-T)	5' - d (T-T-T-T-T-T-T-T)
5' -bc (A-A-A-A-A-A-A-A)	5' - d (T-T-T-T-T-A-T-T-T-T)
5' - (bcT-dT) ₅	5' - d (T-T-T-T-T-C-T-T-T-T)
	5' - d (T-T-T-T-T-G-T-T-T-T)
	5' - d (A-A-A-A-A-A-A-A)

Abb.26 Die in dieser Arbeit nach der Phosphoramiditmethode maschinell synthetisierten Oligonukleotide.

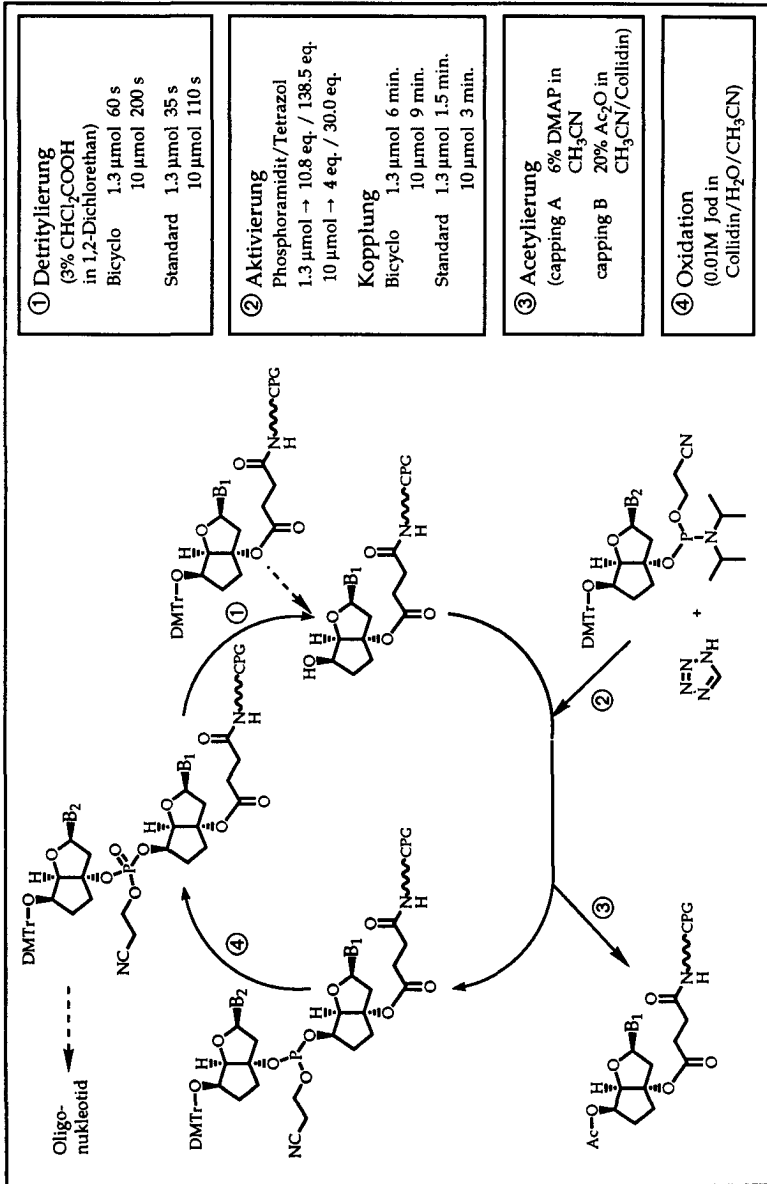


Abb.27 Schematische Darstellung des automatisierten Synthesesyklus zur Darstellung von Oligonucleotiden nach der Phosphoramiditmethode.

Sequenz	Ansatz	mg Träger: µmol/g	Detriptylierung Kopplung	Entschützen	HPLC chromatographische Reinigung	OD260 (%)
bcT10 (allyloxy)	0.67 µmol	25 mg; 26.9	60 s; 6 min.	a) Pd-Kat. [54] ^{1a} b) NH ₃ /RT ü. Nacht	① 20-50%B in 40 min (31 min) ② 13-19%B in 20 min (24.5 min)	9.5 (16%)
	1.08 µmol	40 mg; 26.9	60 s; 6 min.	a) Pd-Kat. [54] ^{1b} b) NH ₃ /RT ü. Nacht	① 0-20%B in 1 min; 20-50%B in 40 min (28 min) ② 0-15%B in 10 min; 15-16%B in 20 min (21 min)	35.6 (37%)
bcT10 (cyanoethyl)	10.0 µmol	293 mg; 34.1	200 s; 9 min.	a) Pd-Kat. [54] ^{1c} b) NH ₃ /55°C 3 Std.	① 25-65%B in 30 min (19 min) ② 0-15%B in 1 min; 15-22%B in 30 min (14 min)	222.8 (25%)
	1.26 µmol	37 mg; 34.1	60 s; 6 min.	NH ₃ /RT ü. Nacht	① 0-20%B in 1 min; 20-50%B in 40 min (19 min) ② 0-15%B in 10 min; 15-16%B in 20 min (14 min)	42.0 (38%)
bcA10	0.90 µmol	25 mg; 36	60 s; 6 min.	a) Pd-Kat. [54] ^{1a} b) NH ₃ /RT ü. Nacht	① 20-50%B in 40 min (26 min) ② 15-22%B in 30 min (15 min)	20.8 (25%)
	10.19 µmol	260 mg; 39.2	200 s; 9 min.	NH ₃ /55°C ü. Nacht	① 40-75%B in 30 min (23 min) ② 0-15%B in 1 min; 15-22%B in 30 min (18 min)	297.3 (28%)
dT10	9.99 µmol	274 mg; 36.5	110 s; 3 min.	NH ₃ /RT 24 Std.	① 25-65%B in 30 min (15 min) ② 0-15%B in 1 min; 15-22%B in 30 min (17 min)	337.2 (35%)
	1.28 µmol	35 mg; 36.5	35 s; 1.5 min.	NH ₃ /55°C ü. Nacht	① 25-65%B in 30 min (17 min) ② 0-15%B in 1 min; 15-22%B in 30 min (14 min)	51.2 (41%)
d(T5AT4)	0.96 µmol	40 mg; 24	35 s; 1.5 min.	NH ₃ /RT ü. Nacht	① 25-65%B in 30 min (18 min) ② 0-15%B in 1 min; 15-22%B in 30 min (14 min)	33.6 (36%)
	1.28 µmol	35 mg; 36.5	35 s; 1.5 min.	NH ₃ /55°C ü. Nacht	① 25-65%B in 30 min (17 min) ② 0-15%B in 1 min; 15-22%B in 30 min (12 min)	48.1 (38%)
dA10	1.32 µmol	30 mg; 44	35 s; 1.5 min.	NH ₃ /55°C ü. Nacht	① 40-75%B in 30 min (26 min) ② 0-13%B in 1 min; 13-19%B in 30 min (15 min)	42.2 (30%)

1. pro Allylgruppe 2.5 eq. Pd-Katalysator und 25 eq. PPh₃; 55°C 60 Min.

a) 2 ml THF; 240 µl n-BuNH₂; 90 µl HCOOH b) 3 ml THF; 360 µl n-BuNH₂; 140 µl HCOOH c) 20 ml THF; 2.4 ml n-BuNH₂; 900 µl HCOOH

System ① DEAE analytisch; A: 20 mM KH₂PO₄ in H₂O/CH₃CN 4:1, pH 6.0; B: 1M KCl in Puffer A, pH 6.0; Fluss 1 ml/min
 System ② RP analytisch; A: 0.1M TEAOAc in H₂O, pH 7.0; B: 0.1M TEAOAc in H₂O/CH₃CN 1:4, pH 7.0; Fluss 1 ml/min
 System ③ DEAE Präparativ; A: 20 mM KH₂PO₄ in H₂O/CH₃CN 4:1, pH 6.0; B: 1M KCl in Puffer A, pH 6.0; Fluss 3 ml/min
 System ④ RP präparativ; A: 0.1M TEAOAc in H₂O, pH 7.0; B: 0.1M TEAOAc in H₂O/CH₃CN 1:4, pH 7.0; Fluss 4 ml/min

Tab.6 Übersicht über die Synthese und die Reinigung der hergestellten Oligonukleotide

Die Oligonukleotidsynthese unter Verwendung des Bicyclothymidin- (24 β) wie auch 26 β) und Bicyclodeoxyadenosinphosphoramdites (25 β) verlief in guten Kopplungsausbeuten und führte (gemäss HPL-Chromatogramm, auf zwei verschiedenen Systemen) zu einheitlichen Produkten (Abb.28, Tab.6).

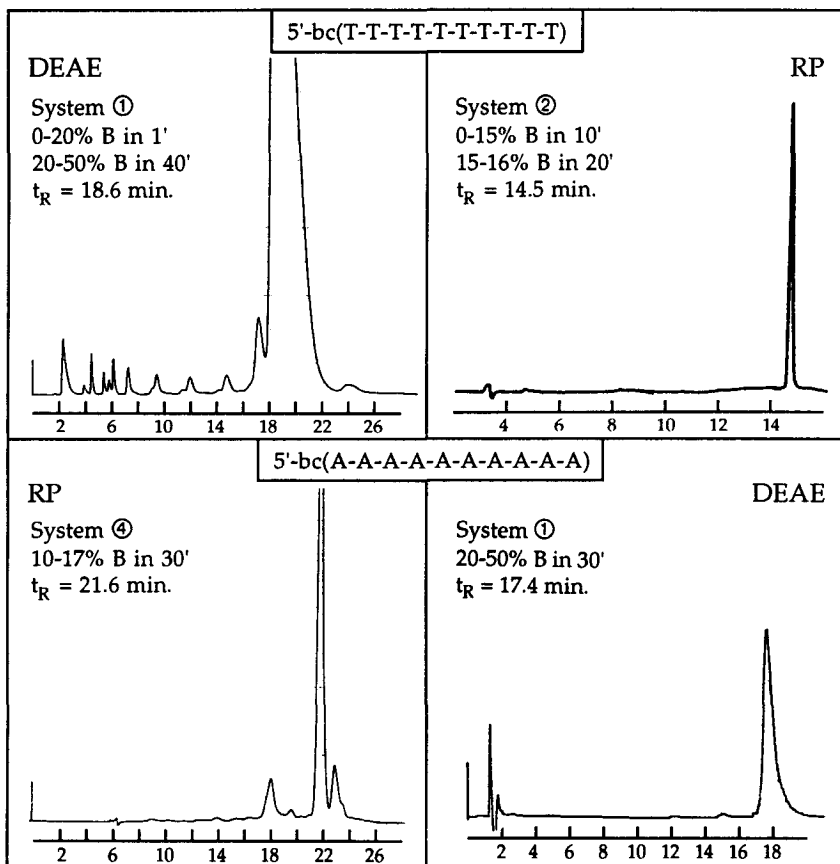


Abb.28 Das Rohprodukt des Bicyclothymidindecameren auf einer DEAE Säule injiziert (oben links). Der Hauptpeak wurde isoliert und zur Kontrolle auf ein RP System eingespritzt (oben rechts). Unten links ist das Rohprodukt des Decameren von Bicyclodeoxyadenosin gezeigt, wie es sich auf einem Umkehrphasensystem (RP) verhält. Das gereinigte Hauptoligomere wurde zur Kontrolle auf einer Ionenaustauschersäule (DEAE) injiziert (unten rechts).

Zur Charakterisierung wurde ein bcT Decameren (cyanoethyl Variante) mit einer Schlangengift Phosphodiesterase zu dem Monomerbaustein abgebaut und die verbleibenden Phosphosäuremonoester mit einer alkalischen Phosphatase gespalten. Injektion dieses Sequenzabbauproduktes im HPLC auf einer "reversed phase" C-18 Säule lieferte nur ein Signal, das sowohl durch Koinjektion mit authentischem Material wie auch durch $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie als 19 β identifiziert werden konnte (Abb.29).

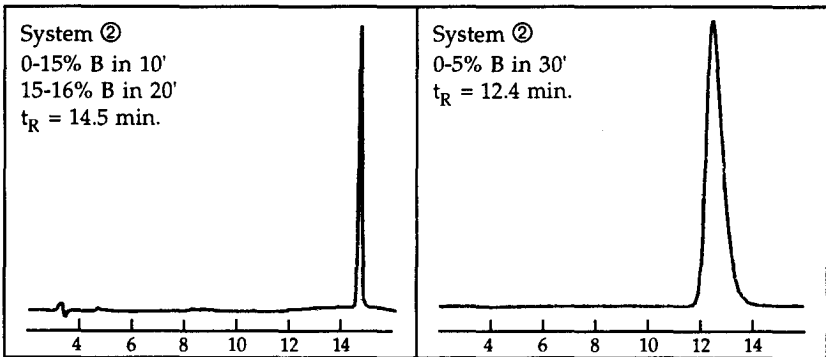


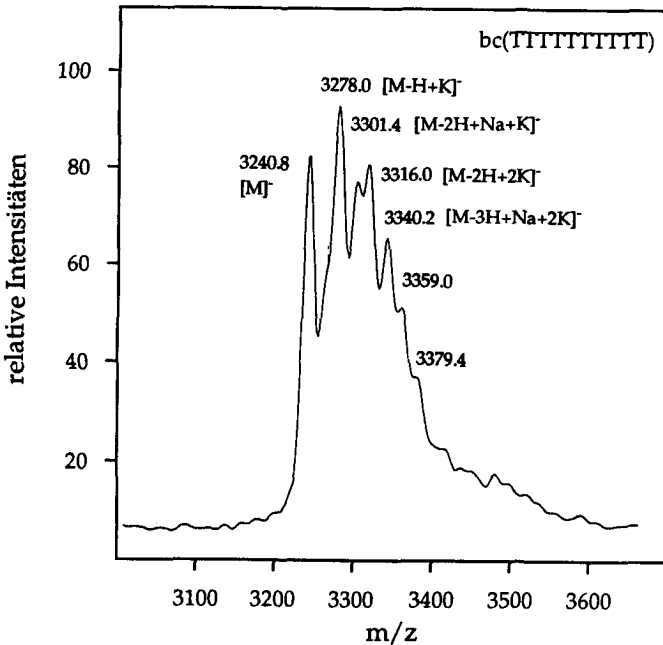
Abb.29 HPL-Chromatogramm des Bicyclothyimiddecameren auf einem RP-System (links). Enzymatischer Abbau und Behandlung mit alkalischer Phosphatase (42 OD Oligonukleotid in 0.15M NaCl, 0.01M Tris-HCl Puffer bei pH 7; 0.15U snake venom PDE; 900U alkalische Phosphatase; inkubiert bei 37°-38° während 6 Stunden) dieses einheitlichen Produktes führte nur zu einem Produkt (rechts), welches als das Monomere bcT 19 β identifiziert wurde.

2.7.1 Charakterisierung der Decameren von bcA₁₀ und bcT₁₀ mittels "time of flight" Massenspektren

Am Ende einer automatisierten Oligonukleotidsynthese stellt sich dennoch die Frage, wie man beweisen kann, dass die richtige Sequenz und Länge vorliegen. Das Problem der Analytik von Oligonukleotiden ist dabei nicht trivial, da Substanzmengen vorhanden sind, die klassische Methoden der Strukturaufklärung (wie zum Beispiel der NMR-Spektroskopie) nicht zulassen. Die HPL-Chromatographie vermag verschiedene Aussagen über die einzelnen Oligonukleotidsequenzen zu geben. Es gelingt, dank der hohen Trennleistung, die in geringem Masse gebildeten kürzeren Sequenzen zu identifizieren. Die Einheitlichkeit der

chromatographisch abgetrennten und gesammelten Produkte kann ebenfalls überprüft werden. Mittels enzymatischem Abbau zu den Monomerbausteinen und Integration der im HPLC erhaltenen Flächen [55] kann, durch Eichung mit den Monomeren, die Zusammensetzung der Sequenz verifiziert werden.

Die Decameren von Bicyclodeoxyadenosin und Bicyclothyridin wurden nach diesen Kriterien untersucht. Zusätzlich zur chromatographischen Analyse kann man mittels Massenspektroskopie die Masse der zu untersuchenden Probe mit grosser Genauigkeit bestimmen. Die massenspektrometrische Messmethode ("time of flight" [56]), die hier zur Anwendung gelangte, benötigt wenig Substanz und ergibt für die zwei untersuchten Homooligonukleotide sehr gute Resultate (Abb.30). Nach der Ionisierung der Probe durch einen Laserstrahl wird die Zeit gemessen bis das Molekülion am Detektor eintrifft¹⁴.



¹⁴ Die LDI-TOF Massenspektren (Laser Desorption Ionisation-Time of flight MS) wurden in verdankenswerter Weise von Herrn Schär (Ciba AG Basel) aufgenommen. Dabei sind Abweichungen von der relativen Masse von ± 0.5 Promille als normal zu bezeichnen.

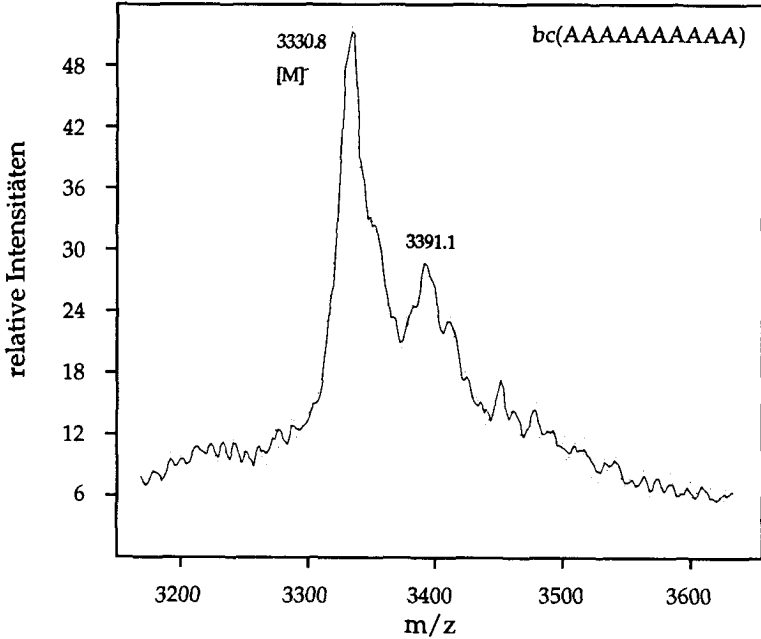


Abb.30 LDI-TOF Massenspektren der beiden bicyclischen Oligonukleotide bcA₁₀ (C₁₂₀H₁₄₀N₅₀O₄₈P₉: [M]⁻ = [M_r - H]⁻ = 3329.5) und bcT₁₀ (C₁₂₀H₁₅₀N₂₀O₆₈P₉: [M]⁻ = [M_r - H]⁻ = 3239.3), welche in der Ammoniumform vorlagen. Detektion: negative Polarität; Anzahl akkumulierter Spektren (Laser Pulse): 9. Als Matrixsubstanz wurden 4-Hydroxy-3-methoxy-Zimtsäure (bcT₁₀) und 2,5-Dihydroxy-benzoessäure (bcA₁₀) eingesetzt. Die Eichung erfolgte durch ein internes Standardgemisch (Hirudin im T Fall; Hypertensin ([M-H]⁻ = 1030.2), Synacthen (2932.5), Calcitonin (3416.9) und Hirudin (6962.5) im A Fall).

In beiden Fällen wurde auf das Molekülanion detektiert (acht Phosphatgruppen in der Form ihrer konjugierten Säure und eine anionische). In Abb.30 sind die beiden gespreizten Ausschnitte der beiden Oligomere bcA₁₀ und bcT₁₀ gezeigt. Im bicyclischen Thymidin-Dekameren ist eine Anzahl zusätzlicher Peaks um den Molekülpeak bei 3240.8 Masseneinheiten zu sehen. Diese Peaks können als das gleiche Molekülanion jedoch mit verschiedenem Na⁺ und K⁺ Gehalt interpretiert werden. Beim bcA₁₀ sehen wir neben dem Molekülpeak bei 3330.8 Masseneinheiten noch einen Peak bei 2932, welcher von der Eichsubstanz herrührt, und bei 3391, der einem Fragment der Matrixsubstanz plus Oligonukleotid zuzuordnen ist.

3. Eigenschaften der neuartigen bicyclischen Adenosin- und Thymidin-Oligomere

Die gebräuchlichste Methode um eine strukturelle Änderung von Oligonukleotiden festzustellen, besteht darin, die UV-Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge als Funktion der Temperatur zu beobachten [57]. Liegt ein Einzelstrang vor, so wird man eine nicht kooperative Änderung der Absorption im Temperaturmessbereich sehen. Diese Extinktionsänderung kann auf die Änderung der Basenstapelungsverhältnisse im untersuchten Oligonukleotid zurückgeführt werden. Nimmt eine solche Schmelzkurve einen sigmaoiden Verlauf, so entspricht dies einem kooperativen Prozess und ist damit ein klassisches Merkmal für einen Paarungs- respektive Schmelzprozess. Solche Übergänge werden typischerweise mit dem T_m Wert klassifiziert. Man ermittelt T_m als diejenige Temperatur, bei welcher die Hälfte der prozentualen Absorptionsänderung (Hyperchromizität¹⁵) erreicht wird.

Mittels CD-Spektroskopie kann zusätzliche Information über konformationelle wie auch konstitutionelle Änderungen eines Systems erhalten werden. Damit können beispielsweise die in der natürlichen DNS vorkommenden drei Hauptkonformationstypen, nämlich A-, B- und Z-DNS, unterschieden werden.

3.1 Paarung von bcT₁₀ und bcA₁₀ mit den jeweiligen komplementären Homopolymeren poly dA, poly A und poly U

3.1.1 Die beiden Einzelstränge bcT₁₀ und bcA₁₀

Um auszuschliessen, dass die zu untersuchenden bicyclischen Einzelstränge eine Komplexbildung mit sich selbst eingehen, wurden sowohl temperaturabhängige Schmelzkurven als auch CD-Kurven aufgenommen. Das Bicyclothyminidinkamere zeigt ein lineares Ansteigen der Hyperchromizität von 0% auf etwa 3% bei Erhöhung der Temperatur bis ungefähr 40°, dort bleibt sie auch bei weiterer Temperaturerhöhung konstant (Abb.31). Die Schmelzkurve deutet keinen kooperativen Übergang an, was auf eine Einzelstrangstruktur hinweist.

¹⁵ Als Hyperchromizität wird die prozentuale Zunahme der Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge bei steigender Temperatur bezeichnet: $\%H(T) = \frac{\text{abs}(T) - \text{abs}(T_0)}{\text{abs}(T_0)} \cdot 100$

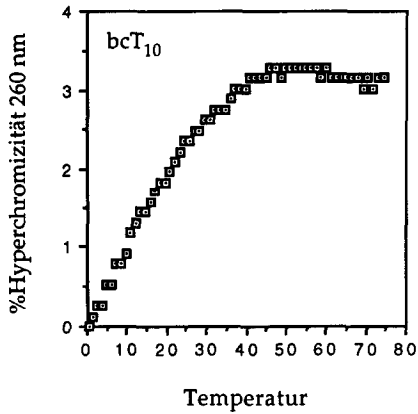


Abb.31 Schmelzkurve des Einzelstranges bcT₁₀ (10.8µM) in 0.01M Tris-HCl, 1M NaCl bei pH 7; Detektion bei 260 nm.

Mit der CD-Spektroskopie besitzt man ein weiteres Instrument, um strukturelle Unterschiede im Vergleich zu natürlicher DNS festzustellen. Das CD-Spektrum des bcT₁₀, überlagert mit dT₁₀ (Abb.32), zeigt einen deutlich grösseren Cotton-Effekt im bicyclischen Fall, das auf eine höhere strukturelle Ordnung hindeutet. Die kleine Hyperchromizitätszunahme von lediglich circa 3% (Abb.31) kann nicht auf eine Strukturänderung hindeuten, bei welcher eine Basenstapelung wesentlich verändert wurde. α-dT Oligonukleotide nämlich, welche antiparallele Duplexe bilden [58, 59], zeigen Hyperchromizitäten im Grössenbereich von 30%-40%.

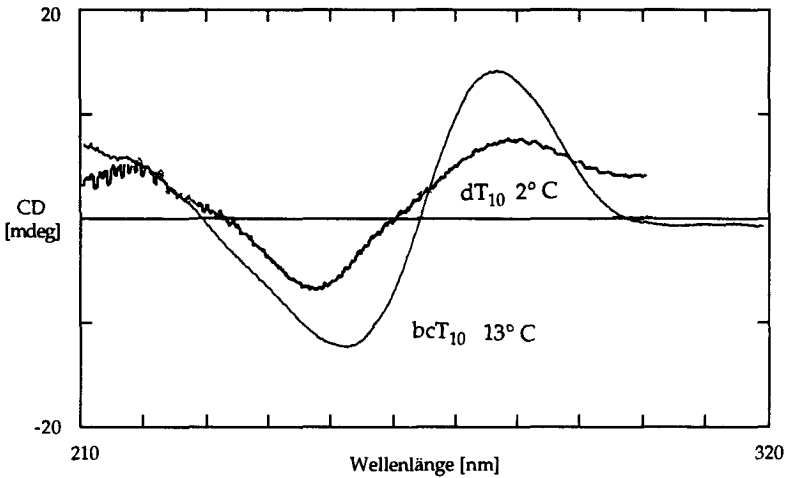


Abb.32 CD Spektrum von bcT_{10} und dT_{10} bei den in der Grafik angegebenen Temperaturen. Die Aufnahme erfolgte in 0.01M Tris-HCl, 0.15M NaCl bei pH 7.

In analoger Weise wurde der bcA_{10} Einzelstrang untersucht. Das Schmelzen dieses Einzelstranges zeigt im Temperaturbereich von 0-80°C ein quasilineares Ansteigen der Hyperchromizität auf etwa 15% (Abb.33), ein nicht kooperativer Vorgang. Dies ist somit um etwa 12% mehr als im bicyclischen T Decameren. Der Kurvenverlauf ist demjenigen von dA_{10} sehr ähnlich und lässt auf eine gestapelte Anordnung der Purinbasen schließen.

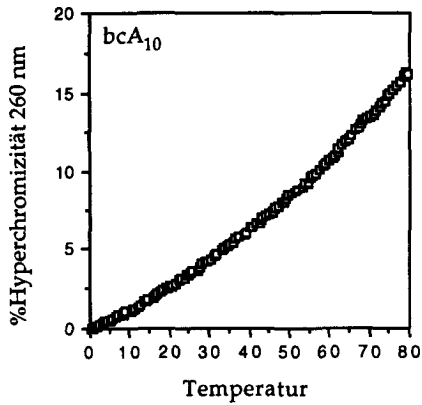


Abb.33 Schmelzkurve von bcA_{10} ($4.8\mu M$) in $0.01M$ Tris-HCl, $0.15M$ NaCl bei pH 7; Detektion 260 nm.

Die CD-Spektren von bcA_{10} und dA_{10} sind jedoch sehr ähnlich (Abb.34). Wie schon im bcT_{10} , beobachtet man auch hier grosse Cotton-Effekte bei 249 nm (neg.) und 267 nm (pos.), das hier allerdings auf die Stapelung der Purinbasen hinweist. Die beiden bicyclischen Oligomersequenzen bcA_{10} und bcT_{10} liegen somit wie ihre natürlichen Analoga unter den betrachteten Bedingungen in Lösung als Einzelstrang vor.

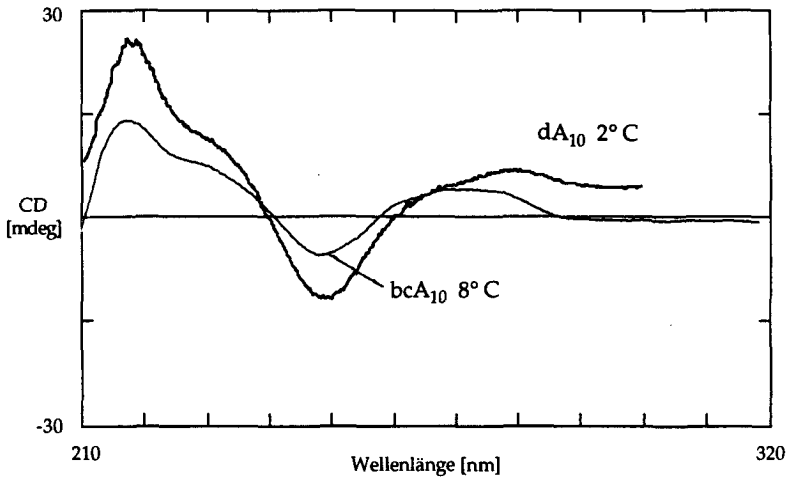


Abb.34 CD Spektrum von bcA_{10} und dA_{10} bei den in der Grafik angegebenen Temperaturen. Die Aufnahme erfolgte in $0.01M$ Tris-HCl, $0.15M$ NaCl bei pH 7.

3.1.2 Komplexierung mit poly dA, poly A und poly U

Erste Messungen mit bcT₁₀ und poly dA bzw. poly A zeigen, dass das bicyclische System eine Basenpaarung eingeht, ersichtlich aus den Schmelzkurven¹⁶ in Abbildung 35. Bei tiefer Salzkonzentration (0.15M NaCl) ist die Paarung von bcT₁₀ mit poly dA deutlich weniger stabil ($\Delta T_m = 20^\circ$, Abb.35 A) im Vergleich zum natürlichen System. Die Assoziation von bcT₁₀ mit poly A hingegen ist nur um weniges instabiler als das natürliche Pendant ($\Delta T_m = 4^\circ$, Abb.35 C). Wenn man zu höherer Salzkonzentration (1M NaCl) übergeht, verringerten sich die ΔT_m Werte auf 5° im ersteren Fall (Abb.35 B) bzw. 2° (Abb.35 D). Das bicyclische Thymidin-System diskriminiert komplementäre DNS gegenüber RNS bei physiologischer Salzkonzentration ($\Delta T_m(\text{bcT}_{10}\cdot\text{poly A versus bcT}_{10}\cdot\text{poly dA})=13^\circ$), während dT₁₀ keinen grossen Unterschied zu komplementärer DNS und RNS zeigt ($\Delta T_m(\text{dT}_{10}\cdot\text{poly dA versus dT}_{10}\cdot\text{poly A})=3^\circ$). Diese Diskriminierung ist bei hoher Salzkonzentration weniger ausgeprägt. Im Falle von bcT₁₀·poly dA bei hoher Salzkonzentration findet man eine reproduzierbare Schmelzkurve (Abb.35 B), die eher zweiphasig ist im Vergleich zum monophasigen Übergang von dT₁₀·poly dA. Ob es sich bei diesem Vorgang bei $T_m \sim 20^\circ$ um einen (bimolekularen) Triplex zu Duplex Übergang der Stöchiometrie $A_2T \rightarrow A + T \cdot A$ handelt, bleibt vorderhand offen. Die durchschnittlichen Hyperchromizitätszunahmen liegen bei 30%-40%. Eine Übersicht der diskutierten T_m Werte findet sich in Tabelle 8.

¹⁶ Sämtliche in dieser Arbeit diskutierten Schmelzkurven sind reversibel, das heisst Hybridierungs- und Schmelzkurven sind deckungsgleich.

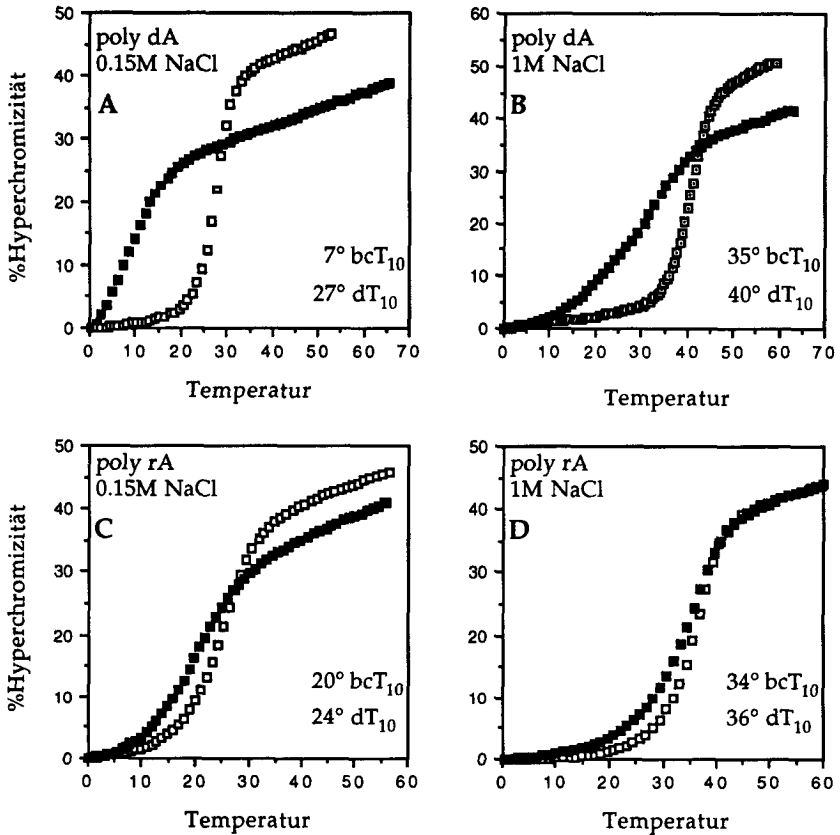


Abb.35 Schmelzkurven mit poly dA bzw. poly A. Konzentrationen: dT₁₀ 4.25μM, bcT₁₀ 4.64μM, poly dA 5μM und poly A 5μM. Die Kurven wurden in 10mM Tris-HCl Puffer bei pH 7 aufgenommen. Detektion erfolgte bei 260 nm. Die entsprechenden Salzkonzentrationen sind in der Graphik angegeben.

Ein DNS-RNS Hybrid liegt normalerweise in der vom RNS Strang vorgegebenen A-Form vor [40]. Dabei bestimmen unter anderem die folgenden Parameter den DNS Typ: die Zuckerkonformation, die Neigung der Base im Vergleich zur Helixachse, die Rotation pro Nukleotideinheit und die Verschiebung der Basenpaarung zur Helixachse (Tab.7).

	A-Typ	B-Typ
Zuckerkonformation	C3'-endo	C2'-endo
Abstand zwischen den beiden Phosphaten im Einzelstrang	5.9Å	7.0Å
Verschiebung der Basenpaare im Bezug auf die Helixachse	4.4Å bis 4.9Å in grosser Furche	-0.2Å bis -1.8Å in kleiner Furche
Rotation pro Nucleotid	30°-32.7°	36°-45°
Axialer Anstieg pro Nucleotid	2.56Å - 3.29Å	3.03Å-3.37Å
Neigung der Basenpaare	pos., 10° bis 20°	neg., -5.9° bis -16.4°

Tab.7 Strukturelle Charakteristiken von A- und B-Typ Polynukleotid-Helices

Es war von besonderem Interesse, die Beschaffenheit des CD-Spektrums eines bcT₁₀-poly A Komplexes in Vergleich zum dT₁₀-poly A Assoziat-Spektrum festzustellen. Um einen reinen Duplex in der A-Form zu bilden, müsste unser bicyclisches System eine C3'-endo Zuckerkonformation einnehmen. Aufgrund der Kenntnisse aus den Monomeren sollte jedoch keine C3'-endo Konformation zugelassen sein (vgl. Kapitel 2.5). Wie aus Abbildung 36 ersichtlich, sind die CD-Spektren beider zur Diskussion stehenden Oligonukleotide vergleichbar. Der DNS-Typ kann nicht eindeutig einem A- oder B-Typ zugeordnet werden. Es ist deshalb anzunehmen, dass hier ein gemischter Typ vorliegt, wobei die Nucleosideinheiten im bcT₁₀ in einer C2'-endo bzw. C1'-exo und im RNS-Strang in einer C3'-endo Konformation vorliegen. Die Äquivalenz der CD Spektren unterstützen Befunde in der Literatur, wonach DNS-RNS Hybride heteronome Duplexe bilden können mit verschiedenen Rückgratkonformationen in beiden Strängen (vgl. dazu die Strukturen von poly dT und poly A [60], sowie der dodecamere Duplex der Sequenz d(CGTTATAATGCG)·r(CGCAUUAUAACG) [61]).

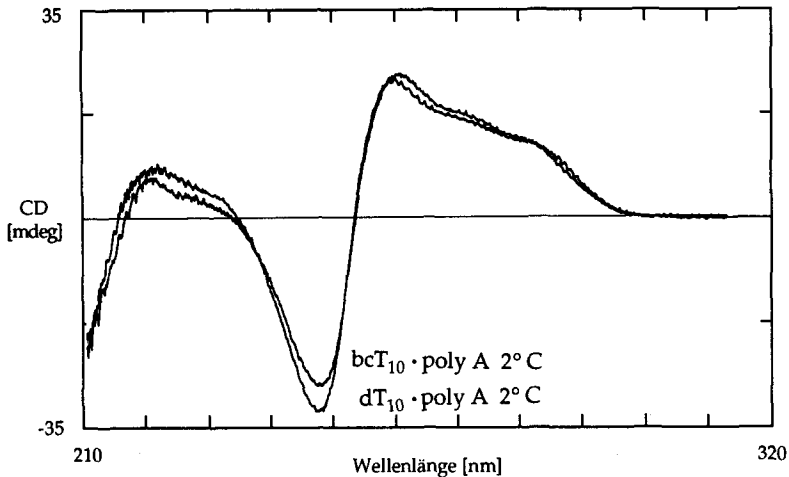


Abb.36 CD Spektren von bcT_{10} und dT_{10} mit dem Homopolymeren poly A in 0.01M Tris·HCl Puffer bei pH 7 bei einer totalen Basenpaarkonzentration von $31\mu\text{M}$ (bcT_{10}) und $33\mu\text{M}$ (dT_{10}). Die Salzkonzentration betrug in beiden Fällen 1M NaCl.

Im Gegensatz zu bcT_{10} bildet bcA_{10} mit RNS einen, im Vergleich zum dA_{10} ·RNS Hybrid, deutlich stabileren Komplex. Die Schmelzkurve von bcA_{10} ·poly U (Abb.37) zeigt einen sigmaoiden Verlauf, äusserst steil ansteigend in einem engen Schmelzbereich, mit einer Hyperchromizitätsänderung von etwa 50%. Dieser Komplex ist mit einem T_m Wert von 45° ($26\mu\text{M}$ tot. Basenpaarkonz.) deutlich stabiler als der dA_{10} ·poly U Komplex (T_m 32° , $26\mu\text{M}$). Aufgrund von Titrationsexperimenten von bcA_{10} mit poly U liegen unter einer 1:1 Stöchiometrie nur Duplex vor (vgl. Kapitel 3.4.1).

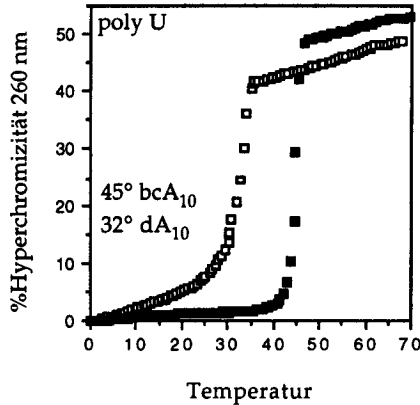


Abb.37 Schmelzkurve des Duplexes zwischen bcA₁₀ mit poly U im Vergleich zu dA₁₀-poly U. Die totale Basenpaarkonzentration betrug jeweils 26μM in 10mM Tris-HCl, 0.15M NaCl bei pH 7.

Wie auch im bcT Fall, wollte man auch hier mittels CD-Spektroskopie Informationen struktureller Art erhalten. Vergleicht man die beiden überlagerten Spektren von bcA₁₀-poly U und dA₁₀-poly U (Abb.38), dann sieht man, dass –obwohl die beiden Kurven nahezu deckungsgleich sind– im bicyclischen Fall das positive Maximum deutlich höher liegt als im natürlichen Fall. Dieses Verhalten, bei welchem die positive Bande deutlich höhere Elliptizität als die negative Bande aufweist, würde eher einem A-Konformationstyp entsprechen. Dies widerspricht jedoch der Erwartung, wonach das bicyclische Komplement in einer C2'-endo-C1'-exo Konformation vorliegen sollte. Die Frage, ob strukturelle Änderungen im Zucker-Phosphatrückgrat, beispielsweise durch Veränderung des Torsionswinkels γ (zur Diskussion der bevorzugten Lage des γ -Winkels in den Monomeren vgl. Kap. 2.5), für ein solches CD Spektrum verantwortlich sind, bleibt offen. Zur weiteren Abklärung dieses Sachverhaltes sind strukturelle Daten aus Röntgenkristallbeugung und ¹H-NMR Spektroskopie nötig.

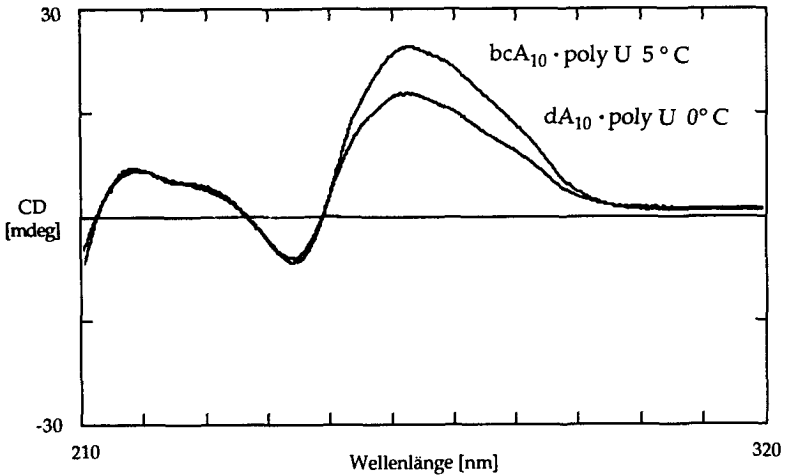


Abb.38 CD Spektren von bcA_{10} und dA_{10} mit dem Homopolymeren poly U in 0.01M Tris-HCl Puffer, 0.15M NaCl bei pH 7 bei einer totalen Basenparkonzentration von $34\mu\text{M}$ (bcA_{10}) und $31\mu\text{M}$ (dA_{10}).

Nachstehend sind die Schmelzpunkte verschiedener Komplexe zusammenfassend aufgelistet (Tab.8).

	poly dA	poly A	poly U
bcT ₁₀ 0.15M	7° C (45 μM)	20° C (48 μM)	
	1M 35° C (45 μM)	34° C (48 μM)	
dT ₁₀ 0.15M	27° C (46 μM)	24° C (46 μM)	
	1M 40° C (46 μM)	36° C (46 μM)	
bcA ₁₀ 0.15M			45° C (26 μM)
dA ₁₀ 0.15M			32° C (26 μM)

Tab.8 Schmelzpunkte der Experimente mit den Homopolymeren poly dA, poly A und poly U. Die Schmelzkurven wurden in 10mM Tris-HCl bei pH 7 aufgenommen. Die totalen Basenparkonzentrationen sind in Klammern angegeben. Detektion erfolgte bei 260 nm.

Bei physiologischer Salzkonzentration wird DNS gegenüber RNS als Komplement von bcT_{10} deutlich diskriminiert. Ferner ist der von bcA_{10} mit poly U gebildete Komplex gegenüber demjenigen aus dA_{10} ·poly U um 13°C stabiler bei niedriger NaCl-Konzentration.

3.2 Paarung von bcA₁₀ und bcT₁₀ mit DNS Komplementärsequenzen gleicher Länge

3.2.1 dA₁₀ und bcT₁₀

Die Verwendung von Oligonukleotiden definierter Länge erlaubt die Bestimmung zuverlässiger thermodynamischer Daten eines Komplexes. Homopolymere liegen als Gemisch zahlreicher Fragmente von verschiedener Länge vor. Es kann deshalb sein, dass Strukturen höherer Ordnung gebildet werden, beispielsweise durch Überlappung an den Enden ("dangling ends"), was auch zu längeren Verkettungen führen kann.

Die Schmelzkurve des Decameren von Bicyclothymidin mit dA₁₀ (Abb.39) zeigt den gleichen Trend wie bei der Paarung mit poly dA. Die Komplexierung ist bei tiefer Salzkonzentration vergleichsweise zum natürlichen System deutlich schlechter. Bei hoher Salzkonzentration jedoch sind die beobachteten T_m Werte ähnlicher.

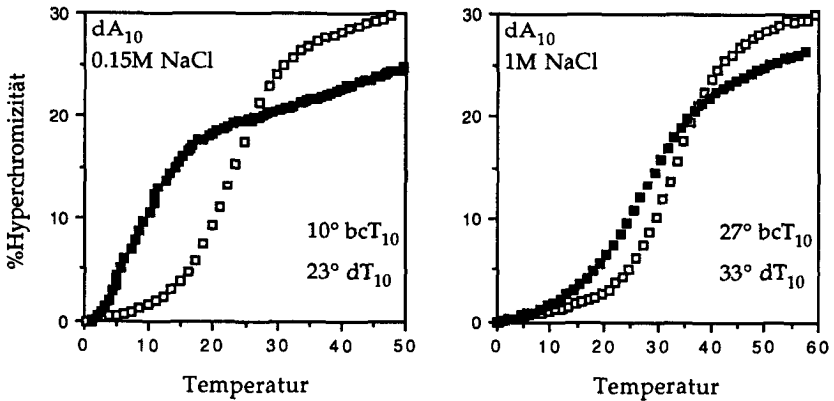


Abb.39 Schmelzkurven von dA₁₀ mit dT₁₀ respektive bcT₁₀ bei tiefer und hoher Salzkonzentration in 10mM Tris-HCl, pH 7. Die Duplexkonzentrationen waren: dA₁₀·dT₁₀ 4.1μM und dA₁₀·bcT₁₀ 4.6μM. Die entsprechenden Salzkonzentrationen sind in der Graphik angegeben. Detektion bei 260 nm.

Vergleicht man das CD-Spektrum von $bcT_{10} \cdot dA_{10}$ mit dem von $dT_{10} \cdot dA_{10}$ aufgenommenen (Abb.40) bei verschiedenen Temperaturen, so stellt man keine bedeutenden Unterschiede fest. Dies kann ein Hinweis dafür sein, dass dieser Komplex Watson-Crick gepaart vorliegt und einem gleichen Konformationstyp, nämlich einem B-Typ, entspricht. Jedoch kann das CD-Spektrum nicht unbedingt als Hilfsmittel zur Unterscheidung von antiparallel bzw. parallel gepaarter DNS herangezogen werden, da die beobachteten Unterschiede nicht signifikant sind [62].

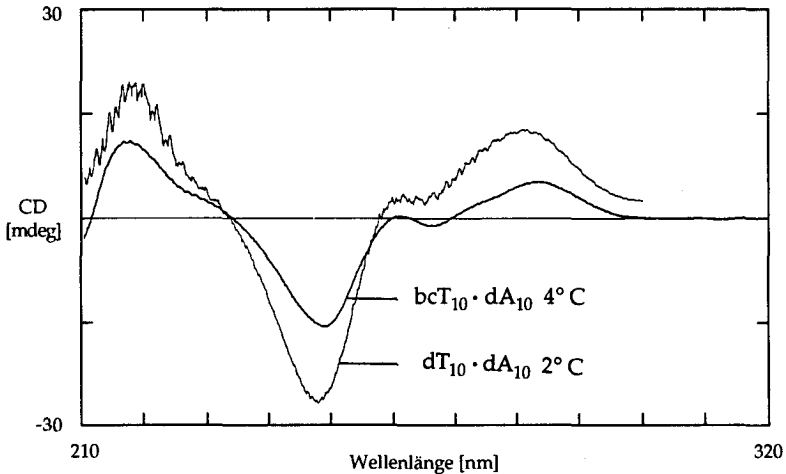


Abb.40 CD Spektren von bcT_{10} und dT_{10} mit dA_{10} bei einer Duplexkonzentration von $4.5\mu\text{M}$ (bcT_{10}) und $6.2\mu\text{M}$ (dT_{10}) in 10mM Tris-HCl Puffer bei pH 7 und 0.15M NaCl.

Währenddem der $bcT_{10} \cdot dA_{10}$ Duplex deutlich schwächer ist als der entsprechende natürliche Komplex, zeigt das Bicyclodeoxyadenosindecamer, dass es schon bei tiefer Salzkonzentration (0.15M NaCl) –verglichen mit dem natürlichen Komplement dA_{10} – einen etwas stärkeren Komplex mit dem entsprechenden Partner bildet. Die aufgenommenen Schmelzkurven sind praktisch identisch (Abb.41), jedoch ist im bicyclischen Fall eine um circa 10% grössere Hyperchromizität zu beobachten. Für den mit dem bcA_{10} gebildeten Komplex wurde eine Schmelztemperatur von 25°C bestimmt. Dieser Wert ist nur um 2° höher als der T_m Wert des $dA_{10} \cdot dT_{10}$ Duplexes.

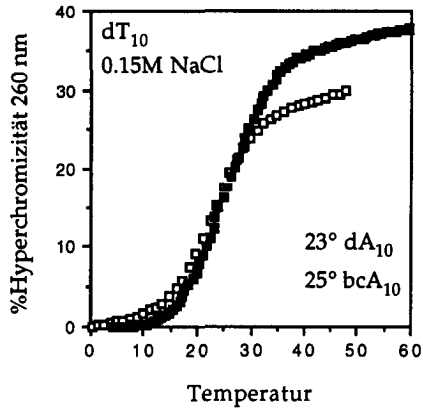


Abb.41 Schmelzkurven von bcA₁₀ und dA₁₀ mit dT₁₀ in 10mM Tris-HCl, pH 7. Die Duplexkonzentration betrug in beiden Fällen 4.1 μ M. Die entsprechende Salzkonzentration ist in der Graphik angegeben.

Auch von diesem Hybridduplex bcA₁₀-dT₁₀ haben wir CD-Spektren bei verschiedenen Temperaturen gemessen (Abb.42 oben). Interessanterweise sind zwar die Spektren bei tiefer Temperatur sehr ähnlich zu denjenigen vom dA₁₀-dT₁₀ CD Spektrum (Abb.42 unten), sie unterscheiden sich jedoch deutlich von ihnen im Vor-Schmelzbereich.

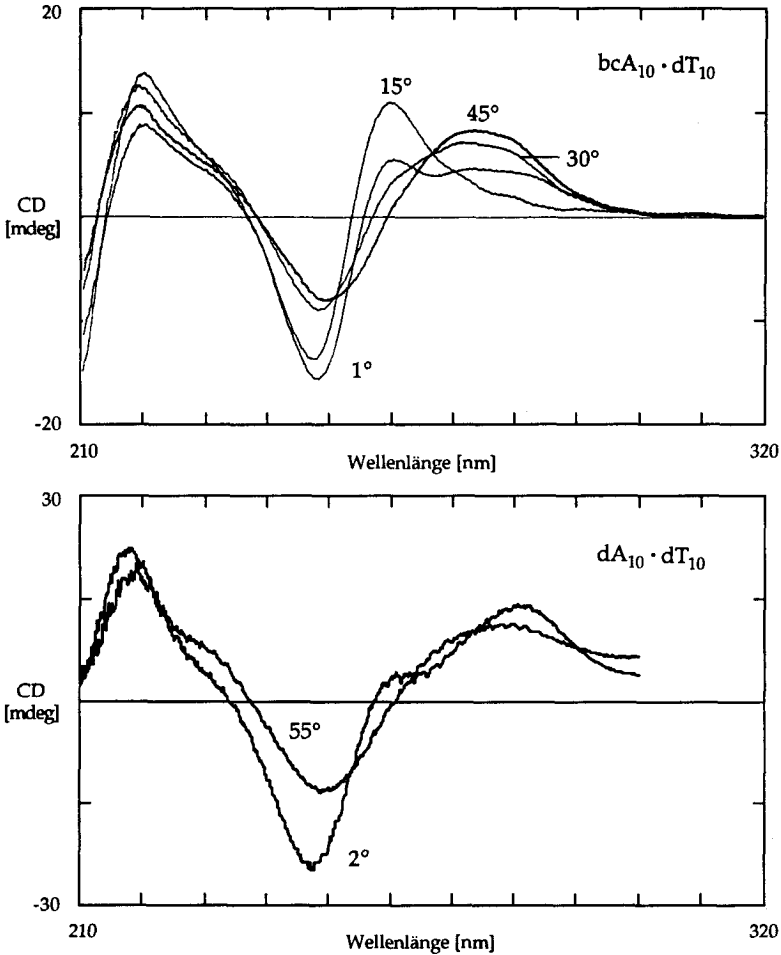


Abb.42 CD Spektren von $bcA_{10} \cdot dT_{10}$ ($2.8 \mu M$; oben) und $dA_{10} \cdot dT_{10}$ ($6.2 \mu M$; unten) in $0.01 M$ Tris-HCl, $0.15 M$ NaCl (pH 7) bei verschiedenen Temperaturen.

Weder die Schmelzkurven bei verschiedenen Wellenlängen ($\lambda = 260 \text{ nm}$, 280 nm , 284 nm), noch die UV Spektren (Abb.43) widerspiegeln dieses im CD-Spektrum beobachtete Verhalten einer strukturellen Änderung. Es bestünde die Möglichkeit, dass diese Bande einem Triplex zu Duplexübergang entspricht wie *Pilch et al.* für das dT·dA·dT System postulieren [63]. Da Triplex- und Duplex-

strukturen aber quasi identische CD-Spektren zeigen (vgl. dazu [63] und [64]) kann Triplexbildung als Ursache für die im CD beobachtete Änderung ausgeschlossen werden. Ob sie durch eine konformationelle Änderung des carbocyclischen Fünfringes in den Nucleosiden des bcA₁₀ Teils des Duplexes zustande kommt, bleibt vorläufig offen.

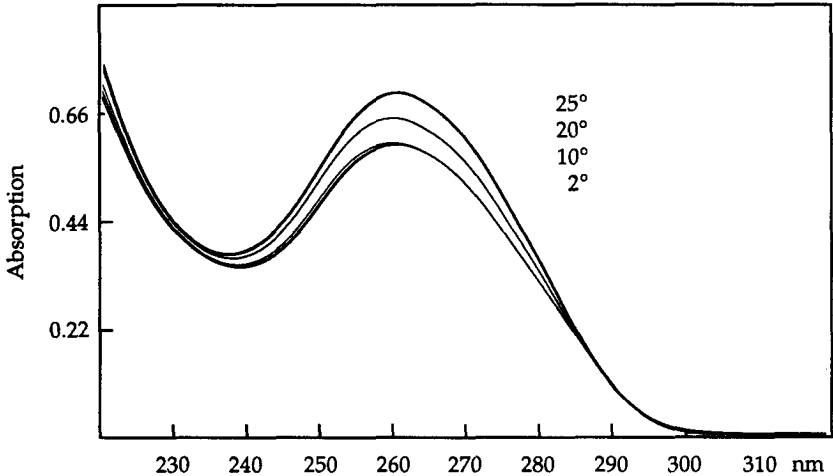


Abb.43 UV-Spektren von bcA₁₀-dT₁₀ in 0.01M Tris-HCl, 0.15M NaCl bei pH 7. Die Temperaturen sind in der Grafik angegeben.

3.2.2 Die alternierende (bcT-dT)₅ Sequenz

Das CD-Spektrum von bcT₁₀ ist, verglichen mit demjenigen von dT₁₀, stärker strukturiert (vgl. Abb.32). Jedoch sind Komplexe vom Decameren des Bicyclo-thymidins mit dA₁₀ deutlich instabiler als der natürliche dA₁₀-dT₁₀ Duplex. Dies kann bedeuten, dass im bicyclischen Einzelstrang zwar eine Präorganisation vorhanden ist, deren Geometrie aber für eine Paarung nicht ideal ist. Der Ersatz eines Bicyclothymidins durch ein Thymidin sollte deshalb voraussichtlich einen stabilisierenden Einfluss ausüben. Die gemischte Sequenz (bcT-dT)₅ wurde jeweils mit poly dA und dA₁₀ hybridisiert. Man konnte eine deutliche Stabilisierung im Vergleich zu den mit bcT₁₀ gebildeten Assoziaten beobachten. Bei der Hybridisierung an poly dA (1M NaCl) wurde ein T_m-Wert von 40° C beobachtet; dieser T_m-Wert ist identisch mit demjenigen eines dT₁₀-poly dA Komplexes.

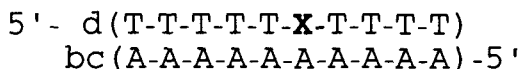
Auch bei der Verwendung von dA_{10} anstelle von poly dA erhält man praktisch identische T_m Werte (Tab.9).

	poly dA	dA_{10}
$(bcT-dT)_5$	40° (47)	30° (42)
dT_{10}	40° (46)	33° (44)
bcT_{10}	35° (45)	27° (46)

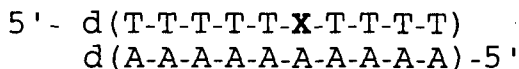
Tab.9 Schmelzpunkte im Vergleich [1MNaCl, 10mM Tris-HCl, pH 7; Detektion 260 nm; (Basenpaarkonzentration μ M)]

3.2.3 Duplexdestabilisierung durch Basenfehlpaarung

Um die Selektivität der Basenpaarung in Bicyclo DNS-DNS Duplexen zu untersuchen, haben wir vier Decamere der Sequenz $d(T_5XT_4)$ synthetisiert, wobei X jeweils eines der vier natürlichen Deoxynukleoside darstellt. Die Paarung dieser vier Sequenzen an das Decamere von Bicyclodeoxyadenosin respektive dA_{10} sollte Auskunft über die Frage geben, wie eine solche Basenfehlpaarung die Duplexstabilität beeinflusst. In Tabelle 10 sind die Differenzen der T_m -Werte zwischen korrekt und fehlgepaarten Duplexen mit bcA_{10} sowie vergleichenderweise mit dA_{10} gezeigt. Sowohl im natürlichen wie auch im bicyclischen System wird für $X=A$ die grösste Destabilisierung, ein ΔT_m von $\sim 20^\circ C$, beobachtet. Die geringste Schwächung ist im bicyclischen Fall für $X=C$, im natürlichen für $X=G$ zu verzeichnen. Der Einfluss einer Basenfehlpaarung ist jedoch sowohl im natürlichen wie auch im bicyclischen System praktisch vergleichbar.



und



	T	A	C	G
bcA ₁₀ (24.6°)	0°	20.1°	18.1°	18.6°
dA ₁₀ (22.6°)	0°	19.9°	18.7°	17.7°

Tab.10 Die Zahlen in °C geben die Destabilisierung ΔT_m im Vergleich zum korrekt gepaarten Duplex (X=T) an. Aufgenommen in 10mM Tris-HCl, 150mM NaCl bei pH 7. Die Duplexkonzentrationen betragen 3.1-3.2 μ M. Detektion erfolgte bei 260 nm.

3.3 Der stabile Duplex bcA₁₀·bcT₁₀

Von Interesse war insbesondere die starke Paarung zwischen den beiden bicyclischen Decameren bcA₁₀ und bcT₁₀. Die Schmelztemperatur T_m lag bei 33° (0.15M NaCl, 2.7 μ M) und war somit um rund 10° höher als diejenige des entsprechenden natürlichen Duplexes bei gleicher Salzkonzentration (T_m =23°C; 4.1 μ M). Als Übersicht sind die verschiedenen Schmelztemperaturen in Tabelle 11 gezeigt.

	dT ₁₀	bcT ₁₀
dA ₁₀ (0.15M NaCl)	23° (4.1 μ M)	10° (4.6 μ M)
(1M NaCl)	33°	27°
bcA ₁₀ (0.15M NaCl)	25° (4.1 μ M)	33° (2.7 μ M)
(1M NaCl)		47°

Tab.11 T_m Werte verschiedener Schmelzexperimente. Die Schmelztemperaturen der mit bcA₁₀ gebildeten Komplexe sind Fett gedruckt (0.01M Tris-HCl Puffer, pH 7). In Klammern sind die entsprechenden Duplexkonzentrationen angegeben. Detektion erfolgte bei 260 nm.

Die Hyperchromizität im reinen bicyclischen Fall ist etwa um 10% grösser als im natürlichen dA₁₀·dT₁₀ System. Die Form der beiden Schmelzkurven ist hingegen praktisch identisch (Abb.44).

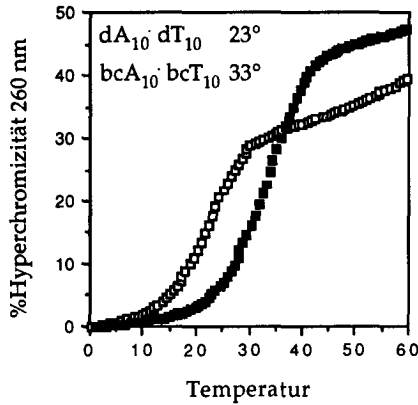


Abb. 44 Schmelzkurven von bcA₁₀-bcT₁₀ und dA₁₀-dT₁₀ in 10mM Tris-HCl, 0.15M NaCl (pH 7) bei einer Konzentration an Duplex bei bcT₁₀- von 2.7μM und beim dT₁₀-Duplex von 4.1μM.

Die CD-Spektren von bcA₁₀-bcT₁₀ bei verschiedenen Temperaturen (Abb.45) widerspiegeln den Schmelzprozess, und sind bei tiefer Temperatur (gepaarter Zustand) drastisch verschieden vom dA₁₀-dT₁₀ CD Spektrum (Abb.42 unten), was auf eine Andersartigkeit der Konformation oder Konstitution (z.B. parallel versus antiparallel oder Watson-Crick versus Hoogsteen gepaarter Duplex) hinweist. Die Kurven von bcA₁₀-bcT₁₀ im gepaarten Zustand sind derjenigen CD-Kurve von bcA₁₀-dT₁₀ bei 15° ähnlich (Abb.42). Es stellt sich deshalb die Frage, ob im rein bicyclischen Duplex eine ähnliche Struktur vorliegt, wie in letztgenanntem Fall bei Temperaturen im Vor-Schmelzbereich.

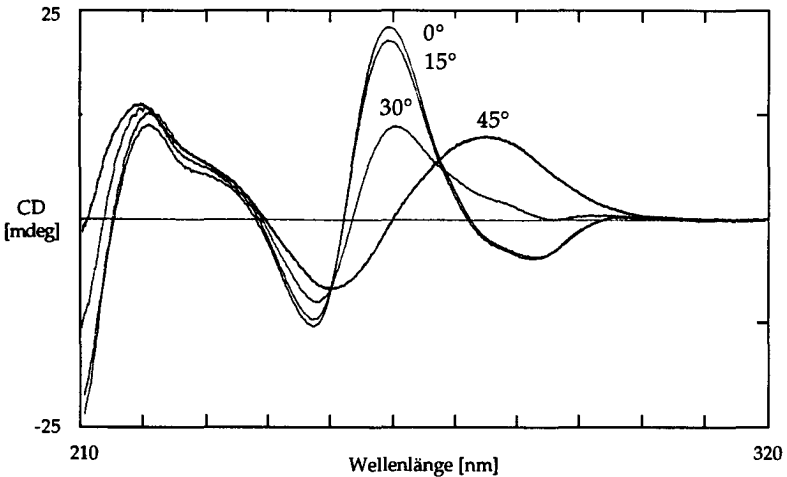


Abb.45 CD-Spektren von bcA₁₀-bcT₁₀ in 10mM Tris-HCl, 0.15M NaCl (pH 7) bei verschiedenen Temperaturen. Der Duplex lag in einer 2.8µM Konzentration vor.

In natürlichen DNS-Duplexen wird eine Abhängigkeit der T_m -Werte von der Salzkonzentration festgestellt. Dabei stabilisiert eine hohe Elektrolytkonzentration den gebildeten Duplex, indem die Interstrang-Repulsion –verursacht durch die Coulomb Abstossung der negativ geladenen Phosphatgruppen– teilweise kompensiert wird.

Es existiert eine lineare Beziehung zwischen der Schmelztemperatur T_m und dem natürlichen Logarithmus der Salzkonzentration. Aus der Regression erhält man für die Steigung einen Wert, der charakteristisch ist für die natürlichen Nukleinsäuren. Beispielsweise findet man für einen Übergang von poly A-poly U zu den beiden Einzelsträngen eine Steigung von etwa $8 \text{ K}\cdot\text{mol}^{-1}$ [65]. Aus Schmelzkurven von bcA₁₀-bcT₁₀ mit unterschiedlichen Konzentrationen an Natriumchlorid erhielt man T_m Werte, die gegenüber dem natürlichen Logarithmus der Na⁺ Ionen eine Gerade mit einer Steigung von etwa $7 \text{ K}\cdot\text{mol}^{-1}$ ergaben (Abb.46). Es scheint also, dass die rein bicyclische Doppelhelix eine vergleichbare Dimension wie die natürliche DNS aufweist, mit einem ähnlichen Abstand der Phosphodiestergruppe in den jeweiligen Strängen.

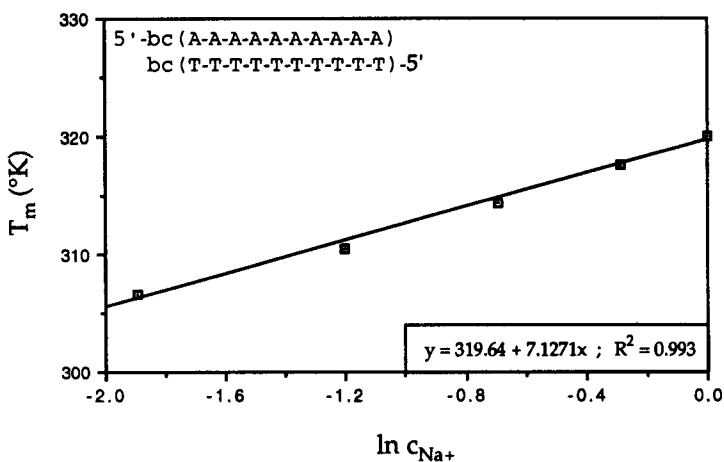


Abb.46 Variation der Salzkonzentration über einen Bereich von 0.15M-1M NaCl bei dem Duplex aus bcA₁₀-bcT₁₀, welcher in einer Konzentration von 2.7 μ M vorlag (10mM Tris-HCl, pH 7).

3.4 Untersuchungen zur Paarungsstöchiometrie in Komplexen von bcA₁₀ und bcT₁₀ mit den entsprechenden natürlichen Komplementärsträngen, sowie mit sich selbst

Im Rahmen der "antisense" Strategie ist die Bildung von Triplexstrukturen von grosser Bedeutung. Schon vor langer Zeit haben *Felsenfeld et al.* [66] mit Untersuchungen an Homopolymeren gezeigt, dass diese in der Lage sind, eine triplexartige Struktur einzunehmen. Zu den ersten entdeckten Basentriplets gehörten das U·A·U (T·A·T) und das C⁺·G·C Triplet. In neuerer Zeit (1987) entwickelte sich eine intensive Forschungstätigkeit in dieser Sparte der DNS-Chemie. Arbeiten, insbesondere von *Moser und Dervan* [67], sowie *Hélène* [68], ergaben zwei mögliche Triplexmotive, welche sich mit hoher Selektivität bilden und in Abbildung 47 dargestellt sind.

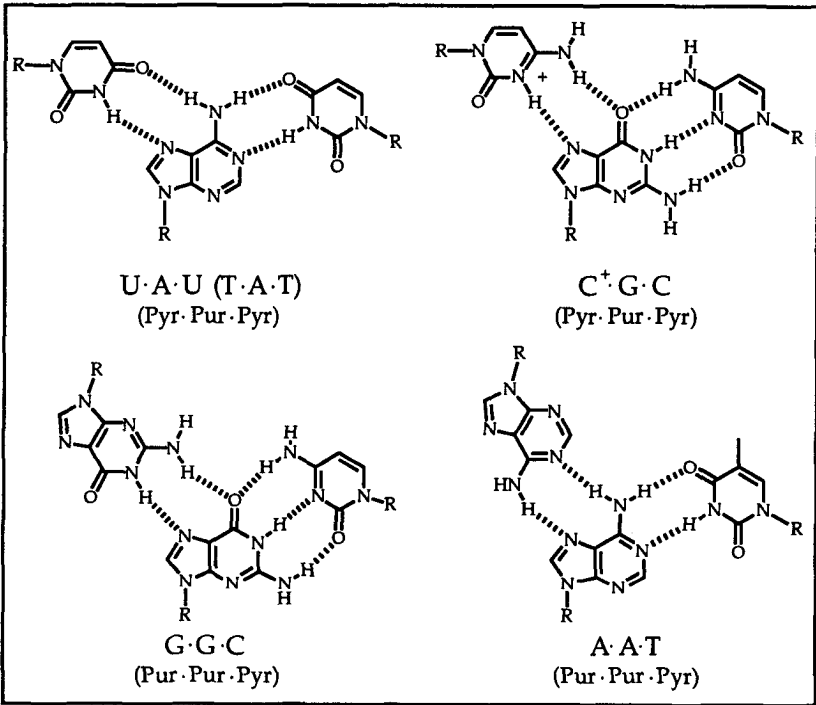


Abb.47 Die vier Basentriplette U·A·U (T·A·T), C⁺·G·C, G·G·C und A·A·T.

Im Pyr-Pur-Pyr Motiv ist der dritte Pyrimidin-Strang Hoogsteen-artig in der grossen Furche des Homopurin-Homopyridin Duplexes, parallel zum Purin-Strang gebunden [69]. Bei den seit kurzem in das Interesse der Forscher gerückten Pur-Pur-Pyr Triplexen wird eine antiparallele Orientierung des dritten Stranges zum Homopurinstrang des zu Grunde liegenden Watson-Crick Duplexes beobachtet [70].

3.4.1 Mischkurventechnik

Bei einer Mischkurve –erstmal von Job [71] im Jahre 1928 angewandt– werden zwei Oligonukleotidlösungen gleicher Konzentration in wechselnden Verhältnissen gemischt (Gesamtoligonukleotidkonzentration konstant) und UV spektroskopisch vermessen. Tritt eine Komplexbildung auf, so ist wegen des

Hyperchromie-Effektes ein Absinken des Absorptionswertes zu beobachten. Aus einer Auftragung von Absorption versus den Molenbruch der beteiligten Partner lässt sich so die Stöchiometrie der vorliegenden Spezies ablesen.

In einer typischen Mischkurve (Abb.48) von poly A mit poly U kann man grundsätzlich drei Regionen differenzieren [72]: Liegt poly A in einem Überschuss vor, so wird die Zugabe von poly U zu einem Duplex führen, wobei die Hyperchromizität bis zu jenem Punkt absinkt, bei welchem alles poly U zur Duplexbildung verbraucht wurde. Dies spielt sich in einem Molenbruch Bereich von $1 \geq x_{\text{poly A}} \geq \frac{1}{2}$ ab. Wenn nun umgekehrt poly U mit poly A titriert wird, so lassen sich zwei Regionen ausmachen, und zwar dort wo $\frac{1}{3} \geq x_{\text{poly A}} \geq 0$ und $\frac{1}{2} \geq x_{\text{poly A}} \geq \frac{1}{3}$ entspricht. In ersterer liegt dann der Triplex und überschüssiges poly U vor, in letzterer hingegen ein Gemisch der beiden Spezies Duplex und Triplex. Es ist unbedingt darauf hinzuweisen, dass die Erkennung obengenannter Bereiche von der Wellenlänge abhängig ist und somit die Wahl der Wellenlänge wichtig ist. Ferner muss man die beiden Einzelstrangkonzentrationen präzise kennen.

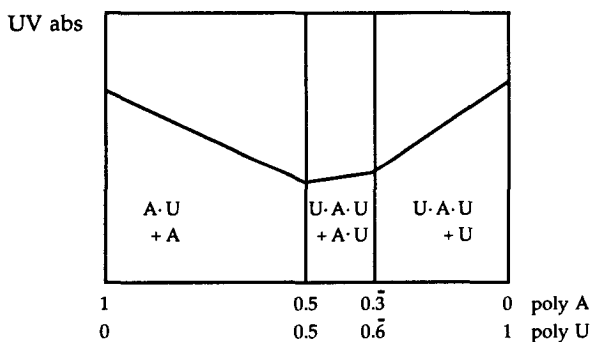


Abb.48 Schematische Darstellung einer Mischkurve von poly A und poly U. Der Anschaulichkeit halber sind die Präfixe poly in der Abbildung weggelassen worden.

Führt man dieses Experiment am Beispiel der Decameren von dA_{10} und dT_{10} bei einer 0.15M Natriumchloridkonzentration in einem 10mM Tris-HCl Puffer bei pH 7 durch ($\lambda=260\text{nm}$), so wird ein stetiges Absinken der Absorption bis zum Punkt von 50% und danach ein ebensolches Ansteigen beobachtet. Die erhaltene Stöchiometrie ist in Abb.49 dargestellt.

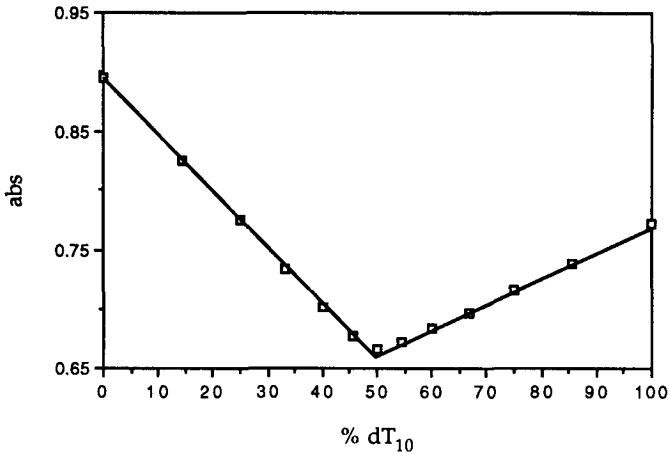


Abb. 49 Mischkurve aus dA₁₀ (8.7μM) und dT₁₀ (8.2μM), aufgenommen in einem 10mM Tris-HCl Puffer bei pH 7, 0.15M NaCl. Die Temperatur der Lösung betrug circa 8° C. Es wurde bei 260 nm detektiert.

Im gesamten durchlaufenen Bereich liegen unter den Messbedingungen nie etwas anderes als eine Duplexstruktur und Einzelstränge vor. Das gleiche Verhalten wurde auch von *Pilch et al.* [63] beobachtet; ein Zusatz von 50mM MgCl₂ zum Puffersystem ermöglichte jedoch die Bildung einer Triplexstruktur T₂A.

Ein unter analogen Bedingungen wie bei der Mischkurve von dA₁₀-dT₁₀ durchgeführte Stöchiometriebestimmung von bcT₁₀-dA₁₀ (Abb.50) zeigte, dass im Bereich von etwa 0-47% bcT₁₀ ein Gemisch von Duplex und überschüssigem dA₁₀ vorliegt. Man sieht keine Evidenz für eine Struktur des Typs A·A·T, das in einer Änderung der Geraden am Punkt von 33% bcT₁₀ ablesbar wäre. Zwischen 47% und 63% bcT₁₀ existieren sowohl Triplex- als auch Duplexstruktur. Ab 63% sieht man ein lineares Ansteigen der Geraden, hier sind Triplex und ungebundener bcT₁₀ Einzelstrang vorhanden.

Wir besitzen somit einen ersten Hinweis auf eine Triplexstruktur, welche hier sogar schon ohne Zusatz zweiwertiger Kationen gebildet wird. Probleme ergaben sich bei der Messung aus dem Umstand, dass bei der Temperatur von 8°C der Duplex bcT₁₀-dA₁₀ bereits im Schmelzen begriffen ist.

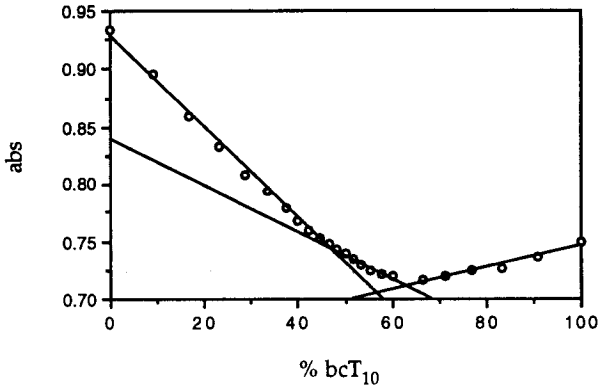


Abb.50 Mischkurve von bcT₁₀ (8.89 μ M) und dA₁₀ (8.97 μ M) aufgenommen in 10mM Tris-HCl Puffer bei pH 7; 0.15M NaCl. Es wurde bei 260 nm detektiert (Temperatur in der UV Zelle: 8° C).

Die Frage war nun, ob sich alle bicyclischen Systeme in diesem Sinne verhalten würden. Die Triplexbildung mit bicyclischem Purinstrang bcA₁₀ und dT₁₀ wurde unter verschiedenen experimentellen Bedingungen untersucht. Die erste Kurve wurde mit 0.15M NaCl aufgenommen, um obige Resultate vergleichen zu können. Es konnte eine markante Richtungsänderung der Geraden bei 52% und 68% bcA₁₀ Zugabe festgestellt werden (Abb.51). Dies ist ein deutlicher Hinweis auf die Tatsache, dass auch hier (wie schon beim System bcT₁₀·dA₁₀ gesehen) eine Triplexbildung ohne Zusatz zweiwertiger Kationen möglich ist. Die Messung bei einer 0.05M Mg²⁺ Konzentration ergab tendenziell das gleiche Resultat wie bei einer 0.15M Na⁺ Konzentration. Die oben diskutierten drei Teilregionen waren klar zu unterscheiden (nicht abgebildet).

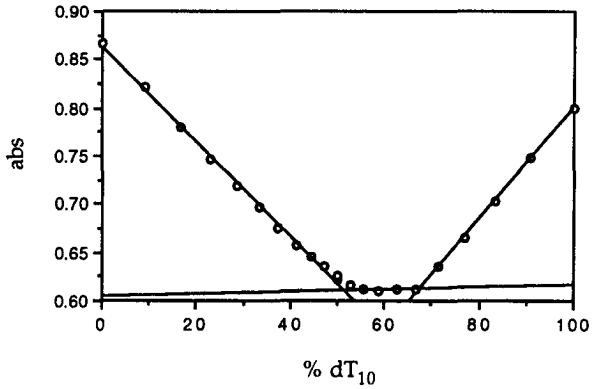


Abb. 51 Mischkurve von bcA₁₀ und dT₁₀ in 0,01M Tris-HCl, 0,15M NaCl bei pH 7. Die Einzelstrangkonzentrationen betragen: bcA₁₀ 8,25 μ M; dT₁₀ 8,33 μ M. Es wurde bei 260 nm detektiert (8° C).

Wird bcA₁₀ mit dem Homopolymeren poly U untersucht, findet man folgendes Bild (Abb.52). Die verschiedenen Regionen sind deutlich auszumachen. 48% und 66% poly U entsprechen denjenigen stöchiometrischen Verhältnissen, bei welchen die Geraden ihre Steigung ändern.

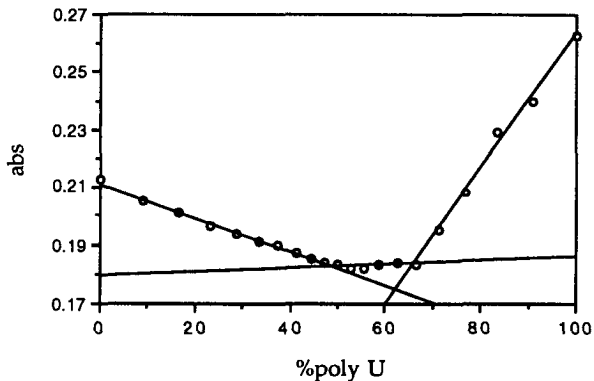


Abb. 52 Mischkurve von bcA₁₀ und poly U in 0,01M Tris-HCl, 0,15M NaCl bei pH 7. Die Einzelstrangkonzentrationen betragen: bcA₁₀ 6,9 μ M; poly U 7,9 μ M ($\epsilon=9350 \times 10$). Es wurde bei 280 nm detektiert (14° C).

Als letztes wurde die Paarungsstöchiometrie der beiden bicyclischen Sequenzen bcA₁₀ und bcT₁₀ untersucht. Aus Schmelzkurven (Kap.3.3) konnte auch bei diesem System keine Evidenz für eine triplexartige Struktur gefunden werden. Aber mittels der Mischkurventechnik wurde nachgewiesen, dass die Kurven sowohl bei 0.15M NaCl-Konzentration, wie auch bei 10mM Mg²⁺ Ionen-Konzentration (Abb.53) praktisch identisch sind. Wiederum lassen sich die drei Teilregionen einer typischen Mischkurve beobachten.

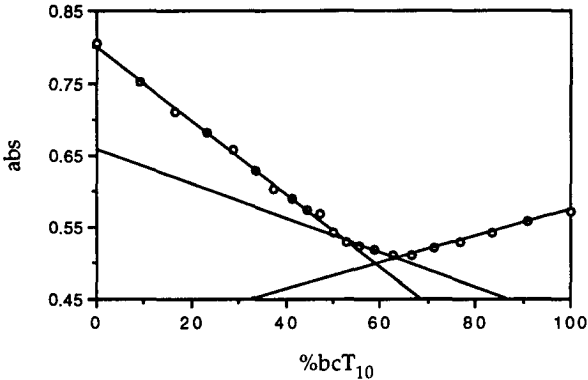


Abb.53 Mischkurve von bcA₁₀ und bcT₁₀ (7.84μM bzw. 7.74μM) bei 10mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl, pH 7, Detektion erfolgte bei 255 nm (8°C). Die Umkehrpunkte sind bei 52% respektive 63% bcT₁₀ Zugabe zu finden.

Alle diese Messungen wiesen eindeutig auf eine Triplexbildung der Stöchiometrie T₂A (U₂A) und nicht des Typs A₂T (A₂U) hin (vgl. Abb.47). Dies bedeutet, dass die untersuchten Systeme, die einen bicyclischen Partner enthalten, schon unter solchen Bedingungen Triplexstrukturen bilden, unter welchen die Komplexe aus natürlichen Oligonukleotiden nur Duplexstrukturen zeigen.

3.4.2 Polyacrylamidgelelektrophorese

Durch die Verwendung der nicht denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) hoffte man einen zusätzlichen, unabhängigen Beweis für das Vorhandensein triplexartiger Strukturen zu finden. Bei dieser Methode wird das Phänomen ausgenutzt, dass die negativ geladenen und in eine Matrix (Polyacrylamid) eingebetteten Oligomeren unter der Einwirkung eines Stromflusses sich in Richtung der Anode bewegen. Dabei hängt die Mobilität der einzelnen Oligonukleotide unter anderem sowohl von der Anzahl der einfach negativ geladenenen Phosphodiesterfunktionen als auch von der Masse der Oligomeren insgesamt ab (über Herstellung und Verwendung von Polyacrylamidgelen in der Nukleinsäureanalytik vgl. [73]). Als Elektrophoresepuffer wurde ein 0.09M Tris-Borsäurepuffer (pH 8.3) verwendet, dem in den verschiedenen Experimenten unterschiedliche Mengen an $MgCl_2$ zugesetzt wurden. Da wir aus Schmelzexperimenten wussten, dass der aus bcT_{10} und dA_{10} gebildete Komplex bei einer nahezu physiologischen 0.15M Natriumchloridkonzentration nur eine Schmelztemperatur von $\sim 10^\circ C$ besass und sich deshalb der Analytik durch PAGE entzog, wurden nur die Systeme bcA_{10} - dT_{10} , und bcA_{10} - bcT_{10} in Betracht gezogen.

Das Gel, das keinen Zusatz an $MgCl_2$ besass, zeigte für das aus rein bicyclischen Einzelsträngen bcA_{10} und bcT_{10} bestehende System ein interessantes Bild (Abb.54 links). Bei einer Stöchiometrie der beiden Decameren von bcA_{10} zu bcT_{10} = 2:1 wurde ein weniger schnell laufender und ein in der Mobilität mit bcA_{10} übereinstimmender Fleck identifiziert. Dieser neu gebildete Fleck kann als Duplex gedeutet werden, da in einer 1:1 Mischung nur dieser neue Fleck entsteht. Wird A zu zwei T Strängen gemischt, sieht man ebenfalls den Duplex und überschüssiges bcT_{10} . Als die Konzentration der Mg^{2+} Ionen auf nur 5mM erhöht wurde (Abb.54 rechts), wurde bei gleicher Stöchiometrie ein noch etwas weniger mobiler Fleck als der Duplex beobachtet. Da in der 2T:1A Mischung kein bcT_{10} mehr zu sehen war, entspricht das beobachtete Assoziat offensichtlich einem Triplex mit obiger Stöchiometrie.

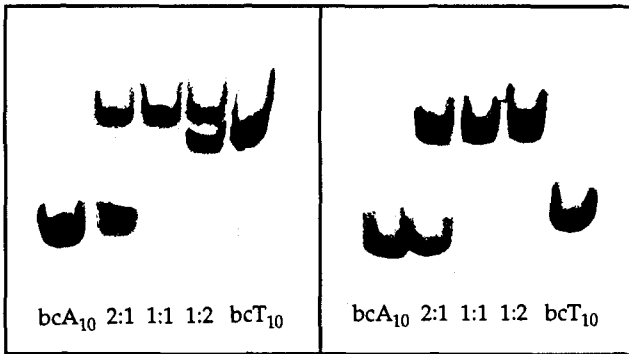


Abb.54 Gel-Elektrophorese der beiden bicyclischen Oligonukleotide bcT₁₀ und bcA₁₀ in verschiedenen Mischverhältnissen an 20% Polyacrylamid in 0.09M Tris-Borsäure bei pH 8.3, ohne MgCl₂ (links) und 5mM MgCl₂ (rechts). Die Laufdauer betrug 14.5 Stunden bei einer konstanten Spannung von 100V (circa 4°C Umgebungstemperatur). Das Fehlen von bcT₁₀ bei einer 1:2 Stöchiometrie und das etwas andere Laufverhalten deuten auf einen Triplex hin (rechts).

Bei der Untersuchung der beiden Sequenzen bcA₁₀ und dT₁₀ mittels Polyacrylamidgelelektrophorese zeigte sich ein etwas anderes Bild. Ohne Zusatz von MgCl₂ zum Gel und zum Elektrophoresepuffer konnten in den betrachteten Mischverhältnissen nur jeweils die beiden Einzelstränge identifiziert werden, es fand keine Komplexbildung statt (Abb.55 links). Zwar keinen Triplex, aber immerhin einen Duplex zeigte bcA₁₀ mit dT₁₀ bei einer Stöchiometrie von 1:1 respektive 1:2 (Konzentration an MgCl₂ im Puffer 5mM). Im letzteren Fall war überschüssiges dT₁₀ bezüglich Laufweite in schöner Übereinstimmung mit der zu Kontrollzwecken allein aufgetragenen dT₁₀ Sequenz (Abb.55 rechts). Eine Variation der MgCl₂-Konzentration zu 10mM, 15mM und 25mM ergab keine Änderung. Erst bei 50mM Magnesiumchlorid (Abb.56) konnte auch beim bcA₁₀:dT₁₀ Paar ein Triplex des Typs AT₂ induziert werden. Es fragt sich, ob in diesem System unter der Voraussetzung einer 1:2 Stöchiometrie bei tieferer Kationenkonzentration schon eine teilweise Triplexbildung vorliegt. Die Beantwortung dieser Frage ist deshalb schwierig, weil eigentlich nur bei vollständigem Fehlen des zweiten Äquivalent des T Stranges von einer Triplexstruktur ausgegangen werden kann, denn die beiden Assoziat Duplex beziehungsweise

Triplex sind in ihrem Laufverhalten zu ähnlich, um mit absoluter Bestimmtheit zugeordnet werden zu können.

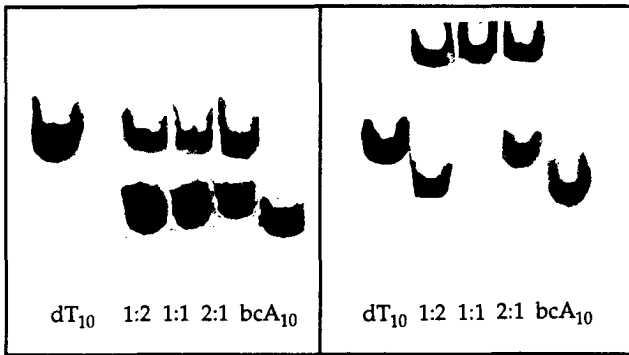


Abb.55 Gel-Elektrophorese der beiden Oligonukleotide bcA_{10} und dT_{10} in verschiedenen Mischverhältnissen an 20% Polyacrylamid in 0.09M Tris-Borsäure bei pH 8.3, ohne $MgCl_2$ (links) und 5mM $MgCl_2$ (rechts). Die Laufdauer betrug circa 15 Stunden bei einer konstanten Spannung von 100V (circa 4°C Umgebungstemperatur).

In Abb.56 ist das Gel der Elektrophorese bei 50mM $MgCl_2$ dargestellt. Hier zeigen alle aufgetragenen Sequenzen sowohl Duplex- (1:1) wie auch Triplex- (1:2) Strukturen des Typs AT_2 .

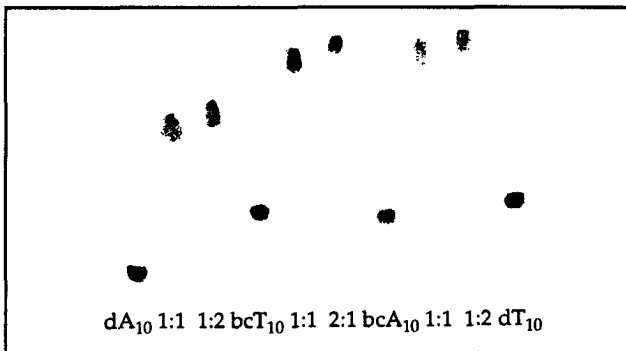


Abb.56 Gel-Elektrophorese an 20% Polyacrylamid in 0.09M Tris-Borsäure bei pH 8.3, 50mM $MgCl_2$. Die Laufdauer betrug 24 Stunden bei einer konstanten Spannung von 150V (Umgebungstemperatur circa 4°C).

3.5 Zur Thermodynamik der Assoziatbildung zwischen bicyclischer und natürlicher DNS

Der Dissoziationsprozess eines Oligonukleotidkomplexes wird ausgenutzt, um mittels Schmelzkurven oder direkten Wärmemessungen die thermodynamischen Parameter ΔH , ΔS und somit dann ΔG des Paarungsprozesses zu bestimmen. Diese Grössen können als Mass dafür genommen werden, ob sich die eingangs gestellte Hypothese der entropischen Duplex-Stabilisierung bestätigen lässt. Wie wir schon bei den aus Schmelzexperimenten gewonnenen T_m -Werten im Vergleich zu dem natürlichen dA-dT Duplex gesehen haben, besteht offenbar eine erhöhte Tendenz der Bicyclooligonukleotide zur Paarung. Eine Ausnahme stellen die mit Bicyclothymidin gebildeten Assoziate dar. Der T_m -Wert steht zwar in direktem Zusammenhang mit der freien Paarungsenthalpie ΔG , jedoch kann aufgrund des T_m -Wertes keine Aussage über die Grösse der Beiträge von ΔH bzw. ΔS an die freie Enthalpie ΔG gemacht werden.

Es bieten sich verschiedene Methoden zur Bestimmung dieser thermodynamischen Grössen an. Eine Übersicht findet sich in den Artikeln von *Breslauer* und *Marky* [74, 75]. Wir haben uns auf zwei voneinander unabhängige Methoden gestützt: bei Methode **A** erhält man die thermodynamischen Daten aus der Abhängigkeit der T_m -Werte (aus UV Schmelzkurven) von der Oligonukleotidkonzentration. Dabei nimmt man an, dass im Gleichgewicht nur vollständig gepaarte oder ungepaarte Spezies vorliegen ("two state model" = Zwei-Zustände Modell). Die Methode **B** erlaubt eine direkte, modellunabhängige Bestimmung dieser Parameter durch "Differential scanning calorimetry" Messungen.

3.5.1 Kurze Erläuterung der beiden verwendeten Messmethoden

UV Schmelzkurven in Abhängigkeit der Oligonukleotidkonzentration (A)

Für das Gleichgewicht einer Assoziation von nicht selbstkomplementären Einzelsträngen



wobei n die Molekularität des Prozesses ausdrückt, gilt für die Gleichgewichtskonstante K :

$$K_{\text{eq.}} = \frac{[A_{1\dots n}]}{[A_1][A_2]\dots[A_n]}$$

Durch die Einführung einer Variable α , welche in einer Schmelzkurve den Bruchteil der Einzelstränge im Duplexzustand ausdrückt, kann die Gleichgewichtskonstante K folgenderart ausgedrückt werden:

$$K_{\text{eq.}} = \frac{\alpha(c_T/n)}{[(1-\alpha) \cdot c_T/n]^n}$$

Unter c_T versteht man die totale Einzelstrangkonzentration. Bei der Schmelztemperatur T_m nimmt α unter der Voraussetzung des Zwei-Zustände Modells einen Wert von 0.5 an. Aus der Kombination der obigen Gleichung mit dem Ausdruck

$$-R \cdot T_m \cdot \ln K_{\text{eq.}} = \Delta H - T \Delta S$$

ergibt sich die folgende Beziehung:

$$\frac{1}{T_m} = \frac{(n-1) \cdot R}{\Delta H^\circ} \cdot \ln c_T + \frac{[\Delta S^\circ - (n-1) \cdot R \cdot \ln 2n]}{\Delta H^\circ}$$

Für einen Duplex, wo $n=2$ ist, erhält man also vereinfacht:

$$\boxed{\frac{1}{T_m} = \frac{R}{\Delta H^\circ} \cdot \ln c_T + \frac{[\Delta S^\circ - R \cdot \ln 4]}{\Delta H^\circ} \quad (1)}$$

Aus der Auftragung des natürlichen Logarithmus von τ_T versus den reziproken Wert der Schmelztemperatur kann somit aus der Steigung der Regressionsgeraden die Enthalpie ΔH , aus dem Achsenabschnitt und Kenntnis von ΔH die Entropie ΔS berechnet werden.

Differential scanning calorimetry (DSC) (B) [76, 77]

In einem DSC-Experiment wird der Unterschied in der Wärmefaufnahme (\underline{D}) zwischen Referenz- und Probezelle über einen gewünschten Temperaturbereich (\underline{S}) gemessen. Dabei wird die Wärmekapazitätsänderung ΔC_p direkt als Funktion der Temperatur aufgezeichnet. Es gilt:

$$\int_{T_0}^{T_1} \Delta C_p \cdot dT = \Delta H_{\text{cal}} \quad \text{und} \quad \int_{T_0}^{T_1} \frac{\Delta C_p}{T} \cdot dT = \Delta S_{\text{cal}}$$

Die korrespondierenden Flächeninhalte ergeben somit direkt die Enthalpie ΔH_{cal} und die Entropie ΔS_{cal} . Die kalorimetrische Methode ist im Gegensatz zur UV-Methode eine direkte Bestimmungsmethode.

Wenn die bei der UV-Methode **A** erhaltenen Werte in naher Übereinstimmung mit den kalorimetrisch ermittelten sind, ist dies ein guter Hinweis, dass der beobachtete Übergang einem Zwei-Zustände Modell entspricht. Sind die Werte nach Methode **A** kleiner, so ist die Wahrscheinlichkeit gross, dass Prozesse stattfinden, die nicht dem oben angesprochenen Zwei-Zustände Modell genügen.

3.5.2 Thermodynamische Untersuchungen anhand der vier möglichen Duplexe gebildet aus bcA_{10} , bcT_{10} , dA_{10} und dT_{10}

T_m Werte aus Schmelzkurven, aufgenommen in einem 0.01M Na_2HPO_4 Puffer (1M NaCl, pH 7)¹⁷, zeigten ein Ansteigen der Schmelztemperatur bei Konzentrationserhöhung (Abb.57a). Die nach Gleichung (1) erhaltenen Regressionsgeraden waren mit einem Korrelationsfaktor $R^2 > 0.99$ als gut übereinstimmend zu bezeichnen.

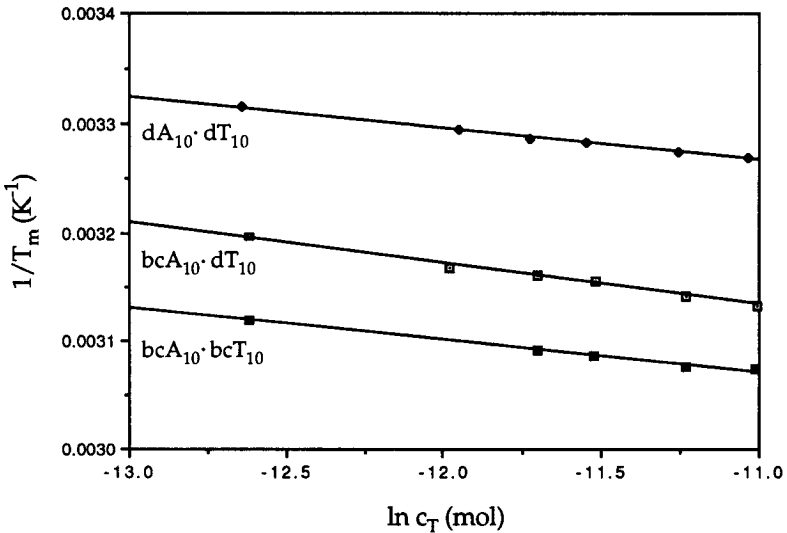


Abb.57a Reziproke T_m -Werte aus Schmelzkurven mit unterschiedlicher Oligonukleotidkonzentration werden gegen den natürlichen Logarithmus der totalen Einzelstrangkonzentration aufgetragen. Aus der Steigung und dem Achsenabschnitt der Regressionsgeraden lassen sich ΔH wie auch ΔS berechnen (vgl. Kap. 3.5.1 und Tab.12).

¹⁷ Alle Messungen wurden in einem Konzentrationsbereich von 2-20 μ M am Oligonukleotid Einzelstrang durchgeführt. Eine erste Messreihe der vier möglichen Duplexe $dA_{10} \cdot dT_{10}$, $dA_{10} \cdot bcT_{10}$, $bcA_{10} \cdot dT_{10}$ und $bcA_{10} \cdot bcT_{10}$ wurde in 10mM Tris-HCl Puffer (0.15M NaCl, pH 7) aufgenommen und ausgewertet. Eine zweite Messreihe, die den gleichen Konzentrationsbereich abdeckte, wurde in 10mM Na_2HPO_4 Puffer (1M NaCl, pH 7) gemessen. Jedoch wurde der Duplex $dA_{10} \cdot bcT_{10}$ nicht mehr bestimmt.

Obiges Puffersystem wurde gewählt, um die Vergleichbarkeit mit den aus mikrokalorimetrischen Messungen gewonnenen Daten zu gewährleisten. Eine Verwendung des Tris-HCl Puffers führte nämlich bei DSC Messungen zu nicht reproduzierbaren Basislinien und war deshalb nicht zu gebrauchen. In den nachfolgenden Abbildungen sind die kalorimetrischen Messungen der drei Komplexe $dA_{10}\text{-}dT_{10}$ (Abb.57b), $bcA_{10}\text{-}dT_{10}$ (Abb.57c) und $bcA_{10}\text{-}bcT_{10}$ (Abb.57d) wiedergegeben. Dabei ist der Werdegang der Rohkurve (Bild A) bis zum entsprechenden Endresultat (Bild D) dargestellt. Wir gelangen zum Bild B, wenn wir die in Bild A unterhalb der Messkurve dargestellte Referenzlinie (Puffer) subtrahieren. Das Bild C zeigt die auf die entsprechende Duplexkonzentration umgerechnete Messkurve mit der konstruierten Basislinie, die in Bild D von der Kurve abgezogen wurde (vergl. auch Exp. Teil).

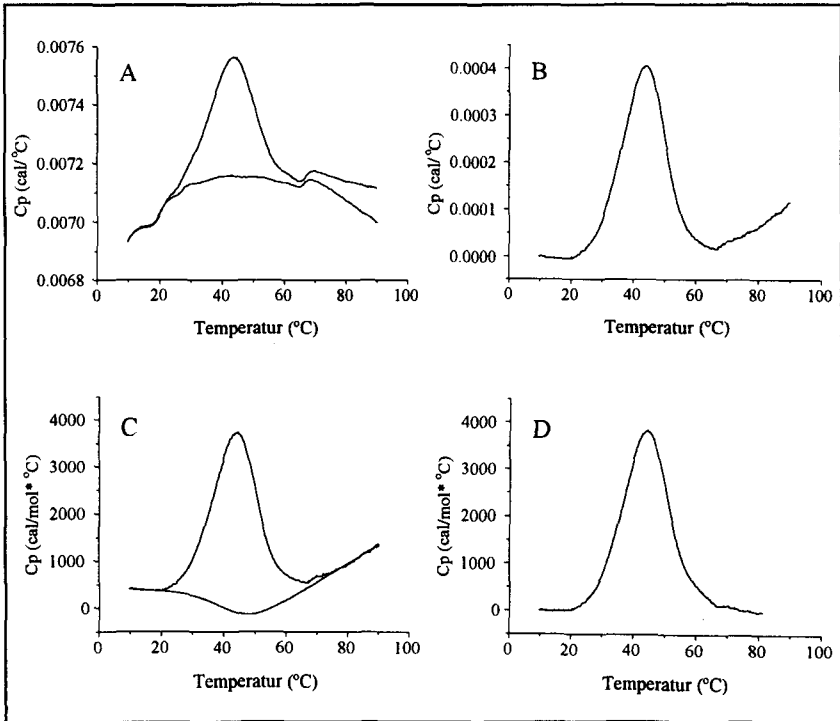


Abb.57b Messung einer 0.1mM Lösung des Duplexes $dA_{10}\text{-}dT_{10}$ in 10mM Na_2HPO_4 Puffer bei pH 7 und einer 1M Natriumchloridkonzentration. ($\Delta H_{cal} = -73.3$ kcal/mol; $\Delta S_{cal} = -231$ cal \cdot mol $^{-1}\cdot$ K $^{-1}$).

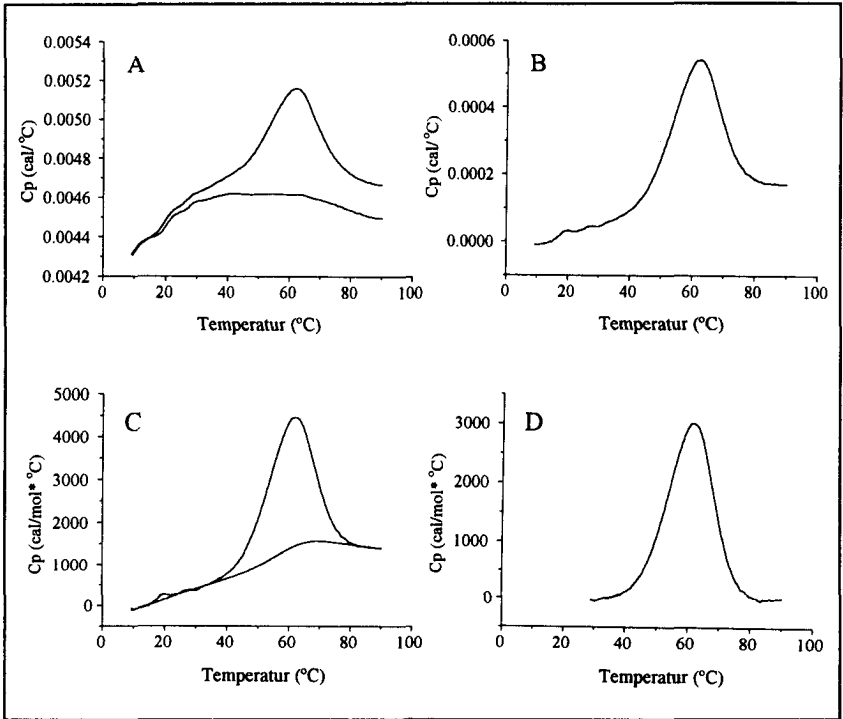


Abb.57c Messung einer 0.1mM Lösung des Duplexes bcA₁₀-dT₁₀ in 10mM Na₂HPO₄ Puffer bei pH 7 und einer 1M Natriumchloridkonzentration. ($\Delta H_{\text{cal}} = -59.1 \text{ kcal/mol}$; $\Delta S_{\text{cal}} = -178 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$).

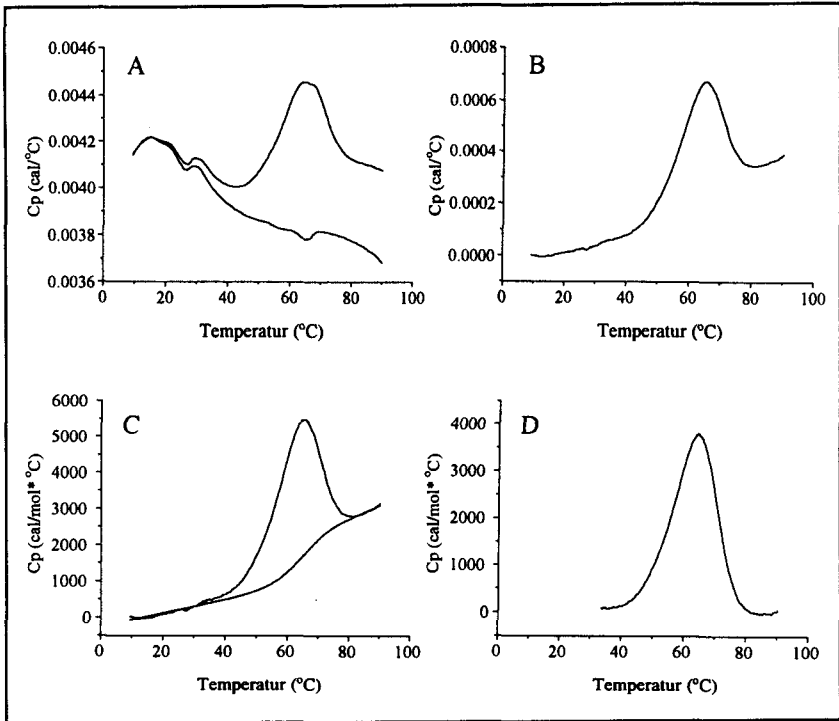


Abb.57d Messung einer 0.1mM Lösung des Duplexes bcA₁₀-bcT₁₀ in 10mM Na₂HPO₄ Puffer bei pH 7 und einer 1M Natriumchloridkonzentration. ($\Delta H_{cal} = -66.8$ kcal/mol; $\Delta S_{cal} = -199$ cal·mol⁻¹·K⁻¹).

Duplex	ΔH (kcal/mol)		ΔS (cal/mol·K)	
	DSC	UV	DSC	UV
bcA ₁₀ · dT ₁₀	-59.1	-51.3	-178	-136
bcT ₁₀ · dA ₁₀ *	—	-55.9	—	-169
bcA ₁₀ · bcT ₁₀	-66.8	-66.9	-199	-181
dA ₁₀ · dT ₁₀	-73.3	-69.7	-231	-203

Tab.12 Gegenüberstellung der beiden verwendeten Methoden. Thermodynamische Daten dreier Duplexe, gemischt im 1:1 Verhältnis, sind durch mikrokalorimetrische DSC (Abb.57b-d) und UV (Abb.57a) optische Methoden bestimmt worden. Die erhaltenen thermodynamischen Größen sind tabellarisch zusammengefasst. Das Puffersystem war in beiden Messreihen 10mM Na₂HPO₄, 1M NaCl bei pH 7. *Dieser Duplex wurde in 0.01M Tris-HCl; 0.15M NaCl bei pH 7 gemessen.

Die entsprechenden Daten (Tab.12) sind nach den beschriebenen Methoden bestimmt worden. Die Äquivalenz der nach zwei Methoden bestimmten thermodynamischen Daten für den rein bicyclischen wie auch den rein natürlichen Duplex zeigen die gute Übereinstimmung mit dem "Zwei-Zustände" Modell. Im gemischten Duplex jedoch, stellen wir eine deutliche Diskrepanz zwischen den auf beide Arten ermittelten Werten fest, was darauf hindeuten könnte, dass die Modellannahme ("Zwei-Zustände" Modell) in diesem System nicht oder nur teilweise zutrifft. Diese Hypothese ist jedoch wenig plausibel, da ja in den beiden rein natürlichen bzw. bicyclischen Komplexen das "two state model" gute Übereinstimmung zeigt. Beim bcA₁₀dT₁₀ CD-Spektrum wurde bei 15° C (Abb.42 oben) ein Prozess beobachtet, der einer konformationellen Änderung entspricht und dem eigentlichen Schmelzvorgang vorgelagert ist. Möglicherweise ist es dieser Vorgang, der die Diskrepanz der auf zwei Arten erhaltenen thermodynamischen Daten dokumentiert. Denn die Kalorimetrie zeichnet die totale Energie auf, die bei einer Dissoziation aufgenommen wird, währenddessen wir bei der Untersuchung mittels UV Schmelzkurven prinzipiell "nur" den effektiven Schmelzvorgang betrachten.

Über die vier gemessenen Duplexe zeigt sich folgendes Bild (Abb.58): Die Entropie sinkt betragsmäßig ab von $dA_{10}dT_{10}$, über den rein bicyclischen zu den beiden gemischten Duplexen. Gerade gegenläufig dazu verhält sich die Enthalpie ΔH , die am günstigsten für die rein natürlichen und bicyclischen Sequenzen ist (vgl. Tab.12). Dass ΔH kleiner wird, kann möglicherweise mit einer nicht optimalen Geometrie der Einzelstrang-Struktur in den Bicyclo-Oligonukleotiden erklärt werden (vgl. γ -Winkel der Monomeren).

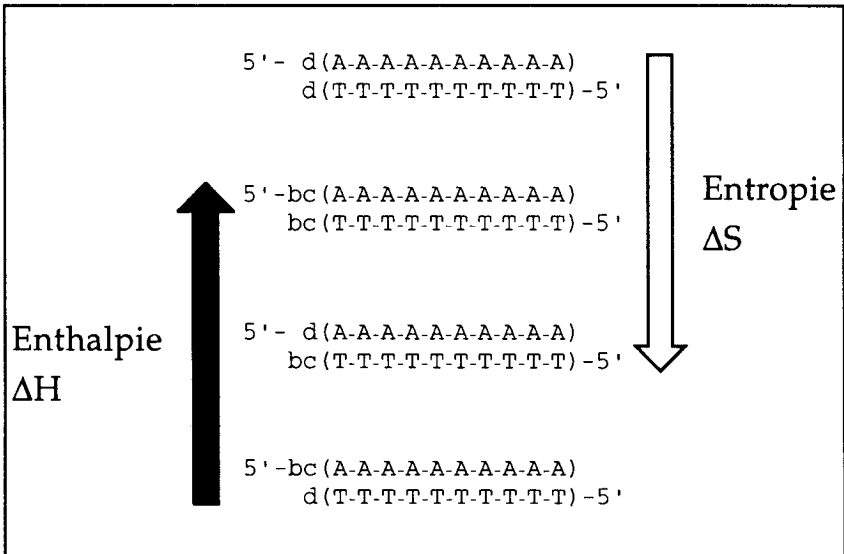


Abb.58 Die Tendenz der beiden thermodynamischen Parameter ΔH und ΔS , wie man sie aus DSC- und UV-Messungen für obige Duplexe festgestellt hat, soll hier verdeutlicht werden. In Pfeilrichtung ist ein stabilisierender Einfluss zu verzeichnen.

3.6 Nukleasenresistenz der Sequenz bcT_{10} verglichen mit dT_{10}

Im Hinblick auf die in der Einleitung erwähnte wichtige Anforderung an synthetische, potentielle "antisense" Oligonukleotide – nämlich gegenüber Nukleasen stabiler zu sein – wurde das Decamere von Bicyclothymidin mit verschiedenen Phosphodiesterasen umgesetzt (Tab.13). Es erwies sich, dass die Kalbsmilz-phosphodiesterase, eine 5'-exo Nuklease, das Oligonukleotid am langsamsten abbaute: bcT_{10} war im Vergleich zu dT_{10} um einen Faktor ~ 14000 stabiler.

Gegenüber einer 3'-exo-Phosphodiesterase (aus Schlangengift) zeigte unsere bicyclische Sequenz im Vergleich zur natürlichen dT₁₀ Sequenz eine circa dreimal höhere Resistenz. Bei Verwendung einer exo-/endo-Nuklease S1 verminderte sich die Hydrolysierbarkeit sogar um einen Faktor ~100. Die bicyclische Sequenz zeigt also im Vergleich zum dT₁₀ eine generell schlechtere Abbaubarkeit mittels der verwendeten Phosphodiesterasen.

Nuklease	dT ₁₀	bcT ₁₀	dT ₁₀ : bcT ₁₀
snake venom PDE (EC 3.1.15.1) 1.5 x 10 ⁻⁴ U (3'-exonuclease)	95% (5 min.)	28% (5 min.)	~3
Nuclease S1 (EC 3.1.30.1) 10u (exo, endonuclease)	100% (5 min.)	— (5 min.) 20% (60 min.)	~100
calf spleen PDE (EC 3.1.16.1) a) 0.024U b) 0.24U (5'-exonuclease)	a) 91% (5 min.)	b) 12% (16 h)	~14000

Tab.13 Resistenz gegenüber verschiedenen Nukleasen von bcT₁₀ im Vergleich zu natürlichem dT₁₀. Es wurden jeweils 0.15 OD₂₆₀ Oligonukleotid im entsprechenden Puffer (sv PDE 0.1M Tris-HCl, pH 8.5; S1 0.033M NaOAc, 0.05M NaCl, 0.03mM ZnSO₄, pH 4.5; cs PDE 0.1M NH₄OAc, pH 6.5) gelöst und bei 37° C inkubiert. Allen Reaktionen wurden zusätzlich 5u alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1) zugegeben. Die Analyse und Quantifizierung der Produkte erfolgte mittels RP-HPLC durch Peakintegration (UV 260 nm). Die Werte repräsentieren den Anteil der Summe aller Hydrolyseprodukte relativ zu unverdaulichem Decamer.

3.7 Ausblick

Die gemessenen thermodynamischen Daten zeigen auf, dass die Fixierung des Zuckerphosphat Rückgrats zu einer entropischen Stabilisierung der Komplexbildung beiträgt. Hingegen sind die Ursachen, welche im bicyclischen System eine destabilisierenden Einfluss der Enthalpie ΔH auf die freie Enthalpie bewirken, noch wenig untersucht. *Vesnaver* und *Breslauer* [78] unterstreichen die Wichtigkeit des energetischen Beitrages der organisierten Einzelstrangkongformation zur gesamten freien Duplexierungsenthalpie. Es bleibt abzuklären, inwiefern die untersuchten decameren, bicyclischen Einzelstränge einen enthalpischen Beitrag zur Paarungsenthalpie liefern. Die Grösse dieser Enthalpie könnte man durch kalorimetrische Titrationsexperimente ermitteln.

Zu den in dieser Arbeit von bcA und bcT gebildeten Assoziaten müssen auch noch diejenigen aus bcC und bcG untersucht werden. Zur Zeit sind Arbeiten von *Bolli* [53] im Gange, die sich mit der Kongformation von Einzelsträngen (bcC-Dimer) und Duplexen (bc(C-G-C-G-A-A-T-T-C-G-C-G)) in Lösung und im Kristall befassen. Eine Röntgenstrukturanalyse des bcC-Dimeren ergab, dass jenes als Duplex kristallisiert, wobei ein bcC eines jeden Einzelstranges protoniert vorliegt und die Stränge parallel zueinander orientiert sind. Es zeigte sich, dass die γ -Winkel rund 145° (bcT-Monomer = 149° , vgl. Kap. 2.5.1) betragen. Erstaunlicherweise ist der β -Winkel jedoch deutlich verkleinert auf rund 70° .

Im Zusammenhang mit Untersuchungen über den Einfluss des Torsionswinkels γ ist das Studium der Paarungseigenschaften von Oligonukleotiden aus den am C(5') epimerisierten bicyclischen Nukleosiden (bc*) von Interesse. Erste Experimente von *Epple* [79] mit einer bc*T₁₀-dC Sequenz ergaben, dass dieses Oligonukleotid keine Komplexbildung mit poly dA, poly A, dA₁₀ und bcA₁₀ eingeht. Eine Modellbetrachtung macht deutlich, dass dieses neue System einen γ -Winkel aufweist, der keiner +sc Kongformation entsprechen kann, sondern im anticlinalen Bereich lokalisiert ist (Abb.59). Ob diese neuen Oligonukleotide grundsätzlich eine Assoziatbildung eingehen können, wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Noch nicht untersucht sind ferner die α -Bicyclonukleoside und deren Oligomeren (Paarungseigenschaften und Resistenz gegenüber dem Abbau von Nukleasen).

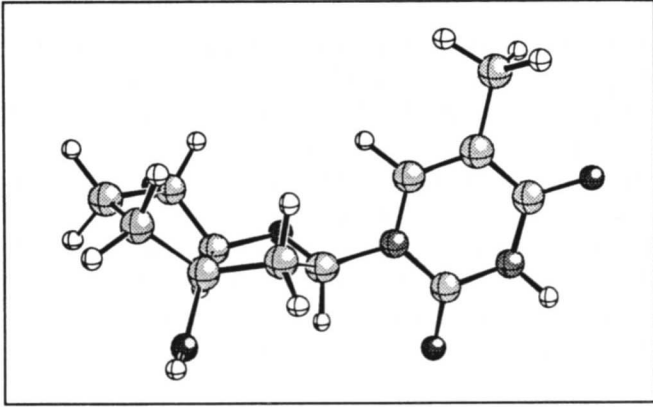


Abb. 59 Ein am C(5') epimerisiertes Bicyclothymidin, welches γ -Winkel im Bereich zwischen circa -90° bis -160° einnehmen kann.

Für die Aufnahme der Massenspektren danke ich den Herren R. Häfliger und O. Greter. Die Infrarotspektren wurden von Herrn R. Dohner und E. Hediger gemessen. Weiter danke ich Frau B. Suter und Herrn D. Manser für die Durchführung der Elementaranalysen. Spezieller Dank gebührt Frau V. Eggli, Herrn M. Sperl, jedoch besonders Frau B. Brandenburg, die sich teilweise mit sehr wenig Material herumschlagen musste und dennoch hervorragende Arbeit leistete.

EXPERIMENTELLER TEIL

4. Allgemeine Angaben zum Experimentellen Teil

4.1 Verwendete Instrumente, Apparaturen und Materialien

AUTOMATISIERTE OLIGONUKLEOTIDSYNTHESE

Pharmacia Gene-Assembler Plus mit Olivetti M 300 Personal Computer; Reagenzien und Lösungen mit Ausnahme des Acetonitrils (Rathburn 'for Gene-Assembler') selber hergestellt respektive abgefüllt.

CD-SPEKTREN

Jasco J-600 Spektropolarimeter mit IBM AT Personal Computer; Küvetten-Schichtdicke 5 oder 10 mm; Temperatur in der Messlösung gemessen; Messparameter: band width 1.0 nm, slid with auto, time constant 2.0 sec, step resolution 0.1 nm, scan speed 20 nm/min; Datenverarbeitung: Rohdaten Basislinie subtrahiert, Spektrum "smoothing".

CHROMATOGRAPHIE

a) Dünnschichtchromatographie (DC): Merck DC-Fertigplatten (Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0.25 mm); Visualisierung/Entwicklung: UV-Lampe, Anisaldehyd-Reagens (10 ml Anisaldehyd, 10 ml konz. Schwefelsäure, 2 ml Essigsäure, 280 ml Ethanol), Iodkammer.

b) Säulenchromatographie: Merck Kieselgel 60 (Korngröße 40-63 µm, 230-400 mesh); alle Chromatographien im Flash-Verfahren, Lösungsmittelqualität: technisch, destilliert.

c) Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC): Pharmacia HPLC Pumpe 2248 mit binärem Niederdruckmischer, Kratos Spectroflow 757, xy-Analogschreiber.

System ① Vorsäule: Nucleogen guard column, 30x4.0 mm, ID (Macherey Nagel); Säule: Nucleogen DEAE 60-7, 125x4.0 mm (Macherey Nagel)

A: 20 mM KH₂PO₄ in H₂O/CH₃CN 4:1, pH 6.0

B: 1M KCl in Puffer A, pH 6.0; Fluss 1 ml/min

System ② Vorsäule: Rp-8 Newguard, 15x3.2 mm, 7 µm (Brownlee Labs);
 Säule: Aquapore Rp-300, 220x4.6 mm, 7 µm (Brownlee Labs)
 A: 0.1M TEAOAc in H₂O, pH 7.0
 B: 0.1M TEAOAc in H₂O/CH₃CN 1:4, pH 7.0; Fluss 1 ml/min

System ③ Nucleogen DEAE 60-7, 125x10.0 mm (Macherey Nagel)
 A: 20 mM KH₂PO₄ in H₂O/CH₃CN 4:1, pH 6.0
 B: 1M KCl in Puffer A, pH 6.0; Fluss 3 ml/min

System ④ Eigenfabrikat Dr. J. Schreiber: Spherisorb-S10X RP-C18, 10µm,
 300Å, 220x12 mm
 A: 0.1M TEAOAc in H₂O, pH 7.0
 B: 0.1M TEAOAc in H₂O/CH₃CN 1:4; Fluss 4 ml/min

DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY

MicroCal-2 (MicroCal Incorporated; 22 Industrial Drive East; Northampton, MA 01060; USA)

Grant LTD 6 (Kühleinheit)

Probenvorbereitung:

Die untersuchten Systeme wurden den Konzentrationen entsprechend in einem Eppendorf Röhrchen gemischt und anschliessend lyophilisiert. Die Probe wurde dann mit der exakten Menge an 0.01M Na₂HPO₄ Pufferlösung (1M NaCl, pH 7) versetzt und in die Probezelle des Instrumentes eingefüllt. Dabei sind zwei Punkte von grosser Wichtigkeit: erstens, dass die Probe in einem "stabilen" Puffersystem gelöst ist (Tris·HCl ungeeignet) und zweitens, dass Probe- und Referenzlösung die gleiche Salzkonzentration aufweisen. Für das Füllen und den Betrieb des Gerätes halte man sich an die Angaben des Herstellers.

Geräteparameter:

scan rate	90° C/h
slope	-1.3
Y-suppression	2.8
shut off	105° C
baseline shift	078
cell volume	1.2186 ml
delta T adj	490
feedback gain	100x
fine	100

Thermodynamische Messungen (0.01M Na₂HPO₄, 1M NaCl, pH 7):

	OD ₂₆₀	Volumen	Konz.	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol*K)
dA ₁₀ :dT ₁₀	16.05/14.40	1.5 ml	0.100 mM	73.3	231
bcA ₁₀ :dT ₁₀	15.75/14.40	1.5 ml	0.100 mM	59.1	178
bcA ₁₀ :bcT ₁₀	15.78/13.33	1.5 ml	0.101 mM	66.8	199

Alle Messungen wurden bei 5° C gestartet und bei 90° C abgebrochen. Dabei lag die durch Equilibrierung des Gerätes bedingte tiefste Anfangstemperatur bei rund 8° C. Die für eine Messung eingegebenen Parameter im Programm *MC-2 Data Acq. [DSC]* sind unten dargestellt.

mehrerer Zyklen	- Enter equilibration time	20
	- Do you want the bath circulating during equilibration?	y
	- Enter starting temperature [5]	5
	- Enter ending temperature [105]	90
	- Enter Filter constant [15]	15
	- Enter scan rate [90]	90
	- Enter File name:	xxxxx.dat

- Enter equilibration period [50]	55	

Das Kühlbad ist nicht mit dem Computer verbunden, da die Software für ein anderes Kühlbad ausgelegt ist. Die Temperatur der Kühlflüssigkeit betrug normalerweise etwa 1.5° C. Am Ende der Messung wurde die Option cooling gewählt. Es empfiehlt sich mehrere Zyklen hintereinander durchzuführen, da die erste Messung für eine Auswertung nicht verwendet werden kann.

Auswertung:

Die Auswertung der einzelnen Experimente erfolgte mit dem Programmpaket Origin™ Version 1.16 (MicroCal Inc.). Dabei folgte man nachfolgendem Schema. Die verschiedenen Scans werden mit **Open DSC Data** geöffnet (ein Fenster) und in einem zweiten Schritt von jeder Kurve die beste Puffer-Puffer Referenzkurve subtrahiert (Durch Öffnen der Referenzkurven in einem neuen Fenster kann durch den Befehl **Averaging multiple scans** eine gemittelte Kurve erhalten werden, die bei mir sehr gut jeweils mit einem aufgenommenen scan übereinstimmte. Die gemittelte Kurve kann nicht weiterverwendet werden, da bei späteren Operationen ein Fehler in der Software auftritt). Durch den Befehl **Concentration Normalization** wird die beobachtete Wärmemengendifferenz mit

der eingesetzten Substanzmenge korreliert ($\text{cal}/^\circ\text{C} \rightarrow \text{cal}/\text{mol}\cdot^\circ\text{C}$). Nun muss die Basislinie konstruiert werden.

1. Open DSC Data
A scan_1.dat
⋮
scan_n.dat
B Puffer Referenz
2. Subtract Ref Trace
A - B (n-mal)
3. Concentration Normalization
n-mal
4. Start Baseline Session
Progress Baseline
OK
(subtract Basline yes) } n-mal
5. Average Multiple Scans
6. Integrate from 0

Mit **Start Baseline session** erhält man für die entsprechende Kurve einen Vorschlag für eine Basislinie, der zumeist direkt übernommen werden kann. Durch die Befehlssequenz **Progress baseline - OK** und **yes (subtract baseline)** erhält man die vollständig bearbeitete Kurven. Erst nach allen diesen Operationen wird mit dem Befehl **Averaging Multiple scans** eine aus den scans 1-n gemittelte Kurve erhalten. Die Integration liefert direkt die Paarungsenthalpie ΔH gemäß der in Kap. 3.5 besprochenen Beziehungen. Aus der gemittelten Kurve lässt sich nun ein Worksheet (x,y Daten) erzeugen, in welchem wir eine neue Kolonne errechnen, die die Werte des Quotienten aus C_p dividiert durch Grad Kelvin annimmt. Auftragung dieser neuen Kolonne (y-Achse) gegen die Temperatur (x-Achse) ergibt eine neue Glockenkurve, deren Integral direkt die Entropie ΔS liefert.

GASCHROMATOGRAPHIE

Gerät: Carlo Erba, Fractovap 4160; FI-Detektion; Mobile Phase: H_2 ; Integrator HP 3380; Injektion von 1% (w/v) Lösungen.

System A: Säule: permethyliertes β -Cyclodextrin in OV1701-Vi (Verhältnis 1:9) [80], 52 m x 0.28 mm

System B: Säule Octakis-(3-O-butyryl-2,6-di-O-pentyl)- γ -Cyclodextrin in OV1701-Vi (Verhältnis 1:2) [81], 46 m x 0.25 mm

Derivatisierung für System B: Eine Lösung von 1 mg des Diols 11 in 500 μ l CH_2Cl_2 und 50 μ l $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$ wurde nach 16 Stunden Stehenlassen bei Raumtemperatur am RV zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 1 ml CH_2Cl_2 gelöst und 1 μ l dieser Lösung wurde injiziert.

IR-SPEKTROSKOPIE

Perkin Elmer Gitterspektrograph 983; Wellenzahlen in cm^{-1} , Intensität als s (stark), m (mittel), w (schwach); die verwendete Aufnahmeart steht in Klammern: KBR, CHCl_3 oder Film

Perkin Elmer 1600 Series FTIR

MASSENSPEKTROSKOPIE

FAB-Spektren: ZAB-2 SEQ; Signale unter 10% (mit Ausnahme wichtiger Fragmente) und Matrixsignale sind weggelassen; Intensitäten in % zum Basispeak in Klammern angegeben; Matrixsubstanzen: 3-NOBA (m-Nitrobenzylalkohol), Glycerin

EI-Spektren: Hitachi RMU-6D; Angaben wie FAB-Spektren.

MISCHKURVEN

Allgemeines Vorgehen: Die UV-Küvette (4mm Strahlenbreite 1cm Strahlengang) wurde mit beispielsweise 500 μ l einer 8.7 μ M dA_{10} Lösung beschickt und dann wurde diese Lösung mit einer 8.2 μ M dT_{10} Lösung in 50 μ l Schritten bis zum 1:1 Gemisch titriert. Den rechten Teil des Diagramm, wo gilt $1 \geq x_{dT_{10}} \geq \frac{1}{2}$, erhielt man durch das umgekehrte Vorgehen. Nach jeder Zugabe wurde die Küvette ein paarmal gekippt und während zehn Minuten equilibriert. Die Temperatur betrug circa 8° (vgl. Kap. 3.4.1).

Sequenz (μM je Strang)	Salzkonzentration	Temperatur	Wellenlänge
dA ₁₀ -dT ₁₀ (8.7 ; 8.2 μM)	0.15M NaCl	8° C	260 nm
bcT ₁₀ -dA ₁₀ (8.9 ; 9.0 μM)	0.15M NaCl	8° C	260 nm
bcA ₁₀ -dT ₁₀ (8.3 ; 8.3 μM)	0.15M NaCl	8° C	260 nm
bcA ₁₀ -poly U (6.9 ; 7.9 μM)	0.15M NaCl	14° C	280 nm
bcA ₁₀ -bcT ₁₀ (7.8 ; 7.7 μM)	0.01M MgCl ₂	8° C	255 nm

Der verwendete Puffer war in allen Fällen 0.01M Tris-HCl (pH 7).

NMR-SPEKTROSKOPIE

Varian XL-300, Bruker WM-300, Bruker AMX-400; Chemische Verschiebungen in ppm, relativ zum internen Standard TMS (¹H- und ¹³C-Spektren), resp. zum externen Standard 85% Phosphorsäure (³¹P-Spektren), bei Spektren in Wasser relativ zum HDO-Signal; Multiplizität abgekürzt als s (Singlett), d (Duplett), t (Triplet), q (Quadruplett), m (Multipllett); Kopplungskonstanten in Hz; ¹³C-Spektren als ¹H-breitbandenkoppelte APT- und DEPT-Spektren.

Bei NOE-Differenz Spektren bedeuten st stark, m mittel und w schwach.

OPTISCHE DREHUNG

Perkin Elmer Polarimeter PE-241; Schichtdicke 1 dm, c in g/100ml; Messung in der nicht-thermostatisierten Zelle bei 589 nm.

POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE [73]

Als Matrix kam ein 20% Polyacrylamidgel (Stammlösung: 29g Acrylamid, 1g N,N'-methylene-bisacrylamide mit H₂O auf 100ml aufgefüllt) zum Einsatz, welches eine Dimension von 140x110x0.8 mm besass. Die normale Beladung einer Spur betrug 10nmol an Base, aufgetragen in 10% Saccharose Lösung ($V_{\text{const}}=125\text{V}$). Zur Visualisierung wurde mit dem kommerziell erhältlichen "stains-all" (Fluka AG) angefärbt. Die Gele wurden im Kühlraum bei Temperaturen von ungefähr 3°C gestartet.

SCHMELZKURVEN

Perkin Elmer Lambda 2 Spectrometer; Perkin Elmer Digital Controller/Temperatur Programmer C570; Probenraum unter Stickstoff; Temperaturmessung in der Probe; Temperaturgradient 1°C/min für Schmelz- wie auch Hybridisierungs-experimente; Messlösungen entgast.

Sequenz (μM)	NaCl Kon- zentration	T_m
bcT ₁₀ (108 μM)	1M	—
bcA ₁₀ (48 μM)	0.15M	—
bcT ₁₀ ·poly dA (45 μM)	0.15M 1M	7° C 35° C
dT ₁₀ ·poly dA (46 μM)	0.15M 1M	27° C 40° C
bcT ₁₀ ·poly A (48 μM)	0.15M 1M	20° C 34° C
dT ₁₀ ·poly A (46 μM)	0.15M 1M	24° C 36° C
bcA ₁₀ ·poly U (26 μM)	0.15M	45° C
dA ₁₀ ·poly U (26 μM)	0.15M	32° C
bcT ₁₀ ·dA ₁₀ (46 μM)	0.15M 1M	10° C 27° C
dA ₁₀ ·dT ₁₀ (41 μM)	0.15M 1M	23° C 33° C
dT ₁₀ ·bcA ₁₀ (41 μM)	0.15M	25° C
(bcT-dT) ₅ ·poly dA (47 μM)	1M	40° C
(bcT-dT) ₅ ·dA ₁₀ (42 μM)	1M	30° C
bcA ₁₀ ·bcT ₁₀ (27 μM)	0.15M 1M	33° C 47° C

Der verwendete Puffer war in allen Fällen 0.01M Tris-HCl (pH 7). In Klammern ist die totale Basenpaarkonzentration angegeben. Die Detektion erfolgte bei 260 nm.

Die Bestimmung thermodynamischer Daten gelang durch die Aufnahme unterschiedlich konzentrierter Schmelzkurven (vgl. Kap.3.5.1). Dabei wurden die T_m Werte durch direkte Ableitung der erhaltenen Schmelzkurven bestimmt (PECSS Software, Perkin Elmer). Die gemessenen Daten sind in folgender Tabelle aufgeführt. Alle Sequenzen wurden in 10mM Na_2HPO_4 Puffer und einer 1M Natriumchloridkonzentration aufgenommen (pH 7). Der mit * bezeichnete Duplex wurde in einem 10mM Tris-HCl Puffer, 0.15M NaCl (pH 7) gemessen.

Duplex	Konzentration (μM)	T_m Werte	ΔH kcal/mol	ΔS cal/mol·K	R^2 der Regression
dA ₁₀ ·dT ₁₀	16.16	32.7°	-69.7	-203	0.993
	12.93	32.2°			
	9.69	31.4°			
	8.08	31.2°			
	6.46	30.3°			
	3.23	28.5°			
bcA ₁₀ ·bcT ₁₀	16.54	52.2°	-66.9	-181	0.991
	13.23	52.0°			
	9.92	50.8°			
	8.27	50.3°			
	3.31	47.4°			
bcA ₁₀ ·dT ₁₀	16.57	46.0°	-51.3	-136	0.997
	13.25	45.1°			
	9.94	43.7°			
	8.28	43.3°			
	6.63	42.5°			
	3.31	39.7°			
dA ₁₀ ·bcT ₁₀ *	20.00	15.4°	-55.9	-169	0.997
	16.00	15.1°			
	8.00	13.0°			
	5.00	11.7°			
	3.00	10.0°			
	2.00	8.9°			

SCHMELZPUNKTE

Bestimmt mit einer Apparatur nach Tottoli (Büchi SMP-20) in offenen Kapillaren; unkorrigiert.

UV-SPEKTROSKOPIE

Kontron Uvikon 860; λ_{max} in nm (ϵ in $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

4.2 Definitionen

BELADUNGSDICHTE [52]

Die Beladungsdichte (BD) gibt an, wieviel Nukleosid (in μmol) pro g Träger auf der Festphase gebunden sind. Sie wird bestimmt durch Versetzen einer genau eingewogenen Menge Trägers mit 0.1 M p-Toluolsulfonsäure in Acetonitril und nachfolgender photometrischer Bestimmung der Tritylkation-Konzentration bei 498 nm in der 10 mm Zelle.

$$\text{Beladungsdichte } [\mu\text{mol/g}] = \frac{\text{Abs} \cdot \text{ml Lsm} \cdot 14.3}{\text{Einwaage [mg]}}$$

EXTINKTIONSKOEFFIZIENTEN

Die Extinktionskoeffizienten einer Sequenz erhält man indirekt durch Bestimmung der Phosphatkonzentration eines Oligonukleotides. Dabei wird zuerst die Absorption einer Lösung der zu bestimmenden Probe im UV gemessen und danach gemäss [82] verascht und die Konzentration des Phosphates als ein Molybdatkomplex bestimmt. Aus der Kenntnis der Phosphat-Konzentration kann die exakte Konzentration des Oligonukleotides errechnet werden. Da gilt $D = \epsilon \cdot c \cdot l$ und weil die Absorption bekannt ist, ergibt sich daraus der Extinktionswert ϵ .

Wir haben jedoch bei unseren Homo-Sequenzen eine andere Variante gewählt. Der vollständige Abbau, kontrolliert durch "reversed phase" C-18 HPLC Chromatographie, der einzelnen Sequenzen mit Schlangengift Phosphodiesterase und alkalischer Phosphatase in 0.01M Tris-HCl Puffer bei pH 7 lieferte uns die entsprechenden Monomeren [55]. Im UV wurde bei 260nm nun die Absorption nach der Verdauung gemessen. Es gilt:

$$D_{\text{mono}} = \epsilon_{\text{mono}} \cdot c \cdot l \quad \text{und nach Umformung} \quad c = \frac{D_{\text{mono}}}{\epsilon_{\text{mono}} \cdot l}$$

Eine Sequenz B_n gehorcht dementsprechend der Gleichung $D_n = \epsilon_n \cdot \frac{1}{n} \cdot c \cdot l$

Einsetzen der Konzentration c liefert nach weiteren Transformationen:

$$\epsilon_n = \frac{n \cdot D_n \cdot \epsilon_{\text{mono}}}{D_{\text{mono}}}$$

5' - d(AAAAAAAAAA)	107000
5' - d(TTTTTTTTTT)	96000
5' -bc(AAAAAAAAAA)	105000
5' -bc(TTTTTTTTTT)	88000

Die Gültigkeit der auf diesem Weg ermittelten Extinktionskoeffizienten für obige Oligonukleotidsequenzen wurde sowohl in Mischkurven wie auch in Gelexperimenten relativ zueinander bestätigt. Die Extinktionswerte der Homopolymeren wurden aus dem Pharmacia Katalog übernommen:

poly dA	8600 (257nm)
poly A	9800 (258nm)
poly U	9350 (260nm)

HYPERCHROMIZITÄT

Die Hyperchromizität (% H) ist definiert als die prozentuale Zunahme der Absorption bei 260 nm (wenn nicht anders angegeben) gemessen an der Anfangsabsorption (üblicherweise bei 0°C).

$$\%H(T) = \frac{\text{abs}(T) - \text{abs}(T_0)}{\text{abs}(T_0)} \cdot 100$$

OPTISCHE DICHTE

Die optische Dichte (OD) einer Oligonukleotid-Lösung ist definiert als deren Absorption bei 260 nm in einer 10 mm Zelle.

SCHMELZTEMPERATUR

Die Schmelztemperatur T_m eines Oligonukleotid-Duplexes wurde durch rechnerische Verfahren ermittelt (Passage Programm), falls die graphische Auswertung nicht möglich war. An den Anfang und das Ende der Schmelzkurve wurden zwei Tangenten gelegt. Beim Schnittpunkt der Mittenhalbierenden dieser Tangenten mit der Schmelzkurve wurde eine senkrechte Linie auf die Temperaturachse gefällt, was zu der entsprechenden Schmelztemperatur T_m führte.

4.3 Lösungsmittel und Reagenzien

Als Lösungsmittel für Extraktionen und Flash-Chromatographien wurden normalerweise Lösungsmittel technischer Qualität destilliert und ohne weitere Reinigung verwendet.

Acetanhydrid	Fluka puriss. p.a.
Aceton	Fluka puriss. p.a.
Acetonitril	Fluka puriss., dest. CaH ₂

Acrylamid	Fluka BioChemika
Aluminiumoxid	Woelm, Aktivität I
Amberlit IR-120 (H ⁺ -Form)	Fluka
Ammoniumchlorid	Siegfried PH.H.V.
Ammoniumperoxidisulfat	Fluka BioChemika
N,O-Bis-trimethylsilylacetamid	Fluka purum
Borsäure	Fluka purum p.a.
Brom	rein
tert. Butylhydroperoxid (~70% in H ₂ O)	Fluka purum
Butyllithium ~1.6M in Hexan	Fluka pract.
Calciumhydrid	Fluka purum p.a.
3-Chlor-perbenzoesäure ~55%	Fluka pract.
sym-Collidin	Fluka puriss. p.a.
Cyclopentanon	Fluka purum, dest.
Dichloressigsäure	Fluka puriss.
Dichlorethan	Fluka puriss.
4,4'-Dimethoxytritylchlorid	Fluka purum
4-Dimethylaminopyridin	Fluka purum
N,N-Dimethylformamid	Fluka puriss. p.a., dest. CaH ₂
Dioxan	
Essigsäure	Fluka puriss. p.a.
Ethyl-diisopropylamin (Hünigbase)	Fluka purum, dest. CaH ₂
Ethylenglykol	Fluka puriss. p.a.
Jod	Fluka puriss. p.a.
2-Jod-benzoesäure	Fluka pract.
Kaliumbromat	Fluka purum
Kaliumchlorid	Merck pro analysi
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck pro analysi
Kaliumpermanganat	PHHV
konz. Ammoniak in Wasser (>25%)	Merck pro analysi
Lithiumaluminiumhydrid	Fluka purum
Long-chain-alkylamin-CPG	Sigma
2,6-Lutidin	Fluka purum
Magnesiumchlorid-hexahydrat	Fluka BioChemika
Molekularsieb 4Å	Chem. Fabrik Uetikon
Methanol	Fluka puriss. p.a.
N,N'-Methylen-bis-acrylamid	BioRad
Natriumborhydrid	Fluka purum p.a.
Natriumchlorid	Fluka puriss. p.a.
Natriumhydrid 55%-65%	Fluka pract.
Natriumhydrogencarbonat	Merck pro analysi
Natriumhydroxid	Siegfried PH.H.VII
Natriumsulfat	Merck pro analysi
Natriumthiosulfat	Siegried PH.H.V.

p-Nitrophenol	Fluka puriss. p.a.
Osmiumtetroxid	
Pentan	Fluka puriss. p.a.
Phosphonoessigsäuretriethylester	Fluka purum
Pyridin	Fluka puriss. p.a., dest. CaH ₂
Salzsäure (konz.)	Fluka puriss. p.a.
Silbertrifluormethansulfonat	Fluka purum
'Stains all'	Fluka BioChemika
Tetrabutylammoniumfluorid-trihydrat	Fluka purum
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	Fluka puriss. p.a.
Tetrazol	Fluka purum, sublimiert
Thymin	Fluka purum
p-Toluolsulfonsäure-monohydrat	Fluka puriss.
1,5,7-Triazabicyclo[4.4.0]dec-5-en	Fluka purum, sublimiert
Triethylamin	Fluka puriss p.a., dest. CaH ₂ , über Alox (Akt. I) filtriert
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Fluka BioChemika
Zinntetrachlorid	Fluka purum

4.4 Abkürzungen

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
abs.	absolutiert
Ac	Acetyl-
bcA	Bicycloadenosin
bcT	Bicyclothymidin
BD	Beladungsdichte
ber.	berechnete Gewichtsanteile (Elementaranalyse)
BSA	N,O-Bis-trimethylsilylacetamid
Bz	Benzoyl-
CD	Circulardichroismus
CPG	Controlled Pore Glass
c	Konzentration [M]
DC	Dünnschichtchromatographie
dest.	destilliert
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMT	4,4'-Dimethoxytrityl-
EI	Elektronenstoss-Ionisation
eq.	(mol-) Äquivalent
FAB	Fast Atom Bombardment
gef.	gefundene Gewichtsanteile (Elementaranalyse)
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie

HV	Hochvakuum (0.001-0.01 Torr)
H	Hyperchromizität [%]
h	Stunden
iPr	iso-Propyl-
konz.	konzentriert
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
NOBA	m-Nitrobenzylalkohol
rac.	racemisch
RT	Raumtemperatur
R V	Rotationsverdampfer
THF	Tetrahydrofuran
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
t _R	Retentionszeit

4.5 Gene-Assembler-Protokolle

Für die automatisierte Synthese der bicyclischen Oligonukleotide am Gene-Assembler wurden die Standard-Methoden von Pharmacia verbessert (optimale Durchmischung von Amidit und Tetrazol, längere Detritylierungszeit, verlängerte Kopplungszeit). Im folgenden ist die modifizierte Methode 13MOD-T5 UND 10MOD-BT (plus entsprechende Unterrouinen) für die Kopplung eines bc-Thymidins (1.3µmol und 10µmol scale) protokolliert, jene für bcA ergibt sich analog.

13MOD-T5:

Line	Time	Function	Value
1	0.00	CALL METHOD	DETRIT
2	0.65	VALVE POS	2.1
3	1.25	VALVE POS	2.3
4	1.45	INTEGRATE	0
5	2.25	ML/MIN	0.00
6	2.25	LOOP TIMES	2
7	2.25	VALVE POS	1.8
8	2.30	ML/MIN	0.90
9	2.40	ML/MIN	0.00
10	2.40	VALVE POS	1.5
11	2.45	ML/MIN	0.70
12	2.55	ML/MIN	0.00
13	2.55	VALVE POS	1.8
14	2.60	ML/MIN	0.90
15	2.70	ML/MIN	0.00
16	2.70	END OF LOOP	

17	2.70	VALVE POS	1.1
18	2.75	ML/MIN	1.00
19	2.85	ML/MIN	0.00
20	2.85	LOOP TIMES	7
21	2.85	STEP VALVE	3
22	2.85	END OF LOOP	
23	2.90	ML/MIN	2.50
24	8.90	ML/MIN	0.00
25	8.90	STEP VALVE	3
26	8.95	ML/MIN	2.50
27	9.25	ML/MIN	1.00
28	9.25	LOOP TIMES	4
29	9.25	VALVE POS	2.5
30	9.35	VALVE POS	2.6
31	9.45	END OF LOOP	
32	9.45	VALVE POS	2.3
33	9.45	ML/MIN	2.50
34	9.75	VALVE POS	2.4
35	10.05	VALVE POS	2.3
36	10.55	ML/MIN	0.00
37	10.55	LOOP TIMES	7
38	10.55	STEP VALVE	3
39	10.55	END OF LOOP	

DETRIT:

Line	Time	Function	Value
1	0.00	VALVE POS	1.1
2	0.00	VALVE POS	2.1
3	0.00	STEP VALVE	3
4	0.00	ML/MIN	2.50
5	1.00	PORT SET	9.1
6	1.00	VALVE POS	2.2
7	1.10	PORT SET	9.0
8	1.10	CLEAR DATA	
9	1.10	MONITOR	1
10	1.10	LEVEL %	4.0
11	1.10	INTEGRATE	1
12	1.10	PS CALL	DETRIT-RET
13	4.00	VALVE POS	2.1
14	6.00	ML/MIN	0.00
15	6.00	VALVE POS	2.7
16	6.00	PS CALL	0
17	6.00	HOLD	
18	6.00	ML/MIN	2.50
19	6.00	VALVE POS	2.2

DETR-RET:

Line	Time	Function	Value
1	0.00	PS CALL	10

END-DETR:

Line	Time	Function	Value
1	0.00	CALL METHOD	DETRIT
2	0.40	VALVE POS	2.1
3	1.40	VALVE POS	2.3
4	1.70	INTEGRATE	0
5	3.30	ML/MIN	0.00
6	3.30	LOOP TIMES	7
7	3.30	STEP VALVE	3
8	3.30	END OF LOOP	

Für einen 10 μ mol Ansatz zur Synthese eines Bicyclothymidins:

10MOD-BT:

Line	Time	Function	Value
1	0.00	CALL METHOD	10DETRIT
2	3.00	VALVE POS	2.3
3	4.00	INTEGRATE	0
4	6.00	ML/MIN	0.00
5	6.00	LOOP TIMES	4
6	6.00	VALVE POS	1.8
7	6.05	ML/MIN	0.75
8	6.15	ML/MIN	0.00
9	6.15	VALVE POS	1.5
10	6.20	ML/MIN	1.00
11	6.30	ML/MIN	0.00
12	6.30	VALVE POS	1.8
13	6.35	ML/MIN	0.75
14	6.45	ML/MIN	0.00
15	6.45	END OF LOOP	
16	6.45	VALVE POS	1.1
17	6.50	ML/MIN	1.00
18	6.60	ML/MIN	0.00
19	6.60	LOOP TIMES	7
20	6.60	STEP VALVE	3
21	6.60	END OF LOOP	
22	6.65	ML/MIN	2.50

23	15.65	ML/MIN	0.00
24	15.65	STEP VALVE	3
25	15.70	ML/MIN	2.50
26	16.20	ML/MIN	1.00
27	16.20	LOOP TIMES	6
28	16.20	VALVE POS	2.5
29	16.30	VALVE POS	2.6
30	16.40	END OF LOOP	
31	16.40	VALVE POS	2.3
32	16.40	ML/MIN	2.50
33	16.90	VALVE POS	2.4
34	17.90	VALVE POS	2.3
35	19.50	ML/MIN	0.00
36	19.50	LOOP TIMES	7
37	19.50	STEP VALVE	3
38	19.50	END OF LOOP	

10DETRIT:

Line	Time	Function	Value
1	0.00	VALVE POS	1.1
2	0.00	VALVE POS	2.1
3	0.00	STEP VALVE	3
4	0.00	ML/MIN	2.50
5	1.50	PORT SET	9.1
6	1.50	VALVE POS	2.2
7	1.60	PORT SET	9.0
8	1.60	CLEAR DATA	
9	1.60	MONITOR	1
10	1.60	LEVEL %	4.0
11	1.60	INTEGRATE	1
12	1.60	PS CALL	DETRIT-RET
13	4.50	VALVE POS	2.1
14	6.50	ML/MIN	0.00
15	6.50	VALVE POS	2.7
16	6.50	PS CALL	0
17	6.50	HOLD	
18	6.50	ML/MIN	2.50
19	6.50	VALVE POS	2.2

DETR-RET:

Line	Time	Function	Value
1	0.00	PS CALL	10

10EDETMO:

Line	Time	Function	Value
1	0.00	CALL METHOD	10DETRIT
2	3.00	VALVE POS	2.3
3	3.20	INTEGRATE	0
4	5.50	ML/MIN	0.00
5	5.50	LOOP TIMES	7
6	5.50	STEP VALVE	3
7	5.50	END OF LOOP	

Pro Kopplung werden in einem 1.3µmol Ansatz 140µl 0.1M Phosphoramidit- und 360µl einer 0.5M Tetrazollösung benötigt. Die Kopplungszeit beträgt 6 min. Es wurde während 60 s detrityliert. (10µmol: 400µl P.amidit, 600µl Tetrazollösung, 200s Detritylierung, 9 min. Kopplung siehe auch Tab.6 S.47).

4.6 Bemerkungen zur Nomenklatur

Bei den Bezeichnungen der Substanzen haben wir uns bis zum bicyclischen Zuckerderivat 14 streng an die von Chemical Abstracts [83] empfohlenen Richtlinien gehalten. Für die bicyclischen Nukleoside (mit Adenin und Thymin), die man richtigerweise als (5',8'-dihydroxy-2'-oxabicyclo[3.3.0]oct-3'-yl)-Nukleoside bezeichnen müsste, haben wir jedoch die "normale" Nukleinsäuren Nomenklatur benutzt, bei der wir den Präfix *ethano* für die in 3',5'-Stellung eingeführte Ethylenbrücke verwenden.

Zur Unterscheidung von natürlicher DNS haben wir bei der Bezeichnung der Oligomeren den Präfix bc (für Bicyclo-) verwendet. Eine Sequenz mit dem Kürzel bcT₁₀ meint also ein decamerer Thymidin, welches aus Monomerbausteinen mit dem modifizierten bicyclischen Zucker aufgebaut ist. Einen Duplex zwischen einem bicyclischen Adenosindecameren und dem natürlichen Thymidindecameren schreiben wir somit als bcA₁₀-dT₁₀.

5. Synthese des Zuckerbausteins

5.1 (1R/S,5R/S)-3,3-dimethyl-2,4-dioxabicyclo[3.3.0]oct-6-on (±)-6 [20,21]



(±)-2
207.07

Es wurden 250 ml (2.81 mol) Cyclopentanon (±)-1 in 1.5 l Ethylenglykol gelöst und unter starkem Rühren wenig Brom zugesetzt. Die Lösung musste dann auf $\sim 30^\circ\text{C}$ erwärmt werden, um sich wieder zu entfärben. Nach Anspringen der Reaktion wurden 145 ml (2.83 mol) Brom so beigegeben, dass sich die Lösung wieder entfärbte. Die Reaktionstemperatur wurde bei

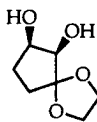
15°C gehalten, daraus resultierte eine Zugabezeit von 2 Stunden. Das nunmehr leicht orange gefärbte Reaktionsgemisch wurde mit 2 l Wasser und dann portionenweise mit 600 g Na_2CO_3 versetzt. Man extrahierte die klare Lösung dreimal mit je 2 l Pentan, trocknete über MgSO_4 , filtrierte und engte am RV zur Trockene ein. Das dabei anfallende Öl verfärbte sich von hellblau zu dunkelblau. Es konnten nach Trocknen am HV 509 g (88%) der bromierten und 1,2-Dioxalan geschützten Verbindung (±)-2 erhalten werden. Sie wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt (DC: Hexan/Ethylacetat 4:1; Rf 0.75).



3
126.16

Das blaue Öl (2.46 mol) (±)-2 wurde in 1.5 l Methanol aufgenommen und unter Eiskühlung und starkem Rühren mit 300 g (7.5 mol) NaOH Plätzchen versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 36 Stunden am Rückfluss gekocht. Die inzwischen braun trübe Lösung wurde in 2 l ges. NaCl Lösung/ H_2O 1:1 Gemisch aufgenommen und dreimal mit je 2 l Hexan extrahiert. Nach Einengen der organischen Phase und Destillation am Wasserstrahl-

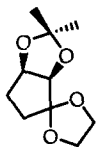
vakuum (~ 30 mm Hg) bei $71^\circ\text{--}73^\circ$ konnten 224 g (72%) der dehydrobromierten Verbindung 3 als farbloses Öl erhalten werden (DC: Hexan/Ethylacetat 4:1; Rf 0.49).



(±)-4
160.17

Unter starkem Rühren wurden bei einer Temperatur von -50°C bis -40°C zu einer Lösung von 224 g (1.78 mol) Olefin 3 in 1 l Aceton 285 g (1.80 mol) KMnO_4 gelöst in 3 l Aceton/Wasser 7:3 während 2 Stunden zugegeben. Es wurde noch 3 Stunden bei Raumtemperatur nachgerührt. Man filtrierte über Celite vom MnO_2 ab und engte das Filtrat zur Trockene ein. Der Braunstein wurde noch zweimal mit je 1 l Aceton/Wasser 7:3 während 2 Stunden stehengelassen. Man konnte so 174 g (61%) der hydroxylierten Verbindung (±)-4 als leicht gelbliches Öl

isolieren (DC: Hexan /Ethylacetat 1:5; Rf 0.23).



(±)-5
200.24

Eine Lösung von 174 g (1.09 mol) des Diols (±)-4 in 1.5 l Aceton wurde mit 12 ml konz. Schwefelsäure versetzt. Nach 4 Stunden bei RT wurde das Reaktionsgemisch mit Triethylamin neutralisiert, filtriert und am RV eingedampft. Der Rückstand wurde in 1 l CH_2Cl_2 aufgenommen und mit 1 l ges. NaHCO_3 Lösung gewaschen. Die Wasserphase wurde noch einmal mit 700 ml CH_2Cl_2 rückextrahiert. Nach Trocknen über MgSO_4 , Eindampfen am RV und Destillation am HV bei $58^\circ\text{-}62^\circ\text{C}$ wurden 111 g (51%) der geschützten Verbindung (±)-5 als

farblose Flüssigkeit erhalten (DC: Hexan/ Ethylacetat 1:3; R_f 0.64).



(±)-6
156.18

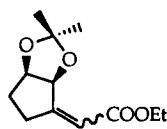
Es wurde eine Lösung von 29.7 g (0.15 mol) des Acetals (±)-5 in 1.4 l Aceton mit 7 ml konz. Schwefelsäure versetzt und während 21 Stunden bei RT gerührt. Nach dieser Zeit war kein weiterer Umsatz zu beobachten und das orange gefärbte Reaktionsgemisch wurde mit Triethylamin auf pH 7 eingestellt und am RV eingengt (es hat sich in späteren Ansätzen gezeigt, dass eine Neutralisation mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ viel besser geeignet ist, da kein Zurückfallen in den sauren Bereich während des

Eindampfens möglich ist). Der Rückstand wurde in 100 ml Methylchlorid aufgenommen und nochmals zur Trockene eingedampft. Das hellgelbe Öl wurde im HV fraktionierend destilliert. Die Fraktionen vom Siedepunkt $60^\circ\text{-}72^\circ\text{C}$ wurden vereinigt. Man erhielt 22.9 g eines beinahe farblosen Öls, welches in 100 ml Hexan aufgenommen und dann bei -20°C stehengelassen wurde, dabei kristallisierten 10.5 g (45%) des Ketons mit einem Schmelzpunkt von 35°C aus. Ein nochmaliges Umsetzen der Mutterlauge mit konz. Schwefelsäure ergab noch zusätzlich 2.7 g (12%) des geschützten Ketons (±)-6.

5.2 E&Z-(1'R/S,5'S/R)-(3',3'-dimethyl-2',4'-dioxabicyclo[3.3.0]oct-6'-yliden) essigsäureethylester (\pm)-7



(\pm)-6
156.18



(\pm)-7
226.27

Zu einer Suspension von 5.1 g (0.21 mol) Natriumhydrid in 200 ml Tetrahydrofuran wurden bei 0° C unter Argonatmosphäre 47.5 g (0.21 mol; 1eq.) Phosphonoessigsäuretriethylester innert 40 Minuten dazugetropft. Danach wurde die braungraue Lösung mit 33 g (0.21 mol) Keton (\pm)-6 in 150 ml Tetrahydrofuran versetzt. Man entfernte das Kühlbad und rührte noch 2 Stunden weiter. Es waren noch weitere Natriumhydrid Zugaben nötig (je 0.5 g (0.02 mol) nach 2 und 2.5 Stunden seit Ketonzugabe). Dem galertartigen Reaktionsgemisch wurden 20 ml 1M KH₂PO₄ zugegeben und am RV vollständig eingedampft. Man nahm in 400 ml 1M KH₂PO₄ und extrahierte 2 mal mit je 500 ml Diethylether. Die organische Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und vollständig eingengt. Destillation am HV (0.05 Torr) bei 76°-80° ergab 42.0 g (0.19 mol; 88%) des (E/Z)- α,β -unge-sättigten Essigsäureethylesters. Aus dem ¹H-NMR wurde ein Isomerenverhältnis von 1:1 abgeschätzt.

E-Isomer:

DC(Hexan/Diethylether 3:1): R_f 0.43

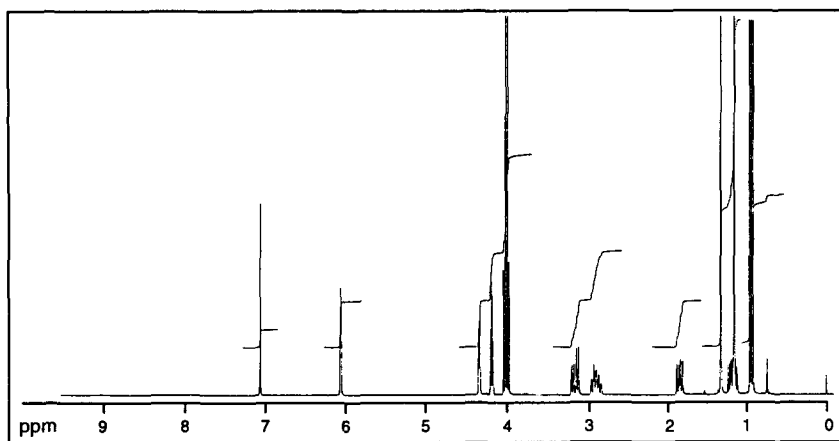
¹H-NMR(300 MHz, C₆D₆): 0.97 [t, J=7.1, 3H, H₃C-H₂C]; 1.19, 1.36 [2s, 6H, (H₃C)₂C]; 1.15-1.27, 1.85-1.93, 2.89-3.02 [3m, 3H, H-C(8'), H-C(7'')]; 3.22 [ddt, J=1.9, J=8.3, J=18.3, 1H, H-C(8'), H-C(7'')]; 4.00 [q, J=7.1, 2H, OCH₂]; 4.19 [t, J=5.0, 1H, H-C(1')]; 4.35 [d, J=5.3, 1H, H-C(5')]; 6.14 [s br., 1H, H-C(2)]

Differenz-NOE (300 MHz, C₆D₆):

6.14 [H-C(2)] → 4.35 [st, H-C(5')]

¹³C-NMR(75 MHz, C₆D₆): 14.31 [q, H₃C-CH₂]; 25.15, 27.22 [2q, (H₃C)₂C]; 28.26, 29.46 [2t, C(8'), C(7'')]; 59.82 [t, OCH₂]; 79.54, 83.32 [2d, C(5'), C(1')]; 111.23 [s, C(3')]; 117.64 [d, C(2)]; 163.76, 166.23 [2s, C(1), C(6')]

MS(EI+): 227(1.4, M⁺+1), 212(12), 211(60), 181(17), 161(49), 141(10), 123(31), 122(14), 112(15), 95(22), 77(12), 67(17), 66(12), 65(10), 59(15), 55(16), 43(100), 41(20), 39(19), 29(28), 27(17), 18(17)



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, C_6D_6) des E- α,β -ungesättigten Esters (\pm)-7

Z-Isomer:

DC(Hexan/Diethylether 3:1): R_f 0.34

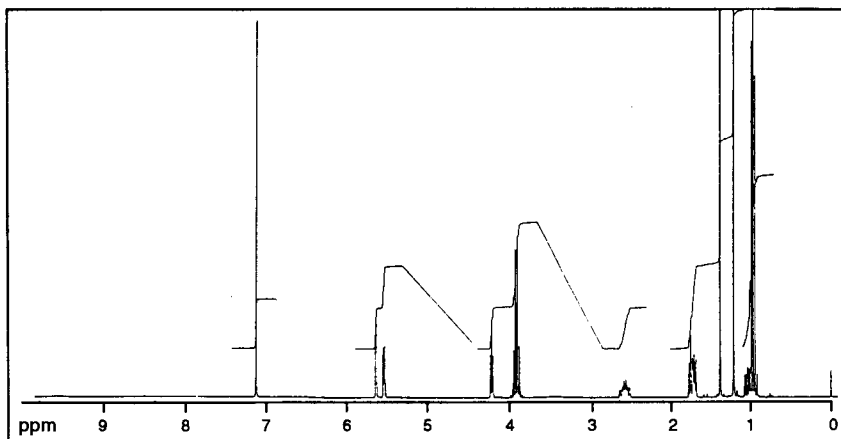
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, C_6D_6): 0.99 [t, $J=7.1$, 3H, $\text{H}_3\text{C-CH}_2$]; 1.23, 1.41 [2s, 6H, $(\text{H}_3\text{C})_2\text{C}$]; 0.94-1.10, 1.71-1.81, 2.58-2.65 [3m, 4H, $\text{H}_2\text{C}(8')$, $\text{H}_2\text{C}(7')$]; 3.97-4.06 [dq, $J=1.3$, $J=7.1$, 2H, OCH_2]; 4.33 [t, $J=5.2$, 1H, $\text{H-C}(1')$]; 5.70 [d, $J=5.5$, 1H, $\text{H-C}(5')$]; 5.81 [t, $J=1.3$, 1H, $\text{H-C}(2)$]

Differenz-NOE (300MHz, C_6D_6):

5.82 [H-C(2)] \rightarrow 1.71-1.82 [st, H-C(7')]

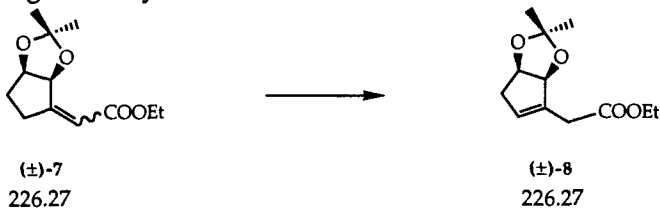
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, C_6D_6): 14.28 [q, $\text{H}_3\text{C-CH}_2$]; 25.54, 26.84 [2q, $(\text{H}_3\text{C})_2\text{C}$]; 29.16, 31.21 [2t, $\text{C}(8')$, $\text{C}(7')$]; 59.83 [t, OCH_2]; 77.89, 80.41 [2d, $\text{C}(1')$, $\text{C}(5')$]; 110.45 [s, $\text{C}(3')$]; 116.79 [d, $\text{C}(2)$]; 161.51, 165.22 [2s, $\text{C}(1)$, $\text{C}(6')$]

MS(EI+): 227(5.2, M^++1), 212(17), 211(75), 181(23), 169(59), 168(22), 151(53), 141(28), 124(17), 123(100), 122(53), 112(34), 107(17), 95(29), 94(18), 83(15), 81(16), 77(19), 67(26), 66(21), 65(16), 59(19), 55(26), 53(15), 43(84), 41(31), 39(32), 29(40), 27(28)



$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, C_6D_6) des $\text{Z-}\alpha,\beta$ -ungesättigten Esters (\pm)-7

5.3 (1'R/S,5'S/R)-(3',3'-Dimethyl-2',4'-dioxabicyclo[3.3.0]oct-6'-enyl) essigsäureethylester (±)-8



Eine Lösung von 42.0 g (0.186 mol) des (E/Z)- α,β -ungesättigten Esters (±)-7 in 250 ml Dichlormethan wurde mit 2.6 g (18.6 mmol; 10 mol%) 1,5,7-Triazabicyclo[4.4.0]dec-5-en versetzt und 24 Stunden bei RT stehengelassen. Die leicht gelbe Reaktionslösung wurde mit 250 ml einer 0.5M NaH₂PO₄ gewaschen, und die wässrige Phase noch einmal mit 250 ml Dichlormethan rückextrahiert. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, filtriert und am RV eingeeengt. Destillation des Rückstandes am HV (0.05 Torr) bei 76°-79° C lieferte 40.9 g (97%) des β,γ ungesättigten Esters (±)-8.

Sdp.: 76°-79° C (0.05 Torr)

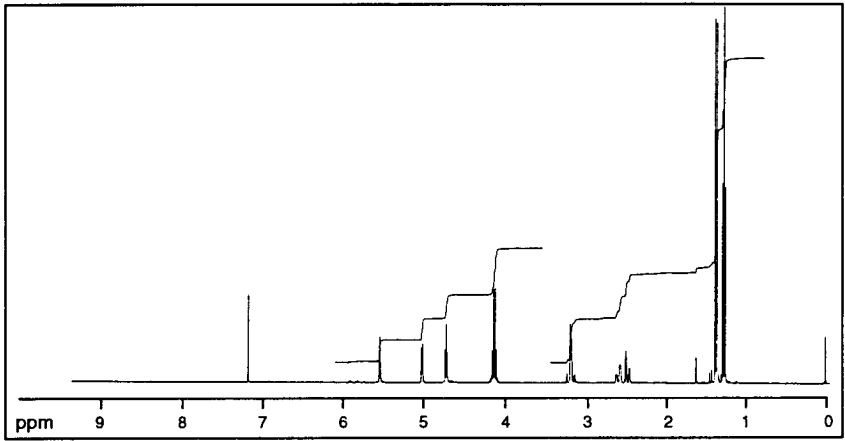
DC(Hexan/Ethylacetat 3:1): R_f 0.64

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.27 [t, J=7.5, 3H, H₃C-CH₂]; 1.36, 1.38 [2s, 6H, 2CH₃]; 2.48 [dd, J=1.0, J=17.8, 1H, H-C(8')]; 2.59 [dd, J=5.4, J=17.8, 1H, H-C(8')]; 3.17 [d, J=16.3, 1H, H-C(2)]; 3.22 [d, J=16.3, 1H, H-C(2)]; 4.15 [q, J=7.15, 2H, OCH₂]; 4.75 [t, J=5.5, 1H, H-C(1')]; 5.07 [d, J=5.7, 1H, H-C(5')]; 5.61 [s br., 1H, H-C(7')]

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 14.12 [q, H₃C-CH₂]; 26.1, 27.5 [2q, 2CH₃]; 33.9 [t, C(8')]; 37.8 [t, C(2)]; 60.7 [t, OCH₂]; 78.3 [d, C(1')]; 85.9 [d, C(5')]; 110.2 [s, C(3')]; 128.5 [d, C(7')]; 136.6 [s, C(6')]; 171.0 [s, C(1)]

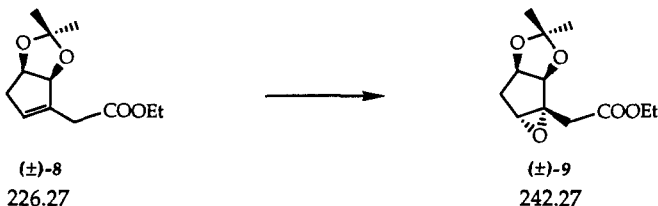
IR(CHCl₃): 2988m, 2936m, 1730s, 1456w, 1372m, 1330w, 1312w, 1295w, 1280w

MS(EI⁺): 211(74, M⁺-15), 181(15), 169(72), 168(10), 151(15), 123(51), 122(13), 109(13), 95(51), 94(20), 79(35), 78(32), 77(11), 67(30), 66(14), 65(13), 43(100), 41(35), 39(33), 29(76), 28(29), 27(35)



$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) des β,γ -ungesättigten Esters (\pm)-8

5.4 (1'R/S,5'R/S,6'R und S,7'R und S)-(6',7'-epoxy-3',3'-dimethyl-2',4'-dioxabicyclo[3.3.0]oct-6'-yl) essigsäureethylester (±)-9



Zu einer Lösung von 9.22 g (40.74 mmol) des β,γ -ungesättigten Esters (\pm)-8 in 50 ml CH_2Cl_2 wurden bei 0°C 25.1 g (80.0 mmol) 55% 3-Chlorperbenzoesäure, gelöst in 150 ml CH_2Cl_2 (Wasser in Scheidetrichter abgetrennt), innerhalb von 15 Minuten zugegeben. Nach 15 Minuten wurde das Eisbad entfernt und das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur während 25 Stunden weitergerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 ml 1M wässriger NaHCO_3 Lösung gestoppt, die organische Phase abgetrennt und dreimal mit je 100 ml 20% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden noch zweimal mit je 100 ml CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde an 500 g Silikagel chromatographiert (\varnothing 5 cm; Hexan/Ethylacetat 4:1). Nach Entfernung des Lösungsmittels und Destillation des leicht gelblichen Öls am HV bei 73°C konnten 6.98 g (71%) des exo-Epoxides (\pm)-9 als farbloses Öl isoliert werden (es entstehen rund 4% endo-Epoxid).

exo β,γ -epoxy Ethylester:

Sdp.: 73°C (0.01 Torr)

DC(Hexan/Ethylacetat 3:1): R_f 0.40

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, C_6D_6): 0.92 [t, $J=7.1$, 3H, $\text{H}_3\text{C-CH}_2$]; 1.12, 1.37 [2s, 6H, 2CH_3]; 1.75 [dt, $J_t=2.1$, $J_d=15.2$, 1H, H-C(8')]; 1.95 [dd, $J=6.4$, $J=15.2$, 1H, H-C(8')]; 2.56 [d, $J=16.4$, 1H, H-C(2)]; 3.09 [d, $J=16.3$, 1H, H-C(2)]; 3.20 [dd, $J=1.0$, $J=2.2$, 1H, H-C(7')]; 3.93 [q, $J=7.1$, 2H, OCH_2]; 4.28 [m (triplettoid), 1H, H-C(1')]; 4.74 [d, $J=5.6$, 1H, H-C(5')]

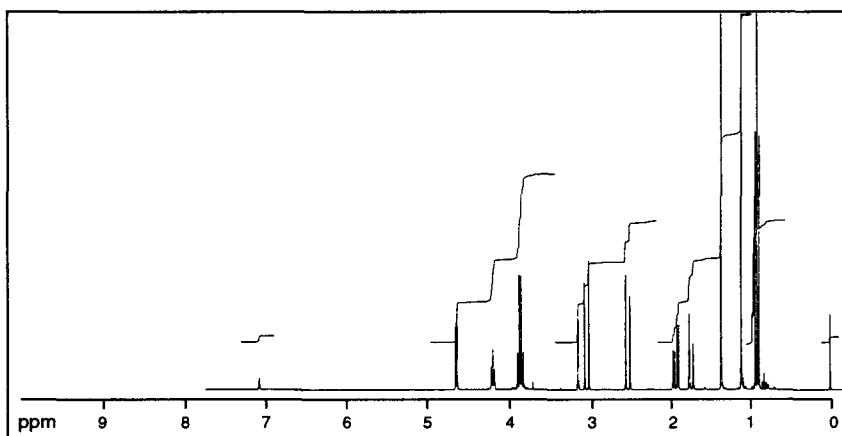
Differenz-NOE (300MHz, C_6D_6):

3.20 [H-C(7')] → 2.57 [st, H-C(2)]
 → 1.96 [w, H-C(8')]
 → 1.76 [st, H-C(8')]

^{13}C -NMR (75 MHz, C_6D_6): 14.15 [q, $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2$]; 24.64, 27.19 [2q, 2CH_3]; 34.35, 35.64 [2t, C(2), C(8')]; 60.50 [t, OCH_2]; 63.71 [d, C(7')]; 65.35 [s, C(6')]; 81.38, 81.51 [2d, C(1'), C(5')]; 111.62 [s, C(3')]; 169.43 [s, C(1)]

IR(CHCl_3): 2986 m , 2938 m , 1740 s , 1373 m , 1260 m , 1210 m , 1160 m , 1076 m , 1051 m , 982 w , 867 w

MS(EI $^+$): 243(57, $\text{M}^+ + 1$), 228(32), 227(100), 197(52), 185(31), 167(66), 139(80), 138(14), 111(33), 110(21), 97(59), 95(17), 94(14), 85(15), 83(17), 81(14), 69(17), 68(16), 67(10), 59(19), 55(27), 43(84), 41(24), 39(21), 29(44), 27(18)



^1H -NMR (300MHz, C_6D_6) des exo- β,γ -epoxy Esters (\pm)-9

endo- β,γ -epoxy Ethylester:

DC(Hexan/Ethylacetat 3:1): Rf 0.18

^1H -NMR (300 MHz, C_6D_6): 0.89 [t, $J=7.1$, 3H, $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2$]; 1.20, 1.66 [2s, 6H, 2CH_3]; 1.45 [ddd, $J=1.7$, $J=6.9$, $J=15.6$, 1H, H-C(8')]; 2.10 [d, $J=15.6$, 1H, H-C(8')]; 2.43 [d, $J=16.1$, 1H, H-C(2)]; 2.93 [d, $J=16.1$, 1H, H-C(2)]; 3.22 [t, $J=1.4$, 1H, H-C(7')]; 3.87 [q, $J=7.1$, 2H, OCH_2]; 4.26 [t, $J=7.0$, 1H, H-C(1')]; 4.52 [d, $J=6.8$, 1H, H-C(5')]

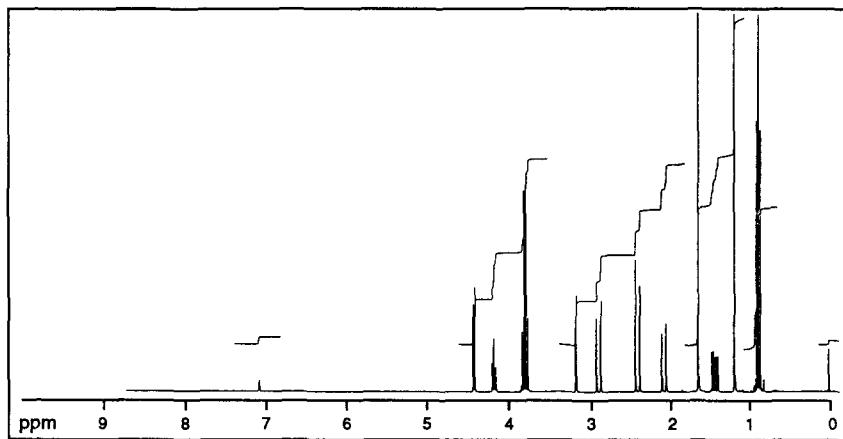
Differenz-NOE (300MHz, C_6D_6):

3.24 [H-C(7')] \rightarrow 4.51 [w, H-C(5')]
 \rightarrow 2.50 [st, H-C(2)]
 \rightarrow 2.11 [st, H-C(8')]

^{13}C -NMR (75 MHz, C_6D_6): 14.08 [q, $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2$]; 25.74, 27.00 [2q, 2CH_3]; 32.60, 35.87 [2t, C(2),C(8')]; 60.53 [t, OCH_2]; 64.13 [d, C(7')]; 64.80 [s, C(6')]; 79.95, 81.58 [2d, C(1'), C(5')]; 112.81 [s, C(3')]; 169.69 [s, C(1)]

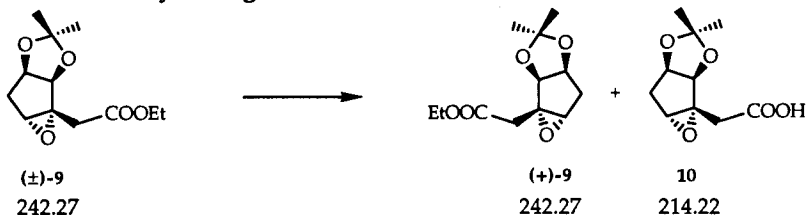
IR(neat): 2982*m*, 2936*m*, 1736*s*, 1443*w*, 1372*s*, 1336*m*, 1322*m*, 1253*s*, 1211*s*, 1159*s*, 1101*s*, 1071*s*, 1055*s*, 991*w*, 972*w*, 926*w*, 872*m*, 800*w*, 676*w*

MS(EI⁺): 243(66, M^++1), 228(39), 227(100), 197(14), 185(34), 168(15), 167(86), 139(66), 111(28), 110(13), 97(66), 95(20), 94(17), 73(16), 69(19), 59(17), 55(29), 43(86), 41(31), 39(30), 29(64), 27(26)



^1H -NMR (300MHz, C_6D_6) des-endo- α,β -epoxy Esters (\pm)-9

5.5 (1'R,5'R,6'R,7'R)-(6',7'-epoxy-3',3'-dimethyl-2',4'-dioxabicyclo [3.3.0]oct-6'-yl) essigsäure 10



Zu einer stark gerührten Emulsion von 10.1 g (41.3 mmol) des rac. Epoxids (±)-9 in 500 ml 0.1M Phosphat Puffer (pH 7.85) und 1.1 ml (11 mg Protein) PLE (Schweineleber Esterase) wurde 1M NaOH so zugegeben, dass der pH konstant bei 7.75 lag (Dosimat). Nach Zugabe von 20 ml 1M NaOH (20 mmol; 49% Umsatz) wurde die nun beinahe klare Reaktionslösung mit 2N NaOH auf pH 9.0 eingestellt und der nicht hydrolysierte Ester (+)-9 viermal mit je 250 ml Diethylether extrahiert (4.2 g (42%); GLC (System A: 120° C 0.3° C/min. 1.6 bar H₂, t_R=41.96, 96% ee, [α]_D²⁵ = +28.4° (c=1.09 Methanol); Spuren von (-)-9 im GLC unter gleichen Bedingungen t_R=41.57). Die wässrige Phase wurde dann mit 1M HCl auf pH 2.0 gebracht, mit NaCl (fest) gesättigt und 6 mal mit je 250 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten CH₂Cl₂ Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert, im Vakuum eingedampft und am Hochvakuum getrocknet. 4.7 g (53%) der β,γ-Epoxysäure 10 wurden als farbloses Öl erhalten, welches im Tiefkühler erstarre. Für die Analytik wurde eine Probe aus Diethylether/Pentan (isotherme Destillation) kristallisiert, dabei zeigte sich, dass das Racemat auskristallisiert (GLC nach Reduktion zum Diol (-)-11).

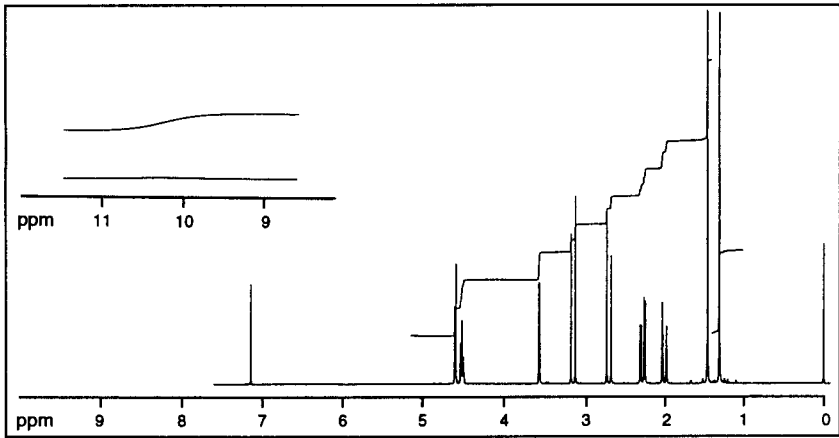
Smp.: 121°-123°

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.32, 1.47 [2s, 6H, 2CH₃]; 2.01 [dt, J_t=2.0, J_d=15.5, 1H, H-C(8')]; 2.28 [dd, J=6.2, J=15.6, 1H, H-C(8')]; 2.71, 3.17 [2d, J=16.7, 2H, H-C(2)]; 3.60 [t, J=1.1, 1H, H-C(7')]; 4.55-4.60 [m (triplettoid), 1H, H-C(1')]; 4.63 [d, J=5.5, 1H, H-C(5')]

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): 24.67, 26.93 [2q, 2CH₃]; 33.99, 35.22 [2t, C(2), C(8')]; 64.22 [d, C(7')]; 65.10 [s, C(6')]; 80.77, 81.35 [2d, C(1'), C(5')]; 111.95 [s, C(3')]; 175.58 [s, C(1)]

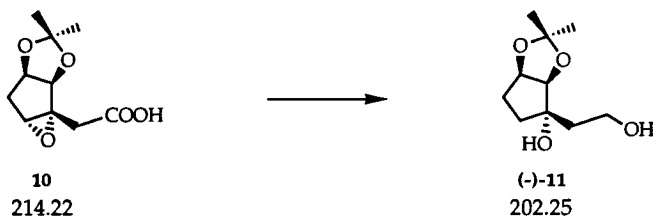
IR(CHCl₃): 3600-2400m br., 1711s, 1436m, 1385m, 1376m, 1344m, 1328m, 1277s, 1231s, 1213s, 1163m, 1086m, 1066s, 1048s, 982m, 962w, 934m, 892w, 852m, 798w, 753w, 722w, 672w, 651w

MS(EI⁺): 215(0.2, M⁺+ 1), 200(10), 199(100), 157(3), 155(4), 140(3), 139(34), 121(4), 111(8), 110(4), 97(32), 95(4), 87(3), 85(5), 83(4), 81(5), 69(6), 68(4), 67(3), 59(7), 55(5), 43(30), 39(5), 28(3)



$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, CDCl_3) der β,γ -epoxy Säure **10**

5.6 (1'R,5'R,6'S)-2-(6'-Hydroxy-3',3'-dimethyl-2',4'-dioxabicyclo [3.3.0]oct-6'-yl) ethan-1-ol (-)-11



Einer Suspension von 4.2 g (110.7 mmol) LiAlH_4 in 60 ml Diethylether wurden unter Stickstoffatmosphäre bei -30°C während 20 Minuten 4.7 g (21.9 mmol) der Epoxysäure **10**, gelöst in 80 ml Diethylether und 20 ml CH_2Cl_2 , zugegeben. Nach vollständiger Zugabe wurde das Kühlbad entfernt und 6 Stunden auf Rückflusstemperatur erhitzt. Bei Raumtemperatur wurden dann 20 ml Wasser und 10 ml 2M NaOH Lösung zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite filtriert, der weisse Aluminatrückstand noch mit 400 ml CH_2Cl_2 gewaschen und die vereinigten Filtrate am Rotationsverdampfer eingedampft. Der Rückstand wurde an 200 g Silikagel chromatographiert (\varnothing 4cm; Hexan/Ethylacetat 1:2, 1:3, 1:5). Nach Entfernung des Lösungsmittels und Trocknen am Hochvakuum erhielt man 3.7 g (84%) des Diols (-)-**11** als erstarrendes Öl (GLC 72% ee). Durch selektive Kristallisation des Racemates aus Hexan (80 ml/1 g Produkt) liessen sich 2.7 g (61%) des Diols in der Mutterlauge in praktisch enantiomerenreiner Form nach Entfernung des Lösungsmittels als farbloses Öl anreichern (GLC 97% ee).

GLC: System A: Fluss 1.5 bar H_2 ; 130°C , $0.3^\circ\text{C}/\text{min.}$; $t_{\text{R}}=40.57$ min.
System B: Fluss 1 bar H_2 ; 80°C , $1^\circ\text{C}/\text{min.}$; $t_{\text{R}}=30.57$ min.

DC(Hexan/Ethylacetat 1:2): R_f 0.27

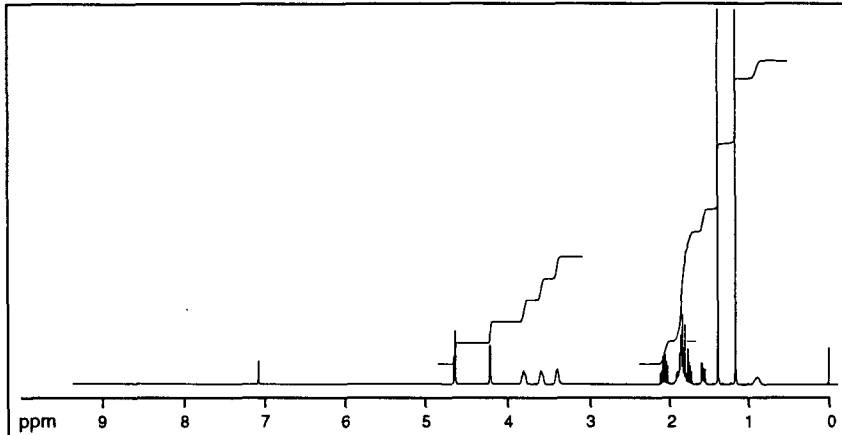
$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -47.0$ ($c=1.0$, Methanol)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, C_6D_6): 1.17, 1.39 [2s, 6H, 2 CH_3]; 1.54-1.59, 1.71-1.90, 2.01-2.10 [3m, 7H, OH, $\text{H}_2\text{C}(2)$, $\text{H}_2\text{C}(7')$, $\text{H}_2\text{C}(8')$]; 3.39 [s br., 1H, OH]; 3.59, 3.81 [2s (multiplettoid), 2H, $\text{H}_2\text{C}(1)$]; 4.24 [dd, $J=1.4$, $J=5.5$, 1H, H-C(5')]; 4.68 [t, $J=5.3$, 1H, H-C(1')]

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, C_6D_6): 24.00, 26.58 [2q, 2 CH_3]; 30.16 [t, C(8')]; 35.31, 36.79 [2t, C(2), C(7')]; 61.10 [t, C(1)]; 81.31 [d, C(1')]; 83.27 [s, C(6')]; 86.42 [d, C(5')]; 109.88 [s, C(3')]

IR(CHCl_3): 3606w, 3600-3200m br., 2993s, 2938s, 1434m, 1383s, 1374s, 1301w, 1272m, 1164m, 1064s, 1040s, 1021s, 994w, 965w, 912w, 871m, 848w

MS(EI⁺): 203(14, M⁺), 187(50), 185(16), 144(35), 127(52), 126(64), 109(70), 108(28), 102(10), 101(41), 99(32), 98(18), 97(22), 96(15), 95(15), 88(77), 85(13), 83(37), 82(16), 81(100), 79(36), 73(39), 71(39), 70(70)



¹H-NMR (400 MHz, C₆D₆) des Diols (-)-11

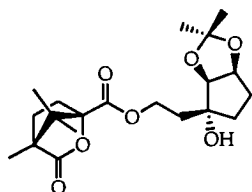
(1'S,5'S,6'R)-2-(6'-hydroxy-3',3'-dimethyl-2',4'-dioxabicyclo[3.3.0]oct-6'-yl) ethan-1-ol (+)-11

Zu einer Suspension von 3.3 g (86.96 mmol) LiAlH₄ in 100 ml Diethylether wurden bei 0° C 100 ml einer Lösung von 4.2 g (17.34 mmol) β,γ-epoxy Esters (+)-9 in Ether vorsichtig zugespritzt. Das Eisbad wurde entfernt und das Reaktionsgemisch am Rückfluss gekocht (90 min.). Bei RT wurden unter starkem Rühren 3.3 g H₂O, 3.3 g 15% NaOH und 9.9 g H₂O (1-1-3 Regel, Fieser) zugegeben. Man filtrierte vom körnigen Aluminat, dampfte das Filtrat ein und chromatographierte das farblose Öl an 120 g Silikagel (Ø 3cm; Hexan/Ethylacetat 1:3). Drei Mischfraktionen wurden noch ein zweitesmal auf dieselbe Weise gereinigt. Man konnte 3.1 g (88%) des Diols (+11) erhalten. Selektive Kristallisation des Racemates aus Hexan (80 ml/g Produkt) führte zur Anreicherung des Diols (+)11 in der Mutterlauge. Man isolierte 2.8 g (80%) als farbloses am HV getrocknetes Öl (GLC 97% ee). Ausser dem ee-Wert und der optischen Drehung stimmen die analytischen Daten mit (-)11 überein.

GLC: System A: Fluss 1.25 bar; 140°C; 0.2°C/min.; t_R=37.23 min.
System B: Fluss 1 bar H₂; 80°C, 1°/min.; t_R=31.63 min.

[α]_D²⁵ = +44.3° (c=0.56, Methanol)

5.7 (S)-Camphansäure-2-((1'S,5'S,6'R)-6'-hydroxy-3',3'-dimethyl-2',4'-dioxabicyclo[3.3.0]oct-6'-yl) ethylester 12



12
382.45

Es wurden 36.5 mg (0.180 mmol) Diol (+)-11 (erhalten durch Reduktion des nicht umgesetzten Esters) in einem Gemisch von 1 ml CH_2Cl_2 und 0.5 ml Pyridin gelöst und bei 0°C mit einer Lösung von 59 mg (0.272 mmol; 1.5eq.) (-)-Camphansäurechlorid in 1 ml CH_2Cl_2 versetzt. Nach 5 Minuten Rühren bei RT wurde das Eisbad entfernt und die klare Lösung weitergerührt. Nach 90 Minuten wurden dem Reaktionsgemisch 5 ml einer 1M NaHCO_3 Lösung hinzugegeben, die organische Phase abge-

trennt und die wässrige Phase noch zweimal mit je 5 ml CH_2Cl_2 extrahiert wurde. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 5 ml Tetrachlorkohlenstoff versetzt und am RV bis zur Trockene eingedampft (2x). Chromatographie des Rückstandes an 5 g Silikagel (\varnothing 1 cm; Hexan/Ethylacetat 1:2) lieferte 70 mg eines farblosen Öls, welches beim Trocknen am HV durchkristallisierte. Nach zweimaliger Umkristallisation aus Diethylether/Hexan (isotherm) konnten 53 mg (77%) des Camphansäureesters 12 als farblose Kristalle erhalten werden, welche einer Röntgenstrukturanalyse unterzogen wurden.

Smp.: 97°C

DC(Hexan/Ethylacetat 1:2): R_f 0.59

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, C_6D_6): 0.69 [s, 3H, $\text{H}_3\text{C-C}(4'')$]; 0.82, 0.83 [2s, 6H, $\text{H}_3\text{C-C}(7'')$]; 1.15, 1.37 [2s, 6H, $\text{H}_3\text{C-C}(3'')$]; 1.20-1.25, 1.34-1.40, 1.68-1.79, 1.82-1.95, 2.00-2.15 [5m, 10H, $\text{H}_2\text{C}(5'')$, $\text{H}_2\text{C}(6'')$, $\text{H}_2\text{C}(2)$, $\text{H}_2\text{C}(7'')$, $\text{H}_2\text{C}(8'')$]; 1.47 [s, 1H, OH]; 4.03 [dd, $J=1.6$, $J=3.9$, 1H, H-C(5'')]; 4.37-4.53 [m, 2H, $\text{H}_2\text{C}(1)$]; 4.56-4.59 [m (triplettoid), 1H, H-C(1'')]

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, C_6D_6): 9.78 [q, $\text{H}_3\text{C-C}(4'')$]; 16.51, 16.80 [2q, $\text{H}_3\text{C-C}(7'')$]; 23.99, 26.54 [2q, $\text{H}_3\text{C-C}(3'')$]; 28.81, 30.11, 30.91, 35.03, 35.45 [5t, C(5''), C(6''), C(2), C(7''), C(8'')]; 54.00, 54.71 [2s, C(4''), C(7'')]; 62.97 [t, C(1)]; 81.19, 86.40 [2d, C(1'), C(5'')]; 81.28 [s, C(6'')]; 90.87 [s, C(1'')]; 109.96 [s, C(3'')]; 167.84, 177.30 [2s, CO]

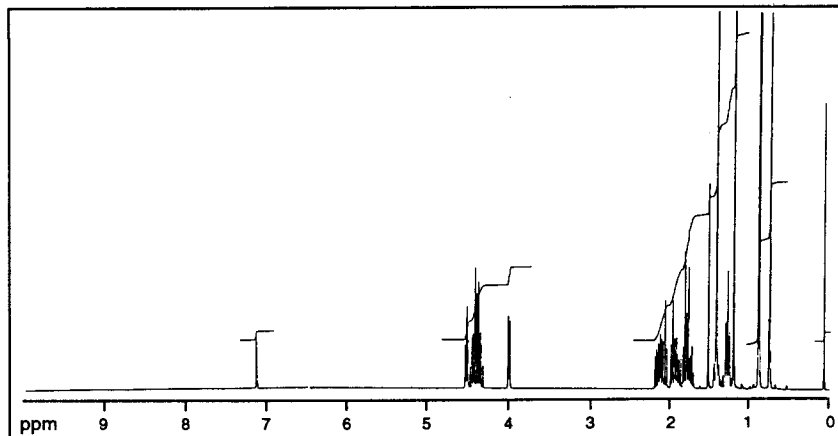
IR(KBr): 3470m br., 2970m, 2940m, 1790s, 1730s, 1450w, 1400w, 1375m, 1350m, 1325m, 1270s, 1210m, 1190m, 1165s, 1110s, 1065s, 1040s, 1025w, 995m, 970w, 955w, 940w, 930m, 900w, 870m, 830w, 820w, 795w, 785w, 740w, 620w

MS(EI⁺): 382(6.0, M⁺), 368(28), 367(68), 325(11), 324(52), 307(15), 268(20), 185(27), 181(19), 169(22), 154(15), 153(65), 152(16), 151(20), 137(54), 136(28), 135(39), 134(31), 127(54), 126(59), 125(58), 121(20), 110(39), 109(100), 108(78), 107(76), 106(21), 101(44)

Summenformel: C₂₀H₃₀O₇ (382.45)

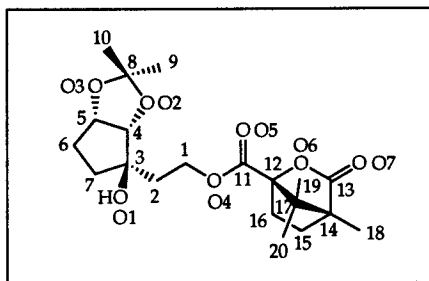
EA: berechnet: C 62.81% H 7.91%

gefunden: C 62.92% H 8.10%



¹H-NMR (300 MHz, C₆D₆) des Camphansäureesters **12**

RÖNTGENSTRUKTURANALYSE:



KETCSE CAMPHER (-) ESTERKETAL P₂₁₂ Z=8 24-AUG-92 16:43:35 a=15.509
b=21.812 c=12.137 al= 90.00 be= 90.00 ga= 90.00 R=0.052 Rw=0.043

Bindungslängen in Å:

C01 -C02	1.352(*)	C01 -O04	1.490(*)	C02 -C03	1.541(*)	C03 -C04	1.553(*)
C03 -C07	1.513(*)	C03 -O01	1.439(*)	C04 -C05	1.543(*)	C04 -O02	1.434(*)
C05 -C06	1.525(*)	C05 -O03	1.423(*)	C06 -C07	1.547(*)	C08 -C09	1.515(*)

C08 -C10	1.514(*)	C08 -002	1.417(*)	C08 -003	1.437(*)	C10A-C8A	1.522(*)
C11 -C12	1.467(*)	C11 -004	1.285(*)	C11 -005	1.238(*)	C11A-C12A	1.514(*)
C11A-04A	1.325(*)	C11A-05A	1.186(*)	C12 -C16	1.528(*)	C12 -C17	1.572(*)
C12 -006	1.484(*)	C12A-C16A	1.524(*)	C12A-C17A	1.548(*)	C12A-06A	1.450(*)
C13 -C14	1.521(*)	C13 -006	1.372(*)	C13 -007	1.201(*)	C13A-C14A	1.507(*)
C13A-06A	1.379(*)	C13A-07A	1.202(*)	C14 -C15	1.527(*)	C14 -C17	1.553(*)
C14 -C18	1.539(*)	C14A-C15A	1.580(*)	C14A-C17A	1.568(*)	C14A-C18A	1.522(*)
C15 -C16	1.534(*)	C15A-C16A	1.581(*)	C17 -C19	1.541(*)	C17 -C20	1.509(*)
C17A-C19A	1.549(*)	C17A-C20A	1.535(*)	C1A -C2A	1.497(*)	C1A -04A	1.491(*)
C2A -C3A	1.541(*)	C3A -C4A	1.522(*)	C3A -C7A	1.503(*)	C3A -01A	1.441(*)
C4A -C5A	1.527(*)	C4A -02A	1.435(*)	C5A -C6A	1.533(*)	C5A -03A	1.448(*)
C6A -C7A	1.515(*)	C8A -C9A	1.508(*)	C8A -02A	1.433(*)	C8A -03A	1.428(*)

Bindungswinkel in Grad:

C02 -C01 -004	107.2(*)	C01 -C02 -C03	116.7(*)	C02 -C03 -C04	110.6(*)
C02 -C03 -C07	116.6(*)	C02 -C03 -001	112.4(*)	C04 -C03 -C07	102.3(*)
C04 -C03 -001	103.4(*)	C07 -C03 -001	110.3(*)	C03 -C04 -C05	107.3(*)
C03 -C04 -002	110.0(*)	C05 -C04 -002	104.5(*)	C04 -C05 -C06	105.1(*)
C04 -C05 -003	104.8(*)	C06 -C05 -003	110.9(*)	C05 -C06 -C07	104.5(*)
C03 -C07 -C06	103.5(*)	C09 -C08 -C10	113.3(*)	C09 -C08 -002	110.4(*)
C09 -C08 -003	111.6(*)	C10 -C08 -002	107.6(*)	C10 -C08 -003	108.3(*)
002 -C08 -003	105.2(*)	C12 -C11 -004	117.4(*)	C12 -C11 -005	117.6(*)
004 -C11 -005	125.0(*)	C12A-C11A-04A	111.5(*)	C12A-C11A-05A	123.3(*)
04A -C11A-05A	125.1(*)	C11 -C12 -C16	120.5(*)	C11 -C12 -C17	116.2(*)
C11 -C12 -006	108.6(*)	C16 -C12 -C17	104.0(*)	C16 -C12 -006	104.1(*)
C17 -C12 -006	101.4(*)	C11A-C12A-C16A	114.9(*)	C11A-C12A-C17A	114.2(*)
C11A-C12A-06A	112.1(*)	C16A-C12A-C17A	104.8(*)	C16A-C12A-06A	106.6(*)
C17A-C12A-06A	103.3(*)	C14 -C13 -006	108.0(*)	C14 -C13 -007	131.5(*)
006 -C13 -007	120.4(*)	C14A-C13A-06A	107.1(*)	C14A-C13A-07A	131.6(*)
06A -C13A-07A	121.3(*)	C13 -C14 -C15	102.2(*)	C13 -C14 -C17	99.1(*)
C13 -C14 -C18	113.8(*)	C15 -C14 -C17	104.5(*)	C15 -C14 -C18	117.0(*)
C17 -C14 -C18	117.6(*)	C13A-C14A-C15A	103.4(*)	C13A-C14A-C17A	99.5(*)
C13A-C14A-C18A	114.3(*)	C15A-C14A-C17A	102.4(*)	C15A-C14A-C18A	114.0(*)
C17A-C14A-C18A	120.8(*)	C14 -C15 -C16	103.4(*)	C14A-C15A-C16A	102.4(*)
C12 -C16 -C15	103.1(*)	C12A-C16A-C15A	101.2(*)	C12 -C17 -C14	91.2(*)
C12 -C17 -C19	112.4(*)	C12 -C17 -C20	114.1(*)	C14 -C17 -C19	115.2(*)
C14 -C17 -C20	115.5(*)	C19 -C17 -C20	107.9(*)	C12A-C17A-C14A	90.8(*)
C12A-C17A-C19A	113.0(*)	C12A-C17A-C20A	115.6(*)	C14A-C17A-C19A	112.0(*)
C14A-C17A-C20A	114.7(*)	C19A-C17A-C20A	109.7(*)	C2A -C1A -04A	109.5(*)
C1A -C2A -C3A	111.2(*)	C2A -C3A -C4A	114.0(*)	C2A -C3A -C7A	113.4(*)
C2A -C3A -01A	109.5(*)	C4A -C3A -C7A	103.9(*)	C4A -C3A -01A	104.9(*)
C7A -C3A -01A	110.8(*)	C3A -C4A -C5A	105.2(*)	C3A -C4A -02A	109.9(*)
C5A -C4A -02A	105.0(*)	C4A -C5A -C6A	106.5(*)	C4A -C5A -03A	104.2(*)
C6A -C5A -03A	109.9(*)	C5A -C6A -C7A	104.2(*)	C3A -C7A -C6A	103.5(*)

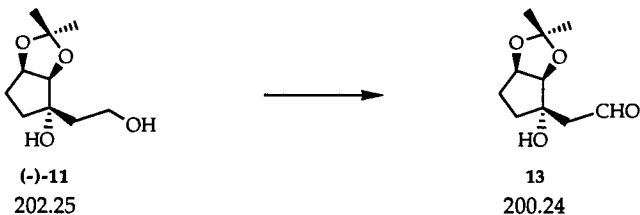
C10A-C8A -C9A 112.1(*) C10A-C8A -02A 108.1(*) C10A-C8A -03A 109.3(*)
 C9A -C8A -02A 110.6(*) C9A -C8A -03A 111.7(*) 02A -C8A -03A 104.5(*)
 C04 -002 -C08 106.8(*) C05 -003 -C08 107.1(*) C01 -004 -C11 116.0(*)
 C12 -006 -C13 105.2(*) C4A -02A -C8A 106.7(*) C5A -03A -C8A 108.4(*)
 C11A-04A -C1A 115.6(*) C12A-06A -C13A 105.9(*)

Koordinaten:

Atom	x/a	y/b	z/c	U(U11)	U22	U33	U23	U13	U12
C01	.5707(6)	.0922(6)	-.0793(9)	.050(7)	.21(1)	.18(1)	-.08(1)	-.060(8)	.032(9)
H011	.6046(6)	.1187(6)	-.1408(9)	1.0(1)					
H012	.6056(6)	.0503(6)	-.0633(9)	.22(6)					
CO2	.5623(6)	.1245(5)	.0151(7)	.070(7)	.16(1)	.043(6)	-.037(7)	-.025(6)	.025(8)
H021	.5234(6)	.1642(5)	-.0032(7)	.04(2)					
H022	.5292(6)	.0961(5)	.0745(7)	.25(7)					
C03	.6462(5)	.1475(4)	.0691(6)	.068(6)	.057(6)	.039(5)	-.000(5)	-.003(4)	.001(6)
C04	.6271(5)	.1758(4)	.1840(5)	.047(5)	.053(6)	.046(5)	.009(4)	-.005(5)	.006(5)
H041	.6077(5)	.2231(4)	.1736(5)	.07(3)					
CO5	.7085(5)	.1669(4)	.2552(6)	.050(6)	.054(6)	.055(5)	.005(5)	-.004(5)	-.015(5)
HO51	.7383(5)	.2085(4)	.2847(6)	.05(2)					
C06	.7714(5)	.1316(4)	.1821(6)	.043(5)	.078(7)	.067(5)	.019(6)	.023(5)	.007(5)
H061	.8157(5)	.1625(4)	.1420(6)	.07(2)					
H062	.8071(5)	.0984(4)	.2298(6)	.07(3)					
C07	.7134(5)	.0995(4)	.0959(6)	.043(5)	.054(7)	.071(6)	.004(5)	-.008(5)	.013(5)
H071	.6838(5)	.0591(4)	.1308(6)	.10(3)					
H072	.7498(5)	.0869(4)	.0235(6)	.08(2)					
C08	.5885(5)	.1344(4)	.3500(7)	.059(6)	.058(7)	.060(6)	.006(6)	.010(5)	-.009(6)
CO9	.5595(5)	.1891(4)	.4177(7)	.066(7)	.088(8)	.075(7)	-.008(6)	.023(6)	-.017(6)
H091	.5806(5)	.1833(4)	.5019(7)	.18(5)					
H092	.4901(5)	.1921(4)	.4154(7)	.10(3)					
H093	.5870(5)	.2306(4)	.3843(7)	.04(2)					
C10	.5534(6)	.0740(4)	.3921(7)	.099(9)	.078(8)	.085(8)	.021(7)	.029(7)	-.015(7)
H101	.5725(6)	.0676(4)	.4769(7)	.10(3)					
H102	.5786(6)	.0369(4)	.3427(7)	.17(5)					
H103	.4839(6)	.0745(4)	.3866(7)	.10(3)					
C11	.4700(6)	.0797(6)	-.223(1)	.032(8)	.12(1)	.19(1)	-.03(1)	.007(9)	-.008(7)
C12	.3806(5)	.0783(4)	-.2624(6)	.053(6)	.078(7)	.047(5)	.011(5)	.016(5)	-.011(6)
C13	.2440(6)	.0651(4)	-.1993(7)	.066(7)	.072(7)	.050(6)	-.006(5)	.001(5)	-.015(6)
C14	.2461(5)	.1099(4)	-.2953(6)	.064(6)	.067(6)	.044(5)	.002(5)	-.010(5)	-.002(6)
C15	.2654(7)	.0679(5)	-.3928(7)	.125(9)	.082(8)	.047(6)	-.006(6)	-.003(6)	-.029(8)
H151	.2213(7)	.0295(5)	-.3952(7)	.18(4)					
H152	.2616(7)	.0929(5)	-.4694(7)	.20(5)					
C16	.3580(6)	.0464(4)	-.3708(6)	.122(9)	.072(8)	.059(6)	-.020(5)	.044(7)	-.001(7)
H161	.4009(6)	.0607(4)	-.4359(6)	.14(3)					
H162	.3607(6)	-.0028(4)	-.3623(6)	.06(2)					
C17	.3334(5)	.1419(4)	-.2704(6)	.072(6)	.049(6)	.045(5)	-.007(5)	.009(4)	-.004(6)
C18	.1654(6)	.1507(5)	-.3038(9)	.088(8)	.109(8)	.118(9)	-.013(9)	-.047(7)	.021(8)
H181	.1716(6)	.1809(5)	-.3737(9)	.30(8)					
H182	.1589(6)	.1776(5)	-.2295(9)	.16(5)					
H183	.1090(6)	.1222(5)	-.3140(9)	.16(5)					
C19	.3368(6)	.1780(4)	-.1613(6)	.097(8)	.058(6)	.046(5)	-.007(5)	.000(5)	.003(6)
H191	.3133(6)	.1497(4)	-.0947(6)	.10(3)					
H192	.2968(6)	.2183(4)	-.1685(6)	.18(5)					
H193	.4024(6)	.1916(4)	-.1445(6)	.23(6)					
C20	.3674(7)	.1831(4)	-.3605(6)	.15(1)	.066(7)	.054(6)	.014(5)	.017(7)	-.036(8)
H201	.3661(7)	.1588(4)	-.4380(6)	.11(3)					
H202	.4328(7)	.1966(4)	-.3420(6)	.18(5)					
H203	.3272(7)	.2234(4)	-.3660(6)	.16(4)					
O01	.6846(3)	.1974(2)	.0092(4)	.103(4)	.062(4)	.062(3)	.030(3)	.026(3)	.011(4)
O02	.5616(3)	.1410(3)	.2393(4)	.047(3)	.102(5)	.046(3)	.002(3)	-.004(3)	-.020(4)
O03	.6808(3)	.1301(2)	.3455(4)	.049(3)	.087(5)	.045(3)	.016(3)	-.005(3)	-.001(3)
O04	.4821(4)	.0771(3)	-.1183(6)	.075(5)	.107(6)	.140(6)	-.011(6)	-.046(5)	.006(4)
O05	.5276(4)	.0861(4)	-.2925(7)	.060(5)	.224(9)	.178(7)	-.037(7)	.031(5)	-.021(6)
O06	.3269(3)	.0462(2)	-.1791(4)	.050(3)	.058(4)	.065(4)	.008(3)	-.011(3)	.007(3)

007	.1851(3)	.0448(3)	-.1464(5)	.067(4)	.128(6)	.089(4)	.008(4)	.018(4)	-.031(4)
C1A	.9708(5)	.0924(4)	.4942(7)	.049(6)	.077(7)	.061(6)	.001(6)	.023(5)	-.004(6)
H1A1	.9363(5)	.0583(4)	.4470(7)	.25(6)					
H1A2	.9888(5)	.0733(4)	.5730(7)	.08(2)					
C2A	.9142(5)	.1472(4)	.5113(6)	.061(6)	.094(6)	.059(6)	-.002(5)	.013(5)	-.004(5)
H2A1	.9506(5)	.1821(4)	.5540(6)	.07(2)					
H2A2	.8939(5)	.1645(4)	.4320(6)	.09(3)					
C3A	.8341(5)	.1307(4)	.5803(5)	.049(5)	.053(6)	.035(4)	.009(4)	.014(4)	-.011(5)
C4A	.8548(4)	.1049(4)	.6937(5)	.044(5)	.056(6)	.038(4)	-.005(4)	.003(4)	-.004(5)
H4A1	.8700(4)	.0566(4)	.6878(5)	.01(1)					
C5A	.7765(4)	.1202(4)	.7649(5)	.043(5)	.083(7)	.038(5)	-.010(5)	.008(4)	-.027(5)
H5A1	.7400(4)	.0810(4)	.7928(5)	.01(1)					
C6A	.7184(5)	.1618(4)	.6951(6)	.054(6)	.085(7)	.061(5)	-.006(6)	.010(5)	-.004(6)
H6A1	.6938(5)	.1994(4)	.7436(6)	.11(3)					
H6A2	.6652(5)	.1360(4)	.6611(6)	.06(2)					
C7A	.7771(5)	.1848(3)	.6044(6)	.060(5)	.051(6)	.043(5)	-.005(5)	.004(4)	.007(5)
H7A1	.8148(5)	.2235(3)	.6323(6)	.05(2)					
H7A2	.7404(5)	.1979(3)	.5325(6)	.09(3)					
C8A	.9034(5)	.1473(5)	.8557(7)	.055(6)	.113(9)	.045(6)	-.003(6)	.007(5)	-.011(6)
C9A	.9315(5)	.0930(4)	.9236(6)	.058(7)	.13(1)	.057(6)	-.004(6)	-.006(5)	-.010(7)
H9A1	.9149(5)	.1007(4)	1.0088(6)	.11(3)					
H9A2	1.0005(5)	.0872(4)	.9163(6)	.07(3)					
H9A3	.8995(5)	.0521(4)	.8944(6)	.20(5)					
C10A	.9456(6)	.2066(4)	.8941(7)	.12(1)	.099(9)	.068(7)	-.021(7)	.010(7)	-.043(7)
H101	1.0149(6)	.2018(4)	.8938(7)	.26(6)					
H102	.9239(6)	.2169(4)	.9766(7)	.08(3)					
H103	.9272(6)	.2434(4)	.8394(7)	.12(4)					
C11A	1.0423(5)	.1133(4)	.3243(7)	.050(6)	.097(7)	.056(6)	-.018(6)	.015(6)	.002(6)
C12A	1.1270(5)	.1296(4)	.2697(6)	.042(5)	.086(8)	.046(5)	-.010(5)	.007(4)	-.004(5)
C13A	1.2685(5)	.1469(4)	.3008(7)	.052(6)	.056(6)	.063(6)	.008(5)	.016(5)	-.000(5)
C14A	1.2548(5)	.1159(3)	.1912(6)	.042(5)	.061(6)	.050(5)	-.002(5)	.012(4)	.000(5)
C15A	1.2114(5)	.1676(4)	.1188(7)	.066(6)	.068(8)	.079(7)	.029(6)	.008(5)	.009(6)
H151	1.2056(5)	.1531(4)	.0340(7)	.14(4)					
H152	1.2475(5)	.2099(4)	.1225(7)	.08(3)					
C16A	1.1199(5)	.1748(4)	.1745(7)	.068(7)	.089(8)	.076(6)	.013(6)	.006(6)	.024(6)
H161	1.0687(5)	.1622(4)	.1185(7)	.13(4)					
H162	1.1096(5)	.2211(4)	.2034(7)	.10(3)					
C17A	1.1761(4)	.0740(3)	.2213(6)	.040(5)	.060(6)	.040(4)	-.005(5)	.001(4)	-.003(5)
C18A	1.3362(5)	.0888(4)	.1408(7)	.052(5)	.090(7)	.079(7)	-.007(6)	.019(5)	.011(6)
H181	1.3204(5)	.0677(4)	.0629(7)	.08(3)					
H182	1.3626(5)	.0546(4)	.1957(7)	.10(3)					
H183	1.3832(5)	.1246(4)	.1278(7)	.13(4)					
C19A	1.1999(5)	.0254(3)	.3094(6)	.080(6)	.054(6)	.040(5)	-.001(5)	.003(5)	-.008(6)
H191	1.2302(5)	.0479(3)	.3785(6)	.06(2)					
H192	1.2438(5)	-.0078(3)	.2747(6)	.05(2)					
H193	1.1420(5)	.0025(3)	.3367(6)	.16(4)					
C20A	1.1329(5)	.0425(4)	.1226(6)	.066(6)	.096(7)	.058(5)	-.022(6)	.006(5)	-.008(6)
H201	1.1167(5)	.0764(4)	.0612(6)	.10(3)					
H202	1.0749(5)	.0196(4)	.1497(6)	.12(3)					
H203	1.1767(5)	.0093(4)	.0876(6)	.12(3)					
O1A	.7862(3)	.0830(2)	.5256(4)	.054(3)	.060(4)	.055(3)	-.009(3)	.001(3)	-.016(3)
O2A	.9248(3)	.1384(2)	.7420(4)	.043(3)	.101(5)	.037(3)	-.002(3)	.009(3)	-.018(3)
O3A	.8120(3)	.1545(2)	.8564(4)	.052(3)	.100(5)	.051(3)	-.013(3)	.013(3)	-.011(4)
O4A	1.0499(3)	.1110(2)	.4330(4)	.051(4)	.098(4)	.050(3)	-.010(3)	.006(3)	-.011(3)
O5A	.9788(4)	.1013(3)	.2743(4)	.044(4)	.211(8)	.061(4)	-.036(5)	.002(3)	-.020(5)
O6A	1.1882(3)	.1556(2)	.3470(4)	.043(3)	.068(4)	.054(3)	-.018(3)	.002(3)	-.010(3)
O7A	1.3331(3)	.1621(3)	.3483(5)	.044(4)	.095(5)	.106(5)	-.021(4)	-.005(4)	-.018(4)

5.8 (1'R,5'R,6'S)-(6'-Hydroxy-3',3'-dimethyl-2',4'-dioxabicyclo[3.3.0]oct-6'-yl) acetaldehyd 13



Es wurden 7.18 g (16.93 mmol) 1,1,1-tris(acetyloxy)-1,1-dihydro-1,2-benzjodoxol-3(1H)-on ("Dess-Martin-Reagenz") in 68 ml CH₂Cl₂ (0.25M Lösung) vorgelegt und bei Raumtemperatur mit 2.74 g (13.55 mmol) des Diols (-)-11 in 54 ml CH₂Cl₂ (0.25M Lösung) während 5 Minuten versetzt. Nach 2 Stunden Rühren wurde die milchigweisse Reaktionslösung in ein Gemisch von 50 ml 20% wäss. Na₂S₂O₃ Lösung, 150 ml ges. wäss. NaHCO₃ Lösung und 150 ml Diethylether gegossen. Es wurde 10 Minuten gerührt und dann die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 300 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde in wenig Ethylacetat aufgenommen und über Silikagel filtriert (Ethylacetat). Kugelrohrdestillation am HV (0.02 Torr, 72°-75°C) lieferte 1.78 g (66%) des Aldehyds 13 als farbloses Öl (in späteren Ansätzen wurde auf eine Reinigung des Aldehyds verzichtet).

Sdp.: 72°-75°C (0.02 Torr)

DC(Hexan/Ethylacetat 1:3): R_f 0.56

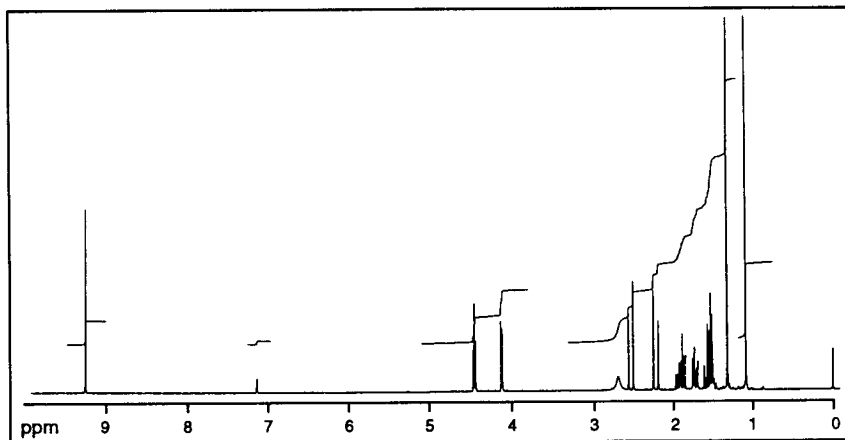
¹H-NMR(300 MHz, C₆D₆): 1.09, 1.33 [2s, 6H, 2CH₃]; 1.51-1.62, 1.70-1.77, 1.85-1.98 [3m, 4H, H₂C(7'), H₂C(8')]; 2.23 [dd, J=0.9, J=18.0, 1H, H-C(2)]; 2.55 [dd, J=1.0, J=18.0, 1H, H-C(2)]; 2.70 [s br., 1H, OH]; 4.18 [dd, J=1.3, J=5.5, 1H, H-C(5')]; 4.52 [t, J=5.2, 1H, H-C(1')]; 9.33 [t, J=1.0, 1H, CHO]

¹³C-NMR (75 MHz, C₆D₆): 23.86, 26.39 [2q, 2CH₃]; 29.79, 34.97 [2t, C(7'), C(8')]; 49.18 [t, C(2)]; 80.38 [s, C(6')]; 81.00 [d, C(1')]; 86.31 [d, C(5')]; 109.97 [s, C(3')]; 202.52 [d, C(1)]

IR(CHCl₃): 3600-3300w br., 3005m, 2992m, 2937m, 2836w, 2742w, 1715s, 1601w, 1445w, 1383m, 1273m, 1165m, 1069m, 1039s, 988w, 965w, 922w, 871m

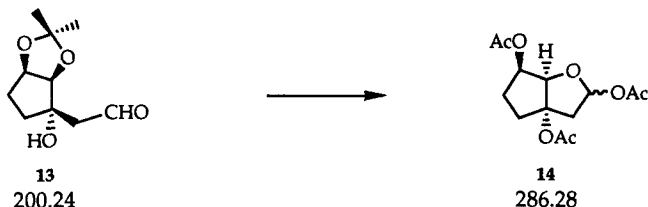
MS(EI⁺): 200(1, M⁺), 185(36), 143(19), 142(18), 125(34), 124(30), 107(32), 101(10), 100(12), 99(28), 98(24), 97(33), 96(19), 95(25), 86(37), 85(24), 83(15), 81(38), 79(36), 71(50), 70(49), 69(38), 68(14), 67(25), 61(10), 60(17), 59(56), 58(38), 57(41), 55(48),

54(11), 53(25), 45(18), 44(44), 43(92), 42(100), 41(52), 40(28), 39(45), 31(40), 29(91),
28(63), 27(42), 26(13), 18(37), 15(28)



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, C_6D_6) des Acetaldehydderivates **13**

5.9 (1R,3R/S,5S,8R)-3,5,8-triacetoxy-2-oxabicyclo[3.3.0]octan 14



Eine Lösung von 1.64 g (8.19 mmol) des Aldehyds **13** in 40 ml Wasser wurde mit 3.3 g Ionentauscherharz Amberlite IR-120 versetzt und 90 Minuten bei 55°C schwach gerührt. Die Lösung wurde filtriert und der Ionentauscher mit wenig Wasser nachgewaschen. Der pH des Filtrates wurde mit ges. wässriger NaHCO₃ Lösung auf 8.0 eingestellt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum bis auf 2 ml eingedampft, der Rückstand in 20 ml Pyridin aufgenommen und bis zur Trockene koevaporiert. Das gelbliche Öl wurde in 25 ml Pyridin aufgenommen, bei 0°C mit 5.4 ml (57.13 mmol, 7 eq. bez. Aldehyd) Essigsäureanhydrid und 250 mg (2.05 mmol, 25 mol% bez. Aldehyd) 4-Dimethylaminopyridin versetzt. Nach 3 Stunden Rühren bei RT wurde dem auf 0°C gekühlten Reaktionsgemisch 100 ml ges. wässriger NaHCO₃ Lösung hinzugegeben. Es wurde dreimal mit je 150 ml CH₂Cl₂ extrahiert, die vereinigten organische Phase über MgSO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde zweimal mit je 100 ml Toluol zur Trockene koevaporiert. Nach Chromatographie des gelbbraunen Öls an 60 g Silikagel (Ø 2.5 cm; Hexan/Ethylacetat 2:1) konnten –nach Entfernung des Lösungsmittels und Trocknen am Hochvakuum (2 Tage)– 2.19 g (93%) des triacetylierten Zuckers **14** als leicht gelbliches Öl, das noch etwas Ethylacetat enthielt, isoliert werden (die analytischen Daten stammen von einer am HV im Kugelrohrföfen destillierten Probe).

Sdp.: 124°-132° (0.02 Torr)

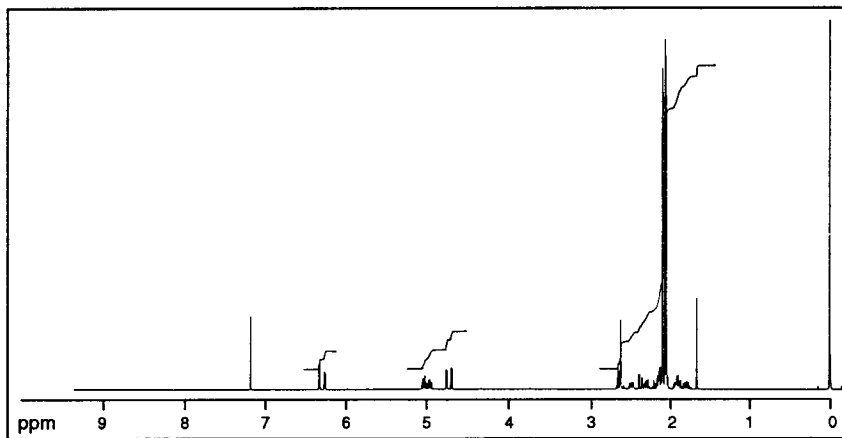
DC(Hexan/Ethylacetat 1:1): R_f 0.40

¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃): 1.73-2.67 [m, 6H, H₂C(4), H₂C(6), H₂C(7)]; 2.04, 2.05, 2.061, 2.064, 2.08, 2.09 [6s, 9H, 3CH₃]; 4.73 [d, J=5.8, 0.5H, H-C(1)]; 4.79 [d, J=5.3, 0.5H, H-C(1)]; 5.01 [ddd, J=5.8, J=7.5, J=9.8, 0.5H, H-C(8)]; 5.08 [dt, J_t=5.4, J_d=10.8, 0.5H, H-C(8)]; 6.34 [dd, J=2.2, J=5.3, 0.5H, H-C(3)]; 6.40 [d, J=5.0, 0.5H, H-C(3)]

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 20.74, 20.91, 21.23, 21.31, 21.39, 21.55 [6q, 3CH₃]; 27.86, 28.00, 33.98, 34.00 [4t, C(6), C(7)]; 46.02, 46.11 [2t, C(4)]; 72.38, 72.85 [2d, C(8)]; 86.25, 87.30 [2d, C(1)]; 91.11, 91.73 [2s, C(5)]; 99.02, 99.33 [2d, C(3)]; 169.74, 169.99, 170.12, 170.25, 170.43, 170.47 [6s, 3CO]

IR(CHCl₃): 3032 w , 1737 s , 1430 w , 1369 m , 1117 m , 1054 m , 997 m , 955 w , 847 w , 812 w , 612 w

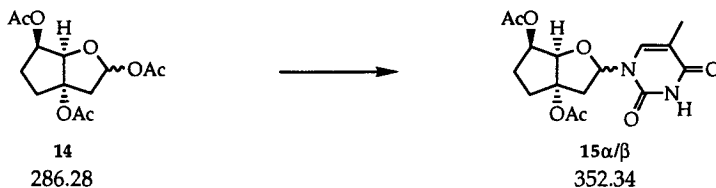
MS(EI⁺): 286(0.7, M⁺), 227(22), 168(11), 167(82), 166(9), 137(10), 125(18), 124(13), 108(13), 107(100), 81(7), 79(8)



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) des bicyclischen Zuckerderivates **14**

6. Synthese der Nucleoside und der Bausteine für die Oligonucleotidsynthese an einer Festphase

6.1 (5'R)-1-(3',5'-Di-O-acetyl-2'-deoxy-3',5'-ethano- α,β -D-ribofuranosyl) thymin 15 α/β



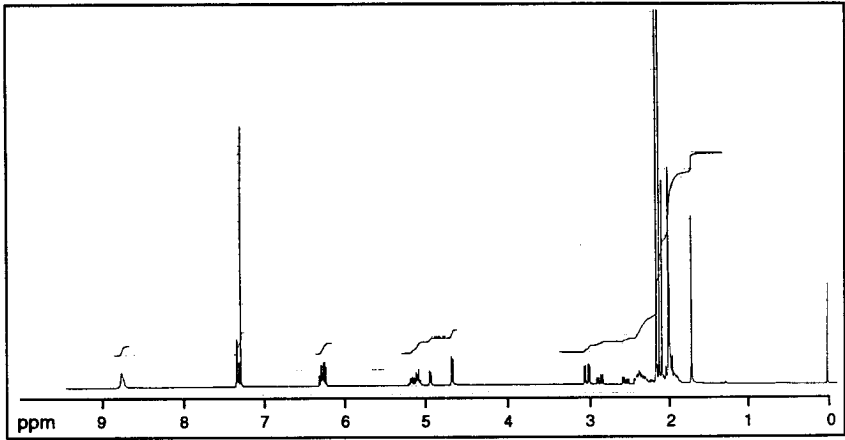
Eine Suspension von 1.25 g (9.91 mmol, 1eq.) Thymin in 100 ml Acetonitril wurde unter Argonatmosphäre gesetzt und nacheinander bei 0°C mit 1.65 ml (7.91 mmol, 0.8 eq.) Bis-(trimethylsilyl)-amin, 1.0 ml (7.89 mmol, 0.8 eq.) Trimethylsilylchlorid und 1.39 ml (11.83 mmol, 1.2 eq.) Zinntetrachlorid versetzt. Nun wurden 2.83 g (9.89 mmol) des Triacetates **14**, gelöst in 20 ml Acetonitril, innerhalb von 5 Minuten zur Suspension gegeben, das Eisbad entfernt und die nun klare Lösung während 35 Minuten bei Raumtemperatur und 35 Minuten bei 50°C gerührt. Die auf Raumtemperatur abgekühlte Lösung wurde in 300 ml ges. NaHCO₃ Lösung gegossen und zweimal mit je 300 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde über Watte filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Trocknen am HV lieferte einen bräunlichen Schaum, der an Silikagel chromatographiert wurde (Hexan/Ethylacetat 1:3). Nach Entfernung des Lösungsmittels am RV und Trocknen im Hochvakuum resultierten 2.55 g (73%) α,β -Anomerengemisch des diacetylierten Bicyclothyminidins **15** als farbloser Schaum.

DC(Ethylacetat): R_f 0.50

¹H-NMR(300 MHz, CDCl₃): 1.84-2.53 [m, 4H, H₂C(6'), H₂C(7')]; 1.95, 1.96 [2d, J=1.2, 3H, H₃C-C(5)]; 2.05, 2.08, 2.115, 2.119 [4s, 6H, 2CH₃]; 2.81 [dd, J=6.6, J=14.7, 0.32H, H-C(2')]; 2.97 [dd, J=5.4, J=14.6, 0.68H, H-C(2')]; 4.64 [d, J=5.6, 0.67H, H-C(4')]; 4.91[d, J=5.5, 0.33H, H-C(4')]; 5.05-5.15 [m, 1H, H-C(5')]; 6.21-6.29 [m, 1H, H-C(1')]; 7.29, 7.31 [2d, J=1.2, 1H, H-C(6)]; 8.73 [s br., 1H, HN(3)]

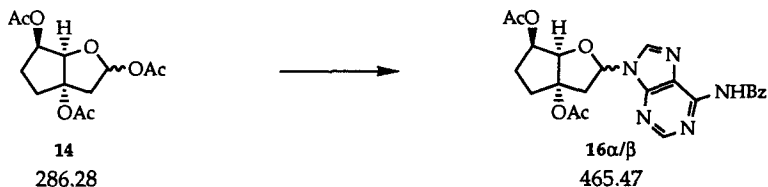
IR(CHCl₃): 3393w, 3032w, 1740s, 1710s sh., 1692s, 1465w, 1371m, 1288m, 1110w, 1059m

MS(EI⁺): 352(7, M⁺), 227(25), 168(13), 167(89), 127(13), 126(22), 125(27), 108(15), 107(100), 106(10), 83(13), 81(12), 43(66)



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) vom diacetylierten $15\alpha/\beta$

6.2 (5'R)-N⁶-Benzoyl-9-(3',5'-Di-O-acetyl-2'-deoxy-3',5'-ethano- α,β -D-ribofuranosyl) adenin 16 α/β



In 20 ml Acetonitril wurden 3.86 g (16.1 mmol; 2 eq.) N-6-Benzoyladenin (P. Kälín) suspendiert und mit 5.86 ml (32.3 mmol; 4 eq.) N,O-Bis-trimethylsilylacetamid versetzt. Nach 30 min. Rühren bei RT wurde zum nunmehr homogenen Reaktionsgemisch eine Lösung von 2.31g (8.1 mmol) des Triacetates **14** in 15 ml Acetonitril gegeben, gefolgt von 200 μ l (1.1 mmol) Trifluormethansulfonsäure-trimethylsilylester. Nach 2h Reaktionszeit bei Rückflusstemperatur liess man auf RT abkühlen und rührte noch 3h nach. Anschliessend wurde die tiefbraune Reaktionslösung auf ein Gemisch von 100ml ges. NaCl Lösung und 100 ml ges. NaHCO₃ Lösung gegossen und zweimal mit je 200 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am RV eingedampft. Der Rückstand wurde in wenig Ethylacetat gelöst, filtriert und das Filtrat erneut eingedampft. Der Rückstand wurde an Silikagel mit Ethylacetat chromatographiert. Die produkthaltigen Fraktionen wurden vereinigt, vom Lösungsmittel befreit und der resultierende Rückstand am HV (1h) zu einem leicht gelblichen Schaum getrocknet. Es verblieben 2.94 g (78 %) des diacetylierten Bicycloadenins **16** als Anomerengemisch im Verhältnis von $\alpha:\beta = 3:2$.

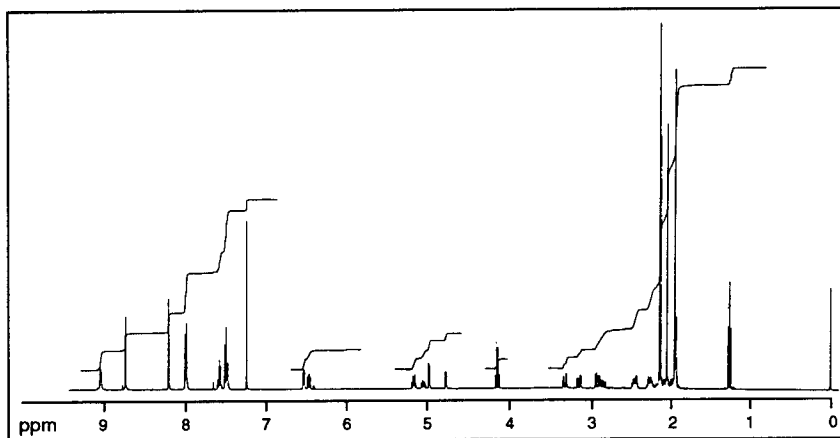
DC(Ethylacetat): R_f 0.37

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.90-2.19, 2.20-2.30, 2.41-2.48 [3m, 4H, H₂C(6'), H₂C(7'')]; 1.94, 2.04, 2.11, 2.13 [4s, 6H, 2CH₃]; 2.84 [dd, J=8.9, J=14.6, 0.4H, H-C(2'')]; 2.91 [dd, J=6.8, J=15.1, 0.6H, H-C(2'')]; 3.14 [dd, J=5.8, J=14.6, 0.4H, H-C(2'')]; 3.32 [dd, J=3.5, J=15.0, 0.6H, H-C(2'')]; 4.77 [d, J=5.4, 0.4H, H-C(4')]; 4.98 [d, J=5.3, 0.6H, H-C(4')]; 5.05 [dt, J_d=9.7, J_t=6.2, 0.4H, H-C(5')]; 5.17 [dt, J_d=8.4, J_t=5.8, 0.6H, H-C(5')]; 6.48 [dd, J=5.8, J=9.0, 0.4H, H-C(1')]; 6.54 [dd, J=3.5, J=6.7, 0.6H, H-C(1')]; 7.51-7.63 [m, 3H, H-C_{ar}]; 8.02 [d, J=7.2, 2H, H-C_{ar}]; 8.24, 8.25, 8.78, 8.79 [2x2s, 2H, H-C(2), H-C(8)]; 9.10 [s br., 1H, HN-C(6)]

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 20.84, 20.92, 21.38, 21.60 [4q, 2CH₃]; 28.12, 28.57, 33.49, 33.74 [4t, C(6'), C(7'')]; 44.91, 45.01 [2t, C(2'')]; 72.69, 72.78 [2d, C(5')]; 84.94, 85.60, 86.67, 87.18 [4d, C(1'), C(4')]; 97.76, 97.94 [2s, C(3')]; 123.25, 123.60 [2s, C(5)]; 127.89, 128.90, 132.83 [3d, C_{ar}]; 133.59, 133.62 [2s, C_{ar}]; 140.94, 141.16 [2d, C(8)]; 149.56, 149.63 [2s, C(4)]; 151.54, 151.74 [2s, C(6)]; 152.73 [d, C(2)]; 164.61 [s, HNCO]; 170.03, 170.28, 170.39 [3s, H₃C-CO]

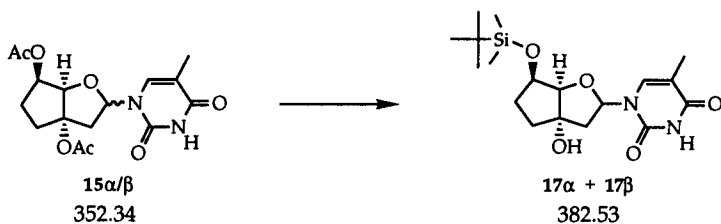
IR(KBr): 3600-3300*w br.*, 2980*w*, 2960*w*, 1740*s*, 1700*m*, 1610*s*, 1580*m*, 1510*m*, 1485*m*, 1455*s*, 1400*m*, 1370*m*, 1330*m*, 1245*s*, 1100*m*, 1055*m*, 970*m*, 870*w*, 850*w*, 800*m*, 710*m*, 645*m*

MS(FAB⁺): 467(19), 466(49), 465(3.6, M⁺), 241(27), 240(100), 154(13), 137(11), 136(17), 107(33), 105(47), 77(19)



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) von **16α/β**

6.3 (5'R)-1-(5'-O-tert.butylidimethylsilyl-2'-deoxy-3',5'-ethano- α + β -D-ribofuranosyl) thymin 17 α +17 β



In 260 ml Lösungsmittelgemisch (THF/MeOH/H₂O 5:4:1) wurden 2.30 g (6.53 mmol) des diacetylierten α,β -Bicyclothymidins **15** gelöst und bei 0°C mit 26 ml (52 mmol) 2N NaOH versetzt. Nach 75 Minuten Rühren bei derselben Temperatur wurden 3.5 g (65.4 mmol) NH₄Cl zugegeben und solange weitergerührt bis eine klare Lösung entstand. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in 200 ml Methanol aufgenommen, an 8 g Silikagel adsorbiert und an 55 g Silikagel chromatographiert (\varnothing 2.5 cm, Methylenchlorid /Methanol 5:1). Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der farblose Schaum in wenig Methanol gelöst, mit 100 ml Pentan versetzt (weisses Pulver) und im Vakuum bis zur Trockene eingedampft. Es wurde nach Trocknen über Nacht im Hochvakuum 1.65 g (94%) des deacetylierten Produktes als weisses Pulver erhalten. Dieses Pulver wurde in 33 ml Pyridin unter leichtem Erwärmen gelöst und dann bei 0°C unter Argonatmosphäre mit 1.84 ml (8.01 mmol) tert.-Butylidimethylsilyltrifluormethansulfonat versetzt. Bei dieser Temperatur wurde während 45 Minuten weitergerührt. Zur klaren Reaktionslösung wurden 100 ml ges. wässrige NaHCO₃ zugegeben und das Gemisch dreimal mit je 150 ml Ethylacetat extrahiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der farblose Schaum kurz am Hochvakuum getrocknet. Chromatographie an Silikagel (5% Aceton in Diethylether; 3 Säulen: 120 g \varnothing 4 cm, 50 g \varnothing 3 cm, 20 g \varnothing 2cm) lieferte die beiden Anomeren des silylierten Bicyclothymidins: **17 α** 655 mg (26%, bez. Diacetat) und **17 β** 1.47 g (59%, bez. Diacetat).

α -Anomer:

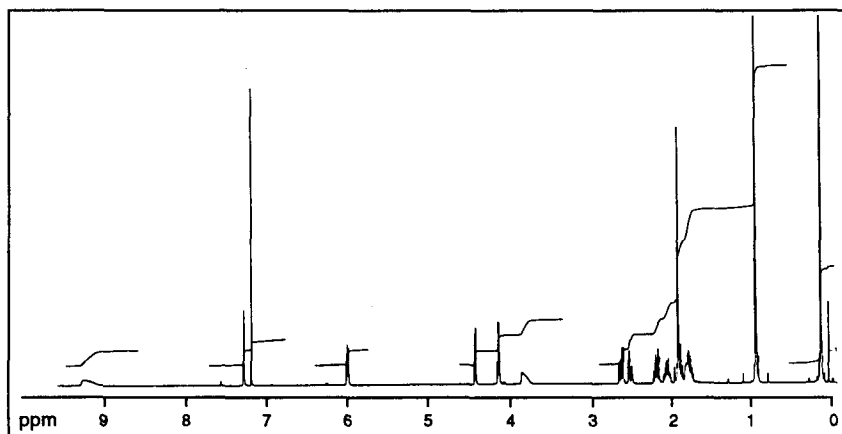
DC(Diethylether (H₂O ges.)/Aceton 95:5): R_f 0.19

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 0.09, 0.10 [2s, 6H, H₃C-Si]; 0.91 [s, 9H, H₃C-C]; 1.70-1.93, 1.83-1.93, 1.98-2.07, 2.12-2.19 [4m, 4H, H₂C(6'), H₂C(7')]; 1.89 [s, 3H, H₃C-C(5)]; 2.49 [d, J=14.5, 1H, H-C(2')]; 2.61 [dd, J=7.9, J=14.6, 1H, H-C(2')]; 3.85 [s br., 1H, OH]; 4.15 [dd, J=4.2, J=8.7, 1H, H-C(5')]; 4.45 [d, J=4.6, 1H, H-C(4')]; 6.05 [dd, J=2.5, J=7.8, 1H, H-C(1')]; 7.37 [s, 1H, H-C(6)]; 9.35 [s br., 1H, HN(3)]

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): -5.03, -4.69 [2q, $\text{H}_3\text{C-Si}$]; 12.46 [q, $\text{H}_3\text{C-C(5)}$]; 18.23 [s, $\text{C(CH}_3)_3$]; 25.88 [q, $(\text{H}_3\text{C})_3\text{C}$]; 32.36, 36.45 [2t, C(6') , C(7')]; 48.06 [t, C(2')]; 73.56 [d, C(5')]; 86.42 [s, C(3')]; 92.20, 94.54 [2d, C(1') , C(4')]; 110.05 [s, C(5)]; 138.35 [d, C(6)]; 150.48 [s, C(2)]; 164.18 [s, C(4)]

IR(CHCl_3): 3392w, 2956m, 1710s sh., 1688s, 1471m, 1360w, 1261m, 1114m, 1070m, 989w, 915w, 864w, 837m

MS(FAB $^+$): 384(21), 383(75), 382(3, M^+), 325(29), 258(16), 257(87), 241(18), 240(14), 239(68), 213(34), 199(49), 183(11), 181(10), 155(15), 154(25), 153(21), 138(12), 137(124), 136(30), 129(14), 127(73), 125(12), 115(12), 110(15), 107(38), 99(38), 89(14), 77(18), 75(47), 74(14), 73(100), 59(20), 55(10)



^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) von 17α

β -Anomer:

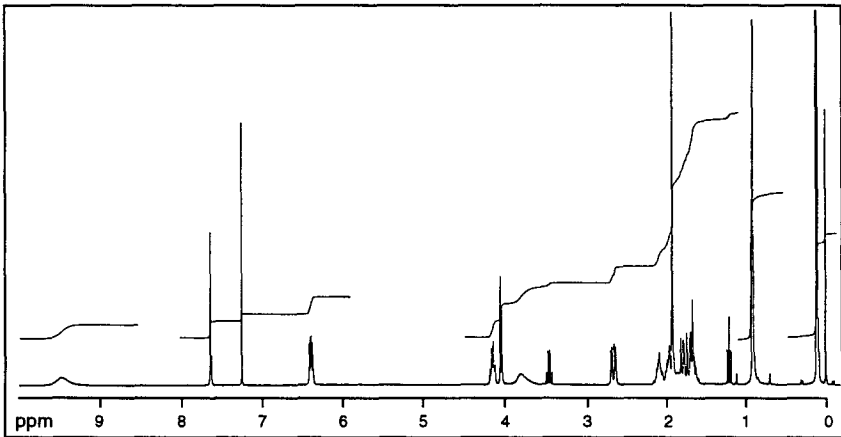
DC (Diethylether (H_2O ges.)/Aceton 95:5): R_f 0.12

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): 0.10, 0.12 [2s, 6H, $\text{H}_3\text{C-Si}$]; 0.91 [s, 9H, $\text{H}_3\text{C-C}$]; 1.63-2.12 [m, 5H, $\text{H}_2\text{C(6')}$, $\text{H}_2\text{C(7')}$, H-C(2')]; 1.92 [d, $J=1.1$, 3H, $\text{H}_3\text{C-C(5)}$]; 2.67 [dd, $J=5.0$, $J=13.6$, 1H, H-C(2')]; 3.85 [s br., 1H, OH]; 4.08 [d, $J=6.0$, 1H, H-C(4')]; 4.19 [dd, $J=6.1$, $J=14.1$, 1H, H-C(5')]; 6.39 [dd, $J=4.9$, $J=9.3$, 1H, H-C(1')]; 7.66 [d, $J=1.2$, 1H, H-C(6)]; 9.55 [s br., 1H, HN(3)]

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): -4.92, -4.60 [2q, $\text{H}_3\text{C-Si}$]; 12.53 [q, $\text{H}_3\text{C-C}(5)$]; 18.30 [s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$]; 25.90 [q, $(\text{H}_3\text{C})_3\text{C}$]; 33.43, 34.46 [2t, $\text{C}(6')$, $\text{C}(7')$]; 47.39 [t, $\text{C}(2')$]; 72.34 [d, $\text{C}(5')$]; 85.92 [d, $\text{C}(1')$]; 86.68 [s, $\text{C}(3')$]; 89.34 [d, $\text{C}(4')$]; 111.13 [s, $\text{C}(5)$]; 135.41 [d, $\text{C}(6)$]; 150.62 [s, $\text{C}(2)$]; 163.89 [s, $\text{C}(4)$]

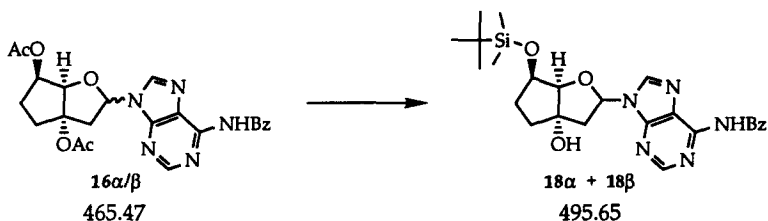
IR(CHCl_3): 3600w, 3398w, 2956m, 2931m, 2858w, 1687s, 1471m, 1369w, 1282m, 1144m, 1094m, 997w, 940w, 904w, 838m

MS(FAB+): 406(11), 405(M+Na⁺, 40), 383(M⁺+1), 37), 325(16), 257(46), 241(11), 239(34), 213(22), 199(29), 153(12), 127(34), 107(12), 99(19), 75(31), 73(100), 59(14)



^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) von 17 β

6.4 (5'R)-N⁶-Benzoyl-9-(5'-O-tert.butylidimethylsilyl-2'-deoxy-3',5'-ethano- α + β -D-ribofuranosyl) adenin 18 α +18 β



Einer Lösung von 3.37 g (7.24 mmol) des diacetylierten α,β -Bicycloadenins **16** in 289 ml eines Gemisches von THF/Methanol/Wasser 5:4:1 wurden bei 0°C 28.9 ml (57.8 mmol) 2N NaOH Lösung hinzugegeben. Nach 30 min. Rühren wurden dem Reaktionsgemisch 3.6 g (67 mmol) NH_4Cl zugesetzt und das Eisbad entfernt. Nach dem Entstehen einer homogenen Lösung wurde das Reaktionsgemisch eingengt, der Rückstand in ca. 50 ml Methanol gelöst und an ca. 5 g Silikagel adsorbiert. Chromatographie an Silikagel mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1, lieferte nach kurzem Trocknen am HV 1.98 g (5.20 mmol, 72%) des deacetylierten Produktes, welches anschliessend in 20 ml Pyridin gelöst und bei 0°C mit 1.43 ml (6.24 mmol) tert.-Butyldimethylsilyl-trifluormethansulfonat versetzt wurde. Nach 30 Minuten Reaktionszeit wurde das Gemisch auf 100 ml ges. NaHCO_3 Lösung gegossen und zweimal mit je 200 ml Ether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am RV eingedampft. Das Rohprodukt (2.3 g) wurde an Silikagel (wassergesättigter Diethylether/Aceton 83:17) chromatographiert, wobei zuerst das α -Isomer **18 α** und dann das β -Isomer **18 β** eluiert wurde. Reine Fraktionen wurden vereinigt und eingedampft, währenddem Mischfraktionen noch ein zweitesmal analog chromatographiert wurden. Auf diese Weise erhielt man zusammen nach Trocknen am HV über Nacht 1.452 g (40%, bez. Diacetat) **18 α** und 0.864g (24%, bez. Diacetat) **18 β** , je in Form eines weissen Schaumes.

α -Anomer:

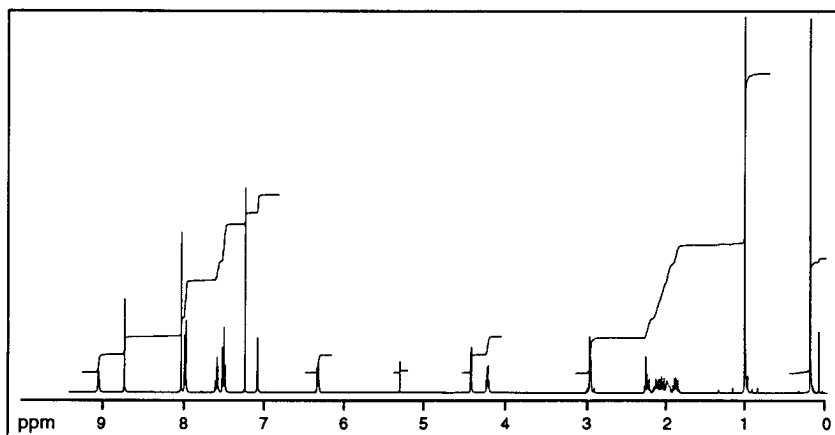
DC(Diethylether (H_2O ges.)/Aceton 85:15): R_f 0.51

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 0.10, 0.11 [2s, 6H, $\text{CH}_3\text{-Si}$]; 0.92 [s, 9H, $\text{CH}_3\text{-C}$]; 1.75-1.83, 1.94-2.08, 2.12-2.19 [3m, 4H, $\text{H}_2\text{C}(6')$, $\text{H}_2\text{C}(7')$]; 2.82-2.92 [m, 2H, $\text{H}_2\text{C}(2')$]; 4.18 [dt, $J_t=4.8$, $J_d=6.1$, 1H, H-C(5')]; 4.39 [d, $J=4.8$, 1H, H-C(4')]; 6.34 [dd, $J=3.8$, $J=7.3$, 1H, H-C(1')]; 7.11 [s, 1H, OH]; 7.53 [t, $J=7.5$, 2H, H-C_{ar}]; 7.62 [t, $J=7.4$, 1H, H-C_{ar}]; 8.02 [d, $J=7.1$, 2H, H-C_{ar}]; 8.08, 8.80 [2s, 2H, H-C(2), H-C(8)]; 9.13 [s br., 1H, HN-C(6)]

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): -4.91, -4.69 [2q, $\text{H}_3\text{C-Si}$]; 18.32 [s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$]; 25.93 [q, $(\text{H}_3\text{C})_3\text{C}$]; 31.55 [t, $\text{C}(6')$]; 36.25 [t, $\text{C}(7')$]; 48.23 [t, $\text{C}(2')$]; 74.04 [d, $\text{C}(5')$]; 86.00 [s, $\text{C}(3')$]; 88.68 [d, $\text{C}(1')$]; 93.63 [d, $\text{C}(4')$]; 124.25 [s, $\text{C}(5)$]; 127.89, 128.95, 132.95 [d, C_{ar}]; 133.52 [s, C_{ar}]; 143.76 [d, $\text{C}(8)$]; 149.95, 150.22 [2s, $\text{C}(4)$, $\text{C}(6)$]; 151.84 [d, $\text{C}(2)$]; 164.47 [s, HN-CO]

IR(KBr): 3600-3100m br., 2950s, 2930s, 2860m, 1700s, 1610s, 1580s, 1510s, 1485s, 1470s sh., 1455s, 1400m, 1330s, 1295s, 1255s, 1215s, 1180m, 1155m, 1090s sh., 1070s, 1030w, 1005w, 985w, 940m, 910m, 840s, 800m, 780s, 710s

MS(FAB $^+$): 497(20), 496(43, $\text{M}^+ + 1$), 438(10), 266(20), 241(29), 240(100), 213(10), 136(14), 105(43), 99(12), 77(15), 75(22), 73(65), 59(11)



^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) von 18α

β -Anomer:

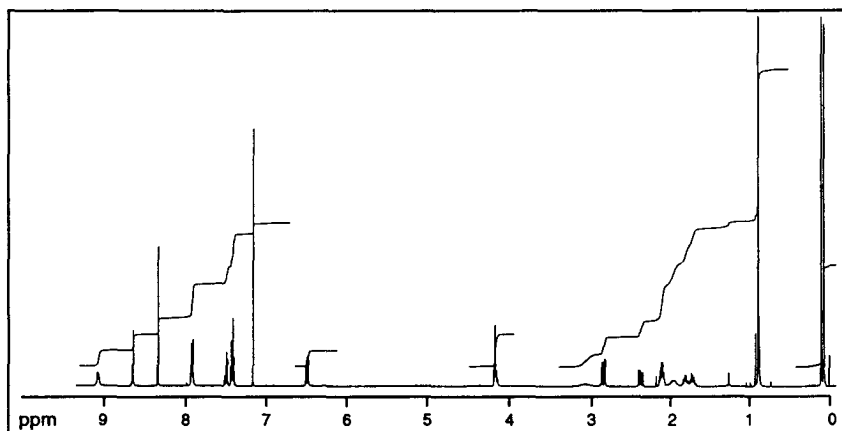
DC(Diethylether (H_2O ges.)/Aceton 85:15): R_f 0.33

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): 0.06, 0.10 [2s, 6H, $\text{CH}_3\text{-Si}$]; 0.88 [s, 9H, $\text{CH}_3\text{-C}$]; 1.67-1.86, 2.08-2.14 [2m, 4H, $\text{H}_2\text{C}(6')$, $\text{H}_2\text{C}(7')$]; 2.37 [dd, $J=9.1$, $J=13.6$, 1H, $\text{H-C}(2')$]; 2.84 [dd, $J=5.4$, $J=13.5$, 1H, $\text{H-C}(2')$]; 3.08 [s br., 1H, OH]; 4.18-4.23 [m, 2H, $\text{H-C}(4')$, $\text{H-C}(5')$]; 6.57 [dd, $J=5.3$, $J=9.0$, 1H, $\text{H-C}(1')$]; 7.50-7.54 [m, 2H, H-C_{ar}]; 7.58-7.63 [m, 1H, H-C_{ar}]; 8.04 [d, $J=7.2$, 2H, H-C_{ar}]; 8.47, 8.79 [2s, 2H, $\text{H-C}(2)$, $\text{H-C}(8)$]; 9.23 [s br., 1H, $\text{HN-C}(6)$]

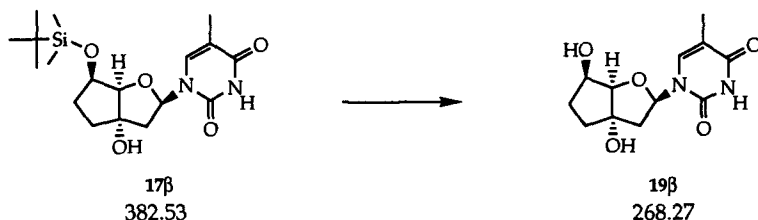
^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): -4.93, -4.46 [q, $\text{H}_3\text{C-Si}$]; 18.32 [s, $(\text{H}_3\text{C})_3\text{C}$]; 25.92 [q, $(\text{H}_3\text{C})_3\text{C}$]; 33.34, 35.41 [2t, $\text{C}(6')$, $\text{C}(7')$]; 48.60 [t, $\text{C}(2')$]; 72.49 [d, $\text{C}(5')$]; 86.13 [d, $\text{C}(1')$]; 87.08 [s, $\text{C}(3')$]; 90.58 [d, $\text{C}(4')$]; 123.02 [s, $\text{C}(5)$]; 127.94, 128.86, 132.79 [d, C_{ar}]; 133.78 [s, C_{ar}]; 141.23 [d, $\text{C}(8)$]; 149.45, 151.29 [2s, $\text{C}(4)$, $\text{C}(6)$]; 152.66 [d, $\text{C}(2)$]; 164.74 [s, CO]

IR(KBr): 3600-3100m, 2950m, 2930m, 2860m, 1700m, 1610s, 1580s, 1510m, 1485m sh., 1460s, 1405m, 1320m, 1300m 1250s, 1220m, 1185m, 1145m, 1095s, 1075s, 1005w, 980w, 940w, 905m, 865m, 835s, 710m, 690m, 645m

MS(FAB $^+$): 497(22), 496(51), 495(2.3, M^+), 438(16), 266(19), 241(26), 240(100), 154(12), 137(10), 136(17), 105(39), 77(17), 75(16), 73(48)



^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) von **18 β**

6.5 (5'R)-1-(2'-deoxy-3',5'-ethano- β -D-ribofuranosyl) thymin 19 β 

Eine Lösung von 1.07 g (2.80 mmol) des silylierten Bicyclothyminidins $\text{17}\beta$ in 20 ml Tetrahydrofuran wurde bei Raumtemperatur mit 1.76 g (5.58 mmol) Tetrabutylammoniumfluorid-trihydrat versetzt und während 4 Tagen stehengelassen. Das Reaktionsgemisch wurde an 10 g Silikagel adsorbiert und an 50 g Silikagel (CH_2Cl_2 /Methanol 6:1) chromatographiert. Kristallisation des Produktes (Methanol /Diethylether 4:1; Pentan: isotherme Destillation) lieferte 521 mg (69%) des β -Bicyclothyminidins Monomeren $\text{19}\beta$ in farblosen Kristallen.

Smp.: > 210° dec.

DC(CH_2Cl_2 /Methanol 6:1): R_f 0.36

$[\alpha]_D^{25} = +61.6$ (c=1.5, H_2O)

UV(H_2O): 265(9719)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): 1.61-1.69, 1.75-1.85, 2.06-2.14 [3m, 4H, $\text{H}_2\text{C}(6')$, $\text{H}_2\text{C}(7')$]; 1.89 [d, $J=1.2$, 3H, $\text{H}_3\text{C-C}(5)$]; 2.15 [dd, $J=10.0$, $J=14.0$, 1H, $\text{H-C}(2')$]; 2.49 [dd, $J=5.2$, $J=14.1$, 1H, $\text{H-C}(2')$]; 4.09 [d, $J=5.3$, 1H, $\text{H-C}(4')$]; 4.19 [dt, $J_t=5.6$, $J_d=9.5$, 1H, $\text{H-C}(5')$]; 6.24 [dd, $J=5.2$, $J=10.1$, 1H, $\text{H-C}(1')$]; 7.67 [d, $J=1.2$, 1H, $\text{H-C}(6)$]

Differenz-NOE (300 MHz, D_2O)

7.67 [H-C(6)]	→	6.24 [m, H-C(1')]
	→	2.49 [w, H-C(2'), neg.]
	→	2.10 [m, H-C(2')]
	→	1.84 [st, $\text{H}_3\text{C-C}(5)$]
6.20 [H-C(1')]	→	7.60 [st, H-C(6)]
	→	4.04 [st, H-C(4')]
	→	2.40 [m, H-C(2')]
4.05 [H-C(4')]	→	6.20 [st, H-C(1')]
	→	4.14 [st, H-C(5')]

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O): 14.17 [q, $\text{H}_3\text{C-C}(5)$]; 33.40, 37.39 [2t, $\text{C}(6')$, $\text{C}(7')$]; 47.80 [t, $\text{C}(2')$]; 73.70 [d, $\text{C}(5'')$]; 87.52 [d, $\text{C}(1')$]; 88.07 [s, $\text{C}(3')$]; 90.58 [d, $\text{C}(4')$]; 114.25 [s, $\text{C}(5)$]; 139.85 [d, $\text{C}(6)$]; 154.32 [s, $\text{C}(2)$]; 169.11 [s, $\text{C}(4)$]

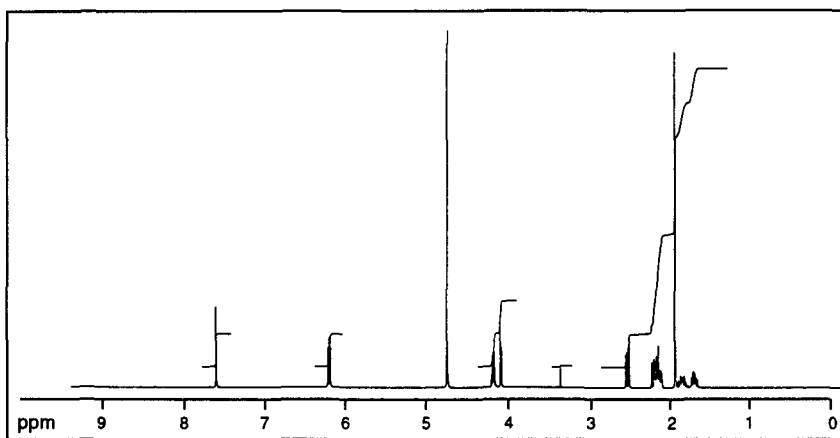
IR(KBr): 3520m, 3500-3200m, 3170m, 3040m, 2940m, 2840w, 1710s, 1670s, 1480s, 1465m, 1440m, 1410m, 1390m, 1375m, 1360w, 1335w, 1305m, 1290s, 1280s, 1265s, 1215m, 1195w, 1155w, 1130m, 1110m, 1075s, 1050s, 1015w, 980s, 965s, 950m, 905w, 895w, 850m, 825m, 780w, 755w, 675m, 660w, 615w, 600w

MS(EI $^+$): 268(0.5, M^+), 143(21), 127(11), 126(14), 99(28), 55(18), 43(12), 32(21), 29(10), 28(100), 18(43), 17(10)

Summenformel $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5$ (268.27)

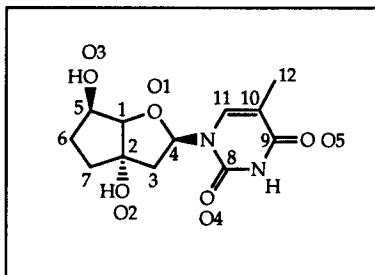
EA: berechnet: C 53.68% H 6.01% N 10.44%

gefunden: C 53.22% H 6.02% N 10.41%



^1H -NMR (400 MHz, D_2O) des Bicyclothymidins **19 β**

RÖNTGENSTRUKTURANALYSE:

Spacegroup $P2_12_12_1$ Cell (Å): $a=5.970$ $b=14.265$ $c=14.368$ $V=1223.6 \text{ \AA}^3$ $Z=4$

F(000): 508

 $\mu(\text{cm}^{-1})$: 001 $d_x(\text{g cm}^{-3})$: 1.46

Orthorhombic space group $P2_12_12_1$, $Z=4$, with cell dimensions $a=5.970$, $b=14.265$, $c=14.368$ Å. From a crystal of approximate size $0.3 \times 0.3 \times 0.2$ mm 1713 independent reflexions were measured on an *Enraf Nonius CAD4* diffractometer with Mo K_α radiation ($\lambda=0.7107$ Å, $\theta < 25^\circ$) and graphite monochromator. The structure was solved by direct methods with SHELXS-86 (G.M. Sheldrick, C. Kruger and R. Goddard, Crystallographic Computing 3, Oxford University Press, 1985, pp. 175-189). Non-hydrogen atoms were refined anisotropically and H-atoms isotropically with full matrix least-squares analysis (SHELX76, G.M. Sheldrick, SHELX76. Program for Crystal Structure Determination, University of Cambridge, England) using 1387 reflexions with $I > 3 \sigma(I)$. The weighting scheme applied was $s(F)^{-2}$. Final agreement factors are $R=0.031$ and $R_w=0.028$.

Bindungslängen in Å (Standardabweichungen in Klammern):

C01-C02	1.549 (3)	C01-C05	1.532 (3)	C01-O1	1.442 (2)
C02-C03	1.534 (3)	C02-C07	1.528 (3)	C02-O2	1.423 (3)
C03-C04	1.508 (3)	C04-N1	1.450 (3)	C04-O1	1.433 (2)
C05-C06	1.520 (4)	C05-O3	1.424 (3)	C06-C07	1.533 (4)
C08-N1	1.382 (3)	C08-N2	1.370 (3)	C08-O4	1.217 (3)
C09-C10	1.448 (3)	C09-N2	1.382 (3)	C10-C11	1.340 (3)
C10-C12	1.498 (3)	C11-N1	1.387 (3)		

Bindungswinkel in Grad:

C02-C01-C05	106.1 (2)	C02-C01-O1	106.8 (2)	C05-C01-O1	111.4 (2)
C01-C02-C03	103.1 (2)	C01-C02-C07	105.0 (2)	C01-C02-O2	109.6 (2)
C03-C02-C07	114.5 (2)	C03-C02-O2	110.6 (2)	C07-C02-O2	113.3 (2)
C02-C03-C04	101.2 (2)	C03-C04-N1	117.1 (2)	C03-C04-O1	104.0 (2)

N1-C04-01	108.6(2)	C01-C05-C06	104.5(2)	C01-C05-03	114.5(2)
C06-C05-03	115.5(2)	C05-C06-C07	101.9(2)	C02-C07-C06	103.8(2)
N1-C08-N2	114.3(2)	N1-C08-04	124.1(2)	N2-C08-04	121.6(2)
C10-C09-N2	115.5(2)	C09-C1 0-C11	117.9(2)	C09-C1 0-C12	118.6(2)
C11-C10-C12	123.4(2)	C10-C11-N1	123.3(2)	C04-N1-C08	117.7(2)
C04-N1-C11	120.5(2)	C08-N1-C11	121.5(2)	C08-N2-C09	127.4(2)
C01-01-C04	105.5(1)				

Torsionswinkel in Grad:

C05-C01-C02-C03	-115.7(1)	C05-C01-C02-C07	4.5(1)	C05-C01-C02-02	126.5(2)
01-C01-C02-C03	3.2(1)	01-C01-C02-C07	123.3(1)	01-C01-C02-02	-114.6(1)
C02-C01-C05-C06	21.9(2)	C02-C01-C05-03	149.3(2)	01-C01-C05-C06	-93.9(2)
01-C01-C05-03	33.5(2)	C02-C01-01-C04	23.9(1)	C05-C01-01-C04	139.3(2)
C01-C02-C03-C04	-27.2(2)	C07-C02-C03-C04	-140.7(2)	02-C02-C03-C04	89.8(2)
C01-C02-C07-C06	-29.0(2)	C03-C02-C07-C06	83.3(2)	02-C02-C07-C06	-148.6(2)
C02-C03-C04-N1	162.8(2)	C02-C03-C04-01	43.1(2)	C03-C04-N1-C08	130.0(2)
C03-C04-N1-C11	-56.3(2)	01-C04-N1-C08	-112.8(2)	01-C04-N1-C11	61.0(2)
C03-C04-01-C01	-42.4(2)	N1-C04-01-C01	-167.8(2)	C01-C05-C06-C07	-39.7(2)
03-C05-C06-C07	-166.4(2)	C05-C06-C07-C02	42.6(2)	N2-C08-N1-C04	175.3(2)
N2-C08-N1-C11	1.6(2)	04-C08-N1-C04	-6.8(2)	04-C08-N1-C11	179.5(2)
N1-C08-N2-C09	-3.2(2)	04-C08-N2-C09	178.8(2)	N2-C09-C10-C11	-2.2(2)
N2-C09-C10-C12	177.2(2)	05-C09-C10-C11	178.5(2)	05-C09-C10-C12	-2.1(2)
C1 0-C09-N2-C08	3.5(2)	05-C09-N2-C08	-177.1(2)	C09-C1 0-C11-N1	1.0(2)
C12-C10-C11-N1	-178.4(2)	C10-C11-N1-C04	-174.2(2)	C10-C11-N1-C08	-0.7(2)

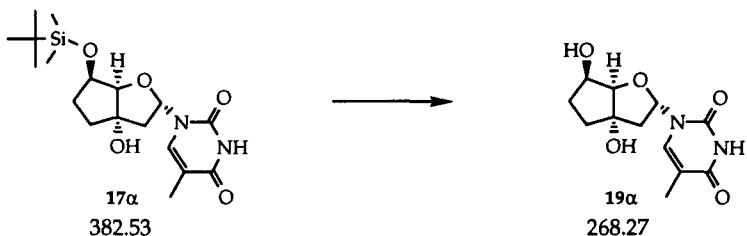
Intermolekulare Geometrie:

N2(x, y, z)	02(1.5-x 1-y, .5+z)	2.78 Å
H(N2)(x, y, z)	02(1.5-x 1-y, .5+z)	1.88 Å
O2(x, y, z)	05(2-x, .5+y, .5-z)	2.70 Å
H(O2)(x, y, z)	05(2-x, .5+y, .5-z)	1.82 Å
O1(x, y, z)	03(-.5+x, .5-y, -z)	3.02 Å
O1(x, y, z)	H(03)(-.5+x, .5-y, -z)	2.21 Å

Koordinaten:

Atom	x/a	y/b	z/c	U(U11)	U22	U33	U23	U13	U12
C01	1.0200(4)	.4228(1)	-.0512(1)	.026(1)	.030(1)	.025(1)	.002(1)	-.003(1)	.002(1)
C02	1.1662(4)	.5059(2)	-.0177(1)	.033(1)	.026(1)	.027(1)	.004(1)	-.004(1)	-.002(1)
C03	1.1787(4)	.4907(2)	.0879(2)	.034(1)	.033(1)	.029(1)	.004(1)	-.009(1)	-.004(1)
C04	.9629(4)	.4387(2)	.1055(2)	.034(1)	.031(1)	.024(1)	.000(1)	-.003(1)	.001(1)
C05	1.1714(4)	.3627(2)	-.1133(2)	.040(1)	.033(1)	.034(1)	-.003(1)	.003(1)	.003(1)
C06	1.4081(5)	.3881(2)	-.0834(2)	.032(1)	.053(2)	.064(2)	-.012(2)	.011(1)	.001(1)
C07	1.3894(4)	.4942(2)	-.0684(2)	.034(1)	.046(1)	.046(1)	.001(1)	.007(1)	-.012(1)
C08	.7532(4)	.4037(1)	.2456(1)	.033(1)	.030(1)	.028(1)	.000(1)	-.005(1)	-.003(1)
C09	.8853(4)	.2792(1)	.3515(1)	.039(1)	.026(1)	.032(1)	.003(1)	-.002(1)	-.001(1)
C10	1.0817(4)	.2673(1)	.2935(1)	.034(1)	.026(1)	.033(1)	-.001(1)	-.002(1)	.003(1)
C11	1.1005(4)	.3214(1)	.2176(1)	.030(1)	.030(1)	.031(1)	-.003(1)	.003(1)	.001(1)
C12	1.2538(5)	.1963(2)	.3216(2)	.046(2)	.041(1)	.055(2)	.009(1)	.003(2)	.013(1)
N1	.9435(3)	.3886(1)	.1930(1)	.032(1)	.0304(9)	.0254(9)	.0038(8)	.0010(9)	.0019(9)
N2	.7387(3)	.3487(1)	.3237(1)	.033(1)	.0309(9)	.029(1)	.0032(8)	.006(1)	.004(1)

INTERMOLECULAR BOND 01	H03*	2.208	3-1. 0. 0.
INTERMOLECULAR BOND 02	HN2*	1.883	2 1. 1.-1.
INTERMOLECULAR BOND 05	H02*	1.815	4 2.-1. 0.
INTERMOLECULAR BOND HN2	02*	1.883	2 1. 1. 0.
INTERMOLECULAR BOND H02	O5*	1.815	4 2. 0. 0.
INTERMOLECULAR BOND H03	01*	2.208	3 0. 0. 0.

6.6 (5'R)-1-(2'-deoxy-3',5'-ethano- α -D-ribofuranosyl) thymin 19 α 

In Analogie zu 19 β erhielt man aus 638 mg (1.67 mmol) der Verbindung 17 α gelöst in 15 ml THF und 740 mg (2.345 mmol; 1.4eq.) Tetrabutylammoniumfluorid-trihydrat (17 Tage gerührt) nach Chromatographie an 20 g Silikagel (\emptyset 1.5 cm; CH₂Cl₂/Methanol 6:1) und Kristallisation aus (Methanol/Diethylether 4:1; Pentan: isotherme Destillation) 345 mg (77%) des α -Bicyclothyminidins 19 α als farblose Kristalle.

Smp.: >220° dec.

DC(CH₂Cl₂/Methanol 6:1): R_f 0.36

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +35.1$ (c=0.8, Methanol); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +25.0$ (c=0.7, H₂O)

UV(H₂O): 267(9923)

¹H-NMR(300 MHz, D₂O): 1.57-1.75, 1.99-2.08 [2m, 4H, H₂C(6'), H₂C(7')]; 1.84 [d, J=1.2, 3H, H₃C-C(5)]; 2.38 [dd, J=4.3, J=14.7, 1H, H-C(2')]; 2.58 [dd, J=7.0, J=14.7, 1H, H-C(2')]; 4.10-4.17 [m, 1H, H-C(5')]; 4.37 [d, J=5.3, 1H, H-C(4')]; 6.15 [dd, J=4.3, J=7.0, 1H, H-C(1')]; 7.69 [d, J=1.2, 1H, H-C(6)]

Differenz-NOE (300 MHz, D₂O)

6.17 [H-C(1')]	→	7.70 [st, H-C(6)]
		→ 2.53-2.62 [m, H β -C(2')]
4.39 [H-C(4')]	→	7.70 [st, H-C(6)]
		→ 4.10-4.20 [st, H-C(5')]

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): 14.21 [q, H₃C-C(5)]; 32.89, 37.91 [2t, C(6'), C(7')]; 48.82 [t, C(2')]; 74.39 [d, C(5')]; 88.31 [s, C(3')]; 91.25, 92.74 [2d, C(1'), C(4')]; 113.63 [s, C(5)]; 142.31 [d, C(6)]; 154.30 [s, C(2)]; 169.26 [s, C(4)]

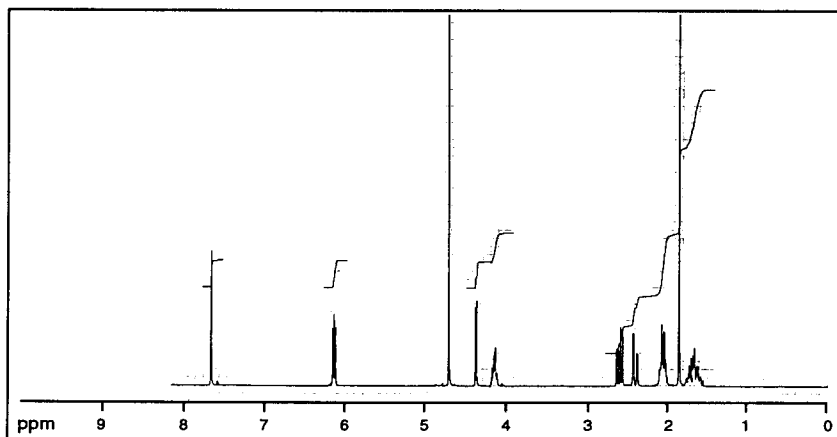
IR(KBr): 3600-3400m br., 3165w, 3040w, 2950w, 2820w, 1685s, 1470m, 1275m, 1115m, 1075m, 1065m, 1000w, 965w, 765w,

MS(EI⁺): 268(1.7, M⁺), 143(79), 127(39), 126(54), 125(39), 124(10), 113(10), 110(16), 99(100), 97(18), 96(10), 83(19), 82(11), 81(20), 71(24), 70(10), 69(12), 67(10), 57(15), 55(48), 54(18), 53(13), 45(26), 44(19), 43(31), 42(11), 41(19), 39(14)

Summenformel: C₁₂H₁₆N₂O₅ (268.27)

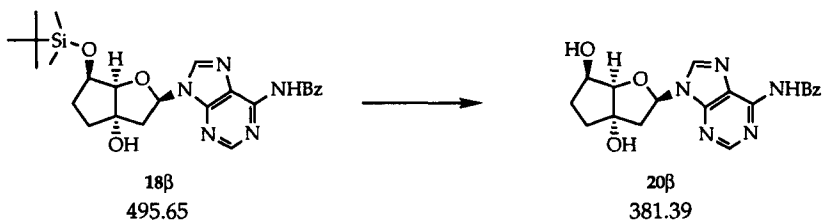
EA: berechnet: C 53.73% H 6.01% N 10.44%

gefunden: C 53.52% H 6.01% N 10.43%



¹H-NMR (300 MHz, D₂O) des α -Bicyclothymidins **19 α**

6.7 (5'R)-N⁶-Benzoyl-9-(2'-deoxy-3',5'-ethano-β-D-ribofuranosyl)adenin 20β



Eine Lösung von 852 mg (1.72 mmol) der Verbindung **18β** in 20 ml THF wurde mit 651 mg (2.1 mmol; 1.24eq.) Tetrabutylammoniumfluorid-trihydrat versetzt. Nach 12 h Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch noch 5 Stunden bei 50°C weitergerührt. Zur nun zweiphasigen Reaktionslösung wurden 500 mg (9.3 mmol) Ammoniumchlorid zugefügt, wobei wieder eine homogene Lösung entstand, und das Reaktionsgemisch nach weiteren 30 min. Rühren eingengt. Der Rückstand wurde an 70 g Silikagel (Ø 3cm; CH₂Cl₂/Methanol 9:1) chromatographiert und die Produktfraktionen (noch verunreinigt mit Tetrabutylammoniumsalzen; I₂ angefärbt) eingedampft. Kristallisation aus 10 ml Wasser lieferte nach Trocknen am HV während 15h 530 mg (81%) des β-N⁶-Benzoylbicycloadenins **20β** in Form von farblosen Nadeln.

Smp.: > 125° dec.

DC(CH₂Cl₂/Methanol 9:1): R_f 0.47

[α]_D²⁵ = +16.8 (c=1.19, Methanol)

UV(Methanol): 279(19377)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): 1.66-1.75, 1.90-2.02, 2.10-2.16 [3m, 4H, H₂C(6'), H₂C(7')]; 2.63 [dd, J=5.6, J=13.4, 1H, H-C(2')]; 2.70 [dd, J=9.6, J=13.3, 1H, H-C(2')]; 4.12-4.17 [m, 2H, H-C(4'), H-C(5')]; 6.55 [dd, J=5.6, J=9.6, 1H, H-C(1')]; 7.53-7.57 [m, 2H, H-C_{ar}]; 7.63-7.67 [m, 1H, H-C_{ar}]; 8.08 [d, J=7.2, 1H, H-C_{ar}]; 8.67 [s, 1H, H-C(8)]; 8.69 [s, 1H, H-C(2)]

Differenz-NOE (300MHz, CD₃OD):

4.12-4.20 [H-C(4'/5')]	→	6.57 [st, H-C(1')]
	→	2.10-2.20, 1.92-2.00, 1.68-1.74 [m, w, w, H-C(6'), H-C(7')]
6.58 [H-C(1')]	→	8.70 [st, H-C(8)]
	→	4.14-4.20 [m, H-C(4'/5')]

—> 2.60-2.70 [w, H-C(2')]

^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD): 33.10, 36.26 [2t, C(6'), C(7')]; 48.00 [t, C(2')]; 72.86 [d, C(5')]; 87.33 [s, C(3')]; 87.65 [d, C(1')]; 91.65 [d, C(4')]; 125.33 [s, C(5)]; 129.47, 129.80, 133.94 [d, C_{ar}]; 135.01 [s, C_{ar}]; 144.34 [d, C(8)]; 151.22 [s, C(4)]; 153.18 [s, C(6)]; 153.21 [d, C(2)]; 168.12 [s, CO]

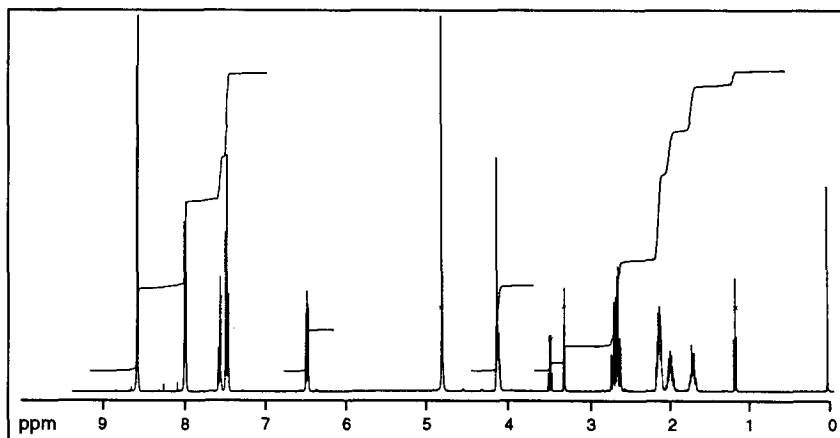
IR(KBr): 3600-3000s *br.*, 2950*w*, 1700*s*, 1660*w*, 1610*s*, 1590*s*, 1525*m*, 1480*m sh.*, 1455*s*, 1440*m*, 1360*m*, 1320*m sh.*, 1305*m*, 1250*s*, 1190*w*, 1160*w*, 1120*m*, 1095*m*, 1075*m*, 1050*m*, 1040*w*, 1010*w*, 985*w*, 960*w*, 900*w*, 820*w*, 800*w*, 755*w*, 710*m*, 700*m*, 640*w*

MS(FAB⁺): 383(12), 382(36), 381(3.1, M⁺), 266(13), 242(11), 241(27), 240(100), 136(16), 105(61), 99(17), 77(19)

Summenformel: $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_4$ (+1H₂O aus ^1H -NMR: 399.41)

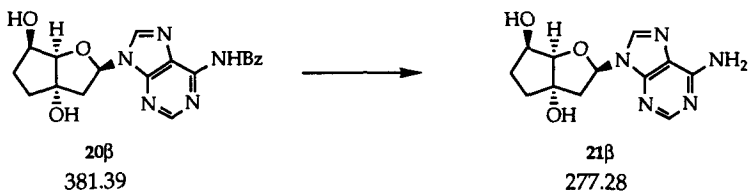
EA: berechnet: C 57.14% H 5.30% N 17.53%

gefunden: C 57.29% H 5.18% N 17.56%



^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) des N^6 -Benzoyl-Bicyclodeoxyadenosins **20 β**

6.8 (5'R)-9-(2'-deoxy-3',5'-ethano-β-D-ribofuranosyl) adenin 21β



In einem verschraubbaren Gläschen wurden 198 mg (0.519 mmol) Benzoyl geschütztes β-Bicycloadenin 20β in 4 ml konz. Ammoniak (25%) gelöst und während 2.5 Stunden bei 55° C gehalten. Die klare Reaktionslösung wurde am RV eingedampft, der Rückstand in wenig Methanol gelöst und an 2 g Silikagel adsorbiert. Chromatographie an 5 g Silikagel (Ø 1 cm; CH₂Cl₂/Methanol 3:1, eine Mischfraktion wurde ein zweites Mal mit Verhältnis 5:1 gereinigt) lieferte ein glasartiges Produkt, welches aus Methanol/Diethylether 1:4 | Pentan kristallisiert werden konnte. Es wurden 122 mg (85%) des freien Bicycloadenin Monomern 21β als farblose Kristalle erhalten.

Smp.: >175° dec.

DC(CH₂Cl₂/Methanol 3:1): R_f 0.57

$[\alpha]_D^{25} = +9.3$ (c=0.53, H₂O)

UV(H₂O): 258(13971)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): 1.64-1.72, 1.80-1.90, 2.08-2.16 [3m, 4H, H₂C(6'), H₂C(7')]; 2.50 [dd, J=10.0, J=13.9, 1H, H-C(2')]; 2.63 [dd, J=5.3, J=13.9, 1H, H-C(2')]; 4.16-4.22 [m, 2H, H-C(4'), H-C(5')]; 6.26 [dd, J=5.3, J=10.0, 1H, H-C(1')]; 8.04 [s, 1H, H-C(2)]; 8.21 [s, 1H, H-C(8)]

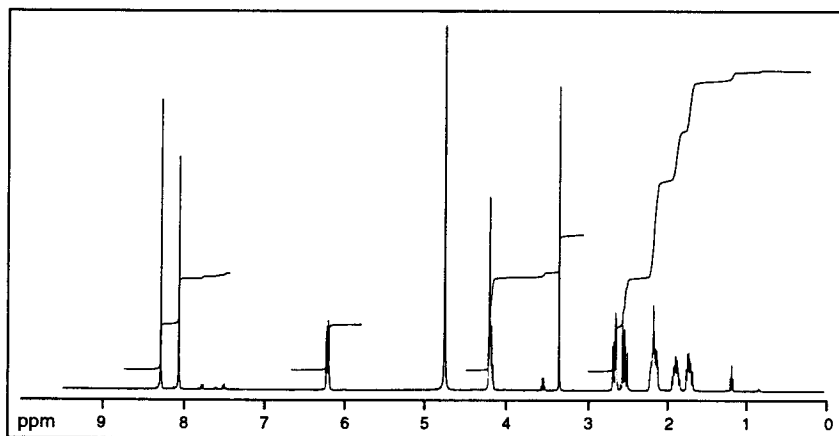
Differenz-NOE (300 MHz, D₂O)

8.17 [H-C(8)]	→	6.22 [H-C(1')]
	→	2.45 [H _β -C(2')]
4.10-4.20		
[H-C(4'), H-C(5')]	→	6.23 [st, H-C(1')]
		2.15-2.05, 1.65-1.60 [st, m, H-C(7'), H-C(6')]
6.21 [H-C(1')]	→	8.17 [st, H-C(8)]
	→	4.20-4.10 [m, H-C(5'), H-C(4')]
	→	2.58 [w, H _α -C(2')]

^{13}C -NMR(100 MHz, D_2O): 33.60, 36.92 [2t, C(6'), C(7')]; 48.35 [t, C(2')]; 73.70 [d, C(5')]; 87.57 [d, C(1')]; 88.60 [s, C(3')]; 91.35 [d, C(4')]; 121.04 [s, C(5)]; 142.45 [d, C(8)]; 150.88 [s, C(4)]; 155.03 [d, C(2)]; 157.84 [s, C(6)]

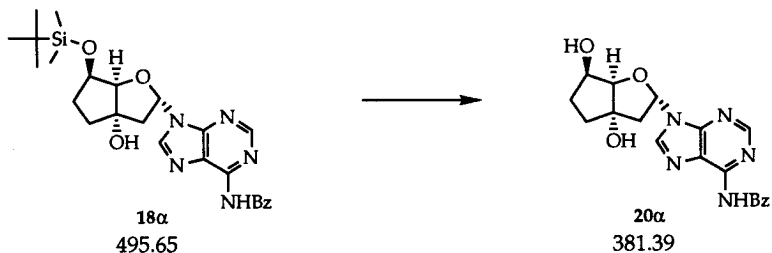
IR(KBr): 3600-2500s *br.*, 1640s, 1600s, 1575s, 1475m, 1420m, 1370m, 1330m, 1300m, 1250m, 1210m, 1165m, 1155m, 1010m, 980w, 960w, 895w, 835w, 810w, 800w, 730w, 650m

MS(FAB+): 370(12), 279(21), 278(63), 277(21, M^+), 242(16), 186(10), 136(40), 75(30), 57(19)



^1H -NMR (400 MHz, D_2O) von β -Bicyclodeoxyadenosin 21 β

6.9 (5'R)-N⁶-Benzoyl-9-(2'-deoxy-3',5'-ethano- α -D-ribofuranosyl)adenin 20 α



Zu einer Lösung von 1.22 g (2.47 mmol) silyliertem bcA^{Bz}-Nucleosid **18 α** in Tetrahydrofuran wurden bei Raumtemperatur 936 mg (2.97 mmol; 1.2eq.) Tetrabutylammoniumfluorid-trihydrat und 169 μ l (2.96 mmol; 1.2eq.) Essigsäure hinzugegeben. Die nunmehr farblose Lösung wurde bei Raumtemperatur während 95 Stunden gerührt, dann weitere 886 mg (2.81 mmol; 1.1eq.) TBAF-Trihydrat zugesetzt und das Reaktionsgemisch noch 48 Stunden bei 55° C weitergerührt. Es wurden 4.5 g Silikagel hinzugegeben, das Lösungsmittel am RV entfernt und an 70 g Silikagel (CH₂Cl₂/Methanol 9:1) chromatographiert. Produktthaltige Fraktionen wurden vereinigt und eingengt. Der Rückstand wurde in ~10 ml Methylenchlorid aufgenommen, mit ~2 ml Methanol, sowie ~2 ml Diethylether versetzt, bei Raumtemperatur 30 Minuten stehengelassen und die Kristalle abfiltriert. Das desilylierte Bicycloadenin **20 α** wurde aus Methanol/Diethylether 4:1| Pentan (isotherme Destillation) umkristallisiert, es resultierten 765 mg (81%) **20 α** in farblosen Plättchen.

Smp.: 91°-93°

DC(CH₂Cl₂/Methanol 9:1): R_f 0.37

$[\alpha]_D^{25} = +52.8$ (c=1.08, Methanol)

UV(Methanol): 280(19130)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): 1.71-1.81, 2.02-2.15 [2m, 4H, H₂C(6'), H₂C(7')]; 2.75 [dd, J=7.4, J=14.7, 1H, H-C(2'')], 2.84 [dd, J=2.5, J=14.7, 1H, H-C(2'')]; 4.11 [dt, J_t=5.4, J_d=8.4, 1H, H-C(5')]; 4.35 [d, J=5.0, 1H, H-C(4')]; 6.63 [dd, J=2.5, J=7.3, 1H, H-C(1'')]; 7.53-7.58 [m(triplettoid), 2H, H-C_{ar}]; 7.63-7.67 [m, 1H, H-C_{ar}]; 8.08 [d, J=8.3, 2H, H-C_{ar}]; 8.71 [s, 1H, H-C(2)]; 8.76 [s, 1H, H-C(8)]

Differenz-NOE (300 MHz, CD₃OD):

4.37 [H-C(4')] → 8.78 [st, H-C(8)]

- 6.65 [w, H-C(1')]
 → 4.12 [st, H-C(5')]
 6.66 [H-C(1')] → 8.78 [st, HC(8)]
 → 2.70-2.82 [w, H-C(2')]

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD): 32.11, 37.25 [2t, C(6'), C(7')]; 48.52 [t, C(2')]; 73.37 [d, C(5')]; 87.22 [s, C(3')]; 88.34, 92.64 [2d, C(1'), C(4')]; 125.24 [s, C(5)]; 129.47, 129.80, 133.94 [d, C_{ar}]; 135.03 [s, C_{ar}]; 144.96 [d, C(8)]; 151.22 [s, C(4)]; 153.01 [d, C(2)]; 168.14 [s, CO]

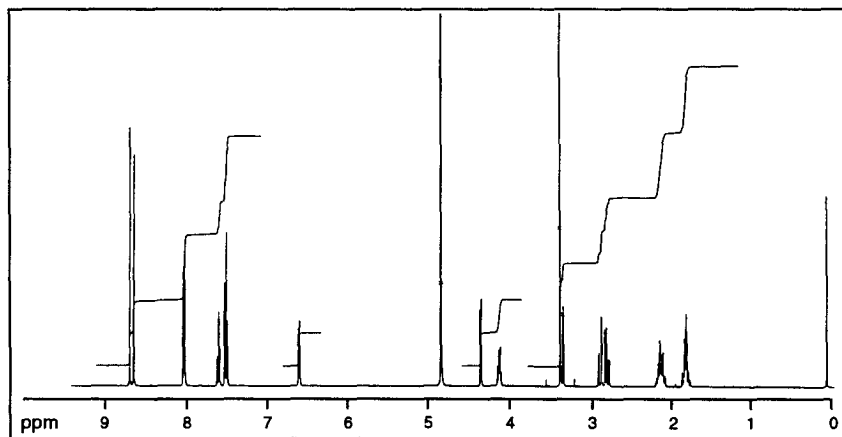
IR(KBr): 3600-3000s *br.*, 2950*m*, 1705*s*, 1610*s*, 1580*s*, 1510*s*, 1485*s*, 1455*s*, 1415*m*, 1400*m*, 1355*m*, 1335*s*, 1300*s*, 1250*s*, 1230*s*, 1200*m*, 1160*w*, 1130*m*, 1070*s*, 1025*m*, 1000*w*, 985*w*, 965*w*, 930*w*, 900*w*, 800*m*, 750*w*, 710*s*, 690*m*, 670*m*, 645*m*

MS(FAB⁺): 763(4), 383(20), 382(64), 381(5.8, M⁺), 266(13), 241(24), 240(100), 154(25), 137(18), 136(25), 105(47), 99(12), 89(10), 77(17)

Summenformel: C₁₉H₁₉N₅O₄ (+ 1.14 CH₃OH aus ¹H-NMR)

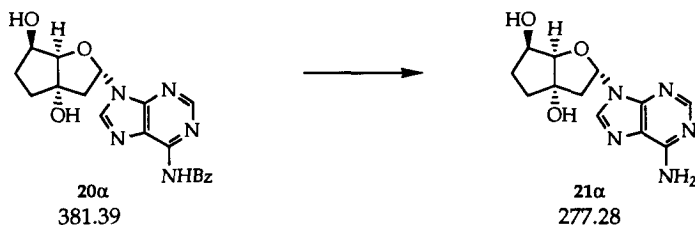
EA: berechnet: C 57.88% H 5.68% N 16.75%

gefunden: C 57.65% H 5.51% N 16.97%



¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) von N⁶-Benzoyl-Bicyclodeoxyadenosin 21α

6.10 (5'R)-9-(2'-deoxy-3',5'-ethano- α -D-ribofuranosyl) adenin 21 α



Eine Lösung von 125 mg (0.328 mmol) α -N⁶-Benzoyl-bicycloadenosin 20 α in 3 ml konz. Ammoniak (25%) wurde während 3.75 Stunden bei 50° gehalten. Die Reaktionslösung wurde am RV eingedampft, an 1.5 g Silikagel adsorbiert und an 6 g Silikagel (\varnothing 1cm; Dichlormethan/Methanol 3:1) chromatographisch gereinigt. Das Produkt (70 mg; 77%) wurde aus Methanol/Pentan (isotherme Destillation) umkristallisiert. Man erhielt 62 mg (68%) des debenzoylierten α -Bicycloadenosins 21 α in farblosen Nadeln.

DC(CH₂Cl₂/Methanol 3:1): R_f 0.47

Smp.: 109°-111°

$[\alpha]_D^{25} = +69.8$ (c=0.46, H₂O)

UV(H₂O): 259(13999)

¹H-NMR(400 MHz, D₂O): 1.64-1.76, 2.04-2.13 [2m, 4H, H₂C(6'), H₂C(7')]; 2.73-2.90 [m, 2H, H₂C(2')]; 4.13-4.18 [m, 1H, H-C(5')]; 4.32 [d, J=5.2, 1H, H-C(4')]; 6.32 [dd, J=3.9, J=6.1, 1H, H-C(1')]; 8.02 [s, 1H, H-C(2)]; 8.25 [s, 1H, H-C(8)]

Differenz-NOE (300 MHz, D₂O)

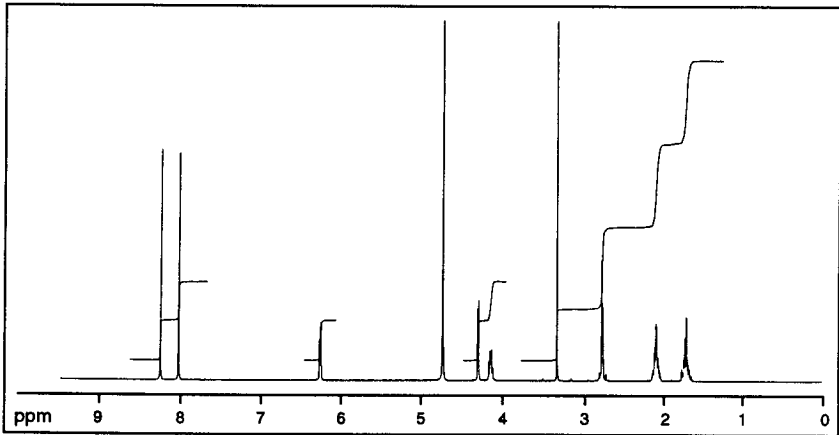
4.22 [H-C(4')]	→	8.18 [st, H-C(8)]
	→	7.95 [w, H-C(2)]
	→	6.25 [w, H-C(1')]
	→	4.07 [m, H-C(5')]
6.25 [H-C(1')]	→	8.18 [st, H-C(8)]
	→	7.95 [w, H-C(2)]
	→	4.25 [w, H-C(4')]
	→	2.68 [m, H-C(2')]
8.18 [H-C(8)]	→	6.25 [st, H-C(1')]
	→	4.25 [st, H-C(4')]
	→	2.68 [m, H-C(2')]
7.95 [H-C(2)]	→	6.25 [w, H-C(1')]

4.25 [m, H-C(4')]

^{13}C -NMR(100 MHz, D_2O): 32.65, 37.93 [2t, C(6'), C(7')]; 49.01 [t, C(2')]; 74.34 [d, C(5')]; 88.66 [s, C(3')]; 89.27, 92.41[2d, C(1'), C(4')]; 121.26 [s, C(5)]; 143.70 [d, C(8)]; 150.31 [s, C(4)]; 154.74 [d, C(2)]; 157.90 [s, C(6)]

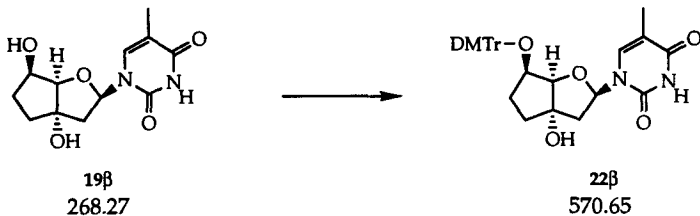
IR(KBr): 3600-2600s *br.*, 2960*m*, 2940*m*, 1685*s*, 1645*s*, 1610*s*, 1575*m*, 1475*m*, 1420*m*, 1370*m*, 1335*s*, 1300*s*, 1245*m*, 1225*m*, 1200*s*, 1105*s*, 1060*s*, 995*w*, 960*w*, 930*w*, 910*w*, 795*w*, 735*w*, 710*w*, 650*m*

MS(FAB+): 370(7), 279(11), 278(35), 277(21, M^+), 186(10), 136(21), 75(27), 57(17)



^1H -NMR (400 MHz, D_2O) von α -Bicyclodeoxyadenosin **21** α

6.11 (5'R)-1-[2'-deoxy-5'-O-[(4,4'-dimethoxytriphenyl)methyl]-3',5'-ethano- β -D-ribofuranosyl] thymin 22 β



Eine Lösung von 305 mg (1.137 mmol) bcT-Nucleosid **19 β** in 5 ml abs. Pyridin (musste warm gelöst werden) wurde am RV zur Trockene eingedampft, wieder in 6.1 ml Pyridin aufgenommen, unter Argon gesetzt und dann bei Raumtemperatur mit 772 mg (1.706 mmol; 1.5eq.) Dimethoxytrityl-trifluormethansulfonat versetzt. Nach 5.25 Stunden und weiteren Zugaben von DMTr-triflat (105' 0.5eq.; 165' 0.12eq.) wurde die Reaktionslösung mit 6 ml ges. NaHCO₃ Lösung und 10 ml CH₂Cl₂ versetzt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase noch dreimal mit je 10 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden nach einmaligem Waschen mit 30 ml ges. NaHCO₃ Lösung über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am RV entfernt. Der Rückstand wurde an 20 g Silikagel (\varnothing 2 cm; Hexan/Ethylacetat 1:9) chromatographiert (beim Auftragen der im Laufmittel gelösten Rohsubstanz kristallisierte das Produkt auf der Säule aus. Es wurde dennoch weiter eluiert und am Schluss der Chromatographie wurde der oberste Teil der trocken geblasenen Säule abgetragen, in CH₂Cl₂ aufgenommen, filtriert und das Filtrat am RV eingedampft). Durch Kristallisation aus Ethylacetat/Hexan konnten 570 mg (88%) des tritylierten bcT **22 β** als mikrokristallines Pulver erhalten werden.

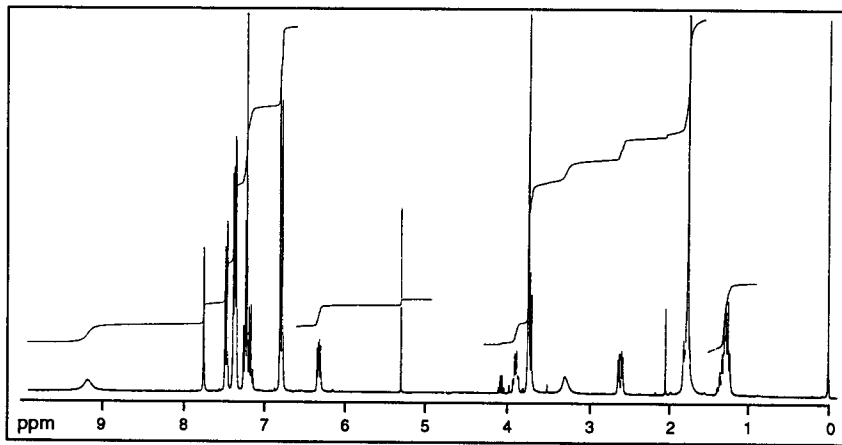
DC(Hexan/Ethylacetat 1:9): R_f 0.37

¹H-NMR(300 MHz, CDCl₃): 1.22-1.36, 1.70-1.82 [2m, 5H, H-C(2'), H₂C(6'), H₂C(7')]; 1.76 [d, J=1.1, 3H, H₃C-C(5)]; 2.62 [dd, J=5.1, J=13.8, 1H, H-C(2')]; 3.31 [s br., 1H, OH]; 3.75 [d, J=6.4, 1H, H-C(4')]; 3.78 [s, 6H, 2OCH₃]; 3.94 [dd, J=7.0, J=13.6, 1H, H-C(5')]; 6.35 [dd, J=5.2, J=9.3, 1H, H-C(1')]; 6.82 [dd, J=1.3, J=9.0, 4H, H-C_{ar}]; 7.18-7.31, 7.38-7.43 [2m, 7H, H-C_{ar}]; 7.52 [d, J=7.0, 2H, H-C_{ar}]; 7.80 [d, J=1.1, 1H, H-C(6)]; 9.27 [s br., 1H, HN(3)]

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): 12.46 [q, H₃C-C(5)]; 31.30, 34.48 [2t, C(6'), C(7')]; 47.44 [t, C(2')]; 55.25 [q, OCH₃]; 73.35 [d, C(5')]; 85.46 [d, C(1')]; 86.20, 87.22 [2s, C(3'), C(Ph)₃]; 88.89 [d, C(4')]; 111.32 [s, C(5)]; 113.21, 126.95, 127.90, 128.16 und 130.16 [d, C_{ar}]; 135.44 [d, C(6)]; 136.61, 136.77 und 145.54 [s, C_{ar}]; 150.46 [s, C(2)]; 158.68 [s, C-OCH₃]; 163.76 [s, C(4)]

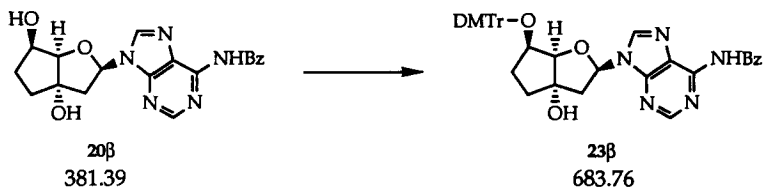
IR(CHCl₃): 3599w, 3393w, 2839w, 1687s, 1608m, 1509s, 1465m, 1374w, 1281w, 1120w, 1070m, 1037m, 1000w, 829w

MS(FAB⁺): 593(7.4, M⁺+ 23), 304(37), 303(100), 135(11), 77(10)



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) von 22β

6.12 (5'R)-N⁶-Benzoyl-9-[2'-deoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenyl)methyl]-3',5'-ethano-β-D-ribofuranosyl]-adenin 23β



Es wurden 505 mg (1.32 mmol) des N⁶-benzoylierten bcA-Nucleosids 20β in 10 ml Pyridin gelöst und bei Raumtemperatur mit 1.198g (2.64 mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl-trifluormethansulfonat (DMT-Tf) versetzt. Nach 30 min. wurden weitere 2.0 g (4.4 mmol) DMT-Tf zugegeben. Nach insgesamt 3h Reaktionszeit wurde das Rohgemisch in 100 ml Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit je 100 ml ges. NaHCO₃ Lösung extrahiert. Die wässrigen Phasen wurden noch einmal mit 100 ml Ethylacetat rückextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert, das Lösungsmittel am RV eingedampft und der Rückstand an 80 g Silikagel (Ø 3 cm) chromatographiert. Zuerst wurden mit Ethylacetat apolare Nebenprodukte eluiert, dann mit CH₂Cl₂/Methanol 9:1 das tritylierte bcA-Nukleosid 23β, welches nach Einengen und Trocknen am HV über Nacht in einer Menge von 770 mg (85 %) als leicht gelblicher Schaum anfiel.

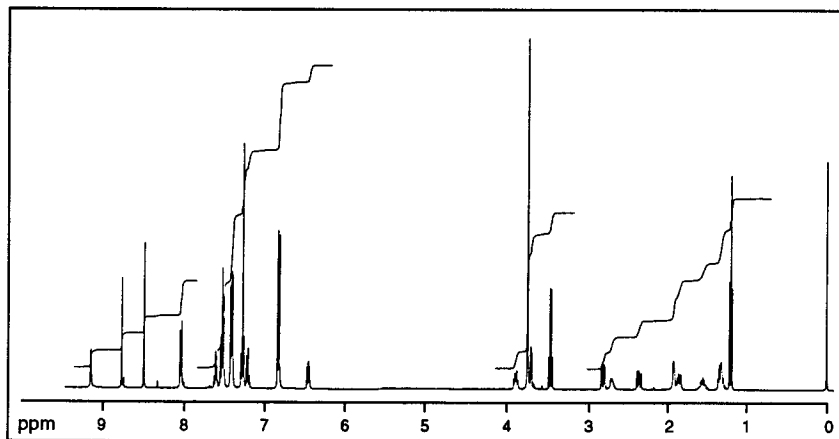
DC(Ethylacetat): R_f 0.37

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.28-1.36, 1.50-1.60, 1.83-1.88 [3m, 4H, H₂C(6'), H₂C(7')]; 2.35 [dd, J=8.7, J=13.7, 1H, H-C(2')]; 2.70 [s br., 1H, OH]; 2.81 [dd, J=5.5, J=13.7, 1H, H-C(2')]; 3.72 [d, J=5.9, 1H, H-C(4')]; 3.77 [s, 6H, OCH₃]; 3.89-3.95 [m, 1H, H-C(5')]; 6.43 [dd, J=5.5, J=8.7, 1H, H-C(1')]; 6.81 [d, J=8.6, 4H, H-C_{ar}]; 7.17-7.21 [m, 1H, H-C_{ar}]; 7.24-7.28 [m, 2H, H-C_{ar}]; 7.38-7.42 [m, 4H, H-C_{ar}]; 7.50-7.54 [m, 4H, H-C_{ar}]; 7.57-7.69 [m, 1H, H-C_{ar}]; 8.04 [d, J=7.2, 2H, H-C_{ar}]; 8.51, 8.79 [2s, 2H, H-C(2), H-C(8)]; 9.17 [s br., 1H, HN-C(6)]

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 30.79 [t, C(6')]; 35.23 [t, C(7')]; 48.90 [t, C(2')]; 55.24 [q, OCH₃]; 73.50 [d, C(5')]; 85.13 [d, C(1')]; 86.23, 87.10 [2s, C(3'), C(Ph)₃]; 89.05 [d, C(4')]; 113.18 [d, C_{ar}]; 123.20 [s, C(5)]; 126.89, 127.91, 128.19, 128.88, 130.16, 132.79 [d, C_{ar}]; 133.75 [s, C_{ar}]; 136.73, 136.81 [s, C_{ar}]; 141.18 [d, C(8)]; 145.52 [s, C_{ar}]; 149.44 [s, C(4)]; 151.34 [s, C(6)]; 152.62 [d, C(2)]; 158.62 [s, C-OCH₃]; 164.67 [s, CO]

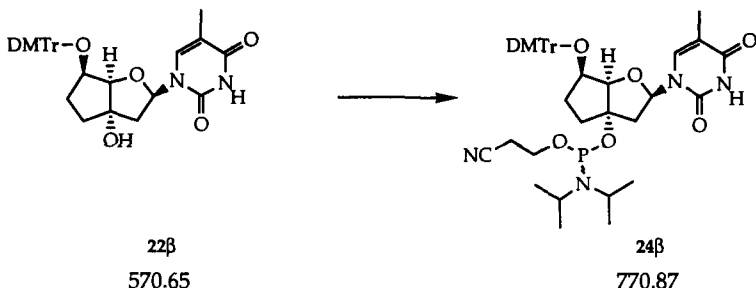
IR(KBr): 3600-3200m, 3000w, 2970w, 2950w, 2840w, 1700m, 1610s, 1580s, 1510s, 1485m, 1455s, 1400w, 1300s, 1250s, 1220s, 1175s, 1155w, 1115w, 1090m sh., 1070m, 1030m, 1010w, 1000w, 980w, 965w, 900w, 830m, 795w, 790w, 755m, 725w, 705m, 656w, 645w, 620w

MS(FAB⁺): 706(18, M⁺+ 23), 684(5, M⁺+1), 683(0.9, M⁺), 304(37), 303(100), 242(24), 240(31), 105(26), 77(10)



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) von 23β

6.13 (5'R)-1-{3'-O-[(2-cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphino]-2'-deoxy-5'-O-[(4,4'-dimethoxytriphenyl)methyl]-3',5'-ethano-β-D-ribofuranosyl}-thymidin 24β



Eine Suspension von 200 mg (0.350 mmol) des Nucleosids 22β in 2 ml THF wurde nacheinander bei RT unter Argonatmosphäre mit 360 μl (2.103 mmol; 6eq.) N,N-Diisopropylamin und 235 μl (1.053 mmol; 3 eq.) 2-cyanethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit versetzt, wobei sich die Lösung kurzzeitig vollständig klärte. Nach 90 Minuten wurde die Reaktionslösung mit 8 ml ges. NaHCO₃ Lösung versetzt und dreimal mit je 12 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Watte filtriert, am RV eingedampft. Chromatographie des Rückstandes an 20 g Silikagel (Ø 1.5 cm, Hexan/Ethylacetat/NEt₃ 10:20:1) lieferte 232 mg eines farblosen Schaumes, der in 2 ml CH₂Cl₂ gelöst und aus 100 ml nullgrädigem Pentan gefällt wurde. Nach Trocknen am HV resultierten 171 mg (63%) des Phosphoramidites 24β als weißes Pulver. Aus dem ¹H-NMR wurde ein ungefähres 1:1 Diastereomerenverhältnis bestimmt.

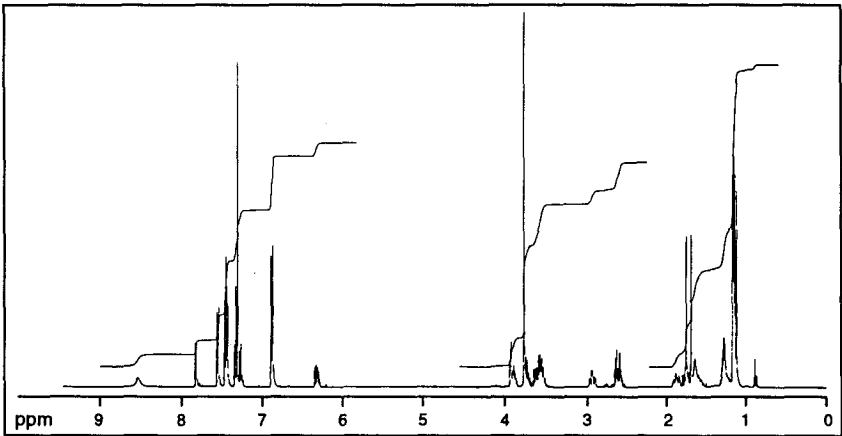
DC(Hexan/Ethylacetat 1:4): R_f 0.64

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.125, 1.142, 1.150, 1.157, 1.163, 1.167, 1.174, 1.179 [8s, 12H, 2(CH₃)₂CH]; 1.22-1.32 [m, 2H, H₂C(6'), H₂C(7')]; 1.51-1.65 [m, 2H, H₂C(6''), H₂C(7'')]; 1.70, 1.76 [2d, J=1.1, 3H, H₃C-C(5)]; 1.84-1.94 [m, 1H, H-C(2'')]; 2.58-2.67 [m, 2H, CH₂CN]; 2.91-2.99 [m, 1H, H-C(2')]; 3.56-3.70 [m, 3H, H-C_{i-Pr}, OCH₂]; 3.72-3.82 [m, 1H, H-C_{i-Pr}]; 3.80, 3.81 [2s, 6H, OCH₃]; 3.90-3.98 [m, 2H, H-C(4'), H-C(5')]; 6.28 [ddd, J=5.1, J_d=9.4, J=11.3, 1H, H-C(1')]; 6.83-6.86 [m, 4H, H-C_{ar}]; 7.21-7.39 [m, 3H, H-C_{ar}]; 7.40-7.44 [m, 4H, H-C_{ar}]; 7.52, 7.54 [2d, J=1.3, 2H, H-C_{ar}]; 7.80, 7.82 [2d, J=1.2, 1H, H-C(6)]; 8.54 [s br., 1H, HN(3)]

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 12.39, 12.49 [q, H₃C-C(5)]; 20.21, 20.28, 20.36 [t, CH₂-CN]; 24.22, 24.30, 24.51, 24.55, 24.57, 24.61 [q, H₃C_{i-Pr}]; 31.14, 31.37 [t, C(6')]; 32.94, 33.05, 33.43, 33.52 [t, J_{C-P}=10, C(7')]; 43.31, 43.33, 43.44 [d, C_{i-Pr}]; 45.73, 45.80, 45.86, 45.93 [t, J_{C-P}=7, C(2'')]; 55.26 [q, OCH₃]; 57.73, 57.82, 57.91, 58.00 [t, J_{C-P}=9, OCH₂]; 72.79, 72.90 [d, C(5')]; 85.64, 85.69 [d, C(1')]; 87.32, 87.36 [s, C(Ph)₃]; 88.05, 88.11, 88.37,

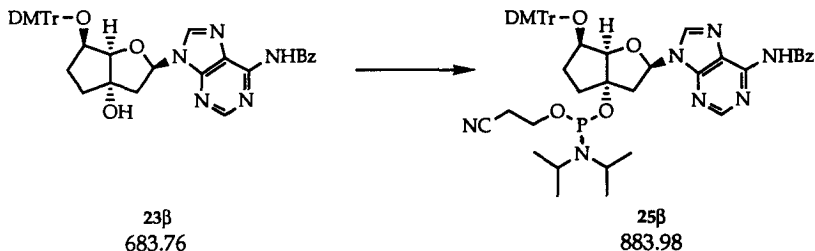
88.44 [d, $J_{C-P}=7$, H-C(4')]; 90.26, 90.37, 90.46 [s, C(3')]; 111.02, 111.06 [s, C(5)]; 113.22, 113.23 [d, C_{ar}]; 117.68, 117.85 [s, CN]; 126.97, 127.00, 127.95, 128.13, 128.19, 130.20 [d, C_{ar}]; 135.51, 135.63 [d, C(6)]; 136.49, 136.54, 136.67, 136.70 [s, C_{ar}]; 145.45, 145.50 [s, C_{ar}]; 150.07, 150.14 [s, C(2)]; 158.70 [s, C-OCH₃]; 163.70 [s, C(4)]

³¹P-NMR(161.9 MHz, CDCl₃): 141.97, 142.59



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) des Phosphoramidits 24β

6.14 (5'R)-N⁶-Benzoyl-9-(3'-O-[(2-cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphino]-2'-deoxy-5'-O-[(4,4'-dimethoxytriphenyl)methyl])-3',5'-ethano-β-D-ribofuranosyl)-adenin 25β



Eine Lösung von 998 mg (1.460 mmol) trityliertem bcA Nucleosid 23β in 15 ml Acetonitril wurde nacheinander bei RT mit 1 ml (5.841 mmol, 4eq.) N,N-Diisopropyl-N-ethylamin und 650 μl (2.914 mmol, 2eq.) 2-cyanethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit versetzt, wobei sich die gelbliche, klare Reaktionslösung trübte. Nach 1 Stunde Reaktionszeit wurde das Rohgemisch in 100 ml Ethylacetat aufgenommen und zweimal mit je 70 ml ges. NaHCO₃ Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Watte filtriert, eingeeengt und der Rückstand an 50 g Silikagel (Ø 2 cm; Hexan/Ethylacetat 1:4) chromatographiert. Nach Trocknen am HV über Nacht resultierten 980 mg (76 %) bcA Phosphoramidit 25β in Form eines farblosen Schaumes.

DC(Hexan/Ethylacetat 1:4): R_f 0.55

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.13-1.18 [m, 12H, 2CH(CH₃)₂]; 1.30-1.39, 1.52-1.72, 1.84-1.95 [3m, 4H, H₂C(6'), H₂C(7'')]; 2.26-2.35 [m, 1H, HC-CN]; 2.57-2.67 [m, 2H, H-C(2'), HC-CN]; 3.12-3.19 [m, 1H, H-C(2'')]; 3.55-3.74 [m, 3H, H-C_{i-Pr}, OCH₂]; 3.75-3.82 [m, 1H, H-C_{i-Pr}]; 3.78, 3.79 [2s, 6H, OCH₃]; 3.86-3.96 [m, 2H, H-C(4'), H-C(5'')]; 6.42 [dt, J_t=5.5, J_d=9.0, 1H, H-C(1'')]; 6.80-6.84 [m, 4H, H-C_{ar}]; 7.19-7.22 [m, 1H, H-C_{ar}]; 7.25-7.30 [m, 2H, H-C_{ar}]; 7.38-7.44 [m, 4H, H-C_{ar}]; 7.50-7.55 [m, 4H, H-C_{ar}]; 7.60-7.63 [m, 1H, H-C_{ar}]; 8.04 [d, J=7.2, 2H, H-C_{ar}]; 8.50, 8.51, 8.81, 8.82 [2x2s, 2H, H-C(2), H-C(8)]; 9.07 [s br., 1H, HN-C(6)]

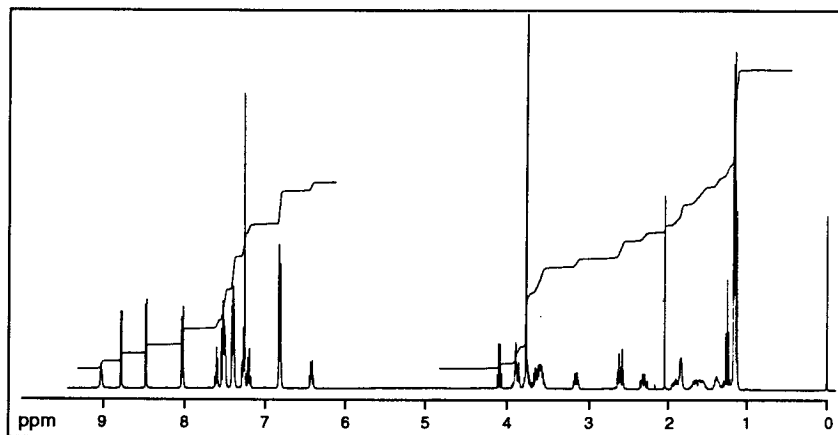
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 20.29, 20.37 [t, C-CN]; 24.27, 24.35, 24.53, 24.56, 24.59, 24.62 [q, H₃C(i-Pr)]; 30.41, 30.63 [t, C(6')]; 33.38, 33.49, 33.78, 33.88 [t, J_{C-P}=10, C(7'')]; 43.35, 43.39, 43.48, 43.51 [d, J_{C-P}=3.5, C_{i-Pr}]; 47.38, 47.45, 47.59, 47.67 [t, J_{C-P}=7, C(2'')]; 55.24 [q, OCH₃]; 57.72, 57.83, 57.90, 58.01 [t, J_{C-P}=12, OCH₂]; 73.09, 73.19 [d, C(5'')]; 85.20 [d, C(1'')]; 87.10, 87.13 [s, C(Ph)₃]; 88.09, 88.16, 88.44, 88.51 [d, J_{C-P}=7, C(4'')]; 90.05, 90.14, 90.22 [s, C(3'')]; 113.18 [d, C_{ar}]; 117.56, 117.62 [s, CN]; 123.25, 123.29 [s, C(5)]; 126.78, 127.86, 127.89, 128.2, 128.22, 128.89, 130.20, 132.74 [d, C_{ar}]; 133.81, 133.84

[s, C_{ar}]; 136.75, 136.77, 136.83 [s, C_{ar}]; 141.21, 141.31 [d, C(8)]; 145.56 [s, C_{ar}]; 149.37 [s, C(4)]; 151.49 [s, C(6)]; 152.67 [d, C(2)]; 158.62 [s, C-OCH₃]; 164.58 [s, CO]

³¹P-NMR(161.9 MHz, CDCl₃): 142.31, 142.74 [2s]

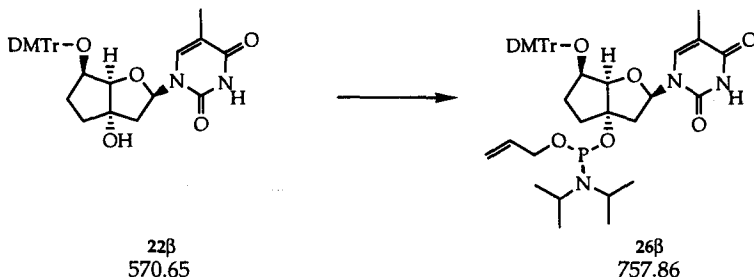
IR(KBr): 3600-3200*w*, 3060*w*, 2960*m*, 2930*m*, 2870*w*, 2735*w*, 2250*w*, 1690*m*, 1610*s*, 1580*m*, 1510*s*, 1485*s*, 1455*s*, 1415*w*, 1400*w*, 1365*w*, 1340*w*, 1320*m*, 1295*m*, 1250*s*, 1220*m*, 1200*m*, 1180*s*, 1155*m*, 1125*m*, 1090*m*, 1070*s*, 1050*s sh.*, 1035*s*, 975*m*, 965*m*, 900*w*, 830*m*, 790*m*, 755*w*, 710*m*, 645*w*

MS(FAB⁺): 884(1.0, M⁺+ 1), 304(38), 303(100), 240(22), 201(14), 105(17)



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) des Phosphoramidites **25β**

6.15 (5'R)-1-[3'-O-[(allyloxy)(diisopropylamino)phosphino]-2'-deoxy-5'-O-[(4,4'-dimethoxytriphenyl)methyl]-3',5'-ethano- β -D-ribofuranosyl] thymin 26 β



Zu einer Lösung von 313 mg (0.548 mmol) des tritylierten bcT 22 β in 5 ml CH₂Cl₂ wurden nacheinander bei Raumtemperatur 560 μ l (3.271 mmol, 6eq.) N,N-Diisopropyl-N-ethylamin und 370 μ l (1.654 mmol, 3 eq.) Allyloxy-chloro-N,N-diisopropylamino-phosphit gespritzt. Nach 5 Minuten klärte sich die Lösung (leicht gelblich). Nach 60 Minuten Rühren wurde die Reaktion durch Zugabe von 15 ml ges. NaHCO₃ Lösung gestoppt und zweimal mit je 15 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Watte filtriert und das Lösungsmittel am RV entfernt. Der ölige Rückstand wurde an 30 g Silikagel (\varnothing 1.5 cm; Hexan/Ethylacetat) chromatographiert. Es konnten nach Entfernung des Lösungsmittels und Trocknen am HV 361 mg (87%) des bcT-allyloxyphosphoramidites 26 β als farbloser Schaum erhalten werden.

DC(Hexan/Ethylacetat 1:3): R_f 0.68

¹H-NMR(300 MHz, CDCl₃): 1.11-1.32, 1.58-1.86 [2m, >5H, H-C(2'), H₂C(6'), H₂C(7')]; 1.11, 1.13, 1.14, 1.15, 1.16, 1.18 [6s, 12H, 2CH(CH₃)₂]; 1.73, 1.75 [2d, J=1.1, 3H, H₃C-C(5)]; 2.89-2.98 [m, 1H, H-C(2')]; 3.52-3.62 [m, 2H, OCH₂]; 3.79 [s, 6H, OCH₃]; 3.87-4.09 [Signalhaufen, 4H, H-C(4'), H-C(5'), 2H-C_i-Pr]; 5.09 [t, J=9.1, 1H, H_{allyl}]; 5.23 [ddd, J=1.7, J=10.2, J=17.1, 1H, H_{allyl}]; 5.82-5.95 [m, 1H, H_{allyl}]; 6.29 [dt, J_t=4.8, J_d=9.6, 1H, H-C(1')]; 6.83 [dd, J=1.5, J=8.7, 4H, H-C_{ar}]; 7.19-7.31 [m, 3H, H-C_{ar}]; 7.41 [dd, J=4.5, J=8.9, 4H, H-C_{ar}]; 7.52 [d, J=7.0, 2H, H-C_{ar}]; 7.83 [s br., 1H, H-C(6)]; 8.27 [s br., 1H, HN(3)]

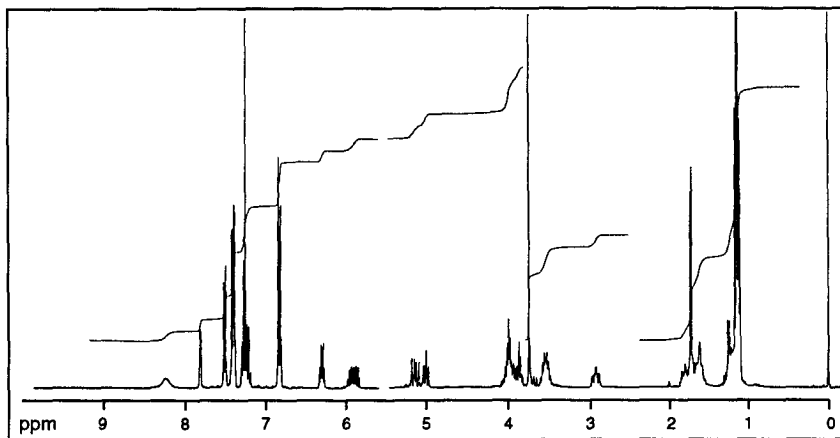
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): 12.43 [q, H₃C-C(5)]; 24.24, 24.45 [q, H₃C_i-Propyl]; 31.20 [t, C(6')]; 33.09, 33.22, 33.35 [t, C(7')]; 43.18, 43.35 [d, C_i-Pr]; 46.20, 46.36, 46.45 [t, C(2')]; 55.23 [q, H₃CO]; 63.73, 63.89, 63.95, 64.09 [t, J_{C-P}=11, C_{allyl}]; 72.87, 72.96 [d, C(5')]; 85.75 [d, C(1')]; 87.30 [s, C(Ph)₃]; 87.96, 88.05, 88.30, 88.37 [d, J_{C-P}=6, C(4')]; 89.96, 90.06, 90.19 [s, C(3')]; 110.81 [s, C(5)]; 113.21 [d, C_{ar}]; 115.63, 115.72 [t, C_{allyl}]; 126.93,

127.91, 128.16, 130.16 [d, C_{ar}]; 135.41, 135.51 [d, C_{allyl}]; 135.67 [d, C(6)]; 136.59, 136.77 [s, C_{ar}]; 145.54 [s, C_{ar}]; 149.91 [s, C(2)]; 158.68 [s, C-OCH₃]; 163.61 [s, C(4)]

³¹P-NMR (121 MHz, CDCl₃): 141.36, 141.83 [2s]

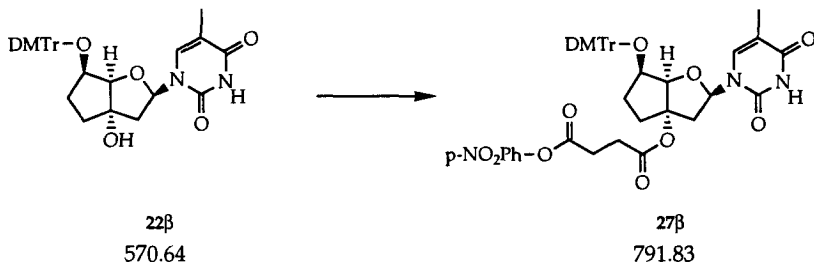
IR(CHCl₃): 3396w, 3006m, 2968s, 2935m, 2870w, 2839w, 1689s, 1710s sh., 1608 m, 1509s, 1464s, 1397w, 1365m, 1319w, 1155w, 1125m, 1065m, 1035m, 976m, 836m

MS(FAB⁺): 757(0.1, M⁺), 304(35), 303(100), 188(47), 146(19), 104(15)



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) des Phosphoramidites **26β**

6.16 (5'R)-1-[2'-deoxy-5'-O-[(4,4'-dimethoxytriphenyl)methyl]-3',5'-ethano-3'-O-[4-O-(4-nitrophenyl)succinyl]-β-D-ribofuranosyl]-thymidin 27β



Zu 150 mg (0.263 mmol) β-DMT-bcT **22β** und 263 mg (2.628 mmol, 10 eq.) Bernsteinsäureanhydrid wurden unter Argonatmosphäre 1.3 ml Pyridin gegeben, die Lösung auf 0° gekühlt und im Gegenstrom mit 160 mg (1.310 mmol, 5eq.) 4-N,N-Dimethylaminopyridin versetzt. Nach 18 Stunden Rühren bei 4° C wurde noch 5 Tage bei Raumtemperatur weitergerührt. Zur braunen Reaktionslösung wurden 5 ml ges. NaHCO₃ Lösung und 5 ml CH₂Cl₂ gegeben, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase noch zweimal mit je 8 ml CH₂Cl₂ rückextrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden noch einmal mit 10 ml 10% Zitronensäure gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am RV abgezogen und am HV getrocknet. Es resultierten 186 mg (>100%) des Bernsteinsäurehalbesters als brauner Schaum, der in 3 ml abs. Dioxan aufgenommen wurde und nacheinander bei RT mit einer Lösung von 51 mg (0.368 mmol, 1.4eq.) 4-Nitro-phenol (0.5 ml abs. Dioxan) und 206 mg (0.998 mmol, 3.8eq.) N,N-Dicyclohexyl-carbodiimid (0.5 ml abs. Dioxan) versetzt wurde. Nach 90 Minuten Rühren wurde das Lösungsmittel am RV entfernt, das Reaktionsgemisch einmal in 10 ml Toluol aufgenommen und erneut zur Trockene eingedampft. Chromatographie an 10 g Silikagel (Ø 1 cm, Hexan/Ethylacetat 1:2) und anschließende Fällung bei 0° C aus 50 ml Pentan (gelöst in CH₂Cl₂) lieferte 153 mg (73%) des bcT Aktivesters **27β** als ein schwach ockerfarbenedes Pulver.

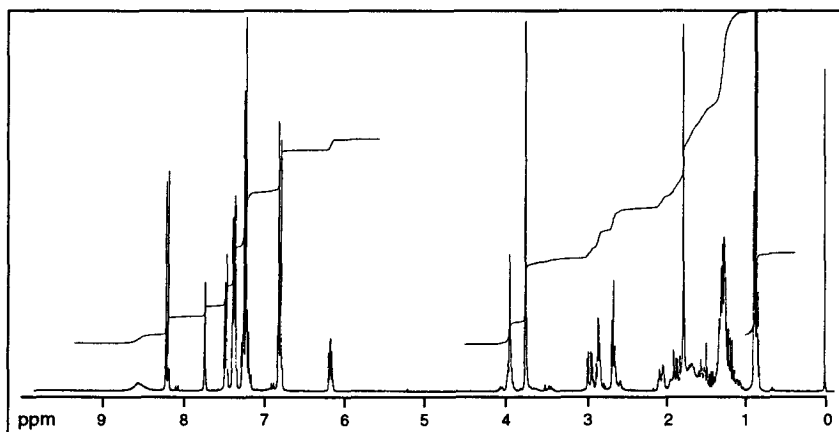
DC(Hexan/Ethylacetat 1:4): R_f 0.59

¹H-NMR(300 MHz, CDCl₃): 1.10-1.78 [Signalhaufen, >3H, H₂C(6'), H₂C(7'), Harnstoffderivat von DCC]; 1.79 [d, J=1.1, 3H, H₃C-C(5)]; 1.87 [dd, J=9.0, J=14.8, 1H, H-C(2'')]; 2.04-2.11 [m, 1H, H-C(6'), H-C(7'')]; 2.66-2.70 [m, 2H, H₂C-CO]; 2.84-2.93 [m, 2H, H₂C-CO]; 2.98 [d, J=5.5, J=14.7, 1H, H-C(2'')]; 3.79 [s, 6H, 2OCH₃]; 3.95-4.01 [m, 2H, H-C(4'), H-C(5'')]; 6.18 [dd, J=5.4, J=8.9, 1H, H-C(1')]; 6.83 [d, J=3.1, 4H, H-C_{ar}]; 7.20-7.31 [m, 5H, H-C_{ar}]; 7.38-7.43 [m, 4H, H-C_{ar}]; 7.49-7.53 [m, 2H, H-C_{ar}]; 7.78 [d, J=1.1, 1H, H-C(6)]; 8.24-8.29 [m, 2H, H-C_{ar}]; 8.63 [s br., 1H, HN(3)]

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): 12.49 [q, $\text{H}_3\text{C-C}(5)$]; 29.16, 29.36 [2t, $\text{CH}_2\text{-CO}$]; 30.78, 32.37 (oder 34.15) [2t, $\text{C}(6')$, $\text{C}(7')$]; 45.22 [t, $\text{C}(2')$]; 55.29 [q, OCH_3]; 72.80 [d, $\text{C}(5')$]; 85.43, 86.27 [2d, $\text{C}(1')$, $\text{C}(4')$]; 87.34 [s, $\text{C}(3')$]; 92.71 [s, C_{ar}]; 111.19 [s, $\text{C}(5)$]; 113.27, 122.34, 125.29, 127.06, 127.97, 128.16, 130.17 [d, C_{ar}]; 135.15 [d, $\text{C}(6)$]; 136.48, 136.58 [s, C_{ar}]; 145.41 [s, C_{ar}]; 150.14 [s, $\text{C}(2)$]; 155.25 [s, C_{ar}]; 158.78 [s, C-OCH_3]; 163.57 [s, $\text{C}(4)$]; 169.96, 171.11 [s, CO_{succ}] (+Verunreinigungen durch DCC)

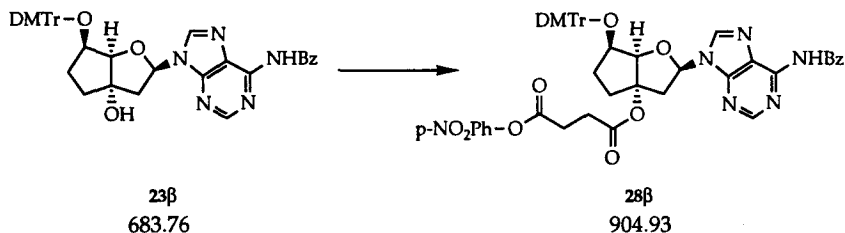
IR(CHCl_3): 3392w, 2934w, 2858w, 1760w, 1730w, 1700s sh., 1689s, 1608w, 1527m, 1509m, 1464w, 1349m, 1129m

MS(FAB $^+$): 791(2), 346(20), 319(15), 305(22), 304(78), 303(100), 301(11), 289(20), 273(13), 226(11), 225(38), 165(11), 155(18), 154(52), 152(13), 139(13), 138(23), 137(37), 136(45), 135(19), 127(14), 125(12), 120(10), 108(10), 107(38), 105(14), 100(11), 98(15), 91(14), 90(15), 89(22), 83(12), 81(14), 79(14), 78(12), 77(27), 65(11), 63(11), 55(28)



^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3) des Bicyclothymidin-Aktivesters 27 β

6.17 (5'R)-N⁶-benzoyl-9-[2'-deoxy-5'-O-[(4,4'-dimethoxytriphenyl)methyl]-3',5'-ethano-3'-O-[4-O-(4-nitrophenyl)succinyl]-β-D-ribofuranosyl] adenin 28β



In einem ausgeheizten Kölbchen wurden 125 mg (0.183 mmol) DMT-bcA^{Bz} 23β und 183 mg (1.829 mmol, 10eq.) Bernsteinsäureanhydrid bei RT vorgelegt, unter Argon gesetzt und 1 ml Pyridin zugespritzt. Zur gelben Reaktionslösung wurden dann bei 0°C 112 mg (0.917 mmol, 5eq.) 4-N,N-Dimethylamino-pyridin im Argonstrom zugegeben. Nach einer Stunde Rühren wurde das Eisbad entfernt und 45 Stunden weitergerührt. Die tiefbraune Reaktionslösung wurde mit 5 ml ges. NaHCO₃ Lösung sowie 5 ml ges. NaCl Lösung versetzt und dreimal mit je 10 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden noch einmal mit 10 ml eisgekühlter 10% Zitronensäurelösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am RV entfernt. Es resultierten nach Trocknen am HV 165 mg (115%) eines bräunlichen Schaumes, welcher in 3 ml Dioxan gelöst und nacheinander bei RT mit je 500 µl einer Lösung von 36 mg (0.259 mmol; 1.4eq. bez. β-bcA^{Bz}) 4-Nitrophenol in Dioxan und 113 mg (0.548 mmol; 3eq. bez. β-bcA^{Bz}) N,N-Dicyclohexylcarbodiimid in Dioxan versetzt wurde. Nach 2 Stunden Rühren wurde das Reaktionsgemisch am RV zur Trockene eingengt und der Rückstand einmal in 10 ml Toluol aufgenommen und erneut eingedampft. Chromatographie an 5 g Silikagel (Ø 1cm; Ethylacetat) lieferte nach Entfernung des Lösungsmittels am RV und Trocknen am Hochvakuum 122 mg des bcA^{Bz} Aktivesters 28β. Dieser wurde aus Pentan umgefällt (in CH₂Cl₂ gelöst) und es konnten 104 mg (63%) des Esters 28β als bräunliches Pulver isoliert werden (laut ¹H-NMR noch Spuren von DCC, jedoch gute Beladungsdichten realisiert).

DC(Ethylacetat): R_f 0.48

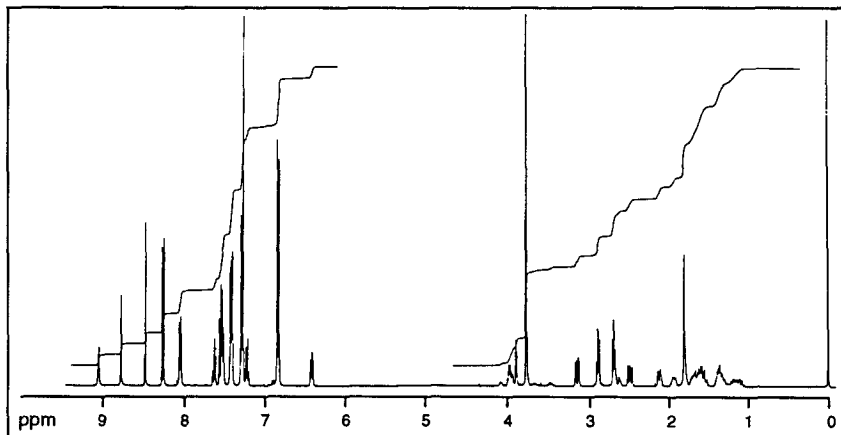
¹H-NMR(400MHz, CDCl₃ bas. Alox): 1.51-1.71 [m, 3H, H₂C(6'), H₂C(7'')]; 2.09-2.14 [dd, J=5.7, J=13.0, 1H, H-C(6'), H-C(7'')]; 2.48 [dd, J=8.4, J=14.8, 1H, H-C(2')]; 2.67-2.71 [m, 2H, H₂C-CO]; 2.87-2.90 [m, 2H, H₂C-CO]; 3.14 [dd, J=5.8, J=14.7, 1H, H-C(2'')]; 3.78 [s, 6H, 2OCH₃]; 3.91 [d, J=5.4, 1H, H-C(4')]; 3.94-4.02 [m, 1H, H-C(5')]; 6.40 [dd, J=5.8, J=8.3, 1H, H-C(1')]; 6.80-6.84 [m, 4H, H-C_{ar}]; 7.19-7.22 [m, 1H, H-C_{ar}]; 7.26-7.30 [m, 4H, H-C_{ar}]; 7.39-7.43 [m, 4H, H-C_{ar}]; 7.50-7.56 [m, 4H, H-C_{ar}]; 7.60-7.64 [m, 1H,

H-C_{ar}]; 8.04 [d, J=7.2, 2H, H-C_{ar}]; 8.26 [d, J=9.2, 2H, H-C_{ar}]; 8.49, 8.80 [2s, 2H, H-C(2), H-C(8)]; 9.08 [s br., 1H, HN-C(6)]

¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃ bas. Alox): 29.16, 29.26 [2t, H₂C-CO]; 29.86, 33.03, 33.95 [2t, C(6'), C(7')]; 46.58 [t, C(2')]; 55.25 [q, OCH₃]; 73.20 [d, C(5')]; 85.10, 86.51 [2d, C(1'), C(4')]; 87.13 [s, C(3')]; 92.23 [s, C_{ar}]; 113.22, 122.35 [2d, C_{ar}]; 123.40 [s, C(5)]; 125.26, 126.95, 127.90, 127.92, 128.91, 130.13, 130.17, 132.81 [d, C_{ar}]; 133.69, 136.64, 133.67 [s, C_{ar}]; 141.01 [d, C(8)]; 145.40 [s, C_{ar}]; 149.51 [s, C(4)]; 151.41 [s, C(6)]; 152.66 [d, C(2)]; 155.20 [s, C_{ar}]; 158.67 [s, C-OCH₃]; 164.62, 170.00, 171.08 [s, CO]

IR(KBr): 3600-3200w br., 2930w, 1765w, 1740m, 1700w, 1610s, 1580m, 1525s, 1510s, 1490m, 1455m, 1410w, 1350s, 1300m, 1250s, 1175s, 1125s, 1095m, 1070m, 1045w, 990w, 970w, 910w, 895w, 865w, 830w, 795w, 790w, 750w, 730w, 705w, 645w

MS(FAB⁺): 905(6.1, M⁺+1), 304(38), 303(100), 240(36), 225(17), 154(29), 138(11), 137(20), 136(23), 107(12), 105(23), 77(13)



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) des Bicyclodeoxyadenosin-Aktivesters 28β

6.18 Herstellung der festphasengebundenen Nucleoside

Zu einer Lösung von 116µmol Aktivester 27β (resp. 97µmol 28β) in 730µl (resp. 550µl) Dioxan wurde bei RT unter Argonatmosphäre 115µl (resp. 100µl) Triethylamin und 1.1 ml (resp. 900µl) N,N-Dimethylformamid zugegeben. Long-chain-alkylamino-CPG wurde vorgängig mit Methanol, Triethylamin/Methanol 1:1 und Diethylether gewaschen, trockengesaugt und dann am Hochvakuum getrocknet. 500 mg dieses so vorbehandelten Trägers wurden im Ar-Gegenstrom zum Reaktionsgemisch gegeben. Das Kölbchen wurde nun an einem Kugelrohr-Ofen montiert und während 2 Tagen bei RT gedreht. Der Träger wurde abfiltriert, mit Methanol und Diethylether gewaschen, an der Luft trockengesaugt und am Hochvakuum getrocknet. Die Beladungsdichten wurden bestimmt, indem ein Aliquot des Trägers in einem Messkolben mit x ml einer 0.1M p-Toluolsulfonsäure Lösung in Acetonitril detriptyliert wurde und die Absorption bei 498nm abgelesen wurde. Gemäss untenstehender Formel [52] konnten die entsprechenden Beladungsdichten ermittelt werden:

$$\text{Bel.dichte} = \frac{\text{abs bei 498nm} \cdot x \text{ ml} \cdot 14.3}{\text{mg Einwaage}} = \dots \mu\text{mol/g Träger}$$

Es resultierten dabei Beladungsdichten (vgl. auch Tab.6, S.47) zwischen 24-39µmol/g Träger. Allfällige freie Aminogruppen des Trägers wurden mit Essigsäureanhydrid in Pyridin und 4-N,N-Dimethylaminopyridin während 30-40 Minuten bei Raumtemperatur acetyliert (pro 50µmol Aktivester: 68µl Pyridin, 45µl Essigsäureanhydrid, 2.3 mg DMAP).

6.19 Automatisierte Oligonucleotidsynthese an einer Festphase

Die Herstellung der in dieser Arbeit untersuchten bicyclischen Oligonucleotide konnte gemäss den vom Hersteller empfohlenen Protokollen für den 'Gene Assembler Plus' weitgehend übernommen werden. Für die Änderung der Detriptylierungs- und Kopplungszeiten vergleiche man die in Kapitel 4.5 abgebildeten Routinen. Es wurde nach der Phosphoramiditmethode synthetisiert, wobei mit dem Modus 'Trityl off' gearbeitet wurde (am Schluss der Synthese wird am 5'-Ende die Dimethoxytritylgruppe gespalten). Für die Spaltung der cyanoethyl Schutzgruppe, die Ablösung des Oligonucleotides von der Festphase und die Reinigung der Sequenzen vergleiche man Tabelle 6 (S.47). Die natürlichen Sequenzen wurden ohne Änderung nach den vom Hersteller mitgelieferten Standardverfahren synthetisiert.

7. Literatur

- [1] J.D. Watson and F.H. Crick, *Nature* **171**, 137 (1953)
- [2] C. Hélène, *Anti Cancer Drug Design* **6**, 569 (1991)
- [3] P.C. Zamencnik and M.L. Stephenson, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **75**, 280 (1978)
- [4] E. Uhlmann and A. Peyman, *Chem. Rev.* **90**, 543 (1990)
- [5] P.S. Miller, K.N. Fang, N.S. Kondo and P.O.P. Ts'o, *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 6657 (1971)
- [6] R.C. Pless and P.O.P. Ts'o, *Biochemistry* **16**, 1239 (1977)
- [7] P.S. Miller, J. Yano, E. Yano, C. Carroll, K. Jayaraman and P.O.P. Ts'o, *Biochemistry* **18**, 5134 (1979)
- [8] B. Froehler, P. Ng and M. Matteucci, *Nucleic Acid Res.* **16**, 4831 (1988)
- [9] C.A. Stein, C. Subasinghe, K. Shinozuka and J.S. Cohen, *Nucleic Acid Res.* **16**, 3209 (1988)
- [10] W.K.-D. Brill, J.-Y. Tang, Y.-X. Ma and M.H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 2321 (1989)
- [11] U. Sequin, *Experientia* **29**, 1059 (1973)
- [12] C. Hélène and J.-J. Toulmé, in *Topics in Molecular and Structural Biology*, J.S. Cohen, Editor (Macmillan Press), **12**, 137 (1989)
- [13] N.T. Thuong, U. Asseline and T. Montenev-Garestier, *ibid.*, **12**, 25 (1989)
- [13] B. Rayner, C. Malvy, J. Paoletti, B. Lebleu, C. Paoletti and J.-L. Imbach, in *Topics in Molecular and Structural Biology*, J.S. Cohen, Editor (Macmillan Press), **12**, 119 (1989)
- [14] P.E. Nielsen, M. Egholm, R.H. Berg and O. Buchardt, *Science* **254**, 1497 (1991)
- [15] M. Egholm, O. Buchardt, P.E. Nielsen and R.H. Berg, *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 1895 (1992)
- [16] A. Eschenmoser, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **39**, 795 (1991)
- [17] K.C. Schneider and S.A. Benner, *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 453 (1990)
- [18] L. Peng, *Dissertation ETH Nr. 10035* (1992), "1. Synthese und Eigenschaften von Oligo-(1',2')-seco-2'-deoxy-D-ribonukleotiden; 2. Purin-Purin gepaarte Oligonukleotide der Homo-DNA-Reihe"
- [19] W.K. Olson, *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 278 (1982)
- [20] F.G. Cocu and T. Posternak, *Helv. Chim. Acta* **55**, 2838 (1972)
- [21] F.G. Cocu and T. Posternak, *Helv. Chim. Acta* **55**, 2828 (1972)
- [22] E.W. Garbisch Jr., *J. Org. Chem.* **30**, 2109 (1965)
- [23] W. Herz and M. Knoch, *Z. Anorg. Allgem. Chem.* **41**, 315 (1904)
- [24] M. Schröder, *Chem. Rev.* **80**, 187 (1980)
- [25] M. Meili, *Diplomarbeit ETH Zürich* (1991), "Synthese eines bicyclischen Adeninnukleosides"
- [26] J. Boutagy and R. Thomas, *Chem. Rev.* **74**, 87 (1974)
- [27] M. Schlosser, B. Schaub, J.d. Oliveira-Neto and S. Jeganathan, *Chimia* **40**, 244 (1986)
- [28] P. Mohr, L. Rösslein and C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* **70**, 142 (1987)

- [29] P. Mohr, N. Waespe-Sarcevic and C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* **66**, 2501 (1983)
- [30] P. Murray-Rust, in *Molecular Structure and Biological Activity*, J.T. Griffin and W.L. Duax, Editor; Elsevier: New York, 117 (1982)
- [31] A.J. Manusco and D. Swern, *Synthesis*, 165 (1981)
- [32] W.P. Griffith, S.V. Ley, G.P. Whitcombe and A.D. White, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1625 (1987)
- [33] D.B. Dess and J.C. Martin, *J. Org. Chem.* **48**, 4155 (1983)
- [34] J.P. Burkhart, N.P. Peet and P. Bey, *Tetrahedron Lett.* **29**, 3433 (1988)
- [35] J.B. Plumb and D.J. Harper, *Chem. Eng. News* **68**(29), 3 (1990)
- [36] K.A. Watanabe, D.H. Hollenberg and J.J. Fox, *J. Carbohydrates Nucleosides Nucleotides* **1**, 1 (1974)
- [37] E. Wittenburg, *Chem. Ber.* **101**, 1095 (1968)
- [38] H. Vorbrüggen and B. Bennua, *Chem. Ber.* **114**, 1279 (1981)
- [39] M.-T. Chenon, R.J. Pugmire, D.M. Grant, R.P. Panzica and L.B. Townsend, *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 4627 (1975)
- [40] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*. ed. C.R. Cantor. 1984, Springer Verlag.
- [41] D.W. Young, P. Tollin and H.R. Wilson, *Acta Cryst.* **B25**, 1423 (1969)
- [42] A.V. Botschkarev, G.V. Gurskaja, A.S. Schdanov, E.M. Kasmina and I.I. Fjedorov, *Bioorg. Khim.* **17**, 1094 (1991)
- [43] M. Karplus, *J. Chem. Phys.* **30**, 11 (1959)
- [44] C. Altona and M. Sundaralingam, *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 2333 (1973)
- [45] C.A.G. Haasnoot, F.A.A.M. de Leeuw and C. Altona, *Tetrahedron* **36**, 2783 (1980)
- [46] R.E. Schirmer, J.P. Davies, J.H. Noggle and P.A. Hart, *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 2561 (1972)
- [47] H. Rosemeyer, G. Tóth, B. Golankiewicz, Z. Kazimierzczuk, W. Bourgeois, U. Kretschmer, H.-P. Muth and F. Seela, *J. Org. Chem.* **55**, 5784 (1990)
- [48] R.L. Letsinger, J.L. Finnan, G.A. Heavener and W.B. Lunsford, *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 3278 (1975)
- [49] B.C. Froehler and M.D. Matteucci, *Tetrahedron Lett.* **27**, 469 (1986)
- [50] M.D. Matteucci and M.H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **21**, 3243 (1980)
- [51] N.D. Sinha, J. Biernat and H. Köster, *Tetrahedron Lett.* **24**, 5843 (1983)
- [52] M.J. Gait, *Oligonucleotide synthesis a practical approach*. 1984, Oxford-Washington D.C: IRL Press
- [53] M. Bolli, *Dissertation Universität Bern*, in Vorbereitung
- [54] Y. Hayakawa, S. Wakabayashi, H. Kato and R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 1691 (1990)
- [55] J.S. Eadie, L.J. McBride, J.W. Efcavitch, L.B. Hoff and R. Cathcraft, *Anal. Biochem.* **165**, 442 (1987)
- [56] F. Hillenkamp, M. Karas, R.C. Beavis and B.T. Chait, *Anal. Chem.* **63**, 1193A (1991)
- R.J. Cotter, *Anal. Chem.* **64**, 1027A (1992)
- R.C. Beavis, *Org. Mass Spectrom.* **27**, 653 (1992)
- [57] *Biophysical Chemistry: Techniques for the study of biological structure and function (Part II)*, C.R. Cantor and P.R. Schimmel, Editor. W.H. Freeman

- and Company: San Francisco
- [58] M. Durand, N.T. Thuong and J.C. Maurizot, *FEBS Lett.* **256**, 175 (1989)
- [59] U. Neidlein and C. Leumann, *Tetrahedron Lett.* **33**, 8057 (1992)
- [60] S.B. Zimmermann and B.H. Pfeiffer, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **78**, 78 (1981)
- [61] S.-H. Chou, P. Flynn and B. Reid, *Biochemistry* **28**, 2435 (1989)
- [62] N.B. Ramsing and T.M. Jovin, *Nucleic Acids Res.* **16**, 6659 (1988)
- [63] D.S. Pilch, C. Levenson and R.H. Shafer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1942 (1990)
- [64] G.E. Plum, Y.-W. Park, S.F. Singleton, P.B. Dervan and K.J. Breslauer, *Biochemistry* **87**, 9436 (1990)
- [65] M.T. Record, C.F. Anderson and T.M. Lohmann, *Quarterly reviews of Biophysics* **11**, 103 (1978)
- [66] G. Felsenfeld and A. Rich, *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 457 (1957)
- [67] H.E. Moser and P.B. Dervan, *Science* **238**, 645 (1987)
- [68] J.-C. François, T. Saison-Behmoaras and C. Hélène, *Nucleic Acid. Res.* **16**, 11431 (1988)
- [69] S. Arnott and P.J. Bond, *Nature (London) New Biol.* **244**, 99 (1973)
- [70] P.A. Beal and P.B. Dervan, *Nucleic Acids Res.* **20**, 2773 (1992)
- M. Cooney, G. Czernuszewicz, E.H. Postel, S.J. Flint and M.E. Hogan, *Science* **241**, 456 (1988)
- D.S. Pilch, C. Levenson and R.H. Shafer, *Biochemistry* **30**, 6081 (1991)
- [71] P. Job, *Ann. Chim. (Paris)* **9**, 113 (1928)
- [72] V.A. Bloomfield, D.M. Crothers and J. I. Tinocco, *Physical Chemistry of Nucleic Acids*. 1974, San Francisco: Harper & Row, 322
- [73] T. Maniatis, E. Fritsch and J. Sambrook, *Molecular Cloning*. 1982, Cold Spring Harbor Laboratory
- [74] K.J. Breslauer, in *Thermodynamic data for biochemistry and biotechnology*, H.J. Hinz, Editor; Springer Verlag: Berlin Heidelberg New York Tokyo (1986), 402.
- [75] L.A. Marky and K.J. Breslauer, *Biopolymers* **26**, 1601 (1987)
- [76] V.V. Filimonov, in *Thermodynamic data for biochemistry and biotechnology*, H.J. Hinz, Editor; Springer Verlag: Berlin Heidelberg New York Tokyo (1986), 377
- [77] P.L. Privalov, in *Biological Microcalorimetry*, A.E. Beezer, Editor. 1980, Academic Press (Great Britain): London New York
- [78] G. Vesnaver and K.J. Breslauer, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **88**, 3569 (1991)
- [79] C. Eppe, *Diplomarbeit ETH Zürich* (1992), "Synthese und Charakterisierung eines thyminhaltigen Nukleinsäureanalogons mit konformationell eingeschränktem Zuckerphosphat-Rückgrat"
- [80] V. Schurig and H.-P. Novotny, *Angew. Chemie* **102**, 969 (1990)
- V. Schurig and H.-P. Novotny, *J. Chromatogr.* **441**, 155 (1988)
- [81] W.A. König, R. Krebber and P. Mischnick, *J. High Resolut. Chromatogr.* **12**, 732 (1989)
- [82] B.N. Ames, *Meth. Enzymol.* **8**, 115 (1966)
- [83] Chemical Abstracts, *Index guide* **77**, 210

Leer - Vide - Empty

8. Lebenslauf

- 1964 geboren am 24. Juni in Basel als jüngster Sohn des Niklaus Tarköy und der Isabella Tarköy, geb. Kunz
- 1971-1976 Primarschule Oberwil BL
- 1976-1980 Progymnasiale Abteilung der Realschule Oberwil BL
- 1980-1983 Gymnasium Oberwil BL (Matura Typ B)
- 1983-1987 Chemiestudium an der Abt. für Chemie der ETHZ
Diplomabschluss im Herbst 1987
- seit 1988 Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. A. Eschenmoser unter der Leitung von Dr. C. Leumann
seit Juli 1990 Praktikumsassistent in OC-Praktiken
Betreuung eines Lehrlings (bis Sommer 1992)

Zürich, im Februar 1993

Markus Tarköy