



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 197 41 739 B4** 2006.04.27

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **197 41 739.6**
(22) Anmeldetag: **22.09.1997**
(43) Offenlegungstag: **01.04.1999**
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **27.04.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C07D 473/00** (2006.01)

C07D 473/18 (2006.01)

C07D 473/32 (2006.01)

C07D 473/34 (2006.01)

C07D 221/22 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 2 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:

Nanogen Recognomics GmbH, 60311 Frankfurt, DE

(74) Vertreter:

Ackermann, J., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 60313 Frankfurt

(72) Erfinder:

Miculka, Christian, Dr., 65929 Frankfurt, DE;
Windhab, Norbert, Dr., 65795 Hattersheim, DE;
Eschenmoser, Albert, Prof. Dr., Küsnacht, CH;
Scherer, Stefan, Dr., 64572 Büttelborn, DE;
Quinkert, Gerhard, Prof. Dr., 61479 Glashütten, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:

US 53 82 580 A

EP 04 68 352 A2

VERHEGGEN, Ilse, et.al.: Synthesis and Antiherpes

Virus Activity of 1,5-Anhydrohexitol Nucleosides.

In: J. Med. Chem. 1993, 36, S.2033-2040;

IODOLACTAMIZATION:

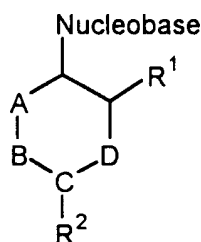
8-exo-iodo-2-azabicyclo[3.3.0]

OCTAN-3-ONE. In: J. Med. Chem. 36, 1993, S.2033-2040;

Org. Synthesis 70, S.101-109 (1995);

(54) Bezeichnung: **Supramolekulares Paarungssystem, dessen Herstellung und Verwendung**

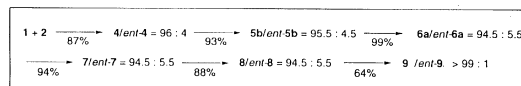
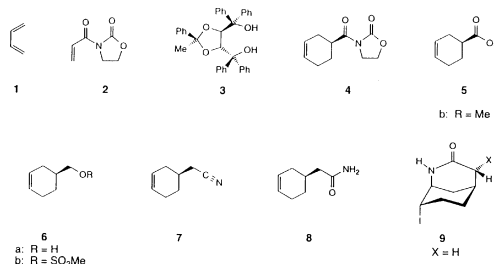
(57) Hauptanspruch: Verbindung der Formel I



(I)

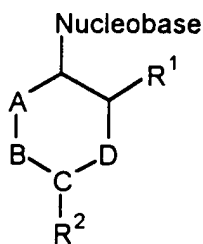
worin R^1 gleich NR^3R^4 , OR^3 oder SR^3 ist mit R^3 und R^4 unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, H oder C_nH_{2n+1} , wobei n gleich eine ganze Zahl von 1-12 ist; R^2 gleich $C_mH_{2m}-C(X)-Y$ mit X gleich =O, =S oder =N ist; Y gleich OR^3 , NR^3R^4 oder SR^3 ist, wobei R^3 und R^4 die oben genannte Bedeutung haben, vorzugsweise ist X gleich NR^3R^4 und OR^3 , insbesondere NR^3R^4 , vor allem NH_2 ; und m eine ganze Zahl von 1-4, oder R^2 gleich $C_mH_{2m}-Z-Y'$ ist mit Z gleich eine Sulfonyl-, Phosphonyl-, Ether- oder Amin-Gruppe, wobei, wenn Z gleich eine Sulfonyl- oder Phosphonyl-Gruppe, Y' gleich H, C_nH_{2n+1} , OR^3 , NR^3R^4 oder SR^3 ist, wobei n, R^3 und R^4 die

oben genannte Bedeutung haben, und, wenn Z gleich eine Ether- oder Amin-Gruppe, Y' gleich C_nH_{2n+1} , ist; A, B und D unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, CR^5R^6 , O, NR^7 oder S bedeuten...



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Verbindung der Formel I



(I),

ihre Herstellung und Verwendung in Paarungs- und/oder Testsystemen.

[0002] Paarungssysteme sind supramolekulare Systeme nicht kovalenter Wechselwirkung, die sich durch Selektivität, Stabilität und Reversibilität auszeichnen, und deren Eigenschaften bevorzugt thermodynamisch, d. h. durch Temperatur, pH-Wert und Konzentration beeinflusst werden. DNA und RNA spielen dabei als Träger der Erbanlagen eine fundamentale Rolle. Solche Paarungssysteme können z. B. aufgrund ihrer selektiven Eigenschaften aber auch als „molekularer Klebstoff für die Zusammenführung von unterschiedlichen Metallclustern zu Cluster-Verbänden mit potentiell neuen Eigenschaften verwendet werden [R. L. Letsinger, et al., Nature, 1996, 382, 607-9; P. G. Schultz et al., Nature, 1996, 382, 609-11].

[0003] Starke und thermodynamisch kontrollierbare Paarungssysteme spielen daher eine immer wichtigere Rolle für die Anwendung im Bereich der Nanotechnologie, zur Herstellung neuer Materialien, Diagnostika, Therapeutika sowie mikroelektronischer, photonischer und optoelektronischer Bauteile und für das kontrollierte Zusammenführen molekularer Species zu supramolekularen Einheiten, wie z. B. den (kombinatorischen) Aufbau von Proteinasssemblies [siehe z. B. A. Lombardi, J. W. Bryson, W. F. DeGrado, Biomoleküls (Pept. Sci.) 1997, 40, 495-504].

[0004] Zur Herstellung derartiger Paarungssysteme besitzen DNA- bzw. RNA-Bausteine jedoch folgende Nachteile:

- a) Die Kräfte, die zwei Stränge zusammenhalten, vor allem Wasserstoffbrücken und Stapel Effekte, sind naturgemäß sehr gering. Solche Duplices weisen daher eine geringe Stabilität auf. Dies kann durch Aufnahme einer sog. Umwandlungskurve und Ermittlung des Umwandlungspunktes leicht festgestellt werden. Folglich sind für die Herstellung von Paarungssysteme relativ lange Einzelstränge notwendig, was zur Folge hat, daß der Anteil des Paarungssystems an der supramolekularen Einheit überwiegt, d. h. die „Nucleotidlast“ ist hoch.
- b) Durch die Ausbildung von Hoogsteen-Paarungen, die alternativ zu Watson-Crick-Paarungen möglich sind, nimmt die Selektivität ab. Damit sind oftmals parallele Duplices oder irreversible Paarungsvorgänge verbunden.
- c) Durch die hohe Flexibilität des Zucker-Phosphat-Rückgrates bilden sich helicale Konformationen, wodurch die räumliche Anordnung in supramolekularen Einheiten weniger gut gesteuert werden kann.
- d) Die chemische Instabilität der Phosphodiesterbindung im Rückgrat läßt nur eine geringe Varianz an physikalischen Bedingungen, wie pH oder Temperatur, für die Verwendung der supramolekularen Einheiten zu.
- e) Die Nuclease-Empfindlichkeit der Produkte führt zu einem nur schwer vermeidbaren, raschen enzymatischen Abbau und damit zur Zerstörung der supramolekularen Einheit.
- f) Eine mögliche Interferenz mit dem genetischen Material biologischer Systeme ist nicht auszuschließen, falls die supramolekularen Einheiten in einem biologischen System zum Einsatz kommen, d. h. eine Orthogonalität des Paarungsvorganges fehlt.
- g) Die Herstellung größerer Mengen an Oligonucleotiden ist aufgrund der geringen Beladbarkeit der üblicherweise verwendeten Festphase beispielsweise im Vergleich zur Peptidsynthese schwierig.
- h) Die Herstellung der nicht-natürlichen L-enantiomeren Form ist durch die schlechte Zugänglichkeit der entsprechend konfigurierten Zuckerbausteine erschwert.

[0005] Damit ist eine Verwendung von DNA- bzw. RNA-Bausteinen z. B. in komplementär gebundenen zwei- und dreidimensionalen supramolekularen Strukturen (siehe z. B. WO96/13522) in einem physiologischen Medium vor allem im Hinblick auf die Punkte e), f) und g) nur schwer zu realisieren.

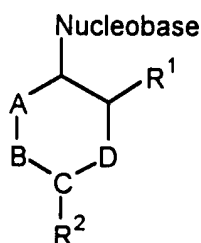
[0006] Eine Alternative zu DNA- bzw. RNA-Bausteinen ist die sogenannte Pyranosyl-RNA (p-RNA). pRNA ist ein Oligonucleotid, das anstelle der Ribofuranose der RNA die Ribopyranose als Zuckerbaustein enthält und daher ausschließlich Watson-Crick-gepaarte, antiparallele, reversibel „schmelzende“, quasi-lineare und stabile Duplices ausbildet. Daneben gibt es auch homochirale p-RNA-Stränge entgegengesetzten Chiralitätssinns, die ebenfalls kontrollierbar paaren und in der gebildeten Duplex nicht streng-helical sind. Diese für den Aufbau supramolekularer Einheiten wertvolle Spezifität hängt mit der relativ geringen Flexibilität des Ribopyranose-phosphat-Rückgrats sowie mit der starken Neigung der Basenebene zur Strangachse und der hieraus folgenden Tendenz zu intercatenarer Basenstapelung im resultierenden Duplex zusammen und lässt sich letztlich auf die Teilnahme eines 2',4'-cisdisubstituierten Ribopyranoserings am Aufbau des Rückgrates zurückführen. p-RNA löst damit einige der beschriebenen Nachteile von DNA und RNA, jedoch nicht die Nachteile gemäß Punkt d), e), g) und h).

[0007] Eine weitere Alternative stellt die Verknüpfung der Monomereinheiten über Amidbindungen, d. h. der Aufbau eines oligomeren Peptids, sogenannten Peptide Nucleic Acids (PNA's), dar.

[0008] PNA's weisen durch ihre offenkettige Struktur eine hohe Flexibilität auf und sind damit hinsichtlich ihrer konformationellen Präorganisation für den kontrollierten Aufbau supramolekularer Systeme nicht geeignet.

[0009] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, Verbindungen bereit zu stellen, die die oben beschriebenen Nachteile nicht aufweisen.

[0010] Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher Verbindungen der Formel I



(I)

worin R^1 gleich NR^3R^4 , OR^3 oder SR^3 ist mit R^3 und R^4 unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, H oder C_nH_{2n+1} , wobei n eine ganze Zahl von 1-12, vorzugsweise 1-8, insbesondere 1-4 ist; vorzugsweise R^1 gleich NR^3R^4 oder OR^3 , insbesondere NR^3R^4 , vor allem NH_2 bedeutet;

R^2 gleich $C_mH_{2m}-C(X)-Y$ ist mit X gleich $=O$, $=S$ oder $=N$; Y gleich OR^3 , NR^3R^4 oder SR^3 , wobei R^3 und R^4 die oben genannte Bedeutung haben; und m eine ganze Zahl von 1-4, insbesondere 1-3, vor allem 1-2; vorzugsweise ist X gleich NR^3R^4 oder OR^3 , insbesondere NR^3R^4 , vor allem NH_2 , und Y ist vorzugsweise gleich OR^3 oder NR^3R^4 ; oder

R^2 gleich $C_mH_{2m}-Z-Y'$ ist mit Z gleich eine Sulfonyl-, Phosphonyl-, Ether- oder Amin-Gruppe, wobei, wenn Z gleich eine Sulfonyl- oder Phosphonyl-Gruppe, Y' gleich H, C_nH_{2n+1} , OR^3 , NR^3R^4 oder SR^3 ist, wobei n, R^3 und R^4 die oben genannte Bedeutung haben, und, wenn Z gleich eine Ether- oder Amin-Gruppe, Y' gleich C_nH_{2n+1} , ist;

A, B und D unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, CR^5R^6 , O, NR^7 oder S bedeuten mit R^5 , R^6 , R^7 unabhängig voneinander H oder C_nH_{2n+1} , wobei n die oben genannte Bedeutung hat; und

C gleich CR^8 oder N bedeutet mit R^8 unabhängig davon die Bedeutung von R^5 , wobei jedoch A-B, B-C oder C-D nicht zwei gleiche Heteroatome bedeuten; und

der Begriff Nucleobase im Sinne der vorliegenden Erfindung Thymin, Uracil, Adenin, Cytosin, Guanin, Isocytosin, Isoguanin, Xanthin oder Hypoxanthin, vorzugsweise Thymin, Uracil, Adenin, Cytosin oder Guanin bedeutet.

[0011] Insbesondere sind Verbindungen bevorzugt, bei denen R^1 gleich NH_2 und R^2 gleich CH_2-COOH ist, vor allem eine [2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-Nucleobase, wie 1-[2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-thymin, 1-[2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-uracil, 1-[2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-cytosin, 9-[2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-adenin oder 9-[2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-guanin.

[0012] Weiterhin ist es vorteilhaft, wenn die erfindungsgemäße Verbindung enantiomerenrein ist.

[0013] Für die Synthese ist es ferner vorteilhaft, wenn R^1 auch mit Schutzgruppen versehen ist, wie z. B. im Falle von R^1 gleich NH_2 mit tert.-Butoxycarbonyl-Gruppen (BOC) oder 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Gruppen (Fmoc) oder im Falle von R^1 gleich OH mit Ether- oder Acetalschutzgruppen. Unter Schutzgruppen versteht man im allgemeinen Reste, die reaktive Gruppen von Verbindungen vor unerwünschten Reaktionen schützen und leicht abspaltbar sind. Derartige Gruppen sind z. B. Benzyloximethyl- (BOM-), BOC-, Fmoc-, Ether- oder Acetalschutzgruppen.

[0014] Daneben kann Y auch mit Aktivierungsreagentien zu reaktiven Intermediaten, z. B. gemischten Anhydriden, umgesetzt sein.

[0015] Vorzugsweise sind die erfindungsgemäßen Verbindungen Cyclohexanderivate, die in 1'-Stellung eine Nucleobase und in 2'-Stellung ein Nucleophil, wie z. B. ein Stickstoffatom tragen, das mit der reaktiven Gruppe in 4'-Stellung bzw. nach deren Aktivierung, wie z. B. miteinander Carbonylfunktion in Reaktion gebracht werden kann, und somit durch Wiederholung dieses Vorgangs in der Lage ist, eine oligomere Struktur aufzubauen. Aus stereochemischer Sicht sind Derivate bevorzugt, bei denen alle Substituenten am Sechsring äquatoriale Positionen aufweisen, insbesondere bei denen die Substituenten in 1'- und 2'-Stellung äquatoriale Positionen aufweisen und vor allem bei denen die Nucleobase eine äquatoriale Position aufweist.

[0016] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können beispielsweise folgendermaßen hergestellt werden.

[0017] Am Anfang wird eine chirogene Diels-Alder-Reaktion zwischen z. B. 1,3-Butadien 1 und z. B. 3-(2-Propenoyl)-1,3-oxazolidin-2-on 2 in Gegenwart chiral, nicht racemischer Promotoren wie das Seebach'sche TAD-DOL 3 (D. Seebach et al., J. Org. Chem. 1995, 60, 1788) durchgeführt (siehe [Fig. 1](#)). 3-(2-Propenoyl)-1,3-oxazolidin-2-on kann beispielsweise durch Umsetzen von Oxazolidin-2-on mit Acrylsäurechlorid in Gegenwart von Kupfer und Kupfer(I)chlorid hergestellt werden. Die Verbindung 5 kann beispielsweise aus 4 in Anwesenheit von Magnesiumspänen und Wasser-freiem Methanol hergestellt werden. Das Reaktionsprodukt wird anschließend z. B. mit Lithiumaluminiumhydrid reduziert, um die Verbindung 6 zu ergeben. Das Acetoniril 7 kann aus 6 z. B. durch Umsetzen mit Methansäurechlorid zum Methansäuremethylester und anschließend durch Umsetzen mit Cyanid hergestellt werden. Eine alkalische Hydrolyse des Reaktionsproduktes ergibt das Essigsäurederivat, welches mit $SOCl_2$ zum Acetylchlorid umgesetzt werden kann, um in Anwesenheit von einer wäßrigen Ammoniaklösung das Acetamid 8 zu ergeben. Anschließend erfolgt dessen Jodlactamisierung (S. Knapp et al., Org. Synth. 1991, 70, 101), zum Jodlactam 9.

[0018] Anschließend kann das Jodlactam 9 in Anwesenheit eines Hydrids an eine Nucleobase gekoppelt werden, ohne daß der Bicyclus zerstört wird.

[0019] Hierzu ist es vorteilhaft, wenn eventuell reaktive Gruppen der Nucleobase durch geeignete Schutzgruppen, z. B. BOC, Fmoc, Acetal usw. geschützt werden. Lediglich beim Diaminopurin als Nucleobase sind Schutzgruppen nicht nötig. Jedoch hat sich gezeigt, daß bei Diaminopurin als Nucleobase der Lactamring nicht mehr geöffnet werden konnte. Unabhängig davon spielt Diaminopurin in biologischen Systemen keine Rolle.

[0020] Weiterhin ist es bevorzugt, wenn das Jodlactam nicht in der racemischen Form, sondern enantiomerenrein vorliegt, da die aufzubauenden Oligomeren, die ein Paarungssystem darstellen sollen, nur einer stereochemischen Reihe angehören sollen. Der Aufbau eines Paarungssystems aus racemischen Bausteinen ist im allgemeinen nicht möglich.

[0021] Gemäß der vorliegenden Erfindung kann ein kopplungsfähiger Pyrimidinbaustein, z. B. ein Thyminbaustein, ausgehend vom Iodlactam 9 in einer fünfstufigen Synthesesequenz in einer Ausbeute von 27 % über alle Schritte hergestellt werden ([Fig. 2](#)): Im ersten Schritt erfolgt die stereoselektive Einführung der Nucleobase in einer Substitutionsreaktion (13a) gefolgt von der Maskierung des aciden Imidprotons des Thymins (13b). Anschließend wird das Lactam durch Einführen einer Schutzgruppe, z. B. der Boc-Gruppe (13c), aktiviert und der Ring nucleophil z. B. mittels $LiOOH$ (14a) geöffnet. Nach Entfernen der beispielsweise vorhandenen BOM-Schutzgruppe ergibt sich mittels katalytischer Hydrierung der gewünschte Baustein (14b).

[0022] Der enantiomorphe (R)-Baustein ent-14b ist durch analoges Vorgehen aus dem (R)-Iodlactam ent-9 erhältlich. Ebenso sind in analoger Weise kopplungsfähige Uracil-, Cytosin- und Isocytosin-Bausteine erhältlich.

[0023] Ein kopplungsfähiger Purinbaustein, z. B. ein Adeninbaustein, ist ausgehend vom Iodlactam 9 in einer siebenstufigen Synthesesequenz in einer Ausbeute von 19 % über alle Schritte zugänglich ([Fig. 3](#)):

Nach Einführung des z. B. N(6)-benzoylierten Adenins in das (S)-Iodlactam 9 unter Retention (15a) erfolge die Umschützung zum z. B. N(6)-Formamidinadeninlactam 15c. Anschließend erfolgt die Aktivierung des Lactams z. B. mittels tert-Butoxycarbonylierung (15d), ein erneutes Umschützen zum z. B. N(6)-anisoylgeschützten Lactam (15f) und nachfolgende Lactamspaltung z. B. mittels LiOH liefert den gewünschten Baustein 16.

[0024] Der enantiomorphe (R)-Baustein ent-16 ist durch analoges Vorgehen aus dem (R)-Iodlactam ent-9 erhältlich. Ebenso sind in analoger Weise kopplungsfähige Guanin-, Isoguanin-, Xanthin- und Hypoxanthin-Bausteine erhältlich.

[0025] Die Herstellung von Heteroatom-enhaltenden Sechsringen sowie anderen Derivaten der erfindungsgemäßen Verbindung sind z. B. analog über eine Hetero-Diels-Alder-Reaktion bzw. über Diels-Alder-Reaktionen mit den entsprechenden Ausgangsverbindungen möglich.

[0026] Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Verbindung mit folgenden Schritten:

- (a) Kopplung des entsprechenden Jodcycloalkans, z. B. eines Jodlactams, vorzugsweise eines enantiomerenreinen Jodcycloalkans mit einer geschützten Nucleobase vorzugsweise in Anwesenheit eines Hydrids, wie z. B. NaH, und im Falle eines Jodlactams
- (b) Aktivierung des Lactams, beispielsweise durch Einführen einer Schutzgruppe wie z. B. eine BOC-Gruppe, sowie
- (c) nucleophile Ringöffnung, z. B. durch ein Hydroperoxid wie z. B. LiOOH.

[0027] Zur Herstellung von Oligomeren werden die erfindungsgemäßen Verbindungen dann vorzugsweise an fester Phase nach Art der Merrifield-Peptidsynthese zu oligomeren Strukturen aufgebaut. Dabei werden die notwendigen Reagenzien vorzugsweise im Überschuß zugesetzt und nicht umgesetzte Mengen durch einfache Waschschrte wieder entfernt [R. B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 1963, 85, 2149]. Repetitive Zyklen, die aus Abspaltungen der temporären Schutzgruppen und Kupplungen, z. B. nach der Methode des symmetrischen Anhydrids, der geschützten Monomer-Bausteine bestehen, führen zum Oligomeren am Harz. Am Ende der Synthese wird die terminate Schutzgruppe abgespalten, das Oligomer vom Harz gespalten und bevorzugt mit chromatographischen Methoden aufgereinigt. Die isolierten HPLC-Fraktionen der Syntheseprodukte wurden mit analytischer HPLC auf ihre Reinheit überprüft und mit Elektrospray-Massenspektrometrie eindeutig charakterisiert.

[0028] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Oligomer enthaltend mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung, welche im allgemeinen 2'→4' verknüpft sind.

[0029] Um molekulare Species, wie Peptide, Proteine, Rezeptoren, Redoxzentren, Antikörper, Nucleinsäure-Abschnitte (wie DNA, RNA) mit Hilfe des beschriebenen Paarungssystem zusammenzuführen, werden im allgemeinen geeignete Linker integriert. Bevorzugt, aber nicht ausschließlich, läßt sich Lysin an jeder beliebigen Stelle im oligomeren Paarungssystem, ganz bevorzugt aber terminal, einbauen. Lysin hat durch seine freie Aminogruppe eine Vielzahl von Verknüpfungsmöglichkeiten. Der Einbau in das erfindungsgemäße Oligomer erfolgt beispielsweise über Boc-Lysin(Fmoc), dessen FMOC-Gruppe mit Piperidin in DMF abgespalten werden kann.

[0030] Daher bezieht sich die vorliegende Erfindung auch auf Oligomere, die zusätzlich mindestens einen Linker, vorzugsweise einen Lysinlinker, vor allem einen terminalen Lysinlinker enthalten.

[0031] Das beispielsweise aminofunktionalisierte Oligomere kann auch bevorzugt mit aktivierten Linkern wie z. B. Jodacetylsuccinimid (A) oder Bis(hydroxysuccinimidyl)glutarat (B) derivatisiert werden, welche dann bevorzugt in physiologischen Medien, insbesondere in wäßrig-gepufferten Lösungen ggf. unter Zugabe von organischen Lösungsvermittlern, mit HS-Gruppen der molekularen Spezies, z. B. über (A) mit den Cystein-Resten eines Peptids oder Proteins oder über (B) mit Aminogruppen der molekularen Spezies unter Bildung von chemisch stabilen, kovalenten Bindungen reagieren.

[0032] Daher umfaßt die vorliegende Erfindung auch Oligomere, die mit einem aktivierten Linker, wie z. B. Jodacetylsuccinimid und/oder Bis(hydroxysuccinimidyl)glutarat derivatisiert sind.

[0033] Ein anderer Gegenstand der Erfindung ist folglich auch ein Konjugat aus einem erfindungsgemäßen Oligomer und einem Biomolekül.

[0034] Unter Biomolekül versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung z. B. ein Peptid, Peptoid oder Protein, wie z. B. einen Rezeptor, einen Antikörper oder funktionelle Teile davon oder ein Enzym, sowie eine Nucleinsäure wie DNA oder RNA, oder Zellbestandteile wie Lipide, Glykoproteine, Filamentbestandteile, oder Viren, Virenbestandteile wie Kapside, Viroide, und deren Derivate wie z. B. Acetate.

[0035] Funktionelle Teile von Antikörper sind beispielsweise Fv-Fragmente (Skerra & Plückthun (1988) Science 240, 1038), einzelkettige Fv-Fragmente (scFv; Bird et al (1988), Science 242, 423; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 5879) oder Fab-Fragmente (Better et al. (1988) Science 240, 1041). Die erfindungsgemäßen Konjugate aus Effektormolekülen und bevorzugt peptidischen, aber im Gegensatz zu PNA selektiven und kontrollierbaren Paarungssystemen sind dann vorteilhaft, wenn reversibel supramolekulare assemblies aufgebaut werden sollen, deren Wirkung, wie z. B. Bindung, Inhibition, Auslösung eines physiologischen Effektes, sich von der Wirkung der einzelnen Effektormoleküle unterscheidet.

[0036] So beschreibt z. B. WO 96/13613 eine Methode zum Auffinden einer Substanz, die eine biologische Wirkung durch die Multimerisierung von Proteinen auslöst, indem man zuerst eine Substanz I durch einen Test ermittelt, die an ein Protein bindet, dann eine zweite Substanz II ermittelt, die an ein zweites Protein bindet und dann die beiden Substanzen I und II kovalent über einen Linker verbindet, so daß eine Dimerisierung der beiden Proteine ausgelöst wird. Diese Dimerisierung führt dann den gewünschten biologischen Effekt herbei. Größere Flexibilität kann eine solche Methode erhalten, wenn das Verbinden der beiden Substanzen I und II nicht kovalent, sondern durch ein Paarungssystem wie das erfindungsgemäße Oligomer oder Konjugat erfolgt. Durch die Steuerbarkeit dieser Paarung, beispielsweise durch Temperatur oder pH, kann der Dimerisierungsvorgang der Proteine beobachtet oder dessen Ausmaß gesteuert werden. Die erfindungsgemäßen Paarungssysteme haben z. B. gegenüber den Systemen aus WO 96/13522 den Vorteil, daß sie Nuclease-stabil sind.

[0037] Ein Ansatz, peptidische „Klebe“-Einheiten zur Bildung von homo- oder heterodimeren assemblies zu verwenden, wird z. B. in WO 94/28173 beschrieben:

Assoziierungspeptide (Hexa- oder Heptapeptide) einer festgelegten Sequenz führen Effektoreinheiten, wie z. B. Proteine, zu supramolekularen Einheiten zusammen. Höhere Flexibilität kann eine solchen Methode durch Steuerbarkeit dieses Assoziierungsvorganges erhalten, die im allgemeinen mit den Assoziierungspeptiden nicht realisiert werden kann, in vorteilhafter Weise jedoch mit den Paarungssystemen der vorliegenden Erfindung.

[0038] Daher bezieht sich die Erfindung auch auf die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindung, des erfindungsgemäßen Oligomers bzw. des erfindungsgemäßen Konjugates in einem Paarungs- und/oder Testsystem, wie z. B. in WO94/28173, WO96/13522, WO96/13613, R. L. Letsinger, et al., Nature, 1996, 382, 607-9; P. G. Schultz et al., Nature, 1996, 382, 609-11 oder A. Lombardi, J. W. Bryson, W. F. DeGrado, Biomoleküls (Pept. Sci.) 1997, 40, 495-504 näher beschrieben und oben allgemein erläutert.

[0039] Eine besondere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung stellt ein Träger dar, an den eine erfindungsgemäße Verbindung, ein erfindungsgemäßes Oligomer und/oder ein erfindungsgemäßes Konjugat immobilisiert ist, insbesondere zur Verwendung in einem Paarungs- und/oder Testsystem, wie oben näher beschrieben.

[0040] Unter dem Begriff „immobilisiert“ versteht man im Sinne der vorliegenden Erfindung die Ausbildung einer kovalenten Bindung, quasi-kovalenten Bindung oder supramolekularen Bindung durch Assoziation von zwei oder mehreren molekularen Spezies wie linear konstituierte Moleküle, insbesondere Peptide, Peptoide, Proteine, lineare Oligo- oder Polysaccharide, Nukleinsäuren und deren Analoga, oder Monomere wie Heterocyclen, insbesondere Stickstoffheterocyclen, oder nichtlinear konstituierte Moleküle wie verzweigte Oligo- oder Polysaccharide oder Antikörper und deren funktionelle Teile wie Fv-Fragmente, einzelkettige Fv-Fragmente (scFv) oder Fab-Fragmente.

[0041] Als Trägermaterialien eignen sich beispielsweise Keramik, Metall, insbesondere Edelmetall, Gläser, Kunststoffe, kristalline Materialien bzw. dünne Schichten des Trägers, insbesondere der genannten Materialien, oder (bio)molekulare Filamente wie Cellulose, Gerüstproteine.

[0042] Zusammenfassend weist die vorliegende Erfindung gegenüber herkömmlichen Paarungs- und Testsystemen folgende Vorteile auf

[0043] Die Duplices der erfindungsgemäßen Oligomere oder Konjugate sind wesentlich stabiler als jene der DNA, RNA und p-RNA. Die oligomeren Substanzen sind chemisch und gegenüber enzymatischem Abbau im

wesentlichen stabil, paaren nicht mit DNA oder RNA und lassen sich auf einfache Weise in größeren Mengen herstellen. Beide Enantiomere sind durch synthetische chirogene Schritte leicht zugänglich. Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind daher als selektive „molekulare Klebstoffe“ den bisher bekannten Paarungssystemen überlegen.

[0044] Die folgenden Figuren und Beispiele sollen die Erfindung näher beschreiben, ohne sie zu beschränken.

BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0045] [Fig. 1](#) zeigt schematisch die Synthese des Jodlactams 9.

[0046] [Fig. 2](#) zeigt schematisch die Synthese eines kopplungsfähigen Thyminbausteins.

[0047] [Fig. 3](#) zeigt schematisch die Synthese eines kopplungsfähigen Adeninbausteins.

[0048] [Fig. 4](#) zeigt die Abbildung einer reversiblen UV-Umwandlungskurve des Oligomers ATATA.

BEISPIELE

Beispiel 1

Synthese eines kopplungsfähigen Thyminbausteins

Herstellung von 1-[(S,S,S)-8-Azabicyclo[3.3.1]nonan-7-on-2-yl]-3-[(benzyloxy)methyl]thymin (13b)

1. Durchführung

[0049] In einem trocknen, mit Schutzgas begasten 50-ml-Löwenthalkolben wurden 148 mg (4.00 mmol) 65%ige NaH-Suspension vorgelegt, zweimal mit je 5 ml wasserfreiem Pentan gewaschen und in 20 ml DMF suspendiert. Es wurden zuerst portionsweise 493 mg (2.00 mmol) 3-(Benzyloxy)methylthymin und nach Abklingen der Gasentwicklung 530 mg (2.00 mmol) 9 zugesetzt. Nach ca. 20 minütigem Rühren bei Raumtemp. bildete sich eine fahlgelbe Reaktionslösung, die über Nacht bei Raumtemp. gerührt wurde.

[0050] Man versetzte mit 1 ml einer ges. wäßrigen NH_4Cl -Lösung und überführte die Reaktionslösung unter Nachspülen mit MeOH in einen Rundkolben. Im Anschluß entfernte man die Lösungsmittel zunächst vorsichtig i.V.i.RV, danach durch Kugelrohrdestillation (70°C/0.5 Torr). Man erhielt 1.71 g eines gelborangefarbenen Öles, welches durch MPL-Chromatographie an 150 g Kieselgel 60 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 30:1) gereinigt wurde. Der so erhaltene Feststoff wurde mit wenig Et_2O digeriert, abfiltriert, zerkleinert und im ÖPV getrocknet. Dies lieferte 405 mg (53%) 13b (ent-13b: 50%; rac-13: 51%) als farbloses Pulver vom Schmp. 160-162°C. Eine analytische Probe wurde durch Kristallisation aus THF/Cyclohexan erhalten.

2. Analytische Daten

1-[(S,S,S)-8-Azabicyclo[3.3.1]nonan-7-on-2-yl]-3-[(benzyloxy)methyl]thymin (13b):

Schmp: 160-162°C (THF/Cyclohexan); ent-13b : 161-162°C.

rac-13b: 186-188°C (THF/Cyclohexan).

DC: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 15:1, R_f 0.41.

Spez. Drehung: $[\alpha]_{589}^{20} = -43.3^\circ$ ($c = 1.10$, CH_2Cl_2); ent-13b: $[\alpha]_{589}^{20} = +42.9^\circ$ ($c = 1.05$, CH_2Cl_2).

UV(CH_3CN): λ_{max} 274.2 (9623).

IR(KBr): 3447w, 3189w, 3090w, 2949m, 2906m, 1703, 1652, 1464, 1405, 1357s, 1270s, 1076.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, d_6 -DMSO): 1.59 (m_c , 3H, H-C(4')), 2H-C(9')); 1.85 (m_c , N-C(3')); 1.88 (s, CH_3); 2.00-2.14 (m, 3H, H'-C(3'), H'-C(4'), H-C(6')); 2.20 (br. s, H-C(5')); 2.47 (dd, J(H'-C(6'), H-C(6')) = 18.5, J(H'-C(6'), H-C(5')) = 7.5, H'-C(6')); 3.58 (br. m, H-C(1')); 4.22 (br. m, H-C(2')); 4.60 (s, 2H, PhCH_2O); 5.35 (m_c , 2H, OCH_2N); 7.22-7.35 (m, 5H, Ph); 7.54 (s m. Fs., H-C(6)); 7.99 (d, J(H-N(8'), H-C(1')) = 4.6, H-N(8')).

[0051] Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe eines ^1H , ^1H -COSY-Spektrums.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, d_6 -DMSO): 12.75 (CH_3); 17.90 (C(3')); 23.82 (C(9')); 24.66 (C(5')); 27.47 (C(4')); 37.15 (C(6')); 47.27 (C(1')); 55.55 (C(2')); 70.45 (OCH_2N); 71.06 (PhCH_2O); 107.82 (C(5)); 127.06, 127.29, 128.03

(SC, Ph); 137.40 (C(6)); 138.18 (C_{ipso}); 151.04 (C(2)); 162.67 (C(4)); 170.83 (C(7')).

[0052] Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe eines ¹H, ¹³C-COSY-Spektrums.

MS (ESI⁺): 767.8 [2M+H], 384.5 [M+H].

Anal.: ber. für C₂₁H₂₅N₃O₄ (383.45): C 65.78, H 6.57, N 10.96;

gef.: C 65.68, H 6.64, N 10.84.

Herstellung von 1-[(S,S,S)-8-Aza-8-(tert-butoxycarbonyl)-bicyclo[3.3.1]nonan-7-on-2-yl]-3-[(benzyloxy)methyl]thymin (13c)

1. Durchführung

[0053] In einem 250-ml-Rundkolben wurden 7.18 g (18.7 mmol) 13b in 100 ml CH₂Cl₂ gelöst und nacheinander mit 2.59 ml (18.7 mmol, leq.) NEt₃ und 8.00 ml (37.4 mmol, 2eq.) Boc₂O versetzt. Im Anschluß gab man spatelweise 2.28 g (18.7 mmol, leq.) DMAP zu und rührte die gelbe Reaktionslösung vier Stunden bei Raumtemp.. Es wurden nochmals nacheinander 3.89 ml (28.1 mmol, 1.5 eq.) NEt₃, 12.0 ml (56.1 mmol, 3 eq.) Boc₂O und 3.43 g (28.1 mmol, 1.5 eq.) DMAP zugegeben. Nach Rühren über Nacht unter Wasserausschluß waren laut DC-Kontrolle (Kieselgel 60; CH₂Cl₂/MeOH 15:1) immer noch Spuren Edukt vorhanden. Daher wurden im Abstand von vier Stunden nochmals je 2.00 ml (9.35 mmol) Boc₂O zugesetzt. Man ließ erneut über Nacht unter Wasserausschluß rühren und entfernte im Anschluß die Lösungsmittel und Reagenzien i. V. i. RV. Dies lieferte 19.5 g eines schmierigen, gelben Feststoffes, den man an 275 g Kieselgel 60 (AcOEt/n-Heptan 2:1) chromatographierte. Man erhielt 8.50 g eines leicht gelb gefärbten Feststoffes. Umkristallisation aus 50 ml THF und 100 ml Cyclohexan lieferte 7.81 g (86%) 13c (ent-13c: 87%; rac-13c: 85%) als farblose, kleine Kristalle vom Schmp. 124-126°C.

2. Analytische Daten

1-[(S,S,S)-8-Ara-8-(tert-butoxycarbonyl)bicyclo[3.3.1]nonan-7-on-2-yl]-3-[(benzyloxy)methyl]thymin (18):

Schmp: 124-126°C (THF/Cyclohexan); ent-13c: 123-125°C.

rac-13c: 125-127°C (THF/Cyclohexan).

DC: AcOEt/n-Heptan 2:1, R_f 0.13.

Spez. Drehung: [α]_D²⁰ = -10.3° (c = 1.37, CH₂Cl₂); ent-13c: [α]_D²⁰ = +10.6° (c = 1.20, CH₂Cl₂).

UV(CH₃CN): λ_{max} 273.6 (10200).

IR(KBr): 3447w, 2934w, 1744s, 1701m, 1663s, 1448m, 1363m, 1260s, 1153m, 1078m.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.49 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1.52-1.63, 1.74-2.13 (2m, 6H, 2H-C(3'), 2H-C(4'), 2H-C(9')); 1.88 (s, CH₃-C(5)); 2.33 (br. s, H-C(5')); 2.38 (d, J(H-C(6'), H'-C(6')) = 18.2, H-C(6')); 2.70 (dd, J(H'-C(6'), H-C(6')) = 18.2, J(H'-C(6'), H-C(5')) = 6.7, H'-C(6')); 4.27 (m_c, H-C(1')); 4.40 (m_c, H-C(2')); 4.65 (s, 2H, PhCH₂O); 5.45 (m_c, 2H, OCH₂N); 7.14-7.32 (m, 6H, H-C(6), Ph).

[0054] Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe eines ¹H, ¹H-COSY-Spektrums.

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): 13.39 (CH₃-C(5)); 19.63 (C(3')); 24.90 (C(9')); 25.37 (C(5')); 27.39 (C(4')); 27.84 (C(CH₃)₃); 41.03 (C(6')); 53.36 (C(1')); 57.71 (C(2')); 70.80 (OCH₂N); 72.25 (PhCH₂O); 89.97 (C(CH₃)₃); 109.73 (C(5)); 127.55, 128.20 (5C, Ph); 137.17 (C(6)); 138.16 (C_{ipso}); 151.19, 152.15 (O₂CN, C(2)); 163.30 (C(4)); 170.45 (C(7')).

[0055] Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe eines ¹H, ¹³C-COSY-Spektrums.

MS (ESI⁺): 501.7 [M+H], 384.5 [M+H-Boc].

Anal.: ber. für C₂₆H₃₃N₃O₆ (483.56): C 64.58, H 6.88, N 8.69;

gef.: C 64.45, H 6.91, N 8.59.

Herstellung von 3-[(Benzyloxy)methyl]-1-[(S,S,S)-2-(tert-butoxycarbonyl)amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]thymin (14a)

1. Durchführung

[0056] In einem 500-ml-Rundkolben wurden 7.81 g (16.2 mmol) 13c in 225 ml THF gelöst, mit 50 ml Wasser versetzt und mittels Eisbad auf 0°C abgekühlt. Es wurden 7.33 g (64.8 mmol) 30%iges Wasserstoffperoxid gefolgt von 25 ml einer wäßrigen Lösung von 1.36 g (32.3 mmol) LiOH-Monohydrat zugegeben, woraufhin sich die Lösung trübte. Das Eisbad wurde entfernt und der Reaktionsansatz 45 min gerührt. Die Reaktionslösung

wurde mit 25 ml einer 1.5M wäßrigen Na_2SO_3 -Lösung und 75 ml ges. NaHCO_3 -Lösung versetzt. Im Anschluß wurde das THF i.V.i.RV weitgehend entfernt. Die Lösung wurde auf 350 ml Wasser gegossen und mit wenig 2N Natronlauge auf pH > 12 eingestellt. Die milchige Suspension wurde dreimal mit je 350 ml CH_2Cl_2 extrahiert und die ver. org. Phasen mit MgSO_4 getrocknet. Nach Entfernen der Lösungsmittel i.V.i.RV erhielt man 2.00 g verunreinigtes 13b, das aus 30 ml THF und 60 ml Cyclohexan umkristallisiert wurde. Es gelang so 1.55 g (25%) 13b(ent-13b: 27%; rac-13b: 30%) wiederzugewinnen.

[0057] Die basische, wäßrige Phase wurde vorsichtig mit halbkonzentrierter Salzsäure auf pH 1-2 eingestellt und dreimal mit je 350 ml AcOEt extrahiert. Nach Trocknen mit Na_2SO_4 , Entfernen der Lösungsmittel i.V.i.RV, digerieren mit 50 ml Et_2O , Filtration und Trocknen im ÖPV erhielt man 5.09 g (63%) 14a (ent-14a: 60%; rac-14a: 65%) als feinkristallinen Feststoff vom Schmp. 89-91 °C.

2. Analytische Daten

3-[(Benzyloxy)methyl]-1-[(S,S,S)-2-(tert-butoxycarbonyl)amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]thymin (14a):

Schmp: 89-91 °C (nach Digerieren mit Et_2O); ent-14a: 90-92°C.

rac-14a: 168-170°C (THF/Cyclohexan).

DC: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 15:1, R_f 0.37.

Spez. Drehung: $[\alpha]_{589}^{20} = -24.0^\circ$ (c = 0.99, MeOH); ent-14a: $[\alpha]_{589}^{20} = +23.9^\circ$ (c = 1.05, MeOH).

UV(CH_3CN): λ_{max} 273.2 (10890).

IR (KBr): 3373m, 2974m, 2932m, 1706, 1691, 1664, 1647, 1534m, 1469m, 1452m, 1365m, 1290m, 1255m, 1175m.

^1H -NMR (300 MHz, d_6 -DMSO): 0.88-1.30 (m, 2H, H-C(4) H-C(6)); 1.19 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1.66-2.00 (m, 5H, 2H-C(3), H'-C(4), H-C(5), H'-C(6)); 1.80 (s, CH_3 -C(5')); 2.16 (m, 2H, CH_2COOH); 3.79 (m, H-C(1)); 4.27 (m, H-C(2)); 4.58 (s, 2H, PhCH_2O); 5.34 (s, 2H, OCH_2N); 6.86 (d, J(H-N, H-C(1)) = 9.6, NH); 7.23-7.37 (m, 5H, Ph); 7.68 (br. s, H-C(6')); 12.09 (br. s, CH_2COOH).

[0058] Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe eines ^1H , ^1H -COSY-Spektrums.

^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl_3): 13.09 (CH_3 -C(5')); 28.11 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 30.13 (C(3)); 31.07 (C(4)); 33.38 (C(5)); 39.23 (C(6)); 40.18 (CH_2COOH); 51.38 (C(1)); 58.19 (C(2)); 70.83 (OCH_2N); 72.17 (PhCH_2O); 80.05 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 110.06 (C(5')); 127.62, 127.69, 128.27 (SC, Ph); 135.46 (C(6')); 138.00 (C_{ipso}); 152.72, 155.43 (O_2CN , C(2')); 163.20 (C(4')); 176.30 (CH_2COOH).

[0059] Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe eines ^1H , ^{13}C -COSY-Spektrums.

MS (ESI⁺): 519.7 [M+H+H₂O].

Anal.: ber. für $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}$, (501.58): C 62.26, H 7.03, N 8.38;

gef.: C 62.00, H 6.96, N 8.17.

Herstellung von 1-[(S,S,S)-2-(tert-Butoxycarbonyl)amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]thymin (14b)

1. Durchführung

[0060] In einem 500-ml-Dreihalskolben wurden 300 mg Pd-C in 60 ml wasserfreiem THF suspendiert und 45 min lang mit Wasserstoff gesättigt. Es wurde im Anschluß eine Lösung von 2.01 g (4.00 mmol) 14a in 30 ml THF zugegeben und die Reaktionsmischung 90 min (DC-Kontrolle; $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 15:1) intensiv unter Wasserstoffatmosphäre gerührt.

[0061] Der Katalysator wurde über Celite abfiltriert und die Lösungsmittel i.V.i.RV entfernt. Man erhielt 1.96 g eines farblosen Schaumes, den man in 90 ml wasserfreiem MeOH löste und mit 454 mg (8.40 mmol) NaOMe versetzte. Es wurde über Nacht unter Wasserausschluß bei Raumtemp. gerührt.

[0062] Man versetzte mit 6 ml ges. NH_4Cl -Lösung und entfernte die Lösungsmittel weitgehend i.V.i.RV. Der Rückstand wurde auf 50 ml Wasser gegossen, der pH-Wert der wäßrigen Phase mit 2N Salzsäure auf 1-2 eingestellt und die wäßrige Phase viermal mit je 50 ml AcOEt extrahiert. Nach Trocknen mit Na_2SO_4 und Entfernen der Lösungsmittel i.V.i.RV digerierte man den erhaltenen Schaum mit 20 ml Et_2O . Nach Filtration des Präzipitates und Trocknen im ÖPV erhält man 1.43 g (94%) 14b(ent-14b: 90%; rac-14b: 88%) als farblosen Feststoff vom Schmp. 231-233°C. Eine analytische Probe wurde durch Kristallisation aus MeOH/Wasser erhalten.

2. Analytische Daten

1-[(S,S,S)-2-(tert-Butozycarbonyl)amino]-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]thymin (14b):

Schmp: 235-237°C (MeOH/ H₂O); Gasentwicklung; ent-14b: 234-237°C.

rac-14b: 231-233°C (MeOH/ H₂O); Gasentwicklung.u. Zersetz..

DC: CH₂Cl₂/MeOH 5:1, R_f 0.38.

Spez. Drehung: $[\alpha]_{589}^{20} = -21.9^\circ$ (c = 0.57, MeOH); ent-14b: $[\alpha]_{589}^{20} = +21.2^\circ$ (c = 0.53, MeOH).

UV(H₂O): λ_{\max} 272.4 (11450).

IR (KBr): 3374s, 3187w, 2978w, 2935w, 1702s, 1648s, 1522s, 1394w, 1366w, 1282s, 1254m, 1170m.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 0.85-1.38 (m, 2H, H-C(4) H-C(6)); 1.27 (s, 9H, C(CH₃)₃); 1.62-2.00 (m, 5H, 2H-C(3), H'-C(4), H-C(5), H'-C(6)); 1.73 (s, CH₃-C(5')); 2.15 (m, 2H, CH₂COOH); 3.75 (m, H-C(1)); 4.19 (m, H-C(2)); 6.77 (d, J(H-N, H-C(1)) = 9.6, NH); 7.56 (s, H-C(6')); 11.09 (s, H-N(3')); 12.08 (br. s, CH₂COOH).

[0063] Im Bereich von 6.00-10.0 ppm sind mehrere kleine Signale zu erkennen, die beim Auf-heizen der NMR-Probe auf 80°C verschwinden.

[0064] Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe eines ¹H,¹H-COSY-Spektrums.

¹³C-NMR (75.5 MHz, d₆-DMSO): 12.03 (CH₃-C(5')); 27.90 (C(CH₃)₃); 29.16 (C(3)); 30.72 (C(4)); 32.72 (C(5)); 38.06 (C(6)); 40.30 (CH₂COOH); 49.71 (C(1)); 57.05 (C(2)); 77.51 (C(CH₃)₃); 107.65 (C(5')); 138.32 (C(6')); 151.28, 154.79 (O₂CN, C(2')); 163.60 (C(4')); 173.35 (CH₂COOH).

[0065] Die Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe eines ¹H,¹³C-COSY-Spektrums.

MS (ESI⁺): 382.3 [M+H].

Anal.: ber. für C₁₈H₂₇N₃O₆ (381.43): C 56.68, H 7.13, N 11.02;

gef.: C 56.45, H 7.16, N 10.80.

Beispiel 2

Synthese eines kopplungsfähigen Adeninbausteins

Herstellung von 9-[(S,S,S-8-Azabicyclo[3.3.1]nonan-7-on-2-yl]-6-N-benzoyl-adenin (15a)

1. Durchführung

[0066] Ein 500 ml Zweihalsrundkolben wurde mit 180 ml trockenem DMF und 2.25 g einer Suspension an NaH (60 mmol) beladen. 7.18 g 6-N-Benzoyladenin (30 mmol) wurden portionsweise hinzugegeben und and die Mischung solange geführt bis die Gasentwicklung abklang. Nach 15 min wurden 7.95 g Iodlactam 9 (30 mmol) hinzugegeben und die Lösung im Dunklen 22 h lang gerührt. Danach wurde die Lösung auf 0°C abgekühlt und durch Zugabe von 1 M wäßriger HCl (24 ml) neutralisiert. Unter reduziertem Druck (0.3 mbar, Badtemperatur 60°C) wurde das Lösemittel entfernt. Der resultierende Rest wurde in 100 ml MeOH gelöst und auf 15 g Silicagel vorabsorbiert. Eine Chromatographie über 7 × 15 cm Silicagel mit CH₂Cl₂/MeOH (12:1) ergab 17 g eines gelben Öls, welches in 15 ml MeOH umkristallisiert wurde, um 8.2 g 15a (22 mmol; 73%) eines farblosen Feststoffes zu ergeben, der für weitere Reaktionen rein genug war. Eine analytische Probe wurde durch Kristallisation aus MeOH/Et₂O erhalten.

2. Analytische Daten

Schmp.: 269-271 °C (Zersetzung)

TLC: CH₂Cl₂/MeOH 10:1, R_f 0.28

$[\alpha]_D^{20}$: +35.9° (c 1.03, MeOH)

UV(MeOH): λ_{\max} 280(20329)

IR: 3500-3000s, 2938m, 1685m, 1654s, 1610s, 1542w, 1508m, 1490m, 1458s, 1400m, 1341m, 1286s, 1254s, 1168w, 1098m, 799w, 713m, 643w.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 1.53-1.72 (m, 3H); 2.08-2.32 (m, 5H); 2.48-2.58 (m, 1H); 4.27 (br. m, 1H, H-C(1≡)); 4.63 (br. m, 1H, H-C(2≡)); 7.52-7.58 (m, 2H, Ph); 7.62-7.68 (m, 1H, Ph); 8.04-8.08 (m, 2H, Ph); 8.14 (d, J (H-N(8≡), H(C(1≡))) = 4.3 Hz, H-N(8≡)); 8.70, 8.75 (2 s, 2H, H-C(2); H-C(8)); 11.18 (s, 1H, H-NC(6)).

¹³C-NMR (75 MHz, d₆-DMSO): 18.89, 24.21, 27.27 (C(3≡), C(4≡), C(9≡)); 25.15 (C(5≡)); 36.95 (C(6≡)); 47.44 (C(1≡)); 54.21 (C(2≡)); 125.32 (C(5)); 128.34, 132.28, 133.34 (Ph); 143.05 (C(8)); 150.17 (C(4)); 151.12 (C(2)); 152.59 (C(6)); 165.49 (Bz-C=O); 171.39 (Lactam-C=O).

MS (ESI⁺): 377 [M+H] (100%)

Mikroanalyse: kalkuliert für C₂₀H₂₀N₆O₂: C 63.83, H 5.32, N 22.34

gefunden: C 63.90, H 5.45, N 22.1

Herstellung von 9-[(S,S,S)-B-Azabicyclo[3.3.1]nonan-7-on-2-yl]-adenin (15b)

1. Durchführung

[0067] Ein 500 ml Rundhalskolben wurde mit 8.2 g Benzoyl-A-Lactam 15a (22 mmol) und 250 ml trockenem Methanol beladen. Die Suspension wurde erhitzt bis 15a vollständig aufgelöst war. Danach wurde eine Lösung von 1.62 g NaOMe in 5.5 ml MeOH hinzugegeben und die Mischung 19 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Die resultierende Suspension wurde filtriert und das Präzipitat mit Et₂O gewaschen. Das Filtrat wurde durch Zugabe von Ionenaustauscherharz (Amberlite IR-120, H⁺-Form) neutralisiert. Das Harz wurde abfiltriert und das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 4 ml MeOH gelöst und durch Zugabe von 30 ml Et₂O ausgefällt. Das Präzipitat wurde gefiltert und die vereinten Präzipitate unter Vakuum getrocknet, um 5.8 g 15b (21 mmol, 97%) zu ergeben, das rein genug für weitere Reaktionen war. Eine analytische Probe wurde durch Kristallisation aus MeOH/H₂O erhalten.

2. Analytische Daten

Schmp.: 300-302°C (Zersetzung)

TLC: MeOH, R_f 0.35

[α]_D²⁰: +42.8° (c 0.40, MeOH)

UV(MeOH): λ_{max} 260 (16374)

IR: 3367, 3179, 3101m, 2926m, 2864w, 1651, 1600s, 1563m, 1470m, 1337m, 1296m, 1258m, 1229m, 1166w, 1107w, 1005w, 802w, 724w, 668w.

¹H-NMR (300 MHz, d₆-DMSO): 1.48-1.67 (m, 3H); 2.04-2.24 (m, 5H); 2.46-2.54 (m, 1H); 4.20 (br. m, 1H, N-C(1[≡])); 4.46 (br. m, 1H, H-C(2[≡])); 7.26 (s, 2H, NH₂); 8.06 (d, J (H-N(8[≡]), H(C(1[≡]))) = 4.3 Hz, H-N(8[≡])); 8.14, 8.35 (2 s, 2H, H-C(2); H-C-(8)).

¹³C-NMR (75 MHz, d₆-DMSO): 18.94, 24.15, 27.36 (C(3[≡]), C(4[≡]), C(9[≡])); 25.20 (C(5[≡])); 37.03 (C(6[≡])); 47.47 (C(1[≡])); 53.85 (C(2[≡])); 118.75 (C(5)); 139.18 (C(8)); 149.70 (C(4)); 152.15 (C(2)); 156.03 (C(6)); 178.91 (lactame-C=O).

MS (ESI⁺): 273 [M+H] (100%)

Mikroanalyse: kalkuliert für Cl₁₃H₁₆N₆O × H₂O: C 53.78, H 6.25, N 28.95

gefunden: C 53.65, H 6.24, N 29.12

Herstellung von 9-[(S,S,S)-8-Azabicyclo[3.3.1]nonan-7-on-2-yl]-6-N-dimethylaminomethylidene-adenin (15c)

1. Durchführung

[0068] Ein 500 ml Rundkolben wurde mit 5.58 g A-lactam 15b (20 mmol), 200 ml trockenem DMF und 17.1 ml Dimethylformamid-diethylacetal (100 mmol) beladen. Die Mischung wurde auf 80°C 3h lang erhitzt. Die resultierende klare Lösung wurde unter reduziertem Druck (0.4 mbar, 60°C Badtemperatur) konzentriert, um 6.9 g von rohem 15c zu ergeben, das ohne weitere Reinigung verwendet wurde.

2. Analytische Daten

TLC (Al₂O₃): CH₂Cl₂/MeOH 20:1, R_f 0.75

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.58-1.79 (m, 2H); 1.89-1.93 (m, 1H); 2.16-2.28 (m, 2H); 2.38-2.51 (m, 3H); 2.69-2.78 (m, 1H); 3.23, 3.28 (2 s, 6H, CH₃); 4.38 (br. m, 1H, H-C(1[≡])); 4.68 (br. m, 1H, H-C(2[≡])); 6.62 (d, J (H-N(8[≡]), H(C(1[≡]))) = 4.3 Hz, H-N(8[≡])); 8.13, 8.54 (2 s, 2H, H-C(2); H-C-(8)); 8.97 (s, 1H, Formamidin-H).

MS (ESI⁺): 328 [M+H] (100%)

Herstellung von 9-[(S,S,S)-8-N-Tert.-butoxycarbonyl-8-azabicyclo[3.3.1]nonan-7-on-2-yl]-6-N-dimethylaminomethylidene-adenin (15d)

1. Durchführung

[0069] Ein 250 ml Rundkolben wurde mit 6.9 g rohem Amidine-A-lactame 15c (20 mmol) und 100 ml trockene-

nem CH_2Cl_2 beladen. Unter Rühren wurden 2.8 ml Triethylamin (20 mmol) hinzugegeben, gefolgt von 8.7 g Boc_2O (40 mmol) und 2.44 g DMAP (20 mmol). Die Lösung wurde 16 h lang bei Raumtemperatur gerührt bis das gesamte Ausgangsmaterial verbraucht war. Das Lösemittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der resultierende Rückstand wurde mittels Chromatographie (7 × 16 cm Silicagel, Elutionsmittel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 20:1) gereinigt, um 8.2 g eines gelben Feststoffes zu ergeben, der in einen 100 ml Rundkolben überführt wurde. Danach wurden 50 ml Et_2O hinzugegeben und die Mischung wurde 2 h lang unter Rückfluß beschallt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Mischung filtriert und das Präzipitat wurde mit Et_2O behandelt und noch einmal mit Ultraschall beschallt. Die Filtration ergab 6.66 g 15d (78%) eines leicht gelblichen Feststoffes, der rein genug für weitere Reaktionen war.

2. Analytische Daten

TLC: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10:1, R_f 0.66

$^1\text{H-NMR}$ 300 MHz, CDCl_3 : 1.54 (s, 9H, tert.-Bu); 1.84-2.36 (m, 7H); 2.44 (d, 1H, $J = 18.5$ Hz); 2.77 (dd, $J = 7.0, 18.5$ Hz, 1H); 3.14, 3.20 (2 s, 6H, Formamidin- CH_3); 4.80 (br. m, 1H, H-C(1 \Rightarrow)); 5.23 (br. m, 1H, H-C(2 \Rightarrow)); 8.04, 8.48 (2 s, 2H, H-C(2); H-C-(8)); 8.87 (s, 1H, Formamidin-H).

MS (ESI $^+$): 428 [M+H] (100%)

Herstellung von 9-[(S,S,S)-8-N-Tert.-butoxycarbonyl-8-azabicyclo[3.3.1]nonan-7-on-2-yl]-adenin (15e)

1. Durchführung

[0070] Ein 250 ml Rundkolben wurde mit 6.64 g Amidine-A-lactame 15d (15.5 mmol) und 150 ml trockenem CH_2Cl_2 beladen. Danach wurden 11.55 g of p-Toluolsulfonsäurehydrazid (62.0 mmol) hinzugegeben gefolgt von 1.47 g TsOH (7.75 mmol). Die Lösung wurde bei Raumtemperatur 44 h lang gerührt. Nach der Zugabe von 150 ml CH_2Cl_2 wurde die Lösung dreimal mit Wasser gewaschen und durch Zugabe von 2 M NaOH auf einen pH > 12 eingestellt. Die vereinigten Waschlösungen wurden mit 100 ml CH_2Cl_2 extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet. Nach der Filtration wurde das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt und der resultierende Rückstand mittels Chromatographie (5.2 × 20 cm Silicagel, Elutionsmittel: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 30:1) gereinigt, um 4.96 g 15e (86%) zu ergeben, das für weitere Reaktionen rein genug ist. Eine analytische Probe wurde durch Kristallisation aus THF/Cyclohexan erhalten.

2. Analytische Daten

Schmp.: 211°C (gas evol.) 300-302°C (Zersetzung)

TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 30:1, R_f 0.23

$[\alpha]_D^{20}$: +80.6° (c 1.32, CH_2Cl_2)

UV(MeCN/ H_2O 1:9): λ_{max} 260 (14136)

IR: 3406m, 3328m, 3206m, 2941w, 1756s, 1724s, 1701m, 1668s, 1645s, 1597s, 1570m, 1479m, 1414w, 1304m, 1273s, 1251s, 1228m, 1145s, 1034w, 996w, 853w, 760w.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 1.62 (s, 9H, tert.-Bu); 1.81-1.89 (m, 3H); 2.19-2.37 (m, 4H); 2.54 (d, $J = 18.5$ Hz, 1H); 2.86 (dd, $J = 7.0, 18.5$ Hz, 1H); 4.86 (br. m, 1H, H-C(1 \Rightarrow)); 5.28 (br. m, 1H, H-C(2 \Rightarrow)); 5.64 (s, 2H, NH_2); 8.06, 8.38 (2 s, 2H, H-C(2); H-C-(8)).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, d_6 -DMSO): 19.93, 25.45, 27.23 (C(3 \Rightarrow), C(4 \Rightarrow), C(9 \Rightarrow)); 25.97 (C(5 \Rightarrow)); 28.01 (C(CH_3) $_3$); 40.24 (C(6 \Rightarrow)); 52.65 (C(1 \Rightarrow)); 53.68 (C(2 \Rightarrow)); 84.12 (C(CH_3) $_3$); 119.82 (C(5)); 139.20 (C(8)); 150.59 (C(4)); 152.58 (C(2)); 155.55 (C(6)); 158.46 (Boc-C=O); 171.14 (lactame-C=O).

MS (ESI $^+$): 373 [M+H] (100%)

Mikroanalyse: kalkuliert für $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_3$: C 58.05, H 6.50, N 22.57

gefunden: C 58.13, H 6.51, N 22.85

Herstellung von 9-[(S,S,S)-8-N-Tert.-butoxycarbonyl-8-azabicyclo[3.3.1]nonan-7-on-2-yl]-6-N-p-methoxybenzoyl-adenin (15f)

1. Durchführung

[0071] Ein 100 ml Zweihalsrundkolben wurde mit 4.96 g Boc-A-lactame 15e (13.3 mmol) und 60 ml trockenem CH_2Cl_2 beladen. Danach wurden 5.35 ml trockenes Pyridin (66.5 mmol) hinzugegeben, gefolgt von 1.59 g DMAP (1.3 mmol). Nach dem Abkühlen auf 0°C wurden 5.4 ml 4-Methoxybenzoylchlorid (39.9 mmol) tropfenweise hinzugegeben und die Mischung wurde bei 0°C 15 min lang gerührt. Das Eisbad wurde entfernt und die Reaktionsmischung wurde 22 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Reaktionsmischung wie-

der auf 0°C gekühlt und 35 ml MeOH wurden tropfenweise hinzugegeben. Nach 30 min bei 0°C wurden 80 ml einer gesättigten Lösung von NH_3 in MeOH tröpfchenweise hinzugegeben. Es bildete sich ein weißes Präzipitat, das sich nach vollständiger Zugabe der Lösung auflöste. Nach 30 min wurde das Eisbad entfernt und die Reaktion bei Raumtemperatur für weitere 2 h gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt und der resultierende Rückstand in 200 ml CH_2Cl_2 aufgelöst. Die Lösung wurde nacheinander mit 150 ml gesättigter NaHCO_3 -Lösung und wäßriger Zitronensäurelösung (20%, 2 × 100 ml) gewaschen, über MgSO_4 gewaschen, filtriert und im Vakuum konzentriert. Der resultierende Rückstand wurde mittels Chromatographie (5.2 × 18 cm Silicagel; Elutionsmittel: EtOAc/MeOH 40:3) gereinigt, um 5.93 g 15f (88%) zu ergeben.

2. Analytische Daten

Schmp.: 110-112°C (Zersetzung)

TLC: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 40:1, R_f 0.44

$[\alpha]_D^{20}$: +58.3° (c 1.32, CH_2Cl_2)

UV(MeOH): λ_{max} 288 (30459)

IR: 3600-3050m, 2940m, 1757, 1707m, 1671m, 1604s, 1577m, 1506s, 1458m, 1402m, 1342m, 1251, 1168m, 1145, 1100m, 1024m, 893w, 848m, 794w, 761m, 644w.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): 1.63 (s, 9H, tert.-Bu); 1.84-1.91 (m, 3H); 2.24-2.40 (m, 4H); 2.55 (d, J = 18.5 Hz, 1H); 2.88 (dd, J = 7.0, 18.5 Hz, 1H); 3.92 (s, 3H, OMe); 4.95 (br. m, 1H, H-C(1 \Rightarrow)); 5.28 (br. m, 1H, H-C(2 \Rightarrow)); 7.01-

7.04 (m, 2H, PMBz-H); 8.01-8.04 (m, 2H, PMBz-H); 8.26, 8.81 (2 s, 2H, H-C(2); H-C(8)); 8.91 (s, 1H, H-NC(6)).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): 19.95, 25.55, 27.24 (C(3 \Rightarrow), C(4 \Rightarrow), C(9 \Rightarrow)); 25.95 (C(5 \Rightarrow)); 28.06 (C(CH₃)₃); 40.28 (C(6 \Rightarrow)); 52.61 (C(1 \Rightarrow)); 53.99 (C(2 \Rightarrow)); 55.54 (OMe); 84.27 (C(CH₃)₃); 114.08 (PMBz); 123.12 (C(5)); 126.24 (PMBz); 130.03 (PMBz); 141.58 (C(8)); 149.87 (C(4)); 152.00 (C(2)); 152.31 (C(6)); 152.54, 163.31, 164.02 (PMBz, PMBz-C=O, Boc-C=O); 171.14 (Lactam-C=O).

MS (ESI⁺): 507 [M+H] (100%)

Mikroanalyse: kalkuliert für $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_5$: C 61.66, H 5.93, N 16.60

gefunden: C 61.75, H 6.01, N 16.69

Herstellung von 9-[(S,S,S)-2-(Tert.-butoxycarbonyl)amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-6-N-p-methoxybenzoyl-adenin (16)

1. Durchführung

[0072] Ein 500 ml Zweihalsrundkolben wurde mit 5.25 g PMBzBoc-A-lactam 15f (10.36 mmol) und 200 ml THF beladen. Nach dem Abkühlen auf 0°C, wurde eine Lösung von 2.17 g $\text{LiOH} \times \text{H}_2\text{O}$ (51.8 mmol) in 50 ml H_2O über einen Zeitraum von 20 min. tropfenweise hinzugegeben.

[0073] Danach wurden 30 ml MeOH hinzugegeben, das Eisbad wurde entfernt und die Reaktionsmischung wurde für eine 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde ein Ionenaustauscherharz (Amberlite IR-120, H⁺-Form) hinzugegeben bis ein pH von 7 erreicht wurde. Das Harz wurde durch Filtration entfernt und die Lösung wurde unter reduziertem Druck auf ein Volumen von 100 ml konzentriert. Anschließend wurden 200 ml H_2O hinzugegeben und ein pH von 2 durch Zugabe von 1 M wäßriger HCl eingestellt. Die Lösung wurde mit EtOAc (3 × 200 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte über MgSO_4 getrocknet, filtriert und im Vakuum konzentriert. Der resultierende Rückstand wurde in 25 ml von heißem MeOH gelöst. Das Produkt wurde anschließend durch Zugabe von 10 ml H_2O ausgefällt. Das Präzipitat wurde filtriert, mit H_2O gewaschen und über P_4O_{10} getrocknet, um 1.95 g 16 zu ergeben. Weitere 0.57 g konnten von der Mutterlösung und den Waschlösungen erhalten werden, um eine Gesamtausbeute von 46% zu ergeben.

2. Analytische Daten

Schmp.: 238-239°C

TLC: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10:1, R_f 0.39

$[\alpha]_D^{20}$: +19.9° (c 0.55, MeOH)

UV(MeCN/ H_2O): λ_{max} 290 (22722)

IR: 3368m, 2939w, 1710m, 1683s, 1608s, 1577m, 1528m, 1507m, 1458m, 1306m, 1250s, 1175s, 1030w, 842w, 761w.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, d_6 -DMSO): 1.08 (s, 9H, tert.-Bu); 1.09-1.40 (m, 2H); 1.80-2.35 (m, 7H); 3.86 (s, 3H, OMe); 4.07, 4.36 (2 br. m, 2H, H-C(1 \Rightarrow) H-C(2 \Rightarrow)); 6.87 (br. s, 1H, NHBoc); 7.06-7.09 (m, 2H, PMBz-H); 8.00-8.05 (m, 2H, PMBz-H); 8.42, 8.86 (2 s, 2H, H-C(2); H-C(8)); 10.88 (s, 1H, H-NC(6)).

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): 27.73 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 30.35, 30.46, 37.95 ($\text{C}(3\equiv)$, $\text{C}(5\equiv)$, $\text{C}(6\equiv)$); 32.89 ($\text{C}(4\equiv)$); 40.32 ($\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$); 51.30 ($\text{C}(2\equiv)$); 55.38 (OMe); 77.45 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 113.55 (PMBz); 125.24 ($\text{C}(5)$); 125.63 (PMBz); 131.41 (PMBz); 143.48 ($\text{C}(8)$); 150.03 ($\text{C}(4)$); 150.69 ($\text{C}(2)$); 152.38 ($\text{C}(6)$); 154.53, 162.38, 164.77 (PMBz, PMBz-C=O, Boc-C=O); 173.36 (CO_2H).

MS (ESI⁺): 525 [M+H] (100%)

Mikroanalyse: kalkuliert für $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_6$: C 59.53, H 6.15, N 16.02

gefunden: C 59.35, H 6.32, N 15.89

Beispiel 3

Synthese eines Oligomers mit der Sequenz ATATA

[0074] Als polymerer Träger wird ein Polyoxyethylen-(POE)-Polystyrol-Copolymer (Tentagel S HMB, 0,23 mmol/g) verwendet, das sowohl in wäßriger Lösung als auch in organischen Lösungsmitteln gute Quelleigenschaften besitzt. Die Aminoethylfunktionen des Polymers sind mit einem Hydroxymethyl-benzoyl-(HMB)-Linker derivatisiert; die Beladung mit dem ersten A-Baustein erfolgt unter Verwendung eines 5-fachen Überschusses nach der Methode des symmetrischen Anhydrids (Zugabe von 2.5 eq. DIC und 2.5 eq. DMAP) innerhalb von 20 h in DCM.

[0075] Es erfolgte schrittweise Verlängerung der Oligomerkette durch repetitive Zyklen, die aus Abspaltungen der temporären Boc-Schutzgruppen und Kupplungen der Boc-geschützten Monomer-Bausteine bestehen. Am Ende der Synthese wird die N-terminale Boc-Schutzgruppe mit 50% TFA/DCM abgespalten, das Oligomer wird mit 2 N HCl/MeOH vom HMB-Linker gespalten und mit HPLC für die weiteren Umwandlungsexperimente aufgereinigt.

[0076] Der Standard-Kupplungszyklus ist in der Tabelle beschrieben: die Boc-Schutzgruppe der Aminofunktion wird mit 50% TFA/DCM abgespalten (30 min), anschließend wird das Harz mit DCM gewaschen und mit 1 M DIEA/DMF neutralisiert und mit DMF aminfrei gewaschen. Die Kupplungen erfolgen jeweils nach Voraktivierung des Monomer-Bausteins (3 eq.) mit HATU (3 eq.) in DMF und unter Zusatz von 1 M DIEA/DMF (6 eq.) und 2 M Lutidin/DMF (12 eq.). Die Kupplungszeiten betragen 3 h bei Raumtemperatur. Nach Beendigung der Kupplungszyklen werden nicht-umgesetzte Aminofunktionen mit Essigsäureanhydrid (20 eq.) unter Pyridinzusatz (10 eq.) gecappt. Zur Reaktionskontrolle mittels HPLC wurden nach jedem Kupplungsschritt ein paar Harzkügelchen entnommen, die zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit 50% TFA/DCM behandelt wurden. Dann wurde das jeweilige Oligomer mit 2 N NaOH/MeOH (15 min, RT) abgespalten, die Abspaltlösung wurde mit HCl neutralisiert und per RP-HPLC analysiert.

[0077] Nach Beendigung der Synthese erfolgt die Abspaltung der Boc-entschützten Oligomeren vom HMB-Harz, wie gewohnt, mit 2 N NaOH/MeOH (15 min, RT). Die Abspaltung der p-Methoxybenzoyl-Schutzgruppen bei (A^{PMBz})-haltigen Oligomeren wird dadurch erreicht, daß die Abspaltungslösung 2.5 h bei 55 °C gehalten wird. Die Aufreinigung erfolgt nach der Neutralisation der Abspaltungslösung mit HCl durch RP-HPLC. Die isolierten HPLC-Fractionen der Syntheseprodukte wurden mit analytischer HPLC auf ihre Reinheit überprüft, mit Elektrospray(ESI)-Massenspektrometrie eindeutig charakterisiert, und eine reversible UV-Umwandlungskurve bei 265 nm ($c_{\text{ATATA}} = 27,9 \mu\text{M}$ in 5 mM Tris/HCl; pH 7,0) aufgenommen ([Fig. 4.](#)), womit die Eignung als Paarungssystem bewiesen ist.

ATATA:

Mber= 1361,0 (M+H)gef= 1362,0

tR = 14,1 min (10 bis 40 % Acetonitril in 0,1 %iger TFA in Wasser in 30 min)

Absorptionsmaximum: 263 nm

Tabellarische Übersicht zu den Kupplungen:

Operation	Reagenz/Lsg.mittel	Volumen	Zeit
1. Deblockierung	50% TFA/DCM	150 µl	1 x 5 min 1 x 25 min
2. Waschen	DCM	150 µl	5 x (im Durchfluß)
3. Neutralisation	1 M DIEA/DMF	75 µl	1 x (im Durchfluß)
4. Waschen	DMF	150 µl	5 x (im Durchfluß)
5. Kupplung	Baustein/HATU/DMF	80 µl	180 min (Schütteln)
	1 M DIEA/DMF	12 µl	
	2 M Lutidin/DMF	12 µl	
6. Waschen	DMF	150 µl	3 x (im Durchfluß)
7. Analytik mit HPLC: Probeabspaltung mit 2 N NaOH/MeOH (15 min, RT)			
8. Capping	Ac ₂ O	10 µl	20 min (Schütteln)
	Pyridin	10 µl	
	DCM	100 µl	
9. Waschen	DCM	150 µl	5 x (im Durchfluß)

Beispiel 4

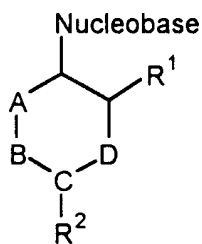
Reversible Bildung eines homodimeren Peptids

[0078] Analog Beispiel 3 wird eine Sequenz AATAT an der Festphase aufgebaut, und an diesen Paarungsabschnitt ein Boc-Lysin(Fmoc)-Baustein gekuppelt. Mit 40 % Piperidin in DMF wird die Fmoc-Gruppe abgespalten, mit DMF gewaschen und dann mit Jodessigsäure (20 eq.) und DIC (20 eq.) in DMF versetzt. Nach 15 h bei RT. wird die Lösung abfiltriert, das Harz mit DMF gewaschen und mit dem Peptid CYSKVG (50 eq.) in DMF versetzt. Man beläßt 15 h bei RT., filtriert die Lösung ab und wäscht das Harz mit DMF und MeOH. Man spaltet mit 2 M NaOH wäßrig mit MeOH (1:1) vom Harz ab und erhitzt die Abspaltlösung 2.5 h auf 55 °C. Nach Abkühlen neutralisiert man mit 2 M Salzsäure und isoliert das Produkt mit RP-HPLC (10 bis 40 % Acetonitril in 0,1 %iger TFA in Wasser in 30 min). Die Produktfraktion (V = 3 ml) wird im Vakuum vom Acetonitrilanteil befreit und auf 500 µl wäßrige Lösung eingengt. Diese Lösung wurde über eine SepPak Plus C 18-Cartridge (Waters) entsalzt, und auf 1 ml wäßrige Lösung eingestellt. Die Konzentration des Oligomers betrug c = 140 µmol/l (aus E = 1,004 bei 265 nm, gemessen bei 70 °C).

[0079] Die UV-Umwandlungskurve einer 10 µmolaren Lösung zeigte, daß unterhalb der Raumtemperatur die Substanz als einheitliches Homodimer vorliegt, während oberhalb von 40 °C kein Homodimer nachgewiesen werden kann. Dieses Gleichgewicht ist reversibel, der Anteil an Homodimer kann durch Wahl der Temperatur und der Konzentration eingestellt werden.

Patentansprüche

1. Verbindung der Formel I



(I)

worin R^1 gleich NR^3R^4 , OR^3 oder SR^3 ist mit R^3 und R^4 unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, H oder C_nH_{2n+1} , wobei n gleich eine ganze Zahl von 1-12 ist;

R^2 gleich $C_mH_{2m}-C(X)-Y$ mit X gleich $=O$, $=S$ oder $=N$ ist; Y gleich OR^3 , NR^3R^4 oder SR^3 ist, wobei R^3 und R^4 die oben genannte Bedeutung haben, vorzugsweise ist X gleich NR^3R^4 und OR^3 , insbesondere NR^3R^4 , vor allem NH_2 ; und m eine ganze Zahl von 1-4, oder

R^2 gleich $C_mH_{2m}-Z-Y'$ ist mit Z gleich eine Sulfonyl-, Phosphonyl-, Ether- oder Amin-Gruppe, wobei, wenn Z gleich eine Sulfonyl- oder Phosphonyl-Gruppe, Y' gleich H, C_nH_{2n+1} , OR^3 , NR^3R^4 oder SR^3 ist, wobei n, R^3 und R^4 die oben genannte Bedeutung haben, und, wenn Z gleich eine Ether- oder Amin-Gruppe, Y' gleich C_nH_{2n+1} , ist;

A, B und D unabhängig voneinander, gleich oder verschieden, CR^5R^6 , O, NR^7 oder S bedeuten mit R^5 , R^6 , R^7 unabhängig voneinander H oder C_nH_{2n+1} , wobei n die oben genannte Bedeutung hat; und

C gleich CR^8 oder N bedeutet mit R^8 unabhängig davon die Bedeutung von R^5 , wobei jedoch A-B, B-C oder C-D nicht zwei gleiche Heteroatome bedeuten; und

Nucleobase Thymin, Uracil, Adenin, Cytosin, Guanin, Isocytosin, Isoguanin, Xanthin oder Hypoxanthin bedeutet.

2. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß R^1 gleich NR^3R^4 oder OR^3 ist und R^2 gleich $C_mH_{2m}-C(X)-Y$ mit X gleich NR^3R^4 oder OR^3 und Y gleich OR^3 oder NR^3R^4 ist.

3. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß R^1 gleich NH_2 und R^2 gleich $CH_2-CO-OH$ ist.

4. Verbindung nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß sie ausgewählt ist aus einer [2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-Nucleobase.

5. Verbindung nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß sie ausgewählt ist aus 1-[2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-thymin, 1-[2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-uracil, 1-[2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-cytosin, 9-[2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-adenin oder 9-[2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-guanin.

6. Verbindung nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung enantiomerenrein ist.

7. Verbindung nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß R^1 und/oder die Nucleobase mit Schutzgruppen versehen ist.

8. Verbindung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Schutzgruppen ausgewählt sind aus BOC-, BOM-, FMOC-, Ether- oder Acetalschutzgruppen.

9. Verbindung nach einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, daß die Nucleobase äquatorial angeordnet ist.

10. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß ein Jodcycloalkan an eine geschützte Nucleobase gekoppelt wird.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Jodcycloalkan ein Jodlactam ist.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß in weiteren Schritten das Lactam aus dem vorhergehenden Schritt aktiviert wird, und anschließend der Lactamring nucleophil geöffnet wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10-12, dadurch gekennzeichnet, daß das Jodcycloalkan enantiomerenrein vorliegt.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10-13, dadurch gekennzeichnet, daß das Jodcycloalkan an eine geschützte Nucleobase in Anwesenheit eines Hydrids gekoppelt wird.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11-14, dadurch gekennzeichnet, daß das Lactam durch Einführen einer Schutzgruppe aktiviert wird.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 11-15, dadurch gekennzeichnet, daß der Lactamring gemäß Schritt (c) durch ein Hydroperoxid nucleophil geöffnet wird.
17. Oligomer enthaltend eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1-9.
18. Oligomer nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich mindestens einen Linker enthält.
19. Oligomer nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker ein Lysin-Linker ist.
20. Oligomer nach einem der Ansprüche 17-19, dadurch gekennzeichnet, daß es mit einem aktivierten Linker derivatisiert ist.
21. Oligomer nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß der aktivierte Linker Jodacetylsuccinimid und/oder Bis(hydroxysuccinimidyl)glutarat ist.
22. Konjugat enthaltend ein Oligomer gemäß einem der Ansprüche 17-21 und ein Biomolekül.
23. Konjugat nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß das Biomolekül ein Peptid, Peptoid, Protein, Zellbestandteil, Filamentbestandteil, oder eine Nucleinsäure, und Derivate davon ist.
24. Träger, dadurch charakterisiert, daß daran mindestens eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1-9, mindestens ein Oligomer gemäß einem der Ansprüche 17-21 und/oder mindestens ein Konjugat gemäß Anspruch 22 oder 23 immobilisiert ist.
25. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1-9, eines Oligomers gemäß einem der Ansprüche 17-21, eines Konjugates gemäß Anspruch 22 oder 23 und/oder eines Trägers gemäß Anspruch 24 in einem Paarungs- und/oder Testsystem.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

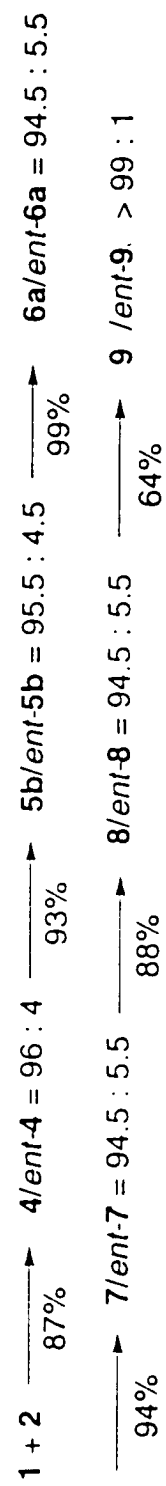
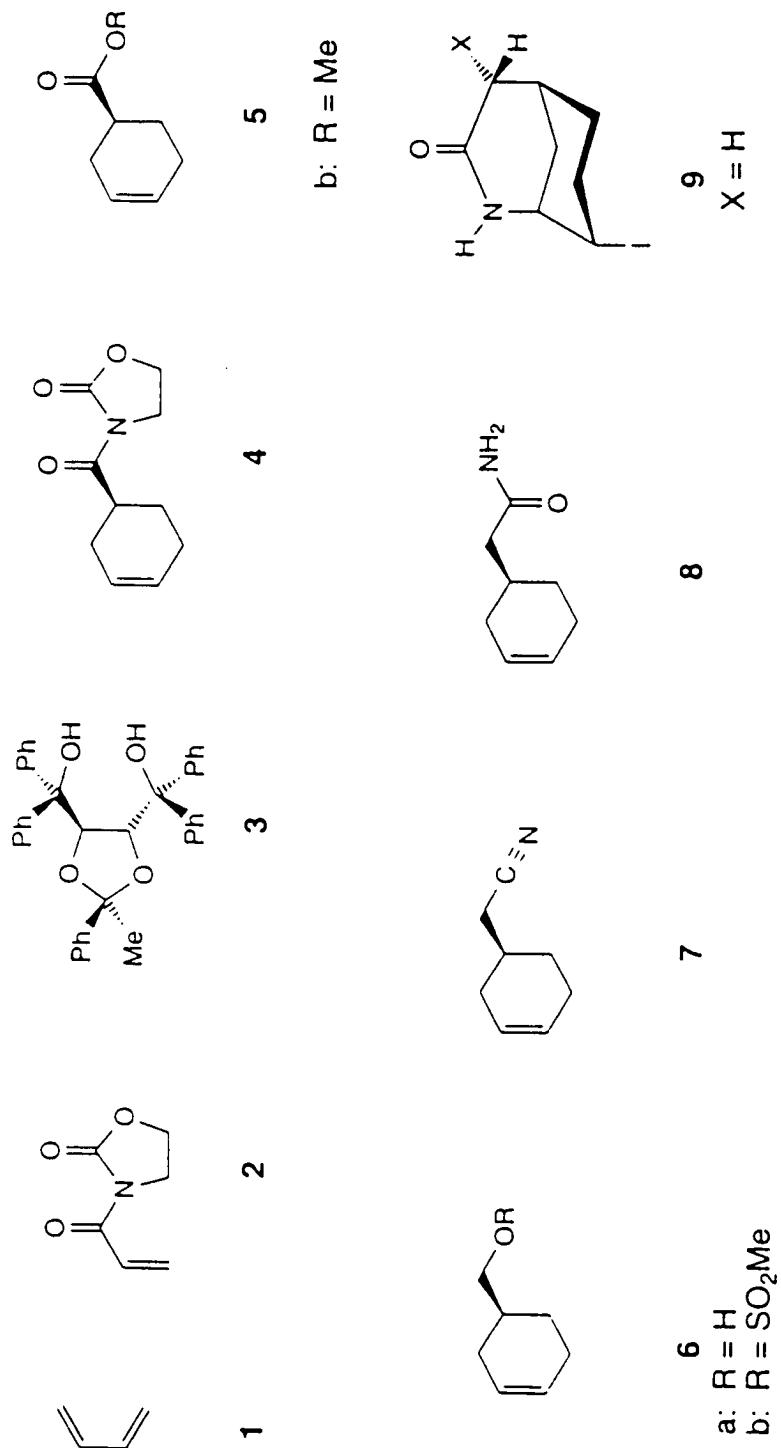


Fig. 1

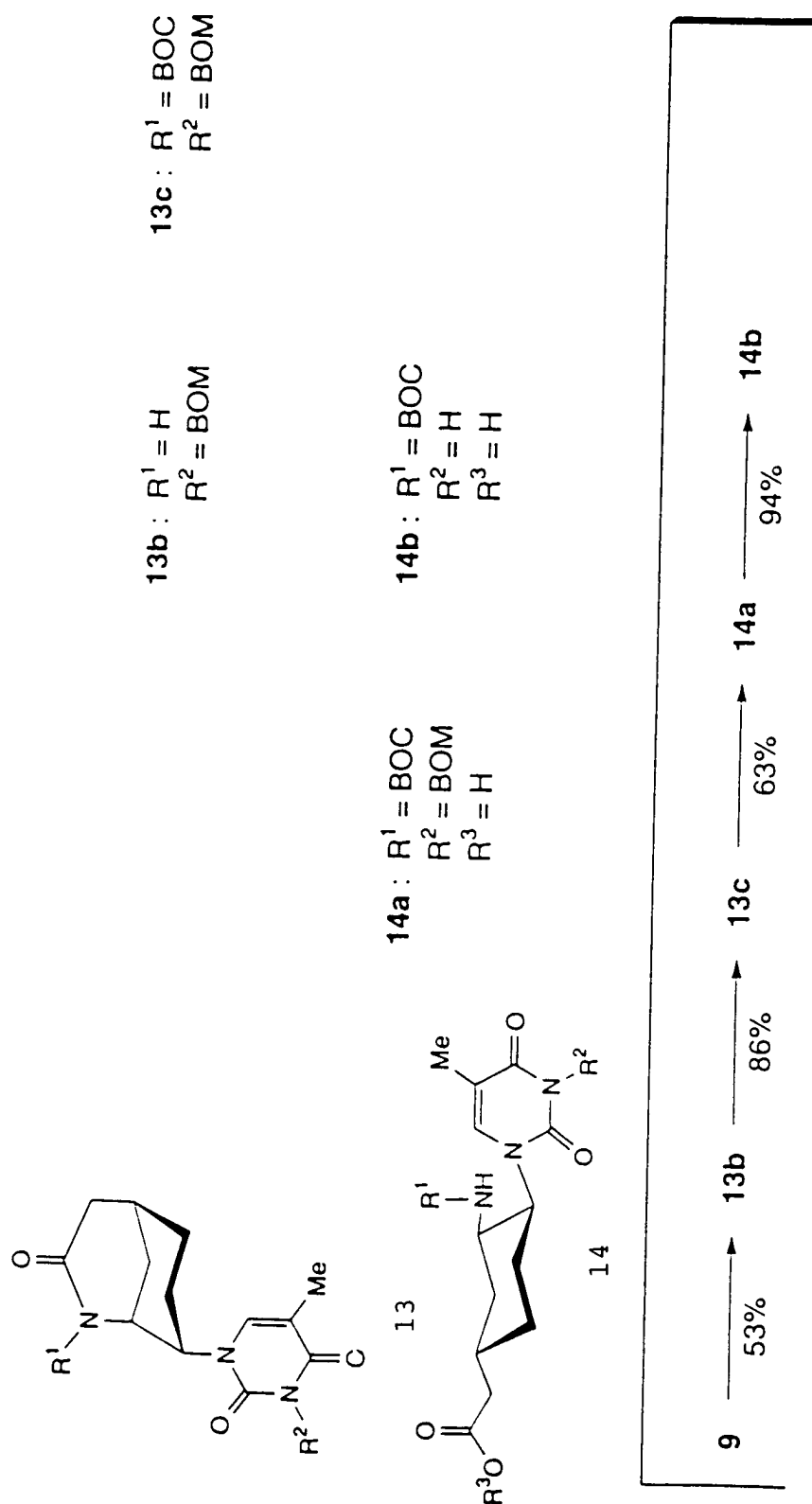
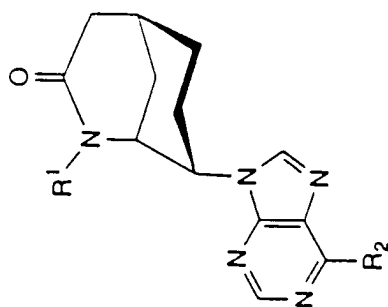


Fig. 2



15a : $R^1 = H$; $R^2 = HN-CO-Ph$

15b : $R^1 = H$; $R^2 = NH_2$

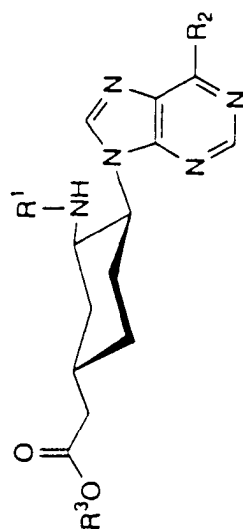
15c : $R^1 = H$; $R^2 = N=C-(NMe_2)_2$

15d : $R^1 = Boc$; $R^2 = N=C-(NMe_2)_2$

15e : $R^1 = Boc$; $R^2 = NH_2$

15f : $R^1 = Boc$; $R^2 = NH-CO-C_6H_4-OMe$

15



16

$R^1 = Boc$; $R^2 = NH-CO-C_6H_4-OMe$; $R^3 = H$

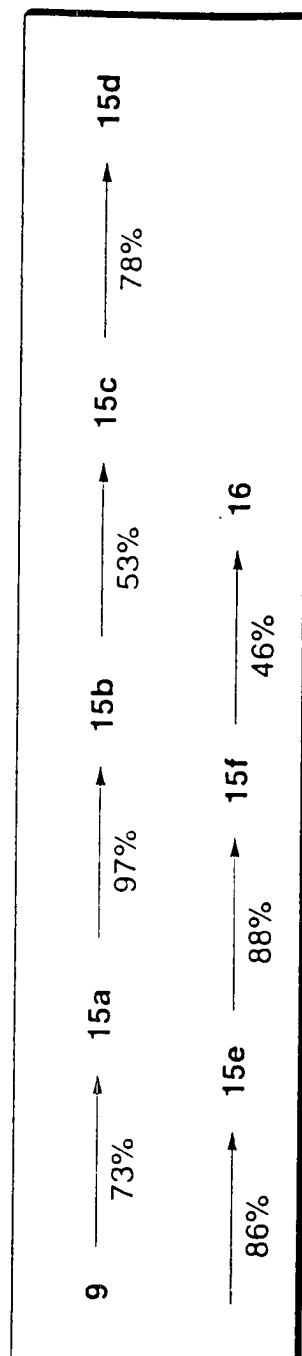


Fig. 3

Fig. 4

