

**iso-Bicyclo-DNA:
Design und Synthese des
zugrundeliegenden Zuckergerüsts**

Inauguraldissertation
der philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Bern

vorgelegt von
Tino Boss
aus Seftigen (BE)

Leiter der Arbeit:
Prof. Dr. C. J. Leumann
Departement für Chemie und Biochemie der Universität Bern

**iso-Bicyclo-DNA:
Design und Synthese des zugrundeliegenden
Zuckergerüsts**

Inauguraldissertation
der philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Bern

vorgelegt von
Tino Boss
aus Seftigen (BE)

Leiter der Arbeit:
Prof. Dr. C. J. Leumann
Departement für Chemie und Biochemie der Universität Bern

Von der Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät angenommen.

Bern, den 26. Oktober 2006

Der Dekan:
Prof. Dr. P. Messerli

Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Christian Leumann für die freundliche und stete Unterstützung, viele hilfreiche Anregungen und die grosse Freiheit, die er bei meiner Arbeit gewährte.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. R. Häner und PD. Dr. J. Hunziker, die sich bereit erklärt haben diese Arbeit zu bewerten.

Weiter möchte ich mich bei allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe bedanken für viele praktische Tipps, interessante Diskussionen und eine gute Atmosphäre sowohl im als auch ausserhalb des Labors. Im besonderen geht mein Dank an Dae-Ro Ahn, Adrian Häberli, Reto Bertolini, Theo Ryan, Alain Mayer, Sabrina Buchini und Andrea Stauffiger.

Ein ganz grosses Dankeschön verdient haben auch meine Eltern Hanna und Erwin, auf deren Unterstützung ich immer zählen konnte, sowie mein Bruder Olivier für seine Tipps zur Arbeit und die Beratung in Latex-Fragen. Schliesslich möchte ich mich auch ganz herzlich bei Regula für die unschätzbare Unterstützung in der Schlussphase dieser Arbeit bedanken.

Teile dieser Arbeit wurden auf folgender Veranstaltung vorgestellt:

Fall-Meeting der Swiss Chemical Society, Zürich, Oktober **2004**: “iso-Bicyclo-DNA: a new conformationally restricted DNA-analogue”, Tino Boss and Christian J. Leumann

Inhaltsverzeichnis

I	Theoretischer Teil	5
1	Einleitung	7
1.1	Die Entdeckung der Struktur von DNA	7
1.2	Entwicklung der Molekularbiologie	9
1.3	Struktur von DNA und RNA	10
1.4	Modifizierte Nucleinsäuren	15
1.5	Antisense	16
1.6	Konformationell fixierte Nucleinsäuren	17
2	Allgemeine Aufgabenstellung	23
3	Design und Modeling	25
3.0.1	Modell	25
3.0.2	Vorgehensweise	26
3.0.3	Bemerkungen	27
3.1	iso-Tricyclo- und [4.3.0]-Bicyclo-DNA	28
3.1.1	Design	28
3.1.2	Resultate	28
3.2	iso-Bicyclo- und iso-[4.3.0]-Bicyclo-DNA	31
3.2.1	Design	31
3.2.2	Resultate	32
4	Konkrete Aufgabenstellung	35
5	Synthesen	37
5.1	Retrosynthese	37
5.2	Synthese des Cyclopentenylalkohols	40
5.2.1	Syntheseversuch ausgehend von Cyclopentadien	40
5.2.2	Synthese ausgehend von L-Arabinose	43
5.3	Synthese des bicyclischen Kohlenstoffgerüsts und Nucleosidierungsversuche	47
5.3.1	Nucleosidierungsversuche	47
5.3.2	Substitution am Halogenierten Bicyclogerüst	49

5.3.3	Basenaufbau	49
5.3.4	Zum Bicyclogerüst via Epoxidierung	50
5.3.5	Pd-katalysierte allylische Substitution als Nucleosidierung	53
5.4	Syntheseweg ausgehend von Epoxyester 32	55
5.4.1	Hydroxylierungsversuche	57
5.4.2	Ringschlussversuche	59
6	Ausblick	61
II	Experimenteller Teil	63
7	Geräte und Materialien	65
8	Synthesen	67
8.1	Synthese ausgehend von L-Arabinose	67
8.2	Synthese ausgehend von Epoxyester 32	109
	Abkürzungen und Symbole	127
	Literaturverzeichnis	134

Zusammenfassung

Modifizierte Nucleinsäuren mit einer hohen Bindungsaffinität und -spezifität zu einzelsträngiger RNA und DNA sind als Werkzeuge in der Biochemie und in der pharmazeutischen Chemie von grosser Bedeutung. Das Konzept der konformationellen Restriktion wurde in der Vergangenheit zum Design solcher Nucleinsäureanaloge erfolgreich angewendet und hat z.B. die LNA oder die Tricyclo-DNA hervorgebracht.

In der vorliegenden Arbeit wurden in einem ersten Schritt ausgehend von Bicyclo- und Tricyclo-DNA mehrere neue Nucleinsäureanaloge im Computermodell betrachtet. Eine strukturelle Besonderheit von Bicyclo- und Tricyclo-DNA ist ein Torsionswinkel γ , der vorzugsweise *trans*-, und nicht wie in natürlichen DNA- und RNA-Duplexen *gauche*-orientiert ist. Im Computermodell erschien iso-Bicyclo-DNA eine vielversprechende neue Variante mit einem *gauche*-fixierten Torsionswinkel γ .

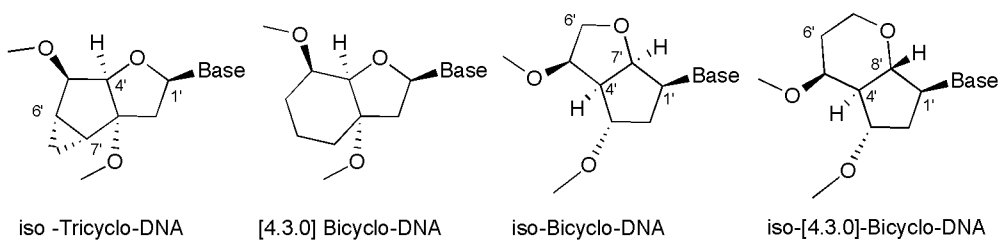
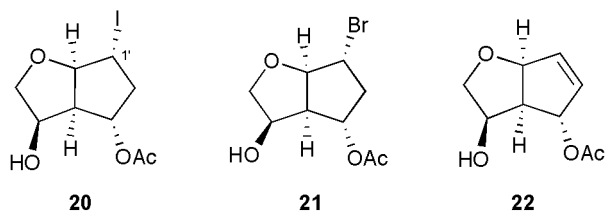


Abbildung 1: Monomerstrukturen der modellierten DNA-Analoga

In einem nächsten Schritt wurde eine Synthese für das der iso-Bicyclo-DNA zugrundeliegende Zuckergerüst entwickelt.

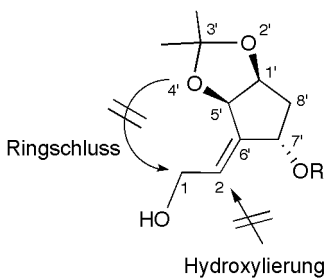
Darstellungsversuche ausgehend von Cyclopentadien stiessen am β,γ -ungesättigten Aldehyd 4 an, der sich als zu instabil für eine weitere synthetische Verwendung erwies. Der Aufbau des neuartigen bicyclischen Zuckergerüsts über 4 Stufen aus-

gehend vom bekannten Hepta-1,6-dienol **16** wird beschrieben. Das Ausgangsmaterial erhält man über 8 Stufen ausgehend von L-Arabinose. Neben einem C1'-Iodo-Bicyclogerüst synthetisierte man auch das entsprechende Bromoderivat.



Versuche, eine Nucleobase einzuführen ergaben Elimination des Halogens unter basischen oder keine Reaktion unter sauren Bedingungen.

Aufgrund von Problemen mit der Reproduzierbarkeit der Synthese zum Ausgangsmaterial und mit dem Ziel ein alternativ substituiertes bicyclisches Gerüst zu erhalten, wurde der Versuch unternommen, dieses ausgehend vom vorhandenen Intermediat **32** der Bicyclo-DNA-Synthese aufzubauen. Von den dazu notwendigen Transformationen konnte weder eine regiospezifische Hydroxylierung am C2 noch der direkte Ringschluss realisiert werden.



Summary

Modified nucleic acids which exhibit high binding affinity and specificity towards RNA and DNA have a great importance as biochemical tools and in medicinal chemistry. The concept of conformational restriction has successfully been applied in the design of such nucleic acid analogs in the past and put forth LNA and tricyclo-DNA as members of this class of analogs.

In this study several nucleic acid analogs derived from bicyclo and tricyclo have been screened by molecular modeling. One major structural ambiguity in the Bi- and Tricyclo-DNA series arises from the torsion angle γ which is preferentially trans- and not gauche-oriented as in RNA or DNA duplexes. A new variant, iso-Bicyclo-DNA, seemed promising according to computer modeling. It displayed a gauche-oriented torsion angle γ .

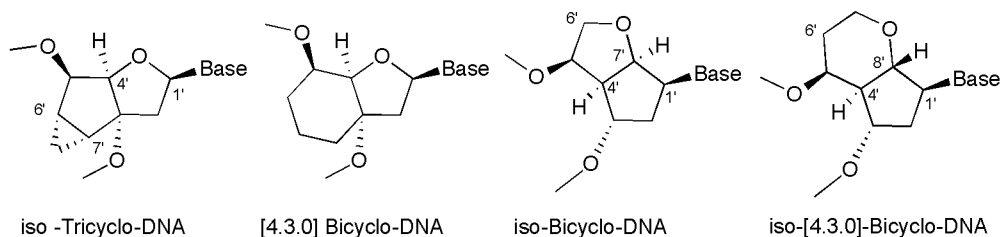
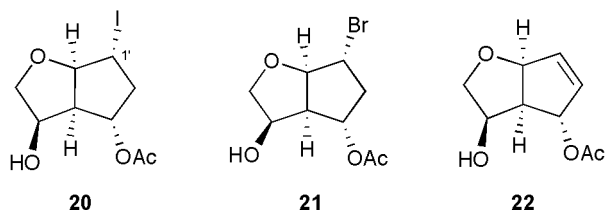


Figure 1: monomeric structures of the modeled DNA-analogs

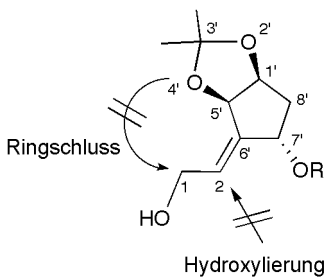
In a next step a synthesis for the underlying sugar scaffold of iso-Bicyclo-DNA was developed.

Synthetic efforts starting from cyclopentadiene were set back by the instability of the intermediate β,γ -unsaturated aldehyde **4**. The synthesis of the new bicyclic sugar scaffold in four steps starting from the known hepta-1,6-dienol **16** is described. The starting material is obtained over eight steps from L-arabinose. A C1'-iodinated scaffold and its bromo analog were synthesized.

Efforts to introduce the nucleobase resulted in halogen elimination under basic conditions and no reaction under acidic conditions.



As a result of problems with the reproducibility of the synthesis of starting material and the goal to obtain a differently C1'-substituted scaffold it was attempted to assemble the scaffold starting from the intermediate **32** of the bicyclo synthesis. Out of the necessary transformations neither a regioselective hydroxylation at C2 nor a direct ring closure could be achieved.



Teil I
Theoretischer Teil

Kapitel 1

Einleitung

Die Desoxyribonucleinsäure (DNA) ist allgemein bekannt als Träger der Erbinformation. Diese Eigenschaft der DNA wurde 1943 von *Avery* nachgewiesen^[1]. Die chemische Struktur wurde 1953 von *Watson* und *Crick* erstmals korrekt vorgeschlagen^[2].

1.1 Die Entdeckung der Struktur von DNA

Diesen zwei wesentlichen Entdeckungen des 20. Jahrhunderts gingen mehr als 80 Jahre intensiver Forschung mit zahlreichen Erkenntnissen voran. 1969 isolierte *Miescher* erstmals DNA aus Leukocyten^[3]. 1909 konnten *Levene* und *Jacobs* die chemische Struktur der vier Ribonucleotide beschreiben, welche durch basische Hydrolyse aus RNA gewonnen werden konnten. Die Deoxyribonucleotide wurden erst 1929 beschrieben, als *Levene* DNA mittels enzymatischer Hydrolyse aufspaltete. 1932 gelang *Takahashi* der Nachweis von Phosphodiesterbindungen in der DNA. Allerdings konnte man sich die riesige molekulare Masse der DNA zu diesem Zeitpunkt nicht schlüssig erklären. Aus Strömungsdoppelbrechungsexperimenten schloss *Signer* auf eine molekulare Masse von $0.5-1.0 \times 10^6$ Dalton; weiter liess sich eine stabförmige Struktur ableiten^[4]. *Todd* konnte 1951 durch Totalsynthese die β -glycosidische Bindung von Ribonucleosiden^[5] und 1955 die von Deoxyribonucleotiden nachweisen^[6].

Eine weitere wichtige Beobachtung machte *Chargaff* bezüglich der Basenzusammensetzung von DNA aus verschiedenen Quellen: Mittels Papierchromatographie konnte er zeigen, dass die Mengenverhältnisse von Adenin zu Thymin und von Guanin zu Cytosin immer 1:1 betragen^[8]. Röntgendiffraktionsexperimente von *Astbury*^[9] und später *Wilkins* und *Franklin*^[10] liessen klar auf eine helicale Struktur der DNA schliessen. *Franklin* beschrieb ausserdem eine A-Form von DNA bei niedriger Feuchtigkeit sowie eine B-Form bei hoher Feuchtigkeit^[11]. Daraus schloss sie, dass die Phosphatgruppen dem Wasser ausgesetzt sein und sich somit auf der Aussenseite der Helix befinden müssen. *Watson* und *Crick* setzten

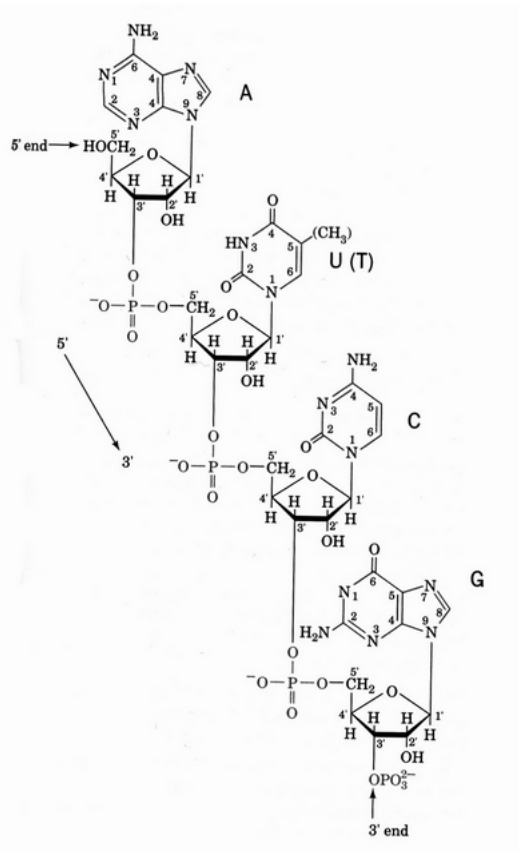


Abbildung 1.1: Die Primärstruktur eines RNA-Stranges mit den 4 Nucleobasen Adenin, Uracil, Cytosin und Guanin. Bei der DNA sind die 2'-Hydroxygruppen durch ein H und Uracil durch Thymin ersetzt.^[7]

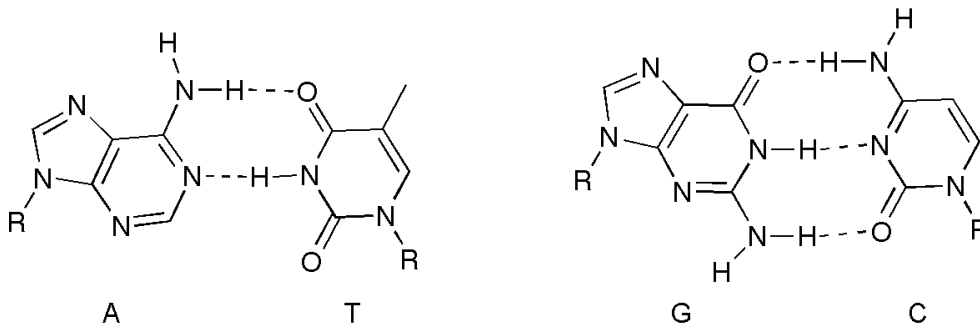


Abbildung 1.2: Watson-Crick-Basenpaare der DNA. Adenin (A) und Thymin (T) sind über 2, Guanin (G) und Cytosin (C) über 3 Wasserstoffbrücken verbunden. R bezeichnet die Zuckerreste.

schliesslich das Puzzle an bekannten Informationen zusammen und schlugen 1953 eine DNA-Struktur vor, die durch anschliessende Röntendiffraktionsexperimente bestätigt werden konnte^[12].

1.2 Entwicklung der Molekularbiologie

Seit der Aufklärung der Struktur von DNA in den Fünfzigerjahren hat die Forschung im Gebiet der Molekularbiologie eine rasante Entwicklung erfahren. Die Grenzgebiete der Chemie und Biologie sind seit daher immer mehr verschmolzen zu einem Spektrum an Disziplinen, die heute unter dem Begriff *Life Sciences* zusammengefasst werden können.

Ein Meilenstein war 1961 der Nachweis von mRNA als Zwischenstufe der Proteinsynthese durch Jacob und Monod^[13], der 1970 zur Formulierung des “Zentralen Dogma der Molekularbiologie” durch Crick^[14] führte. Dieses Dogma¹ beschreibt die möglichen Informationsflüsse in einer Zelle. Dazu gehören Transcription von DNA zu RNA, Translation von RNA zu Protein sowie die Replikation von DNA (Abbildung 1.3). Das Modell wurde um eine Vielzahl von Kontroll- und Regulationsmechanismen sowie um Zwischenstufen (*Splicing*) erweitert und verfeinert, bleibt aber in seinem Grundsatz bis heute wahr.

Ein weitere Entdeckung von eminenter Wichtigkeit war 1965 die Aufschlüsselung des genetischen Codes durch Khorana^[15] gestützt auf Arbeiten von Nirenberg und Matthaei^[16]. Kurze Zeit später identifizierte Holley tRNA als Adaptermolekül der Proteinsynthese^[17].

¹Wie Crick später selber erklärte ist der Begriff Dogma eigentlich nicht angebracht, da die beschriebenen Zusammenhänge ein wissenschaftliches Modell darstellen und nichts mit Glauben oder Überzeugungen zu tun haben.

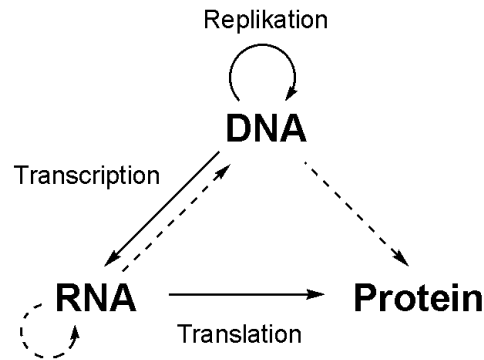


Abbildung 1.3: Zentrales Dogma der Molekularbiologie (Crick, 1970): Ausgezogene Pfeile bezeichnen “wahrscheinliche”, gestrichelte Pfeile “spezielle” Informationsflüsse.

Nachdem *Sanger* in den 50er-Jahren die Sequenz des Proteins Insulin bestimmt hatte, gelang ihm 1981 auch die Sequenzierung von RNA und DNA^[18]. Die Sequenzierung von DNA wurde bald zu einem Routineverfahren und ermöglichte die Entschlüsselung einzelner Gene und schliesslich ganzer Genome.

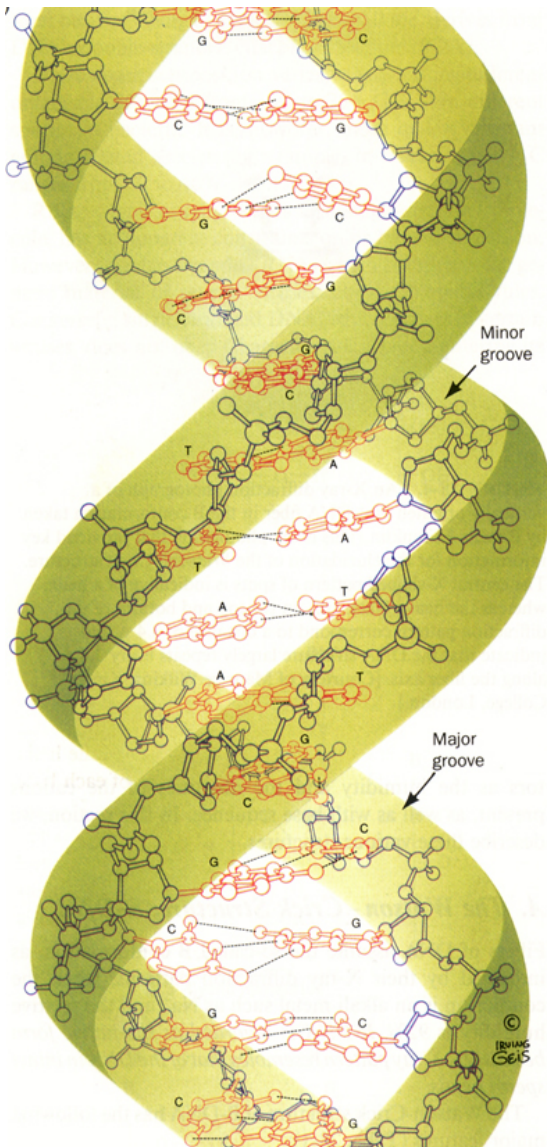
Sowohl bei der Aufdeckung des genetischen Codes als auch bei der Entwicklung von Sequenziermethoden hat die Chemie entscheidende Beiträge geleistet. Für die Molekularbiologie ebenfalls unentbehrlich geworden ist die chemische Synthese von Oligonucleotiden. Die automatisierte Festphasensynthese basiert auf einem Protokoll für Phosphoramidite, das 1979 von *Caruthers* entwickelt wurde^[19]. Sie ermöglicht eine zeitsparende und effiziente² Synthese von natürlicher DNA und RNA, aber auch den Einbau modifizierter Nucleotide in Oligonucleotide. Diese haben besonders in der Medizinalchemie eine grosse Bedeutung (siehe Kap. 1.4).

1.3 Struktur von DNA und RNA

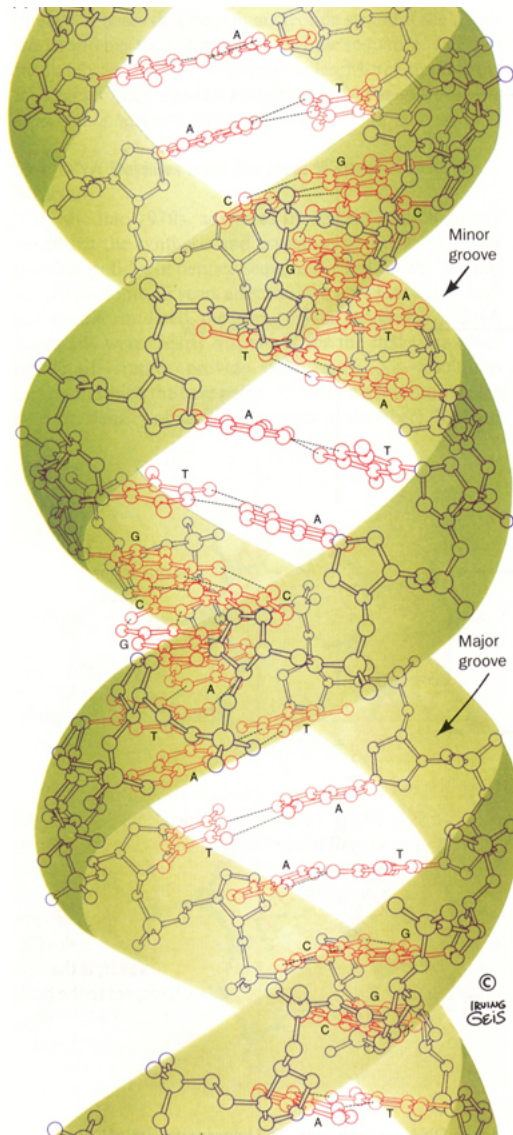
Natürliche DNA besteht aus den vier Nucleosiden Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin, die jeweils über eine Phosphodiesterbindung von den 5'- zu den 3'-Hydroxygruppen zu einem Strang verbunden sind (Abbildung 1.1). Die Nucleobasen sind jeweils β -glycosidisch an die Deoxyribose gebunden.

Zwei Stränge liegen sich antiparallel gegenüber und bilden eine Doppelhelix (sog. Duplex). Dabei paaren jeweils Adenin mit Thymin und Guanin mit Cytosin (Abbildung 1.2). Die Basenabfolge (Sequenz) in einem DNA Strang macht den genetischen Code aus. In der RNA liegt statt Thymin Uracil vor. Die Phosphatgruppen sind bei physiologischem pH deprotoniert, so dass es sich bei den

²Die Ausbeuten der einzelnen Kopplungsschritte sind um 99%!



B-Form



A-Form

Abbildung 1.4: Die zwei Hauptformen der DNA^[7]

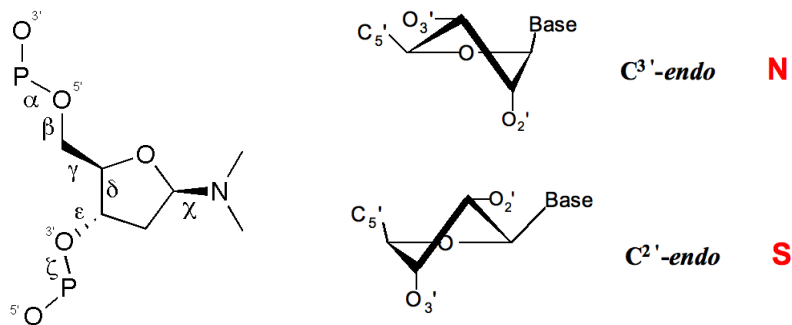


Abbildung 1.5: Notation der Torsionswinkel von Polynucleotiden und bevorzugte Zuckerkonformationen (sog. sugar pucker) für B- und A-Form-Helices: $C_{2'}\text{-endo}$ (S), und $C_{3'}\text{-endo}$ (N)^[20]

Nucleinsäuren um Polyanionen handelt.

Die Konformation des Rückgrats der DNA wird durch 6 Torsionswinkel α bis ζ pro Nucleotid beschrieben (Abbildung 1.5). Die Orientierung der Nucleobase wird mit dem Winkel χ angegeben.

Der Fünfring der Ribose kann in *envelope*- oder *twist*-Konformationen vorliegen. Dabei werden die aus der Ebene der restlichen drei oder vier Atome herausragenden Atome mit *endo* (Verschiebung hin zur Seite von $C5'$) oder *exo* (Verschiebung weg von der Seite von $C5'$) bezeichnet. Die Zuckerkonformationen werden mit E (*envelope*) oder T (*twist*) mit hochgestellter Positionszahl für *endo*-Positionen und tiefgestellter Positionszahl für *exo*-Positionen bezeichnet. Bei unsymmetrischen *twist*-Konformationen wird diejenige Positionszahl vorangestellt, deren Atom eine grössere Auslenkung hat; diejenige der Position mit kleinerer Auslenkung wird hintenangestellt. So wird z.B. eine $C^{2'}\text{-endo}\text{-}C^{3'}\text{-exo}$ -*twist*-Konformationen, bei der die $C^{3'}\text{-exo}$ -Auslenkung grösser ist, als die von $C^{2'}\text{-endo}$, mit ${}_3T^2$ bezeichnet. Die verschiedenen Konformationen können auch auf einem Pseudorotationszyklus angeordnet und so mit einem Winkel von 0 bis 360° beschrieben werden (Abbildung 1.6).

Ein DNA-Duplex kann je nach Basensequenz und Salzkonzentration in verschiedenen Konformationen vorliegen; die drei Standardformen sind die A-, B- und Z-Form. Die häufigste Form ist die B-Form. Diese liegt in einer rechtsdrehenden Helix mit 10 Basenpaaren pro Umdrehung vor, die jeweils einen Abstand von 3.3 - 3.4 Å haben. Die Basenpaare liegen ziemlich genau in der Mitte der Helix und sind senkrecht zur Helixachse angeordnet. Die Konformation der Ribose ist $2'\text{-endo}$, auch als *South*- oder **S**-Konformation bezeichnet (Abbildung 1.5). Die Zwischenräume in der Helix nennt man Furchen; es gibt eine grosse und eine kleine Furche (sog. major und minor groove) (Abbildung 1.4). In der B-Form sind die beiden Furchen etwa gleich tief wobei die grosse Furche etwa doppelt so breit

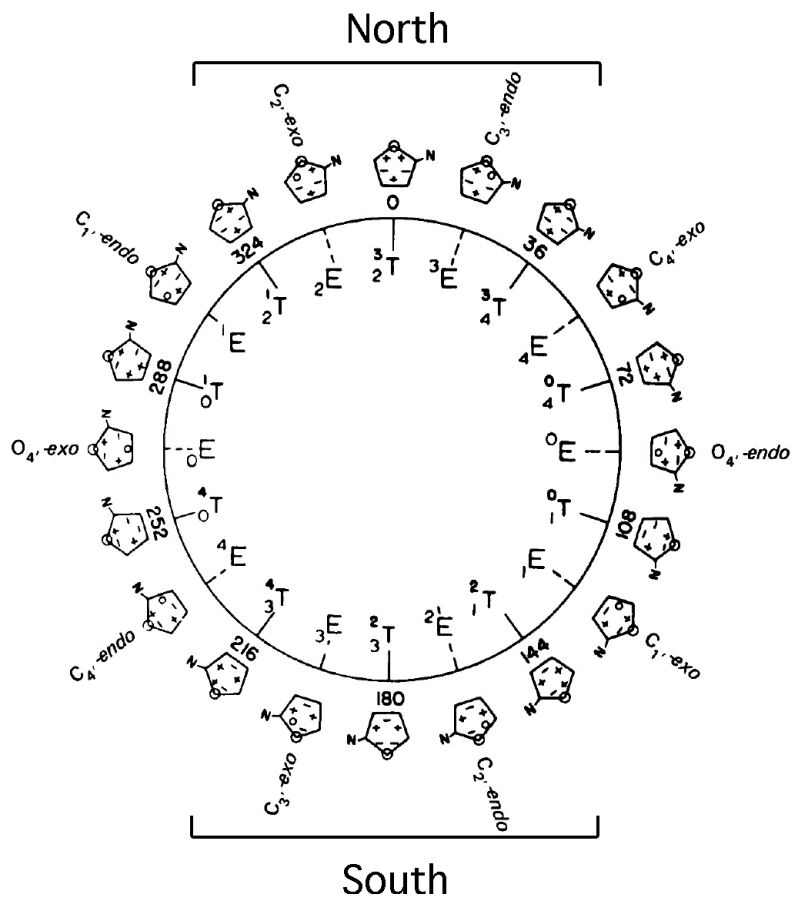


Abbildung 1.6: Pseudorotationszyklus des Furanoserings in Nucleosiden^[21].

	B-Form	A-Form
Basenpaare pro Umdrehung	10	11
Verschiebung der Basenpaare von der Helixachse	-0.2 bis -1.8 Å	4.5 Å
Ganghöhe pro Basenpaar	3.3 bis 3.4 Å	2.9 Å
Zuckerkonformation	2'-endo	3'-endo
Breite der grossen Furche	11.7 Å	2.7 Å
Breite der kleinen Furche	5.7 Å	11.0 Å
Tiefe der grossen Furche	8.8 Å	13.5 Å
Tiefe der kleinen Furche	7.5 Å	2.8 Å
Helixdurchmesser	20 Å	24 Å

Tabelle 1.1: Gemittelte Helixparameter von A- und B-DNA^[20]

ist.

Bei hoher Salzkonzentration (oder geringer Feuchtigkeit) sieht man eine sog. A-Form. Auch RNA-RNA-Duplexe und DNA-RNA-Duplexe bilden eine A-Form-Helix. Die Basenpaare befinden sich in dieser um 4.5 Å von der Helixachse verschoben und stehen zu dieser etwa in einem Winkel von 20°. Daraus ergibt sich ein hohler Kern. Die grosse Furche ist relativ schmal und sehr tief während die kleine Furche sehr flach ist. Die Ribose hat eine 3'-endo-Konformation, auch als *North-* oder *N-*Konformation bezeichnet.

Z-DNA hat eine linksgängige Helix und wurde in Oligomeren mit (GC)_n-Sequenzen gefunden, kann jedoch auch in anderen Sequenzen vorliegen. Bei der Stabilisierung von DNA-Strukturen spielt Wasser eine grosse Rolle und wird manchmal neben Zucker, Phosphat und Base als vierte Komponente der DNA bezeichnet. In B-DNA gibt es in beiden Furchen wohlgeordnet gebundene Wassermoleküle. In einigen Kristallstrukturen wurden bis zu 14 Wassermoleküle pro Basenpaar zugeordnet.

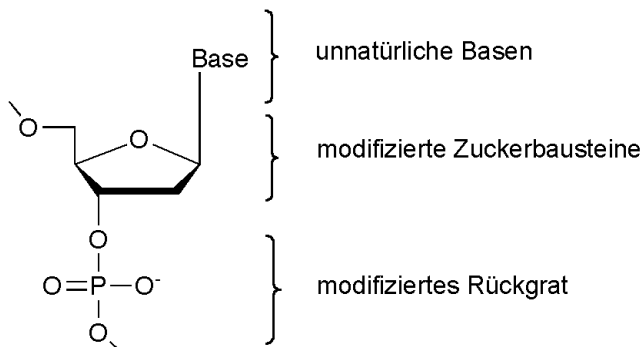


Abbildung 1.7: Mögliche Arten von Nucleinsäuremodifikationen

1.4 Modifizierte Nucleinsäuren

Durch die Verfügbarkeit der automatisierten Festphasensynthese von DNA und RNA^[19] fanden Nucleinsäuren weitverbreitete Anwendung in der Chemie, Biologie und Medizin. Während synthetische DNA-Stränge mit natürlicher Struktur zweifellos als Primer, Linker oder zur molekularen Erkennung in molekularbiologischen Techniken sehr nützlich sind, gibt es eine Menge an bekannten modifizierten Nucleinsäuren mit neuen Eigenschaften und Anwendungsbereichen. Dazu gehören Anwendungen in der Grundlagenforschung, wo Oligonucleotide als Werkzeuge in der Biochemie und Molekularbiologie dienen (Assays, Screening). Weiter werden sie in der Diagnose von Erbkrankheiten oder Krankheitserreger und schliesslich auch als aktive Wirkstoffe in Medikamenten verwendet.

Die meisten dieser Anwendungen beruhen darauf, dass Nucleinsäuren oder deren Analoga in der Lage sind, spezifisch helicale Strukturen zu bilden, sei es intramolekular oder intermolekular mit einer bestimmten Zielstruktur (meist auch Nucleinsäuren). Das heisst die spezifische nichtkovalente molekulare Erkennung spielt dabei eine Schlüsselrolle.

Daneben gibt es natürlich je nach Anwendung eine Reihe von erwünschten oder nicht erwünschten Eigenschaften, die durch Modifizieren der natürlichen Nucleinsäuren beeinflusst werden können. Zum Bsp. ist die Biostabilität oder Bioverträglichkeit für medizinische Anwendungen von entscheidender Bedeutung.

Generell können drei Arten von Modifikationen unterschieden werden (Abbildung 1.7): Analoga mit modifizierten Zuckerbausteinen, mit unnatürlichen Basen oder verändertem Phosphatrückgrat. Oftmals wird auch eine Kombination dieser Modifikationen verwendet.

1.5 Antisense

Durch das *Human Genome Project*³ ist seit 2005 etwa 98% des menschlichen Genomes in seiner Sequenz bekannt^[22]. Die Anzahl menschlicher Gene wird auf 20'000 bis 25'000 geschätzt^[23]. Neben dem menschlichen und anderen bereits bekannten Genomen werden in naher Zukunft Genome weiterer Organismen hinzukommen. Eine der grossen Herausforderung der nächsten Zeit wird es sein, aus einem riesigen Berg an genetischen Informationen relevante Gene aufzuspüren und ihre Funktion zu erforschen. Dadurch erlangen Methoden zur spezifischen und effizienten Unterdrückung einzelner Gene eine enorme Wichtigkeit.

Die spezifische Unterdrückung von Genen ist auch therapeutisch sehr interessant, da man damit Krankheiten heilen kann, die auf der Expression eines "schädlichen" Gens beruhen, z.B. virale Infektionen, Krebs oder Entzündungskrankheiten.

Eine entsprechende Methode stellt die Antisense-Strategie dar. Im Jahre 1979 entdeckten *Stephenson* und *Zamecnik* anhand des *Rous sarcoma Virus*, dass Genexpression durch Oligodeoxynucleotide inhibiert werden kann^{[24][25]}. Durch spezifische Basenerkennung bindet ein Antisense-Oligonucleotid (AS-ON) an eine komplementäre mRNA (Sense-Strang) und unterdrückt dadurch die Translation des entsprechenden Gens. AS-ON bestehen gewöhnlich aus 15-20 Nucleotiden. Da man als Information über das zu inhibierende Gen lediglich seine Sequenz kennen muss, ist der Ansatz sehr allgemein und für beliebige Gene anwendbar.

Für die Anwendung von AS-ONs als Medikamente bedeutet das ein sehr rationales und einfaches Design im Vergleich zum herkömmlichen Ansatz, wo meist versucht wird, ein Enzym in seiner Funktion zu beeinflussen. Ausserdem wird mit AS-ONs auf einer früheren Stufe in die Wirkung eines Gens eingegriffen als mit herkömmlichen Medikamenten; dies sollte eine effizientere Wirkung ermöglichen.

Es sind zwei Mechanismen für AS-ONs bekannt. Einerseits kann ein AS-ON nach der Bindung an die mRNA RNase H aktivieren, das bei DNA/RNA-Heteroduplexe den RNA-Strang schneidet, und führt so einen Abbau der gewünschten mRNA herbei. Andererseits kann ein an die mRNA gebundenes AS-ON das Ribosom bei der Translation blockieren. Während der Abbau durch RNase H im Zellkern stattfindet, ist die sterische Blockierung auch im Zytoplasma anzutreffen.

Ein AS-ON sollte folgende Eigenschaften besitzen:

- hohe Affinität und Bindungsspezifität zu RNA
- Aktivierung von RNase H
- enzymatische Stabilität

³ein Gemeinschaftsprojekt des *International Human Genome Sequencing Consortium* (www.intlgenome.org)

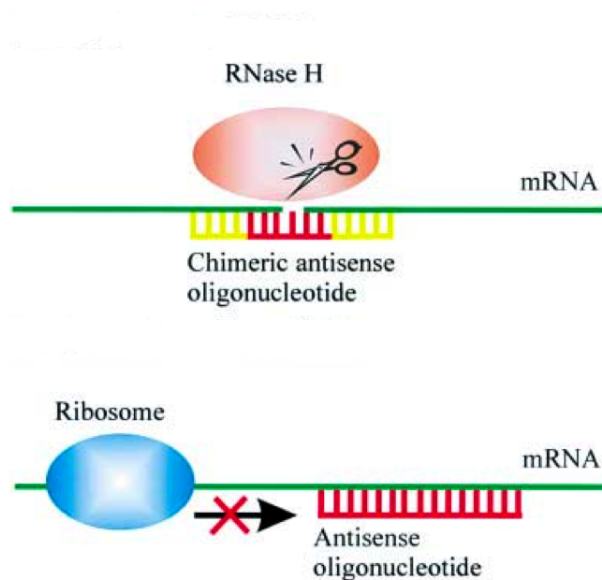


Abbildung 1.8: Antisense-Mechanismen. oben: Aktivierung von RNaseH führt zum Abbau der mRNA, unten: Translation wird durch AS-ON blockiert^[26]

- minimierte Toxizität und Immunogenizität
- industrielle Herstellbarkeit

1.6 Konformationell fixierte Nucleinsäuren

Eine hohe Affinität von Oligonucleotiden zu DNA oder RNA kann prinzipiell durch eine Erhöhung der Enthalpie oder eine Senkung der Entropie der Duplexierung erreicht werden. Eine Möglichkeit zur Senkung der Entropie bietet das Konzept der konformationellen Restriktion^[27]. Dies ist nichts anderes als eine Form der "Präorganisation" von Nucleinsäuren. Beim Betrachten des Vorgangs der Duplexierung bedeutet Präorganisation, dass ein Einzelstrang bereits in einer Konformation vorliegt, die derjenigen gleicht, die er in seiner duplexierten Form erhält.

Bei seinen Studien zu Host-Guest-Komplexen hielt *Cram* fest, dass die Bildung eines Komplexes von zwei Molekülen entropisch ungünstig ist^[28]. Und zwar nicht nur weil dabei zwei Moleküle zu einer Einheit zusammengeführt werden, sondern auch weil die einzelnen Moleküle im Komplex "fixiert" werden und so weitere Freiheitsgrade (freie Rotation um Bindungen) verloren gehen. Wenn eines der beiden Moleküle schon in der Konformation fixiert ist, die es im Komplex

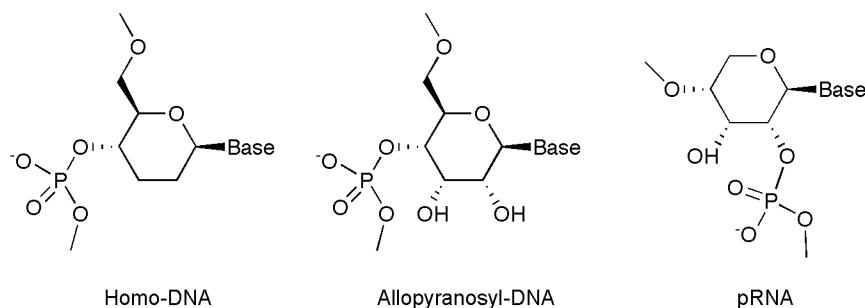


Abbildung 1.9: Hexapyranosyl-Nucleinsäuren

erhalten wird, gibt es im Idealfall abgesehen vom Effekt der bimolekularen Interaktion keinen Entropieverlust bei der Komplexbildung.

Homo-DNA

Einen entropischen Effekt von Präorganisation von Nucleinsäuren wurde erstmals bei Homo-DNA festgestellt. Dabei handelt es sich um 4'-6'-verknüpfte 2',3'-Dideoxy- β -D-glucopyranosylnucleotide^[29] (Abbildung 1.9). Homo-DNA ist ein zu natürlichen Nucleinsäuren orthogonales Paarungssystem; d.h. es bildet keine Duplexe mit DNA oder RNA, jedoch mit sich selbst. Diese Homo-DNA-Duplexe zeigen im Vergleich zu natürlicher DNA eine erhöhte thermodynamische Stabilität, die ursächlich von entropischer Natur ist. Diese wurde auf die Sesselkonformation des Pyranoserings zurückgeführt, der verglichen mit dem Furanosering mit all seinen möglichen Konformationen eine relativ starre Struktur darstellt^[30]. NMR-Strukturanalysen zeigten eine fast lineare nicht-helicale Struktur.

Neben der Homo-DNA wurden auch die hydroxylierten Varianten der Hexopyranosylnucleinsäuren untersucht. Diese zeigten jedoch nur schwache Duplexierungen; wahrscheinlich aufgrund sterischer Kollision der 2'-Hydroxygruppe mit der Nucleobase der nächsten Einheit. Weiter untersuchte man Pentopyranosylnucleinsäuren wie Pyranosyl-RNA (pRNA). Bei dieser fand man wieder Duplexierung zu einer linearen Struktur mit sehr hoher thermischer Stabilität.

HNA

Eine weitere Gruppe von konformationell fixierten Nucleinsäuren stellen die Hexitolnucleinsäuren mit seinem prominentesten Mitglied HNA dar (Abbildung 1.10). HNA bildet Duplexe sowohl mit DNA und RNA als auch mit sich selber. Dabei wurde eine erhöhte thermische Stabilität von $\Delta T_m/\text{mod} = + 1.3^\circ\text{C}$ mit DNA und $\Delta T_m/\text{mod} = + 3^\circ\text{C}$ mit RNA festgestellt. Der Pyranosering liegt in einer Sesselkonformation vor, wobei die Nucleobase in axialer Position ist. HNA/RNA-

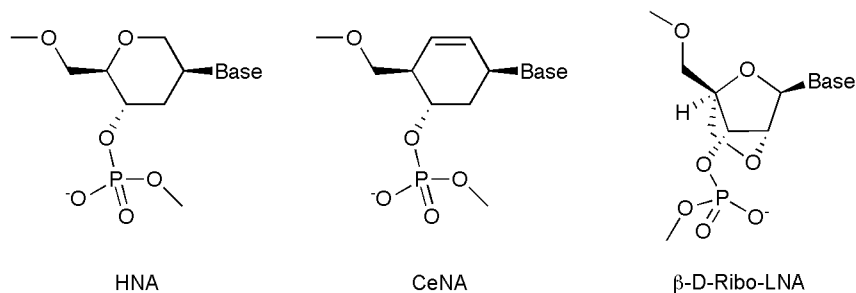


Abbildung 1.10: Nucleinsäureanaloge

Duplexe sind RNase H-resistent, was damit erklärt wurde, dass sie zu sehr einem RNA/RNA-Duplex ähneln^[31]. Es konnte allerdings eine Antisense-Aktivität mit verschiedenen Targets gezeigt werden^[32].

Eine neueres Mitglied der Hexitolnucleinsäuren, die Cyclohexenyl-NA (CeNA) zeigt eine erhöhte thermische Stabilität ($\Delta T_m/\text{mod} = + 1.2^\circ\text{C}$) in RNA-Duplexen und ausserdem RNase H-Aktivität^[33].

LNA

Die Familie der LNA (locked nucleic acid) besteht aus Ribonucleotiden mit einer Methylenbrücke von O2' nach C4'^{[34][35]} (Abbildung 1.10). β -D-Ribo-LNA (LNA) bildet die stabilsten zur Zeit bekannten Duplexe mit RNA ($\Delta T_m/\text{mod} = 4\text{-}10^\circ\text{C}$, je nach Basenkomposition)^[36]. Die Methylenbrücke zwingt die Zuckerkonformation in eine 3'-*endo*-Konformation, die für die A-Form von LNA-Duplexen verantwortlich ist. NMR-Strukturen von Nonameren RNA- und DNA-Duplexen zeigen eine fast kanonische A-Form-Helix. Die Helixachse ist fast gerade und die Geometrie regelmässig^[37]. LNA kann neben Duplex auch Triplexstruktur mit doppelsträngiger DNA bilden^[38].

Dank den guten Bindungseigenschaften, einer guten Stabilität gegenüber Nucleasen und keinen Anzeichen von Zytotoxizität bei optimaler Dosierung^{[39][40]} wurde LNA vermehrt in Antisense-Versuchen verwendet^[41]. Sie aktiviert allerdings RNase H nicht und wird darum meist in Gapmeren eingesetzt; das sind LNA-Oligomere, die in der Mitte 4-6 natürliche DNA-Nucleotide haben. So kann die starke Affinität der LNA mit beiden Enden ausgenützt werden und in der Mitte des Duplex trotzdem RNase H aktiviert werden. Mit solchen Gapmeren können verglichen zu einem isosequenziellen DNA-ON bis 200-fach erhöhte Antisenseaktivitäten erreicht werden^[42]. Neben der β -D-Ribo-LNA sind inzwischen viele LNA-Modifikationen bekannt, darunter z.B. α -L-Ribo-LNA und β -D-Xylo-LNA, welche ebenfalls sehr stabil an RNA binden.

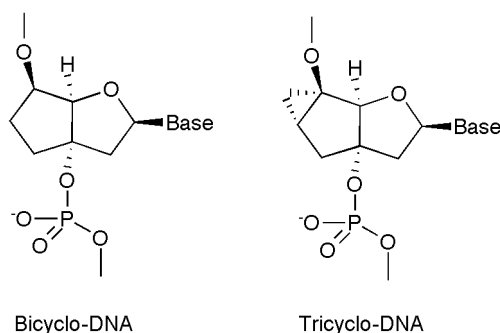


Abbildung 1.11: Nucleinsäureanaloge

Bicyclo- und Tricyclo-DNA

Bicyclo-DNA ist ein DNA-Analogon, bei dem C3' und C5' über eine Ethylenbrücke verbunden ist (Abbildung 1.11). Dadurch werden die Torsionswinkel γ und δ fixiert. Durch die Restriktion von γ erhoffte man sich einen wesentlichen Beitrag zur Präorganisation, da dieser in natürlicher DNA kaum fixiert ist. Bicyclo-Homoadenin-DNA-Sequenzen zeigten eine leicht erhöhte thermische Stabilität in DNA- oder RNA-Duplexen, während Sequenzen mit gemischter Basenfolge eine deutliche Destabilisierung mit sich brachten. Dies konnte damit erklärt werden, dass Bicyclo-DNA mit Homopurin-Sequenzen Hoogsteen und reverse-Hoogsteen-Paarungsmodi bevorzugt. Für Homopurinsequenzen ist eine parallele Orientierung und somit stabilisierende Hoogsteen-Basenpaare möglich, während im gemischtbasigen Kontext destabilisierende Watson-Crick-Basenpaare vorliegen. Die Präferenz zu der Hoogsteen-Seite ist mit dem Torsionswinkel γ zu erklären, der im Gegensatz zu natürlichen Nucleinsäuren im antiperiplanaren Bereich liegt. Dies wurde durch Modelling und Strukturanalyse am Monomer gezeigt.

Interessanterweise war die anschliessend untersuchte 5'-Epi-Bicyclo-DNA, bei dem die Stereokonformation am C5' geändert wurde, gänzlich ausserstandene Watson-Crick-Basenpaare einzugehen.

Im Bestreben den Torsionswinkel γ zu korrigieren und die Zuckerkonformation noch mehr zu fixieren wurde ein synthetischer Abkömmling der Bicyclo-DNA, die Tricyclo-DNA geschaffen. Diese hat eine zusätzliche Methylengruppe zwischen C5' und C6' des Bicyclo-DNA-Zuckergerüsts. Homobasische Adenin- und Thymin-Tricyclo-DNA bildet extrem stabile Duplexe; sowohl mit DNA und RNA als auch mit sich selber. Dabei wird wie bei der Bicyclo-DNA die Hoogsteen-Seite der Basen bevorzugt^[43]. Tricyclo-DNA mit Homopyrimidin-Sequenzen als auch mit Homopurin-Sequenzen bindet dsDNA zu Triplexen^{[44][45]}.

Gemischte Sequenzen ergeben mit DNA und RNA mit erhöhter thermischer Stabilität von 1.2°C resp. 2.4°C/mod^[46]. Tricyclo-DNA ist nucleasenstabil und wirkt nicht RNase H-aktivierend in RNA-Duplexen. Es konnte *in vivo* gezeigt

werden, dass aberrantes Splicing von β -globin durch Tricyclo-AS-ON effizient unterdrückt wird. Dies mit einer 100-fachen Aktivität verglichen zu mit 2'-OMe-Phosphorothioat-ON^[47]. In einem weiteren Versuch mit einem Splice-Site-Target wurde Tricyclo-DNA mit LNA verglichen und stellte sich als 4-5mal aktiver heraus^[48].

Kapitel 2

Allgemeine Aufgabenstellung

Modifizierte Nucleinsäuren haben in vielen Gebieten der Molekularbiologie und der pharmazeutischen Chemie Anwendung gefunden. Bestimmte Modifikationen haben je nach Anwendung gewisse Vorteile gegenüber anderen, bringen aber häufig auch unerwünschte Eigenschaften mit sich. So hat z.B. LNA eine sehr hohe Affinität zu RNA, was für ein Antisense-Oligomer eine nützliche Eigenschaft ist. Sie kann aber im Vergleich zu DNA oder phosphorothioat-modifizierter DNA in einem Duplex mit RNA RNase H nicht aktivieren.

Neben biologischen oder biophysikalischen Eigenschaften wie Affinität zu DNA/RNA, Antisense-Aktivität, Enzymstabilität, toxikologischen Eigenschaften sind auch synthetische, technische oder wirtschaftliche Vor- und Nachteile für die Anwendung in einem bestimmten Bereich entscheidend.

Bezogen auf das Gebiet der Antisense-Forschung heisst das: es gibt schon eine Menge bekannte modifizierte Nucleinsäuren, man kann aber davon ausgehen, dass noch sehr viel mehr Modifikationen mit interessanten Eigenschaften zu entdecken und zu erforschen sind.

Da wir an potenziellen Antisense-Nucleinsäuren interessiert sind und für diese eine effiziente Erkennung von Nucleinsäuren-Einzelsträngen eine wichtige Rolle spielt, lässt sich für uns folgende allgemeine Aufgabenstellung formulieren:

Suche nach neuartig modifizierten Nucleinsäuren, die mit DNA und RNA möglichst stabile Duplexe bilden ausgehend von am Zuckerbaustein konformationell eingeschränkten Nucleosiden unter Einsatz moderner Modeling-Techniken.

Kapitel 3

Design und Modeling

Um neue Modifikationen an Nucleinsäuren zu betrachten nahm man ein Computermodell (Molecular Modelling) zu Hilfe.

3.0.1 Modell

Um relevante Strukturen von einem Molekül zu erhalten braucht man eine Möglichkeit, dessen Gesamtenergie zu berechnen. Damit solche Berechnungen von grösseren Molekülen auf einem gängigen Computer überhaupt zu bewältigen sind, benutzt man etwas vereinfachte Molekülmodelle: sog. Kraftfeld-Modelle. Mit diesen wird die Gesamtenergie eines Systems nicht mit quantenmechanischen Methoden, sondern mit Methoden der klassischen Mechanik berechnet. Dabei werden grob gesagt Bindungswechselwirkungen (d.h. Bindungen, Bindungswinkel und Diederwinkel) durch Federkonstanten beschrieben, andere nichtkovalente Wechselwirkungen (elektrostatische oder Van-der-Waals) durch Kraftfelder. Die benötigten Konstanten und Feldgleichungen werden empirisch gefunden.

Für die vorliegenden Simulationen benutzte man AMBER^[49] ¹ ² als Modell. AMBER wurde in den 80er-Jahren von *Weiner et al.* entwickelt^{[50][51]} und wird bis heute verbessert^{[52][53]}. Es eignet sich speziell für grosse Biomoleküle wie Proteine oder Nucleinsäuren. In der verwendeten Version hat man nicht explizite Wassermoleküle als Lösungsmittel, stattdessen wird der Abschirmungseffekt von Wasser durch eine distanzabhängige Dielektrizitätskonstante ϵ im Coulomb-Term simuliert. Diese hatte einen Wert von $4r$. Elektrostatische- und Van-der-Waals-1-4 nichtkovalente Wechselwirkungen wurden mit Faktor 0.5 skaliert. Nichtkovalente Wechselwirkungen wurden bei jeder Iterationsstufe berechnet (keine *cut-offs*).

¹“Assisted Model Building with Energy Refinement”

²implementiert in *InsightII* mit Discover 3, V98.0 von *Molecular Simulations, Inc.*

3.0.2 Vorgehensweise

Untersucht wurde jeweils eine Doppelhelix bestehend aus einem 10-mer einer modifizierten DNA und dem dazugehörigen komplementären DNA-, oder RNA-Strang. Die ins Auge gefassten monomeren Nukeosidstrukturen sind in Abbildung 3.1 und 3.4 abgebildet. Die Ausgangsstruktur hatte für die DNA-Duplexe angenähert eine B-Form und für die RNA-Duplexe angenähert eine A-Form. Diese Ausgangsstrukturen wurden nun einer Energieminimierung und anschliessend einer Dynamiksimulation unterworfen.

3.0.2.1 Energie-Minimierung

Die Energieminimierung ist eine Konformationssuche, bei der die Gesamtenergie des Systems möglichst gesenkt (minimiert) wird. Theoretisch wären in einer idealen Konformation alle Spannungen verschwunden und die Kräfte auf die einzelnen Atome wären alle Null.

Mit den gängigen Algorithmen (sog. Minimizer) bewegt man sich auf der Potentialoberfläche des Systems in Richtung des nächsten Minimums bis zur Konvergenz des Algorithmus. Weil sich die Suchalgorithmen immer möglichst potentialabwärts bewegen, können damit allerdings nur *lokale* Energieminima in der Nähe der Ausgangsstruktur gefunden werden. Das ist der Grund, warum die Ausgangsstruktur eine eminent wichtige Rolle spielt. Bei den meisten grossen Biomolekülen oder Komplexen gibt es mehrere mögliche Konformationen, die jeweils ein lokales Energieminimum darstellen. Um die energetisch günstigste Konformation (*globales* Minimum) zu finden, müsste man zuerst die verschiedenen lokalen Minima finden und anschliessend vergleichen.

Als Minimizer verwendete man zuerst *steepest descent* bis zu einer Konvergenz von $1000 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ und anschliessend *conjugate gradient* (bis $0.05 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$).

3.0.2.2 Dynamiksimulation

Ausgehend von der energieminierten Struktur wurde nun eine Dynamiksimulation durchgeführt. Dazu wird eine künstliche Wärmebewegung in Form von zufällig generierten Geschwindigkeiten für die einzelnen Atome des betrachteten Moleküls eingeführt. Anschliessend werden in diskreten Zeitstufen die resultierenden Kräfte auf die Atome sowie deren neue Position und Geschwindigkeit berechnet. Dadurch erhält man eine Wärmebewegung der Moleküle und kann daran deren Flexibilität bzw. Starrheit erkennen.

Von den erhaltenen Informationen über die Flexibilität der hier betrachteten Duplexe lässt sich ziemlich direkt auf die Stabilität derselben schliessen; und damit auf die Affinität der involvierten Stränge, an der wir schlussendlich interessiert sind. Etwas Vorsicht ist darum geboten, weil es bei der Beurteilung der

Affinität um die freie Reaktionsenthalpie ΔG der Assoziationsreaktion geht und man hier nur den assoziierten Zustand isoliert betrachtet.

Neben Informationen über Flexibilität erhält man auch Strukturinformationen sowohl über bevorzugte Konformationen der einzelnen Nucleotide als auch über die Form der Doppelhelix. Solche Strukturinformationen erhält man schon durch eine Energieminimierung; die Strukturen nach einer Dynamik (oder mehrmaligem Kombinieren von Minimierung und Dynamik) sind aber wahrscheinlich realistischer.

Die Dynamiksimulation wurde in fs-Zeitstufen und mit stufenweise steigender Temperatur von 50 bis 300 K über 22 ps durchgeführt (1 ps bei 50 K, 1 ps bei 100 K, 2 ps bei 150 K, 3 ps bei 200 K, 5 ps bei 250 K, and 10 ps bei 300 K). Anschliessend berechnete man eine Trajektorie über 200 ps bei 300 K, wobei alle 500 fs eine Struktur gespeichert und anschliessend über die letzten 50 ps gemittelte wurde.

3.0.3 Bemerkungen

Das verwendete Modell kann uns sicherlich keine definitive Antwort über die wirkliche Struktur der getesteten Nucleinsäuren oder deren Paarungseigenschaften geben.

Abgesehen von den Unzulänglichkeiten des Modells und der Methode wurden jeweils nur zwei Ausgangsstrukturen (je einen Duplex mit DNA und RNA in ungefährer A- oder B-Form) über einen eher kurzen Zeitabschnitt (200 ps) betrachtet. Um mehr relevante Konformationen zu erzeugen müsste man z.B. Techniken wie *simulated annealing* anwenden.

Für mehr Informationen zu den Paarungseigenschaften der betrachteten Nucleinsäuren bräuchte es eine Vielzahl von Ausgangsstrukturen, in denen all die interessierenden Besonderheiten wie z.B. parallele Strangorientierung oder eine Basenfehlpaarung eingebaut sind. Das hängt vor allem auch damit zusammen, dass das betrachtete Zeitfenster viel zu kurz ist, als dass sich supramolekulare Erkennungsprozesse erfolgreich simulieren liessen. Für unsere Anwendung heisst das, es ist nicht möglich zwei oder mehr Nucleinsäurestränge nebeneinanderzustellen und mittels Dynamiksimulation zu einem Duplex zusammenzuführen und so neue Paarungsmuster oder sogar Selektivitäten für verschiedene Stränge zu erkennen. Wir können lediglich von verschiedenen Duplexen ausgehend Tendenzen für deren Stabilität feststellen, indem wir schauen, ob die Doppelhelixstruktur erhalten bleibt, bzw. die Basenpaarung darin intakt bleibt; dabei sind aber durchaus kleinere Konformationsänderungen möglich, was schon einen bedeutenden Einfluss auf Helixparameter haben kann. So wird z.B. ein DNA/RNA-Duplex, der ausgehend von einer B-Form-Helix modelliert wird, relativ schnell in eine A-Form übergehen.

3.1 iso-Tricyclo- und [4.3.0]-Bicyclo-DNA

3.1.1 Design

Ausgehend von Tricyclo- und Bicyclo-DNA untersuchte man die beiden Varianten iso-Tricyclo- und [4.3.0]-Bicyclo-DNA (Abbildung 3.1). Als iso-Tricyclo-DNA wird hier ein Isomer von Tricyclo-DNA bezeichnet bei dem die Cyclopropaneinheit um eine Position zu C-6' und C-7' verschoben wurde. Bei der [4.3.0]-Bicyclo-DNA handelt es sich um eine Bicyclo-DNA bei welcher der zweite Ring um eine Kohlenstoffeinheit zum Sechsring erweitert wurde. Die beiden Ringe sind *cis*-verknüpft.

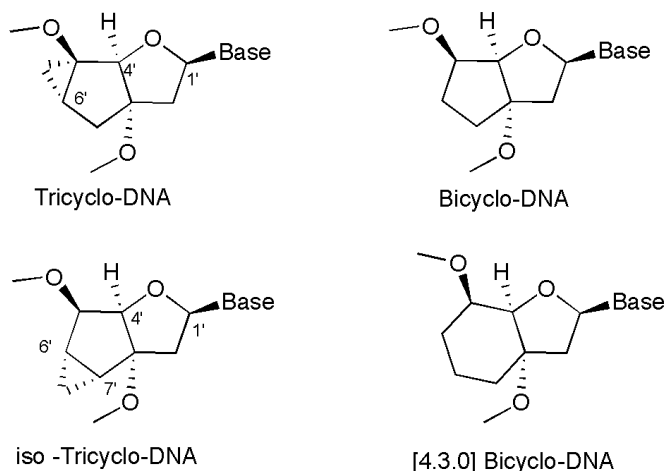
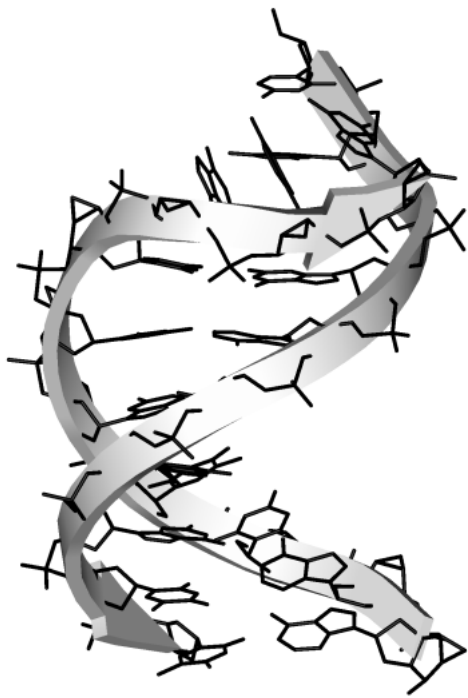


Abbildung 3.1: Monomerstrukturen von iso-Tricyclo- und [4.3.0]-Bicyclo-DNA

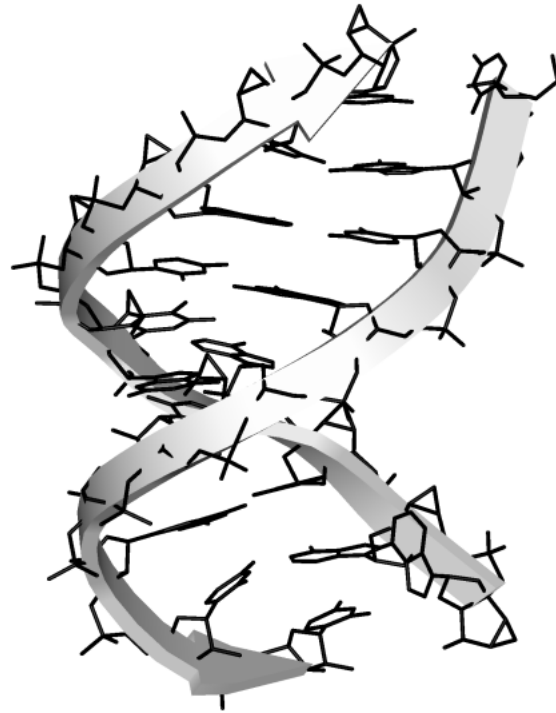
3.1.2 Resultate

Für die iso-Tricyclo-Duplexe erhielt man nach obiger Methode zwei A-Form-Helices, wobei bei demjenigen mit DNA-Komplement die drei randständigen Basenpaare bei der Dynamik entpaart wurden (Abbildung 3.2). Man fand Zuckerkonformationen im Bereich von $C_{4'}$ -*exo* und $C_{3'}$ -*endo* vor. Die Torsionswinkel γ und δ massen um 150° und 95° mit einer kleinen Streuung, was auf ein starres Zuckerrückgrat schliessen lässt (Tabelle 3.1).

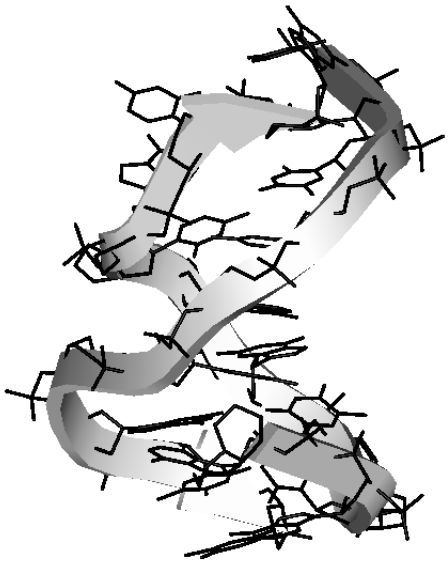
Beim [4.3.0]-Bicyclo-DNA/DNA-Duplex verdrehten sich schon beim Minimieren die Basenpaare. Mit der Dynamiksimulation wurde die Struktur vollends unregelmässig (Abbildung 3.2). Anders verhielt es sich mit RNA als zweitem Strang. Hier erhielt man eine intakte A-Form-Helix (grosser Durchmesser und Hohlraum



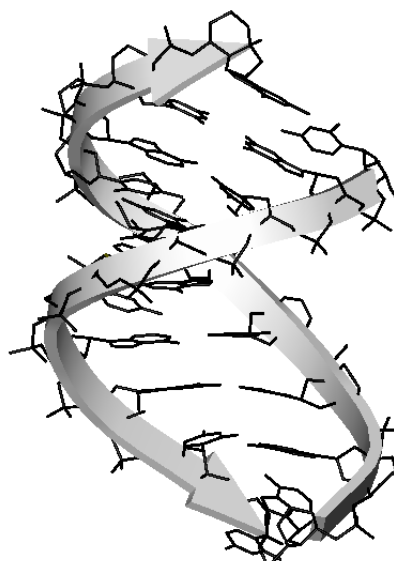
iso-Tricyclo-DNA/DNA



iso-Tricyclo-DNA/RNA



[4.3.0]-Bicyclo-DNA/DNA



[4.3.0]-Bicyclo-DNA/RNA

Abbildung 3.2: Strukturen von Oligo-10-meren nach Energieminimierung und Dynamiksimulation (siehe Kap. 3.0.2); ohne H

	α	β	γ	δ	ε	ζ
iso-Tricyclo/DNA	$-173^\circ \pm 7$	$175^\circ \pm 1$	149 ± 4	$96^\circ \pm 4$	$179^\circ \pm 3$	$-61^\circ \pm 11$
iso-Tricyclo/RNA	$-177^\circ \pm 4$	$137^\circ \pm 47$	152 ± 1	$93^\circ \pm 3$	$-180^\circ \pm 4$	$-16^\circ \pm 56$
[4.3.0]-Bicyclo/DNA	-	-	-	-	-	-
[4.3.0]-Bicyclo/RNA	$-164^\circ \pm 29$	$153^\circ \pm 31$	143 ± 36	$98^\circ \pm 13$	$-180^\circ \pm 6$	$-39^\circ \pm 25$
iso-Bicyclo/DNA	$-62^\circ \pm 2$	$-166^\circ \pm 1$	32 ± 4	$152^\circ \pm 2$	$-173^\circ \pm 2$	$-104^\circ \pm 6$
iso-Bicyclo/RNA	$-64^\circ \pm 2$	$-166^\circ \pm 1$	30 ± 3	$151^\circ \pm 2$	$-172^\circ \pm 1$	$-103^\circ \pm 3$
iso-[4.3.0]-Bicyclo/DNA	$-160^\circ \pm 39$	$-166^\circ \pm 10$	61 ± 4	$80^\circ \pm 6$	$-58^\circ \pm 128$	$-3^\circ \pm 74$
iso-[4.3.0]-Bicyclo/RNA	-	-	-	-	-	-
B-DNA	$-72^\circ \pm 3$	$173^\circ \pm 2$	62 ± 1	$107^\circ \pm 8$	$-178^\circ \pm 3$	$-89^\circ \pm 4$
A-DNA ^[21]	$-75^\circ \pm 36$	$-175^\circ \pm 13$	56 ± 22	$91^\circ \pm 18$	$-166^\circ \pm 19$	$-75^\circ \pm 19$
B-DNA ^[21]	$-63^\circ \pm 8$	$171^\circ \pm 14$	54 ± 8	$123^\circ \pm 21$	$169^\circ \pm 25$	$108^\circ \pm 34$
Bicyclo/DNA ^[46]	$-166^\circ \pm 2$	$178^\circ \pm 2$	143 ± 4	$122^\circ \pm 3$	$177^\circ \pm 3$	$-86^\circ \pm 4$
Tricyclo/DNA ^[46]	$-156^\circ \pm 10$	$87^\circ \pm 6$	149 ± 10	$92^\circ \pm 7$	$173^\circ \pm 8$	$23^\circ \pm 6$

Table 3.1: Übersicht Torsionswinkel. oben: Resultate Modellierung, unten: Vergleichswerte aus der Lit.

um die Helixachse). Die Zuckerkonformationen waren in den meisten Fällen C_4' -*exo* oder O_4' -*endo*, wobei der Sechsring in einer *twisted-boat*-Konformation vorlag, bei dem C-6' nach "hinten" geklappt war (γ um 160°). Es gab auch einige etwas abweichende Konformationen (γ um 100°), was zu den grossen Standardabweichungen führte und auf ein vergleichsweise flexibles Rückgrat schliessen lässt.

3.2 iso-Bicyclo- und iso-[4.3.0]-Bicyclo-DNA

3.2.1 Design

Eine inhärente Eigenschaft der bisher untersuchten Bicyclo- und Tricyclo-DNA^{[27][46]} ist ein Torsionswinkel γ , der im antiperiplanaren Bereich liegt, während natürliche DNA und RNA ein γ im synclinalen Bereich aufweist. In einem Versuch, Zuckerbausteine zu kreieren, bei denen γ eher dem natürlichen Winkel entspricht, entwarf man iso-Bicyclo- bzw. das iso-[4.3.0]-Bicyclo-DNA. Diese enthalten C4', O4' und C5' eines natürlichen Nucleosids in einen zweiten Ring (Abbildung 3.3). Iso-Bicyclo-DNA hat einen fünfgliedrigen und iso-[4.3.0]-Bicyclo-DNA einen sechsgliedrigen zweiten Ring; benachbart zum Brückenkopf wurde ein Kohlenstoff- durch ein Sauerstoffatom ersetzt (Abbildung 3.4). Damit bei der iso-[4.3.0]-Bicyclo-DNA der zweite Ring und die Nucleobasen nebeneinander Platz haben, wählte man *trans*-fusionierte Ringe (S-Konfiguration an der Position C8').

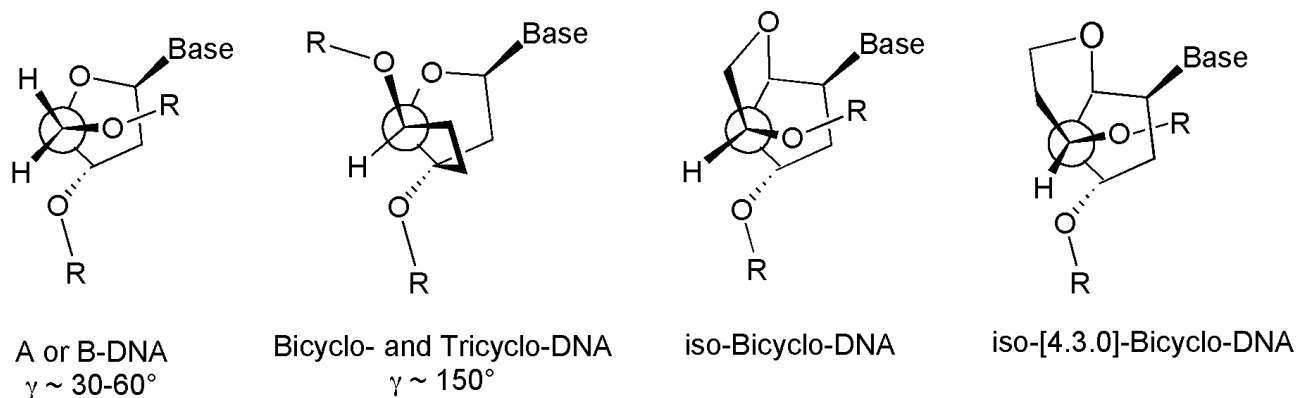


Abbildung 3.3: Der Torsionswinkel γ in verschiedenen DNA-Modifikationen

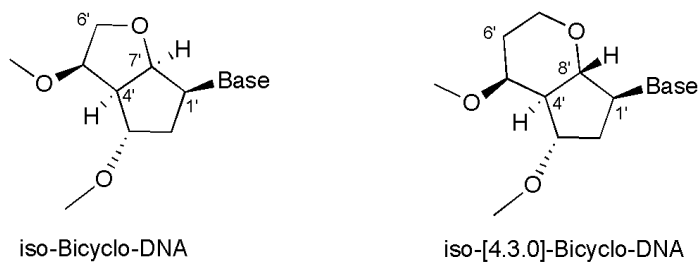
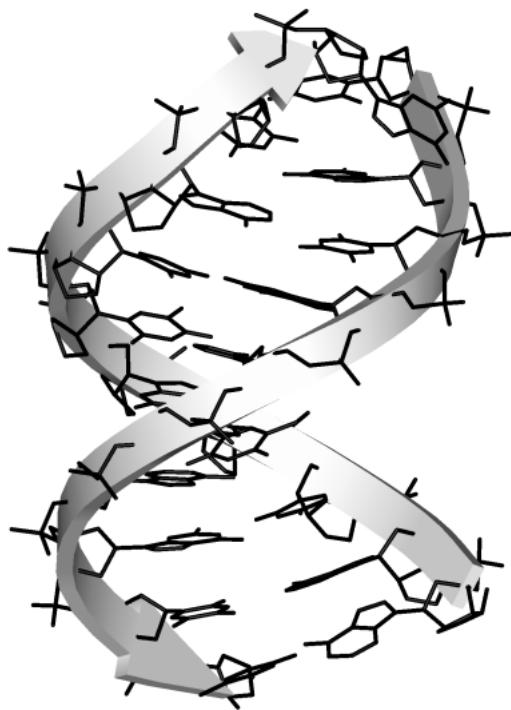


Abbildung 3.4: Monomerstrukturen von iso-Bicyclo- und iso-[4.3.0]-Bicyclo-DNA

3.2.2 Resultate

Das Modelling ergab für die beiden iso-Bicyclo-DNA-Duplexe zwei intakte Helixstrukturen. Zuckerkonformation traf man durchgehend die gleichen an: $C_{3'}\text{-exo}$ (${}_3E$) bis ${}_3T^2$. Die DNA-gepaarte Helix wies eher eine B-Form, die RNA-gepaarte eher eine A-Form auf (Abbildung 3.6), wobei bei letzterer die endständigen Nucleotide des 5'-Endes zur Helixmitte zurückgefaltet waren. Dass bei gleichbleibender Zuckerkonformation einmal eine A- und einmal eine B-Form resultierte, ist etwas erstaunlich. Der Winkel γ war mit etwa 30° geringfügig kleiner als in DNA und RNA (etwa 40° - 60°); δ mit etwa 150° etwas grösser als DNA und RNA (Tabelle 3.1. Das gesamte Rückgrat (inkl. Phosphodiesterbindungen) ist in beiden Helices sehr gleichmässig, was auf eine starre Struktur schliessen lässt.

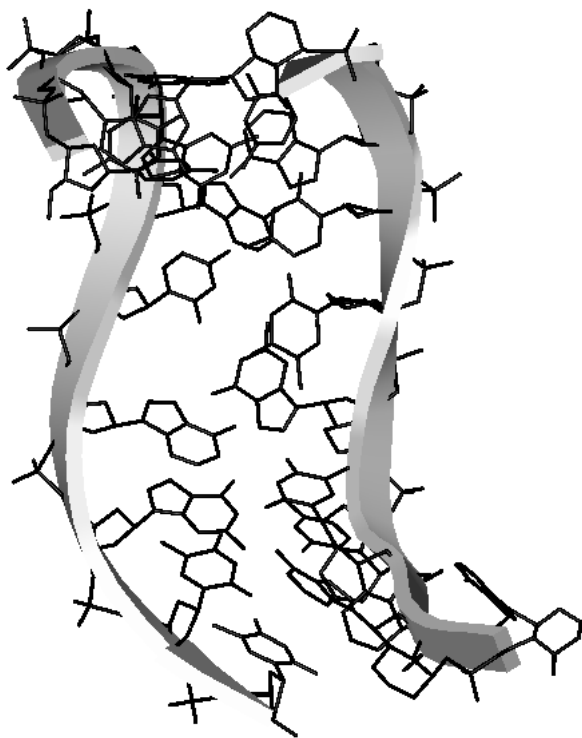
Die beiden Modelle der iso-[4.3.0]-Bicyclo-DNA verloren ihre helicale Struktur bei der Dynamiksimulation weitgehend und gingen in eine lineare gebogene Struktur über. Dabei blieb die Basenpaarung im Duplex mit DNA-Komplement weitgehend erhalten. Als Zuckerkonformationen ergaben sich eine $C_{4'}\text{-exo}$ - bis ${}^{\prime}O_4\text{-endo}$ -Konformationen, wobei der Sechsring jeweils in einer Sesselkonformation anzutreffen war. Die Winkel γ und δ lagen ungefähr in der Nähe derjenigen von A-DNA.



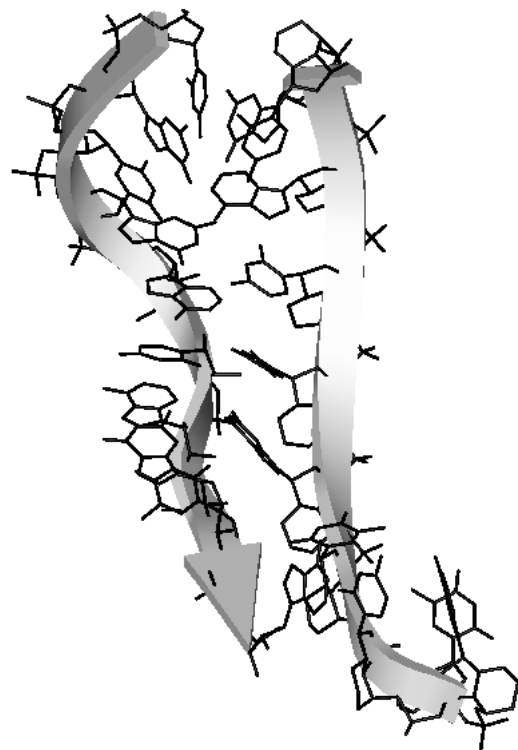
iso-Bicyclo-DNA/DNA



iso-Bicyclo-DNA/RNA



iso-[4.3.0]-Bicyclo-DNA/DNA



iso-[4.3.0]-Bicyclo-DNA/RNA

Abbildung 3.5: Strukturen von Oligo-10-meren nach Energieminimierung und Dynamiksimulation (Methode siehe Kap. 3.0.2)

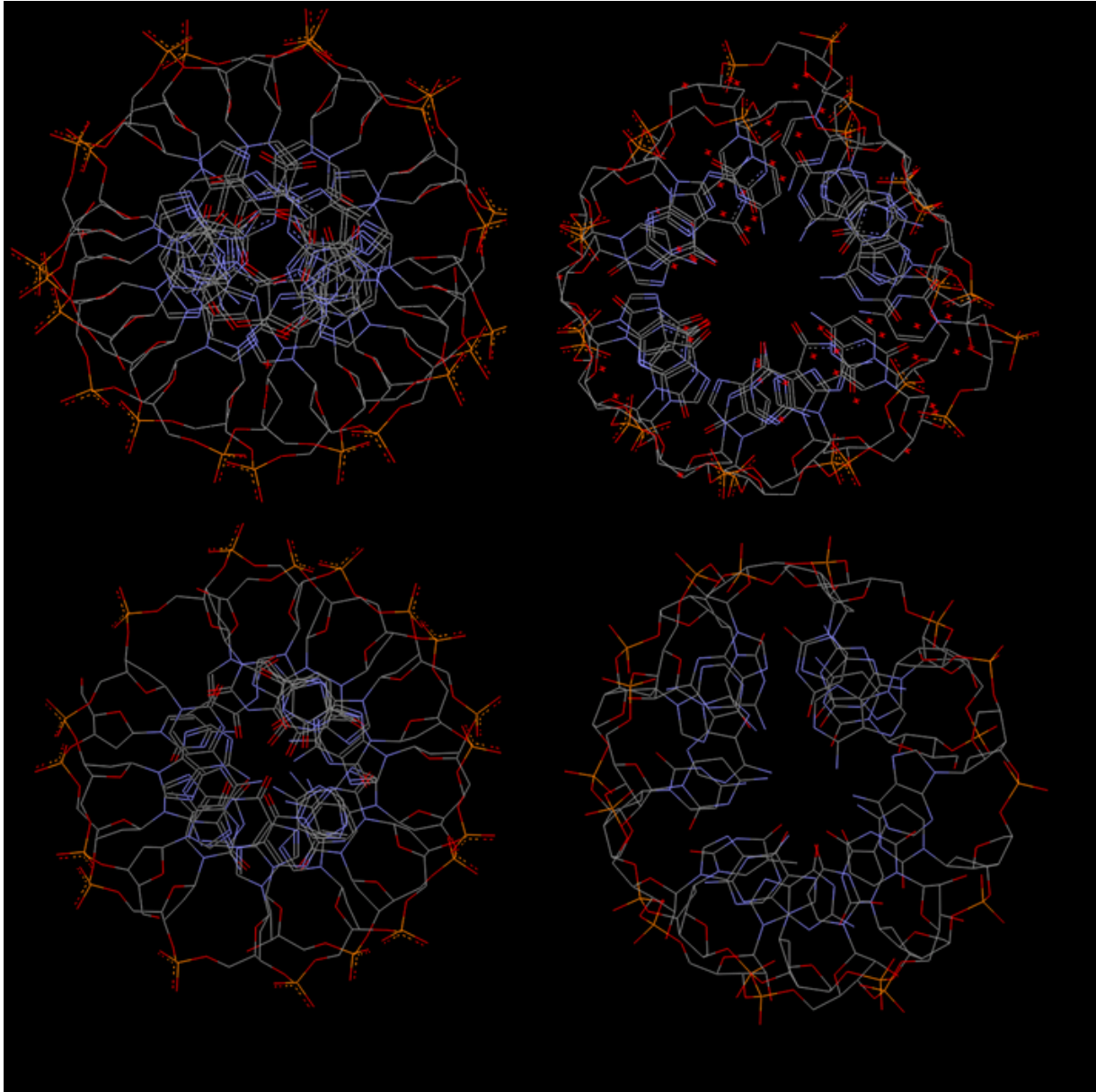


Abbildung 3.6: oben (v.l.): Kristallstruktur einer B-DNA^[54] (NDB ID^[55]: bd0002) und einer A-DNA^[56] (NDB ID: ad0005) unten: Modell der iso-Bicyclo-DNA gepaart mit DNA (links) und RNA (rechts)

Kapitel 4

Konkrete Aufgabenstellung

Aufgrund der ersten Eindrücke über die verschiedenen im Computermodell betrachteten neuen Nucleinsäuren beschloss man, die iso-Bicyclo-DNA experimentell zu realisieren.

Dabei würden vor allem Fragen zu den Paarungseigenschaften im Vordergrund stehen:

1. Bildet iso-Bicyclo-DNA Duplexe mit DNA und RNA?
2. Bildet iso-Bicyclo-DNA Duplexe mit sich selber?
3. Wie ist die thermische Stabilität solcher Duplexes?
4. Wie ist die Basenpaarungsselektivität solcher Duplexe? Wie stark wirkt sich eine Fehlpaarung auf die thermische Stabilität aus?
5. Was für Basenpaarungsmodi sind möglich (Watson-Crick, Hoogsteen)?
6. Was für Strangorientierungen sind möglich (parallel/antiparallel)?
7. Bildet iso-Bicyclo-DNA Triplexen mit DNA?

Aus diesen Fragen leitete sich konkret folgende Aufgabenstellung ab:

1. Entwicklung einer Synthese für den iso-Bicyclo-DNA-Zuckerbaustein
2. Entwicklung einer Synthese der iso-Bicyclo-Nucleoside
3. Synthese von Oligomeren bestehend aus iso-Bicyclo-Nucleosiden
4. Erstes Abklären von Paarungseigenschaften dieser neuartigen Oligomere mit DNA und RNA

Kapitel 5

Synthesen

5.1 Retrosynthese

Ziel der Studie ist die Synthese des Zuckergerüsts der iso-Bicyclo-DNA. Dieses 2-Oxa-[3.3.0]-bicyclo-Gerüst, welches an den Zentren 2, 4 und 6 oxo-substituiert ist, zeigt 5 Chiralitätszentren, über welche Stereokontrolle erzielt werden muss (Abbildung 5.1).

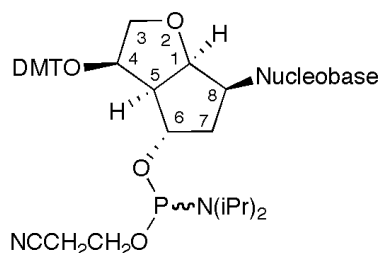


Abbildung 5.1: Zielmolekül: 5'-DMT-geschütztes 3'-Phosphoramidit eines iso-Bicyclonucleosides bereit für die Festphasensynthese.

Eine retrosynthetische Analyse zeigte, dass sich das richtig substituierte bicyclische Gerüst auf einen entsprechend substituierten Cyclopentenylalkohol zurückführen lässt (Abbildung 5.2). In diesem sind schon drei Stereozentren enthalten und das vierte ist gewissermassen vorprogrammiert, da sich bei einem Ringchluss wahrscheinlich das *cis*-fusionierte bicyclische System bildet; das *trans*-fusionierte System wäre sehr viel gespannter und darum nicht als Produkt zu erwarten^[57].

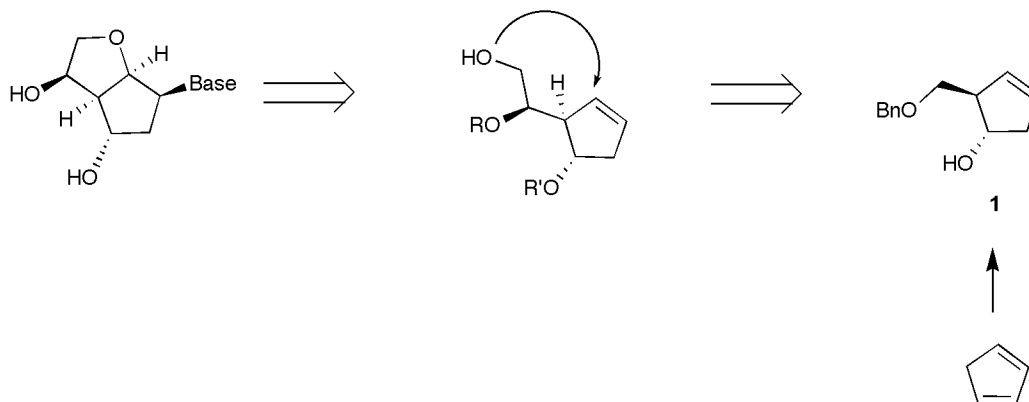


Abbildung 5.2: Retrosynthetische Analyse des bicyclischen Systems mit intermediärem Cyclopentenylalkohol als erste Zwischenstation.

Der Ringschluss kann entweder direkt über eine Iodierung nach *Ghosh*^[58] erfolgen oder über eine Epoxidierung mit anschließendem Ringschluss, z.B. nach *Nicolaou* unter sauren Bedingungen^[59]. Für den Ringschluss wäre auch basische Aktivierung der angreifenden Hydroxygruppe denkbar (Abbildung 5.3).

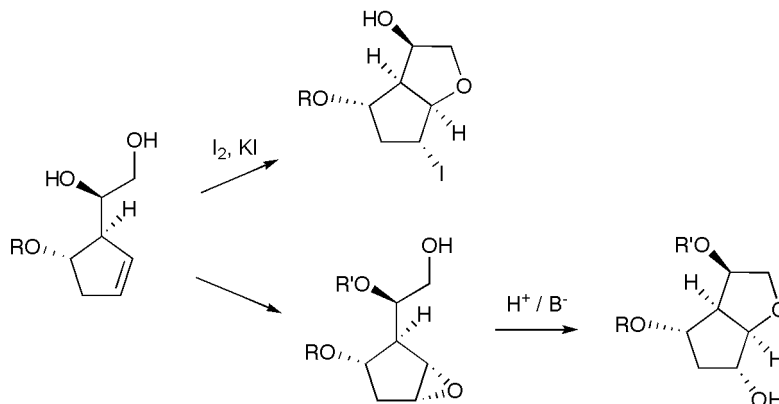


Abbildung 5.3: Ringschluss zum bicyclischen Gerüst direkt durch Iodierung oder über Epoxydierung.

Der intermediäre Cyclopentenylalkohol wiederum sollte ausgehend von Cyclopentadien zugänglich sein (Abbildung 5.4). Eine stereo- und regiospezifische Umsetzung von Cyclopentadien zu (1*S*, 2*R*)-2-Benzyloxymethylcyclopent-3-enol (**1**) ist in der Literatur beschrieben^[60]. Dieser liesse sich nach geeigneter Um-
schützung zum entsprechenden exozyklischen Aldehyd **4** oxidieren und diesen mit Cyanid um eine Kohlenstoffeinheit verlängern. Mit TBDMS-Cyanid liesse sich gleichzeitig die nebenstehende Hydroxygruppe zum TBDMS-Ether schützen.

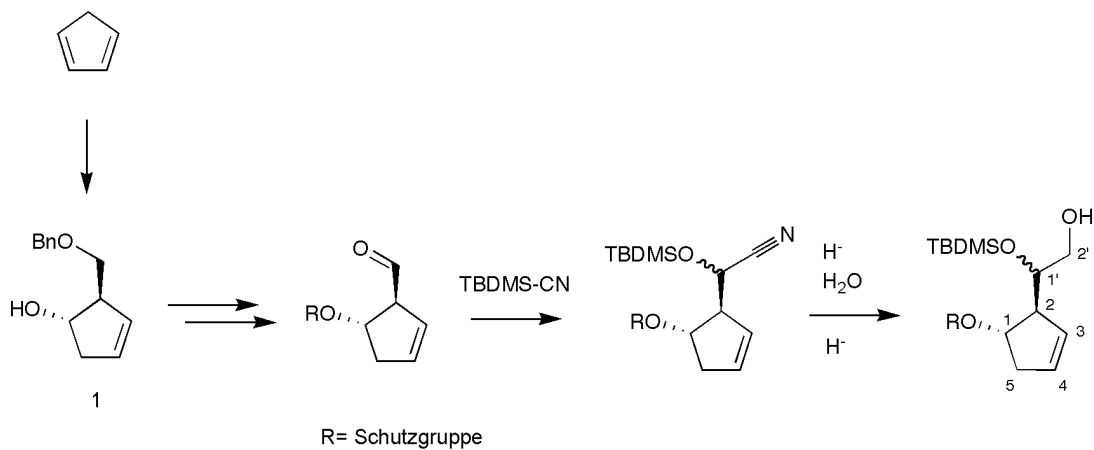


Abbildung 5.4: Strategie zur Synthese des intermediären Cyclopentenylalkohols.

Die Cyanogruppe müsste anschliessend noch reduziert und das entstandene Imin durch Wasser zum Aldehyd ausgetauscht werden. Dieser gäbe nach erneuter Reduktion den gewünschten TBDMS-geschützten Cyclopentenylalkohol. Ein Nachteil dieser Strategie wäre die undefinierte Stereochemie am C-1'. Diese ergäbe sich durch den Angriff des Cyanids auf den Aldehyd, aus welchem ein Diastereomerenmisch zu erwarten wäre.

5.2 Synthese des Cyclopentenylalkohols

5.2.1 Syntheseversuch ausgehend von Cyclopentadien

Nach *Biggadike et al.*^[60] wurde Cyclopentadien über Bildung des Natriumsalzes am sekundären Kohlenstoffatom alkyliert und anschliessend durch stereo- und regioselektive Hydroborierung mit oxidativer Aufarbeitung zum Alkohol **1** oxidiert. Dazu wurde Cyclopentadien mit Natriumhydrid deprotoniert, direkt mit Benzylchloromethylether behandelt, anschliessend mit (-)-Diisopinylcamphenylboran umgesetzt und mit H₂O₂ in NaOH aq. aufgearbeitet (Schema 5.1.)

Die anfänglich sehr tiefen Ausbeuten (6-10%) konnten durch den Gebrauch von käuflicher Natriumcyclopentadien-Lösung (*Fluka*, 2M in THF) auf etwa 30% gesteigert werden (Lit.: 35-36%^[61]). Eine weitere Verbesserung der Ausbeute könnte wahrscheinlich durch Aufkonzentrieren der Reaktionslösung vor der Zugabe des Borans erreicht werden^[62]. Die optische Reinheit des Produkts lag nach GC-Analyse mit chiraler Säule bei 95-97% ee. (-)-Diisopinylcamphenylboran wurde nach *Darses et al.*^[63] aus (+)- α -Pinen und Dimethylsulfid-Boran-Komplex in THF hergestellt und direkt in Lösung verwendet.

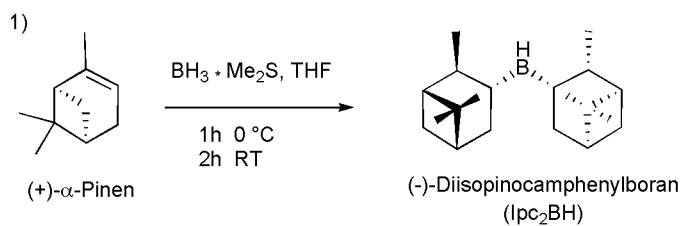
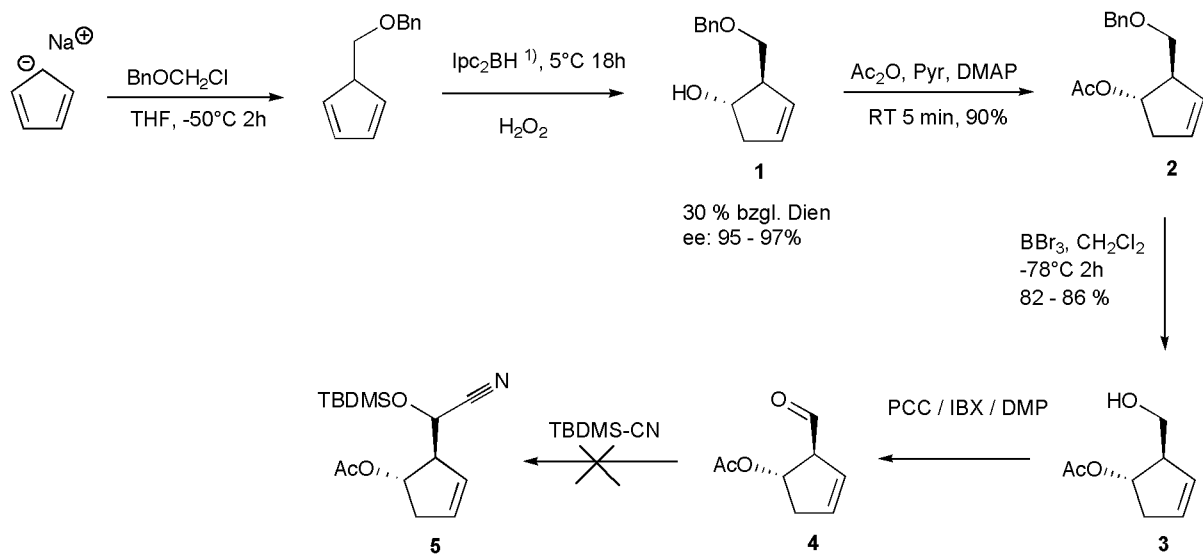
Der Alkohol **1** wurde mit Essigsäureanhydrid und katalytischer Menge DMAP in Pyridin zu **2** acetyliert (Ausbeute 90%). Anschliessend wurde mit BBr₃ in CH₂Cl₂ entschützt, was mit zufriedenstellender Ausbeute (82-86%) gelang.

Nun ging es darum den Alkohol zum Aldehyd zu oxidieren. Mit 3 eq. PCC in CH₂Cl₂ kam es nach DC nur zu geringem Reaktionsumsatz und man erhielt nach Filtration über Celit und Silica nur sehr wenig (\sim 10%) eines schwarzen Öls als Rohprodukt. Auch Umsetzung mit IBX in DMSO/THF verlief relativ langsam und unvollständig (DC: \sim 50% Umsatz zu einem apolareren Spot nach 5h RT) und man erhielt nach Waschen mit ges. NaHCO₃-Lösung und Extraktion mit tBME nur etwa 10% Rohprodukt. Behandlung mit Dess-Martin-Periodinan (DMP) in CH₂Cl₂ bei RT ergab nach DC bereits nach 15 min einen vollständigen Umsatz. Man wusch mit ges. NaHCO₃-Lösung und H₂O und extrahierte mit tBME. Gemäss DC entstand ein Produktgemisch neben unumgesetztem Ausgangsmaterial. Nach Reinigung mittels FC erhielt man \sim 20% Produkt, das sich im NMR als Gemisch von mehreren Aldehyden herausstellte.

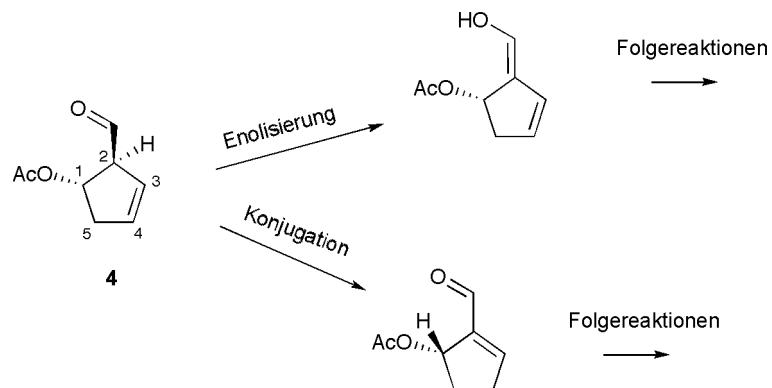
Diese Versuchen zeigten, dass der gewünschte Aldehyd **4** sehr instabil sein muss. Man kann sich diesen Befund erklären, wenn man bedenkt, dass das Proton am C2 relativ sauer ist und dadurch die benachbarte Doppelbindung in Konjugation treten kann (Schema 5.2).

Es wurde versucht, den mit DMP gewonnenen Aldehyd **4** nach dem Workup ohne Reinigung direkt mit TBDMS-Cyanid und KI umzusetzen. Dabei erhielt man allerdings nach Reinigung mittels FC nur zwei Fraktionen mit geringer Menge an Material, die gemäss NMR-Analyse nicht das gewünschte Produkt nicht enthielten.

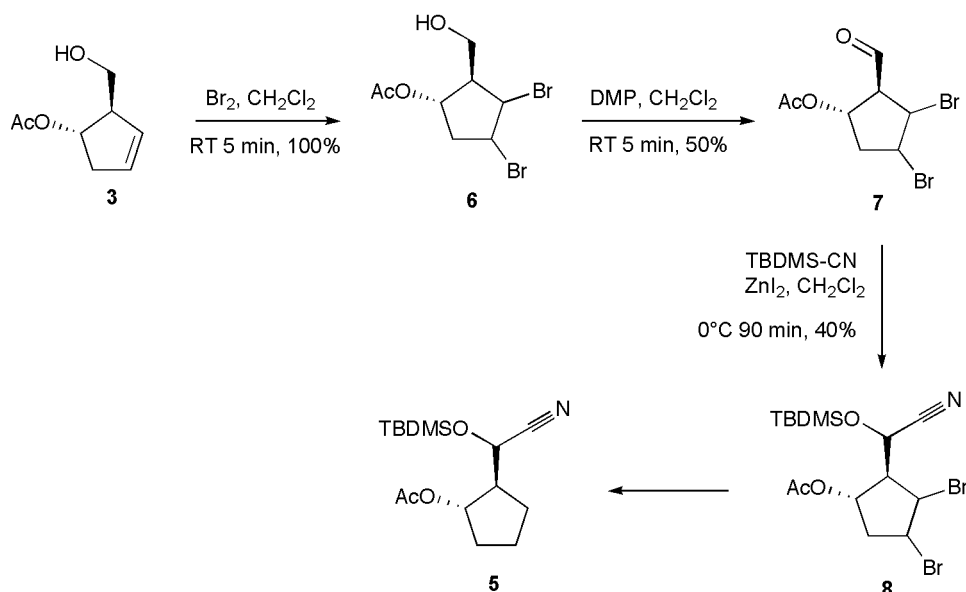
Um das Problem des instabilen Aldehyds **4** zu umgehen, wurde versucht vor



Schema 5.1: Synthese ausgehend von Cyclopentadien.



Schema 5.2: wahrscheinliche Nebenreaktionen von Aldehyd 4 zu konjugierten Verbindungen.

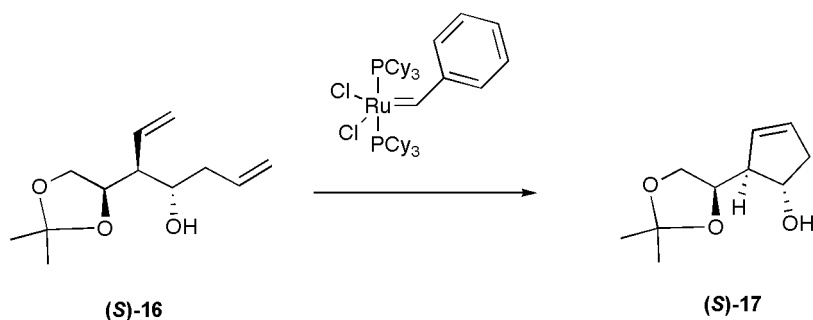


Schema 5.3: Umgehung von Aldehyd **4** durch Brominierung.

der Oxidation die Doppelbindung zu bromieren, um damit den Aldehyd **7** zu erhalten (Schema 5.3). Dieser sollte aufgrund der fehlenden Doppelbindung wesentlich stabiler sein als Aldehyd **4** und könnte dann nach der Addition von TBDMS-CN wieder dehalogeniert werden. Die Bromierung mit Br₂ in CH₂Cl₂ bei RT verlief problemlos. Die anschliessende Oxidation mit DMP ergab Aldehyd **7** in 50% Ausbeute als 1:1 Gemisch von zwei Isomeren, höchstwahrscheinlich den beiden Stereoisomeren der Bromierung.

Die Addition von TBDMS-CN an **7** nach *Rawal et al.*^[64] wonach das TBDMS-CN *in situ* mit TBDMS-Cl und KCN mit katalytischer Menge ZnI₂ hergestellt wird, ergab nur Zersetzung der Ausgangsmaterials. Bei direkter Zugabe von TBDMS-CN in CH₂Cl₂ bei 0°C konnte man gemäss DC die Reaktion von einem der beiden Stereoisomere des Ausgangsmaterials beobachten. Nach 90 min hatte sich dieses fast vollständig umgesetzt. Nach Aufarbeiten mit ges. NaHCO₃-Lösung in Et₂O und Reinigung mittels FC erhielt man ein Gemisch von zwei Isomeren in 17% Ausbeute. Die ¹H-NMR-Analyse stand im Einklang mit der postulierten Struktur von **8** (bzw. Stereoisomere).

Die geringen Ausbeuten der letzten Stufen, die nicht gegebene Stereospezifität der Addition an den Aldehyd sowie die Ungewissheit über die anschliessend geplante Debrominierung liess uns schliesslich nach anderen Synthesestrategien Ausschau halten.



Schema 5.4: Ringschlussmetathese mit Grubbs-Katalysator.

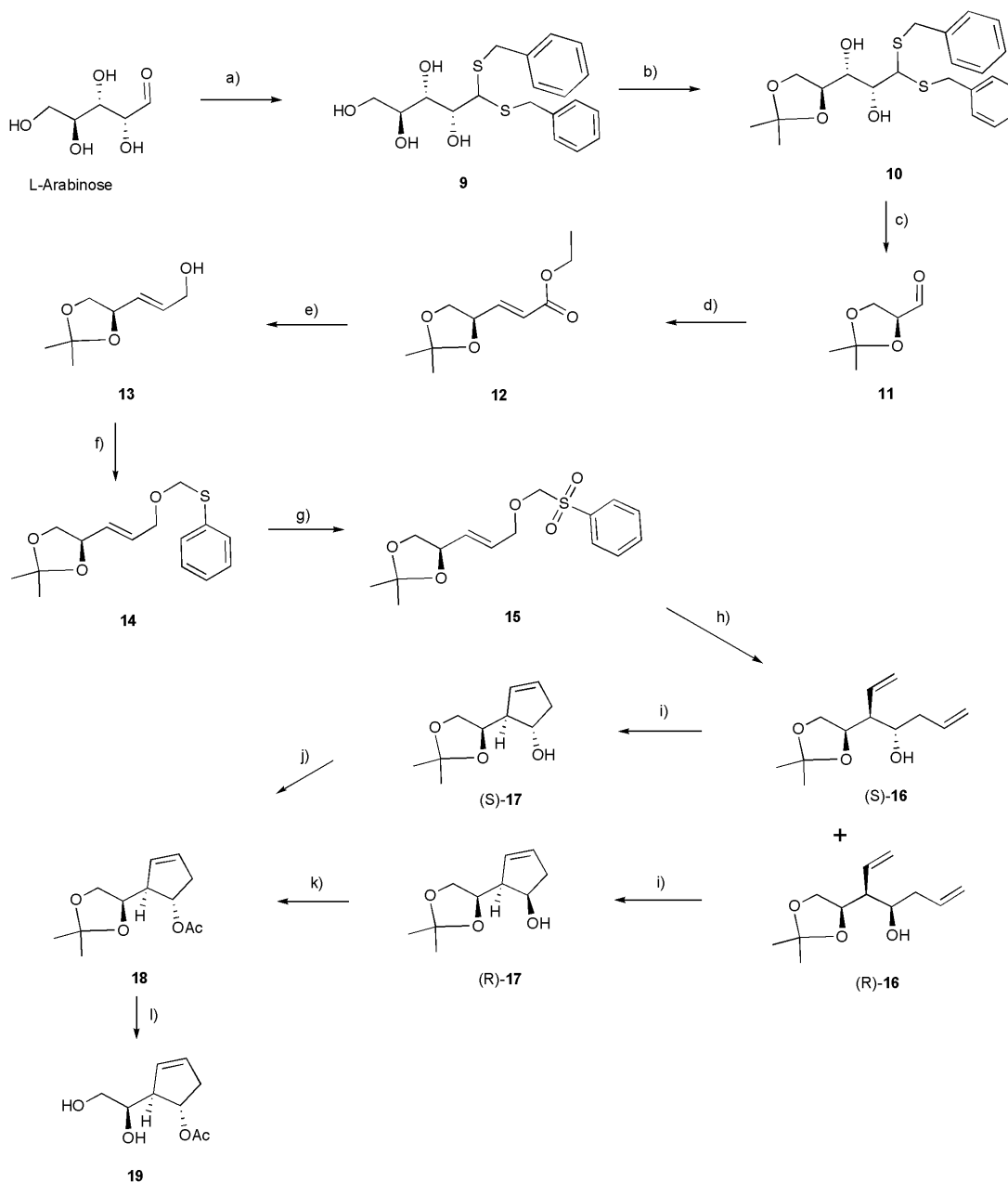
5.2.2 Synthese ausgehend von L-Arabinose

Auf der Suche nach einem neuen Zugang zum intermediären Cyclopentenylalkohol stiess man auf das Dien **(S)-16**, das von *Brückner* beschrieben wurde^[65]. Dieses Dien könnte über eine *Grubbs*-Ringschlussmetathese direkt zum gewünschten Alkohol überführt werden (Abbildung 5.4). Es besitzt bereits alle drei Stereozentren in gewünschter Konfiguration und der entstehende Alkohol **(S)-17** muss lediglich noch zum primären ungeschützten Cyclopentenylalkohl umgesetzt werden.

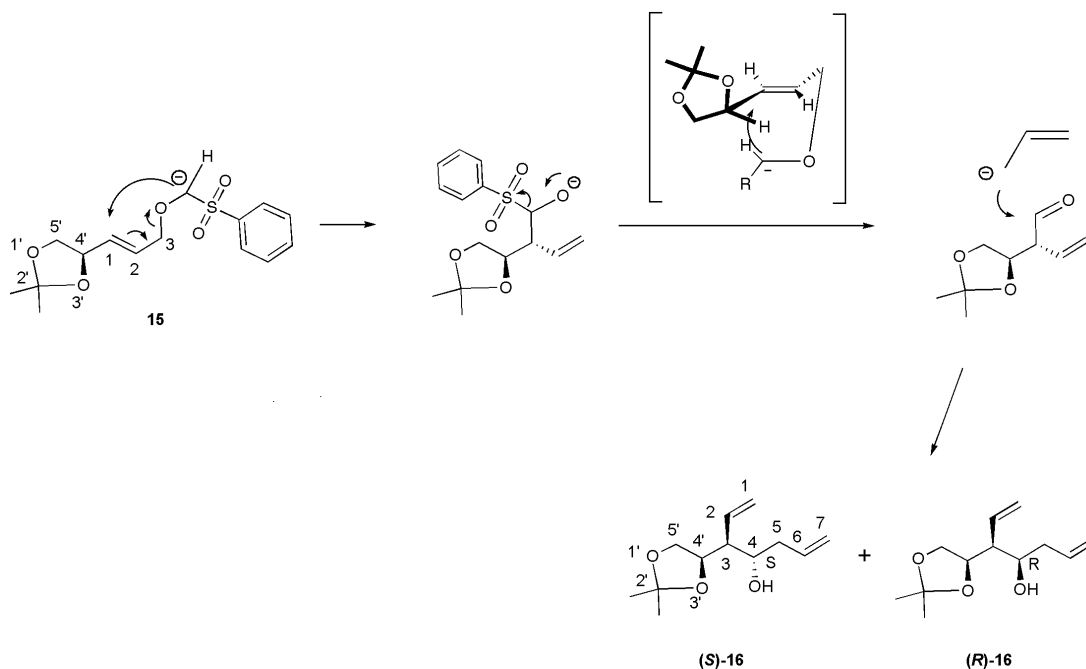
Das Dien **9** wurde ausgehend von L-Arabinose über 8 Stufen hergestellt (Schema 5.5). L-Arabinose wurde nach *Maloney*^[66] mit Benzylmercaptan zum entsprechenden Dithioacetal **9** umgesetzt. Danach wurde mit Dimethoxypropan und PPTS die primäre Hydroxygruppe und deren vicinale sekundäre Hydroxygruppe als Acetonid geschützt^[67]. Das entstandene Diol **10** wurde mit NaIO₄ oxidativ gespalten^[68]. Weil der gebildete Glyceraldehyd relativ instabil ist, wurde er nicht gereinigt, sondern lediglich mit einer kurzen Säulenchromatographie vom anderen anfallenden Aldehyd getrennt und sofort weiterverwendet. Nach einer *Horner-Wittig*-Reaktion erhielt man Ester **12**^[69] in etwa 50% Ausbeute über beide Stufen. Versuche mit gereinigtem Ausgangsmaterial **11** ergaben für die Olefinierung Ausbeuten von 77-79%.

Anschliessend wurde der Ester mit DIBAH zum Alkohol **13** reduziert^[70] (82% Ausbeute) und dieser mit Chlormethyl-phenyl-sulfid zum Thioether **14** umgesetzt^[71] (Ausbeute: 60-76%). Die folgende Oxidation mit *m*CPBA zum Sulfon **15**^[72] verlief in ~90% Ausbeute.

Die folgende Wittig-Umlagerung/Alkylierung zum Dien **16** wurde nach *Brückner*^[73] durchgeführt. Dabei versetzte man *in situ* aus Tetraallylzinn *n*-BuLi hergestelltes Allyllithium mit **15**. Dieses wird am Kohlenstoffatom neben der Sulfongruppe deprotoniert, worauf die Umlagerung mit einem intramolekularen Angriff des Carbanions auf das C1 stattfindet (Schema 5.6). Die Umlagerung wird in ihrer Stereoselektivität durch das vorhandene Stereozentrum am C4' kontrolliert. Diese *asymmetrische Induktion* ist durch den Übergangszustand mit bevor-



Schema 5.5: Übersicht über die Synthese des Bicyclogerüsts **20**: a) BnSH, HCl aq., 1h, 0°C, 63% b) Dimethoxypropan, PPTS, Aceton, RT, 40 min, 100% c) NaIO₄, THF/H₂O, 30 min RT, 50-60%, nicht gereinigt d) (Et)₃POCH₂COOC₂H₅, KCO₃ aq, RT, 22h, 46 - 51% bzgl. Dithioacetal, E-Z, 97:3 e) DIBAH, CH₂Cl₂, -78°C, 90 min, 82% f) PhSMeCl, NaI, 1h 0°C, 6.5h RT, 60 - 76% g) mCPBA, 2h, RT, 87 - 93% h) 1. Sn(C₃H₅)₄, *n*-BuLi, -78°C 20 min 2. DMPU, THF, -78°C, 20 min, 64-73%, (nicht vollständig getrennt, Verhältnis ~1:1) i) Grubbs Kat. 11%, Et₂O, 18h, RT, (*S*)-**17**: 72%/ (*R*)-**17**: 60%, j) Ac₂O, DMAP, pyr, RT 30 min, 90% k) DIAD, Ph₃P, AcOH, THF, 15h RT, 27-42% l) 80% AcOH aq., 20h RT, 50-90%.



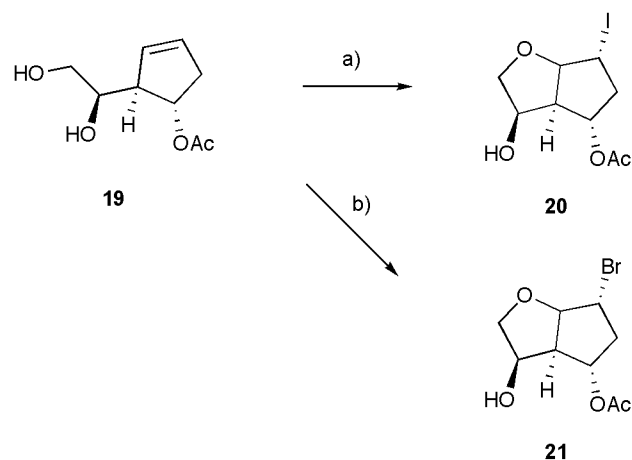
Schema 5.6: Mechanismus der Wittig-Umlagerung; die Konformation des Übergangszustandes bestimmt die Stereoselektivität der Umlagerung.

zugter Konformation bestimmt, bei der sowohl die Minimierung von sterischer Abstoßung als auch Überlappung von allylischen σ - und σ^* -Orbitalen eine Rolle spielen^[74]. Man erhält am C3 ausschliesslich die S-Konfiguration (das jeweils andere Isomer wurde nicht isoliert; in der Lit.^[73] ist ein Verhältnis von 10:1 angegeben). Nach der Umlagerung wird der Phenylsulfonylrest eliminiert und der entstandene Aldehyd von *in situ* generiertem Allyllithium alkyliert. Letzterer Schritt erfolgt nicht stereospezifisch; man erhielt ein Gemisch der beiden Stereoisomere im Verhältnis 1:1 in einer Gesamtausbeute von 64 - 85%. Das Tetraallylzinn wurde nach Gampe *et al.*^[75] aus Allylmagnesiumchlorid und Zinntetrachlorid hergestellt.

Die Ausbeuten der Umlagerung konnten allerdings bei späteren Ansätzen nicht reproduziert werden. Man erhielt nur noch Ausbeuten von 38-45%. Der Grund ist unklar. Man ersetzte *n*-BuLi durch das reaktivere *sec*-BuLi, was aber keine Besserung brachte. Auch eine Reinigung und eine erneute Herstellung von Tetraallylzinn ergab keine besseren Ausbeuten.

Das Stereoisomer (**R**)-**16**, das ein für unsere Synthese falsch konfiguriertes Stereozentrum am C4 besitzt wurde trotzdem weiterverwendet; es konnte nach der Ringschlussmetathese mit einer Mitsunobu-Inversion in das erwünschte

S-Isomer überführt werden. Für die Ringschlussmetathese wurde der Grubbs-Katalysator (erste Generation) in Et₂O verwendet. Um eine einigermaßen vollständige Konversion zu erreichen, benötigte man 11 mol% Katalysator. Anschliessend wurde die cyclische Hydroxygruppe acetyliert bzw. durch Mitsunobu Reaktion invertiert und gleichzeitig acetyliert. Das geschützte Triol **18** wurde mit 80% Essigsäure entschützt. Dabei konnten anfängliche Ausbeuten von 85-90% nicht immer reproduziert werden. Man erreichte z.T. nur noch 48-62%. Da die Reaktion nach DC vollständig und sauber ablief, musste es sich um ein Problem der Aufarbeitung handeln.



Schema 5.7: Ringschlüsse zum Bicyclischen Gerüst mittels Halogenierung
 a) I_2 , KI, $NaHCO_3$, CH_2Cl_2/H_2O , RT, 3d, 60-80%, b) Br_2 , KBr, $NaHCO_3$, CH_2Cl_2/H_2O , RT, 3d, 23%.

5.3 Synthese des bicyclischen Kohlenstoffgerüsts und Nucleosidierungsversuche

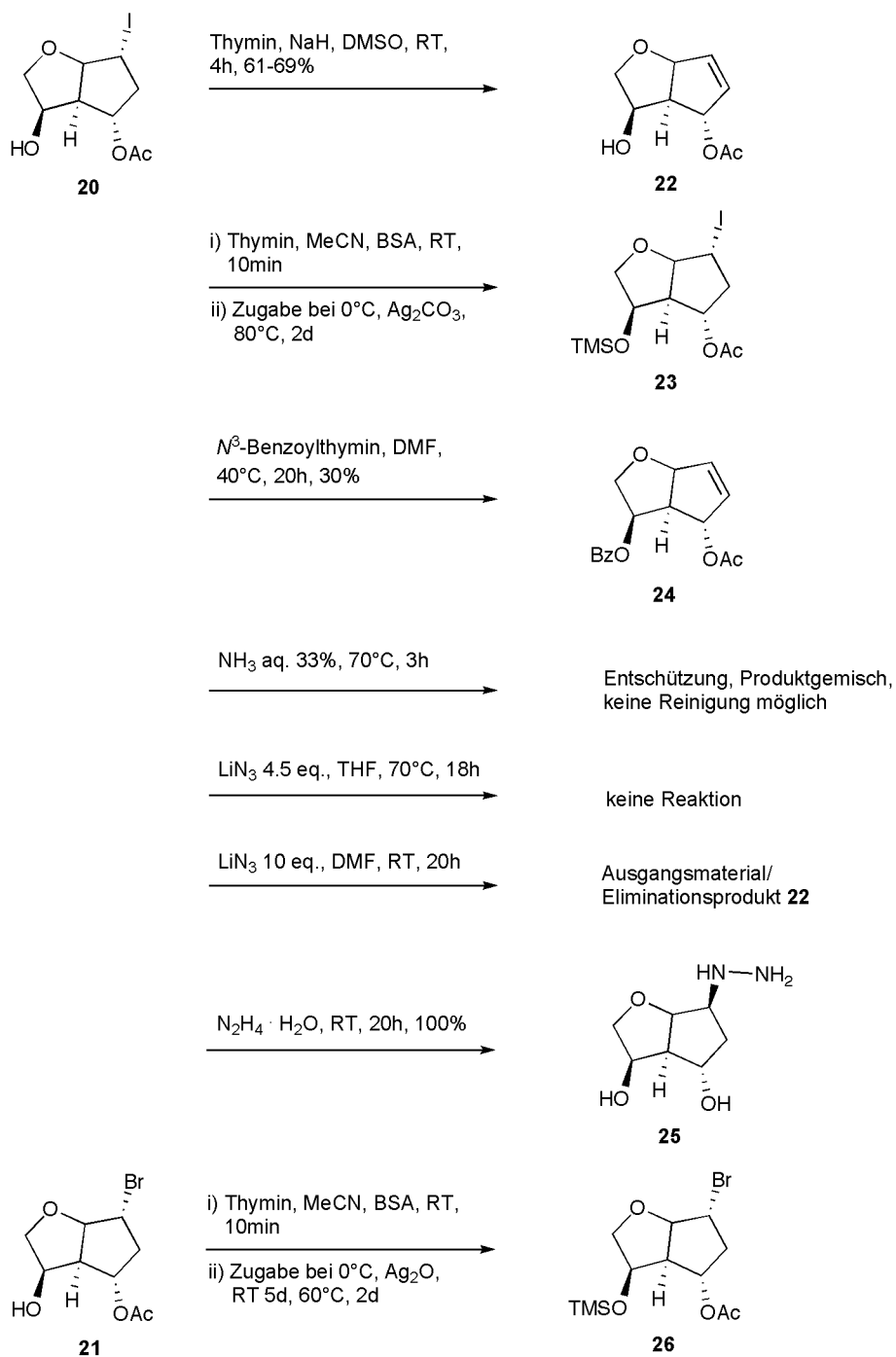
Der intermediäre Cyclopentenylalkohol (**18** bzw. **19**) lag also vor und es ging nun darum, den zweiten Ring zum bicyclischen System zu schliessen (Abbildung 5.7). Der Ringschluss mit Iod nach Ghosh^[58] gelang in 60 - 80% Ausbeute. Die analoge Reaktion mit Brom zu **21** ergab 23% Aubeute, war allerdings nicht optimiert worden.

5.3.1 Nucleosidierungsversuche

Nun wurde versucht, das Produkt **20** zu nucleosidieren. Die Nucleobase sollte über S_N2 am iodinierten Kohlenstoffatom eingeführt werden. Man verwendete dazu mit 1-2 eq. NaH aktiviertes Thymin und DMSO als LSM. Es konnte aber lediglich das Eliminationsprodukt **22** (61-69% Ausbeute), sowie eine kleine Menge an deacetyliertem Produkt isoliert werden (Schema 5.8).

Es wurden auch Reaktionsbedingungen nach Howarth *et al.*^[76] getestet. Ihm gelang es, bei einem iodinierten Cyclopentanderivat das Iod mit bezoylgeschütztem Thymin in 49% Ausbeute zu substituieren. Dazu wurden 2.2 eq. Benzoylthymin und 2 eq. NaH in DMF bei 40°C verwendet. In unserem Fall konnte jedoch lediglich 30% an der freien Hydroxygruppe benzoyliertes Eliminationsprodukt **24** isoliert werden.

Des weiteren versuchte man, die Nucleobase durch Silylieren als Nucleophil zu aktivieren. Dazu benutzte man BSA in Acetonitril. Nach Zugabe von **20** konnte



Schema 5.8: Getestete Bedingungen zu Substitutionsreaktionen der bicyclischen Halogenverbindungen **20** und **21**.

jedoch lediglich ein apolarerer Spot beobachtet werden, der sich als silyliertes Ausgangsmaterial **23** herausstellte. Auch längere Reaktionszeit, erhöhte Temperatur (80°C) und Zugabe von Silbercarbonat zur Aktivierung von Iod als Abgangsgruppe, führten zu keiner Substitution.

Den selben Versuch machte man mit dem bicyclischen Bromderivat **21** und Silber(I)-Oxid. Aber auch hier erhielt man lediglich silyliertes Ausgangsmaterial **23**.

Da unklar war, warum die Substitution am C8 nicht funktionierte, beschloss man, die freie Hydroxygruppe am C4 zu schützen, um einen eventuellen Einfluss derselben bei der Substitutionsreaktion zu unterbinden. Man versuchte mit Benzylbromid zu benzylieren. Man versetzte **20** in Benzol mit Benzylbromid und Silber(I)-Oxid. Allerdings konnte man auch nach Tagen am Rückfluss keine Reaktion feststellen. Ein Versuch mit Benzylbromid, Kaliumiodid und Triethylamin in DMF ergab auch keinerlei Reaktion. Dass keine Benzylierung zu beobachten war, ist eigentlich erstaunlich weil es im Widerspruch zu den Beobachtungen der Nucleosidierungsversuche stand, bei denen die C4-Hydroxygruppe silyliert worden war.

5.3.2 Substitution am Halogenierten Bicyclogerüst

Um zu testen, ob das Iodatom von **20** überhaupt substituiert werden kann, wurde es mit verschiedenen Nucleophilen behandelt. Mit 33%iger Ammoniaklösung bei 70°C konnte man nach DC das Verschwinden des Edukts und einen neuen Spot, der mit Ninhydrin-Lösung färbte feststellen, was auf ein Amin hindeutete. Nach NMR lag ein Gemisch von verschiedenen Produkten vor. Sämtliche Reinigungsversuche mittels FC oder direkte Schützung mittels Boc-Anhydrid waren nicht erfolgreich.

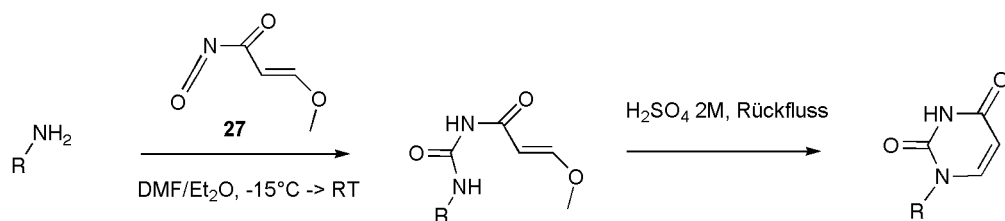
Mit Lithiumazid in THF oder DMF konnte keine Substitution beobachtet werden. In THF konnte keine Reaktion festgestellt werden; in DMF erhielt man nur das Eliminationsprodukt **22**.

Mit Hydrazin schliesslich konnte Substitution zu **25** beobachtet werden. Mit einem Eq. Hydrazinhydrat in MeOH erhielt man noch ungefähr 5% Eliminationsprodukt; wurde Hydrazinhydrat als LSM verwendet, erhielt man ausschliesslich Substitution. Dabei wurde allerdings auch deacetyliert. Das überschüssige Hydrazinhydrat sowie das Acetylhydrazin konnten direkt am HV abgedampft werden.

Mit einem starken Nucleophil schwacher Basizität in hoher Konzentration hatte man also eine Substitution erreicht.

5.3.3 Basenaufbau

Mit der Verbindung **25** in Händen wurde nun ein Weg zum gewünschten Nucleosid mittels Basenaufbau ins Auge gefasst. Dazu nahm man die Methode von



Schema 5.9: Basenaufbau nach Shealy et al..

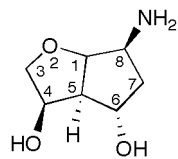
Shealy et al.^[77] zum Aufbau von Uracil, die auch schon in unserem Labor erfolgreich angewendet worden war^[78] (Schema 5.9). Dabei wird ein Amin mit dem hochreaktiven Isocyanat **27** gekoppelt. Dieses erhält man durch Reaktion von Acrylsäurechlorid mit Silbercyanat. Das Kopplungsprodukt wird anschliessend in wässriger saurer Lösung zu Uracil cyclisiert.

Es galt also das Hydrazin **25** zum Amin zu reduzieren. Nach 21 h Rühren in einer wässrigen Raney-Nickel-Suspension bei RT erhielt man ein Produktgemisch, das nach ¹H- und ¹³C-NMR ungefähr eine Zusammensetzung von 4:1 hatte und dessen Hauptkomponente durchaus das gewünschte Amin sein konnte. Auch die erwartete Masse von 159 wurde im Massenspektrum vorgefunden. Allerdings liess ein ¹³C-DEPT-Experiment drei sekundäre Kohlenstoffatome erkennen, zwei davon bei etwas über 30 ppm (Abbildung 5.5). In diesem Bereich würde man für das gewünschte Produkt nur ein Signal erwarten. Ein zweites sekundäres Kohlenstoffatom liesse sich durch eine reduktive Ringöffnung am bicyclischen System erklären. Allerdings müsste man dann eine Masse von 161 vorhanden sein, was nicht der Fall war.

Trotz der unklaren spektroskopischen Daten wurde mit dem erhaltenen Produkt ein Uracil-Basenaufbau mit dem Isocyanat **27** versucht. Die Kopplungsreaktion ergab etwa 6 apolarere Produkte (bezgl. Amin **28**), wovon das Hauptprodukt isoliert wurde. Die spektroskopischen Daten (NMR und MS) deuteten auf ein mehrfach alkyliertes Produkt hin. Nach Rückflussieren dieses Produkts in H₂SO₄ 2M ergaben sich zwar einige neue Spots, es konnte aber mit FC kein Produkt isoliert werden. Ein Kopplungsexperiment mit anschließender Säurebehandlung ohne Reinigung des Zwischenproduktes ergab nach Reinigung mit FC nur sehr wenig eines im DC nicht UV-aktiven Produktes. Im Massenspektrum wurde die Masse des gewünschten Nucleosids nicht gefunden.

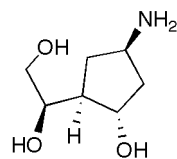
5.3.4 Zum Bicyclogerüst via Epoxidierung

Nachdem es nicht gelungen war, die halogenierten Verbindungen **20** und **21** zu nucleosidieren, beschloss man über eine Epoxidierung von Verbindung **18** zum



28

159.18 g/mol



29

161.20 g/mol

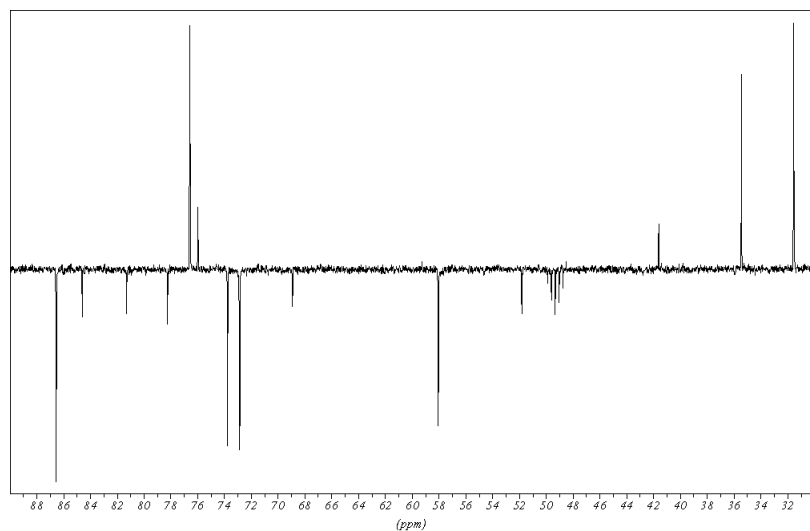
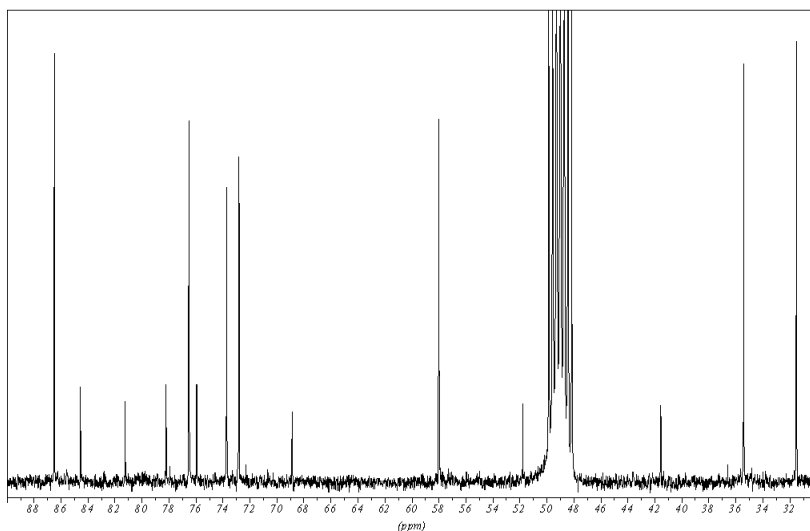
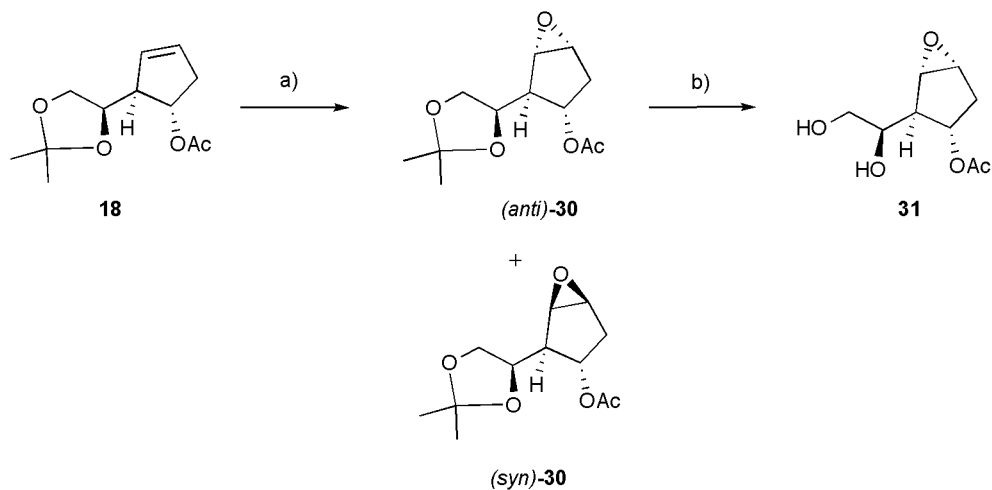


Abbildung 5.5: Reduktion von Hydrazin **25**: erwünschtes Produkt **28** und möglicherweise erhaltenes Produkt **29** sowie ^{13}C -NMR und ^{13}C -DEPT-Spektren.



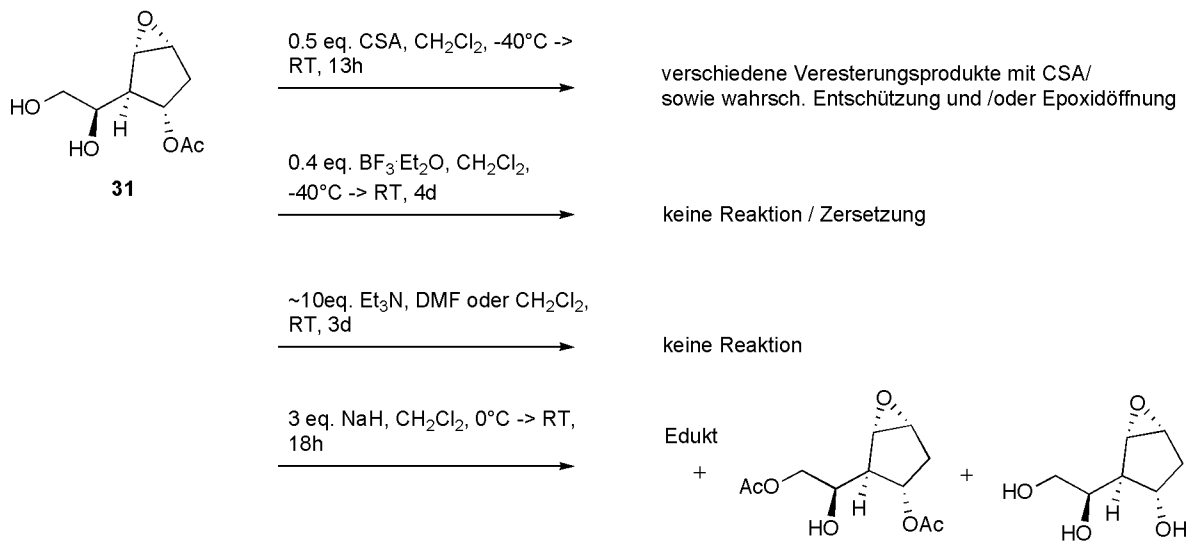
Schema 5.10: Epoxidierung und Entschützung von **18** a) *m*CPBA, CH₂Cl₂, 0°C, 62h, 59% *anti*-**30** 31% *syn*-**30** b) 80% AcOH, RT, 11h, 69%.

entsprechenden Hydroxy-substituierten Bicyclogerüst zu gelangen (Abbildung 5.3). An diesem liesse sich durch Installieren einer Abgangsgruppe wie Tosyl oder über eine Mitsunobu-Reaktion die Nucleobase einführen und es hätte vielleicht eine vorteilhaftere Reaktivität bezgl. Substitution/Elimination.

Die Epoxidierung von **18** mit *m*CPBA ergab ein Gemisch von *syn*- und *anti*-Epoxid **30** im Verhältnis 1:2 in 90% Ausbeute. Anschliessend wurde in Essigsäure 80% entschützt und man erhielt Diol **31** in 69% Ausbeute. Aus diesem galt es nun mittels Ringschluss zum bicyclische Gerüst zu gelangen. Wie oben erwähnt kann man entweder die endständige Hydroxygruppe basisch als Nucleophil aktivieren, oder die Epoxidfunktion sauer aktivieren. Nach Nicolaou^[59] ist der säurekatalysierte Weg vorzuziehen.

Man behandelte also Verbindung **31** nach Nicolaou in CH₂Cl₂ mit 0.1 eq. Camphersulfonsäure (10-CSA) bei -40°C bis 0°C. Nach 5 h und Zugabe von weiteren 0.4 eq. CSA und 8 h bei RT erhielt man kleine Mengen von fünf verschiedenen Produkten, die sich nach ¹H-NMR alle als Veresterungsprodukte mit der Camphersulfonsäure herausstellten. Im DC war auch einen Spot auf der Basislinie zu erkennen (CH₂Cl₂:MeOH 10:1), was wahrscheinlich entweder vollständig entschütztes und vielleicht auch epoxidgeöffnetes Produkt oder auch ein Zersetzungsprodukt sein könnte.

Behandlung von **31** mit BF₃·Et₂O (0.4 eq., -40°C → RT, CH₂Cl₂) ergab nur langsame Zersetzung. Bei Behandlung mit mehreren eq. Triethylamin in CH₂Cl₂ oder DMF konnte man keine Reaktion feststellen. Mit NaH (3 eq.) in CH₂Cl₂ wurden neben Ausgangsmaterial lediglich deacetyliertes sowie diacetyliertes Edukt isoliert.



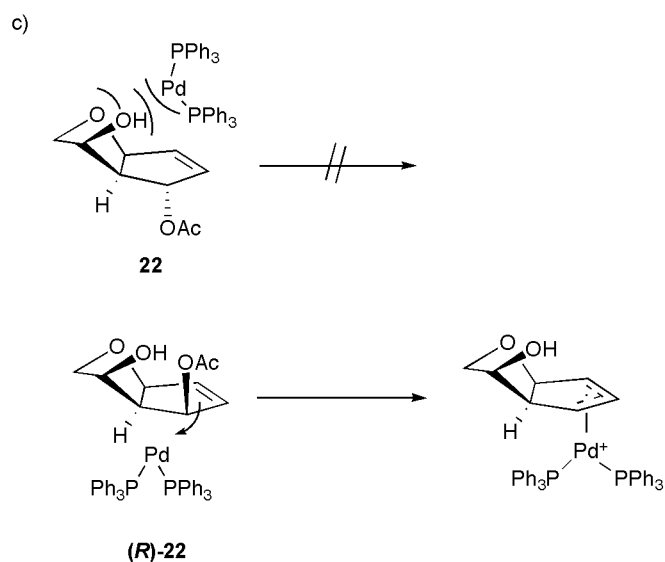
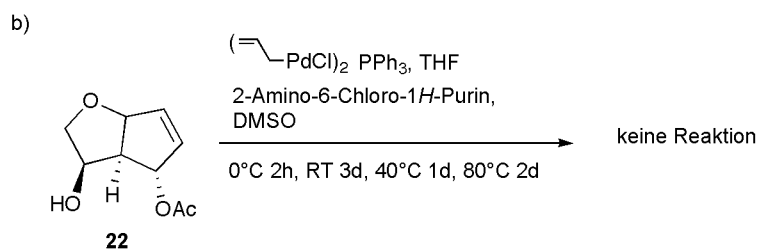
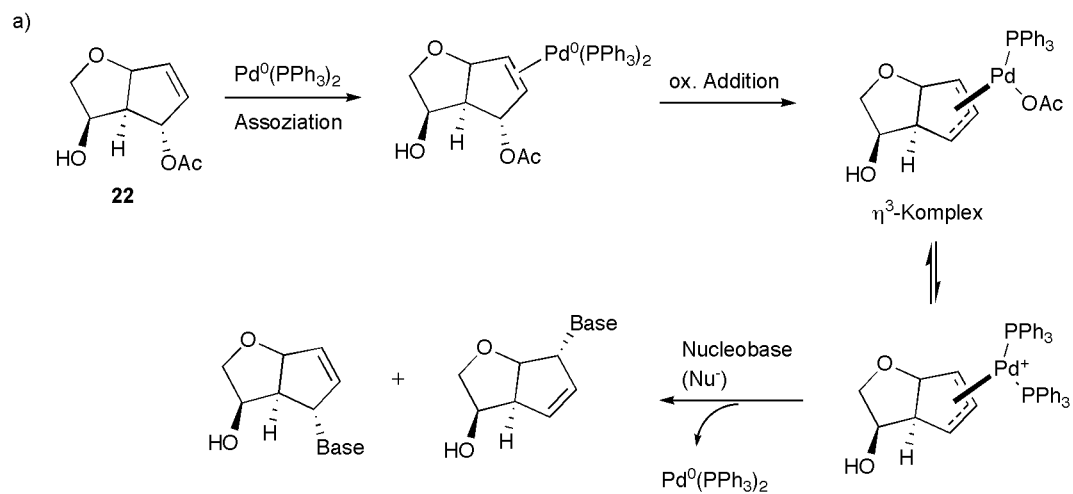
Schema 5.11: Ringschlussversuche mit der Verbindung **31**.

5.3.5 Pd-katalysierte allylische Substitution als Nucleosidierung

Eine weitere Möglichkeit, eine Nucleobase ans Bicyclogerüst zu koppeln, besteht in einer Pd-katalysierten allylischen Substitution am Eliminationsprodukt **22** mit der Nucleobase als Nucleophil. Eine solche Substitution führt über einen η^3 -Allylpalladium-Komplex^[79] (Abbildung 5.12), der durch Assoziation des Palladiums an die Doppelbindung und anschließender Elimination des O-Acetylrests gebildet wird. Der Komplex oder eine kationische Form davon wird anschließend von einem Nucleophil von der entgegengesetzten Seite her angegriffen; in unserem Fall die Nucleobase. Durch zweimalige Inversion der Stereochemie erhalten wir gesamthaft eine Retention. Mit dem Substrat **22** wäre also ein Iso-Bicyclonucleosid mit einer α -Konfiguration und einer Doppelbindung zwischen C6 und C7 (entsprechend den natürlichen C2' und C3') zu erwarten. Diese müsste anschließend entsprechend funktionalisiert werden.

Es wurde ein Experiment mit Bedingungen nach *Hildbrand*^[80] durchgeführt. Man verwendete 2-Amino-6-Chloro-Purin als Nucleobase in DMSO sowie Allylpalladiumchlorid-Dimer und Triphenylphosphin in THF. Man konnte auch nach mehreren Tagen und Erhitzen bis 80°C keine Reaktion feststellen (DC).

Dies lässt sich wahrscheinlich durch sterische Hinderung in **22** bei der Bildung des Palladium-Komplexes erklären^{[81][79]} (Abbildung 5.12). Durch die Struktur unseres bicyclischen Systems ist der Zugang des Palladiums von oben blockiert und der Komplex kann sich nicht bilden. Man müsste also die am C6 anders kon-



Schema 5.12: Palladiumkatalysierte allylische Substitution am Eliminationsprodukt **22**: a) Mechanismus b) Reaktionsbedingungen c) sterische Hinderung bei der Komplexbildung mit **22** verglichen mit dessen Stereoisomer (**R**)-**22**.

figurierte bicyclische Verbindung (**R**)-**22** als Substrat nehmen. Dadurch erhielt man bei gelungener Substitution das erwünschte β -konfigurierte Nucleosid. Dieses naheliegende Experiment konnte jedoch aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden.

5.4 Syntheseweg ausgehend von Epoxyester **32**

Hauptsächlich weil die vorgängig beschriebene Synthese zum Bicyclogerüsts wegen der schlecht reproduzierbaren Wittig-Umlagerung Mühe bereitete als auch wegen den nicht erfolgreichen Versuchen ein C8-Hydroxysubstituiertes (entsprechend natürlichem C1') bicyclisches System zu erhalten wurde nach einem alternativen Zugang zum iso-Bicyclogerüst gesucht.

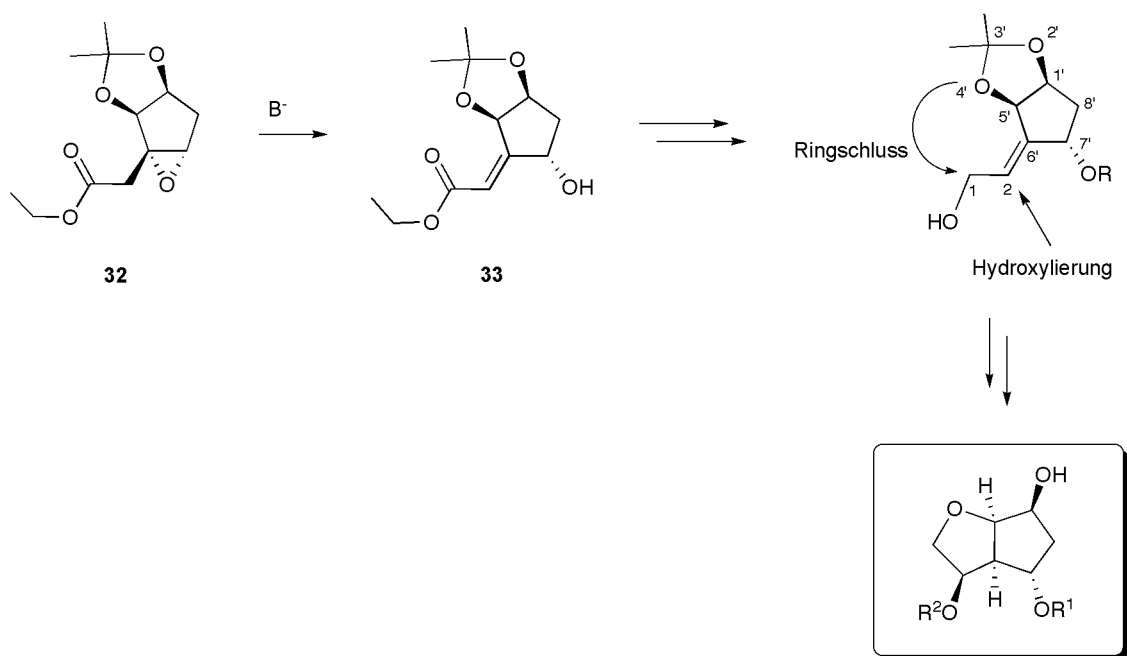
Eine neue Synthesestrategie ging von 6',7'-Epoxy-3'-3'-dimethyl-2'-4'-dioxabicyclo-[3.3.0]oct-6'-yl-essigsäureethylester aus. Das (+)-Enantiomer **32** (Schema 5.13) dieses Epoxyesters fiel bei der Synthese von Bicyclo-DNA in größeren Mengen an^[27], so dass man etwa 80 g davon als Ausgangsmaterial zur Verfügung hatte.

Bei seinen Versuchen zur Verseifung von Epoxyester **32** hatte *Epple*^[82] festgestellt, dass sich unter basischen Bedingungen das Epoxid eliminativ zum Ester **33** öffnet. Dabei wird das *E*-Isomer schneller gebildet und wandelt sich langsam in das thermodynamisch stabilere *Z*-Isomer um.

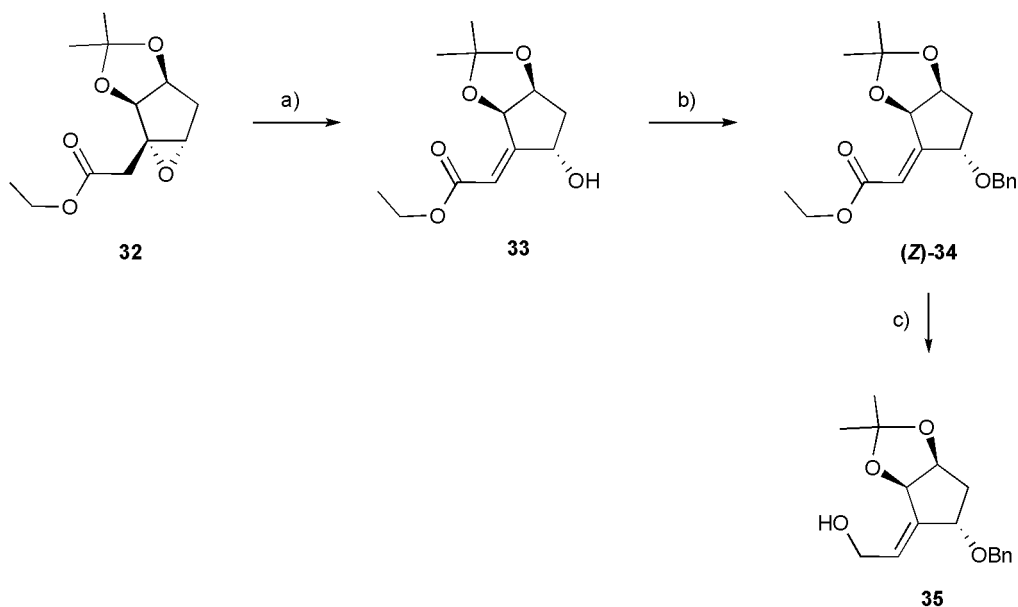
Als ersten Schritt plante man eine Reduktion des Esters **33** zum Alkohol. Vorgängig sollte die sekundäre Hydroxygruppe geschützt werden, um sie später von anderen Hydroxygruppen unterscheiden zu können. Vom erhaltenen Alkohol aus sind anschliessend noch zwei wesentliche Transformationen nötig, um zum gewünschten bicyclischen Gerüst zu gelangen (Schema 5.13):

1. Hydroxylierung am C2 (dabei werden zwei neue Stereozentren geschaffen; d.h. die Hydroxylierung sollte stereospezifisch erfolgen)
2. Ringschluss von der 4'-Hydroxygruppe und dem C1-Atom

Die Epoxidöffnung mit DBU (CH_2Cl_2 , RT) verlief nach DC problemlos. Das *E*-Isomer des Esters **33** begann sich bereits nach wenigen min zu bilden, das *Z*-Isomer etwas langsamer. Daneben konnte man noch schwach ein drittes polareres Produkt erkennen. Nach 3 h bei RT war der Spot des *E*-Isomers verschwunden, ein wenig Ausgangsmaterial blieb (auch bei längeren Reaktionszeiten oder Zugabe von mehr DBU). Brach man nach einer Stunde ab, erhielt man ein Gemisch von *E/Z*-Isomeren ungefähr im Verhältnis 1:1, allerdings nur in je 20 bis 30% Ausbeute. Auch wenn man zum *Z*-Isomer weiterreagieren liess erhielt man nie grössere Ausbeuten als 27-29%. Das unbekanntes polarere Nebenprodukt machte dann ungefähr 50% am Gewicht des Rohproduktes aus. Bei Durchführung der Reaktion mit Eiskühlung verlief die Reaktion entsprechend langsamer, die Ausbeuten blieben aber tief. Ersetzte man DBU durch TBD, verlief die Reaktion



Schema 5.13: Synthesestrategie zum Bicyclorüst ausgehend von Epoxyester **32**. Nach einer Reduktion des Esters zum Alkohol sind zwei wesentliche Transformationen notwendig: Hydroxylierung am C2 sowie Ringschluss zwischen O4' und C1.



Schema 5.14: Synthese von Alkohol **35**; a) DBU (2 eq.), CH₂Cl₂, RT 3h, 27% b) BnBr, Ag₂O, NaH, DMF, RT 18h, 89% c) LAH, Et₂O, -78→-40°C, 5h, 80%

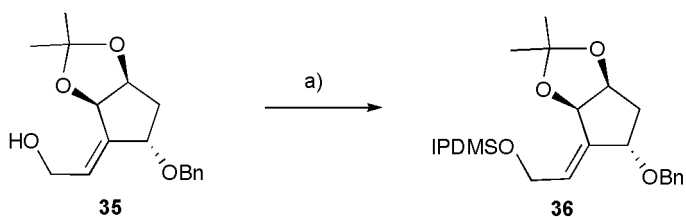
sehr schnell; nachdem man nach 40 min bei RT abbrach und aufarbeitete, erhielt man nur noch etwa 50% des Materials in der organischen Phase, der Rest hatte sich bereits zu sehr polaren Produkten zersetzt. Da man genügend Material für die weiteren Schritte hatte, unterliess man eine weitere Optimierung resp. eine Strukturaufklärung des Nebenproduktes.

Anschliessend wurde mit Benzylchlorid in DMF unter Aktivierung mit NaH oder DBU benzyliert. Dabei erreichte man allerdings nur Ausbeuten von 12-40%. Die Ausbeute konnte durch Zugabe von wenig KI auf 60% verbessert werden. Eine weitere Verbesserung auf 85-89% brachte schliesslich die Verwendung von Benzylbromid, Silber-(I)-Oxid und spätere Zugabe von NaH^[83].

Die folgende Reduktion des α,β -ungesättigten Esters **34** gelang mit LAH in Et₂O in zufriedenstellender Ausbeute (76-80%).

5.4.1 Hydroxylierungsversuche

Ausgehend von **35** wurde nun versucht, die Doppelbindung am C2 zu Hydroxylieren. Dazu war eine Hydroborierung mit oxidativer Aufarbeitung geplant. Die Addition von Borhydrid sollte nach Anti-Markovnikow erfolgen und somit nach der Oxidation zur gewünschten Hydroxylierung am C2 führen. Unklar war allerdings, welches der beiden möglichen Diastereomere zu erwarten wäre; resp. ob



Schema 5.15: a) IPDMS-Cl, Imidazol, CH₂Cl₂, RT 3h, 82%

die Addition von “oben” oder von “unten” erfolgen würde.

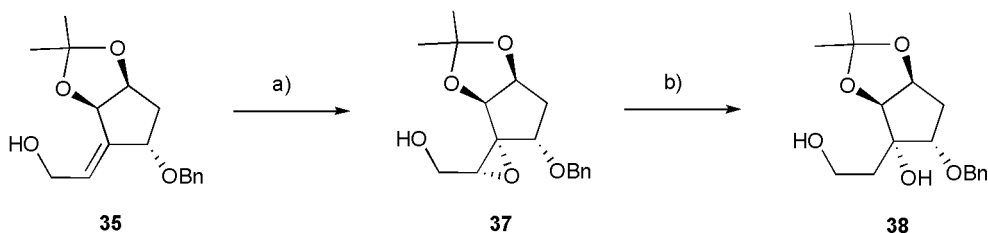
Die Hydroborierung wurde mit Boran-Dimethylsulfid-Komplex oder Boran-THF-Komplex in THF oder CH₂Cl₂ bei Temperaturen von -78°C bis RT versucht. Es konnte aber nur entweder keine Reaktion (bei tiefen Temp.) oder Zersetzung beobachtet werden. In der Annahme, dass die freie Hydroxygruppe stören könnte, wurden auch Hydroborierungsversuche vorgenommen, bei denen man die Hydroxygruppe vorgängig durch Zugabe von BSA *in situ* silylierte. Auch bei diesen Versuchen wurde nur eine langsame Zersetzung festgestellt. Weil die TMS-Gruppe unter den Reaktionsbedingungen mit dem Borankomplex instabil sein könnte, wurden auch Versuche mit IPDMS-geschütztem Edukt gemacht. Die IPDMS-Gruppe sollte in Gegenwart von Boran stabil sein und ist nicht allzu sperrig. Das geschützte Edukt **36** stellte man mit IPDMS-Cl und Imidazol in CH₂Cl₂ her^[84]. Aber auch hier stellte man in der Hydroborierung nur eine langsame Zersetzung fest.

Es war schwierig, zu erklären, warum die verschiedenen Hydroborierungsversuche erfolglos blieben, fand man doch in der Literatur zahlreiche Beispiele von ähnlichen Reaktionen^{[85][86][87][88]}. Ein Grund könnten die drei Sauerstoffsubstituenten an den Kohlenstoffatomen in allylischer Position zur Doppelbindung sein, welche diese derart elektronenarm machen könnten, dass sie nicht mehr reaktiv (nucleophil) genug ist.

Ein anderer Weg, eine Hydroxylierung am C2 zu erreichen führt über eine Epoxidierung der Doppelbindung und anschließender reduktiver Epoxidöffnung. Um die gewünschte Stereokonfiguration an den Positionen 2 und 6' zu erhalten, müsste die Epoxidierung von “unten” erfolgen. Ob dies der Fall sein würde, oder ob das andere Isomer gebildet würde oder ein Gemisch der beiden war schwierig vorauszusagen und hängt wahrscheinlich in erster Linie von der räumlichen Zugänglichkeit der Doppelbindung und somit auch von der bevorzugten Konformation des Eduktes ab.

Die Epoxidierung gelang mit *m*CPBA in CH₂Cl₂ in 89% Ausbeute. Man erhielt nur ein Stereoisomer, allerdings konnte mit einem NOE-Experiment nicht schlüssig gezeigt werden, welches.

Die darauffolgende Epoxidöffnung versuchte man mit NaCNBH₃ und



Schema 5.16: a) *m*CPBA, CH₂Cl₂, 0°C→RT 3h, 89% b) NaCNBH₃, THF, BF₃·THF, 4d, RT, 16% (Zuordnung der Stereokonfiguration nicht gesichert; siehe Text)

BF₃·Et₂O^[89]. Nach 4d bei RT hatte sich ein Produkt gebildet; mit DC war allerdings noch viel Ausgangsmaterial in der Reaktionslösung zu erkennen. Das Produkt wurde isoliert (Ausbeute: 16%), es stellte sich als das unerwünschte Regioisomer **38** heraus, das am C6' Hydroxyliert war. Die Aufklärung der Konfiguration am C6' mittels NOE gestaltete sich schwierig, da sich die Protonensignale H₂-C1 und H-C7' überlappen. Das hat zur Folge, dass die Intensitäten der Signale von H-C5' und H-C7' sich bei Einstrahlung an den H₂-C2-Protonen schlecht vergleichen lassen. Tentativ konnte man so allerdings eine S-Konfiguration (Hydroxygruppe gegen "unten") am C6' zuordnen.

Verwendung von LiBH₄ und BF₃·Et₂O nach *Hanessian*^[90] zur Epoxidöffnung führte zu einem im Vergleich zum Edukt ein wenig apolareren Produkt, im DC keine UV-Aktivität zeigte und darum nicht isoliert wurde.

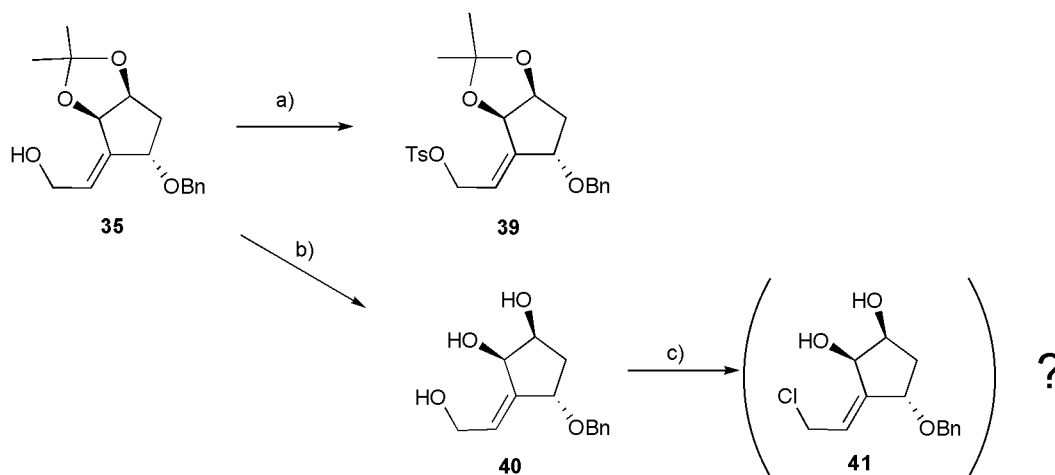
5.4.2 Ringschlussversuche

Unter dem Eindruck der Schwierigkeiten einer Hydroxylierung an Position C2 der Verbindung **35** ging man dazu über den Ringschluss mit intakter Doppelbindung zu versuchen. Diese würde dann später funktionalisiert werden.

Für den Ringschluss tosylierte man die freie Hydroxygruppe, was mit Tosylchlorid, Triethylamin in CH₂Cl₂ gelang (Ausbeute: 68-74%).

Die tosylierte Verbindung **39** behandelte man zur Acetonid-Entschützung mit 80%-iger Essigsäure. Nach 5-7½h war nach DC das Ausgangsmaterial verschwunden und man sah eine Vielzahl von neuen Produkten. Man versuchte drei der UV-aktiven Hauptprodukte mittels FC zu reinigen, erhielt jedoch nur sehr kleine Mengen an unreinem Material, das sich bei RT weiter zersetzte. ¹H-NMR dieser Produkte zeigten alle Absenz der Tosylgruppe und zuviele Signale im Bereich von Doppelbindungen als für das gewünschte bicyclische Produkt oder das entschützte Edukt zu erwarten war.

Man versuchte weiter, die Reaktionsfolge Tosylierung-Entschützung zu vertauschen. Nach einer vorgängigen Acetonidentschützung wäre die primäre Hy-



Schema 5.17: a) TsCl, NEt₃, CH₂Cl₂, 0°C, 80 min, 74%, b) 80% AcOH, RT, 44h, 56%, c) TsCl, NEt₃, CH₂Cl₂, -25°C→RT, 4d

droxygruppe für eine Tosylierung kinetisch bevorteilt. Alkohol **35** wurde mit Essigsäure (80%) in 56% Ausbeute zu **40** entschützt. Die tiefe Ausbeute ist damit zu erklären, dass die Reaktion zu früh (nach 44h bei RT) abgebrochen wurde und noch relativ viel Edukt (29%) vorhanden war.

Das Triol **40** wurde anschliessend Tosylierungsbedingungen ausgesetzt. Mit DC war eine langsame Transformation zu einem apolareren Produkt festzustellen. Nach 4d bei RT und Zugabe von mehreren eq. NEt₃ und TsCl hatten die beiden Spots neben mehreren Zersetzungsprodukten auf dem DC etwa die gleiche Intensität. NMR-spektroskopische Daten¹ des wenigen isolierten Produkts wiesen auf die chlorierte Verbindung **41** hin, was aber nicht im hundertprozentigen Einklang mit den massenspektroskopischen Daten stand.

Die Schwierigkeiten der Ringschlussreaktion mit intakter Doppelbindung sind sicherlich damit zu begründen, dass das erwünschte bicyclische Produkt mit Doppelbindung am Brückenkopf eine erhöhte Ringspannung aufweisen würde. Allerdings wären hier sicherlich auch noch andere Reaktionsbedingungen zu testen.

¹H, ¹³C, ¹³C-DEPT, ¹H/¹H-COSY, ¹H/¹³C-HSQC, ¹H/¹³C-HMBC

Kapitel 6

Ausblick

Eine synthetischer Zugang zum Zuckergerüst von iso-Bicyclo-DNA ist realisiert worden. Allerdings ist die Herstellung des Ausgangsmaterial nicht ganz unproblematisch, so dass es sicher von Nutzen wäre, einen alternativen Zugang zu finden.

Weiter wäre es sicher hilfreich für weitere Nucleosidierungsversuche, wenn man zum C8-halogenierten (entsprechend natürlichem C1') Zuckergerüst auch anders substituierte Derivate hätte.

Ausgehend von der bestehenden Synthese bleibt noch folgendes zu tun:

- Klärung der Gründe für Nichtreproduzierbarkeit der Wittig-Umlagerung zu Verbindung **16**; resp. Verbesserung der Ausbeuten dieser Reaktion.
- Weitere Versuche zum Epoxid-Ringschluss' der Verbindung **31**. Testen von verschiedenen Säuren oder Basen, LSM, Konzentrationen und Temperaturen.
- Weitere Nucleosidierungsversuche via Pd-allyl-Substitution mit dem Stereoisomer (*R*)-**20** als Ausgangsmaterial

Teil II

Experimenteller Teil

Kapitel 7

Geräte und Materialien

Allgemeines und Chemikalien

Reaktionen wurden unter Schutzatmosphäre (Ar) in trockenen Lösungsmitteln (von Alox-Filtersystem, absolutiert nach Standardverfahren ^[91] oder von Fluka abs. gekauft) durchgeführt. Chemikalien von Fluka oder Aldrich in purum oder puriss. Qualität.

Chromatographie

Dünnschichtchromatographie DC

Es wurden Glasplatten *SIL G-25 UV₂₅₄* von *Macherey-Nagel* verwendet. Nicht UV-aktive Stoffe wurden mit folgenden Tauchlösungen und anschliessendem Erhitzen visualisiert:

- Cer-PMA-Lösung (universelles Färbereagens): 10.5 g Cerium(IV)-Sulfat, 21 g Phosphomolybdänsäuremonohydrate, 60 ml konz. H₂SO₄, 900 ml H₂O
- Anisaldehyd-Lösung (universelles Färbereagens): 0.5 ml Anisaldehyd, 250 ml EtOH, 50 ml AcOH, 1 ml konz. H₂SO₄
- Ninhydrin-Lösung (färbt Amine rot): 250 mg Ninhydrin, 250 ml BuOH, 2.5 ml AcOH
- DNP-Lösung (färbt Aldehyde orange): DNP

Säulenchromatographie FC

Man verwendete *Silica Gel 60* (Partikelgrösse 40-63 μm) von *Fluka*. Die Lösungsmittel wurden vorgängig destilliert. Die Lösungsmittelgemische sind als Volumenverhältnisse angegeben.

NMR-Spektroskopie

^1H -NMR-Spektren bei 300 MHz sowie ^{13}C -Spektren bei 75 Mhz wurden auf einem *Bruker AC-300* gemessen. ^1H -400-MHz-Spektren sowie ^{13}C -100-MHz-Spektren wurden auf einem *Bruker AMX-400* gemessen. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm bezüglich folgenden Lösungsmitteln angegeben:

- d_6 -DMSO: 2.49 (^1H), 39.51 (^{13}C)
- CD_3OD : 3.31 (^1H), 49.00 (^{13}C)
- CDCl_3 : 7.26 (^1H), 77.00 (^{13}C)

Die Multiplizitäten sind als s (Singulett), d (Duplett), t (Triplet), q (Quadruplett), m (Multipllett) und br (breit) angegeben. ^{13}C -Multiplizitäten wurden aus DEPT-Spektren (Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer) entnommen. Für die Zuordnungen wurden $^1\text{H}/^1\text{H}$ - und $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -COSY-Spektren verwendet.

Massenspektroskopie

EI+-MS: *AutoSpec Q VG*, Ionisationsenergie 70 eV

ESI+-MS und ESI+-TOF: *Applied Biosystems, Sciex QSTAR Pulsar*

Intensitäten in Klammer in %

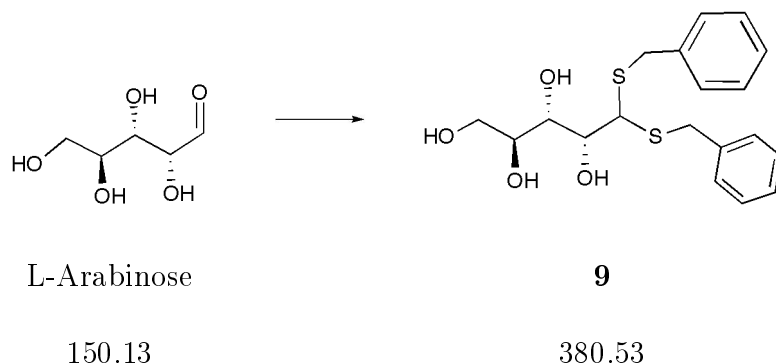
Kapitel 8

Synthesen

8.1 Synthese ausgehend von L-Arabinose

Die ersten acht Stufen werden hier nochmals beschrieben, obwohl sie bekannt sind ^{[65][73]}. Es wurden einige Ergänzungen und Anpassungen gemacht.

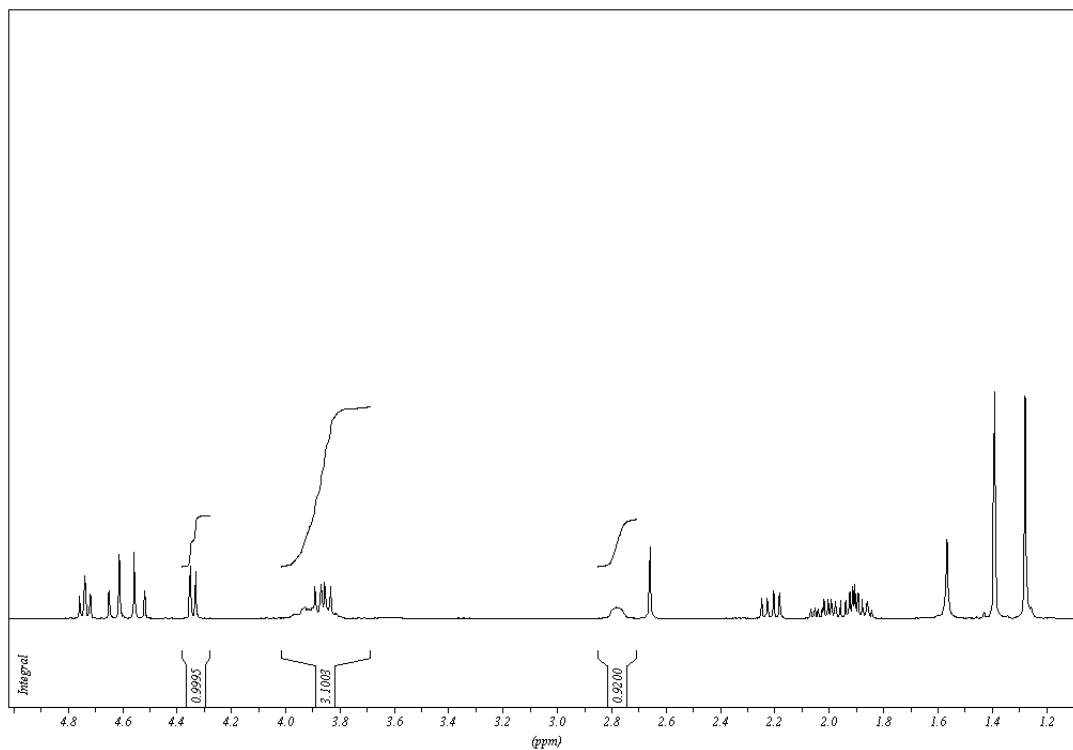
L-Arabinose-Dibenzylthioacetal **9**



In einem 1l-Erlenmeyerkolben wurden 100 g L-(+)-Arabinose (666 mmol) in 200 ml konz. HCl bei 0°C gelöst. Benzylmercaptan (200 ml, 1.69 mol) wurde in drei Portionen dazugegeben. Anschliessend wurde für 1h bei 0°C heftig gerührt. Die verfestigte Masse wurde aufgebrochen, filtriert und mit kaltem Wasser (3 l), kalter 10% wässriger NH₃-Lsg (400 ml) und nochmals mit kaltem Wasser (800 ml) gewaschen. Das luftgetrocknete Material wurde in bei 60°C in 3 l 95% EtOH gelöst, auf RT abkühlen und anschliessend über Nacht bei 5°C vollständig auskristallisieren gelassen. Die Kristalle wurden abfiltriert und mit kühlem EtOH (1.5 l) und kühlem Et₂O (800 ml) gewaschen. Die weisse Wolle wurde 3h am HV getrocknet. Ausbeute: 188.7 g (75%).

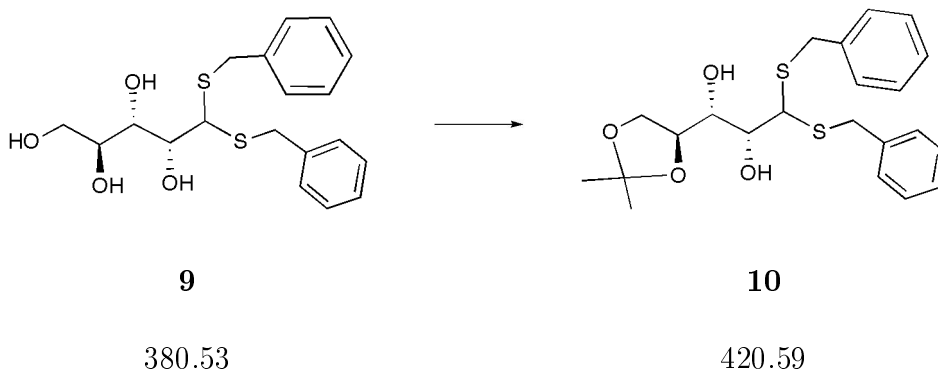
DC (CH₂Cl₂ : MeOH = 15 : 1): R_f = 0.25

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, d_6 -DMSO, δ/ppm): 3.33-3.90 (m, 10H), 4.32-4.38 (m, 2H), 4.49 (d, $J = 5.25$ Hz, 1H), 4.78 (d, $J = 6.96$ Hz, 1H), 7.18-7.32 (m, 10H, arom H)



$^1\text{H-NMR}$ von **9**

(1*S*, 2*R*, 4'*S*)-3,3-Bis(benzylthio)-1-(2',2'-dimethyl-1',3'-dioxolan-4'-yl)propan-1,2-diol **10**

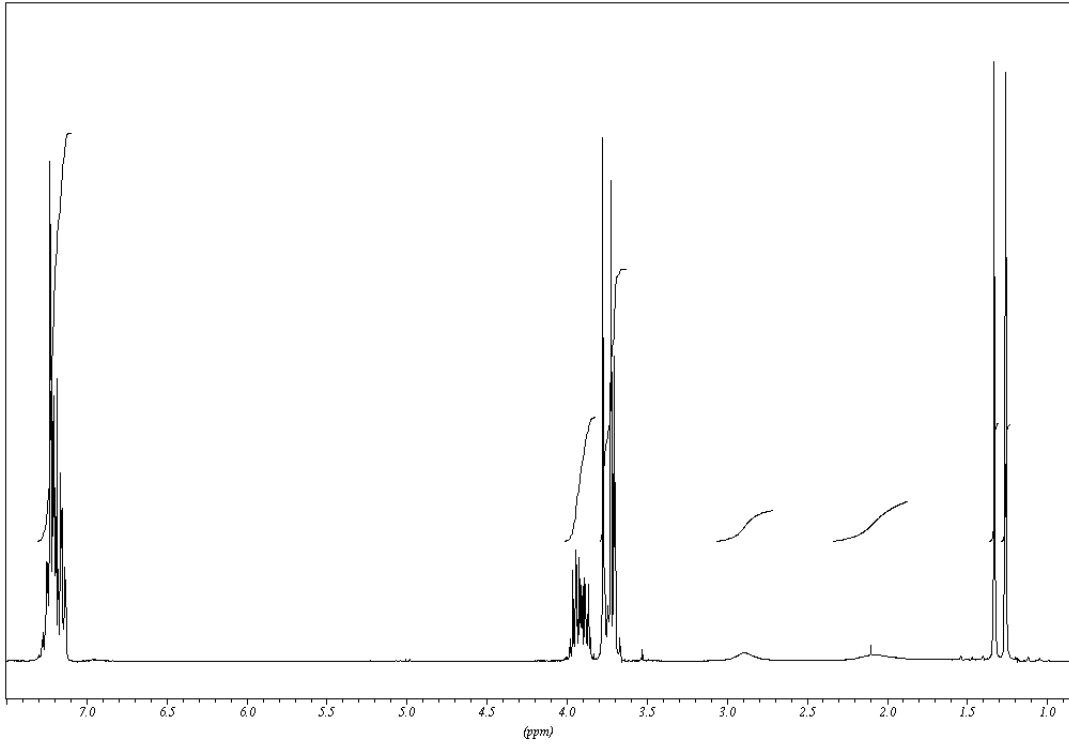


Zu einer Suspension von 188.7 g (745 mmol) L-Arabinose-Dibenzylthioacetal in (5 l) trockenem Aceton¹ wurden unter Rühren 121.6 ml (992 mmol) Aceton-dimethylacetal und 6.25 g (25 mmol) Pyridinium *p*-Toluolsulfonsäure zugegeben. Nach 1h hatte sich das Ausgangsmaterial vollständig aufgelöst und es wurde weitere 10 min gerührt. Dann wurde die Reaktionslösung mit 20 ml NaOH-Lösung 3M neutralisiert und zur Trockene eingengt. Der weiße Rückstand wurde in 3 l CH₂Cl₂ gelöst und mit ges. NaHCO₃-Lösung (1.5 l) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit 1 l CH₂Cl₂ extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über NaSO₄ getrocknet und eingengt. Nach Trocknen am HV erhielt man 217 g **10** (100% = 209 g) als amorphen weißen Feststoff, der direkt für die nächste Stufe weiterverwendet wurde.

DC (CH₂Cl₂ : MeOH = 15 : 1): R_f = 0.88

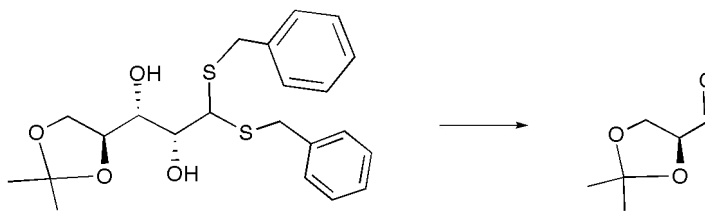
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 1.26 (s, 3H), 1.33 (s, 3H), 2.16 (s br, 1H), 2.95 (s br, 1H), 3.75-4.09 (m, 10H), 7.19-7.35 (m, 10H)

¹destilliert über K₂CO₃



$^1\text{H-NMR}$ von **10**

(4S)-2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-carbaldehyd **11**



10

11

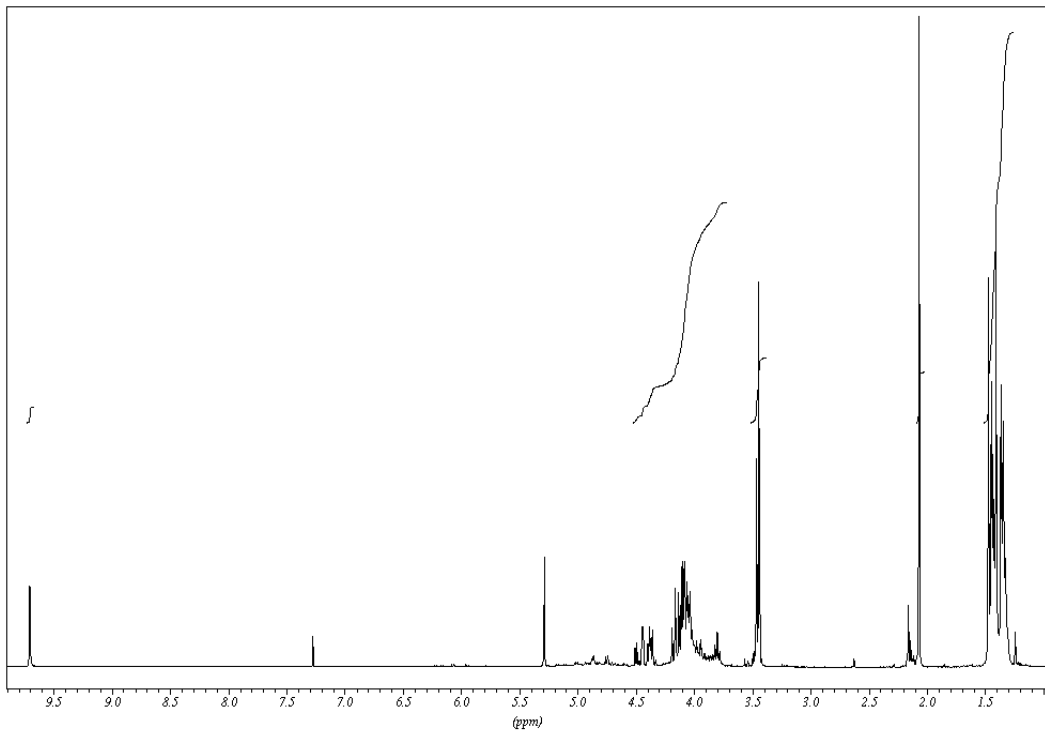
432.43

123.43

Zu einer Lösung von 217 g (nicht ganz rein; max. 745 mmol) **10** in 1.1 l THF (KPG-Rührer) wurden 360 ml Phosphat-Puffer (0.05 N, pH 7.0) zugegeben. Anschliessend wurden unter Rühren 207 g (968.0 mmol) NaIO₄ zugegeben; die Temperatur wurde mittels Eisbad unter 40°C gehalten. Nach 1.5h wurde die Suspension mit MgSO₄ getrocknet, über Celit filtriert und der Rückstand mit CH₂Cl₂ nachgewaschen. Die Lösung wurde bei RT eingengt und der Rückstand mittels zwei aufeinanderfolgenden kurzen (15 cm) FC (CH₂Cl₂ / MeOH 30:1) aufgereinigt. Man erhielt 68 g gelbes Öl (100% ≡ 97 g), das ohne weitere Reinigung für die nächste Stufe verwendet wurde.

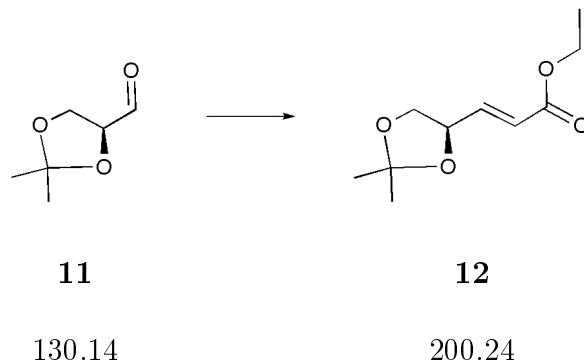
DC (CH₂Cl₂ : MeOH = 30 : 1): R_f = 0.22

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 1.40 (s, 3H), 1.47 (s, 3H), 4.06-4.39 (m, 3H), 9.70 (d, J = 1.4 Hz, 1H)



$^1\text{H-NMR}$ von **11**

(4'R)-(E)-Ethyl-3-(2',2'-dimethyl-1',3'-dioxolan-4'-yl)acrylsäureester **12**

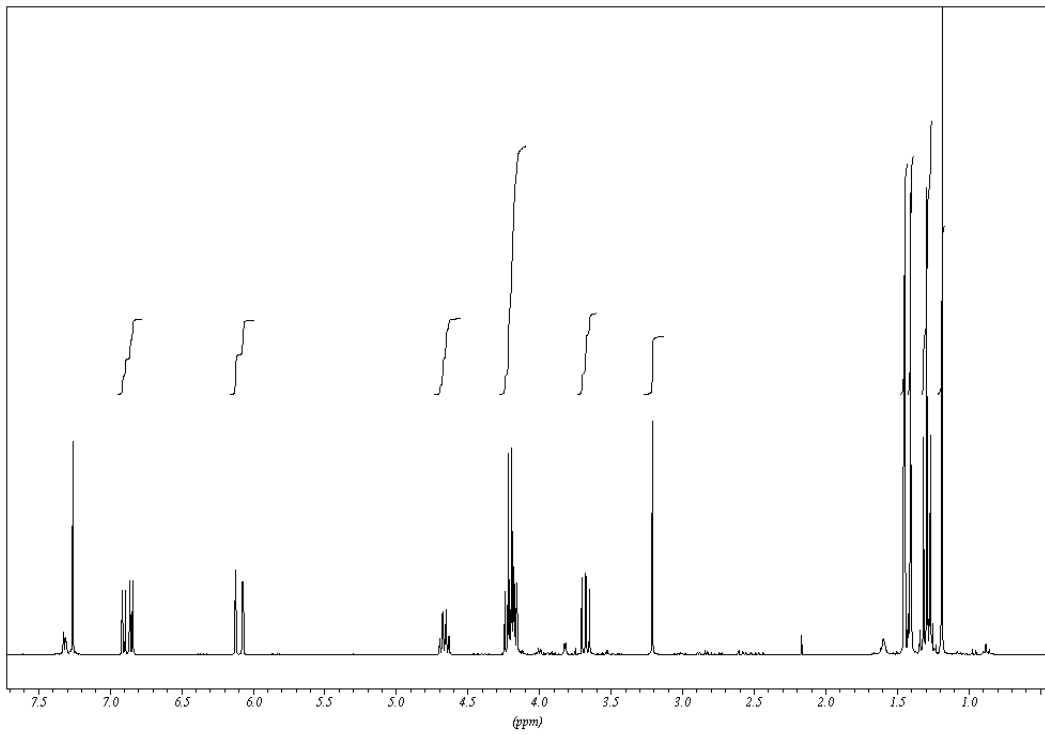


Eine Lösung von 68 g **11** (~ 310 mmol) in 680 ml Wasser wurde auf 0°C gekühlt, mit 680 ml ges. KCO_3 -Lösung und 85.0 ml (427 mmol) Phosphonoessigsäure-triethylester versetzt. Nach 22h Rühren bei RT wurde mit EtOAc (3 x 1 l) extrahiert, über MgSO_4 getrocknet und eingeeengt. Nach Reinigung mit FC (tBME / Hexan 1:5) erhielt man 52.33 g (261.3 mmol, 35% bezgl. **10**) eines *E-Z* Gemisches (97:3¹) von **12** als farbloses Öl.

DC (tBME :Hexan = 1 : 5): $R_f = 0.28$

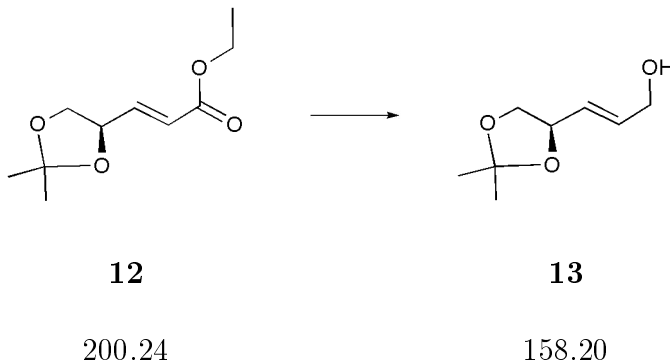
¹H-NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 1.30 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.42 (s, 3H), 3.69 (dd, $J = 7.2, 8.3$ Hz, 1H), 4.17-4.25 (m, 3H), 4.68 (ddd, $J = 1.5, 5.7, 7.2$ Hz, 1H), 6.11 (dd, $J = 1.5, 15.6$ Hz, 1H), 6.89 (dd, $J = 5.7, 15.6$ Hz, 1H)

¹nach NMR -Integration: dd bei 6.85 entspricht *E*, dd bei 6.33 entspricht *Z*^[69]



$^1\text{H-NMR}$ von **12**

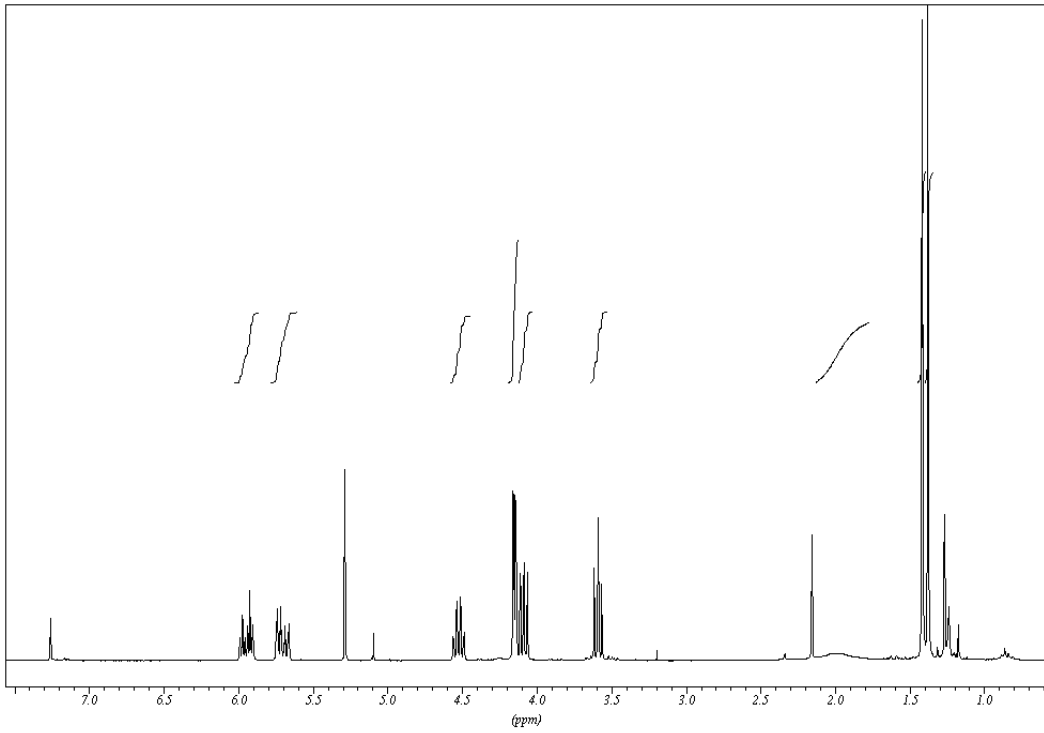
(4'R)-(E)-3-(2',2'-Dimethyl-1',3'-dioxolan-4'-yl)prop-2-en-1-ol **13**



Eine Lösung von 54.5 g (272 mmol) **12** in 1 l CH₂Cl₂ wurde auf -78°C gekühlt. Dazu wurde 480 ml DIBAH-Lösung (~1 M in CH₂Cl₂) über 90 min dazugetropft. Nach 1h wurde die Reaktion mit 45 ml Wasser und 45 ml ges. NaK-Tartrat-Lösung gequencht und auf RT erwärmen gelassen. Die Lösung wurde mit ges. NaK-Tartrat-Lösung (2 x 250 ml) gewaschen und die wässrigen Phasen mit EtOAc (je 3 x 1 l) extrahiert. Die kombinierten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und eingengt. Nach Reinigung mittels FC (tBME / Hexan 1:1) erhielt man 34.14 g (79%) **13** als farbloses Öl.

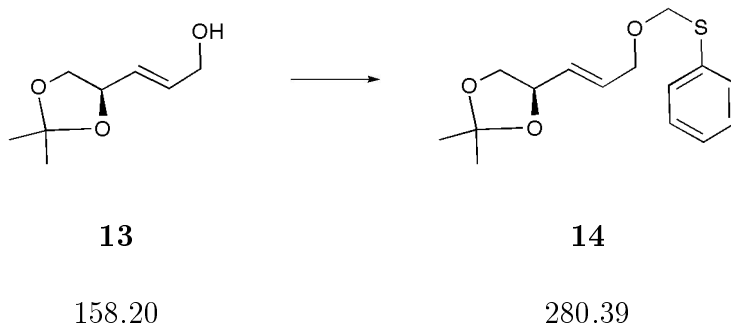
DC (tBME : Hexan = 1 : 1): R_f = 0.19

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 1.38 (s, 3H), 1.42 (s, 3H), 3.59 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 4.09 (dd, J = 6.3, 8.1 Hz, 1H), 4.15 (dd, J = 1.5, 5.2 Hz, 2H), 4.53 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 5.71 (tdd, J = 1.5, 7.6, 15.4 Hz, 1H), 5.95 (td, J = 5.2, 15.4 Hz, 1H)



$^1\text{H-NMR}$ von **13**

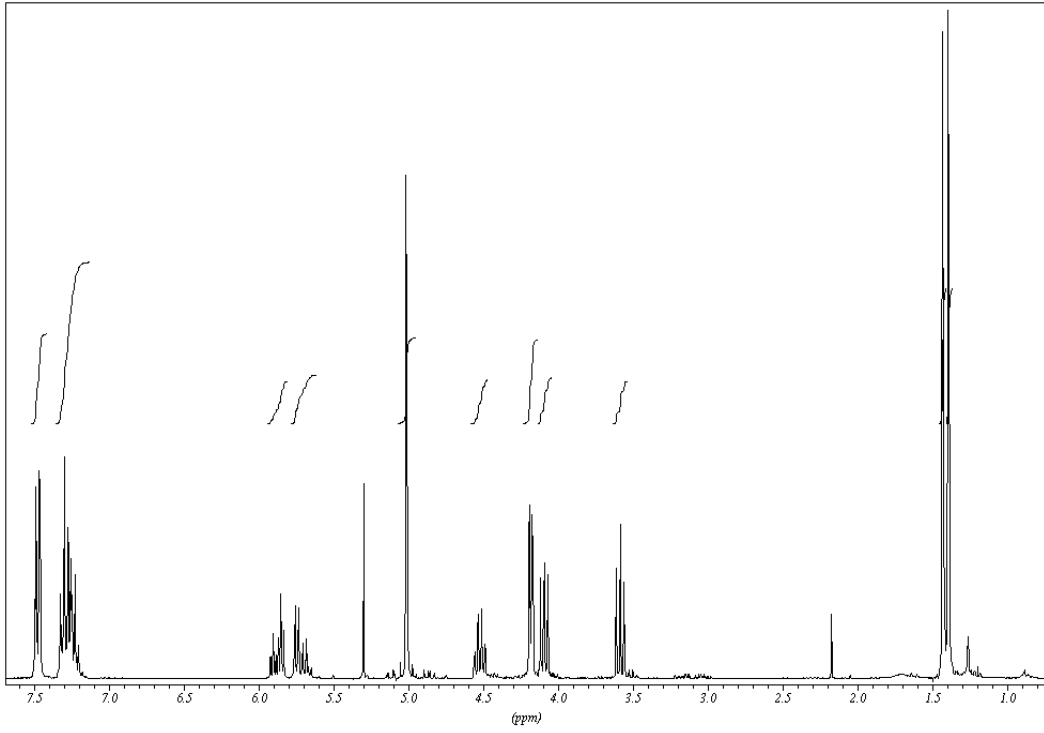
(4'R)-(*E*)-2',2'-Dimethyl-4'-(3-(phenylthiomethoxy)prop-1-enyl)-1',3'-dioxolan **14**



Zu einer Lösung von 12.31 g NaH (60% Suspension in Öl, 307 mmol) in 320 ml Dimethoxyethan wurde bei 0°C über 2h eine Lösung von 34.65 g Alkohol **13** (34.65 g, 219 mmol) in 320 ml Dimethoxyethan zugetropft und 1h bei 0°C gerührt. Dann wurden 39.40 ml (293 mmol) Chlormethyl-phenyl-sulfid und 46 g NaI zugegeben und 1h bei 0°C gerührt. Nach weiteren 6h bei RT wurde mittels Eisbad gekühlt und mit Wasser (250 ml) gequenchet. Die Reaktionslösung wurde mit tBME (3 x 600 ml) extrahiert, die organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und eingeeengt. Das Rohprodukt wurde mit FC (Hexan / EtOAc 10:1) gereinigt und man erhielt 53.94 g (89%) **14** als gelbes Öl.

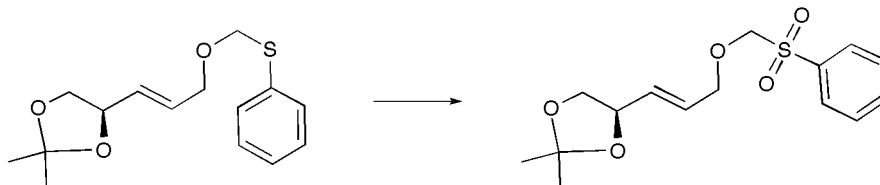
DC (Hexan:EtOAc = 10 : 1): $R_f = 0.21$

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ /ppm): 1.40 (s, 3H), 1.43 (s, 3H), 3.59 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 4.10 (dd, $J = 6.2, 8.1$ Hz, 1H), 4.18 (d, $J = 5.46$, 1H), 4.53 (q, $J = 6.6$ Hz, 2H), 5.02 (s, 2H), 5.72 (tdd, $J = 1.3, 7.2, 15.5$ Hz, 1H), 5.88 (dtd, $J = 0.6, 5.4, 15.4$ Hz, 1H), 7.20-7.34 7.45-7.50 (m, 5H)



$^1\text{H-NMR}$ von **14**

(4'R)-(E)-2',2'-dimethyl-4'-(3-(phenylsulfonylmethoxy)prop-1-enyl)-1',3'-dioxolan **15**



14

280.39

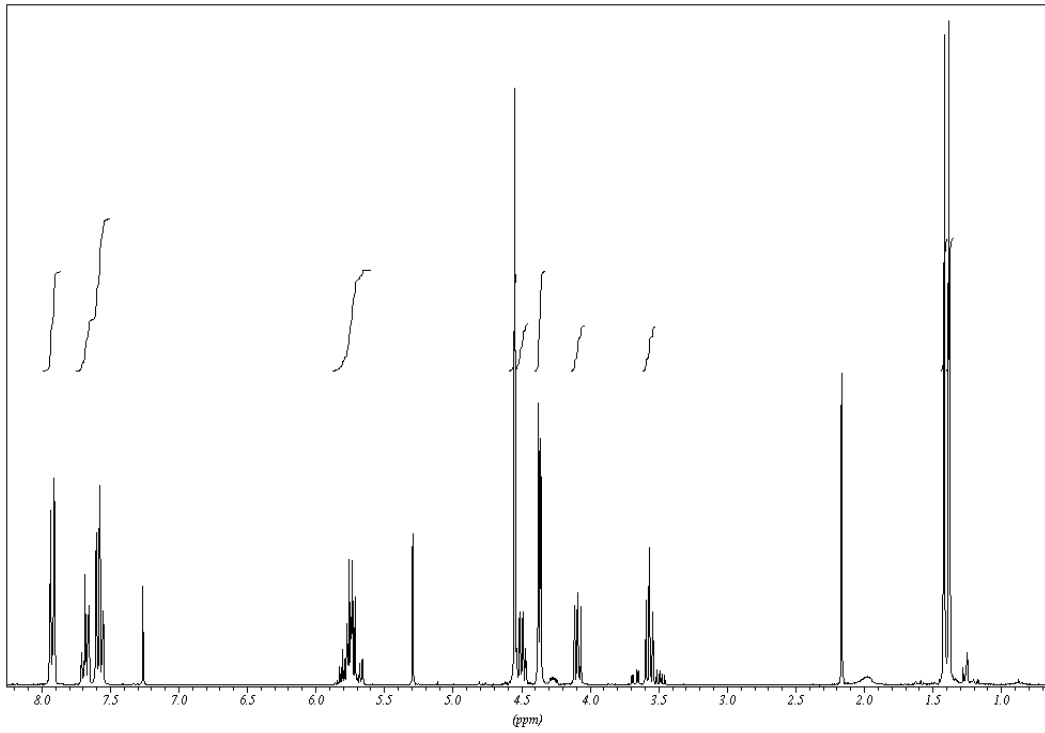
15

312.39

Zu einer auf 0°C gekühlten Lösung von 45.98 g (147 mmol) Thioether **14** in 1 l CH₂Cl₂ wurden 100.1 g (77%, 447 mmol) mCPBA portionenweise über 20 min zugegeben. Nach weiteren 10 min bei 0°C liess man auf RT erwärmen und rührte weitere 2h. Danach wurde über Celit abfiltriert und mit CH₂Cl₂ nachgespült. Die Lösung wurde mit ges. NaHCO₃-Lösung (2 x 700 ml) gewaschen und diese mit CH₂Cl₂ (2 x 400 ml) rückextrahiert. Nach Trocknen über MgSO₄ und Einengen erhielt man ein gelbliches Öl, das mit FC (tBME / Hexan 2:3) gereinigt wurde und 32.35 g (70%) **15** ergab.

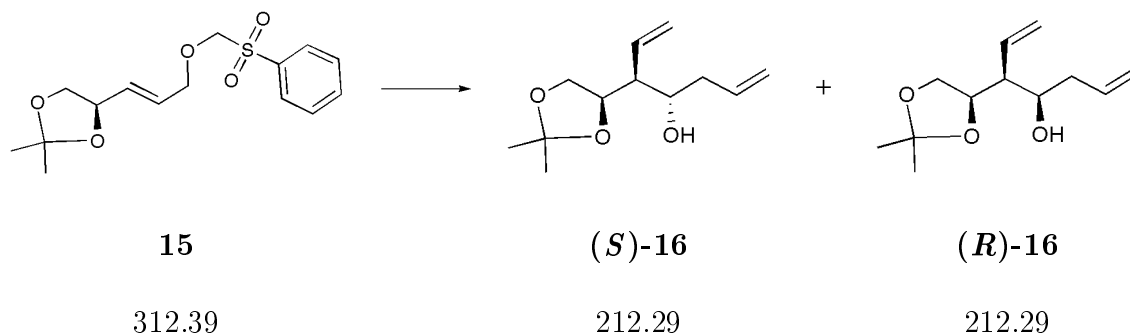
DC (tBME : Hexan = 1 : 1): R_f = 0.27

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 1.38 (s, 3H), 1.42 (s, 3H), 3.57 (t, J = 7.8, 1H), 4.09 (dd, J = 6.3, 8.1 Hz, 1H), 4.37 (d, J = 4.7 Hz, 2H), 4.50 (q, J = 6.6 Hz, 1H), 4.55 (s, 2H), 5.65-5.83 (m, 2H), 7.53-7.95 (m, 5H)



$^1\text{H-NMR}$ von **15**

(4'R, 5S, 4S und 4R)-3-(2',2'-Dimethyl-1',3'-dioxolan-4'-yl)-hepta-1,6-dien-4-ol (*S*)-**16**/*(R)*-**16**



Zu einer auf -78°C gekühlten Lösung von 4.59 g (16.2 mmol) Tetraallylzinn¹ wurden 35.5 ml nBuLi-Lösung (1.6M in Hexan, 56.8 mmol) über 36 min zugetropft. Nach 10 min wurde eine Lösung von 5.663 g (18.1 mmol) **15** in 40 ml THF über 11 min zugetropft und weitere 17 min bei -78°C gerührt. Die Reaktionslösung wurde nun möglichst rasch über eine CO_2 -gekühlte Teflonkanüle in eine auf -78°C gekühlte Lösung von 30 ml DMPU in 90 ml THF gedrückt (in ~ 6 min). Nach 47 min Rühren bei -78°C wurde mit 80 ml ges. NH_4 -Lösung gequench und auf RT erwärmen gelassen. Es wurde mit 400 ges. NH_4 -Lösung ausgeschüttelt, mit tBME (500 ml) rückextrahiert, über NaSO_4 getrocknet und eingengt. Eine FC (CH_2Cl_2 / EtOAc 20:1) lieferte 1.289 g (34%) (*R*)-**16**, 554 mg (14%) (*S*)-**16** und 975 mg (25%) eines Gemisches der beiden Isomere.

analytische Daten für (*S*)-**16**:

DC (CH_2Cl_2 : EtOAc = 20 : 1): $R_f = 0.14$

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 1.36 (s, 3H), 1.40 (s, 3H), 2.03-2.25 (m, 2H), 2.32-2.48 (m, 2H), 3.71 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 3.76 (dt, $J = 2.2, 7.7$ Hz, 1H), 4.02 (dd, $J = 6.6, 8.1$ Hz), 4.48 (m, 1H), 5.08-5.20 (m, 3H), 5.24 (dd, $J = 2.1, 10.4$ Hz, 1H), 5.65-5.92 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 25.23, 26.18 (2q), 40.01 (t), 51.97 (d), 67.14 (t), 70.65 (d), 75.15 (d), 108.78 (s), 118.33, 119.42 (2t), 134.27, 134.70 (2d)

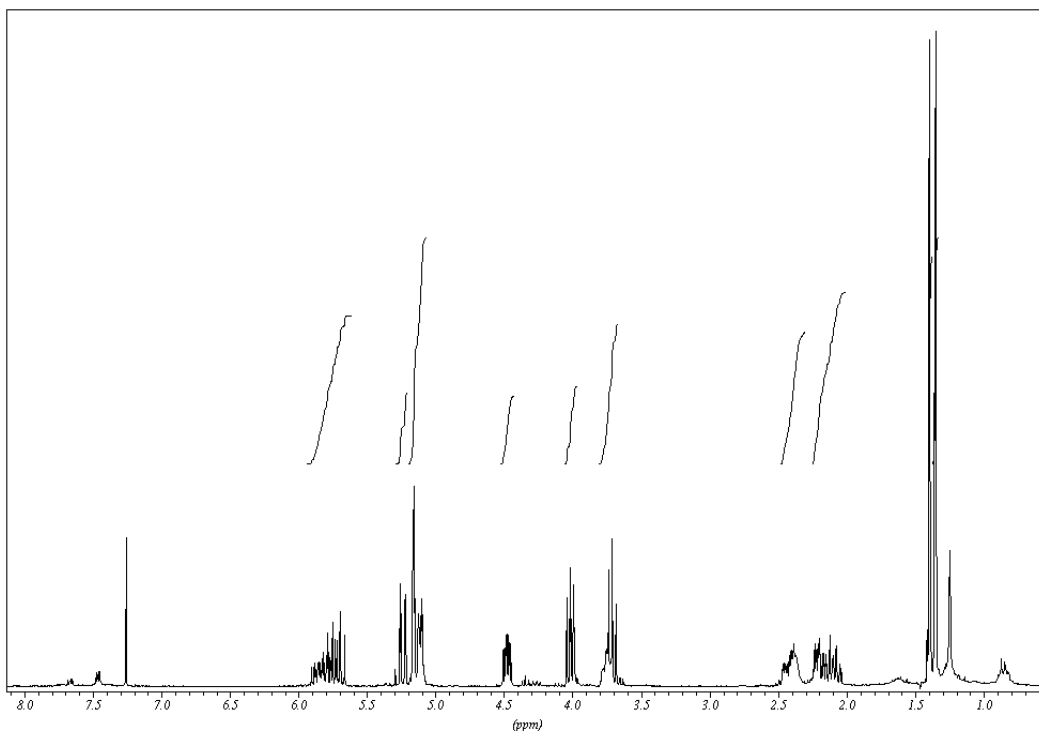
analytische Daten für (*R*)-**16**:

DC (CH_2Cl_2 : EtOAc = 20 : 1): $R_f = 0.23$

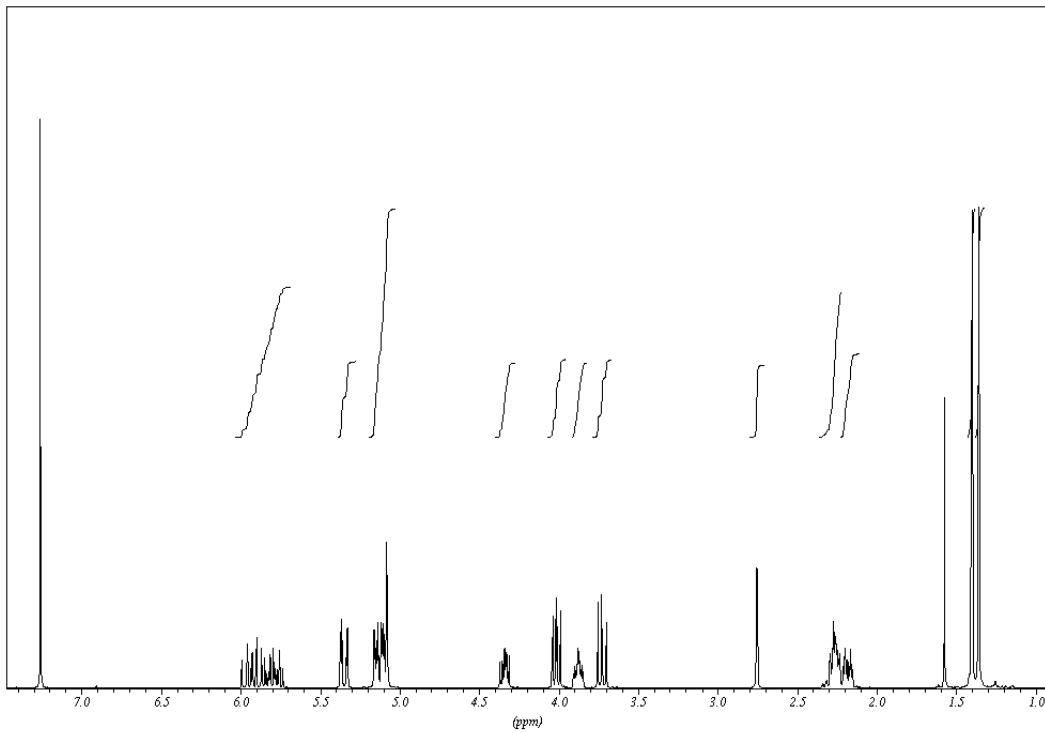
¹hergestellt nach Gampe et al.^[75]; gereinigt mit FC (Hexan)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 1.36 (s, 3H), 1.40 (s, 3H), 2.17 (td, $J = 3.2, 9.6$ Hz, 1H), 2.22-2.30 (m, 2H), 2.77 (s br, 1H), 3.73 (dd, $J = 7.5, 8.1$ Hz, 1H), 3.87 (dt, $J = 2.8, 7.0$ Hz, 1H), 4.01 (dd, $J = 6.2, 8.1$ Hz), 4.34 (dt, $J = 3.8, 6.8$ Hz), 5.06-5.17 (m, 3H), 5.34 (dd, $J = 2.1, 10.4$ Hz, 1H), 5.72-6.00 (m, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 25.32, 26.16 (2q), 39.28 (t), 50.17 (d), 67.23 (t), 72.82 (d), 77.88 (d), 109.26 (s), 117.67, 120.45 (2t), 132.30, 134.80 (2d)

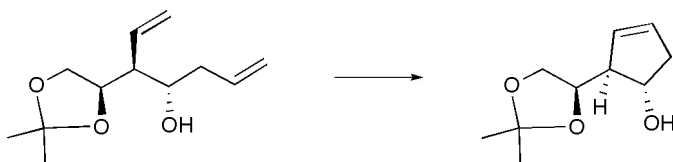


$^1\text{H-NMR}$ von (*S*)-**16**



$^1\text{H-NMR}$ von **(R)-16**

(1*S*, 2*S*, 4'*R*)-2-(2',2'-dimethyl-1',3'-dioxolan-4'-yl)cyclopent-3-enol (*S*)-**17**



(*S*)-**16**

(*S*)-**17**

212.29

184.24

Es wurden 3.711 g (17.48 mmol) (*S*)-**16** in 40 ml abs. Et₂ gelöst und mit 1.87 g (2.27 mmol, 13 mol%) Benzyliden-bis-(tricyclohexylphosphin)-dichlororuthenium versetzt. Nach 38h Rühren bei RT wurde die Reaktionslösung eingeeengt. Nach Reinigung mittels FC (tBME / Hexan 1:1) erhielt man 2.770 g (86%) (*S*)-**17** als dunkelbraunes Öl.

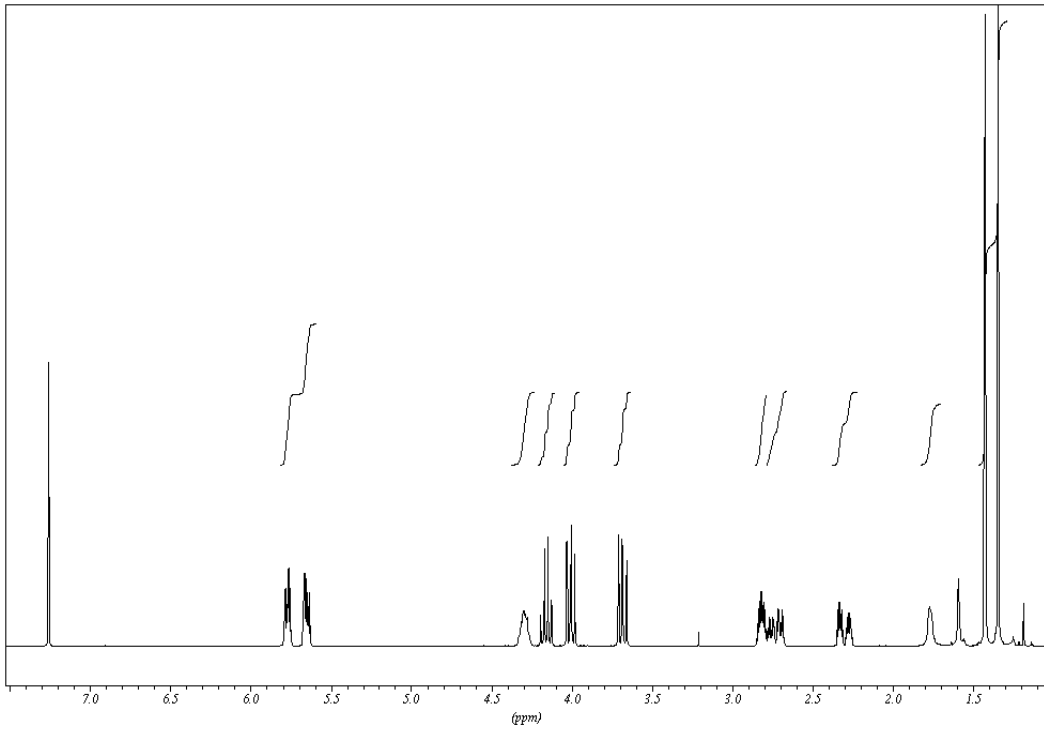
DC (tBME : Hexan = 1 : 1): R_f = 0.18

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 1.35, 1.35 (2s, 6H, CH₃), 1.77 (d br, J = 3.2 Hz, 1H, OH), 2.30 (dtd, J = 17.1, 4.2, 2.1, 1H, H-C(5)), 2.68-2.79 (m, 1H, H-C(5)), 2.79-2.85 (m, 1H, H-C(2)), 3.68 (dd, J = 6.8, 8.3 Hz, 1H, H-C(5')), 4.01 (dd, J = 6.4, 8.1 Hz, 1H, H-C(5')), 4.16 (q, J = 6.6 Hz, 1H, H-C(4')) 4.30 (q, J = 6.4, 1H, H-C(1)), 5.63-5.68 (m, 1H, H-C=C), 5.75-5.80 (m, 1H, H-C=C)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 25.22, 26.61 (2q, CH₃), 41.86 (t, C(5)), 57.63 (d, C(2)), 67.13 (t, C(5')), 74.10 (d, C(1)), 77.00 (d, C(4')), 109.01 (s, C(2')), 128.90, 130.33 (2d, C=C)

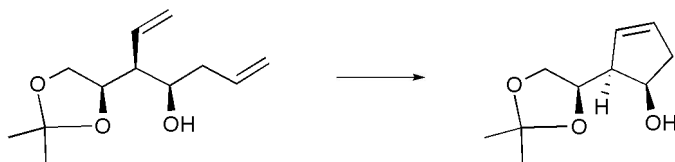
EI+-MS: 101 (100), 169 (13)

ESI+-TOF-MS: berechnet für C₁₀H₁₆O₃Na: 207.0997; gefunden: 207.0997



$^1\text{H-NMR}$ von (*S*)-**17**

(1R, 2S, 4'R)-2-(2',2'-dimethyl-1',3'-dioxolan-4'-yl)cyclopent-3-enol (**R**)-17



(**R**)-16

212.29

(**R**)-17

184.24

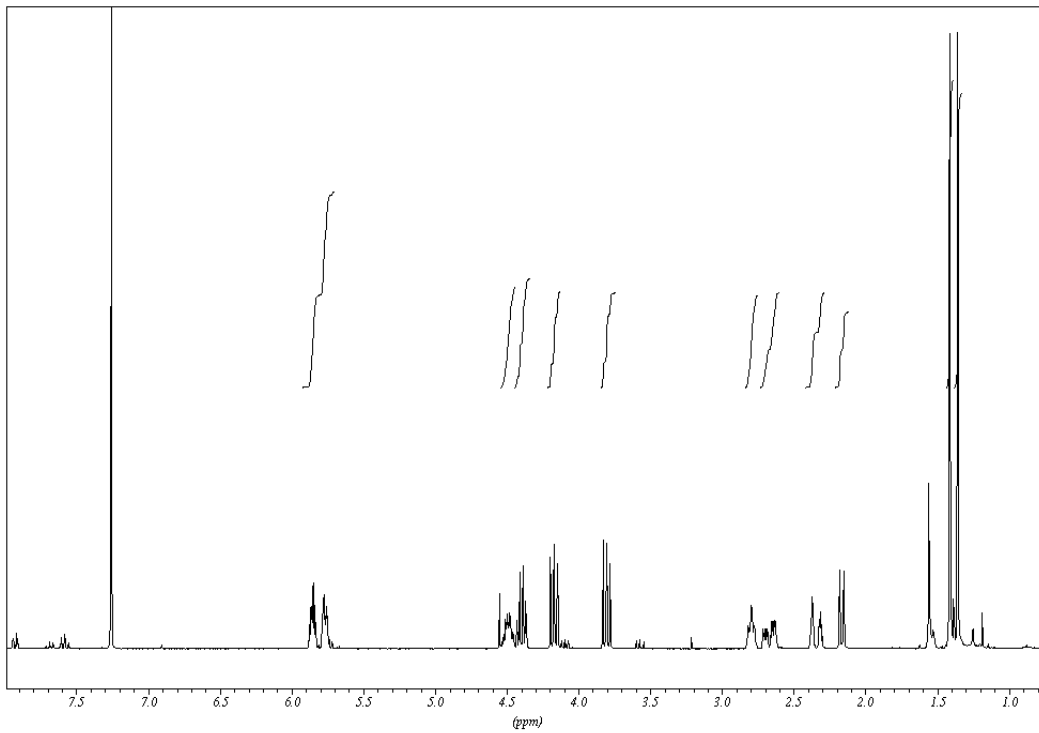
3.031 g (14.28 mmol) (**R**)-16 wurde analog zur Herstellung von (**S**)-17 aus (**S**)-16 zu 2.121 g (11.51 mmol) (**R**)-17 umgesetzt.

DC (tBME : Hexan = 1 : 1): $R_f = 0.27$

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 2.15, 2.18 (2s, 6H, CH_3), 2.17 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, OH), 2.30-2.39 (m, 1H, H-C(5)), 2.61-2.73 (m, 1H, H-C(5)), 2.76-2.84 (m, 1H, H-C(2)), 3.81 (dd, $J = 8.1, 6.6$ Hz, 1H, H-C(5')), 4.17 (dd, $J = 8.1, 6.2$ Hz, 1H, H-C(5')), 4.40 (dd, $J = 6.4, 6.2$ Hz, 1H, H-C(4')), 4.49 (m, 1H, H-C(1)), 5.74-5.80 (m, 1H, H-C=C), 5.83-5.89 (m, 1H, H-C=C)

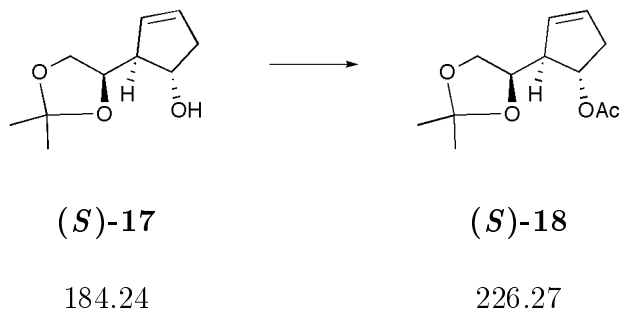
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 25.39, 26.55 (2q, CH_3), 43.02 (t, C(5)), 52.67 (d, C(2)), 68.32 (t, C(5')), 73.17 (d, C(1)), 75.40 (d, C(4')), 108.91 (s, C(2')), 129.19, 130.15 (2d, C=C)

ESI+-TOF-MS: berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{Na}$: 207.0997; gefunden: 207.0997

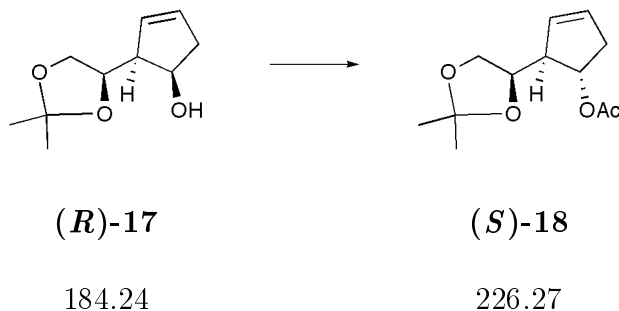


$^1\text{H-NMR}$ von **(R)-17**

(1*S*, 2*R*, 4'*R*)-1-Acetoxy-2-(2',2'-Dimethyl-1',3'-dioxolan-4'-yl)cyclopent-3-en (*S*)-18



Zu einer gekühlten Lösung von 3.97 g (21.6 mmol) (*S*)-17 in 14.5 ml Pyridin wurden 4.07 ml (43.1 mmol) Essigsäureanhydrid und 265 mg (2.17 mmol) Dimethylaminopyridin gegeben. Nach 30 min bei RT wurde Reaktionslösung in 150 ml EtOAc aufgenommen und mit ges. NaHCO₃-Lösung (2 x 150 ml) und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phase wurden mit 250 ml EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und eingengt. Eine FC (tBME / Hexan 1:3) lieferte 4.46 (91%) (*S*)-18 als gelbliches Öl.



Zu einer auf 0°C gekühlten Lösung von 8.13 g (31 mmol) PPh₃ in 129 ml abs. THF wurden 6.41 ml DIAD (94%, 31 mmol) gegeben. Nach 40 min Rühren bei 0°C wurde eine Lösung von 2.863 g (15.5 mmol) (*R*)-17 und 1.77 ml (31 mmol) Essigsäure in 50 ml THF zugetropft und 1h bei 0°C und anschliessend bei RT weitergerührt. Die Reaktionslösung wurde eingengt, in Pentan gelöst, der weisse Niederschlag abfiltriert und wieder eingengt. Nach Reinigung mittels FC (tBME / Hexan 2:15) erhielt man 2.010 g (57%) (*S*)-18 als farbloses Öl. Weiter wurden 1.205 g (42%) Ausgangsmaterial zurückgewonnen.

DC (tBME :Hexan = 1 :3): R_f = 0.33

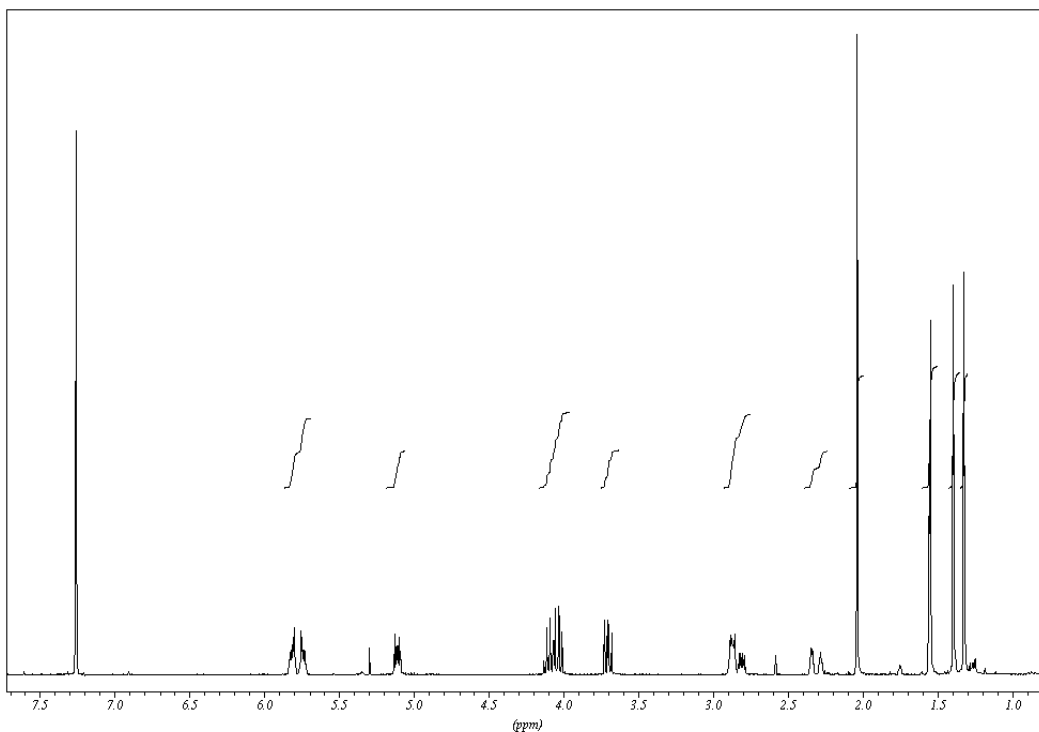
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 1.33, 1.40 (2s, 6H, CH₃-C(2')), 2.04 (s, 3H, CH₃-COO-), 2.27-2.37 (m, 1H, H-C(5)), 2.78-2.83 (m, 1H, H-C(5)),

2.83-2.90 (m, 1H, H-C(2)), 3.71 (dd, $J = 6.0, 8.1$ Hz, 1H, H-C(5')), 3.99-4.15 (m, 2H, H-C(5'), H-C(4')), 5.08-5.15 (m, 1H, H-C(1)), 5.71-5.78, 5.79-5.85 (2m, 2H, H-C=C)

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 21.25 (q, $\text{CH}_3\text{-COO-}$), 25.32, 26.55 (2q, $\text{CH}_3\text{-C}(2')$), 39.70 (t, C(5)), 55.69 (d, C(2)), 67.56 (t, C(5')), 75.97 (d, C(1)), 77.00 (d, C(4')), 109.16 (s, C(2')), 129.08, 130.29 (2d, C=C), 170.84 (s, COO)

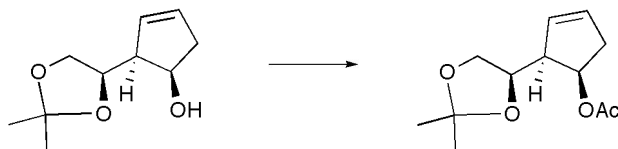
EI+-MS: 101 (100), 211 (16)

ESI+-TOF-MS: berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{Na}$: 249.1102; gefunden: 249.1074



^1H -NMR von (*S*)-18

(1R, 2R, 4'R)-1-Acetoxy-2-(2',2'-Dimethyl-1',3'-dioxolan-4'-yl)cyclopent-3-en (*R*)-18



(*R*)-17

184.24

(*R*)-18

226.27

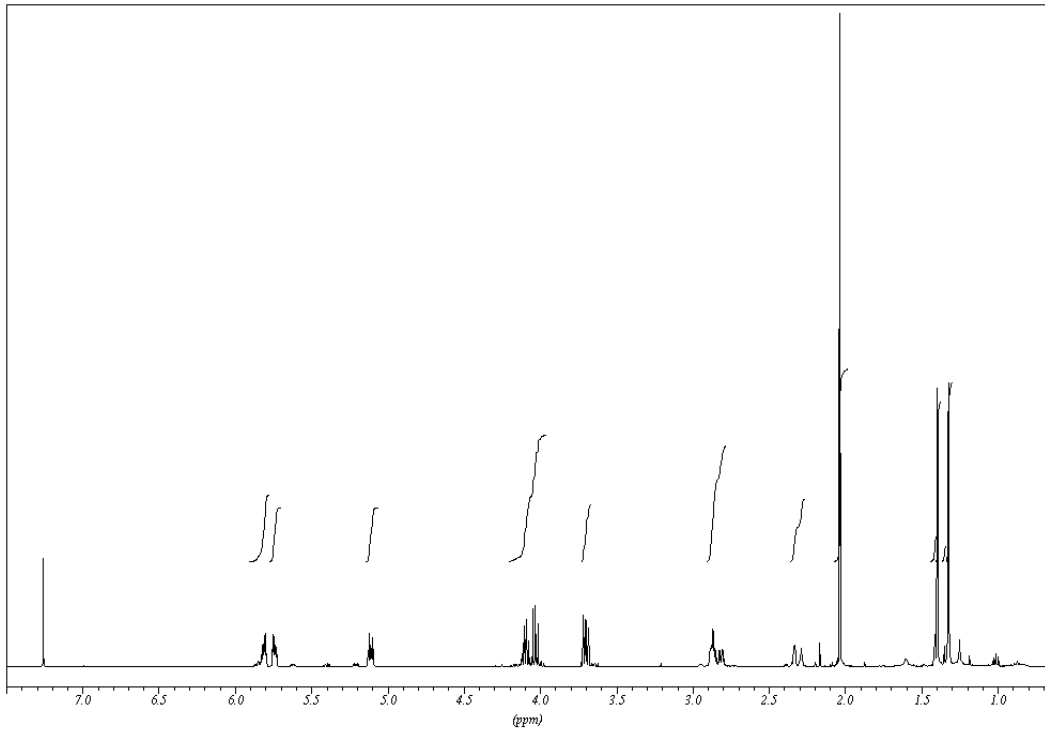
Analog zur Herstellung von (*S*)-18 aus (*S*)-17 wurden 545 mg (2.96 mmol) (*R*)-17 zu 428 mg (11.51 mmol) (*R*)-18 umgesetzt.

DC (tBME : Hexan = 1 : 3): $R_f = 0.34$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 1.32, 1.40 (2s, 6H, $\text{CH}_3\text{-C}(2')$), 2.04 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-COO-}$), 2.27-2.36 (m, 1H, H-C(5)), 2.78-2.83 (m, 1H, H-C(5)), 2.83-2.90 (m, 1H, H-C(2)), 3.70 (dd, $J = 6.2, 8.2$ Hz, 1H, H-C(5')), 3.99-4.15 (m, 2H, H-C(5'), H-C(4')), 5.08-5.15 (m, 1H, H-C(1)), 5.71-5.78, 5.79-5.85 (2m, 2H, H-C=C)

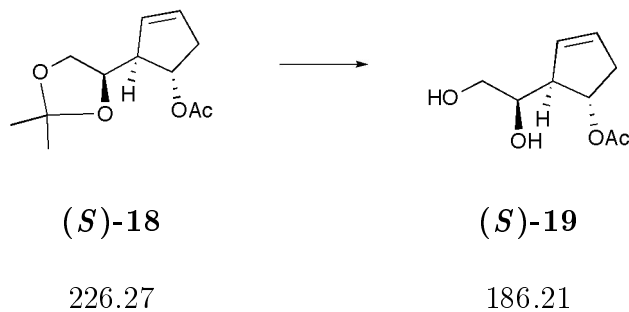
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 21.25 (q, $\text{CH}_3\text{-COO-}$), 25.31, 26.54 (2q, $\text{CH}_3\text{-C}(2')$), 39.69 (t, C(5)), 55.68 (d, C(2)), 67.54 (t, C(5')), 75.96 (d, C(1)), 77.00 (d, C(4')), 109.14 (s, C(2')), 129.06, 130.27 (2d, C=C), 170.82 (s, COO)

ESI+-TOF-MS: berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{Na}$: 249.1102; gefunden: 249.1109



$^1\text{H-NMR}$ von **(R)-18**

(1*S*, 2*R*, 1'*R*)-1-Acetoxy-2-(1',2'-dihydroxyethyl)-cyclopent-3-en (*S*)-19



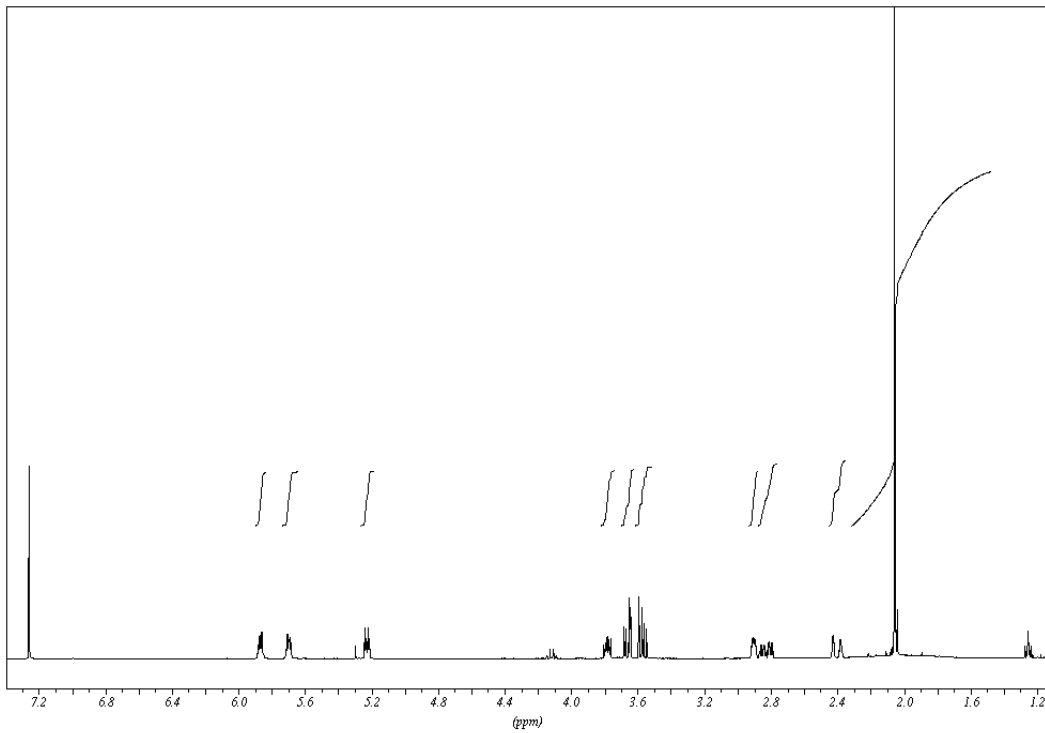
50 ml Essigsäure (80%, aq.) wurden zu 2.52 g (11.1 mmol) (*S*)-18 gegeben und 8h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde langsam zu einer auf 10°C gekühlter ges. NaHCO₃-Lösung (900 ml) gegeben und mit EtOAc (6 x 400 ml) extrahiert. Trocknen der organischen Phasen über MgSO₄ und Einengen ergaben 1.84 g (89%) (*S*)-19 als gelbliches Öl.

DC (EtOAc): R_f = 0.38

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 2.06 (s, 3H, CH₃-COO-), 2.38-2.44 (m, 1H, H-C(5)), 2.78-2.87 (m, 1H, H-C(5)), 2.88-2.92 (m, 1H, H-C(2)), 3.57 (dd, J = 11.5, 6.7 Hz, 1H, H-C(2')), 3.66 (dd, J = 11.5, 3.5 Hz, 1H, H-C(2')), 3.76-3.81 (m, 1H, H-C(1')), 5.23 (dt, J = 7.0, 2.2 Hz, 1H, H-C(1)), 5.18-5.22, 5.83-5.89 (2m, 2H, H-C=C)

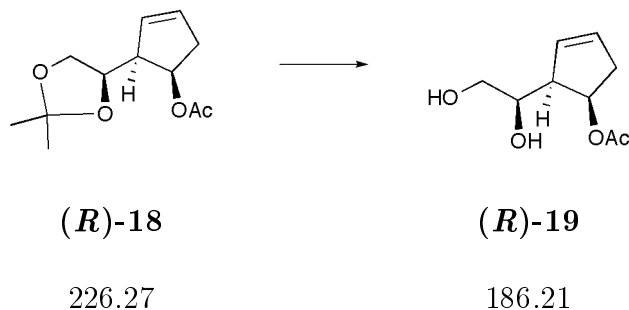
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 21.31 (q, CH₃-COO-), 39.13 (t, C(5)), 56.51 (d, C(2)), 64.87 (t, C(2')), 72.79 (d, C(1)), 76.44 (d, C(1')), 128.35, 130.97 (2d, C=C)

ESI+-TOF-MS: berechnet für C₉H₁₄O₄Na: 209.0789; gefunden: 209.0788



$^1\text{H-NMR}$ von $(S)\text{-19}$

(1R, 2R, 1'R)-1-Acetoxy-2-(1',2'-dihydroxyethyl)-cyclopent-3-en (*R*)-19



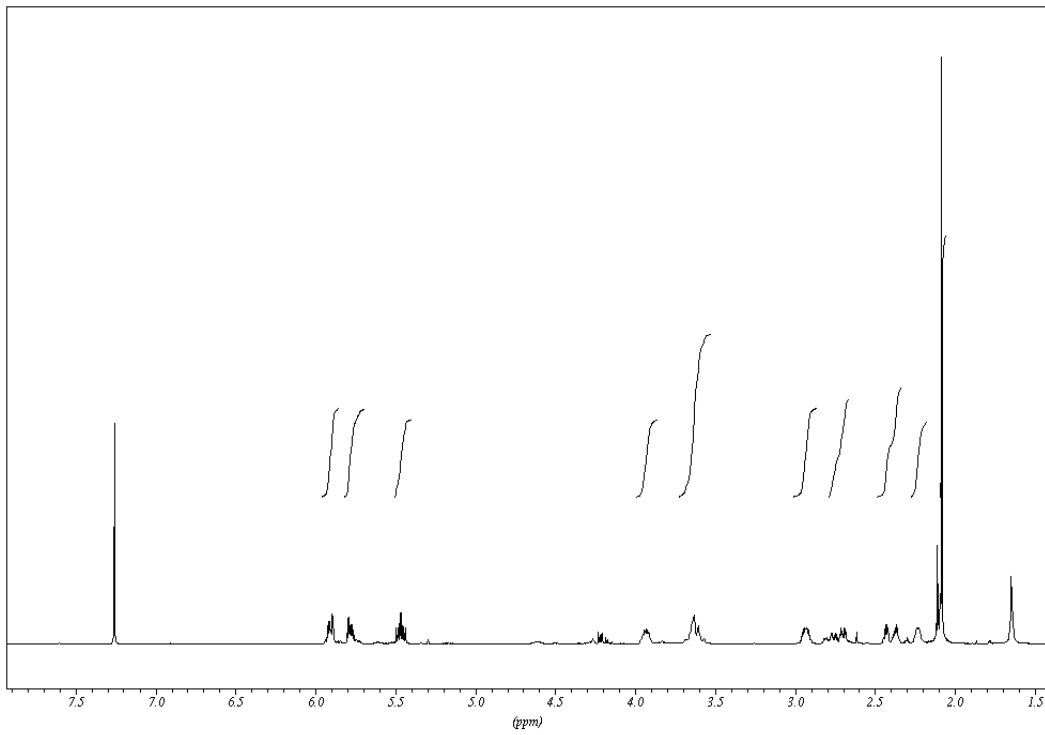
Man liess 468 mg (2.07 mmol) (***R***-18) 10h bei RT in 10 ml AcOH 80% rühren. Die Lösung wurde auf 0°C gekühlt, mit kalter ges. NaHCO₃-Lösung (200 ml) neutralisiert und mit EtOAc (5 x 100 ml) extrahiert. Eine FC (EtOAc / Hexan 2:1) lieferte 239 mg (62%) (***R***-19) als weissen Feststoff.

DC (EtOAc): R_f = 0.41

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 2.09 (s, 3H, CH₃-COO-), 2.23 (d br, J = 3.75, 1H, OH), 2.34-2.47 (m, 1H, H-C(5)), 2.68-2.78 (m, 1H, H-C(5)), 2.89-2.98 (m, 1H, H-C(2)), 3.54-3.71 (m, 2H, H₂-C(2')), 3.89-3.98 (m, 1H, H-C(2')), 5.42-5.50 (m, 1H, H-C(1)), 5.76-5.81, 5.88-5.95 (2m, 2H, H-C=C)

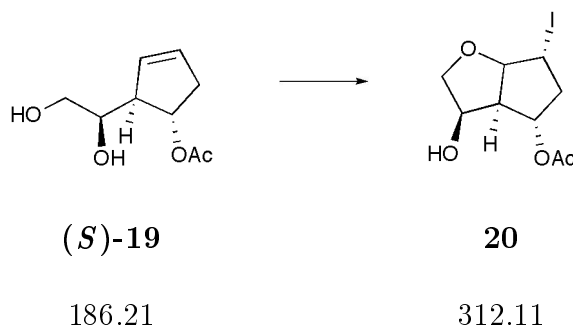
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 21.21 (q, CH₃-COO-), 39.61 (t, C(5)), 50.26 (d, C(2)), 65.71 (t, C(2')), 70.57 (d, C(1)), 75.31 (d, C(1')), 128.49, 130.82 (2d, C=C), 170.56 (s, COO)

ESI+-TOF-MS: berechnet für C₉H₁₄O₄Na: 209.0789; gefunden: 209.0793



$^1\text{H-NMR}$ von **(R)-19**

(1R, 4R, 5R, 6S, 8R)-6-Acetoxy-4-hydroxy-8-iodo-2-oxabicyclo-[3.3.0]-octan 20



Zu einer Lösung von 178 mg (0.956 mmol) **(S)-19** in 5 ml CH₂Cl₂ und 1 ml Wasser wurden 320 mg (3.81 mmol) NaHCO₃, 325 mg (1.96 mmol) KI und 481 mg (1.90 mmol) I₂ zugegeben. Nach 3d Rühren bei RT wurde die Reaktionslösung in 20 ml CH₂Cl₂ aufgenommen, mit ges. Na₂SO₃-Lösung (2 x 20 ml), Wasser (20 ml) und ges. NaCl-Lösung (20 ml) gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit je 20 ml CH₂Cl₂ rückextrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und eingeeengt. Man erhielt 268 mg (90%) **20** als farbloses Öl.

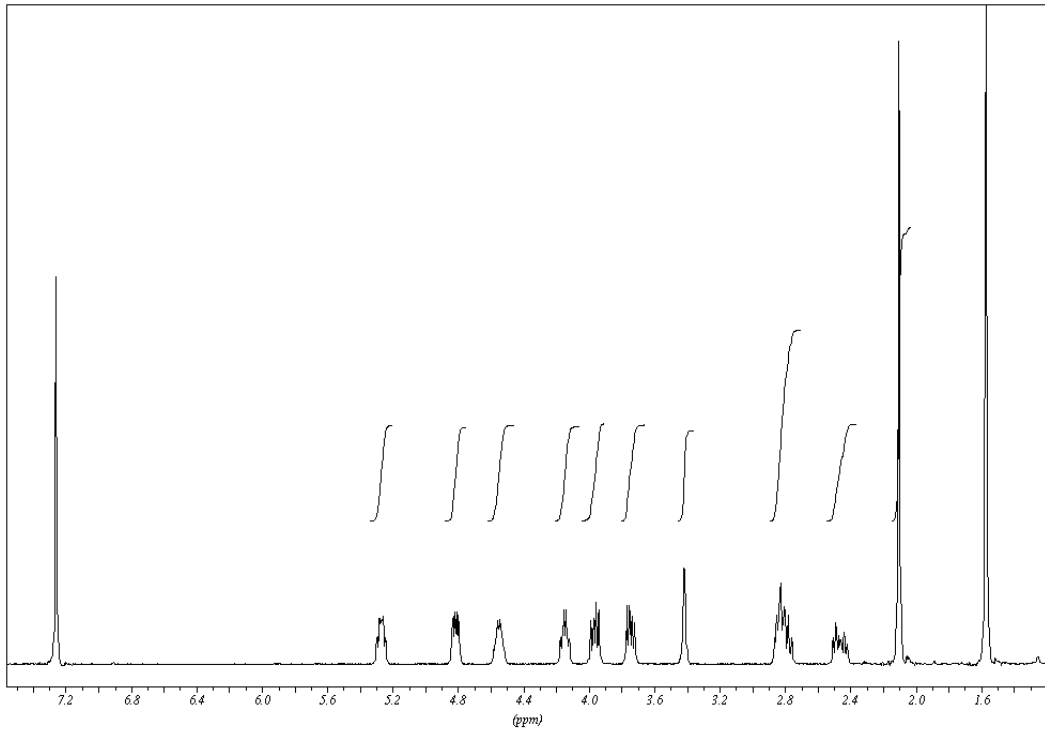
DC (EtOAc): R_f = 0.41; (CH₂Cl₂ / MeOH 15:1): R_f = 0.58

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 2.11 (s, 3H, CH₃-COO-), 2.47 (td, J = 5.9, 14.7 Hz, 1H, H-C(7)), 2.74-2.89 (m, 2H, H-C(7), H-C(5)), 3.41 (d br, J = 2.5 Hz, 1H, OH), 3.74 (dd, J = 4.7, 9.6 Hz, 1H, H-C(3)), 3.96 (dd, J = 5.5, 9.6 Hz, 1H, H-C(3)), 4.10-4.18 (m, 1H, H-C(8)), 4.82 (dd, J = 4.7, 7.3 Hz, 1H, H-C(4)), 5.22-5.30 (m, 1H, H-C(6))

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 21.19 (q, CH₃-COO-), 23.12 (d, C(8)), 43.57 (t, C(7)), 54.97 (d, C(5)), 70.91 (d, C(4)), 73.70 (d, C(6)), 75.77 (t, C(3)), 93.03 (d, C(1))

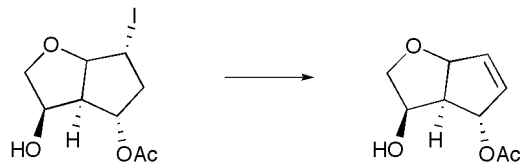
ESI+-MS: 251 (43), 335 (100)

ESI+-TOF-MS: berechnet für C₉H₁₄O₄Na: 334.9756; gefunden: 334.9760



$^1\text{H-NMR}$ von **20**

**(1S, 4R, 5R, 6S)-6-Acetoxy-4-hydroxy-2-oxabicyclo-[3.3.0]-
oct-7-en **22****



20

22

312.11

184.19

Es wurden 28 mg NaH (60%, 0.69 mmol) mit trockenem Pentan (2 x 2 ml) gewaschen und mit 1.2 ml DMSO versetzt. Dazu wurden 43 mg (0.34 mmol) Thymin gegeben. Nach 5 min Rühren wurden 101 mg (0.32 mmol) **20** in 0.5 ml DMSO zugegeben und weitere 42h bei RT gerührt. Danach quenchte man mit 0.5 ml ges. NH₄-Lösung und engte am HV ein. Der Rückstand wurde in EtOAc gelöst und auf Silicagel absorbiert. Eine FC lieferte 43 mg (72%) **22** als farbloses Öl.

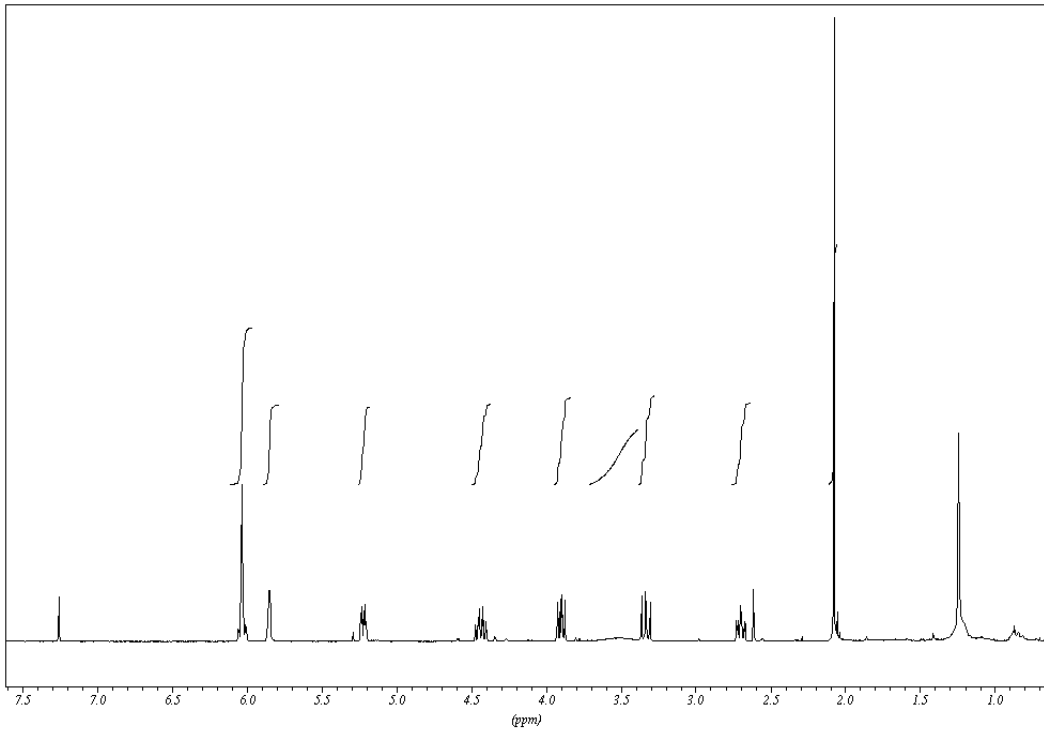
DC (CH₂Cl₂ / MeOH 15:1): R_f = 0.52

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 2.08 (s, 3H, CH₃-COO-), 2.66-2.74 (m, 1H, H-C(5)), 3.33 (dd, J = 7.7, 9.2 Hz, 1H, H-C(3)), 3.51 (br, 1H, OH), 3.90 (dd, J = 5.9, 9.2 Hz, 1H, H-C(3)), 4.44 (dt, J = 5.9, 8.1 Hz, 1H, H-C(4)), 5.20-5.25 (m, 1H, H-C(1)), 5.83-5.87 (m, 1H, H-C(6)), 6.00-6.06 (m, 2H, H-C=C-H)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 21.20 (q, CH₃-COO-), 51.71 (d, C(5)), 70.83, 70.86 (2t, C(3), C(4)), 79.10 (d, C(6)), 87.53 (d, C(1)), 133.57, 136.32 (2d, C(7), C(8)), 172.40 (s, COO)

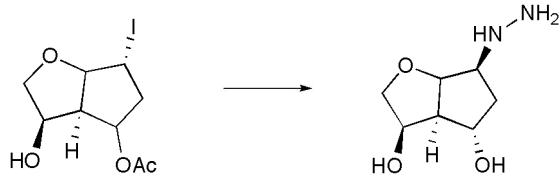
ESI+-MS: 185 (5), 207 (100)

ESI+-TOF-MS: berechnet für C₉H₁₄O₄Na: 207.0633; gefunden: 207.0631



$^1\text{H-NMR}$ von **22**

(1R, 4R, 5S, 6S, 8S)-4,6-Dihydroxy-8-hydrazino-2-oxabicyclo-[3.3.0]-octan 25



20

25

312.11

174.20

Zu 426 mg **20** wurden 5 ml Hydrazinhydrat gegeben und 22h bei RT gerührt. Anschliessend wurde die Lösung am HV eingengt und getrocknet. Man erhielt 467 mg transparentes Öl, das ohne Reinigung für die nächste Stufe verwendet wurde.

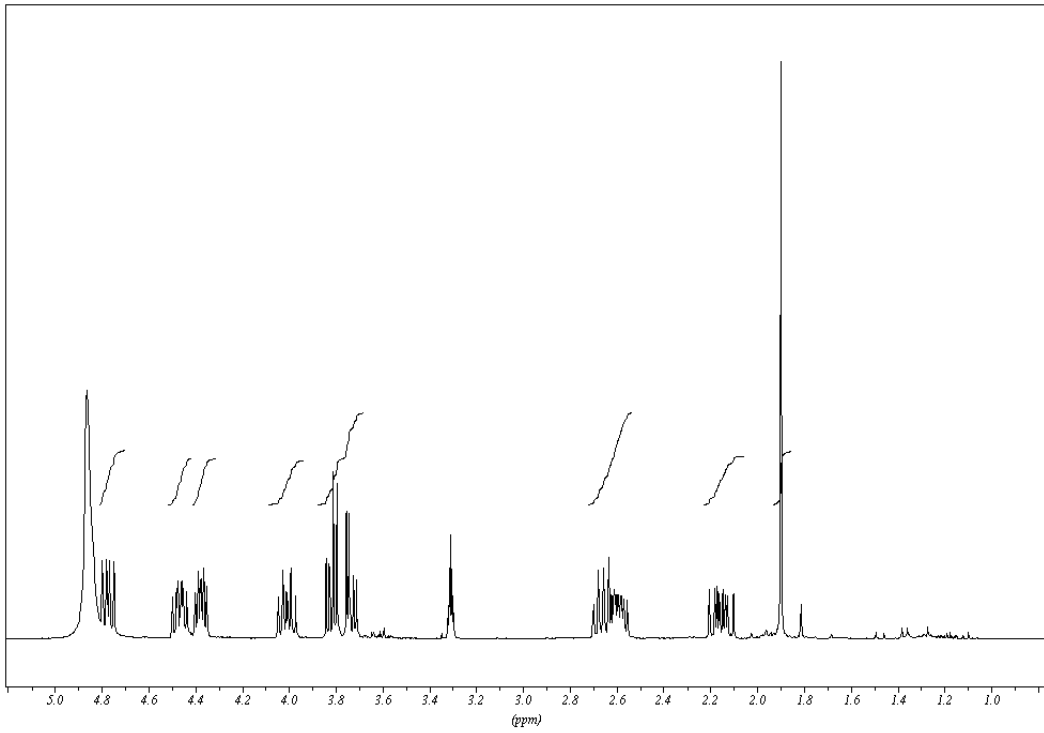
DC (CH₂Cl₂ / MeOH 10:1): R_f = 0.08; (CH₂Cl₂ / MeOH 5:1): R_f = 0.26

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 2.09-2.22 (m, 1H, H-C(7)), 2.52-2.72 (m, 2H, H-C(7)), H-C(5)), 3.70-3.85 (m, 2H, H₂-C(3)), 3.96-4.06 (m, 1H, H-C(8)), 4.33-4.41 (m, 1H, H-C(4)), 4.43-4.51 (m, 1H, H-C(6)), 4.77 (dd, J = 5.8, 9.0 1H, H-C(1))

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, δ/ppm): 24.30 (d, C(8)), 49.36 (t, C(7)), 57.05 (d, C(5)), 70.38 (d, C(6)), 71.14 (d, C(4)), 76.96 (t, C(3)), 94.61 (d, C(1))

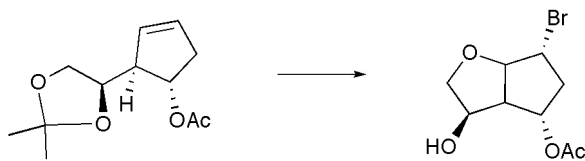
ESI+-MS: 43 (100), 174 (38)

ESI+-TOF-MS: berechnet für C₇H₁₅N₂O₃: 175.1083; gefunden: 175.1082



$^1\text{H-NMR}$ von **25**

(1R, 4R, 5R, 6S, 8R)-6-Acetoxy-4-hydroxy-8-bromo-2-oxabicyclo-[3.3.0]-octan 21



(S)-19

21

186.21

265.11

Zu einer Lösung von 400 mg (2.15 mmol) **(S)-19** in 10.5 ml CH₂Cl₂ und 1.2 ml Wasser wurden 718 mg (8.54 mmol) NaHCO₃, 510 mg (4.29 mmol) KBr und 683 mg (4.27 mmol) Br₂ zugegeben. Nach 3d Rühren bei RT wurde die Reaktionslösung in 45 ml CH₂Cl₂ aufgenommen, mit ges. Na₂SO₃-Lösung (2 x 40 ml), Wasser (40 ml) und ges. NaCl-Lösung (40 ml) gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit je 40 ml CH₂Cl₂ rückextrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und eingeeengt. Eine FC (EtOAc / Hexan 1:5) lieferte 132 mg (23%) **21** als farbloses Öl.

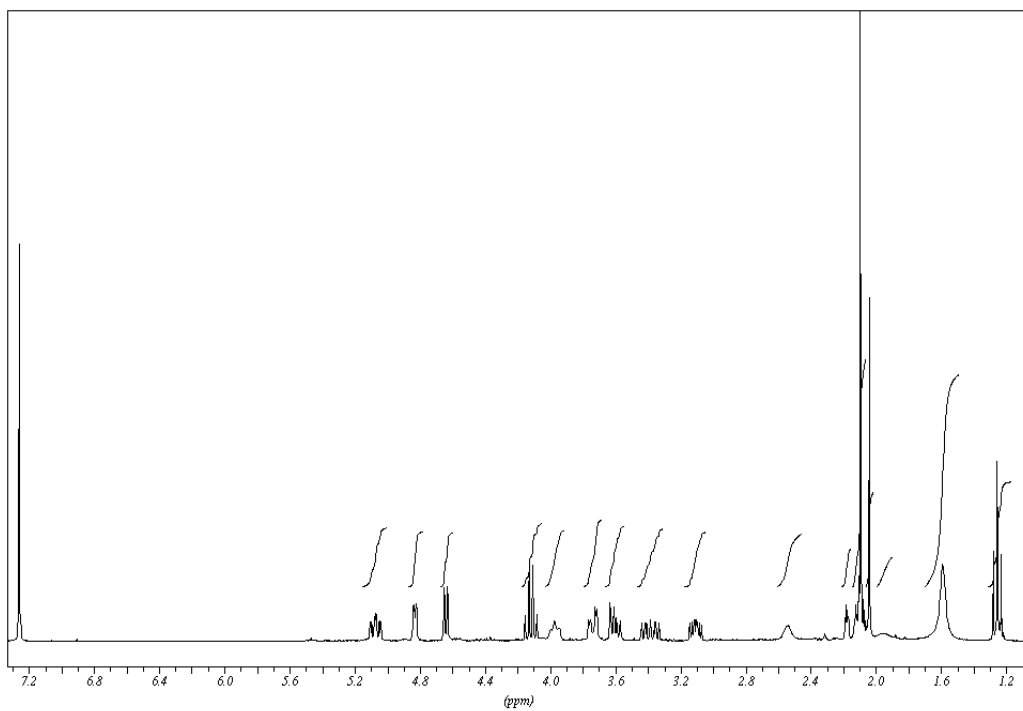
DC (EtOAc): R_f = 0.75

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 2.10 (s, 3H, CH₃-COO-), 2.15 (td, J = 2.1, 14.9 Hz, 1H, H-C(7)), 2.54 (s br, 1H, OH), 3.11 (ddd, J = 4.5, 8.1, 9.5 Hz, 1H, H-C(5)), 3.39 (ddd, J = 6.2, 9.0, 17.0 Hz, 1H, H-C(7)), 3.60 (dd, J = 6.4, 11.5 Hz, 1H, H-C(3)), 3.74 (dd, J = 2.6, 11.5 Hz, 1H, H-C(3)), 3.97 (t, J = 6.6 Hz, 1H, H-C(4)), 4.64 (d, J = 6.0 Hz, 1H, H-C(8)), 4.83 (dd, J = 1.7, 4.5 Hz, H-C(1)), 5.07 (dt, J = 2.6, 8.5 Hz, 1H, H-C(6))

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 20.99 (q, CH₃-COO-), 42.01 (t, C(7)), 49.77 (d, C(5)), 51.34 (d, C(8)), 60.25 (d, C(1)), 64.77 (t, C(3)), 73.57 (d, C(4)), 74.49 (d, C(1))

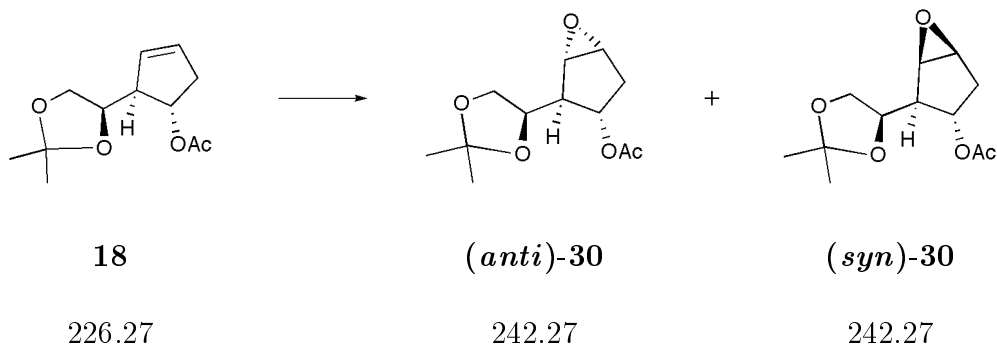
ESI+-MS: 40 (100), 265 (13), 267 (32)

ESI+-TOF-MS: berechnet für C₉H₁₃O₄NaBr: 286.9894 ; gefunden: 286.9896



$^1\text{H-NMR}$ von **21**

(1S, 2R, 4'R, 3S, 4S und 3R, 4R)-(1-Acetoxy-2-(2',2'-dimethyl-1',3'-dioxolan-4'-yl)-3,4-epoxy-cyclopentan (*anti*)-30 / (*syn*)-30



Bei 0°C wurde über 10 min eine Lösung von 970 mg (4.29 mmol) **18** in 5 ml CH₂Cl₂ zu einer Lösung von 1.154 g (1.2 eq.) mCPBA 77% in 5 ml CH₂Cl₂ gegeben. Nach 62h bei 0°C wurde die Lösung in tBME (200 ml) aufgenommen, mit 10% Na₂S₂O₃ aq. (2 x 200 ml), ges. NaHCO₃-Lösung (200 ml) und ges. NaCl-Lösung (200 ml) gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit je 200 ml tBME rückextrahiert, über MgSO₄ getrocknet und einged. Eine FC (EtOAc / Hexan 1:5) lieferte 612 mg (59%) (*anti*)-**30**, sowie 317 mg (31%) (*syn*)-**30**.

analytische Daten für (*anti*)-**30**:

DC (tBME : EtOAc = 1 : 1): R_f = 0.36

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 2.11 (d, J = 15.6 Hz, 1H, H-C(5)), 2.25 (ddd, J = 1.3, 7.7, 15.8 Hz, 1H, H-C(5)), 2.35 (d, J = 5.7 Hz, 1H, H-C(2)), 3.56-3.59 (m, 1H, H-C(4)), 3.61-3.64 (m, 1H, H-C(3)), 3.85-3.93 (m, 1H, H-C(2')), 4.10-4.16 (m, 1H, H-C(1'), H-C(2')), 4.95 (d, J = 7.5 Hz, 1H, H-C(1))

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 21.23 (q, CH₃-COO), 24.94, 26.45 (2q, CH₃-C(2')), 34.80 (t, C(5)), 51.29 (d, C(2)), 57.68, 58.19 (2d, C(3), C(4)), 67.86 (t, C(2')), 74.89 (d, C(1)), 75.97 (d, C(1')), 109.57 (s, C(2')), 170.88 (s, CH₃-COO)

Differenz-NOE (400 MHz, CDCl₃):

4.95 (H-C(1)) → 3.68 (H-C(3)) : 1.7%

ESI+-TOF-MS: berechnet für C₁₂H₁₈O₅Na: 265.1051 ; gefunden: 265.1056

analytische Daten für (*syn*)-**30**:

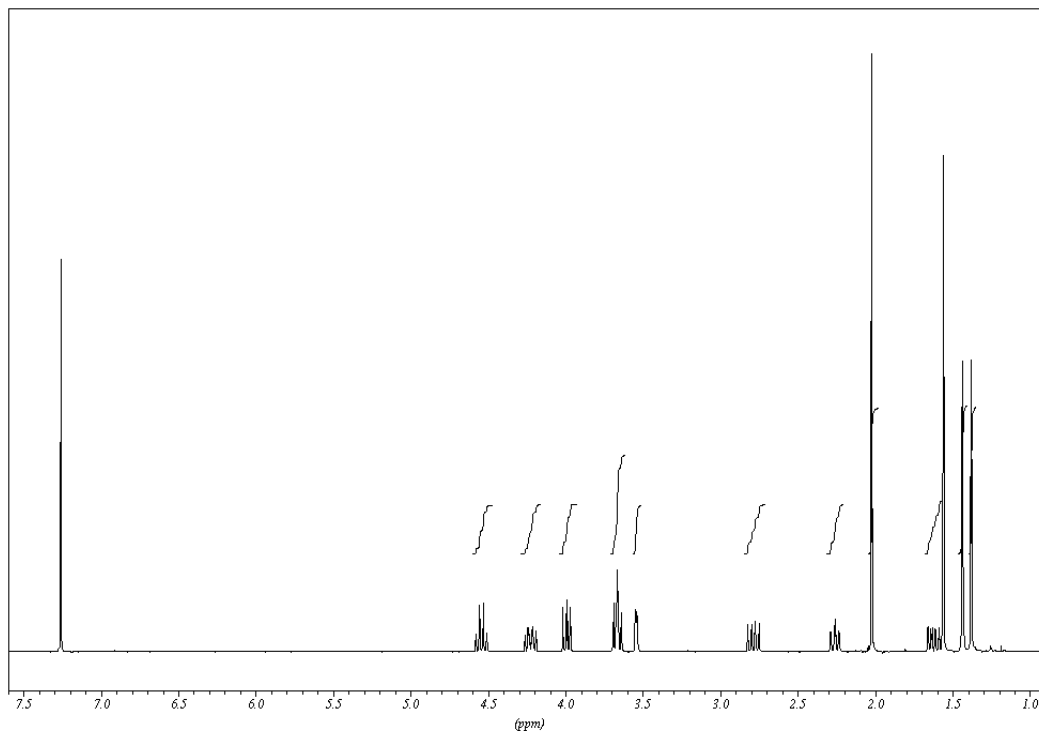
DC (tBME:EtOAc = 1:1): $R_f = 0.27$

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 1.38, 1.44 (2s, 6H, $\text{CH}_3\text{-C}(2')$), 1.62 (ddd, $J = 1.5, 7.0, 14.3$ Hz, H-C(5)), 2.02 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-COO}$), 2.26 (ddd, $J = 1.5, 7.0, 9.0$ Hz, 1H, H-C(2)), 2.79 (dd, $J = 7.5, 14.3$ Hz, 1H, H-C(5)), 3.54 (dd, $J = 1.1, 2.8$ Hz, 1H, H-C(4)), 3.63-3.70 (m, 2H, H-C(3), H-C(2')), 4.00 (dd, $J = 6.0, 8.3$ Hz, 1H, H-C(2')), 4.18-4.27 (m, 1H, H-C(1')), 4.54 (q, $J = 7.0$ Hz, 1H, H-C(1))

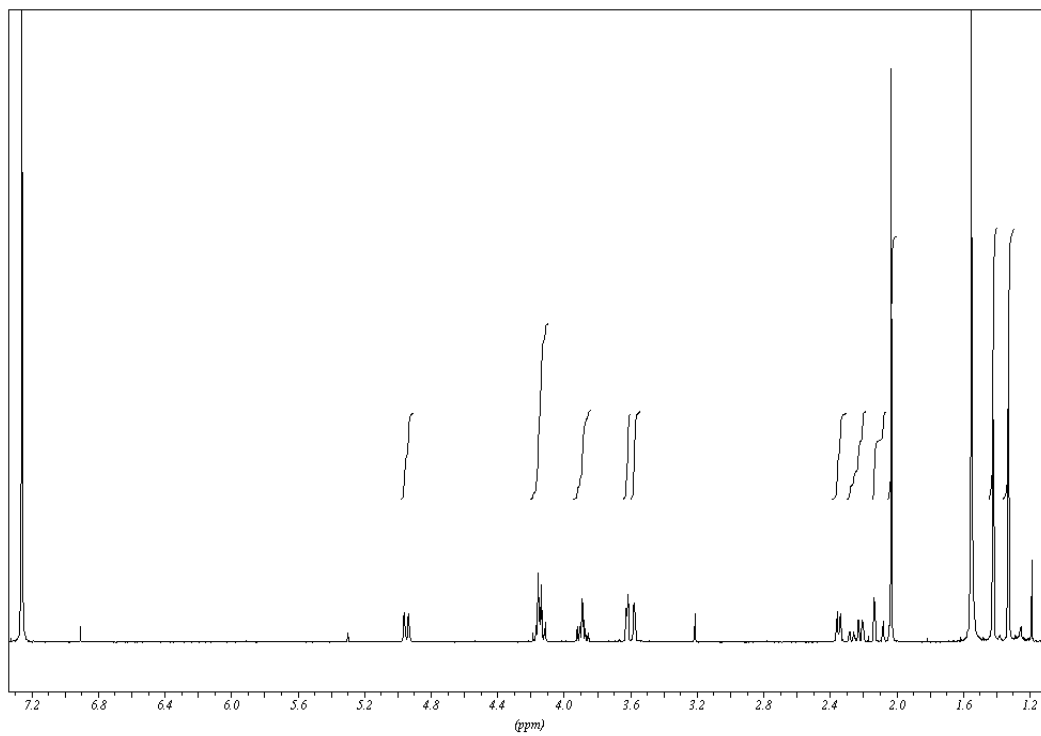
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 20.94 (q, $\text{CH}_3\text{-COO}$), 26.84, 26.85 (2q, $\text{CH}_3\text{-C}(2')$), 34.36 (t, C(5)), 48.69 (d, C(2)), 54.85, 56.41 (2d, C(4), C(3)), 67.41 (t, C(2')), 72.28 (d, C(1)), 75.20 (d, C(1')), 108.94 (s, C(2')), 170.20 (s, $\text{CH}_3\text{-COO}$)

Differenz-NOE (400 MHz, CDCl_3):
4.55 (H-C(1)) \rightarrow 3.68 (H-C(3)) : 0%

ESI+-TOF-MS: berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_5\text{Na}$: 265.1051 ; gefunden: 265.1051

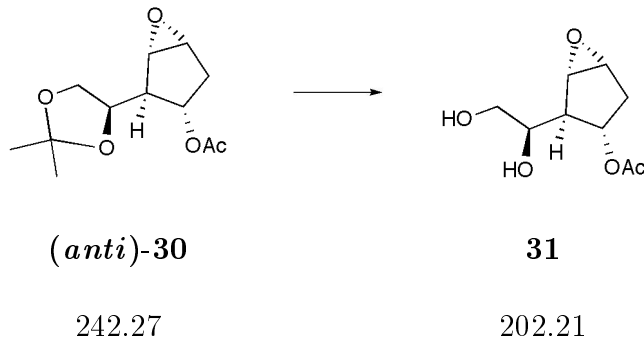


$^1\text{H-NMR}$ von (*anti*)-**30**



$^1\text{H-NMR}$ von $(syn)\text{-30}$

(1S, 2S, 3S, 4S, 1'R)-(1-Acetoxy-2-(1',2'-dihydroxy-ethyl)-3,4-epoxy-cyclopentan 31



Zu 572 mg (2.36 mmol) (*anti*)-**30** wurden 12 ml Essigsäure (80% aq.) gegeben und 11h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde in 70 ml Phosphatpuffer (1.4 M, pH 6.4) gegeben und auf 0°C gekühlt. Mit 3M NaOH (~ 45 ml) wurde auf Ph 7 gestellt und mit EtOAc (6 x 150 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und eingengt. Eine FC (CH₂Cl₂ / MeOH 19:1) ergab 331 mg (69%) **31** sowie 6 mg (1%) des Ausgangsmaterials.

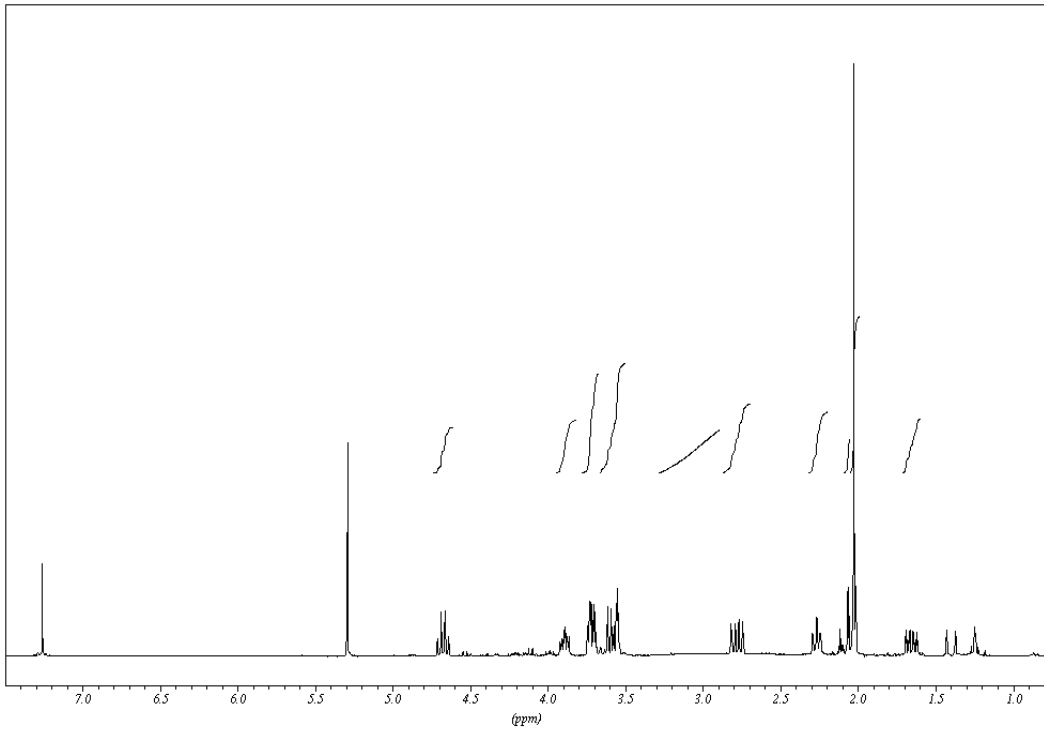
DC (CH₂Cl₂ / MeOH 19:1): R_f = 0.13

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 1.66 (ddd, J = 1.5, 6.8, 14.5 Hz, H-C(5)), 2.03 (s, 3H, CH₃-COO), 2.07 (d, J = 2.2 Hz, 1H, OH), 2.27 (dt, J = 1.5, 7.0 Hz, 1H, H-C(2)), 2.78 (dd, J = 7.5, 14.5 Hz, 1H, H-C(5)), 3.53-3.63 (m, 2H, H-C(4), H-C(2')), 3.68-3.75 (m, 2H, H-C(3), H-C(2')), 3.89 (dt, J = 3.2, 7.2 Hz, 1H, H-C(1')), 4.68 (q, J = 7.0 Hz, 1H, H-C(1))

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 20.95 (q, CH₃-COO), 34.26 (t, C(5)), 48.07 (d, C(2)), 54.99 (d, C(4)), 56.46 (d, C(3)), 65.22 (t, C(2')), 71.48 (d, C(1')), 72.58 (d, C(1')), 170.53 (s, CH₃-COO)

ESI+-MS: 185 (40), 203 (100), 225 (30)

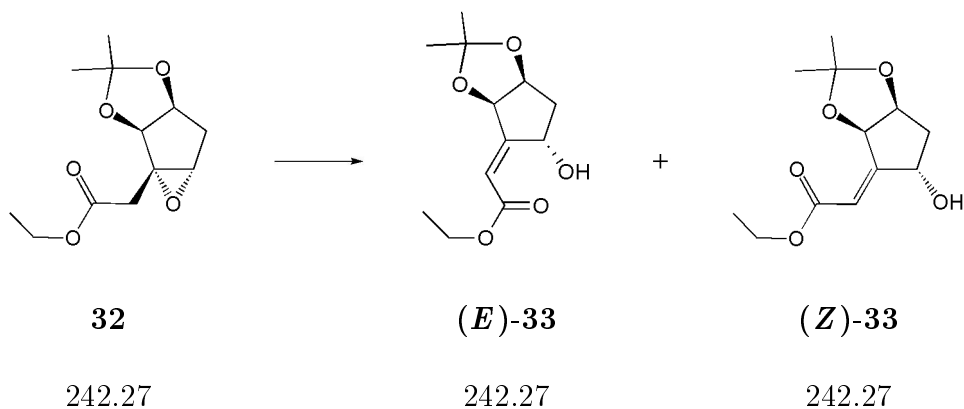
ESI+-TOF-MS: berechnet für C₉H₁₄O₅Na: 225.0738 ; gefunden: 225.0732



$^1\text{H-NMR}$ von **31**

8.2 Synthese ausgehend von Epoxyester **32**

(*E* und *Z*, 1'S, 5'R, 7'S)-2-(3',3'-Dimethyl-2',4'-dioxo-7'-hydroxybicyclo-[3.3.0]oct-6'-yliden)-essigsäureethylester
(*Z*)-**33**/*(E)*-**33**



Zu einer Lösung von 999 mg (4.12 mmol) Epoxyester **32** in 10 ml CH₂Cl₂ wurden 620 μ l (632 mg, 4.15 mmol) DBU zugegeben. Nach 1h bei RT wurde mit EtOAc gequench und mit 236 μ l (4.13 mmol) neutralisiert. Die Lösung wurde in 50 ml EtOAc aufgenommen, mit ges. NH₄Cl-Lösung (100 ml) und ges. NaCl-Lösung (100 ml) gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit EtOAc (2 x 150 ml) rückextrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und eingengt. Ein FC (Hexan / EtOAc 4:1) lieferte 223 mg (22%) (*E*)-**33** als farbloses Öl sowie 241 mg (24%) (*Z*)-**33** als weissen Feststoff.

analytische Daten für (*E*)-**33**:

DC (Hexan / EtOAc 1:1): R_f = 0.46

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ /ppm): 1.24 (t, 3H, J = 7.2 Hz, CH₃-CH₂), 1.26, 1.32 (2s, 6H, CH₃-C(3')), 1.88 (ddd, J = 5.0, 8.8, 14.6 Hz, 1H, H-C(8')), 2.58 (dd, J = 8.1, 14.6 Hz, 1H, H-C(8')), 4.18-4.27 (m, 2H, CH₂), 4.69 (t, J = 5.0 Hz, 1H, H-C(1')), 4.89 (td, J = 1.8, 5.2 Hz, 1H, H-C(5')), 5.19 (d, J = 2.0 Hz, 1H, OH), 5.24 (qt, J = 2.2, 8.5 Hz, 1H, H-C(7')), 6.11-6.13 (m, 1H, H-C(9'))

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ /ppm): 14.08 (t, CH₃-CH₂), 25.35, 27.28 (2q, CH₃-C(3')), 36.43 (t, C(8')), 61.17 (t, CH₂), 70.76 (d, C(7')), 77.99 (d, C(1')), 81.53 (d, C(5')), 111.66 (s, C(3')), 120.06 (d, C(2)), 167.31, 167.82 (2s, C(6'), C(1))

Differenz-NOE (400 MHz, CDCl₃):

6.12 (H-C(9')) → 4.89 (H-C(5')) : 3.5%

6.12 (H-C(9')) → 5.24 (H-C(7')) : 0%

ESI+-TOF-MS: berechnet für C₁₂H₁₉O₅: 243.1232; gefunden: 243.1228

analytische Daten für (**Z**)-**33**:

DC (Hexan / EtOAc 1:1): R_f = 0.32

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 1.29 (t, 3H, J = 7.1 Hz, CH₃-CH₂), 1.36, 1.44 (2s, 6H, CH₃-C(3')), 1.44-1.55 (m, 1H, H-C(8')), 1.88 (br, 1H, OH), 2.42 (dd, J = 7.4, 13.4 Hz, 1H, H-C(8')), 4.22 (q, J = 7.1, 2H, CH₂), 4.68 (t, J = 5.6 Hz, 1H, H-C(1')), 4.93 (t br, J = 9.2 Hz, 1H, H-C(7')), 5.63 (d, J = 6.0 Hz, 1H, H-C(5')), 6.07 (dd, J = 1.3, 2.4 Hz, 1H, H-C(2))

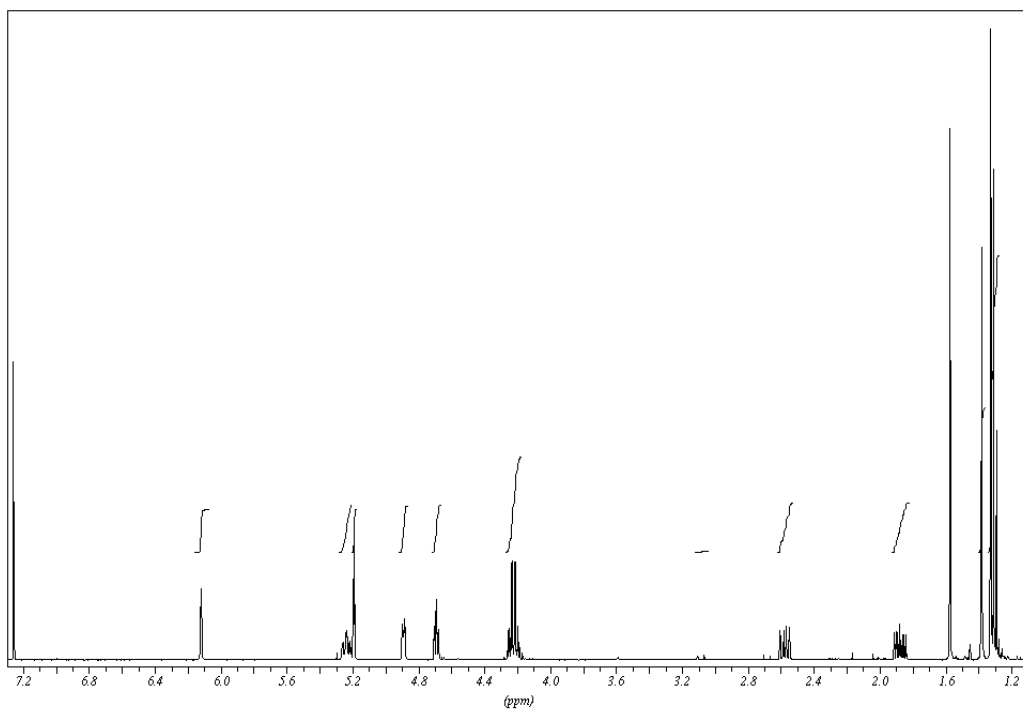
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 14.17 (t, CH₃-CH₂), 24.03, 26.36 (2q, CH₃-C(3')), 37.53 (t, C(8')), 60.36 (t, CH₂), 71.66 (d, C(7')), 75.44 (d, C(5')), 76.44 (d, C(1')), 110.60 (s, C(3')), 116.46 (d, C(2)), 161.39 (s, C(6')), 165.56 (2s, C(1))

Differenz-NOE (400 MHz, CDCl₃):

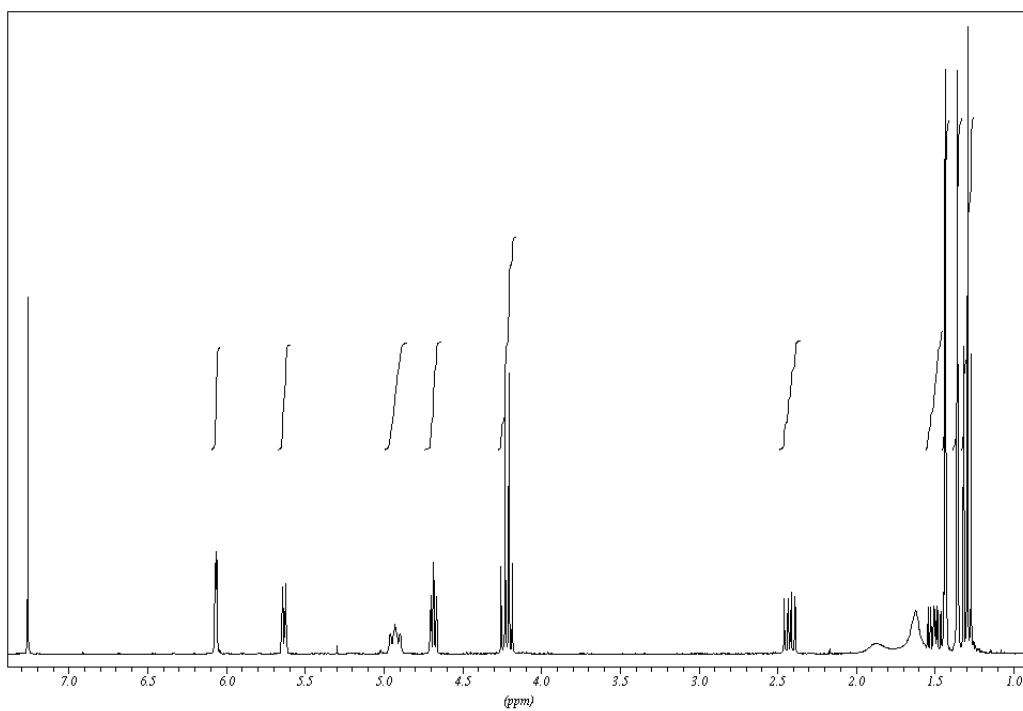
6.07 (H-C(9')) → 5.63 (H-C(5')) : 0.5%

6.07 (H-C(9')) → 4.93 (H-C(7')) : 1.6%

ESI+-TOF-MS: berechnet für C₁₂H₁₈O₅Na: 265.1051 ; gefunden: 265.1050

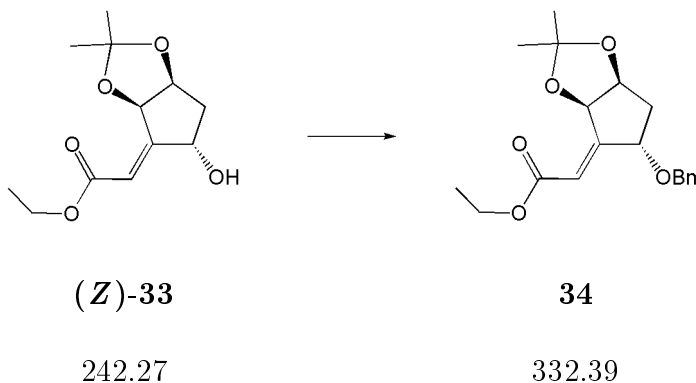


$^1\text{H-NMR}$ von **(E)-33**



$^1\text{H-NMR}$ von **(Z)-33**

(*Z*, 1'S, 5'R, 7'S)-2-(3',3'-Dimethyl-2',4'-dioxo-7'-benzyloxybicyclo-[3.3.0]oct-6'-yliden)-essigsäureethylester
34



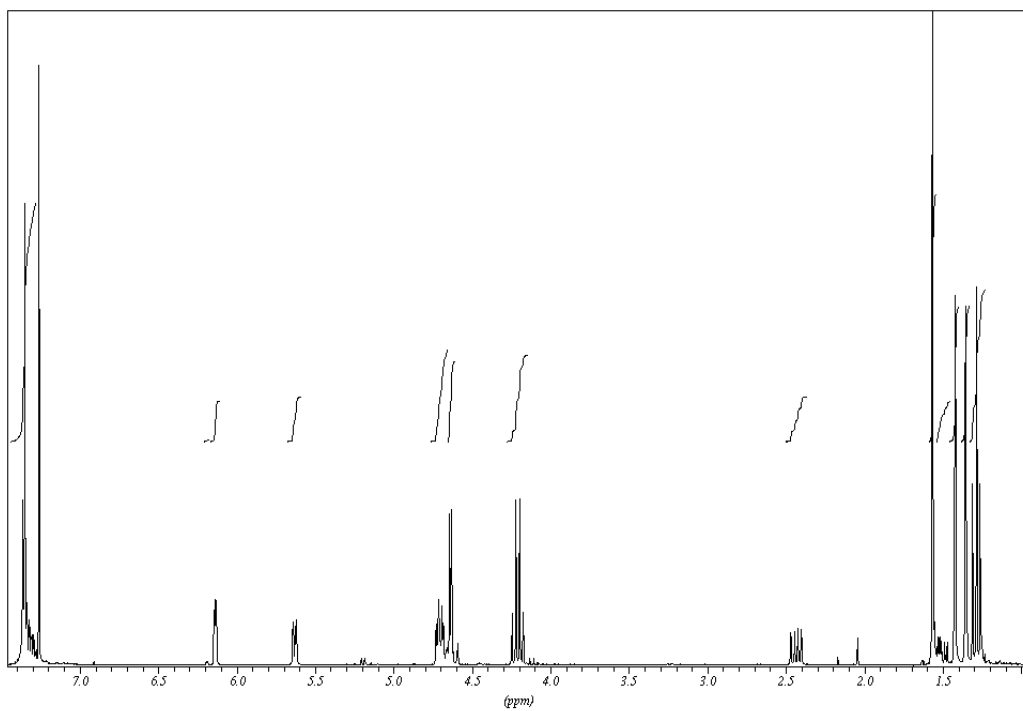
Zu einer Lösung von 5.50 g (22.7 mmol) Alkohol (*Z*)-**33** in 94 ml trockenem DMF wurden 11.0 ml Benzylbromid und 10.86 g (46.86 mmol) Silber(I)-oxid gegeben. Nach 3.5h Rühren bei RT und vor Licht geschützt wurden 1.05 g NaH (60%, 26.3 mmol) zugegeben und weitere 15h gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit EtOH (~ 50 ml) gequench, über Celite filtriert, mit ges. NH₄Cl-Lösung (2 x 150 ml), ges. NaCl-Lösung (2 x 150 ml) und Wasser (150 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und eingeeengt. Nach Reinigung mittels FC (EtOAc / Hexan 1:8) erhielt man 6.71 g (89%) **34** als farbloses Öl.

DC (Hexan / EtOAc 2:1): $R_f = 0.45$

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 1.29 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, CH₃-CH₂), 1.36, 1.42 (2s, 6H, CH₃-C(3')), 1.44-1.56 (m, 1H, H-C(8')), 2.43 (dd, $J = 7.3, 13.4$ Hz, 1H, H-C(8')), 4.21 (q, $J = 7.0$, 2H, CH₂-CH₃), 4.62-4.74 (m, 4H, H-C(1'), H-C(7'), CH₂-Ph), 5.63 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, H-C(5')), 6.14 (dd, $J = 1.3, 2.3$ Hz, 1H, H-C(2))

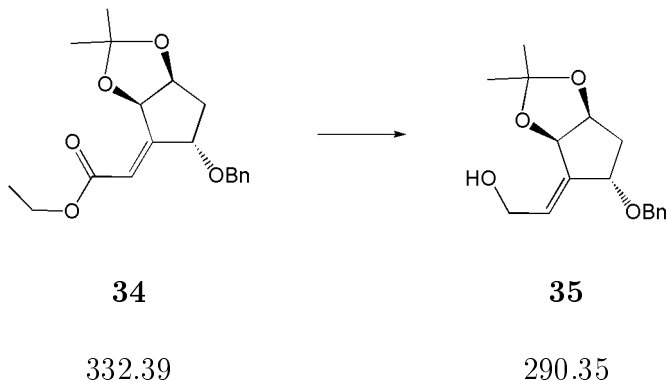
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 14.20 (t, CH₃-CH₂), 24.05, 26.38 (2q, CH₃-C(3')), 34.81 (t, C(8')), 60.28 (t, CH₂), 72.33 (t, CH₂-Ph), 75.37 (d, C(5')), 76.75 (d, C(1')), 78.09 (d, C(7')), 110.55 (s, C(3')), 117.11 (d, C(2)), 127.59, 127.83, 128.46, 137.87 (4d, aryl-C), 159.27 (s, C(6')), 165.58 (s, C(1))

ESI+-TOF-MS: berechnet für C₁₉H₂₄O₅Na: 335.1521 ; gefunden: 335.1512



$^1\text{H-NMR}$ von **34**

(*Z*, 1'*S*, 5'*R*, 7'*S*)-2-(3',3'-Dimethyl-2',4'-dioxo-7'-benzyloxybicyclo-[3.3.0]oct-6'-yliden)-ethanol **35**



Zu einer auf -78°C gekühlten Lösung von 6.71 g (20.2 mmol) **34** in abs. Diethylether gab man portionenweise 2.20 g (58.0 mmol) Lithiumaluminiumhydrid und liess unter Rühren während 5h auf -40°C erwärmen. Anschliessend wurde mit EtOAc (100 ml) gequenchet und über Celit filtriert (mit 150 ml EtOAc gespült). Die Lösung wurde mit ges. NH_4Cl -Lösung (2 x 300 ml) und ges. NaCl-Lösung (2 x 200 ml) gewaschen, die wässrigen Phasen mit EtOAc (300 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und eingegengt. Eine FC (Hexan / EtOAc 2:1 \rightarrow 1:1) lieferte 4.44 g (76%) **35** als weissen Feststoff.

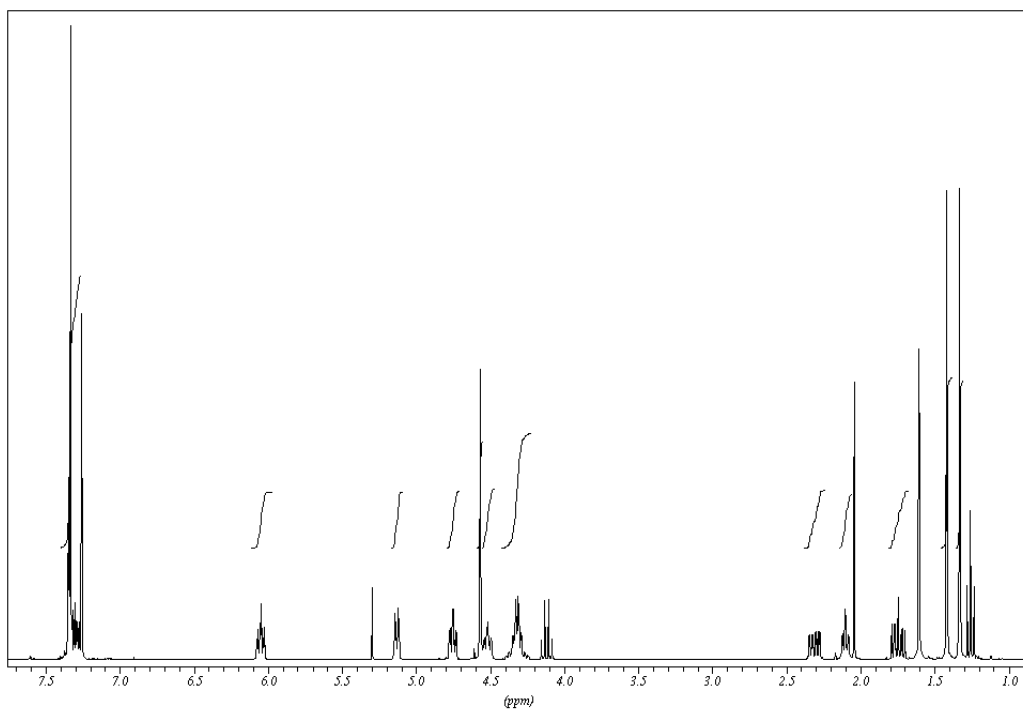
DC (EtOAc): $R_f = 0.52$

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 1.33, 1.42 (2s, 6H, CH_3), 1.75 (ddd, $J = 5.5, 7.9, 13.6$ Hz, 1H, H-C(8')), 2.10 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H, OH) 2.31 (ddd, $J = 2.1, 6.4, 13.8$ Hz, 1H, H-C(8')), 4.23-4.40 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 4.47-4.55 (m, 1H, H-C(7')), 4.75 (dt, $J = 2.1, 5.8$ Hz, 1H, H-C(1')), 5.13 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, H-C(5')), 6.14 (td, $J = 1.7, 6.4$ Hz, 1H, H-C(2)), 7.27-7.40 (m, 5H, aryl-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 24.69, 26.87 (2q, $\text{CH}_3\text{-C}(3')$), 36.69 (t, C(8')), 59.90 (t, C(1)), 71.38 (t, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 76.58 (d, C(5')), 76.82 (d, C(1')), 79.40 (d, C(7')), 111.02 (s, C(3')), 127.60, 127.66, 128.40, 128.61, 137.87 (4d, C(2), aryl-C), 143.34

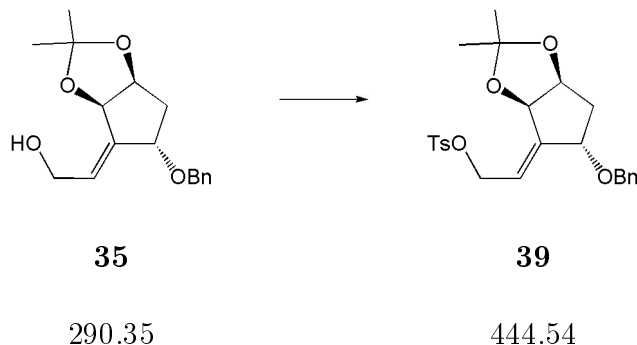
ESI+-MS: 146 (24), 313 (100)

ESI+-TOF-MS: berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_5\text{Na}$: 313.1415 ; gefunden: 313.1424



$^1\text{H-NMR}$ von **35**

(*Z*, 1'*S*, 5'*R*, 7'*S*)-Toluol-4-sulfonsäure-2-(3',3'-dimethyl-2',4'-dioxo-7'-benzyloxybicyclo-[3.3.0]oct-6'-yliden)-ethylester **39**



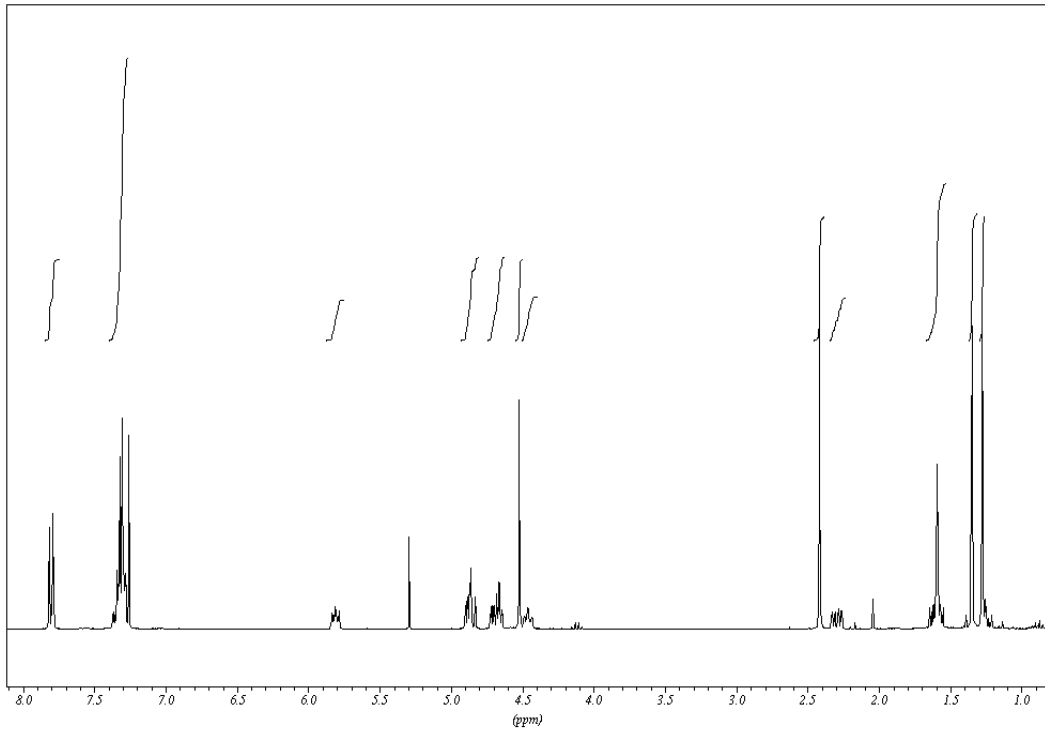
Zu einer auf 0°C gekühlten Lösung von 691 mg (2.38 mmol) **35** und 0.44 ml (3.2 mmol) Et₃N in 4.5 ml abs. CH₂Cl₂ wurden 684 mg (3.59 mmol) Toluol-4-sulfonylchlorid portionenweise zugegeben. Nach 80 min Rühren bei 0°C wurde mit 140 ml tBME gequenchet. Die Lösung wurde mit gekühlter ges. NH₄Cl-Lösung (200 ml), gekühlter ges. NaCl-Lösung (200 ml) und mit gekühltem Wasser (200 ml) gewaschen, die wässrigen Phasen mit EtOAc (300 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und eingedunstet. Eine FC (Hexan / EtOAc 8:1 → 3:1) lieferte 722 mg (68%) **39** als farbloses Öl.

DC (EtOAc): R_f = 0.75

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 1.28, 1.35 (2s, 6H, (CH₃)₂-C(3')), 1.54-1.66 (m, 1H, H-C(8')), 2.30 (ddd, J = 1.0, 6.8, 13.6 Hz, 1H, H-C(8')) 2.42 (s, 3H, CH₃(Ts)), 4.46 (t br, J = 7.9 Hz, 2H, H-C(7')), 4.63-4.73 (m, 2H, H-C(1), H-C(1')), 4.82-4.91 (m, 2H, H-C(1), H-C(5')), 5.77-5.85 (m, 1H, H-C(2)), 7.26-7.38 (m, 7H, aryl-H), 7.77-7.83 (m, 2H, H(Ts))

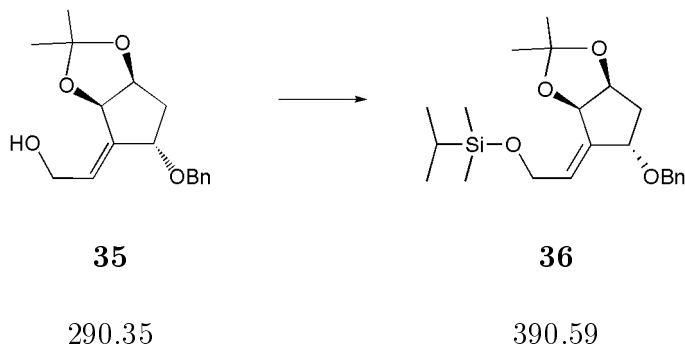
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 21.61 (q, CH₃(Ts)), 24.39, 26.59 (2q, CH₃-C(3')), 36.09 (t, C(8')), 66.73 (t, C(1)), 71.59 (t, CH₂-Ph), 75.91 (d, C(5')), 77.49 (d, C(1')), 78.39 (d, C(7')), 110.91 (s, C(3')), 120.79 (d, C(2)), 127.53, 127.71, 128.00, 128.41, 128.78, 129.78, 133.39, 138.06 (7d, 1s, C(2), aryl-C), 144.70 (s, C(Ts)), 147.10 (s, C(6))

ESI+-TOF-MS: berechnet für C₂₄H₂₉O₆S: 445.1684 ; gefunden: 445.1671



$^1\text{H-NMR}$ von **39**

(Z, 1'S, 5'R, 7'S)-Isopropyl-dimethylsilyl-2-(3',3'-dimethyl-2',4'-dioxo-7'-benzyloxybicyclo-[3.3.0]oct-6'-yliden)-ethylether **36**



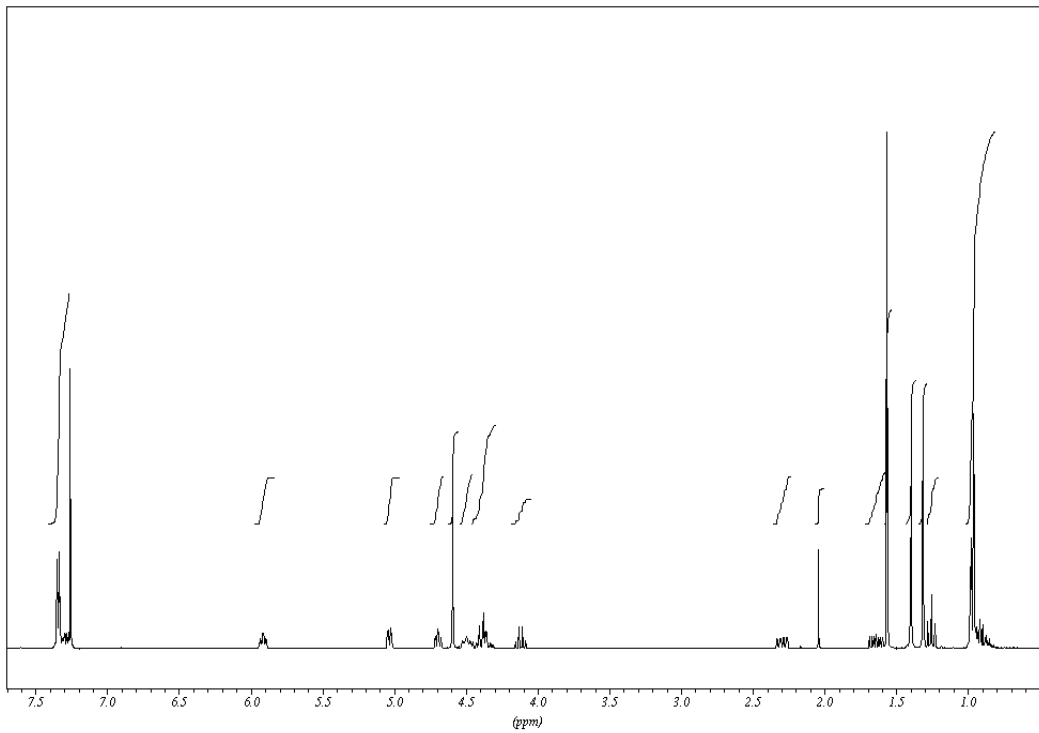
Zu einer Lösung von 240 mg (0.827 mmol) Alkohol **35** in 6 ml CH₂Cl₂ wurden 182 μ l (160 mg, 1.17 mmol) Isopropyl-dimethylchlorsilan und 113 mg (1.66 mmol) Imidazol gegeben. Die Lösung wurde 3h bei RT gerührt, in EtOAc (10 ml) aufgenommen und mit Wasser (15 ml) und ges. NaCl-Lösung (15 ml) gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit tBME extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und eingengt. Eine FC (Hexan / EtOAc 4:1) lieferte 265 mg (82%) **36** als farbloses Öl.

DC (Hexan / EtOAc 1:2): R_f = 0.75

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ /ppm): 0.02-0.10 (m, 6H, CH₃-Si), 0.93-1.01 (m, 7H, (CH₃)₂-CH-Si), 1.32, 1.40 (2s, 6H, (CH₃)₂-C(3')), 1.64 (ddd, J = 5.6, 8.9, 13.6 Hz, 1H, H-C(8')), 2.30 (ddd, J = 1.3, 6.4, 13.6 Hz, 1H, H-C(8')) 4.30-4.46 (m, 2H, H₂-C(1)), 4.46-5.4 (m, 1H, H-C(1')), 4.70 (dt, J = 1.5, 5.8 Hz, 1H, H-C(7')), 5.04 (d, J = 6 Hz, 1H, H-C(2)), 7.26-7.38 (m, 5H, aryl-H)

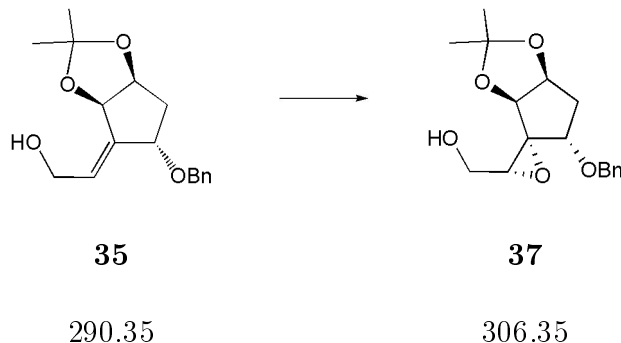
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, δ /ppm): -4.31 (q, CH₃-Si), 14.46 (d, CH-Si), 16.91 (q, CH₃-CH-Si), 24.46, 26.71 (2q, CH₃-C(3')), 36.64 (t, C(8')), 60.06 (t, C(1)), 71.53 (t, CH₂-Ph), 76.58 (d, C(5')), 77.58 (d, C(1')), 78.73 (d, C(7')), 110.45 (s, C(3')), 127.51, 127.54, 128.35, 128.68, 138.49 (1s, 4d, C(2), aryl-C), 140.67 (s, C(6))

ESI+-TOF-MS: berechnet für C₂₂H₃₄O₄NaSi: 413.2124 ; gefunden: 413.2130



$^1\text{H-NMR}$ von **36**

(2S, 1'S, 5'R, 6'S, 7'S)-2-(3',3'-Dimethyl-2',4'-dioxo-7'-benzyloxybicyclo-[3.3.0]oct-6'-yl)-6',2-epoxy-ethanol **37**



Es wurden 168 mg mCPBA (77%, 0.750 mmol) in 0.8 ml CH₂Cl₂ suspendiert und auf 0°C gekühlt. Dazu wurde eine Lösung von 183 mg (0.630 mmol) **35** in 0.8 ml CH₂Cl₂ langsam zugegeben. Man liess unter Rühren während 3h auf RT erwärmen. Die Suspension wurde in tBME (60 ml) aufgenommen, mit 10% Na₂S₂O₃ aq. (2 x 60 ml), ges. NaHCO₃-Lösung (2 x 60 ml) und ges. NaCl-Lösung (60 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und eingengt. Eine FC (Hexan / EtOAc 2:1) ergab 176 mg (89%) **37**² als farbloses Öl.

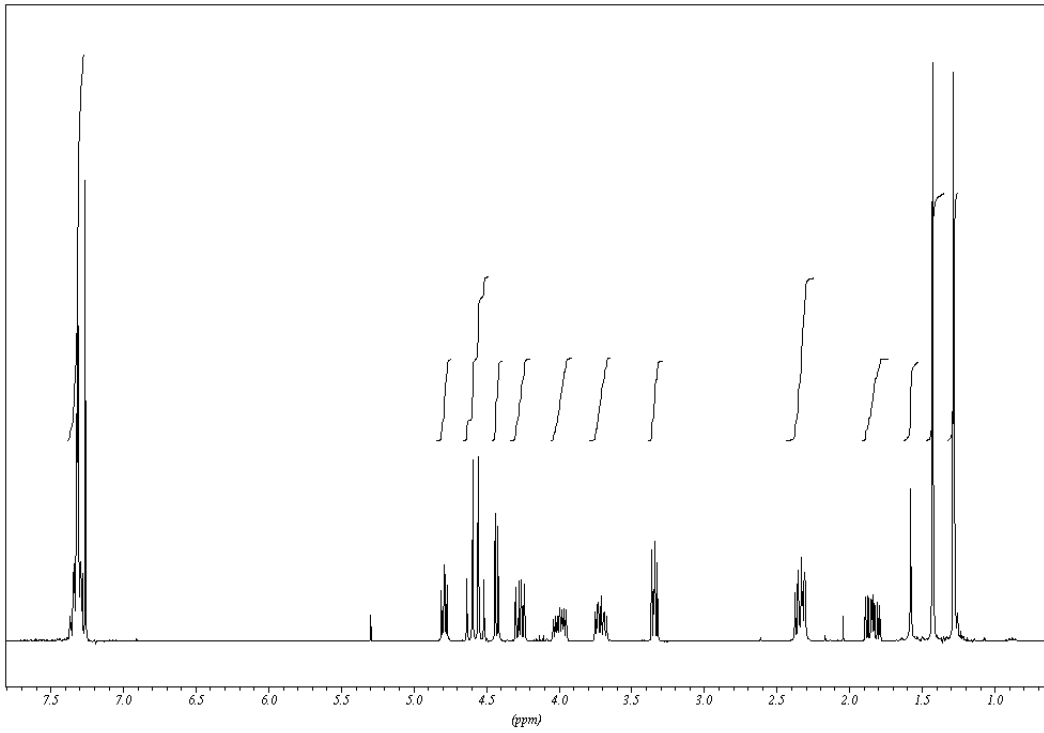
DC (EtOAc): R_f = 0.59

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 1.28, 1.43 (2s, 6H, (CH₃)₂-C(3')), 1.78-1.90 (m, 1H, H-C(8')), 2.28-2.39 (m, 2H, H-C(8')), OH) 3.34 (d, J = 5.3, 6.4 Hz, 1H, H₂-C(2)), 3.66-3.77, 3.93-4.05 (2m, 2H, H₂-C(1)), 4.27 (dd, J = 6.4, 11.1 Hz, 1H, H-C(7')), 4.43 (d, J = 6.2 Hz, 1H, H-C(5')), 4.54, 4.61 (2d, J = 12 Hz, CH₂-Ph), 4.75-4.82 (m, 1H, H-C(1')), 7.26-7.38 (m, 5H, aryl-H)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 23.68, 26.10 (2q, CH₃-C(3')), 35.01 (t, C(8')), 56.86 (d, C(2)), 62.30 (d, C(1)), 67.93 (s, C(6')), 72.64 (t, CH₂-Ph), 73.84 (d, C(7')), 76.24 (d, C(1')), 80.67 (d, C(5')), 110.90 (s, C(3')), 127.75, 127.84, 128.41 (3d, aryl-C), 137.79 (s, aryl-C)

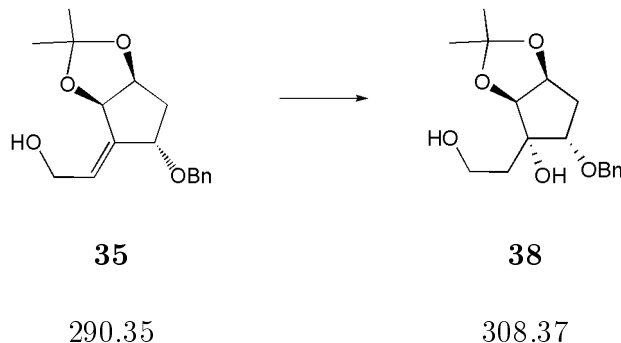
ESI+-TOF-MS: berechnet für C₁₇H₂₂O₅Na: 329.1364 ; gefunden: 329.1355

¹Die Beschreibung der Stereokonfiguration der Epoxidgruppe beruht auf der tentativen Zuordnung beim Produkt **38** und ist somit nicht gesichert (siehe Kap. 3.4).



$^1\text{H-NMR}$ von **37**

(1'S, 5'R, 6'S, 7'S)-2-(3',3'-Dimethyl-2',4'-dioxo-7'-benzyloxybicyclo-[3.3.0]oct-6'-yl)-6'-hydroxy-ethanol **38**



Es wurden 17 mg (0.27 mmol) Natriumcyanoborhydrid zu einer Lösung von 30 mg (0.10 mmol) **37** in 0.3 mg THF gegeben, die ein wenig Bromkresolgrün enthielt. Durch Zugabe von 2 Tropfen ($\sim 25 \mu\text{l}$, 0.23 mmol) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ schlug der Indikator von grün nach gelb um. Nachdem er wieder nach grün umgeschlagen hatte, gab man weitere 0.2 ml (1.8 mmol) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ zu. Nach 2d Rühren bei RT gab man 10 mg (0.16 mmol) Natriumcyanoborhydrid zu und liess weitere 2d rühren. Die Reaktionslösung wurde mit ges. NaHCO_3 -Lösung gequenchet und in EtOAc (10 ml) aufgenommen. Es wurde mit ges. NaHCO_3 -Lösung (10 ml) gewaschen und diese mit EtOAc (10 ml) rückextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und eingeeht. Eine FC (Hexan / EtOAc 2:1) lieferte 7 mg eine Mischfraktion von Edukt und Produkt, aus der man mittels präparativem DC (4 x mit Hexan / EtOAc 3:1 laufen gelassen) 5 mg (16%) **38**¹ erhielt.

DC (EtOAc): $R_f = 0.49$

¹H-NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 1.28, 1.39 (2s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{-C}(3')$), 1.85-1.95 (m, 2H, H-C(8'), H-C(2)), 2.02 (ddd, $J = 4.5, 8.2, 14.7$ Hz, 1H, H-C(2)) 2.21 (dd, $J = 6.5, 13.3$ Hz, 1H, H-C(8')), 2.77 (br, 1H, OH), 3.80-3.89 (m, 2H, H-C(1), H-C(7')), 3.89-3.97 (m, 1H, H-C(1)), 4.34 (d, $J = 4.6$ Hz, H-C(5')), 4.54, 4.63 (2d, $J = 8.6, 1\text{H}$, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.74 (t, $J = 4.4$ Hz, 1H, H-C(1')) 7.28-7.39 (m, 5H, aryl-H)

Differenz-NOE (400 MHz, CDCl_3):

2.03 (H-C(2)) \rightarrow 3.85 (H-C(7')) : 3.8%

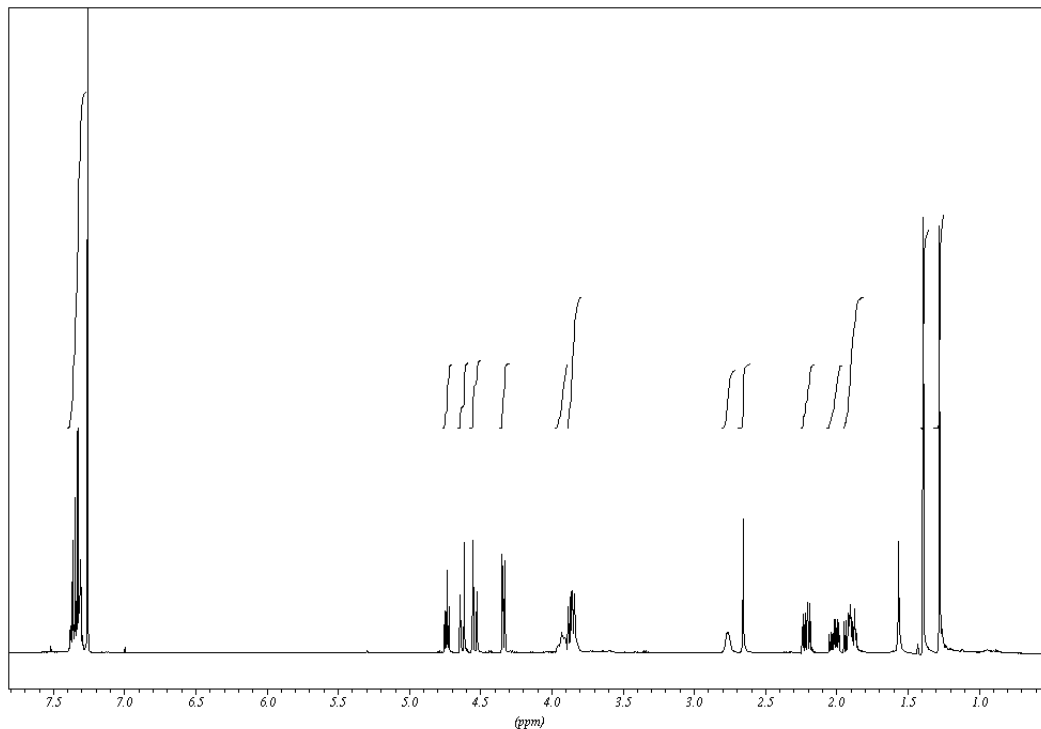
2.03 (H-C(2)) \rightarrow 3.34 (H-C(5')) : 0.4%

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl_3 , δ/ppm): 23.70, 26.18 (2q, $\text{CH}_3\text{-C}(3')$), 34.23 (t, C(2)), 36.31 (t, C(8')), 59.49 (d, C(1)), 72.48 (t, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 77.07 (d, C(1')),

¹tentative Zuordnung der Stereokonfiguration am C-6' aus NOE-Spektren (siehe Kap. 3.4)

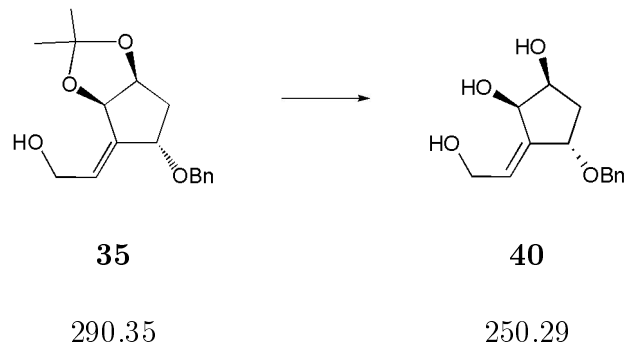
81.41 (s, C(6')), 81.71 (d, C(7')), 82.90 (d, C(5')), 109.88 (s, C(3')), 127.82, 128.05, 128.52 (3d, aryl-C), 137.55 (s, aryl-C)

ESI+-TOF-MS: berechnet für C₁₇H₂₅O₅: 309.1701 ; gefunden: 309.1706



¹H-NMR von **38**

(Z, 1'S, 2'R, 4'S)-2-(1',2'-dihydroxy-4'-benzyloxy-cyclopent-3'-yliden)-ethanol 40



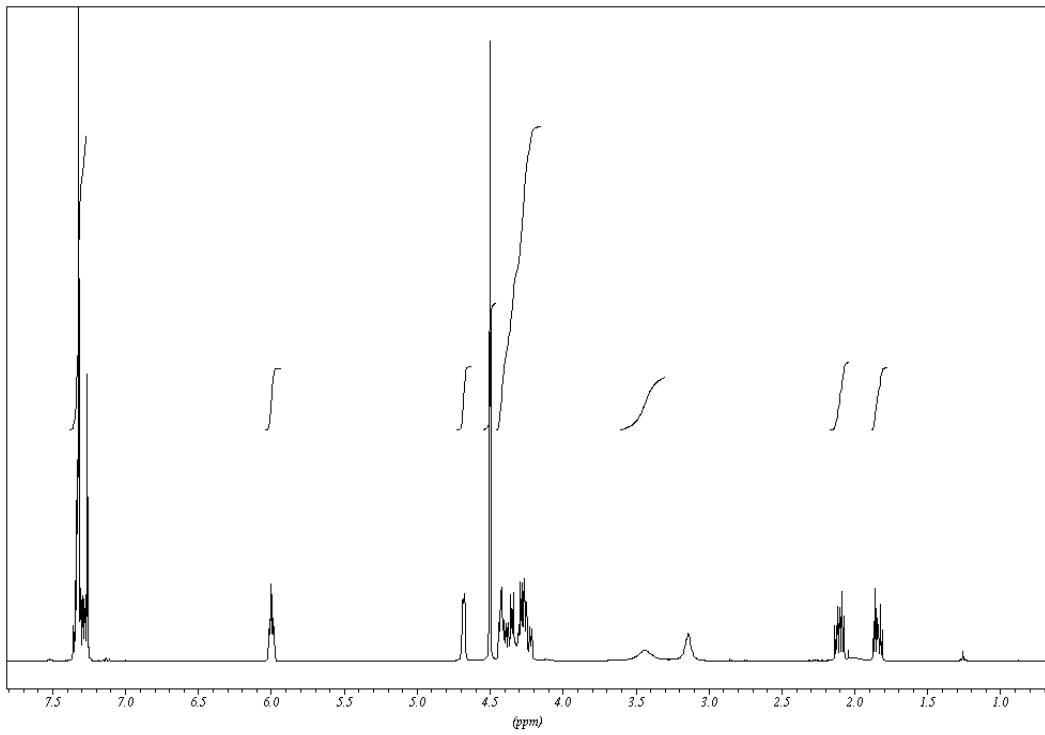
Zu 616 mg (2.12 mmol) **35** wurden 12 ml Essigsäure (80% aq.) gegeben und 44h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 3M NaOH (~ 50 ml) neutralisiert und mit EtOAc (6 x 100 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und eingengt. Eine FC (EtOAc) ergab 292 mg (56%) **40** als weissen Feststoff.

DC (EtOAc): R_f = 0.17

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 1.85 (td, J = 5.4, 13.2 Hz, 1H, H-C(5')), 2.10 (td, J = 5.9, 13.2 Hz, 1H, H-C(5')) 3.14 (br, 1H, OH), 3.44 (br, 1H, OH), 4.20-4.45 (m, 5H, H₂-C(1), H-C(1'), H-C(4'), OH), 4.50 (s, 2H, H₂C-Ph), 4.68 (d br, J = 3.5 Hz, 1H, H-C(2')), 5.97-6.03 (m, 1H, H-C(2)), 7.25-7.37 (m, 5H, aryl-H)

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃, δ/ppm): 37.15 (t, C(5')), 60.00 (t, C(1)), 70.78 (t, CH₂-Ph), 71.12 (d, C(2')), 71.32 (d, C(1')), 78.92 (d, C(4')), 127.76, 127.82, 128.46 (3d, aryl-C), 129.97 (d, C(2)), 138.13 (s, aryl-C), 145.06 (s, C(3'))

ESI+-TOF-MS: berechnet für C₁₄H₁₈O₄Na: 273.1102 ; gefunden: 273.1101



$^1\text{H-NMR}$ von **40**

Abkürzungen und Symbole

abs.	absolutiert
Ac	Acetyl
Bn	Benzyl
Bu	Butyl
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
BSA	<i>N, O</i> -Bis-(trimethylsilyl)-acetamid
10-CSA	(+)-Campher-10-sulfonsäure
Cy	Cyclohexan
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7en
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMPU	Dimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2(1H)-pyrimidinon
DNP	2,4-Dinitrophenylhydrazin
d	Tag
ee	enantiomeric excess
eq.	Äquivalente
EtOH	Ethanol
Et ₃ N	Triethylamin
Et ₂ O	Diethylether
EtOAc	Essigäureethylester
FC	Flash-Chromatographie
fs	Femtosekunde
GC	Gas-Chromatographie
DC	Dünnschichtchromatographie
DIAD	Azodicarbonsäure-diisopropylester
PPh ₃	Triphenylphosphin
PPTS	Pyridinum- <i>p</i> -Toluolsulfonsäure
ppm	Parts per million
DBU	Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DMF	Dimethylformamid
DMP	Dess-Martin Periodinan (1,1,1-Tris(acetyloxy)-1,1-dihydro-1,2-benziodoxol-3(1H)-on
ps	Picosekunde

h	Stunde
Hz	Hertz
IBX	2-Iodoxybenzeoesäure
IPDMS	Isopropyldimethylsilan
J	Kopplungskonstante
K	Kelvin
konz.	konzentriert
LAH	Lithiumaluminiumhydrid
LSM	Lösungsmittel
min	Minuten
mCPBA	<i>meta</i> -Chlor-perbenzoesäure
MeOH	Methanol
NOE	Nuclear Overhauser Effect
<i>n</i> BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
<i>sec</i> BuLi	<i>sec</i> -Butyllithium
Ph	Phenyl
RT	Raumtemperatur
Temp.	Temperatur
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
tBME	<i>tert</i> -Butylmethylether
THF	Tetrahydrofuran
Ts	Tosyl; Toluol-4-sulfonyl

Literaturverzeichnis

- [1] Avery, O. T.; MacLeod, C. M.; McCarty, M. *J. Exp. Med.*, **1944**, *79*, 137–58.
- [2] Watson, J. D.; Crick, F. H. C. *Nature*, **1953**, *171*, 737–8.
- [3] His, W. *Die Histochemischen und Physiologischen Arbeiten von Friedrich Miescher*. F. C. W. Vogel, Leipzig, 1897.
- [4] Signer, R.; Caspersson, T.; Hammarsten, E. *Nature*, **1938**, *141*, 122.
- [5] Elmore, D. T.; Todd, A. R. *J. Chem. Soc.*, **1952**, pp 3681–6.
- [6] Hayes, D. H.; Michelson, A. M.; Sir Todd, A. R. *J. Chem. Soc.*, **1955**, pp 808–15.
- [7] Voet, D.; G., V. J. *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., 2nd edition, 1995.
- [8] Chargaff, E. *Federation Proceedings*, **1951**, *10*, 654–59.
- [9] Astbury, W. T.; Bell, F. O. *Nature*, **1938**, *141*, 747–8.
- [10] Franklin, R. E.; Gosling, R. G. *Acta Cryst.*, **1953**, *6*, 678–85.
- [11] Franklin, R. E.; Gosling, R. G. *Acta Cryst.*, **1953**, *6*, 673–7.
- [12] Franklin, R. E.; Gosling, R. G. *Nature*, **1953**, *172*, 156–7.
- [13] Jacob, F.; Monod, J. *J. Mol. Biol.*, **1961**, *3*, 318–56.
- [14] Crick, F. H. C. *Nature*, **1970**, *227*, 561–3.
- [15] Khorana, H. G. *Federation Proceedings*, **1965**, *24*, 1473–87.
- [16] Nirenberg, M. W.; Matthaei, J. H.; Jones, O. W.; Martin, R. G.; Barondes, S. H. *Federation Proceedings*, **1963**, *22*, 55–61.
- [17] Holley, R. W.; Apgar, J.; Everett, G. A.; Madison, J. T.; Marquisee, M.; Merrill, S.; Penswick, J. R.; A., Z. *Science*, **1965**, *147*, 1462.

- [18] Sanger, F.; Coulson, A. R. *J. Mol. Biol.*, **1975**, *94*, 441–8.
- [19] Matteucci, M. D.; Caruthers, M. H. *Tetrahedron Lett.*, **1981**, *21*, 719.
- [20] Blackburn, G. M.; Gait, M. J. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*. Oxford University Press, 2nd edition, 1996.
- [21] Saenger, W. *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer-Verlag, New York, 1984.
- [22] Hillier, L. W. e. a. *Nature*, **2005**, *434*, 724–731.
- [23] Consortium, I. H. G. S. *Nature*, **2004**, *431*, 931–945.
- [24] Stephenson, M. L.; Zamecnik, P. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1978**, *75*, 285–8.
- [25] Zamecnik, P. C.; Stephenson, M. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1978**, *75*, 280–4.
- [26] Kurreck, J. *Eur. J. Biochem.*, **2003**, *270*, 1628–1644.
- [27] Tarköy, M.; Bolli, M.; Schweizer, B.; Leumann, C. *Helv. Chim. Acta*, **1993**, *76*, 481.
- [28] Cram, D. J. *CHEMTECH*, **1987**, *17*, 120–5.
- [29] Boehringer, M.; Roth, H. J.; Hunziker, J.; Goebel, M.; Krishnan, R.; Giger, A.; Schweizer, B.; Schreiber, J.; Leumann, C.; Eschenmoser, A. *Helv. Chim. Acta*, **1992**, *75*, 1416–77.
- [30] Otting, G.; Billeter, M.; Wuethrich, K.; Roth, H. J.; Leumann, C.; Eschenmoser, A. *Helv. Chim. Acta*, **1993**, *76*, 2701–56.
- [31] Lescrinier, E.; Esnouf, R.; Schraml, J.; Busson, R.; Heus, H. A.; Hilbers, C. W.; Herdewijn, P. *Chemistry & Biology*, **2000**, *7*, 719–731.
- [32] Vandermeeren, M.; Preveral, S.; Janssens, S.; Geysen, J.; Saison-Behmoaras, E.; Van Aerschot, A.; Herdewijn, P. *Biochem. Pharmacol.*, **2000**, *59*, 655–663.
- [33] Gu, P.; Schepers, G.; Griebel, C.; Rozenski, J.; Gais, H.-J.; Herdewijn, P.; Van Aerschot, A. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, **2005**, *24*, 993–998.
- [34] Koshkin, A. A.; Singh, S. K.; Nielsen, P.; Rajwanshi, V. K.; Kumar, R.; Meldgaard, M.; Olsen, C. E.; Wengel, J. *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 3607–3630.

- [35] Obika, S.; Nanbu, D.; Hari, Y.; Andoh, J.-I.; Morio, K.-I.; Doi, T.; Imanishi, T. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 5401–5404.
- [36] Bondensgaard, K.; Petersen, M.; Singh, S. K.; Rajwanshi, V. K.; Kumar, R.; Wengel, J.; Jacobsen, J. P. *Chem.–Eur. J.*, **2000**, *6*, 2687–2695.
- [37] Nielsen, K. E.; Rasmussen, J.; Kumar, R.; Wengel, J.; Jacobsen, J. P.; Petersen, M. *Bioconjugate Chem.*, **2004**, *15*, 449–457.
- [38] Sorensen, J. J.; Nielsen, J. T.; Petersen, M. *Nucleic Acids Res.*, **2004**, *32*, 6078–6085.
- [39] Wahlestedt, C.; Salmi, P.; Good, L.; Kela, J.; Johnsson, T.; Hokfelt, T.; Broberger, C.; Porreca, F.; Lai, J.; Ren, K.; Ossipov, M.; Koshkin, A.; Jakobsen, N.; Skouv, J.; Oerum, H.; Jacobsen, M. H.; Wengel, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2000**, *97*, 5633–5638.
- [40] Fluiter, K.; ten Asbroek, A. L. M. A.; de Wissel, M. B.; Jakobs, M. E.; Wissenbach, M.; Olsson, H.; Olsen, O.; Oerum, H.; Baas, F. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 953–962.
- [41] Jepsen, J. S.; Sorensen, M. D.; Wengel, J. *Oligonucleotides*, **2004**, *14*, 130–146.
- [42] Grunweller, A.; Eliza, W.; Birgit, B.; Ricarda, J.; A, E. V.; Jens, K. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 3185–93.
- [43] Steffens, R.; Leumann, C. *Helv. Chim. Acta*, **1997**, *80*, 2426–2439.
- [44] Steffens, R.; Leumann, C. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 11548–11549.
- [45] Renneberg, D.; Leumann, C. J. *ChemBioChem*, **2004**, *5*, 1114–1118.
- [46] Renneberg, D.; Leumann, C. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 5993–6002.
- [47] Renneberg, D.; Bouliong, E.; Reber, U.; Schumperli, D.; Leumann, C. J. *Nucleic Acids Res.*, **2002**, *30*, 2751–2757.
- [48] Ittig, D.; Liu, S.; Renneberg, D.; Schuemperli, D.; Leumann, C. J. *Nucleic Acids Res.*, **2004**, *32*, 346–353.
- [49] Homans, S. W. *Biochemistry*, **1990**, *29*, 9110–18.
- [50] Weiner, P. K.; Kollman, P. A. *J. Comput. Chem.*, **1981**, *2*, 287–303.
- [51] Weiner, S. J.; Kollman, P. A.; Nguyen, D. T.; Case, D. A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1986**, *7*, 230–52.

- [52] Yang, L.; Tan, C.-H.; Hsieh, M.-J.; Wang, J.; Duan, Y.; Cieplak, P.; Caldwell, J.; Kollman, P. A.; Luo, R. *J. Phys. Chem. B*, **2006**, *110*, 13166–13176.
- [53] Amber home page. <http://amber.scripps.edu>.
- [54] Rozenberg, H.; Rabinovich, D.; Frolow, F.; Hegde, S.; Shakked, Z. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1998**, *95*, 15194–9.
- [55] Berman, H. M.; Olson, W. K.; Beveridge, D. L.; Westbrook, J.; Gelbin, A.; Demeny, T.; Hsieh, S. H.; Srinivasan, A. R.; Schneider, B. *Biophys. J.*, **1992**, *63*, 751–9.
- [56] Raaijmakers, H.; Suck, D.; Mayer, C. Crystal structure analysis of the a-dna dodecamer gaccacgtggtc. NDB ID: ad0005, 1999.
- [57] Hvilsted, S.; Kops, J. *Macromolecules*, **1979**, *12*, 889–95.
- [58] Ghosh, A. K. e. a. *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 3278–90.
- [59] Nicolaou, K. C.; Prasad, C. V. C.; Somers, P. K.; Hwang, C.-K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 14.
- [60] Biggadike, K.; Borthwick, A. D.; Evans, D.; Exall, A. M.; Kirk, B. E.; Roberts, S. M.; Stephenson, L.; Youds, P. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1988**, pp 549–54.
- [61] Bisacchi, G. S.; Chao, S. T.; Bachard, C.; Daris, J. P.; Innaimo, S.; Jacobs, G. A.; Kocy, O.; Lapointe, P.; Martel, A.; et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, *7*, 127–132.
- [62] Ludek, O. R.; Meier, C. *Synthesis*, **2003**, pp 2101–2109.
- [63] Darses, S.; Michaud, M.; Genêt, J.-P. *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, pp 1875–83.
- [64] Rawal, V. H.; Rao, J. A.; Cava, M. P. *Tetrahedron Lett.*, **1985**, *26*, 4275–78.
- [65] Brückner, R. *Tetrahedron Lett.*, **1988**, *29*, 5747–5750.
- [66] Maloney Huss, K. E. *Synth. Commun.*, **1985**, *15*, 273–77.
- [67] Herczegh, P.; Kovacs, I.; Szilagy, L.; Sztaricskai, F. *Tetrahedron*, **1994**, *50*, 13671–86.
- [68] Stork, G.; West, F.; Lee, H. Y.; Isaacs, R. C. A.; Manabe, S. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 10660–61.
- [69] Takano, S.; Kurotaki, A.; Takahashi, M.; Ogasawara, K. *Synthesis*, **1986**, *1986*, 403–6.

- [70] Marshall, J. A.; Trometer, J. D.; Cleary, D. G. *Tetrahedron*, **1989**, *45*, 391–402.
- [71] Julia, M.; Uguen, D.; Zhang, D. *Aust. J. Chem.*, **1995**, *48*, 279–290.
- [72] Pelter, A.; Ward, R. S.; Little, G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1990**, *10*, 2775–2790.
- [73] Brückner, R. *Stereoselektive Synthese eines C14-C20-Bausteins für das Polyol-Antibiotikum Amphotericin B*. Habilitation, Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg, 1989.
- [74] Brückner, R. *Chem. Ber.*, **1989**, *122*, 193–198.
- [75] Gampe, D.; Jacob, K.; Thiele, K. H. *Zeitschrift fuer Chemie*, **1985**, *25*, 151–2.
- [76] Howarth N. M., W. D. M. Wakelin L. P. G. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 695–698.
- [77] Shealy, Y. F.; O'Dell, C. A.; Thorpe, M. C. *J. Heterocycl. Chem.*, **1981**, *18*, 383–9.
- [78] Sauter, G.; Stulz, E.; Leumann, C. *Helv. Chim. Acta*, **1998**, *81*, 14–34.
- [79] Frost, C. G.; Howarth, J.; Williams, J. M. J. *Tetrahedron: Assymetry*, **1992**, *3*, 1089–1122.
- [80] Hildbrand, S.; Troxler, T.; Scheffold, R. *Helv. Chim. Acta*, **1994**, *77*, 1236.
- [81] Fiaud, J. C.; Legros, J. Y. *J. Org. Chem.*, **1987**, *52*, 1907–11.
- [82] Epple, C. *Synthese und Eigenschaften von Bizylo[3.2.1]-DNA: Ein DNA-Analogon mit starrem Zuckerphosphat-Rückgrat und flexiblem Basenpaarungsbereich*. PhD thesis, Universität Bern, 1997.
- [83] Mori, S.; Ohno, T.; Harada, T. H. Aoyama; Shioiri, T. *Tetrahedron*, **1991**, *47*, 5051–5070.
- [84] Hudlicky, T.; Rouden, J.; Luna, H.; Allen, S. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 5099–107.
- [85] Sinha, S. C.; Keinan, E. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 3653–3654.
- [86] Nicolaou, K. C.; Xu, J.; Murphy, F.; Barluenga, S.; Baudoin, O.; Wei, H.; Gray, D. L. F.; Ohshima, T. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *38*, 2448.

- [87] Meier, R. *Aminofunktionalisierte Bicyclo-DNA: Synthese eines Aminobicyclo-Nukleosids enthaltend die Base Thymin, dessen Einbau in Oligonukleotide sowie Paarungseigenschaften*. PhD thesis, Universität Bern, 1997.
- [88] Du, J.; Wang, G. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, **2000**, *19*, 867–879.
- [89] Taber, D. F.; Houze, J. B. *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 4004–4006.
- [90] Hanessian, S.; Yang, Y.; Giroux, S.; Mascitti, V.; Ma, J.; Raepfel, F. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 13784.
- [91] Müller, R.; Keese, R.; Pfaltz, A. *Grundoperationen der präparativen organischen Chemie*. Juris Druck & Verlag AG, Zürich, 1988.

Lebenslauf

Tino Boss

Geboren am 25. November 1976

Heimatort: Seftigen (BE), Schweiz

1991 – 1996 Realgymnasium Bern-Kirchenfeld.

1996 – 2001 Chemiestudium an der Universität Bern.

Diplomarbeit in organischer Chemie unter der Leitung von PD.
Dr. J. Hunziker mit dem Titel "Synthese von potentiellen Inhibi-
toren der DNA-Glucosidase von Trypanosomen"

Seit 2001 Doktorarbeit an der Universität Bern unter Leitung von Prof.
Dr. Ch. L. Leumann