



# **Totalsynthese chemisch stabilisierter und lipophil maskierter NAADP-Derivate**

Total synthesis of chemically stabilized and lipophilic masked NAADP derivatives

## **Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

*Dr.rer.nat.*

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Chemie, Institut für Organische Chemie

der Universität Hamburg

Von

**Melanie Hofmann**

Hamburg

2025



Die vorliegende Arbeit wurde an der Universität Hamburg im Institut für Organische Chemie am Fachbereich Chemie im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Chris Meier in Kooperation mit dem SFB1328 '*Adenine Nucleotides in Immunity and Inflammation*' im Zeitraum von Mai 2020 bis Dezember 2024 angefertigt.



**1. Gutachter:** Prof. Dr. Chris Meier

**2. Gutachter:** Prof. Dr. Ralph Holl

Datum der Disputation: 11.04.2025

Druckfreigabe: 07.05.2025



"Everyone you meet is fighting a battle you know nothing about. Be kind. Always."

Robin Williams

1951 - 2014



## Inhaltsverzeichnis

<b>Publikationsverzeichnis</b> .....	I
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	II
<b>1 Zusammenfassung</b> .....	1
<b>2 Abstract</b> .....	5
<b>3 Einleitung</b> .....	8
<b>4 Kenntnisstand</b> .....	11
4.1 Zellkommunikation .....	11
4.2 Signalkaskade .....	14
4.3 Calciumionen als <i>second messenger</i> .....	14
4.4 Intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung.....	16
4.5 Methoden der NAADP-Applikation in Zellen.....	29
4.5.2 AB/ACB-Prodrug-Maskenkonzept.....	33
4.5.3 MASTER-NAADP .....	35
<b>5 Aufgabenstellung</b> .....	39
<b>6 Resultate und Diskussion</b> .....	42
6.1 Synthese des Thiazol-NAADP-Derivats .....	42
6.2 Synthese des Thiazol-NADP-Derivats.....	51
6.3 Synthese der Thiazol-Derivate mit ACB-Maskierung.....	55
6.4 Synthese der 5-Pyridin-Verbindung .....	71
6.5 Synthese der 3'-F-MASTER-NADP Referenzverbindung .....	93
6.6 Synthese eines carbocyclischen NAADP-Derivat.....	100
6.7 Synthese eines Nicotinsäure-Mononucleotids.....	113
6.8 Fazit.....	117
<b>7 Experimenteller Teil</b> .....	119
<b>7.1 Edukte und Reagenzien</b> .....	119
<b>7.2 Chromatographie</b> .....	120
<b>7.3 Spektroskopie und Spektrometrie</b> .....	122

<b>7.4 Weitere Geräte</b> .....	123
<b>7.5 Bioanalytische Methoden und Hydrolysestudien</b> .....	123
7.5.1 Hydrolysestudien in PBS Puffer.....	123
7.5.2 Hydrolysestudien in Zellextrakten.....	124
7.5.3 Bestimmung der Hydrolysehalbwertszeit.....	124
<b>7.6 Synthesen</b> .....	125
7.6.1 Synthese des Thiazol-AB-NAADP-Derivats 27.....	125
7.6.2 Synthese der Thiazol-ACB-NAADP-Verbindung 60.....	137
7.6.3 Synthese der Thiazol-ACB-NADP-Verbindung 64.....	142
7.6.4 Synthese des 5-Pyridin-ACB-NAADP-Derivats 68.....	150
7.6.5 Synthese des 5-Pyridin-ACB-NADP-Derivats 88.....	163
7.6.6 Synthese des 3'-F-MASTER-NADP-Derivats 31.....	168
7.6.7 Synthese des carbocyclischen NAADP-Derivats 106.....	178
7.6.8 Synthese des Nicotinsäure-mononucleotid 124.....	191
<b>8 Gefahrenstoffverzeichnis</b> .....	194
<b>9 Literaturverzeichnis</b> .....	204
<b>10 Anhang</b> .....	219
<b>10.1 Hydrolysestudien der Thiazol-Verbindungen 60 und 64</b> .....	219
<b>10.2 Hydrolysestudien der 5-Pyridin-Verbindungen 68 und 88</b> .....	221
<b>11 Danksagung</b> .....	223
<b>12 Eidesstattliche Erklärung</b> .....	225

## Publikationsverzeichnis

- P1 S. Krukenberg, F. Möckl, M. Weiß, P. Dekiert, M. Hofmann, F. Gerlach, K. J. Winterberg, D. Kovacevic, I. Khansahib, B. Troost, M. Hinrichs, V. Granato, M. Nawrocki, T. Hub, V. Tsvilovskyy, R. Medert, L.-M. Woelk, F. Förster, H. Li, R. Werner, M. Altfeld, S. Huber, O. B. Clarke, M. Freichel, B.-P. Diercks, C. Meier, A. H. Guse, MASTER-NAADP: a membrane permeable precursor of the Ca<sup>2+</sup> mobilizing second messenger NAADP, *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 8008.

## Poster und Präsentationen

- P2 S. Krukenberg, F. Möckl, M. Weiß, M. Hofmann, B. Diercks, A. H. Guse, C. Meier, *Total Synthesis of MASTER-NAADP Derivatives*, International Round Table (IRT), Poster, **2024**, Tokyo, Japan.
- P3 M. Hofmann, S. Krukenberg, *Total Synthesis of MASTER-NAADP Derivatives*, **2023**, Poster und Präsentation, SFB Retreat, Bad Segenbergr.
- P4 S. Krukenberg, M. Hofmann, *Total Synthesis of MASTER-NAADP Derivatives*, **2022**, Poster, SFB Retreat, Timmendorfer Strand.
- P5 M. Hofmann, S. Krukenberg, P. Dekiert, *Total Synthesis of membrane permeable NAADP analogues*, **2021**, Poster, SFB Retreat, Timmendorfer Strand.

## Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
AB	Acyloxybenzyl
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ACB	Alkoxy-carbonyloxybenzyl
AcOH	Essigsäure
Ac <sub>2</sub> O	Essigsäureanhydrid
Ac	Acetyl
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AM	Acetyloxymethylester
ANRORC	<i>Addition of the Nucleophile, Ring Opening, and Ring Closure in nucleophilic attack on ring systems</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Äquiv.	Moläquivalent
BAB	Bis[Acyloxybenzyl]-Ester
ber.	berechnet
Bn	Benzyl
BSA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)acetamid
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
cADPR	cyclische Adenosindiphosphat-Ribose
CaM	Calmodulin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD38	ADP-Ribosylcyclase

## Abkürzungsverzeichnis

---

CD38 <sup>-/-</sup>	CD38- <i>knock-out</i>
CDCl <sub>3</sub>	Deuterochloroform
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CICR	<i>Calcium-induced calcium release</i>
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
CICF	Ca <sup>2+</sup> -induzierte Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung
δ	chemische Verschiebung (NMR)
d	Dublett
DAG	Diacylglycerol
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCI	4,5-Dicyanoimidazol
demin.	demineralisiert
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Hexadeuterodimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
D <sub>2</sub> O	Deuteriumoxid
DUOX	<i>Dual oxidase</i>
EE	Ethylacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-HR	<i>electrospray ionization – high resolution</i> (Massenspektrometrie)
ES-Komplex	Enzym-Substrat-Komplex
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
Fm	Fluorenylmethyl
GAP	GTPase aktivierendes Proteinen

## Abkürzungsverzeichnis

---

GDP	Guanosin-5'-diphosphat
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
GLC-6-P-DH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GPCRs	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluor-phosphat
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluoro-phosphat
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HN1L	<i>Hematological and neurological expressed 1-like protein</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HR	<i>High Resolution</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IL-2	Interleukin-2
IMP	Inosin-5'-monophosphat
IMPDH	Inosin-5'-monophosphat-Dehydrogenase
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
IP <sub>3</sub> R	IP <sub>3</sub> -Rezeptor
IR	Infrarotspektroskopie
<i>J</i>	skalare Kern-Kern-Kopplungskonstante (NMR)
JAK	Janus Kinase
JPT2	<i>Jupiter microtubule associated homolog 2</i>
KO	<i>knock-out</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

konz.	konzentriert
LGIC	<i>Ligand-gated ion channels</i>
LogP	dekadischer Logarithmus des Verteilungskoeffizienten P
Lsm.	Lösungsmittel
Lsm12	<i>Sm-like protein</i>
m	Multiplett
MASTER	<b><i>membrane permeable stabilized bioreversible protected</i></b>
max.	maximal
MCU	<i>Ca<sup>2+</sup>-Uniporter</i>
MeOD-d <sub>4</sub>	deuteriertes Methanol
MeOH	Methanol
mind.	mindestens
MS	Massenspektrometrie
NAADP	Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NCX	Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -ATPasen
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
NP	Normalphase
Nr.	Nummer
ns	Nicht signifikant
p	<i>page</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PE	Petrolether

## Abkürzungsverzeichnis

---

pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Ph	Phenyl
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Ca <sup>2+</sup> -abhängigen Proteinkinase C
PLC	Phosphoinositid-Phospholipase C
PMCA	Ca <sup>2+</sup> -ATPasen
ppm	<i>parts per million</i>
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
RP	<i>reversed phase</i>
RT	Raumtemperatur
Ru Red	<i>ruthenium red</i>
RyR	Ryanodin-Rezeptor
S.	Seite
s.	siehe
s	Singulett
Sdp.	Siedepunkt
SERCA	SR Ca <sup>2+</sup> -ATPasen
Smp.	Schmelzpunkt
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i> (Transkriptionsfaktor)
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TAD	Thiazoladeninedinucleotid

## Abkürzungsverzeichnis

---

TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TCR	T-Zell-Rezeptor
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMSOTf	Trimethylsilyltrifluormethansulfonat
TREAT-HF	Triethylamintrihydrofluorid
tRNA	Transfer-Ribonucleinsäure
TRP-ML	<i>Transient Receptor Potential Cation Channel, Mucolipin Subfamily</i>
TPC	<i>Two-Pore Channels</i>
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenverhältnis
verunr.	verunreinigt
z. B.	zum Beispiel



### 1 Zusammenfassung

Das Zusammenspiel einer Vielzahl von biologischen und chemischen Prozessen ermöglicht es einem Organismus auf äußere Reize zu reagieren und ihn vor einer großen Anzahl verschiedenster Erreger, wie Bakterien, Pilze oder Viren, zu schützen. Diese Pathogene können durch sogenannte Antigene, die an Antikörper oder spezielle Rezeptoren binden, vom Immunsystem als Fremdkörper erkannt werden. Dadurch wird anschließend eine Immunantwort eingeleitet. Die daran beteiligten Zellen müssen währenddessen eine Vielzahl an Informationen simultan verarbeiten. Die Signaltransduktion beschreibt dabei den Vorgang, bei dem ein extrazelluläres Signal über die Zellmembran in das Zellinnere vermittelt wird. Innerhalb der Zelle kann ein solches Signal anschließend über eine Signalkaskade, an der *second messenger*, Rezeptoren und andere Enzyme beteiligt sein können, amplifiziert werden (Kapitel 4.2). Dabei werden Vorgänge wie die Aktivierung der Proliferation von T-Zellen und die Zytokinproduktion eingeleitet, was zur weiteren Differenzierung der T-Zellen führt. Einer dieser *second messenger* ist das Nicotinsäureadeninucleotidphosphat (NAADP), welches bereits 1987 als potentester  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzender Botenstoff entdeckt wurde.<sup>[1]</sup> Untersuchungen zeigten, dass die Injektion von NAADP in T-Lymphozyten dosisabhängig unterschiedliche Arten von Signalen erzeugt. Eine Injektion von 30 nM hatte ein lokales subzelluläres Signal zur Folge, wohin bei einer Gabe von 50-100 nM eine globale  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung gemessen wurde.<sup>[2][3]</sup> Der Calcium-Freisetzungsmechanismus durch NAADP wurde in den letzten Jahren besonders in der Arbeitsgruppe um GUSE erforscht. Dabei konnten die Bindepoteine hämatologisch und neurologisch exprimiertes 1-ähnliches Protein/Jupiter Mikrotubuli assoziiertes Homolog 2 (Hn1L/JPT2) und das von ZHAN *et al.* entdeckte Lsm12 identifiziert werden, die nach Komplexierung von NAADP den Ryanodin-Rezeptor (RyR) sowie die Kationenkanäle TCP1 bzw. TPC2 (*two-pore channel*) binden können und eine Calciumfreisetzung aktivieren (Kapitel 4.4.5).<sup>[4][5]</sup> Eine der bedeutendsten Herausforderungen bei der Untersuchung solcher Zellprozesse stellt die Verwendung geeigneter Methoden für die zelluläre Aufnahme des NAADP dar. Die etablierten Verfahren, wie die Mikroinjektion, die Elektroporation oder die *Patch-Clamp*-Methode, führen zu einer Schädigung der Zellmembran und sind aufgrund ihrer Anwendung als einzelzellbasierte Techniken anspruchsvoll und zeitintensiv. Weiterhin können diese invasiven Methoden eine stressbedingte Calciumfreisetzung der Zelle auslösen, was die Wahrscheinlichkeit für falsch-positive Ergebnisse oder störende Artefakte erhöht.<sup>[6]</sup> In diesem Jahr wurde in unserer Gruppe in Zusammenarbeit mit der Gruppe um GUSE ein membran-permeables 3'-F-

MASTER-NAADP-Derivat vorgestellt, welches aufgrund lipophiler Maskierung passiv durch die Zellmembran diffundieren kann (Kapitel 4.6).<sup>[7]</sup>

Intrazellulär können diese Maskierungen enzymatisch gespalten werden, wodurch das bioaktive NAADP-Derivat freigesetzt und somit eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalkaskade ausgelöst werden kann.<sup>[7]</sup> Das MASTER-NAADP-Derivat besitzt im Gegensatz zum nativen NAADP im ehemaligen Nicotinsäurebaustein eine C-glycosidische Bindung, welche die labile N-glycosidische Bindung ersetzt. Zudem wurde am Adenosin-Baustein ein 3'-Fluorsubstituent eingeführt, welcher als Bioisoster der nativen Hydroxyfunktion einen 2',3'-Phosphatshift verhindern soll. Auf Grundlage dieses MASTER-NAADPs sollten weitere Derivate entwickelt werden, die für biologische Untersuchungen genutzt werden können.

Das erste Derivat, welches in dieser Arbeit entwickelt wurde, ist ein Thiazol-modifiziertes NAADP, welches anstelle der Nicotinsäure einen Thiazol-Ring trägt (Kapitel 6.1). Die Carbonsäure und die 2'-Phosphatgruppe des Adenosin-Bausteins wurden dabei mit **A**cyloxy**b**enzyl-, bzw. **A**lkoxycarbonyl-oxy**b**enzyl-Masken (AB/ACB) versehen, welche die Lipophilie durch lange aliphatische Reste verbessern. Der Thiazol-Baustein wurde zunächst durch die Bildung des Thiazol-Rings an der Ribose aufgebaut. Anschließend konnte die lipophile AB-Maske an die Carbonsäure gekuppelt werden. Nach einer selektiven 5'-Monophosphorylierung konnte der Baustein erfolgreich an das 3'-OMe-Adenosin-5'-monophosphat von KRUKENBERG gekuppelt werden. Für die Kupplung wurde das 3'-OMe-Adenosin-5'-monophosphat anstelle des 3'-F-Adenosin-5'-monophosphats ausgewählt, da es in biologischen Untersuchungen zur Calciumfreisetzung vergleichbare Ergebnisse zeigte, jedoch synthetisch besser zugänglich ist. Zur Untersuchung der passiven Diffusion und der calciumfrei-setzenden Eigenschaften sollte eine Nicotinamidadeninukleotidphosphat-Referenz (NADP) synthetisiert werden. Es wurde jedoch festgestellt, dass die Synthese einer Amino-AB-Maske nicht möglich war, da die Alkylkette während der Reaktion gespalten wurde (Kapitel 6.2.1). Entsprechend wurde auf die Verwendung der etablierten ACB-Maskierungsstrategie zurückgegriffen, da diese chemisch stabiler sind.<sup>[8]</sup> Die chemische Stabilität sowie die enzymatisch induzierte Freisetzung der Derivate konnte in Hydrolysestudien mit Schweineleberesterase (*pig liver esterase*, PLE) beobachtet werden. In jeweils 11 Syntheseschritten konnten so die Derivate erhalten und für biologische Untersuchungen verwendet werden. Bei der Untersuchung der calciumfrei-setzenden Eigenschaften wurde beobachtet, dass das Thiazol-NAADP-Derivat keine aktivierende Wirkung hat (Kapitel 6.3). Durch erste Tests wird jedoch vermutet, dass die Calciumfreisetzung durch eine antagonistische Wirkung des Derivats gehemmt wird.

Ein weiteres Derivat ist das 5-Pyridin-NAADP-Derivat, welches neben der C-glycosidischen Bindung ein Stickstoff im Aromaten trägt (Kapitel 6.4). Eine Herausforderung in der Synthese war die Kupplung zwischen dem Bromnicotinsäurebaustein und der Ribose, die durch Verwendung eines Turbo-Grignard-Reagenzes gelöst werden konnte. Anschließend wurde die Carbonsäure mit einer ACB-Maske gekuppelt und die 5'-Position via YOSHIKAWA-Reaktion selektiv monophosphoryliert. Folgend wurde das Monophosphat mit dem 3'-OMe-Adenosin-Derivat erfolgreich gekuppelt. Bei der Synthese der NADP-Referenz erfolgte nach der Turbo-Grignard-Reaktion die Kupplung an die Amino-Carbonat-Maske. Beide Zielverbindungen konnten in jeweils 12 Syntheseschritten erfolgreich dargestellt werden und wurden anschließend auf ihre chemische und enzymatische Stabilität untersucht. Die biologischen Untersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe um GUSE durchgeführt, wobei eine Calciumfreisetzung beobachtet wurde.

Darüberhinaus sollte ein weiteres NADP-Derivat synthetisiert werden, welches in biologischen Untersuchungen die Referenz für das 3'-F-MASTER-NAADP darstellen sollte. Dabei handelt es sich um das 3'-F-MASTER-NADP-Derivat, welches einen Benzolring mit einer Amino-Carbonatmaske trägt (Kapitel 6.7). Das Adenosin-Derivat wurde von KRUKENBERG synthetisiert und hat neben den 2'-Phosphat-AB-Masken einen 3'-F-Substituenten, um einen 2',3'-Phosphatshift zu vermeiden. Die Synthese erfolgte analog zu der Darstellung des 3'-F-MASTER-NAADPs von DEKIERT.<sup>[9]</sup> In Hydrolysestudien konnte eine gute Stabilität des Derivats bestimmt werden, weshalb es als Referenz-Verbindung für biologische Untersuchungen geeignet ist.

Ein weiteres Derivat, welches in dieser Arbeit synthetisiert wurde, ist das carbocyclische-NAADP (Kapitel 6.5). Die Synthese wurde bereits zuvor von DEKIERT durchgeführt, wobei sich eine ZINCKE-Reaktion als möglicher Weg der Kupplung zwischen der Nicotinsäure und dem Aminocyclopentan bewährte.<sup>[9]</sup> Dabei konnte jedoch das Produkt nicht mit einer Maske versehen werden, sodass die Carbonsäure einen großen Faktor in der Lipophilie und Membranpermeabilität darstellt. Anschließend wurde das carbocyclische Monophosphat synthetisiert, das zukünftig mit einem 3'-OMe-Adenosin-Derivat versehen werden könnte, das zwei AB-C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>-Schutzgruppen trägt, um eine erhöhte Lipophilie durch verlängerte Alkylkettenlänge zu gewährleisten. In sieben Syntheseschritten wurde das Monophosphat erfolgreich dargestellt und kann zukünftig an verschiedene Adenosin-Bausteine gekuppelt werden.

Ein weiterer Schritt, um möglichst nah an die Struktur des endogenen NAADP zu kommen, ist die Synthese eines 'natives'-NAADP-Derivats, bei dem die N-glycosidische Bindung wiedereingeführt wird (Kapitel 6.6). Dabei wurde auf die Maskierung der Carbonsäure

verzichtet, wobei analog zu dem carbocyclischen Derivat (Kapitel 6.5) eine Verlängerung der Alkylketten der 2'-Phosphat-AB-Masken zu der benötigten Lipophilsteigerung führen sollte. Dafür wurde zunächst das Nicotinsäure-Mononucleosid dargestellt, welches 5'-monophosphoryliert wurde, um es zukünftig an Adenosin-Bausteine mit unterschiedlichen Kettenlängen zu koppeln.

Zusammenfassend konnte die erfolgreiche Synthese von zwei NAADP-Derivaten sowie ihren NADP-Referenzverbindungen durchgeführt werden, welche in biologischen Untersuchungen Potenzial hinsichtlich ihrer calciumfreisetzenden beziehungsweise inhibitorischen Eigenschaften zeigten. Darüber hinaus wurden zwei Monophosphate für zukünftige Kuppelungen an lipophil-maskierte Adenosin-Bausteine dargestellt sowie das 3'-F-MASTER-NADP-Referenz-Derivat, welches in Hydrolyse-Studien eine gute Handhabbarkeit für biologische Untersuchungen zeigte.

## 2 Abstract

The interplay of a multitude of biological and chemical processes enables an organism to react to external stimuli and to protect itself against a variety of pathogens such as bacteria, fungi or viruses. The immune system facilitates the recognition of these invaders by antigens, which are bound by antibodies or special receptors, triggering an immune response. During this process, the cells involved must process a large amount of information simultaneously. Signal transduction describes the process by which an extracellular signal is transmitted across the cell membrane into the cell interior. Such a signal can then be amplified intracellularly a signaling cascade in which second messengers, receptors and other enzymes are often involved (Chapter 4.2). Triggering further processes that serve to protect the cell or the organism. One of these second messengers is nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP), discovered in 1987 as the most potent  $\text{Ca}^{2+}$ -releasing messenger substance.<sup>[1]</sup> Studies have shown that the injection of NAADP into T Lymphocytes produce different dose-dependent signals. An injection of 30 nM resulted in a local subcellular signal, whereas a global  $\text{Ca}^{2+}$ -release was measured with an administration of 50-100 nM.<sup>[2][3]</sup> The exact mode of action of NAADP has been investigated in more detail especially by the working group around GUSE. Recently, the binding proteins Hn1L/JPT2 and Lsm12 have been identified to play a major role, activating the ryanodine receptor and TPC1 or TPC2 after complexing NAADP, thus triggering a calcium release (Chapter 4.4.5).<sup>[4][5]</sup>

A key challenge in investigating such signaling pathways is the identification of suitable methods for the cellular uptake of NAADP. The established methods, including microinjection, electroporation and the patch-clamp method, are elaborate and time-consuming due to their application as single-cell-based techniques. Further, since these invasive methods damage the cell wall, they can also trigger a stress-induced calcium release increasing the probability of false-positive results or artefacts.<sup>[6]</sup> This year, our research group, in collaboration with the GUSE group, presented a lipophilic masked MASTER-NAADP derivative, which is able to penetrate cellular membranes by passive diffusion (Chapter 4.6).<sup>[7]</sup> Intracellularly, the bioreversible masking units can be enzymatically cleaved, releasing the bioactive NAADP derivative, thus being able to trigger  $\text{Ca}^{2+}$  release. In contrast to the native NAADP, the MASTER-NAADP has a C-glycosidic bond within the former nicotinic acid moiety, replacing the labile N-glycosidic bond for higher stability. In addition, a 3'-fluorine was introduced to the adenosine moiety, which, as a bioisoster of the native hydroxyl function, is intended to prevent a 2',3'-phosphate shift. Based on this initial structure motif, further

derivatives should be developed in the context of present work, optimizing the potential for the application in biological studies.

The first derivative developed in this work is a thiazole-modified NAADP, which provides a thiazole ring replacing the native nicotinic acid (Chapter 6.1). The carboxylic acid and the 2'-phosphate group of the adenosine moiety were masked with acyloxy or alkoxybenzyloxybenzyl masking units (AB/ACB), modulating the compounds lipophilicity due to the hydrophobic alkyl substituents. The thiazole building block was first synthesized by forming the thiazole ring on the ribose. The lipophilic AB mask was then coupled to the carboxylic acid. After selective 5'-monophosphorylation, the obtained building block was successfully coupled to the 3'-OMe adenosine-5'-monophosphate of KRUKENBERG. The 3'-OMe-adenosine-5'-monophosphate was chosen for coupling instead of the 3'-F-adenosine-5'-monophosphate, as it exhibited comparable results in biological studies concerning calcium release, while being more accessible synthetically. An NADP reference was also to be synthesized to investigate the capability of passive diffusion and  $\text{Ca}^{2+}$ -releasing properties, whereby it was recognized that the synthesis of an amino-AB-mask was not possible (Chapter 6.2.1). Therefore, the concept of ACB masking units was introduced, which provide a higher chemical stability than their AB representatives.<sup>[8]</sup> The chemical stability and the enzymatically induced release of the masked derivatives could be demonstrated in hydrolysis studies using pig liver esterase (PLE). In 11 synthesis steps each, the derivatives were successfully obtained. In the course of the investigation into the calcium-releasing properties, it was observed that the thiazole-NAADP derivative had no activating effect (Chapter 6.3). However, preliminary tests indicated that calcium release was being inhibited by an antagonistic effect of the derivative.

Another derivative synthesized is the 5-pyridine-NAADP, which provides an *N*-heterocycle in addition to the *C*-glycosidic bond within the former nicotinic acid moiety, imitating the electronic structure of its native representative (Chapter 6.4). One challenge in its synthesis was the coupling between the 5-bromonicotinic acid building block and the ribose, which could be solved using a Turbo-Grignard reaction. The carboxylic acid was then coupled with an ACB mask and the 5'-position was selectively phosphorylated via a YOSHIKAWA reaction. The monophosphate was then successfully coupled to the corresponding 3'-OMe adenosine-5'-monophosphate. In the synthesis of the NADP reference, coupling to the amino-carbonate was carried out after the Turbo-Grignard reaction. Both target compounds were successfully synthesized in 12 steps and subsequently tested for their chemical and enzymatic stability. The biological investigations were conducted within the working group of GUSE, where calcium release was observed.

Another derivative synthesized in this work is the carbocyclic-NAADP (Chapter 6.5). The synthesis was previously tested by DEKIERT and the ZINCKE reaction was found to be a possible route for coupling the nicotinic acid to an aminocyclopentane.<sup>[9]</sup> However, subsequent protection of the carboxylic acid with a lipophilic masking unit was not possible, thus providing a decisive influence on the compound's membrane permeability. Therefore, after synthesizing the carbocyclic monophosphate, it should be coupled to a 3'-OMe-adenosine-5'-monophosphate providing two AB-C<sub>11</sub>H<sub>23</sub> masking units, ensuring compensation of the carboxylic acid's hydrophilicity by an increased lipophilicity of the alkyl substituents. The monophosphate was successfully synthesized in seven steps and can be coupled to various adenosine building blocks in the future.

A further step to get as close as possible to the structure of the endogenous NAADP was the synthesis of a native NAADP derivative, by reintroduction of the *N*-glycosidic bond (Chapter 6.6). In this work, the masking of the carboxylic acid was omitted, since the synthesis already proved inaccessible in previous studies. Thus, as with the carbocyclic derivative described in Chapter 6.5, an extension of the alkyl chain length of the 2'-phosphate AB masking groups might result in a desired compensation for a sufficient lipophilicity. For this purpose, the nicotinic acid mononucleoside was first prepared by 5'-monophosphorylation and subsequently coupled to an appropriate adenosine building block.

The final objective of the present project was to synthesize an NADP derivative that would serve as a negative control for 3'-F-MASTER-NAADP in the context of biological studies. The 3'-F-MASTER-NADP derivative provides a benzene ring accompanied by an amino carbonate mask (Chapter 6.7). The adenosine building block, synthesized by KRUKENBERG, contains a 3'-F substituent in addition to the AB-masked 2'-phosphate to prevent a 2',3'-phosphate shift. Despite the coupling of the aminocarbonate mask, the synthesis was carried out according to a protocol from DEKIERT.<sup>[9]</sup>

In summary, two novel NAADP derivatives and their reference NADP compounds for negative control were successfully synthesized. Moreover, the preliminary biological data indicate that they provide promising potential for their application in studying cellular Ca<sup>2+</sup>-dependent signaling pathways. Furthermore, two monophosphates for future coupling to lipophilic-masked adenosine building blocks were synthesized, as well as the 3'-F-MASTER-NADP reference, demonstrated effective handling in hydrolysis studies for biological studies.

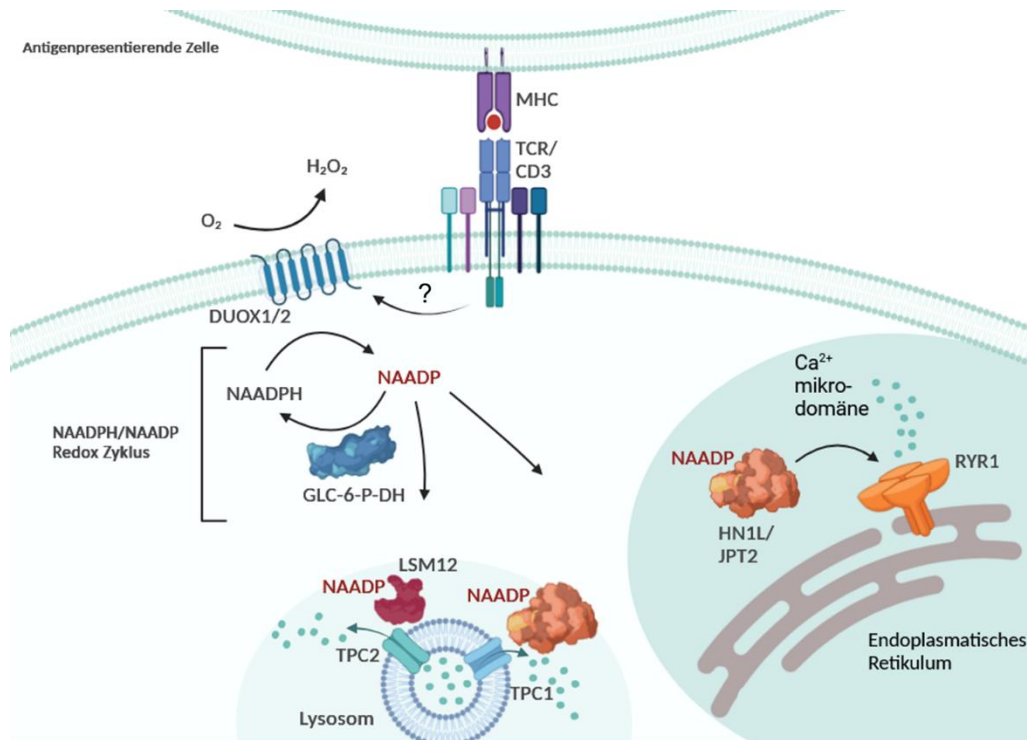
### 3 Einleitung

Seit Jahrtausenden kämpft die Menschheit gegen Krankheiten wie die Pest, Pocken oder Cholera.<sup>[10–12]</sup> Die Corona-19 Pandemie hat gezeigt wie verherrend die Erreger solcher Krankheiten auch heute noch sein können. Schon Ende des 18. Jahrhunderts führte der Landarzt Edward Jenner, welcher als Begründer der Immunologie gilt, die erste Impfung am Menschen mit Kuhpocken-Erregern durch, die anschließend eine Immunität gegen andere Pocken-Varianten zur Folge hatte.<sup>[13]</sup> Aus dieser Entdeckung entwickelte sich die moderne Immunologie die aus den verschiedenen Teilbereichen, wie zum Beispiel der zellulären und humoralen Immunologie, besteht.

Das menschliche Immunsystem ist ein hochkomplexes Abwehrsystem, welches den Organismus vor Viren, Bakterien oder anderen Pathogenen schützen kann.<sup>[14]</sup> Durch das Zusammenspiel einer Vielzahl von Zellen, Botenstoffen und Proteinen laufen im Körper zahlreiche molekularbiologische Prozesse ab, deren Signalwege bis heute noch nicht vollständig entschlüsselt sind. Die Zellkommunikation ist dabei eines der bedeutendsten Instrumente, mit denen ein Organismus auf Umweltreize reagieren kann. Auf der Basis von verschiedensten Rezeptorinteraktionen ermöglichen die dafür notwendigen Botenstoffe einen inter- und intrazellulären Austausch von Informationen, die für das Überleben einzelner Zellen sowie größerer Zellverbände und somit auch des Organismus essentiell sind. Die Bindung eines primären Botenstoffs, zum Beispiel eines Hormons, an ein membranständigen Rezeptor kann intrazellulär eine Signalkaskade auslösen, bei der das Signal in die Zelle geleitet, moduliert und verstärkt wird, sodass es schließlich zu einem zellulären Effekt führt.<sup>[15]</sup> Bei dieser sogenannten intrazellulären Signaltransduktion bilden *second messenger*, wie unter anderem Inositol-1,4,5-triphosphat (IP<sub>3</sub>), cyclische Adenosindiphosphat-Ribose (cADPR) oder Nicotinsäureadenindinucleotidphosphat (NAADP), die bedeutendsten biochemischen Komponenten der Signalweiterleitung.<sup>[16][17]</sup>

Bei der Aktivierung des Immunsystems spielen insbesondere Calcium-Ionen (Ca<sup>2+</sup>) als *second messenger* in allen eukaryotischen Zellen eine zentrale Rolle.<sup>[18]</sup> In ruhenden T-Lymphozyten liegt die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration beispielsweise im niedrigen Bereich von 30-100 nM, was eine hohe Diskrepanz zu dem extrazellulären Raum (1 mM) darstellt.<sup>[18–20]</sup> Eine Stimulation des T-Zell-Rezeptor (TCR) durch die Bindung einer antigenpräsentierenden-Zelle (APC) verursacht eine Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration auf bis zu 1 µM (Abb. 1). Die Bindung des TCR an den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) führt zur Phosphorylierung und Aktivierung von nachgeschalteten Effektoren, die zu einer schnellen

Bildung des  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilisierenden *second messenger* NAADP, sowie  $\text{IP}_3$  und cADPR führen.<sup>[21][22]</sup> Die präzisen Zusammenhänge zwischen der Aktivierung des TCR/CD3 und der Oxidation von NADPH zu NAADP über DUOX1/2 wurden erst kürzlich von der Forschungsgruppe um GUSE aufgeklärt.<sup>[23]</sup>



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der Signaltransduktion nach Stimulation des TCR/CD3-Rezeptors einer T-Zelle. Nach Aktivierung führt eine intrazelluläre Signalkaskade zunächst zur Bildung von *second messenger*-Molekülen wie NAADP, welche nach Bindung an HN1L/JPT2 oder Lsm12 an unterschiedliche Rezeptoren wie RyR1 oder TPC1/2 binden können und somit  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomänen aktivieren. Erstellt mit BioRender.com.<sup>[4][7][24]</sup>

Diese können anschließend direkt mit Rezeptoren, wie dem  $\text{IP}_3$ -Rezeptor am endoplasmatischen Retikulum (ER) interagieren oder, wie in Abbildung 1 dargestellt, mit Bindeproteinen, wie dem HN1L/JPT2 oder dem Lsm12, komplexieren.<sup>[4][24][25]</sup> Die freigesetzten Calcium-Mikrodomänen können anschließend an verschiedene Calcium-bindende Enzyme, wie Calmodulin und Calcineurin, binden, die durch Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NF-AT (*nuclear factor of activated T-cells*) eine Expression verschiedenster Gene aktivieren können.<sup>[26]</sup>

Nach der Signaltransduktion durch die freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ist eine schnelle Abnahme ihrer Konzentration im Cytosol zurück auf die Ausgangskonzentration unerlässlich um weitere Signale in kurzen Abständen zu ermöglichen. Die Konzentrationsabnahme kann dabei einerseits passiv durch  $\text{Ca}^{2+}$ -puffernde Proteine erfolgen. Andererseits können die Ionen

durch  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) und Plasmamembran-gebundene  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen-Pumpen (PMCA), wie P2X oder TRPM, aktiv aus der Zelle transportiert werden.<sup>[14][27]</sup> Die sarko-/endoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-Pumpe (SERCA) ermöglicht dabei den Rücktransport von freiem  $\text{Ca}^{2+}$  in die intrazellulären Speicher des endo-/sarkoplasmatisches Retikulums (SE/ER), welche eine hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  bis 1 mM aufweisen.<sup>[28][29]</sup>

Durch das Zusammenwirken der unterschiedlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden *second messenger* ergibt sich eine Vielzahl von Signalwegen zur Steuerung zellulärer Prozesse. Die Dynamik der Effekte hängt dabei von den raumzeitlichen Eigenschaften der Signale ab. Die meisten Signale bestehen aus kurzen transienten, oszillierenden Konzentrationserhöhungen im Mikrosekundenbereich, die durch Modulation der Frequenz verschiedene kodierte Informationen weiterleiten können.<sup>[30]</sup> Für andere zelluläre Prozesse, wie zum Beispiel die Aktivierung der T-Zell Proliferation, ist ein langer, kontinuierlicher Anstieg erforderlich, der über Stunden anhält.<sup>[31][32]</sup>

Eine Vielzahl an Krankheiten, wie Multiple Sklerose (MS) oder Autoimmunerkrankungen, stehen in Verbindung mit einer Dysregulierung des Immunsystems.<sup>[27][33][34]</sup> Störungen der Calcium-Homöostase können weitreichende Folgen für die Gesundheit haben. Um die Gesamtheit des Immunsystems zu ergründen, ist die Entwicklung neuer Methoden zur Identifikation von Zielstrukturen wie Rezeptoren und Bindungsproteinen erforderlich. Dadurch sollen zukünftig innovative therapeutische Ansätze in der Medizin möglich werden.

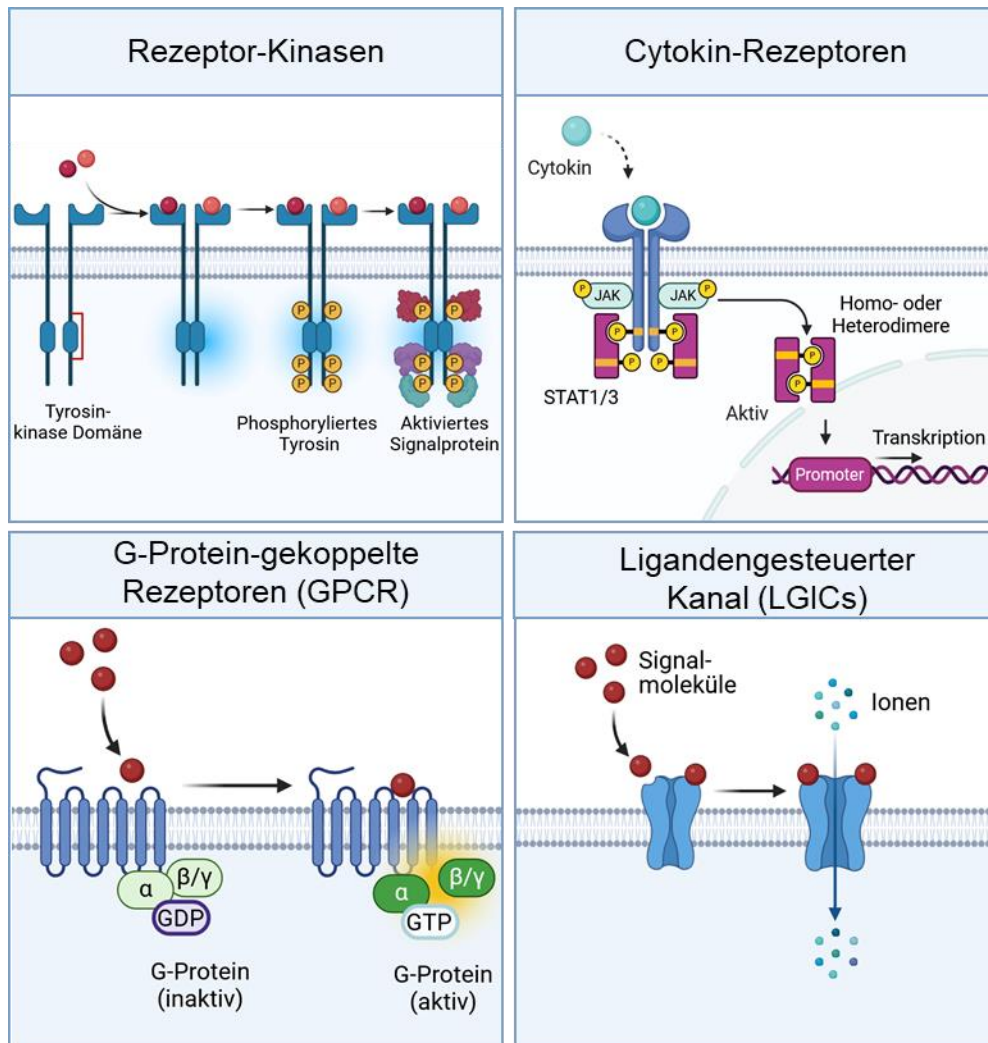
## 4 Kenntnisstand

### 4.1 Zellkommunikation

Die Möglichkeit von Zellen über verschiedene interzelluläre Übertragungswege mit anderen Zellen zu kommunizieren ist essentiell für das Überleben eines Organismus. Die Signaltransduktion bezeichnet dabei den Prozess, bei dem ein Signal über die Zellmembran ins Zellinnere vermittelt wird. Dieser Prozess kann mehrere Schritte umfassen, bei denen unterschiedliche Moleküle, wie primäre oder sekundäre Botenstoffe, Rezeptoren und Enzyme, beteiligt sind.<sup>[15]</sup> Die Art des Signals und der Übertragung kann stark variieren und reicht von extra- sowie intrazellulären Botenstoffen bis hin zu elektrischen Impulsen. Dabei wird zwischen endokrinen, parakrinen, synaptischen und kontaktabhängigen Signalübertragungen unterschieden.<sup>[14][28]</sup> Über den endokrinen Weg werden Signalmoleküle, wie zum Beispiel Hormone, in spezifischen Organen oder Geweben gebildet und über den Blutweg im Körper verteilt. Der parakrine Weg zeichnet sich durch die Diffusion von Hormonen oder hormonähnlichen Substanzen im Interzellularraum der Zelle aus.<sup>[35]</sup> Somit werden die Signale lediglich an unmittelbar benachbarten Zellen übertragen. Die synaptische Signalweiterleitung findet in Nervenzellen statt. Die Signale werden elektrisch durch Änderung des Membranpotentials entlang sogenannter Axone zu den Zielzellen transportiert. An der Zielzelle kann das elektrische Signal in ein chemisches Signal umgewandelt werden.<sup>[36]</sup> Ein weiterer essentieller Signalübertragungsweg ist die kontaktabhängige Signalweiterleitung. Diese erfolgt, analog zum parakrinen Weg, nur zwischen unmittelbar benachbarten Zellen. Das sind zum Beispiel Zellen des Immunsystems, bei denen sowohl der Rezeptor, als auch das Signalmolekül membrangebunden sind.<sup>[37]</sup> Da nur wenige hydrophobe Signalmoleküle, wie Stickstoffmonoxid (NO) oder Steroide, in der Lage sind, passiv durch die Zellmembran zu diffundieren, ist es für andere hydrophilere Signalmoleküle wichtig, dass weitere Transduktionsmechanismen zu Verfügung stehen, um das Signal in die Zelle weiterzuleiten und zu amplifizieren.<sup>[38]</sup> Dabei beginnt die Signalkaskade im Allgemeinen mit der extrazellulären Interaktion eines primären Signalmoleküls mit einem Rezeptor auf der Membranoberfläche.<sup>[28]</sup>

Diese Zelloberflächenrezeptoren können in drei Klassen eingeteilt werden (Abb. 2). Unter die **Rezeptor-Kinasen** fallen zum Beispiel die Tyrosinkinase-Rezeptoren. Sie sind an der Zellmembran gebunden und tragen eine intrazelluläre Domäne, welche die Phosphorylierung von Tyrosin-Seitenketten in Proteinen ermöglicht.<sup>[14]</sup> Bei diesem Rezeptortyp sind es

in der Regel Wachstumsfaktoren, wie der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor I (IGF I) oder der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), die als primäre Signalmoleküle fungieren. Letzterer wird nach Bindung mittels Autophosphorylierung aktiviert und löst intrazellulär eine Signalkaskade mit nachfolgender Genaktivierung aus, die eine Regulierung der Zellproliferation, -migration und -differenzierung zur Folge hat.<sup>[39]</sup>



**Abb. 2:** Darstellung der unterschiedlichen Rezeptorklassen für extrazelluläre Signalmoleküle und deren Transduktionsweg.<sup>[14]</sup> Erstellt mit BioRender.com

Auch die Rezeptorklasse der **Cytokin-Rezeptoren** kann eine Gen-Transkription initiieren. Cytokine sind kleine lösliche Polypeptide, die auf Grundlage ihrer biologischen Funktion in Wachstumsfaktoren, Interleukine, Interferone oder Chemokine eingeteilt werden. Diese Art von Rezeptoren sind mit einer Januskinase Tyrosi Kinase (JAK) assoziiert und induzieren somit durch Bindung eines Cytokins, die Phosphorylierung eines cytoplasmatischen Transkriptionsfaktors (STAT – *signal transducer and activator of transcription*).<sup>[14][39]</sup> Durch eine anschließende Dimerisierung der STAT-Proteine können diese den Rezeptor-Komplex

verlassen und in den Zellkern translozieren. Die STAT-Dimere sind dazu in der Lage, im Zellkern an *enhancer*-Elemente (Anlagerungsort des Transkriptionskomplexes an den Promotor) verschiedener Zielgene zu binden und somit deren Transkription zu aktivieren.<sup>[39]</sup>

Eine weitere Klasse von membrangebundenen Rezeptoren sind die **G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren** (*G-protein-coupled receptors*, GPCRs). Sie bilden mit mehr als 1000 verschiedenen Mitgliedern die größte Proteinsuperfamilie. Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind für die Übertragung einer Vielzahl von externen Signalgebern, wie Licht-, Geruchs- und Geschmacksreizen verantwortlich. Eine entscheidende Rolle spielen GPCRs auch bei Entzündungsprozessen, der Exo- und Endozytose, sowie beim Zellwachstum und der Zelldifferenzierung.<sup>[39][40]</sup> Der GPCR besteht aus sieben transmembranständigen Helices mit einer extrazellulären Bindestelle für Liganden und einer intrazellulären Bindestelle für G-Proteine (Guanosintriphosphat-bindende Proteine) und andere Signalmoleküle. Die Aktivierung des Rezeptors durch die Bindung eines Signalmoleküls an der extrazellulären Domäne führt zu einer Konformationsänderung, die eine Interaktion mit heterotrimeren G-Proteinen zur Folge hat (Abb. 2).<sup>[41]</sup> Die heterotrimeren G-Proteine können an ihrer  $\alpha$ -Untereinheit GTP und GDP binden. Die Aktivierung des Rezeptors sorgt auf diese Weise für den Austausch des inaktiven GDP gegen die aktive GTP-Form an der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins. Der G-Protein-Komplex wird durch die Bindung des GTP instabil, wodurch die  $\alpha$ - und  $\beta\gamma$ -Untereinheiten dissoziieren und die intrazelluläre Signaltransduktion auslösen. Die  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins setzt anschließend mithilfe von GTPase-aktivierenden Proteinen (GAP) das gebundene GTP in GDP und  $P_i$  um. Die Reassoziierung mit der  $\beta\gamma$ -Untereinheit ermöglicht schließlich eine erneute Rezeptorbindung.<sup>[15][42]</sup>

Die **ligandengesteuerten Ionenkanäle (LGICs)** bilden eine weitere Klasse von Rezeptoren. Sie kommen sowohl in der Plasmamembran als auch in Membranen intrazellulärer Kompartimente vor. Der Ionenkanal wird durch die Bindung eines Liganden aktiviert. Die Konformationsänderung, die beispielweise von Neurotransmittern wie Serotonin oder Glutamat ausgelöst wird, ermöglicht eine schnelle zelluläre Reaktion auf Signalstoffe durch einen Ionenfluss von z. B.  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$  oder  $Cl^-$ .<sup>[39]</sup> Die LGICs können in drei Klassen eingeteilt werden. Zum einen in die P2X-Rezeptoren, welche eine Klasse von homo- und heterotrimeren Kationenkanälen bilden, die durch extrazelluläres ATP gesteuert werden. Zum anderen in Cys-loop-Rezeptoren und die ionotropischen Glutamat-aktivierten-Rezeptoren.<sup>[14][43]</sup>

Eine Rezeptor-Klasse die nicht an der Zellmembran lokalisiert ist, ist die der **nukleären Rezeptoren**. Einige extrazelluläre Moleküle können aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften die Plasmamembran mittels passiver Diffusion passieren. Im Zellinneren binden sie an

intrazelluläre Rezeptoren im Cytosol oder im Zellkern und bilden einen Liganden-Rezeptor-Komplex. Dieser kann durch Bindung an spezifische Promoterregionen (*enhancer/silencer*) innerhalb der DNA die Transkription regulieren.<sup>[15]</sup>

Von jeder der oben genannten Rezeptorklassen können verschiedene Signalwege ausgehen. Die Weiterleitung des von dem Rezeptor aufgenommenen extrazellulären Reizes zu einem intrazellulären Effektorprotein ist die Signaltransduktion. Bei einer solchen Signalkaskade sind eine Vielzahl von Enzymen und sekundären Botenstoffen beteiligt.

### 4.2 Signalkaskade

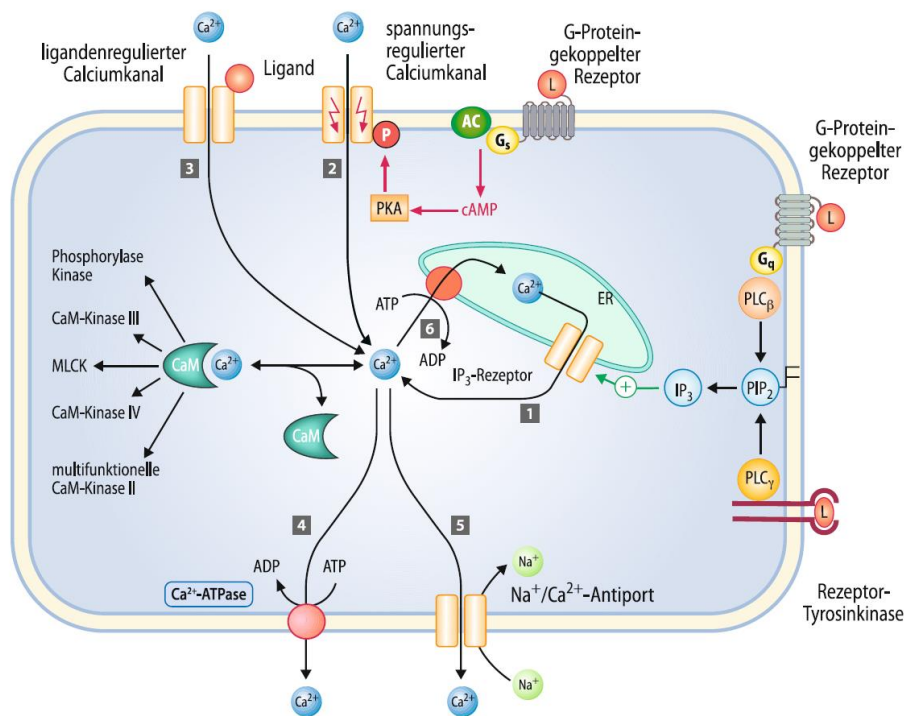
Einige Signalwege führen zur Freisetzung oder Synthese von *second messengern*, die es der Zelle ermöglichen das primäre Signale aus dem extrazellulären Raum intrazellulär zu verarbeiten und zu verstärken. Nach der Bildung von Ligand-Rezeptor-Komplexen können sich solche *second messenger* frei in der Zelle verteilen und auch selbst weitere Signalkaskaden induzieren.<sup>[31]</sup> G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren aktivieren beispielsweise über heterotrimere G-Proteine die membranständige Adenylatcyclase, welche ATP in den *second messenger* cAMP (cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat) umwandelt. Diese Signalkaskade kann mehrere tausend cAMP-Moleküle freisetzen und auf diese Weise das Signal effizient amplifizieren.<sup>[44]</sup> Andere *second messenger*, wie zum Beispiel cGMP (cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat), IP<sub>3</sub>, cADPR oder Ca<sup>2+</sup>-Ionen besitzen die Eigenschaft innerhalb der Zelle in verschiedene Zellkompartimente zu diffundieren und dort ein intrazelluläres globales Signal zu erzeugen. Eine kohärente und organisierte zelluläre Reaktion setzt daher eine feine Abstimmung verschiedener *second messenger* voraus (*cross talk*).<sup>[14][28]</sup>

### 4.3 Calciumionen als *second messenger*

Calciumionen gehören zu den universellen Botenstoffen im menschlichen Körper. Sie sind maßgeblich an zahlreichen biologischen Prozessen beteiligt. Calciumionen sind von entscheidender Bedeutung für die Regulation von Muskelkontraktionen, die neuronale Signalübertragung, den Initiationsprozess der Embryonalentwicklung, die Exozytose sowie die frühe Phase der adaptiven Immunantwort, insbesondere bei der Aktivierung von T-Zellen.<sup>[34][45]</sup> Die Dynamik von Ca<sup>2+</sup>-Signalen ist von den zugrunde liegenden biologischen

Prozessen abhängig und weist daher eine erhebliche Variabilität auf. Sie sind räumlich und zeitlich exakt aufeinander abgestimmt und steuern essentielle zelluläre Vorgänge wie die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von Zellen durch verschiedene transkriptionelle Mechanismen. Im Gegensatz zu anderen sekundären Botenstoffen erfolgt die Bereitstellung und der Abbau von Calciumionen nicht enzymatisch.<sup>[14][28][44]</sup>

Calcium wirkt in der Regel nicht direkt, sondern vermittelt seine Funktionen über Calcium-bindende Proteine wie beispielsweise Calmodulin (CaM).<sup>[26]</sup> Calmodulin besitzt vier hoch-affine Bindungsstellen für Calciumionen und kann, abhängig von der Calciumkonzentration, unterschiedliche Konformationen annehmen. Dadurch ist Calmodulin in der Lage, mit einer großen Anzahl von Zielproteinen zu interagieren (Abb. 3).<sup>[46]</sup> Die Bildung eines Calcium-Calmodulin-Komplexes aktiviert die katalytische Untereinheit von Calcineurin, einer Phosphatase, die NF-AT dephosphorylieren kann.<sup>[26]</sup> Das dephosphorylierte NF-AT-Element wird in den Zellkern transportiert, wo es an spezifischen Stellen an der DNA bindet und die Transkription von beispielsweise Interleukin-2 (IL-2) stimuliert. Nach der Genexpression bindet IL-2 autokrin an den IL-2-Rezeptor der T-Lymphozyten, was wiederum die Zellproliferation anregt.<sup>[26][47]</sup> Darüber hinaus werden verschiedene Enzyme, darunter Calmodulin-abhängige Kinasen (CaMK), Phosphatasen, Ionenpumpen sowie Membrantransportproteine durch Calcium-Calmodulin-Komplexe reguliert.<sup>[48]</sup>



**Abb. 3:** Schematische Darstellung des Calciumstoffwechsels.<sup>[14]</sup>

Die cytoplasmatische Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$  wird im Ruhezustand auf einem niedrigen Niveau von etwa 100 nM konstant gehalten und kann bei äußeren Reizen auf bis zu 1000 nM ansteigen.<sup>[28][31]</sup> Die Regulation der periodischen Schwankungen, die im Rahmen verschiedener Signaltransduktionswege auftreten, umfasst die Kontrolle von Frequenz, Amplitude und Verteilung dieser Konzentrationsoszillationen. Diese Änderungen können entweder aus der Aktivierung intrazellulärer Speicher **[1]** oder durch den Einstrom aus dem extrazellulären Raum resultieren, wobei letzterer Mechanismus über spezifische Ionenkanäle vermittelt wird.<sup>[49][50]</sup>

Ein Mechanismus für den Transport von Calciumionen in die Zelle ist der passive Einstrom über hochspezifische **spannungsabhängige Calciumkanäle [2]** (VGCC) (Abb. 3). Bestimmte Domänen dieser Ionenkanäle enthalten geladene Aminosäureseitenketten, die einen spannungsabhängigen Bereich (*voltage sensing region*) definieren. Eine transiente Depolarisation des Membranpotentials führt zwangsläufig zu einer Konformationsänderung, die den Einstrom von Calciumionen in das Cytosol ermöglicht.<sup>[51]</sup>

Eine weitere Möglichkeit für den Einstrom von Calciumionen sind die **ligandengesteuerten Calciumkanäle [3]**. Zu ihnen gehören unter anderem die Purinrezeptoren vom Typ P2X, welche durch die Bindung von extrazellulärem ATP einen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in das Cytosol bewirken. Der Einstrom aus dem extrazellulären Raum stellt dabei eine schnelle und effiziente Methode dar, um die intrazelluläre Calciumionenkonzentration nach der Erschöpfung der intrazellulären Calcium-Speicher nachhaltig zu erhöhen, ein Prozess, der als *store operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry* (SOCE) bezeichnet wird.<sup>[14][52]</sup>

Die Regulierung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration umfasst neben dem Einstrom auch verschiedene Mechanismen, die den Export von Calcium aus dem Cytoplasma ermöglichen. Über in der Plasmamembran lokalisierte  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen **[4]**,  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ -Antiporter **[5]** oder über die Sequestrierung von Calcium im ER (SERCA) **[6]** kann überschüssiges Calcium gezielt aus dem Cytosol entfernt werden.<sup>[14]</sup>

#### 4.4 Intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung

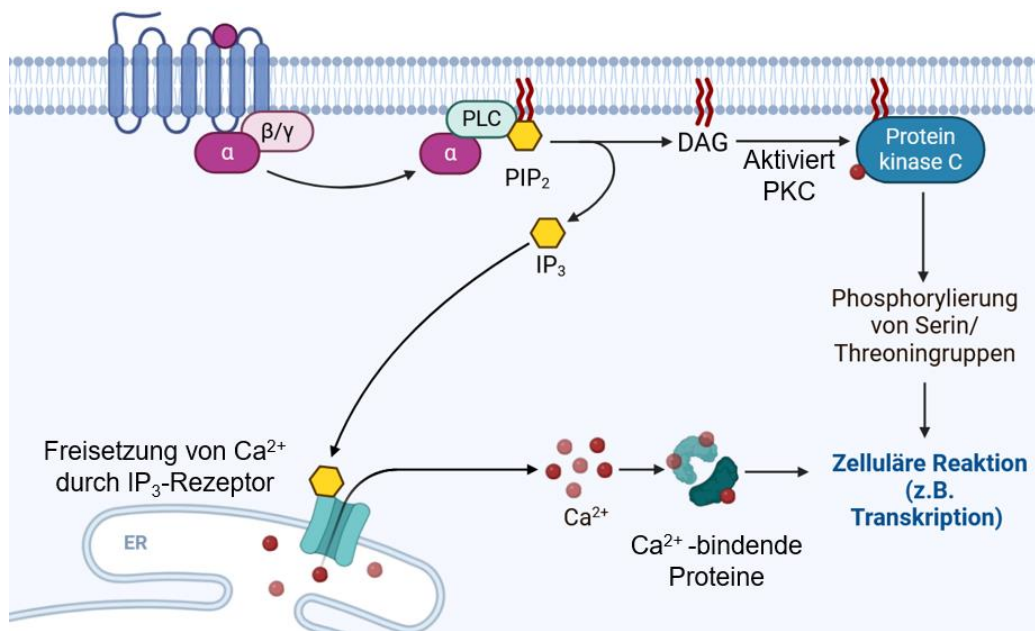
Durch verschiedene *second messenger* können Ca-Ionen nicht nur aus dem extrazellulären Raum in die Zelle transportiert, sondern auch aus intrazellulären Speichern, wie dem endoplasmatischen oder sarkoplasmatischen Retikulum (ER/SR) sowie sauren Lysosomen, freigesetzt werden.<sup>[53]</sup> Neben dem  $\text{IP}_3$ -Rezeptor sind auch der Ryanodin-Rezeptor und die *Two-Pore Channel* (TPC)-Familie an diesem Prozess beteiligt.<sup>[54][7]</sup>

Diese Kanäle können jedoch auch durch Calcium selbst als sekundären Botenstoff aktiviert werden. Freigewordenes Calcium bindet wieder an Rezeptoren und verstärkt durch positive Rückkopplung die eigene Freisetzung. Diese Art des Einstroms wird als calcium-induzierte Calciumfreisetzung (CICR, *calcium-induced calcium release*) bezeichnet und kann sowohl über Ryanodin-Rezeptoren als auch über IP<sub>3</sub>-Rezeptoren erfolgen.<sup>[55]</sup>

Für die verschiedenen Ca<sup>2+</sup>-freisetzenden sekundären Botenstoffe wurden unterschiedliche Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationsverläufe erfasst.<sup>[56][57]</sup> Dies deutet darauf hin, dass die jeweiligen sekundären Botenstoffe für unterschiedliche Signaltypen verantwortlich sind und sich gegenseitig modulieren können.<sup>[58][59]</sup>

### 4.4.1 Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>)

Nach seiner Entdeckung im Jahr 1983 wurde erkannt, dass IP<sub>3</sub> an spezifische Rezeptoren bindet die in der Membran des glatten endoplasmatischen Retikulums liegen.<sup>[60]</sup> Der Mechanismus beginnt mit der Aktivierung eines extrazellulären G-Protein-gekoppelten Rezeptors, der eine Konformationsänderung durchläuft (Abb. 4).<sup>[14]</sup> In diesem Prozess wird ATP gebunden, die Phospholipase C (PLC) aktiviert und das Membranphospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) hydrolysiert, wobei Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG) entstehen. Das an der Membran verankerte DAG fungiert ebenfalls als sekundärer Botenstoff und aktiviert zusammen mit den von IP<sub>3</sub> freigesetzten Ca<sup>2+</sup>-Ionen die Serin/Threonin-Proteinkinase C (PKC). PKC stellt ebenfalls einen Regulator für weiterer Transkriptionsfaktoren dar.<sup>[14]</sup>



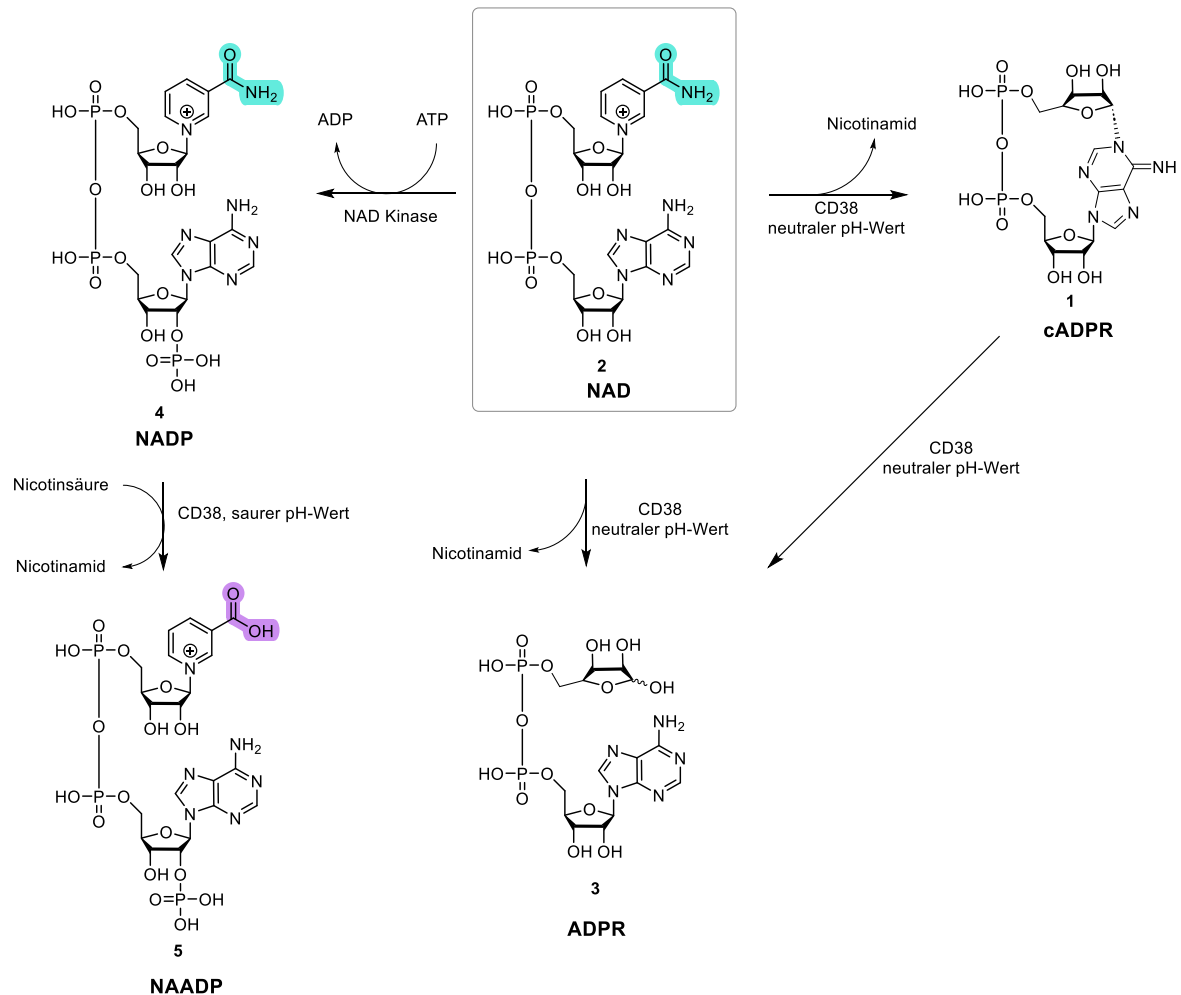
**Abb. 4:** Schematische Darstellung des Calciumfreisetzungsmechanismus des IP<sub>3</sub>-Rezeptors. Die Aktivierung des GPCR führt zur Spaltung von PIP<sub>2</sub> in die sekundären Botenstoffe IP<sub>3</sub> und DAG. Zudem wird die PKC aktiviert und die Freisetzung von Calcium durch den IP<sub>3</sub>-Rezeptor aus dem ER initiiert.<sup>[14]</sup> Erstellt mit BioRender.com

IP<sub>3</sub> verfügt über die Eigenschaft, Calciumionen rasch aus den intrazellulären Speichern des endoplasmatischen Retikulums (ER) und des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) freizusetzen. Gleichzeitig erfolgt jedoch auch eine relativ schnelle enzymatische Phosphorylierung von IP<sub>3</sub>.<sup>[54][61]</sup> Eine Phosphorylierung durch Phosphoinositid-3-Kinase zu Inositol-1,3,4,5-tetraphosphat (IP<sub>4</sub>) initiiert zunächst, durch die Bindung an ein spezifisches GTPase-aktives Protein, eine zusätzliche Calciumfreisetzung. Anschließend wird IP<sub>4</sub> durch Dephosphorylierung mithilfe der IP<sub>3</sub>-5-Phosphatase zu dem inaktivierten Inositol-1,4-bisphosphat (IP<sub>2</sub>) umgewandelt.<sup>[14]</sup>

#### 4.4.2 cyclische Adenosindiphosphat-Ribose (cADPR)

In Gegensatz zu dem schnell abfallenden Ca<sup>2+</sup>-Signal, welches durch Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) induziert wird, konnte gezeigt werden, dass die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Fall von cyclischer ADP-Ribose 1 (cADPR) vermittelten Signalwegen langsam ansteigt. Es wird angenommen, dass cADPR 1 somit für ein langanhaltendes, globales Ca<sup>2+</sup>-Signal verantwortlich ist.<sup>[58][59]</sup> Ein möglicher Syntheseweg von cADPR 1 ist die NAD-Glycohydrolase/ADP-Ribosylcyclase (CD38/CD157) vermittelte Umsetzung von NAD<sup>+</sup> 2 zu cADPR 1

(Abb. 5). Allerdings spielt CD38 vermutlich auch bei der Hydrolyse von cADPR 1 zu ADP-Ribose 3 (ADPR) eine essentielle Rolle.<sup>[62]</sup>



**Abb. 5:** CD38 vermittelte Umsetzung von NAD 3 in cADPR 1 und ADPR 3, sowie die Umsetzung von NAD 2 zu NADP 4 und der Basenaustausch zum NAADP 5.

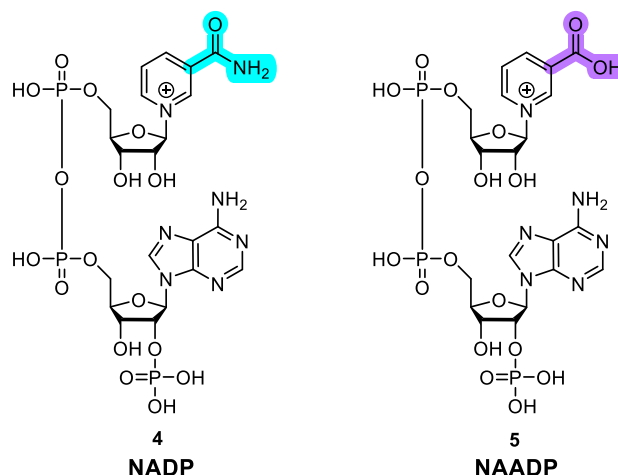
Lange Zeit wurde die Beobachtung, dass das aktive Zentrum vom membrangebundenen CD38 dem extrazellulären Raum zugewandt ist, als topologisches Paradoxon bezeichnet, da sich die Substrate innerhalb der Zelle befinden.<sup>[63]</sup> Im Jahr 2012 konnte jedoch von LEE *et al.* nachgewiesen werden, dass das Enzym neben der extrazellulär orientierten Typ-II-Konformation auch eine Typ-III-Konformation annehmen kann, wodurch die Substratumsetzung im Cytosol ermöglicht wird.<sup>[64]</sup> Die Freisetzung von Calciumionen aus den intrazellulären Speicherorganellen, dem ER und dem SR, wird durch das cADPR 1 entweder durch eine direkte Bindung an einen Ryanodin-Rezeptor oder durch die Bildung eines Ligand-Protein-Komplexes induziert.<sup>[65][66]</sup> Das cADPR 1 spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle im CLCR-Mechanismus, indem es das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal sowohl verlängern als auch modulieren

kann. Durch die Sensitivierung des Ryanodin-Rezeptors ist cADPR **1** in der Lage, eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung im mikromolaren Bereich auszulösen, was darauf hindeutet, dass cADPR **1** eine regulatorische Funktion im Calciumhaushalt übernimmt.<sup>[44]</sup>

Die Vermutung, dass cADPR **1** den membranständigen Rezeptor TRPM2 aktivieren kann, wurde durch GUSE *et al.* widerlegt, da ausschließlich ADPR **3** als Agonist an TRPM2 bindet.

#### 4.4.3 Nicotinsäureadeninucleotidphosphat (NAADP)

Nicotinsäureadeninucleotidphosphat **5** (NAADP) ist ein 1987 von CLAPPER *et al.* entdeckter universeller  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilisierender *second messenger* (Abb. 6).<sup>[1]</sup> Ursprünglich wurde angenommen, dass für die Calciumfreisetzung Nicotinamidadeninucleotidphosphat **4** (NADP) verantwortlich ist. Diese Annahme wurde jedoch nach umfassenden Untersuchungen von CHINI *et al.* im Jahr 1995 widerlegt.<sup>[67]</sup>



**Abb. 6:** Strukturformeln von Nicotinamidadeninucleotidphosphat **4** (NADP) und Nicotinsäureadeninucleotidphosphat **5** (NAADP). Während in der Struktur von NADP **4** die Amid-Gruppe (blau) vorhanden ist, befindet sich in der Struktur von NAADP **5** die Carbonsäure-Gruppe (lila).

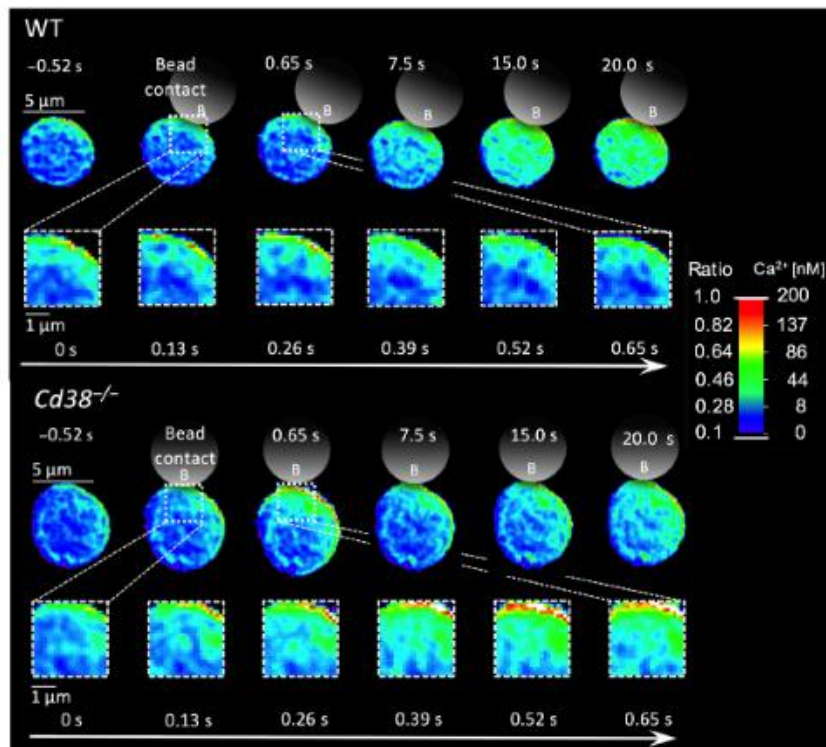
Die Injektion von NAADP **5** in T-Lymphozyten und Seeigelleier zur Stimulation einer Calciumfreisetzung resultierte in dosisabhängigen Effekten, wobei eine Injektion von 30 nM NAADP **5** ein lokales, subzelluläres Signal induzierte. Im Gegensatz dazu wurde bei der Verabreichung von 50 bis 100 nM NAADP **5** ein deutlich stärker ausgedehntes, globales Calciumsignal beobachtet.<sup>[2][3]</sup> Eine weitere Erhöhung der Konzentration auf 100  $\mu\text{M}$  hingegen führte jedoch zu einer Deaktivierung, so dass keine Calciumfreisetzung mehr nachgewiesen werden konnte. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass lediglich NAADP-

Konzentrationen im nanomolaren Bereich eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung stimulieren können, ohne andere Signalwege, die beispielsweise cADPR **1** oder  $\text{IP}_3$  als second messenger umfassen, signifikant zu beeinflussen.<sup>[3]</sup>

In den letzten Jahren wurde der Calcium-Freisetzungsmechanismus von NAADP **5** insbesondere in der Arbeitsgruppe um GUSE intensiv untersucht. Dabei konnte das Bindungsprotein Hn1L/JPT2 und von ZHAN *et al.* das Bindungsprotein Lsm12 identifiziert werden, die als Aktivatoren für den Ryanodin-Rezeptor sowie für TCP1 und TPC2 fungieren. Diese Erkenntnisse haben wesentlich zum Verständnis der molekularen Grundlagen der NAADP-vermittelten Calcium-Signaltransduktion beigetragen.<sup>[4][5]</sup>

#### 4.4.4 Biosynthese von NAADP

Jahrelang wurde davon ausgegangen, dass das Enzym CD38 eine entscheidende Rolle in der bioschemischen Synthese von NAADP **5** einnimmt, da es den Basenaustausch zwischen NADP **4** und NAADP **5** *in vitro* katalysieren kann. Dieser Prozess erfordert jedoch einen sauren pH-Wert im Bereich von 4 bis 5 und eine hohe Konzentration an Nicotinsäure, Bedingungen, die im Cytosol nicht vorliegen. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Hypothese, dass CD38 bei der Synthese von NAADP **5** von zentraler Bedeutung ist, relativiert.<sup>[68]</sup> Weitere Ergebnisse der Forschungsgruppe um GUSE zeigten, dass in CD38-defizienten primären Lymphozyten, nach Stimulation weder die Bildung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomänen noch die globale  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung beeinträchtigt wurde. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass CD38 möglicherweise nicht die entscheidende Rolle in den NAADP-vermittelten Calcium-Signalwegen spielt, wie ursprünglich angenommen (Abb. 7).<sup>[69]</sup>

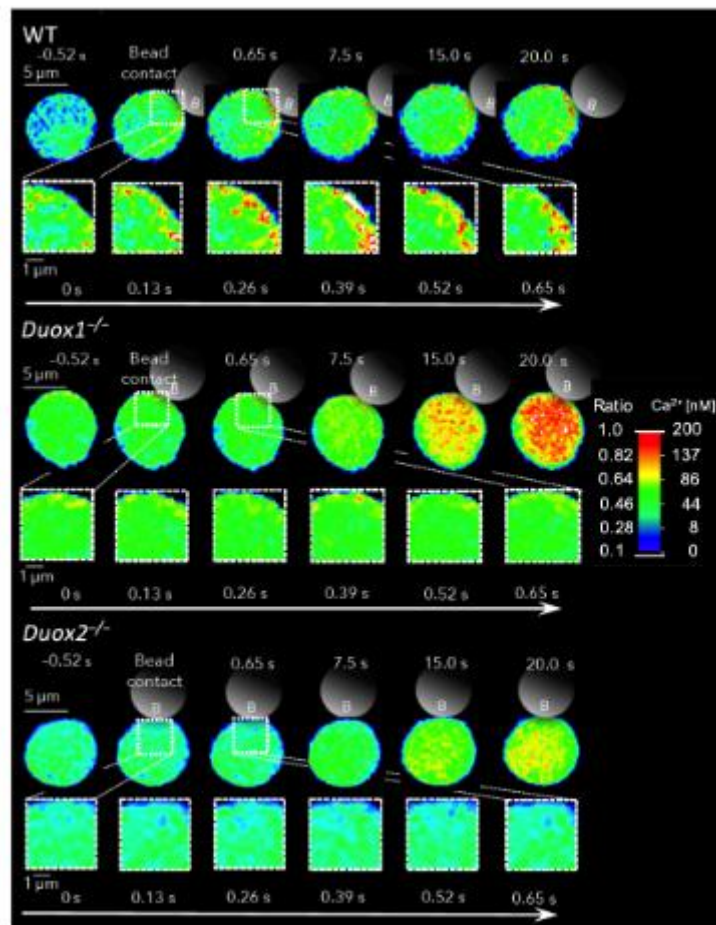


**Abb. 7:** Repräsentative Bilder der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung von *wild type* (WT) (oben) und  $\text{CD38}^{-/-}$  Knockout (unten)  $\text{CD4}^{+}$ -Zellen, die nach der Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28-beschichteten Beads (grau) sowohl mit Fluo4-AM als auch mit FURA-Red-AM sichtbar gemacht wurden. Fluo4-AM und FURA-Red-AM sind ein  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive fluoreszierende Farbstoffe, dessen Fluoreszenz mit steigenden  $[\text{Ca}^{2+}]$  ab bzw. zunimmt. Der Knockout von CD38 zeigt keinen Effekt auf die Bildung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomänen oder globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen in primären T-Lymphozyten.<sup>[69]</sup>

In den letzten Jahren wurde auch die multifunktionelle NAD(P)ase SARM1 als potentieller Lieferant von NAADP **5** identifiziert, die den Basenaustausch auch bei neutralem pH-Wert ermöglicht.<sup>[70]</sup> Es wird jedoch angenommen, dass beide Basenaustauschreaktionen wahrscheinlich lediglich als Auffüllreaktionen fungieren und keine signifikanten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale auslösen können.<sup>[24]</sup>

Die *in vivo* Synthese von NAADP **5** konnte schließlich 2021 von GUSE *et al.* aufgedeckt werden.<sup>[69]</sup> Dafür wurden plasmamembranübergreifende NADPH-Oxidasen als alternativer Biosyntheseweg nachgewiesen. Bereits 2009 beschrieben LETO *et al.*, dass die NADPH-Oxidasen NOX/DUOX unter Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat (NADPH) zu NADP **4** oxidieren können.<sup>[71]</sup> Vor diesem Hintergrund wurde die Hypothese formuliert, dass NAADPH möglicherweise ein Substrat dieser Enzymfamilie darstellen könnte. Experimente, an HEK293-Zellen, die rekombinant NOX5, DUOX1 oder DUOX2 exprimierten, zeigten, dass unter physiologischen Bedingungen die Synthese von NAADPH zu NAADP **5** möglich ist. Darüber hinaus belegten Knockout-Experimente, dass vor allem DUOX2 im Gegensatz zu DUOX1 eine essentielle Rolle bei der

Bildung von NAADP **5** innerhalb der ersten Sekunden nach der Stimulation einnimmt (Abb. 8).<sup>[7][69]</sup> Im Rahmen der Untersuchung zur globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung konnte jedoch nachgewiesen werden, dass auch DUOX1 einen signifikanten Beitrag bei der Bildung von NAADP **5** leistet und vor allem für die Steigerung der NAADP-Konzentration über einen längeren Zeitraum nach der Stimulation essentiell ist. Das zusätzlich bei der Synthese von NAADP **5** freigesetzte Wasserstoffperoxid hatte in Zelltests keinen Einfluss auf die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomänen (Abb. 1).<sup>[69]</sup>



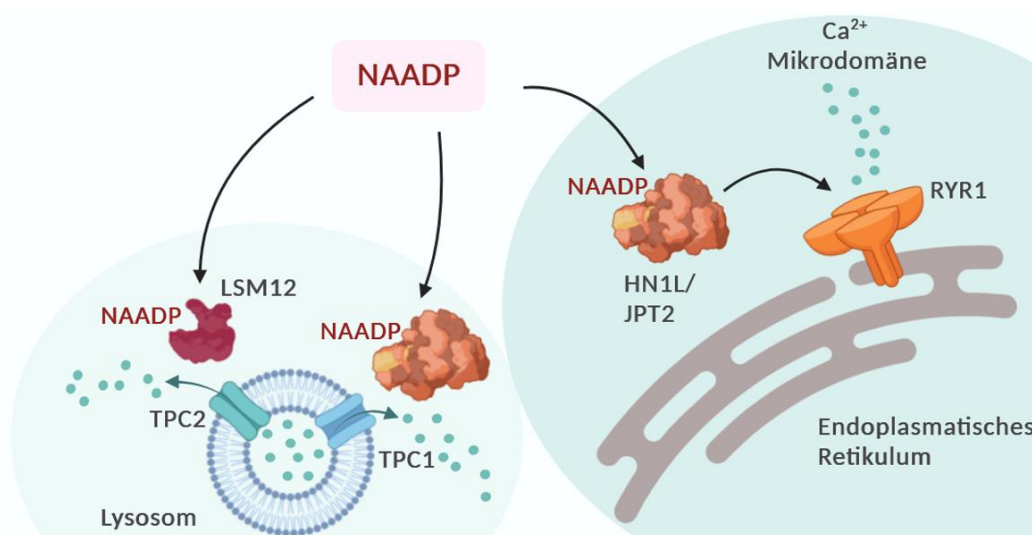
**Abb. 8:** Repräsentative Bilder der Bildung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomänen bei WT, DUOX1- und DUOX2-defizienten in  $\text{CD4}^+$  T-Zellen, die nach der Stimulation mit anti-CD3-/anti-CD28-beschichteten Beads (grau) sowohl mit Fluo4-AM als auch mit FURA-Red-AM sichtbar gemacht wurden.

Der Redoxzyklus wird durch die Reduktion von NAADP **5** zu NAADPH durch die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (GLC-6-P-DH) geschlossen (Abb. 1). Dieses Enzym weist im Gegensatz zu NADP ( $44.47 \pm 17.74 \mu\text{M}$ ) eine hohe Affinität gegenüber NAADP **5** auf ( $2.30 \pm 1.13 \mu\text{M}$ ).

#### 4.4.5 Zielrezeptoren von NAADP

Für die NAADP-initiierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung wurden bereits früh der Ryanodin-Rezeptor am ER/SR sowie die *Two-Pore-Channels* vorgeschlagen.<sup>[72][73][74]</sup> Es gibt zum einen den „ER-NAADP-Signalweg“ und zum anderen den „lysosomalen NAADP-Signalweg“ (Abb. 9).

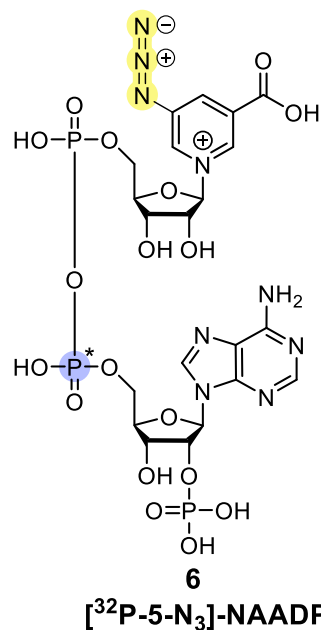
Bereits 2001 beobachteten ONDRIAS *et al.*, dass die Injektion von NAADP **5** in Zellen zu einer Kanalöffnung der Ryanodin-Rezeptoren RyR1 und RyR2 führt.<sup>[75]</sup> Die Ryanodin-Rezeptoren bilden eine Familie von Calciumkanälen, die aus drei Isoformen (RyR1, RyR2 und RyR3) bestehen. Die Aktivierung der Rezeptoren durch NAADP **5** führt zu einer Freisetzung von Calciumionen aus dem ER und dem SR in das Cytosol.<sup>[76][77]</sup> Auch weitere Arbeitsgruppen konnten in den folgenden Jahren den Zusammenhang zwischen der NAADP-vermittelten Calciumfreisetzung und den RyR bestätigen.<sup>[77][78]</sup> In der Forschungsgruppe um GUSE *et al.* wurden in humanen Jurkat T-Lymphozyten erste Untersuchungen mit RyR-Inhibitoren sowie mit RyR-Knockdown-Klonen durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass die Inhibition des RyR durch *Ruthenium Red* (Ru Red) eine globale  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung unterbinden konnte.<sup>[77][78]</sup> Antagonisten des  $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ - und des  $\text{cADPR}/\text{Ca}^{2+}$ -Signalsystems waren jedoch nicht in der Lage, die durch NAADP **5** induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung zu blockieren.<sup>[16]</sup>



**Abb. 9:** Schematische Darstellung der TPC-Aktivierung durch verschiedene NAADP-Bindungssysteme. Die NAADP-Bindung an HN1L/JPT2 ermöglicht eine Calciumfreisetzung durch die Aktivierung des RyR.<sup>[4][5]</sup> Durch die Bindung an Lsm12 ist es in der Lage die Öffnung des TPC2 auf sauren Lysosomen zu stimulieren.<sup>[25]</sup>

Jahre später wurden von ZHU *et al.* die TPCs als neue Klasse von NAADP-regulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen entdeckt.<sup>[72][79][80]</sup> Sie gehören zu einer kleinen Familie von Kationenkanälen, die in Membranen endolysosomaler Kompartimente zu finden sind.<sup>[81]</sup> Mit der sogenannten

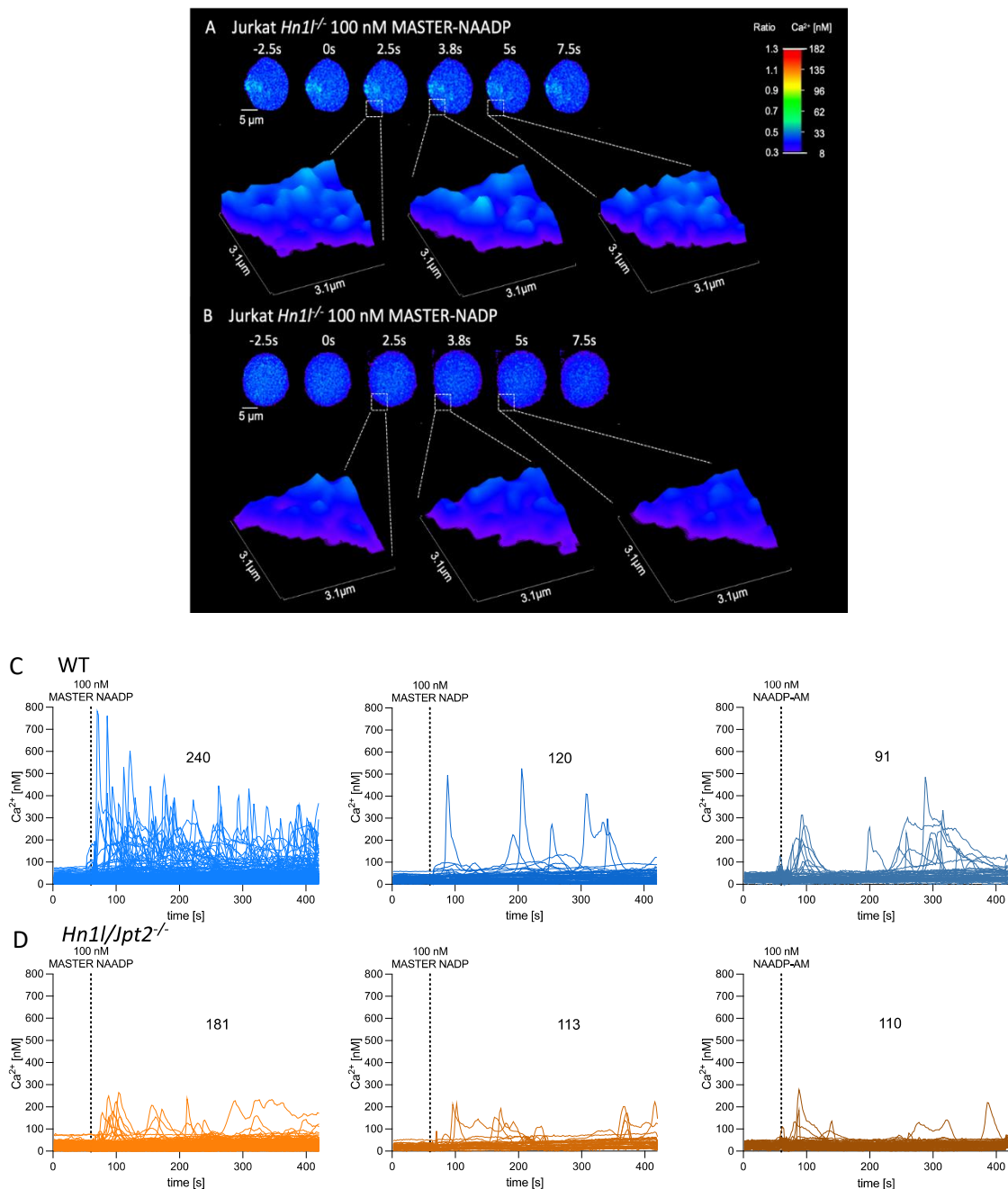
*Patch-Clamp*-Methode demonstrierten WANG *et al.* im Jahr 2012, dass die TPCs allerdings nicht durch NAADP **5** direkt aktiviert werden. Stattdessen wurden sie als Natrium-selektive Kationenkanäle identifiziert, die durch Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat (PI(3,5)P2) aktiviert werden.<sup>[82]</sup> Obwohl eine eindeutige Stimulation der Zugabe von NAADP **5** auf die TPCs nachgewiesen wurde, konnte keine spezifische Bindungsstelle am TPC identifiziert werden. WALSETH *et al.* entwickelten daher eine bifunktionelle Alkin-"*All-in-one-clickable*"-(AIOC)-NAADP-Photoaffinitäts-Sonde ( $[^{32}\text{P-5-N}_3\text{]}\text{-NAADP}$ ) für den NAADP-Rezeptor (Abb. 10). Die Sonde ist in der Lage, eine spezifische Bindung zu initiieren, welche eine nachfolgende Calciumfreisetzung zur Folge hat.<sup>[83][84]</sup> Die radioaktiv markierte Sonde (lila) konnte mehrere Proteine labeln die eine eindeutige Assoziation mit den TPCs aufwiesen.<sup>[83]</sup> Darüber hinaus konnten Co-Immunopräzipitations-Experimente in HEK293-Zellen die Interaktion zwischen TPC1 und NAADP **5**, jedoch nicht mit TPC2 aufdecken.<sup>[5]</sup>



**Abb. 10:** Die radioaktiv gelabelte Photoaffinitäts-Sonde  $[^{32}\text{P-5-N}_3\text{]}\text{-NAADP}$  **6** für den NAADP-Rezeptor wurde durch eine Basenaustauschreaktion mit der ADP-Ribosylcyclase aus *Aplysia* unter Verwendung von  $[^{32}\text{P}]\text{-NADP}$  synthetisiert.<sup>[83]</sup>

Auf Basis der vorliegenden Ergebnisse postulierte GUSE die Hypothese, dass spezifische Rezeptoren oder Bindeproteine existieren müssen, an die NAADP **5** zunächst bindet, bevor eine Calciumfreisetzung an den TPC oder den RyR erfolgt.<sup>[85]</sup> Fast zehn Jahre später gelang es GUSE *et al.* sowie MARCHANTS *et al.*, das HN1L/JPT2 als ein solches Bindeprotein zu identifizieren.<sup>[4][5]</sup> Die Gendelektion des HN1L/JPT2 führte zu einer signifikanten Unterdrückung der Bildung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomänen in stimulierten Jurkat-Zellen, wobei sowohl

der Beginn der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung verzögert als auch die Amplitude der globalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung verringert wurde.<sup>[4]</sup> Weitere Experimente mit HN1L-defizienten Jurkat-Zellen ( $\text{HN1L}^{-/-}$ ) zeigten, dass die Zugabe eines membranpermeablen MASTER-NAADP nicht zur Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomänen führte (Abb. 11).<sup>[7]</sup>



**Abb. 11:** Repräsentative hochaufgelöste Bilder der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung in Jurkat  $\text{Hn1L/Jpt2}^{-/-}$  T-Zellen. Die Zellen wurden mit Fluo4-AM und Fura-Red-AM angefärbt, nachdem sie mit 100 nM MASTER-NAADP (A) oder mit der negativen Kontrolle MASTER-NADP (B) stimuliert wurden. Die Graphen zeigen die Aktivierung der Zellen (WT (C) und  $\text{Hn1L/Jpt2}^{-/-}$  (D)), welche bei der Stimulation mit MASTER-NAADP, MASTER-NADP und NAADP-AM unterschiedlich stark Calcium freisetzen.<sup>[7]</sup>

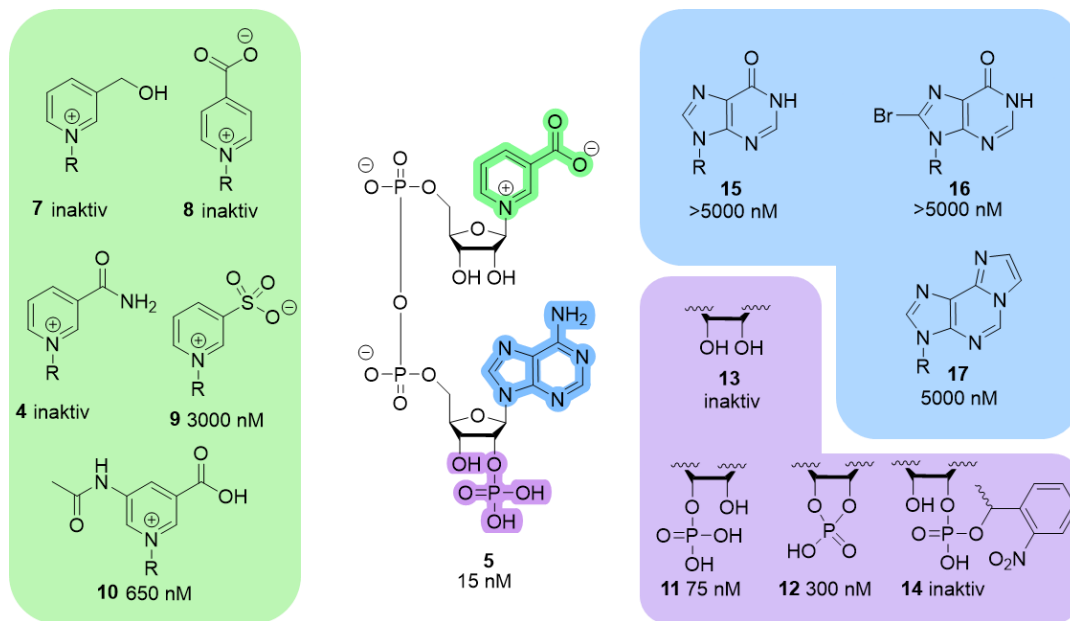
Im Rahmen von Photoaffinitäts-Experimenten konnte eine direkte Bindung von NAADP **5** an rekombinante HN1L/JPT2 nachgewiesen werden. Eine T-Zell-Rezeptor/CD3-abhängige Co-Präzipitation von HN1L/JPT2 mit RyR sowie deren Co-Lokalisierung bestätigten, dass NAADP **5** zu Beginn der T-Zell-Aktivierung zunächst an HN1L/JPT2 bindet und anschließend den RyR aktiviert, was eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung initiiert.<sup>[4]</sup>

Im selben Jahr wurde ein weiteres NAADP-Bindeprotein identifiziert, das Lsm12, welches strukturell nicht mit HN1L/JPT2 verwandt ist. Lsm-Proteine sind dafür bekannt, dass sie an RNA binden und eine regulatorische Funktion bei der Genexpression ausüben.<sup>[24][25]</sup> Die Bindung von NAADP **5** an Lsm12 führt zur Aktivierung und  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung über die TPC2 aus den sauren Lysosomen (Abb. 9).<sup>[25]</sup>

#### 4.4.6 Relevante Strukturmerkmale von NAADP für die Calcium-mobilisierende Aktivität

Für das Verständnis des gesamten NAADP-induzierten Calcium-Systems sowie der Struktur der Bindeproteine ist die Architektur der Bindetasche von wesentlicher Bedeutung. Erste Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (*Structure-Activity Relationships*, SAR) wurden jedoch bereits vor der Entdeckung von HN1L/JPT2 und Lsm12 in Seeigelleiern untersucht.<sup>[86]</sup> LEE *et al.* identifizierten in Experimenten mit NAADP-Analoga, die durch die Basenaustauschreaktion unter Verwendung der *Aplysia* ADP-Ribocyclase synthetisiert wurden, drei relevante Strukturmerkmale.

Zunächst wurde die Bedeutung der **Carbonsäurefunktion** analysiert (Abb. 12). Es wurde festgestellt, dass die Abwesenheit der negativen Ladung, wie sie beim Amido-Substituenten (NADP **4**) oder bei Derivaten mit Alkoholsubstituenten **7** auftritt, zu einer vollständigen Inaktivierung führte. Zudem führte die Verschiebung der Carboxylgruppe auf die 4-Position **8** ebenfalls zur vollständigen Inaktivierung. Daraus ergibt sich, dass die negative Ladung an der 3-Position entscheidend für die  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilisierende Aktivität ist. Der Austausch der Carbonsäure durch Sulfonsäure **9** sowie das Hinzufügen weiterer Substituenten **10** verringerte zwar die Calciumfreisetzung, unterbanden diese jedoch nicht vollständig.<sup>[86][87]</sup>



**Abb. 12:** Relevante Strukturmerkmale von NAADP **5** und deren Calcium-freisetzenden Aktivitäten.<sup>[86][88]</sup>

Neben den Modifikationen am oberen Baustein von NAADP **5** wurden auch Veränderungen an der **2'-Phosphatgruppe** vorgenommen. Die durchgeführten Untersuchungen haben ergeben, dass ein 3'-Shift **11** oder die Bildung eines cyclischen 2',3'-Phosphats **12** zu einer Verringerung der Aktivität des Moleküls führt. Das Fehlen der Phosphatgruppe **13** beziehungsweise die Ausbildung von 2'-Phosphodiestern **14** hat jedoch eine vollständige Inaktivierung des Moleküls zur Folge.<sup>[9][16][86]</sup>

Eine weitere, eher unerwartete strukturelle Komponente ist die **6-Amino-Funktion** der Adeninbase. Bei der Untersuchung des Hypoxanthinderivats **15** wurde eine um mehr als das 1000-fache reduzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungsaktivität festgestellt, obwohl die Größe einer Hydroxyfunktion vergleichbar mit der einer Aminofunktion ist.<sup>[86]</sup>

Kürzlich konnte von KRUKENBERG gezeigt werden, dass trotz des Austauschs der 3'-Hydroxygruppe der Adenosin-Einheit gegen eine Methoxygruppe oder ein Fluoratom eine Calciumfreisetzung stattfand.<sup>[7][89]</sup> Im Gegensatz dazu wies das analoge NADP-Derivat keine Aktivität auf. Dies lässt den Schluss zu, dass die 3'-Position der Adenosin-Einheit eine eher untergeordnete Rolle für die  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilisierende Aktivität spielt, jedoch einen stabilisierenden Einfluss ausübt, indem ein 3'-Phosphatshift oder die Ausbildung eines cyclischen 2',3'-Phosphodiesters verhindert wird.<sup>[7]</sup>

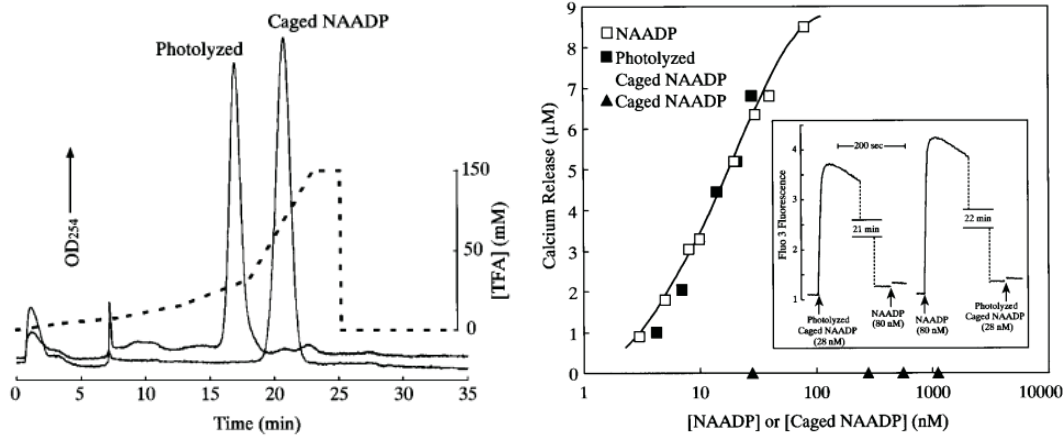
#### 4.5 Methoden der NAADP-Applikation in Zellen

Zur Untersuchung der intrazellulären Signalübertragungswege von NAADP **5** wurden diverse Methoden entwickelt, welche den Transfer des NAADPs in die Zelle ermöglichen und dort eine Calciumfreisetzung initiieren. Anschließend ermöglichen Knock-Out-Experimente die Validierung von Enzymen oder Rezeptoren, die eine entscheidende Rolle bei der Calciumfreisetzung spielen. Aufgrund der hohen Polarität des NAADP-Moleküls unter physiologischen Bedingungen waren die Methoden zur Applikation von NAADP **5** bis vor kurzem auf Mikroinjektion, *Patch-Clamp* und Elektroporation beschränkt.<sup>[74][90]</sup> Diese Verfahren bewirken zwar eine relativ zuverlässige intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung, die Nachteile ergeben sich jedoch insbesondere aus dem präparativen und zeitintensiven Aufwand sowie dem durch die Einzelzellpräparation induzierten Stress. Dieser kann dazu führen, dass es durch frühzeitige  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungen zu falsch-positiven Ergebnissen kommen kann. Aufgrund dieser Herausforderungen wurde in den letzten Jahren ein neuer Ansatz entwickelt, mit dem die Problematik der Einzelzellpräparation vollständig umgangen werden kann.<sup>[7][9]</sup> Dabei werden die negativen Ladungen des NAADPs **5** mit Schutzgruppen maskiert. Durch passive Diffusion ist es dem NAADP-Derivat möglich, die Zellmembran zu durchdringen und intrazellulär eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung zu induzieren. Dabei werden die lipophilen Masken intrazellulär durch Esterasen gespalten, wodurch das demaskierte NAADP-Derivat freigesetzt wird. Diese Derivate können mit den Bindeproteinen HN1L/JPT2 oder Lsm12 interagieren, ohne zusätzlichen Zellstress zu verursachen.<sup>[7][9]</sup>

##### 4.5.1 Masken-Konzept am NAADP

Die Bedingungen, die ein Maskenkonzept erfüllen muss, sind vielfältig. Zum einen sollte durch die Maskierung des polaren Moleküls eine Steigerung der Lipophilie erreicht werden, um eine angemessene Membranpermeabilität bei gleichzeitig hoher Wasserlöslichkeit zu gewährleisten. Darüber hinaus ist eine hinreichende chemische Stabilität erforderlich, um den Transport durch extrazelluläre sowie intrazelluläre Medien zu ermöglichen. Des Weiteren ist eine effiziente Abspaltung der Masken unter Bildung nicht-toxischer Spaltprodukte innerhalb der Zelle erforderlich. Das auf diese freigesetzte biologisch aktive NAADP-Derivat sollte anschließend eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung induzieren, die in ihrer Art und ihrem Ausmaß möglichst identisch zu der seines nativen Vertreters ist.

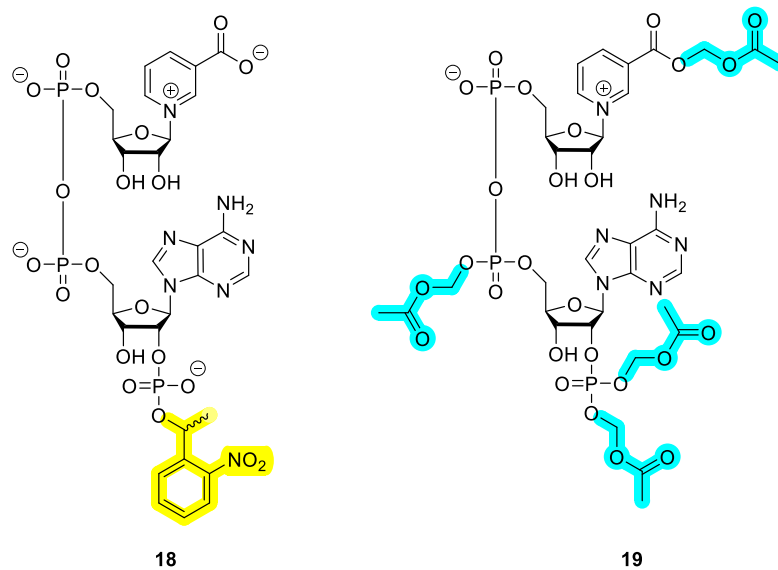
Eines der ersten Maskenkonzepte für NAADP **5** wurde 1997 von LEE *et al.* vorgestellt. Das *photo-caged*-NAADP **18** wurde an der 2'-Phosphat mit einer 1-(2-nitrophenyl)ethyl-Photo-Gruppe versehen (Abb. 14).<sup>[91]</sup> Die Schützung sowie die entsprechende Spaltung der Photo-Maske wurden mittels HPLC untersucht (Abb. 13). In Zellstudien konnte beobachtet werden, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach der Injektion und einer einminütigen UV-Bestrahlung bei 0-4 °C der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration des nativem NAADP **5** ähnelt. Durch eine nachfolgende Injektion mit nativem NAADP **5** konnte die Konzentration nicht weiter gesteigert werden. Auch eine Änderung der Injektionsreihenfolge führte zu keiner zusätzlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung. Diese Ergebnisse legen nahe, dass das *photo-caged*-Derivat **18** nach Bestrahlung denselben NAADP- $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher nutzt wie das native NAADP **5**.<sup>[91]</sup>



**Abb. 13:** Links: HPLC-Chromatogramm vor und nach einer einminütigen Bestrahlung mit UV-Licht bei 0-4 °C. Rechts: Vergleich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung von nativem NAADP **5**, *photo-caged*-NAADP **18** vor der Bestrahlung und *photo-caged*-NAADP **18** nach der Bestrahlung. Injektion von *photo-caged*-NAADP **18** und  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung sowie anschließende Mikroinjektion von nativem NAADP bzw. in umgekehrter Reihenfolge. Die Freisetzung wurde in Seeigelei-Homogenaten mit Fluo-3 gemessen.<sup>[91]</sup>

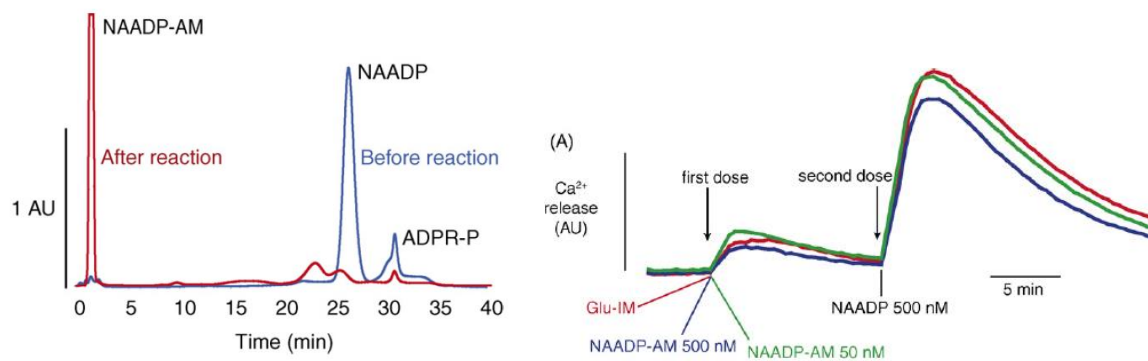
Ein entscheidender Nachteil ist jedoch die unzureichende Steigerung der Lipophilie, weshalb eine invasive Mikroinjektion eingesetzt wurde, um das *photo-caged*-NAADP **18** in die Zelle zu transferieren.<sup>[91]</sup>

Ein weiteres, häufig verwendetes maskiertes NAADP-Derivat ist das 2008 von PARKESH *et al.* veröffentlichte NAADP-AM **19** (Acetyloxymethylester) (Abb. 14).<sup>[92]</sup>



**Abb. 14:** Links: *photo-caged*-NAADP **18** mit Photo-Maske an der 2'-Phosphatgruppe (gelb). Rechts: Postulierte Struktur des NAADP-AM **19** mit vier Acetyloxymethylestern als Maskierungseinheiten (blau).<sup>[91][92]</sup>

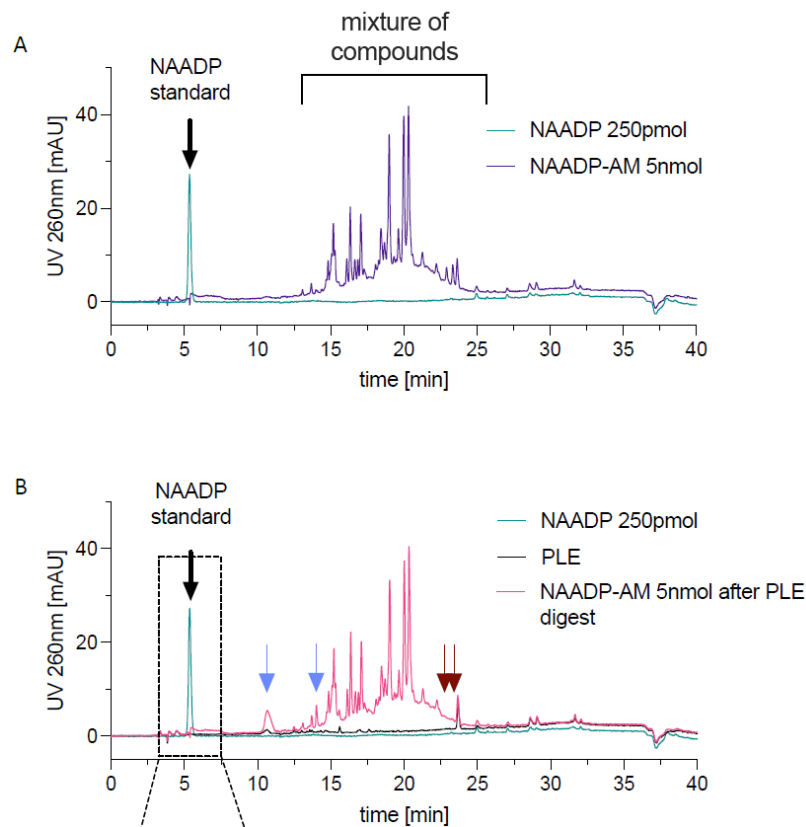
Zur Darstellung des NAADP-AM **19** wurde das native NAADP **5** unter den Bedingungen von SCHULTZ *et al.* mit Acetyloxymethylbromid umgesetzt.<sup>[93]</sup> Die chromatographische Verfolgung der Reaktion mittels HPLC zeigte bereits nach einer Stunde eine signifikante Abnahme des nativen NAADP **5** sowie das Auftreten eines neuen Peaks (Abb. 15).<sup>[92]</sup> PARKESH *et al.* vermuteten, dass die Maskierung der negativen Ladung zu einer signifikanten Verkürzung der Retentionszeit führte. NMR-spektroskopische Analysen ermöglichten aufgrund der Vielzahl an Resonanzen jedoch keine eindeutige Bestimmung der Anzahl und Positionen der Acetyloxymethylmasken, was auf das Vorliegen einer Vielzahl verschiedener Reaktionsprodukte schließen lässt. Auch eine Identifizierung seiner exakten Struktur anhand der im <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum erkennbaren Verschiebungen der Phosphatgruppen war nicht möglich, da die Signale kaum vom Grundrauschen abzugrenzen waren.<sup>[92]</sup>



**Abb. 15:** Links: HPLC-Reaktionsverfolgung (Anionenaustausch-HPLC mit konkav verlaufendem Gradienten aus Trifluoressigsäure) der Synthese von NAADP-AM **19** (rot) nach einer Stunde aus NAADP **5** (blau). Rechts: Untersuchung der Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung nach Zugabe zu Seeigeleierhomogenaten von 50 nM bzw. 500 nM NAADP-AM **19** und anschließender zweiter Dosis mit 500 nM NAADP **5**.<sup>[92]</sup>

Die Untersuchung der Ca<sup>2+</sup>-freisetzenden Eigenschaften von NAADP-AM **19** ergab zwar, dass vermutlich eine passive Diffusion des Moleküls stattfindet, jedoch wurde keine signifikante Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung beobachtet. Dabei wurden zwei verschiedene Konzentrationen (50 nM und 500 nM) von NAADP-AM **19** verabreicht. In beiden Fällen konnte kein signifikanter Anstieg der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration nachgewiesen werden. Nach 20 Minuten wurde die maximale Dosis von 500 nM NAADP **5** erneut zugegeben, wobei eine leicht inhibitorische Wirkung des NAADP-AM **19** festgestellt werden konnte (Abb. 15, blau).<sup>[92]</sup>

Die bei der Synthese von NAADP-AM **19** beobachtete Problematik zeigte sich ebenfalls in der HPLC-Analyse von kommerziell erhältlichem NAADP-AM **19** (Abb. 16).<sup>[7]</sup> Das HPLC-Chromatogramm zeigt über 25 verschiedene Peaks mit unterschiedlicher Intensität, was darauf hindeutet, dass es sich um ein Gemisch von nicht identifizierbaren Molekülen handelt. Darüber hinaus konnte mit Hilfe einer enzymatischen Hydrolyse gezeigt werden, dass nach 5-minütiger Inkubation von NAADP-AM **19** (5 nM) mit Schweineleberesterase (PLE) bei 37 °C weder eine signifikante Veränderung des Chromatogramms der Reaktionslösung, noch die Entstehung von nativen NAADP, welches als externer Standard verwendet wurde, erkennbar sind (Abb. 16, B).<sup>[7]</sup>



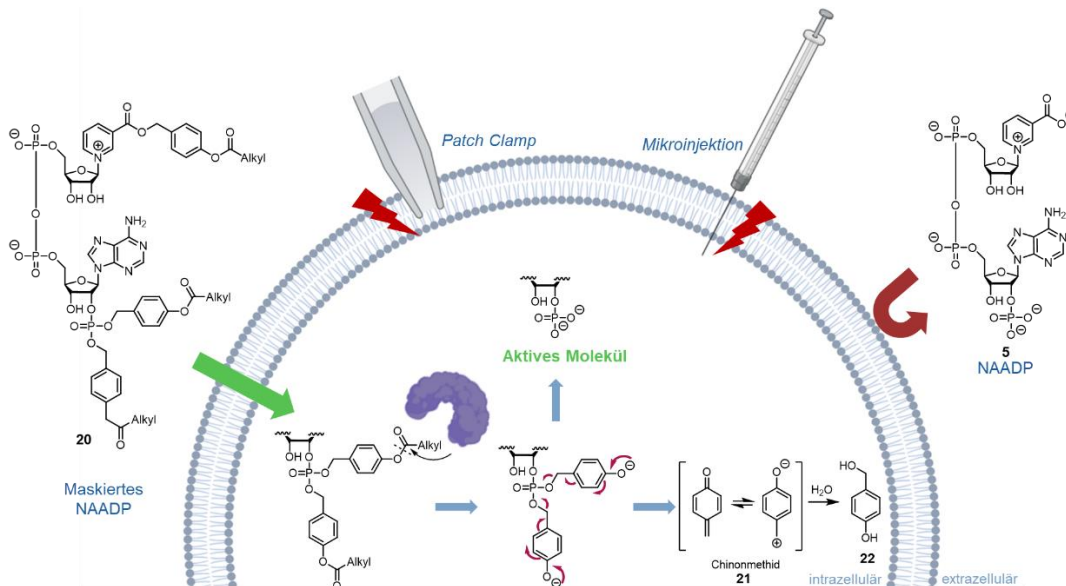
**Abb. 16:** HPLC-Chromatogramm des kommerziell erhältlichen NAADP-AM **19** (5 nM) und NAADP **5** (250 pM) als Kontrolle. B. Enzymatischer Hydrolyseverlauf von NAADP-AM **19** (5 nM) nach 5-minütiger Inkubation in PLE (5 U/mL, rot) bei 37 °C. NAADP **5** ist als Standard gezeigt (blau).<sup>[7]</sup>

Auf Grundlage der zweifelhaften analytischen Daten in Bezug auf die Anzahl und die Positionen der AM-Gruppen sowie der eindeutig negativ ausgefallenen Tests bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung ist die Verwendung von NAADP-AM **19** fragwürdig.<sup>[7][92]</sup>

#### 4.5.2 AB/ACB-Prodrug-Maskenkonzept

Unter den etablierten Schutzgruppen-Konzepten, die durch eine Modifikation von polaren Molekülen wie Nucleosiden die passive Diffusion durch Zellmembranen ermöglichen, hat sich die Verwendung von **Acyloxybenzyl-Estern** (AB-Estern) bewährt.<sup>[8]</sup> Dieses Konzept wurde erstmals von KATZENELLENBOGEN *et al.* zur Maskierung von Aminen und später von FREEMAN *et al.* und THOMSON *et al.* zur Maskierung von Phosphaten beschrieben.<sup>[94–96]</sup> Mit diesem Schutzgruppenkonzept wurden im Arbeitskreis MEIER bei der Synthese von Diphosphat- (DiPPro) und Triphosphat-Prodrugs (TriPPPPro) große Erfolge erzielt. Die Zellaufnahme dieser zellgängigen Prodrugs konnte mithilfe intrinsisch fluoreszierender Nucleotide nachgewiesen werden.<sup>[8][97–102]</sup>

Die Verwendung von AB-Masken an Phosphaten erhöht die Lipophilie durch die Einführung langer Alkylketten und maskiert gleichzeitig die negative Ladung, wodurch eine passive Diffusion durch die Zellmembran ermöglicht wird (Abb. 17). Durch Variation der Kettenlänge können zusätzliche Ladungen innerhalb des Moleküls kompensiert werden, um die Membranpermeabilität sicherzustellen.<sup>[8][103]</sup>



**Abb. 17:** Schematische Darstellung des Prodrug-Konzepts an der 2'-Phosphatgruppe des maskierten NAADP **20**, beispielhaft dargestellt am maskiertem NAADP **20**, mit Hydrolysekaskade des Acyloxybenzylesters unter Freisetzung des ungeschützten Phosphats.<sup>[99][104]</sup>

Intrazellulär erfolgt zunächst die enzymatische Hydrolyse des Phenylesters durch Esterasen oder einen nucleophilen Angriff, bei der eine Umpolung der *para*-ständigen Funktion von einem Elektronenakzeptor zu einem Elektronendonator stattfindet. Daraufhin kommt es zu einer spontanen 1,6-Eliminierung mit dem mesomeriestabilisierte Chinonmethid **21** als Spaltprodukt der Schutzgruppe. Dieses reagiert in einer Additionsreaktion weiter zu einem nicht toxischen Hydroxybenzylalkohol **22** (Abb. 17).<sup>[105][106]</sup>

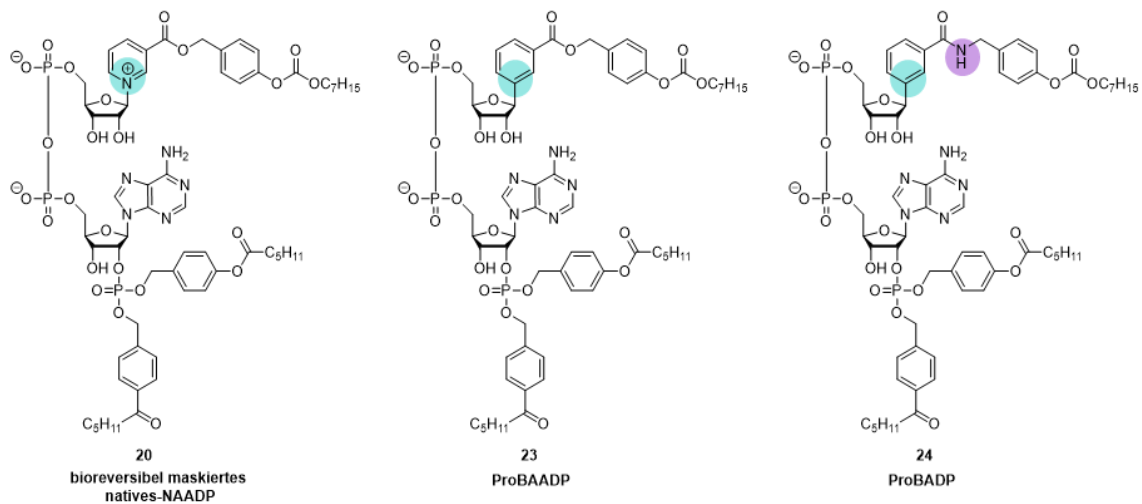
In früheren Arbeiten konnte außerdem gezeigt werden, dass durch Substituenten oder Variation der Kettenlänge gezielt die Lipophilie der maskierten Verbindung sowie die Halbwertszeit der Freisetzung eingestellt werden kann.<sup>[107]</sup> Bei zunehmender Alkyl-Kettenlänge nimmt nicht nur die Lipophilie, sondern auch die Halbwertszeit der Spaltung der Maske zu, sodass eine Kettenlänge zu wählen ist, die zwar eine ausreichende Membranpermeabilität aufweist, jedoch keine zu lange Halbwertszeit.<sup>[107]</sup>

Eine weitere erfolgreich eingesetzte Schutzgruppe, die der AB-Maske ähnelt, ist das **Alkoxy-carbonyloxybenzyl-Ester** (ACB-Ester). Im Gegensatz zur AB-Schutzgruppe zeichnet sich das Carbonat-Motiv durch eine erhöhte chemische Stabilität bei gleichbleibender

enzymatischer Labilität aus.<sup>[8]</sup> Diese chemische Stabilität ist insbesondere im Hinblick auf die Syntheseplanung von Vorteil und könnte zudem eine vorzeitige extrazelluläre Spaltung der bioreversiblen Gruppe im Inkubationsmedium verhindern.

### 4.5.3 MASTER-NAADP

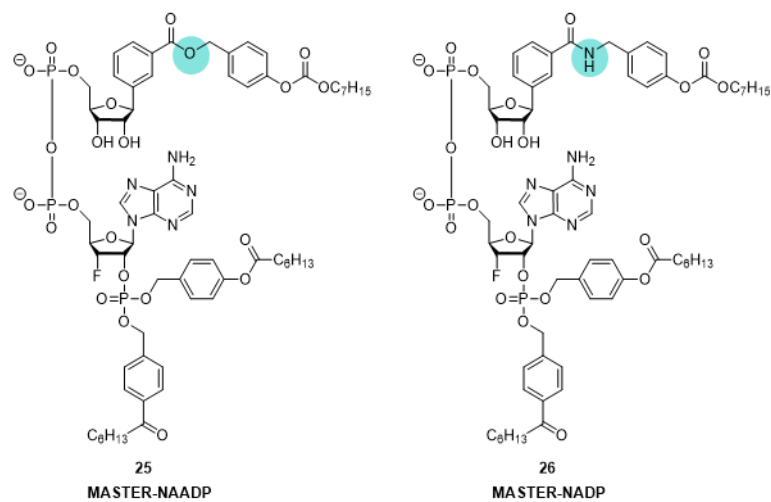
Die ersten membranpermeablen, bioreversibel maskierten AB/ACB-NAADP-Derivate wurden im Arbeitskreis von MEIER durch DEKIERT entwickelt und synthetisiert.<sup>[9]</sup> Zunächst wurde von DEKIERT versucht, das native NAADP **5** in einer Totalsynthese mithilfe des AB-Masken-Konzepts membranpermeabel zu maskieren. Die Schützung der Carbonsäurefunktion sowie die doppelte Maskierung der 2'-Phosphateinheit sollten zielführend sein (Abb. 18). Die beiden Bausteine konnten dabei in einem konvergenten Ansatz mit bioreversiblen Masken versehen und als Monophosphat erhalten werden. Der Versuch, den Adenosinbaustein mit einem Nicotinsäurebaustein zu kuppeln, war jedoch aufgrund der hohen Labilität der *N*-glycosidischen Bindung nicht erfolgreich.<sup>[9]</sup> Zur Erhöhung der Stabilität wurde ein *C*-glycosidischer Nicotinsäurebaustein gewählt. Ein Vorteil der *C*-Nucleoside ist, dass durch die *C*-glycosidische Bindung eine wesentlich höhere Stabilität gegenüber enzymatischer und säurekatalysierter Hydrolyse gegeben ist, da die *C*-glycosidische Bindung im Gegensatz zu der *N*-glycosidischen Bindung keinen Acetalcharakter aufweist.<sup>[108][109]</sup> Die Kupplung des *C*-glycosidischen Nicotinsäurebausteins mit dem noch 3'-TIPDSi<sub>2</sub>-geschützten Adenosinbaustein führte zu dem chemisch stabilisierten, bioreversibel maskierten ProBAADP-Derivat **23**.<sup>[9]</sup>



**Abb. 18:** Chemische Struktur der bioreversibel AB/ACB-maskierten NAADP-Derivate mit labiler N-glycosidischer Bindung **20**, mit chemisch stabilisierter C-glycosidischer Bindung (ProBAADP **23**) und das entsprechende NADP-Derivat (ProBADP **24**).<sup>[9]</sup>

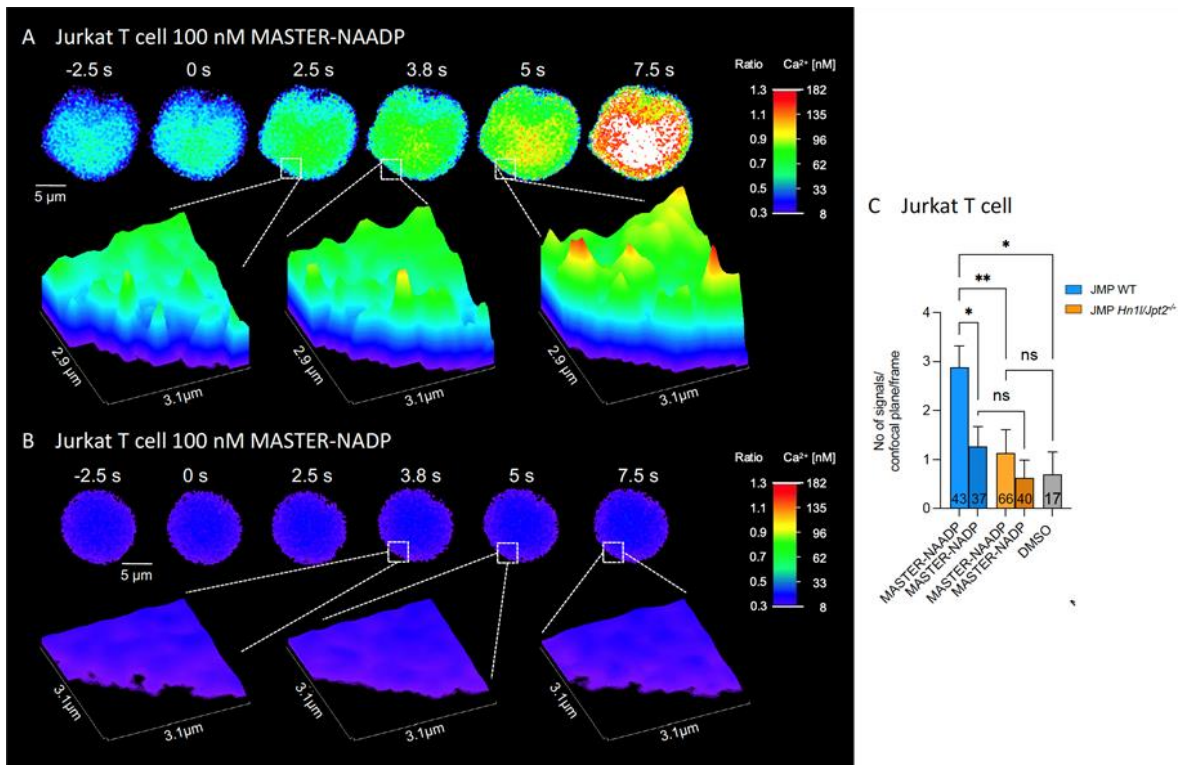
In Hydrolysestudien wurde die enzymatisch induzierte Freisetzung der AB/ACB-Schutzgruppen bestätigt. Zur Validierung der passiven Diffusion sowie der  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzenden Wirkung von ProBAADP **23** wurden ein stabilisiertes NADP-Derivat **24** und ein ungeschütztes NAADP-Derivat als negative Kontrollen synthetisiert. Bei der Untersuchung der Membranpermeabilität und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung wurden Ergebnisse erzielt, die mit denen des nativen NAADPs korrelieren. Stabilitätsstudien zeigten jedoch, dass sich eine Schutzgruppe am 2'-Phosphat bereits nach einstündigem Rühren in PBS-Puffer abspaltete. Dies wird wahrscheinlich durch eine chemisch induzierte Phosphatmigration verursacht, die dazu führt, dass sich eine Schutzgruppe frühzeitig abspaltet, während die zweite erst nach mehreren Tagen abgespalten wird, was letztendlich die Freisetzung des aktiven NAADP-Derivats ermöglicht.<sup>[9]</sup>

Die Einführung eines 3'-Fluorsubstituenten sollte diese Phosphatmigration verhindern und führte 2021 in Zusammenarbeit mit KRUKENBERG zur Entwicklung des 3'-F-MASTER-NAADPs **25** (Abb. 19).<sup>[9][110]</sup>



**Abb. 19:** Vergleich der chemischen Struktur von 3'-F-MASTER-NAADP **25** und 3'-F-MASTER-NADP **26** mit bioreversiblen Schutzgruppen.<sup>[7]</sup>

Im Rahmen von Untersuchungen zur chemischen Stabilität konnte festgestellt werden, dass erst nach einer Hydrolysedauer von sechs Stunden ein Intermediat gebildet wird, bei dem vermutlich eine Schutzgruppe abgespalten wurde. In biologischen Studien konnte anschließend sowohl die hervorragende Membranpermeabilität als auch eine direkte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung nachgewiesen werden.<sup>[7]</sup> Wie in Abbildung 20 dargestellt, konnte bereits 60 Sekunden nach der extrazellulären Zugabe von 3'-F-MASTER-NAADP **25** eine Bildung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomänen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu führt eine Inkubation der Zellen mit der 3'-F-MASTER-NADP-Referenzverbindung **26** zu keinen lokalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die beobachteten Effekte auf die intrazelluläre Entstehung des bioaktiven Metaboliten zurückzuführen sind.<sup>[7]</sup>



**Abb. 20:** Repräsentative hochaufgelöste Bilder der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung in Jurkat-T-Zellen, die mit 100 nM MASTER-NAADP **25** (A) oder MASTER-NADP **26** (B) inkubiert und mit Fluo4-AM und Fura-Red-AM behandelt wurden. (C) Diagramm zur Darstellung der Anzahl der  $\text{Ca}^{2+}$ -Mikrodomänen: Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt; Jurkat WT MASTER-NAADP, n=66 Zellen; Jurkat WT MASTER-NADP, n=40 Zellen; Jurkat HN1L/JPT2<sup>-/-</sup> MASTER-NAADP, n=43 Zellen; Jurkat HN1L/JPT2<sup>-/-</sup> MASTER-NADP, n=37 Zellen; Jurkat WT DMSO, n=17 Zellen; nichtparametrischer Kruskal-Wallis-Test und Dunns Korrektur für Mehrfachtests \*P < 0.05; \*\*P < 0.005.<sup>[7]</sup>

Aufgrund der vorliegenden analytischen und biologischen Daten ist das entwickelte 3'-F-MASTER-NAADP **25** in seiner ersten Generation hervorragend als Werkzeug für weiterführende biologische Untersuchungen geeignet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere Derivate zur Optimierung der calciumfreisetzenden Eigenschaft der 3'-F-MASTER-NAADP-Struktur **25** entwickelt, wobei Modifikationen des Nicotinsäurebausteins vorgenommen wurden.

## 5 Aufgabenstellung

In den letzten Jahren wurde ein bedeutender Teil der Signaltransduktionskaskade von NAADP **5** durch die Entdeckung der Bindeproteine HN1L/JPT2 und Lsm12 aufgeklärt.<sup>[4][5][24][25]</sup> Dennoch bleiben zahlreiche Fragen hinsichtlich der strukturelevanten Merkmale, der Biosynthese, der Speicherung und des Abbaus von NAADP **5** offen, was die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen unabdingbar macht.

Das in unserer Arbeitsgruppe von DEKIERT und KRUKENBERG entwickelte 3'-F-MASTER-NAADP **25** erzielte in biologischen Untersuchungen sehr gute Ergebnisse hinsichtlich der passiven Diffusion und der Bildung von Ca<sup>2+</sup>-Mikrodomänen.<sup>[7]</sup> Aufgrund der chemischen Stabilisierung der *N*-glycosidischen Bindung wurden in dieser Arbeit *C*-glycosidische Nucleoside als Nicotinsäurebaustein verwendet. Für weitere Modifikationen sollten im Nicotinsäurebaustein Heterocyclen eingeführt werden, um positive Ladungen im Ring zu ermöglichen und das Derivat stärker an das native NAADP **5** anzunähern.

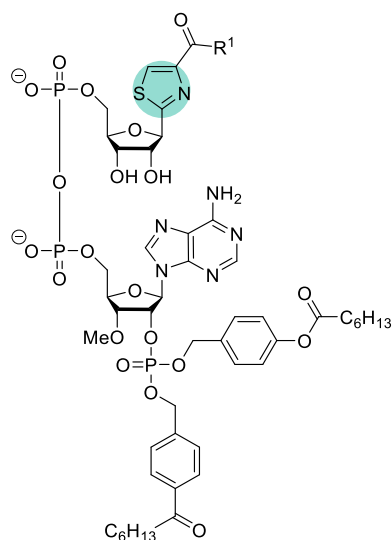
Das erste Derivat **27** wurde vom Thiazofurin-Motiv abgeleitet, welches sich in Form von Thiazoladenindinucleotid (TAD) als Inhibitor der Inosin-5'-monophosphatdehydrogenase (IMPDH) erwiesen hat.<sup>[108]</sup> Dies führt zu einer Unterbrechung der Guaninnucleotidsynthese, wodurch beispielsweise die Apoptose einiger humaner Krebszelllinien eingeleitet werden kann.<sup>[100][111]</sup> Thiazofurin ist ein synthetisches Nucleosid, das eine ausgeprägte antivirale und antitumorale Aktivität aufweist und zur Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie zugelassen ist.<sup>[112][113]</sup> Im Gegensatz zu dem strukturell ähnlichen Ribavirin, das insbesondere während der COVID-19-Pandemie große Aufmerksamkeit erlangte, wird Thiazofurin nicht nur zum Monophosphat metabolisiert, sondern durch die NAD-Pyrophosphorylase weiter zu einem Dinucleotid umgewandelt.<sup>[100–102]</sup> Das Thiazol-Derivat **27** könnte also potentiell als Agonist sowie als Antagonist im Calciumfreisetzungsmechanismus wirken.

Eine weitere Modifikation des Nicotinsäurebausteins besteht in der Verschiebung des Stickstoffatoms des nativen NAADP auf die 5-Position des Pyridin-Rings **28**. Diese Einführung des Stickstoffs stellt im Vergleich zum 3'-F-MASTER-NAADP **25** einen Schritt zurück in Richtung der nativen Struktur des NAADP **5** dar und bietet zudem die Möglichkeit, eine positive Ladung in den Ring zu integrieren und dabei trotzdem von der stabilen *C*-glycosidischen Bindung zu profitieren.

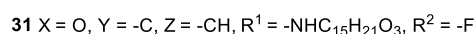
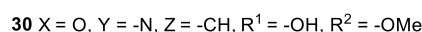
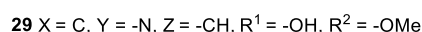
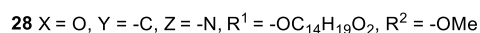
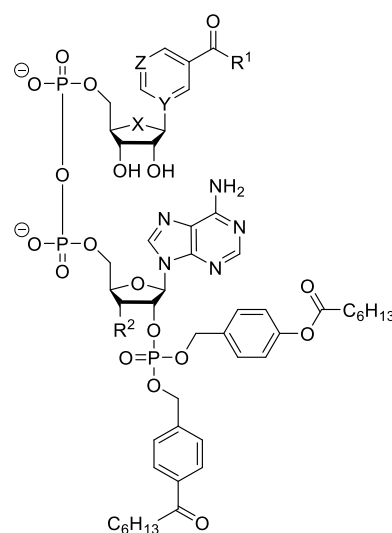
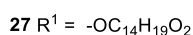
Ein weiteres NADP-Derivat, wie es auch für die Thiazol- und die 5-Pyridin-Derivate synthetisiert werden sollte, ist das 3'-F-MASTER-NADP. Dieses Derivat sollte als Referenzverbindung des 3'-F-MASTER-NAADPs verwendet werden.<sup>[7]</sup>

Ein weiterer Ansatz, um der nativen Struktur des NAADPs zu ähneln, ist die Synthese eines carbocyclischen Derivats **29**, wie in Abbildung 21 dargestellt. Die Einführung eines Carbocyclus zielt darauf ab, den Acetalcharakter der Bindung zum Pyridylring zu verhindern und die Stabilität zu erhöhen. Vorangegangene Arbeiten zeigten allerdings, dass die Maskierung der Carbonsäure durch den zwitterionischen Charakter des Nicotinsäure-Rests erschwert wird.<sup>[9]</sup> Da sich aus diesem Umstand allerdings eine neutrale Nettoladung ergibt, sollte ebenfalls untersucht werden, ob sich die Maskierung der Carbonsäurefunktion als redundant erweist. Mit dem gleichen Ansatz wurde auch ein 'natives' NAADP-Derivat **30** entwickelt, das den Acetalcharakter beibehält. Auf eine Maske wird dabei an der Carbonsäure verzichtet, da DEKIERT vermutete, dass dies die *N*-glycosidische Bindung destabilisiert.<sup>[9]</sup>

Somit bestand das Ziel der vorliegenden Arbeit in der Entwicklung von fünf lipophil maskierten, membranpermeablen und chemisch stabilisierten MASTER-NAADP-Derivaten sowie den dazugehörigen MASTER-NADP-Negativkontrollverbindungen (Abb. 21).



Thiazol-3'-OMe-MASTER-Derivat



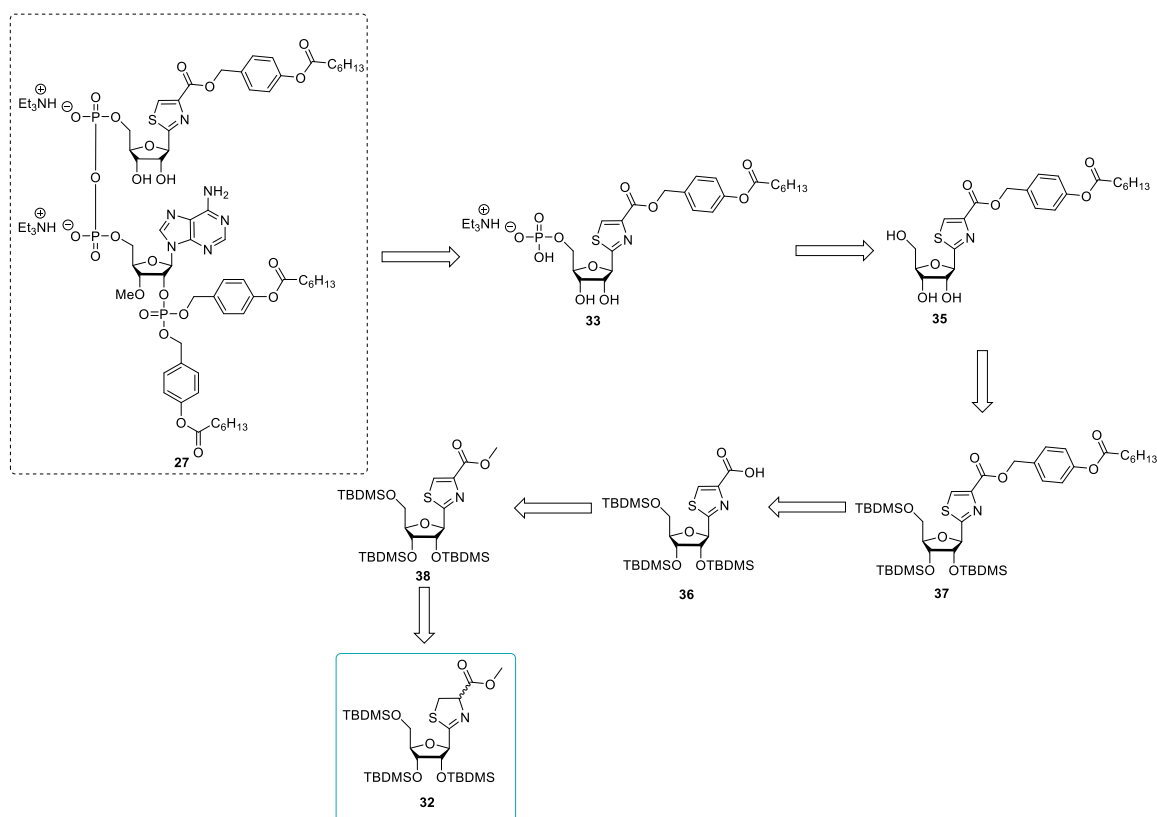
**Abb. 21:** Überblick über die Zielverbindungen, deren Totalsynthese im Rahmen dieser Arbeit entwickelt werden sollten. Für biologische Untersuchungen sollten die vier NAADP-Derivate auch in Form der entsprechenden NADP-Derivate ( $R^1 = -NHC_{14}H_{19}O_2, -NH_2$ ) dargestellt werden.

Im Anschluss sollten Untersuchungen zur chemischen Stabilität sowie zur enzymatischen Hydrolyse der Zielverbindungen erfolgen. Die biologischen Studien sollten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von GUSE am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) im Rahmen des Sonderforschungsbereichs (SFB) 1328 „*Adenine Nucleotides in Immunity and Inflammation*“ stattfinden.

## 6 Resultate und Diskussion

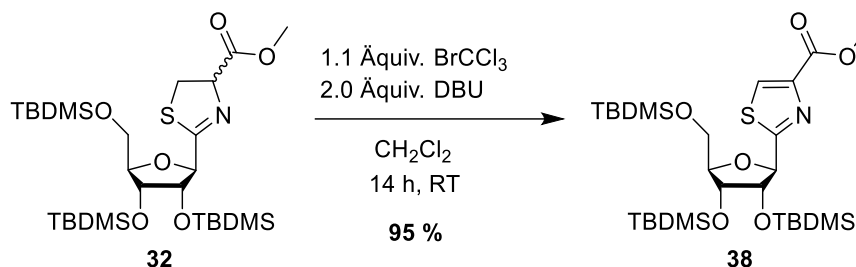
### 6.1 Synthese des Thiazol-NAADP-Derivats

In vorangehenden Forschungsarbeiten konnte die Synthese des Thiazol-Derivats **27** bis zur Verbindung **32** erfolgreich durchgeführt werden (Abb. 22, blau).<sup>[114]</sup> Die Zielverbindung **27** sollte durch die Kupplung der beiden Monophosphate dargestellt werden. Die Monophosphate **33** und **34** sollten durch die etablierte YOSHIKAWA-Phosphorylierung synthetisiert werden.<sup>[115]</sup> Das maskierte Nucleosid **35** sollte, nach Kupplung einer Acyloxybenzylmaskierung an die Carbonsäure **36**, durch eine Desilylierung der Verbindung **37** erhalten werden. Die hierfür erforderliche Carbonsäure **36** sollte durch die Verseifung des Methylesters **38** synthetisiert werden, wobei die Verbindung **38** wiederum durch eine Oxidation erhalten werden sollte.



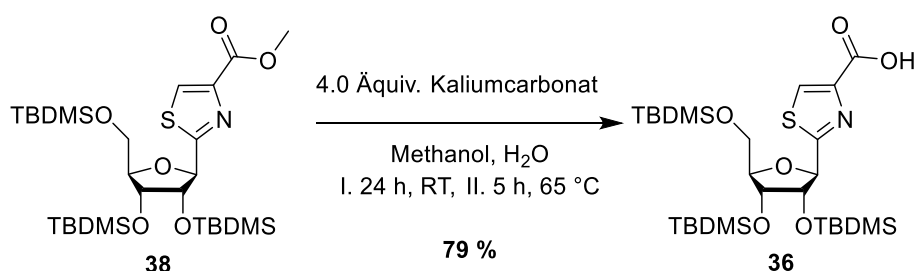
**Abb. 22:** Retrosynthetische Darstellung der Synthesestrategie für die Synthese des Thiazol-NAADP-Derivats.

Die Oxidation der Verbindung **32** zur Darstellung des Thiazolrings wurde unter Verwendung von Bromtrichlormethan und 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) durchgeführt (Abb. 23). Nach einer Reaktionszeit von 14 Stunden konnte dünn-schichtchromatographisch der vollständige Umsatz beobachtet werden.<sup>[116]</sup>



**Abb. 23:** Oxidationsreaktion zur Aromatisierung der Verbindung **32**.

Im Anschluss erfolgte die Verseifung des Methylesters **38** mit Kaliumcarbonat in Methanol (Abb. 24). Da jedoch nach 24-stündigem Rühren bei Raumtemperatur kein vollständiger Umsatz festgestellt werden konnte, wurde die Reaktionslösung auf 65 °C erhitzt und weitere 5 Stunden gerührt. Anschließend konnte der vollständige Reaktionsumsatz dünn-schichtchromatographisch beobachtet werden.

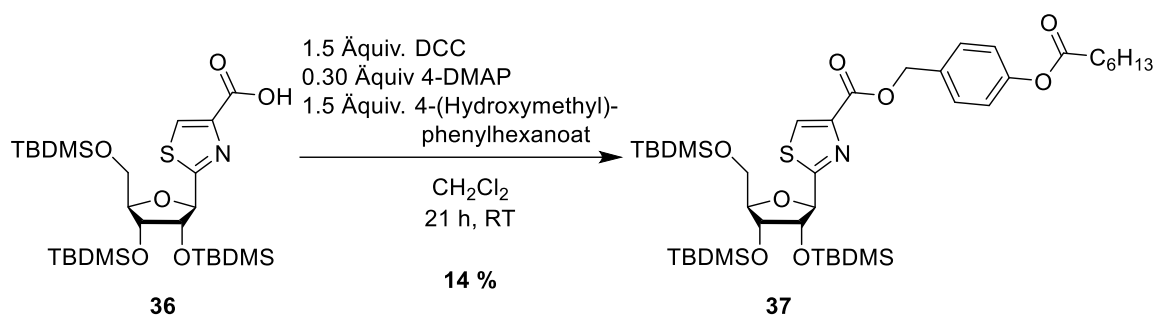


**Abb. 24:** Verseifung des Methylesters **38** zur Synthese der Carbonsäure **36**.

Nach Abschluss der Reaktion erfolgte eine Neutralisation der Reaktionslösung mit halbkonzentrierter Essigsäure. Im Anschluss an die Entfernung aller flüchtigen Bestandteile erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung des Produkts, wobei die Verbindung **36** in einer Ausbeute von 79 % erhalten wurde.

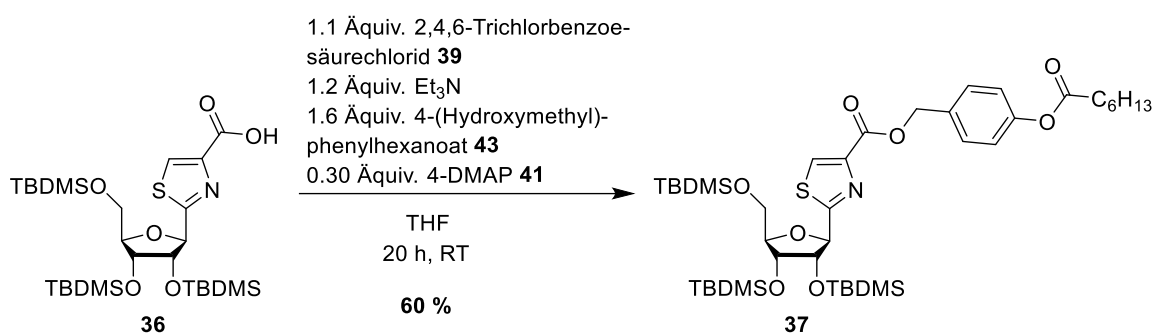
Die für die Steigerung der Lipophilie benötigte Acyloxybenzylmaske kann über unterschiedliche Veresterungsmethoden an die Carbonsäure gekuppelt werden. Zunächst wurde die STEGLICH-Methode gewählt, bei der die Carbonsäure der Verbindung **36** mit *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) aktiviert wird (Abb. 25). Diese wird zunächst an eine *C,N*-Doppelbindung des DCC addiert, wobei ein *O*-Acylisoharnstoff gebildet wird. Die Zugabe von 4-DMAP, welches als Nucleophil mit dem *O*-Acylisoharnstoff zu einem reaktiven *N*-Acylpyridiniumion reagiert, ermöglicht einen erleichterten Angriff des Alkohols an das

Carbonylkohlenstoffatom. Nach einer Protonenübertragung sowie der Abspaltung und Umlagerung wird der Ester **37** gebildet.<sup>[117]</sup>



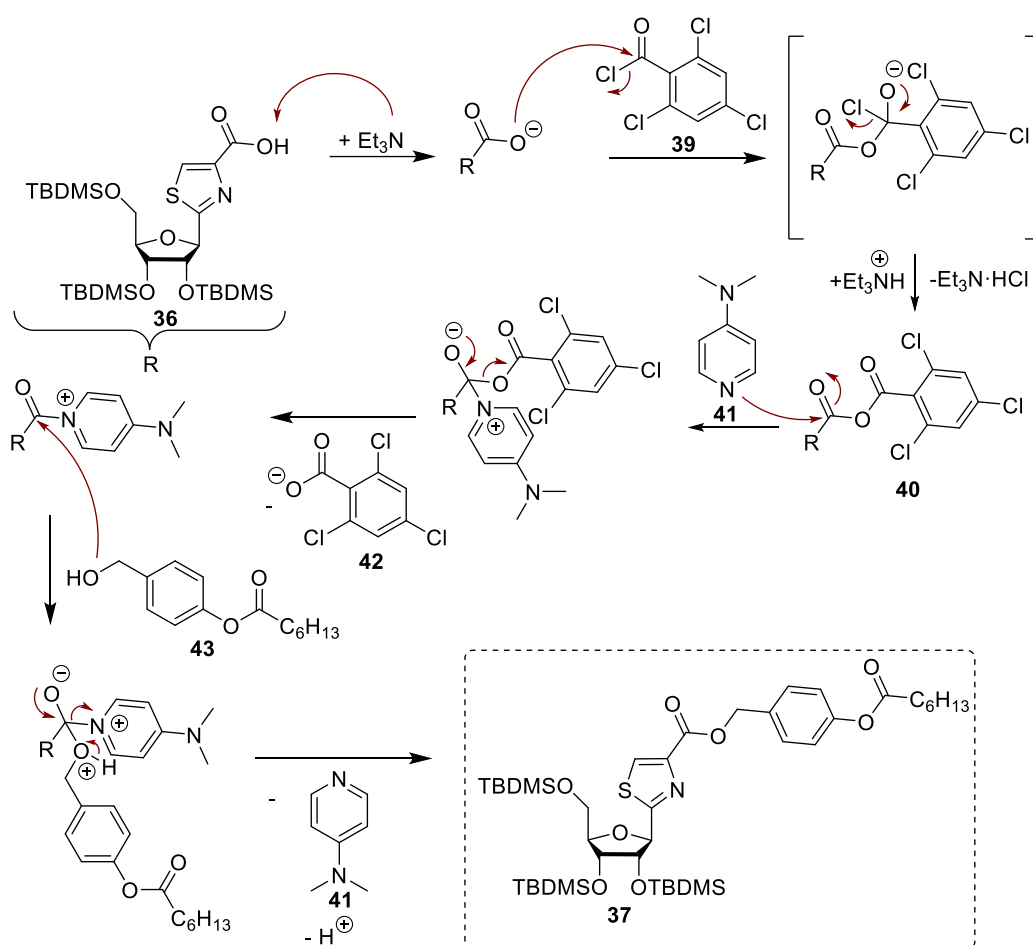
**Abb. 25:** STEGLICH-Veresterung der Carbonsäure **36** mit dem 4-(Hydroxymethyl)phenylhexanoat zur Bildung des Esters **37**.<sup>[117]</sup>

Durch diese Methode wurde das Produkt jedoch nur in einer Ausbeute von 14 % erhalten. Für die Optimierung der Ausbeute wurde daher die YAMAGUCHI-Veresterung gewählt (Abb. 26).<sup>[118]</sup>



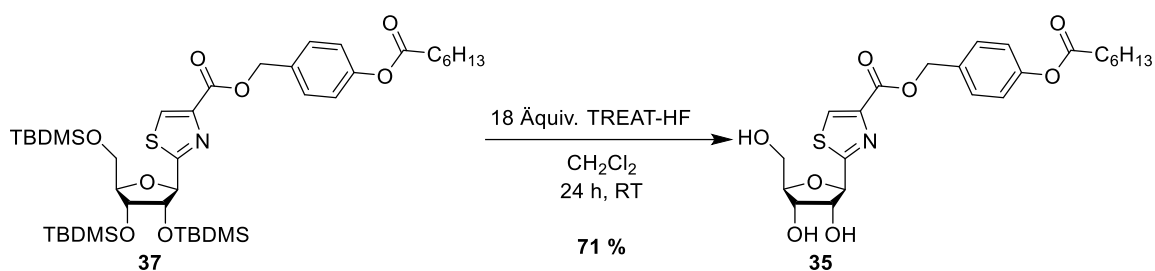
**Abb. 26:** YAMAGUCHI-Veresterung der Carbonsäure **36**.<sup>[118]</sup>

Im ersten Schritt erfolgt eine Deprotonierung der Carbonsäure durch Triethylamin, woraufhin eine nucleophile Substitutionsreaktion mit dem 2,4,6-Trichlorbenzoesäurechlorid **39** stattfindet. Es bildet sich ein gemischtes Anhydrid **40**, wobei das freigesetzte Chlorid als Triethylammoniumchlorid gebunden wird. Im nächsten Schritt greift 4-DMAP **41** die Carbonylgruppe des Anhydrids an und führt zur Spaltung der 2,4,6-Trichlorbenzoesäure **42**. Daraufhin erfolgt der nucleophile Angriff des Alkohols **43** auf das aktivierte Carbonylkohlenstoffatom. Nach der Abspaltung von 4-DMAP **41** wird das maskierte Produkt **37** erhalten (Abb. 27).<sup>[119]</sup>



**Abb. 27:** Mechanismus der Veresterung nach YAMAGUCHI mittels 2,4,6-Trichlorbenzoesäurechlorid **39** und 4-DMAP **41**.<sup>[118][119]</sup>

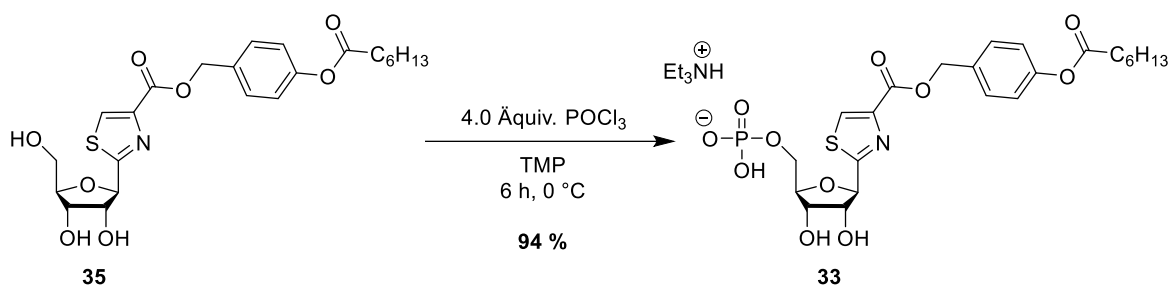
Für die nachfolgenden Reaktionen war es erforderlich, die Silylschutzgruppen der Hydroxygruppen zu entfernen. Die Spaltung von TBDMS-Gruppen erfolgt selektiv durch den Einsatz von Fluoridionen.<sup>[120]</sup> Darüber hinaus können dabei stark saure oder basische Bedingungen vermieden werden, um eine unerwünschte Spaltung der Maskierung zu verhindern. Die Verwendung von TREAT-HF (Triethylamin-Trihydrofluorid) hat dabei einige Vorteile zu anderen Fluoridreagenzien. Zum einen wirkt Triethylamin als Base und kann zusammen mit HF unter milderen Bedingungen eingesetzt werden, was vorteilhaft ist, um die Stabilität empfindlicher Gruppen zu gewährleisten. Zum anderen weist TREAT-HF im Vergleich zu anderen Fluorierungsreagenzien eine geringere Toxizität auf, sodass die Handhabung sicherer ist.<sup>[120]</sup>



**Abb. 28:** Spaltung der Silylschutzgruppen mittels TREAT-HF.

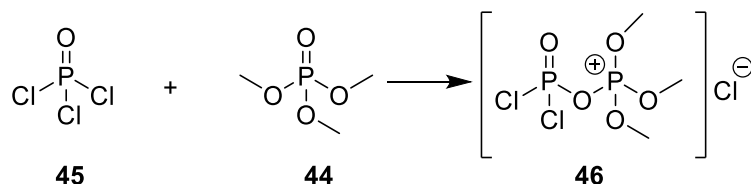
Nach der Zugabe von 18 Äquivalenten TREAT-HF wurde nach 24 Stunden Rühren bei Raumtemperatur das vollständig entschützte Nucleosid **35** erhalten (Abb. 28).

Im nächsten Schritt erfolgte die Monophosphorylierung der 5'-Hydroxygruppe gemäß den Arbeiten von YOSHIKAWA *et al.* Diese Methode ermöglicht eine selektive 5'-Phosphorylierung unter milden Bedingungen.<sup>[115]</sup>



**Abb. 29:** Monophosphorylierung der 5'-Hydroxygruppe nach YOSHIKAWA.<sup>[115]</sup>

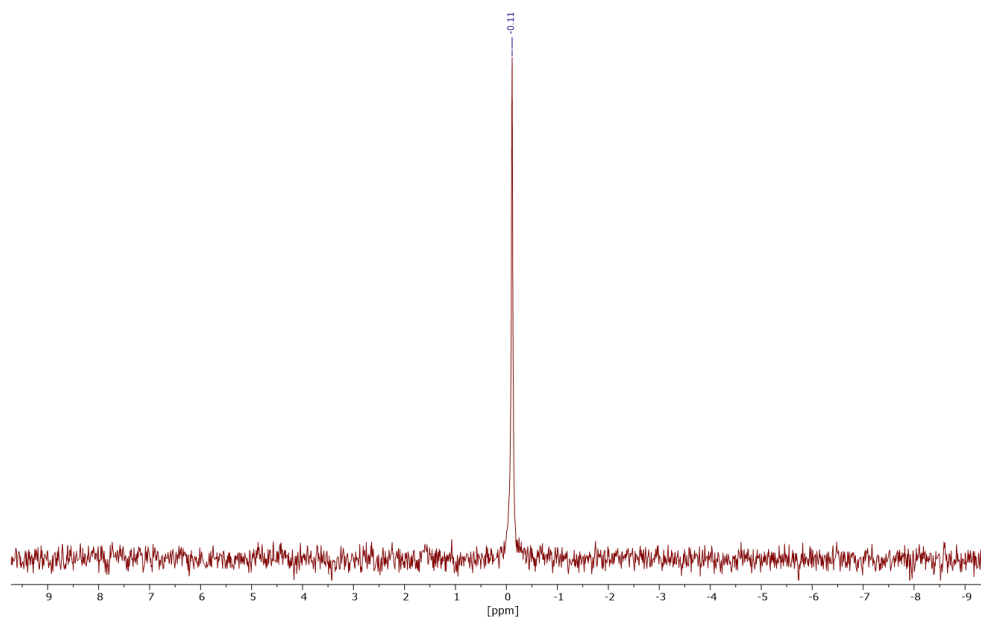
Das Nucleosid **35** wurde in Trimethylphosphat **44** (TMP) gelöst und anschließend das Phosphorylchlorid **45** bei 0 °C zugetropft. YOSHIKAWA *et al.* konnten feststellen, dass durch die Zugabe von Trialkylphosphaten wie TMP **44** oder Triethylphosphat (TEP) sowohl die Reaktionszeit signifikant verkürzt als auch die Löslichkeit der Nucleoside verbessert wird. Die reduzierte Reaktionszeit kann auf die Bildung einer aktivierten Spezies **46** zurückgeführt werden, die zwischen Phosphorylchlorid **45** und TMP **44** entsteht (Abb. 30).<sup>[121]</sup>



**Abb. 30:** Bildung einer aktivierten Spezies aus POCl<sub>3</sub> **45** und TMP **44** im Rahmen der YOSHIKAWA-Reaktion.<sup>[121]</sup>

Die Reaktion wurde anschließend mittels HPLC verfolgt, wobei der Umsatz stündlich verfolgt werden konnte.

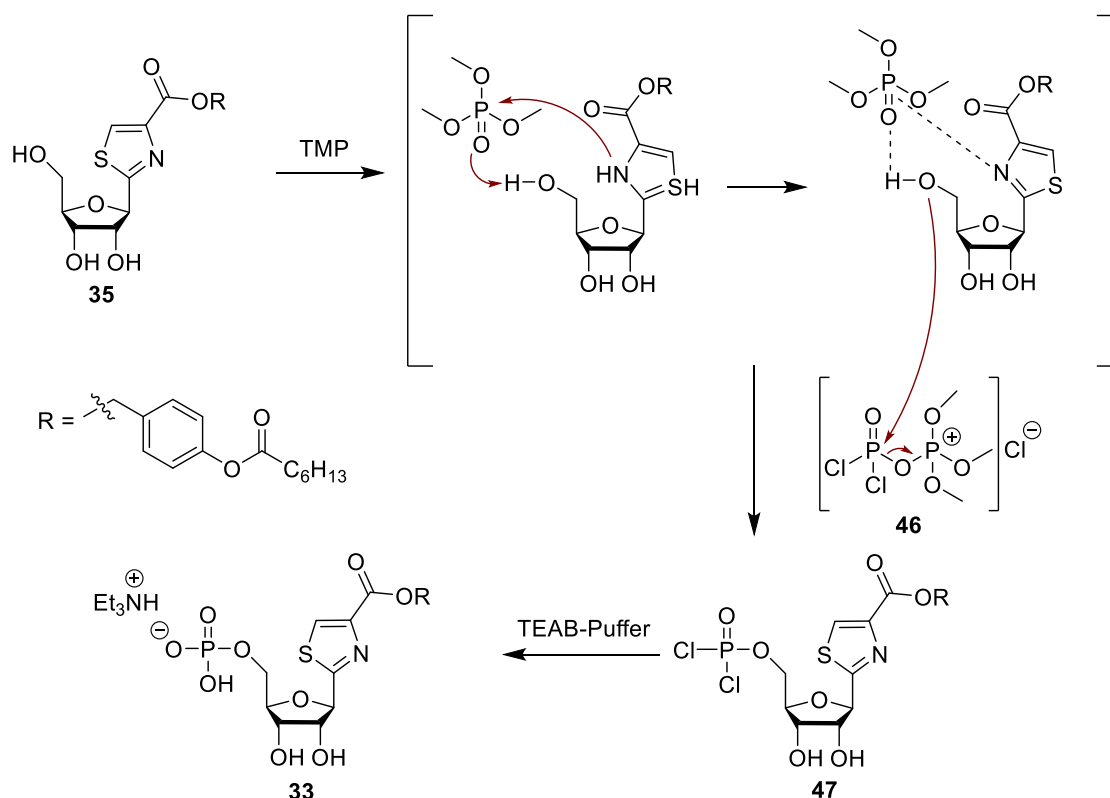
Nach 6 Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 M TEAB-Puffer (pH 8.0) hydrolysiert und die wässrige Lösung mit Hexan gewaschen, um das Trimethyl-phosphat **44** zu entfernen (Abb. 29). Die anschließende Reinigung erfolgte durch eine automatisierte RP-18-Säulenchromatographie (Acetonitril/Wasser).



**Abb. 31:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum des Thiazol-monophosphats **33** (162 MHz, 25 °C,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

Das  $^{31}\text{P}$ -Spektrum zeigt deutlich ein Signal bei -0.11 ppm, was der typischen Verschiebung eines Monophosphats entspricht (Abb. 31). Es sind keine weiteren Signale zu erkennen, sodass die Bildung von zweifach phosphorylierten Spezies ausgeschlossen werden kann.

Durch die Verwendung von TMP **44** als Lösungsmittel ist die Phosphorylierung 5'-selektiv, sodass für die 2'- und 3'-Hydroxygruppen keine aufwendige Schutzgruppenstrategie nötig ist. Durch die Interaktion zwischen TMP **44** und der Nucleobase wird die 5'-Hydroxygruppe aktiviert, da TMP **44** durch das Lewis-basische Sauerstoffatom Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Proton der 5'-Hydroxygruppe ausgebildet, sodass die Nucleophilie dieser Gruppe im Gegensatz zu den anderen Hydroxygruppen erhöht wird (Abb. 32). Die 5'-Selektivität wird zudem durch das saure Milieu begünstigt, da die Protonierung der 2'- und 3'-Hydroxygruppen deren Reaktivität für den nucleophilen Angriff auf die aktivierte Phosphat-Zwischenstufe vermindert und somit lediglich die 5'-Hydroxygruppe nucleophil genug ist.<sup>[122]</sup>



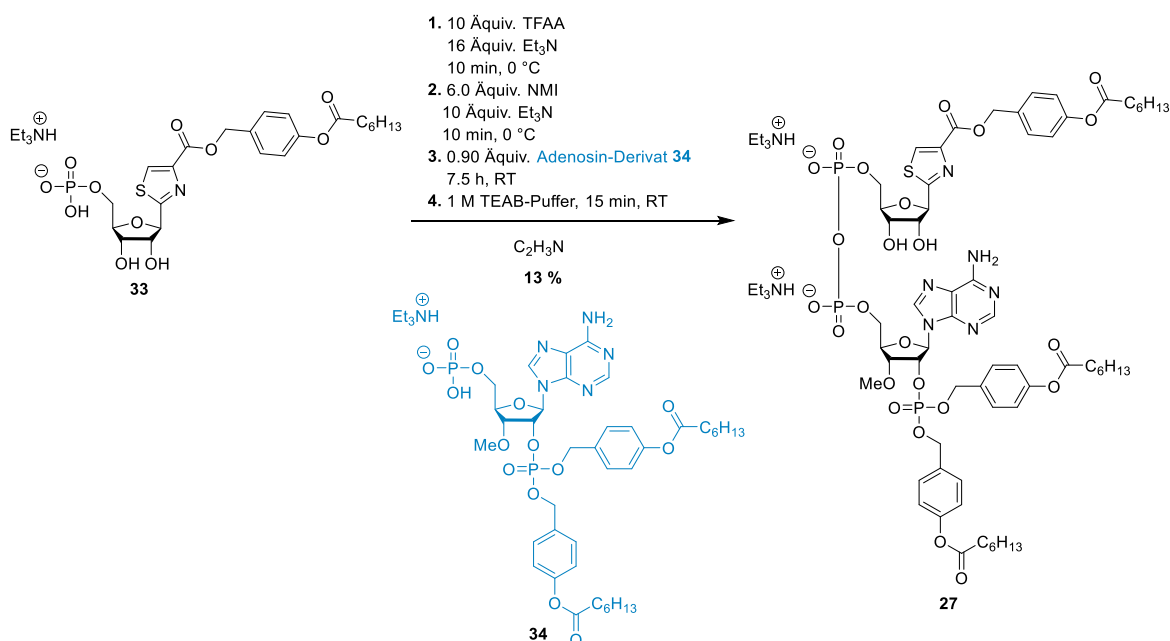
**Abb. 32:** Postulierter Mechanismus der 5'-Phosphorylierung nach YOSHIKAWA.<sup>[121][122]</sup>

Während der Reaktion ist es essentiell, dass die Reaktionstemperatur nicht über 5 °C steigt, da andernfalls eine intramolekulare Umlagerung unter Abspaltung von  $\text{PO}_2\text{Cl}$  zu einem 5'-chlorierten Nebenprodukt führt.<sup>[123]</sup>

Ein weiterer wichtiger Faktor für die nachfolgende Kupplungsreaktion des Monophosphats **33** ist die Anzahl der Triethylammonium-Gegenionen. Nach der Zugabe eines 1 M TEAB-Puffers konnte im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nach der automatisierten RP-C18-Säulenchromatographie nur eine sehr geringe Anzahl an Gegenionen beobachtet werden. Aufgrund der schlechten Löslichkeit des Monophosphats **33** in Wasser wurde angenommen, dass es vorwiegend protoniert und ungeladen vorlag. Durch erneutes 30-minütiges Rühren des Monophosphats **33** in einem 1 M TEAB-Puffer, gefolgt von einer anschließenden Lyophilisierung, konnte anschließend ein Äquivalent Gegenionen durch NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden. Der ionische Charakter der Bindung trägt dazu bei, die Nucleophilie des Sauerstoffs zu verbessern.

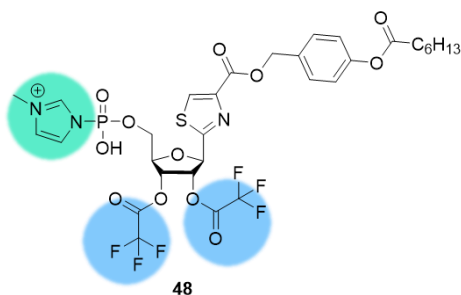
Zur Synthese des Thiazol-Derivats **27** wurden abschließend die beiden Monophosphate **33** und **34** nach einer Methode gekoppelt, die von MOHAMADY *et al.* zur Synthese von Nucleosidtriphosphaten entwickelt wurde (Abb. 33).<sup>[124]</sup>

Das Thiazol-Monophosphat **33** wird hierbei mittels 1-Methylimidazol (NMI) aktiviert, während das Adenosin-Monophosphat **34** als Nucleophil fungiert.



**Abb. 33:** Synthese des Diphosphats **27** durch die Kupplung der Monophosphate des Thiazol-Derivats **33** und des 3'-OMe-Adenosin-Derivats **34** (Synthetisiert von KRUKENBERG).

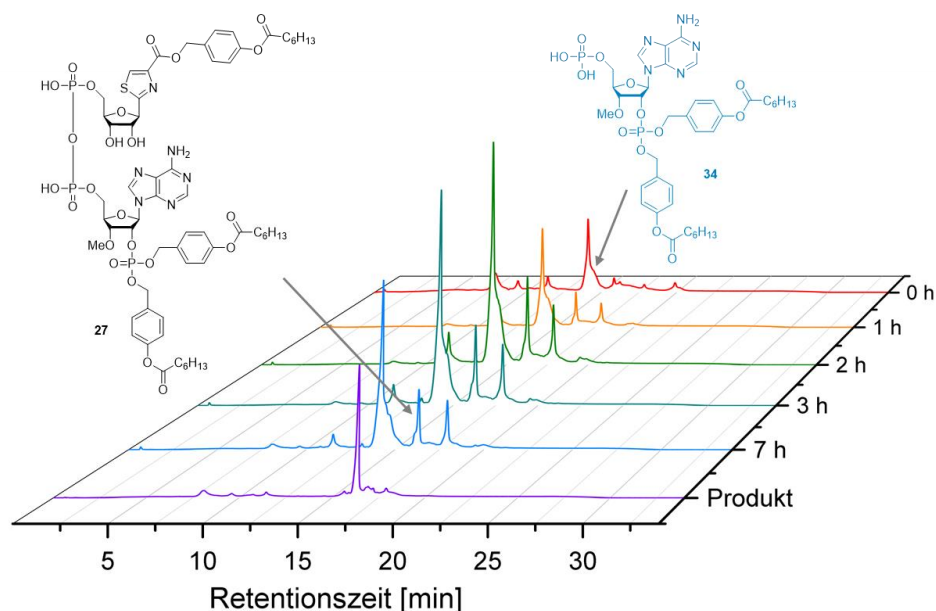
Durch die Zugabe von Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) und Triethylamin wird das *in situ* vollständig geschützte Monophosphat erhalten, welches eine gute Löslichkeit in Acetonitril besitzt. Die Zugabe von TFAA kann außerdem mögliche Rückstände von Wasser, die bei der weiteren Synthese störend wirken könnten, entfernen. Nach dem Entfernen aller flüchtigen Bestandteile wird 1-Methylimidazol zugegeben und dadurch das aktivierte Imidazolidat **48** gebildet (Abb. 34).



**Abb. 34:** Mit TFAA und NMI aktiviertes Monophosphat **48**.

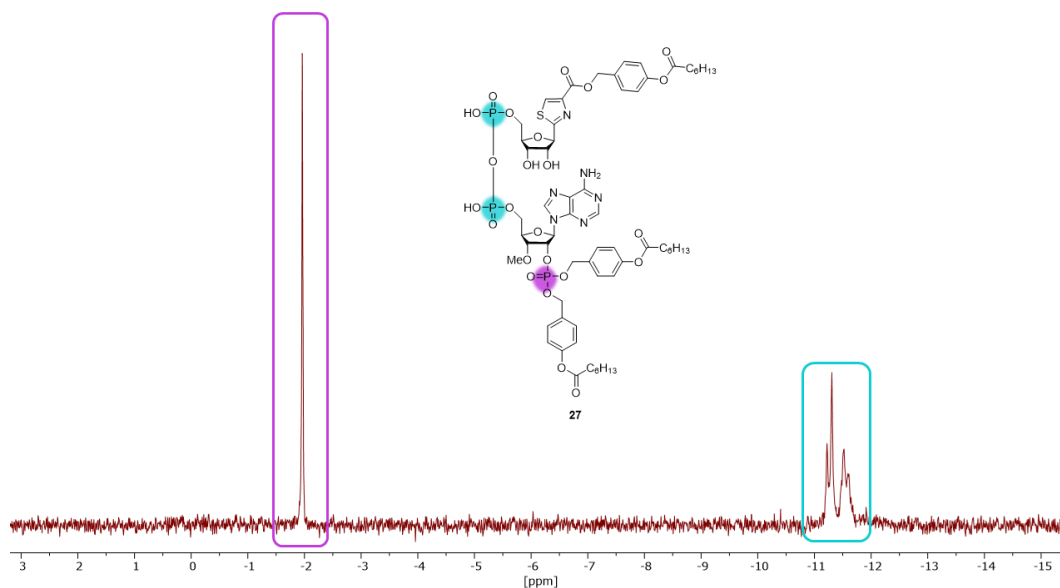
Das Imidazolidat stellt eine gute Abgangsgruppe für den anschließenden nucleophilen Angriff des zweiten Monophosphats **34** dar, sodass nach der Eliminierung des 1-Methylimidazols die gewünschte Diphosphatverbindung **27** erhalten wird.

Die Reaktion wurde mittels HPLC verfolgt, wobei zum Start der Reaktion neben dem NMI nur das Adenosin-Derivat detektiert werden konnte (Abb. 35). Nach einer Stunde konnten zwei weitere Peaks mit höherer Retentionszeit als das Adenosin-Derivat **34** beobachtet werden, dessen Intensität in den folgenden 6 Stunden weiter zunahm. Neben dem Produkt, könnte sich, bei unvollständiger Aktivierung, aus zwei Thiazol-monophosphaten das Pyrophosphat gebildet haben. Nach 7 Stunden wurde kein weiterer Umsatz beobachtet, sodass die Reaktion beendet wurde.



**Abb. 35:** HPLC Reaktionsverlaufskontrolle der Kupplungsreaktion der Monophosphate **33** und **34**.

Die Reinigung erfolgte mittels einer automatisierten RP-C18-Säulenchromatographie in 0.05 M TEAB-Puffer. Nach der ersten RP-Chromatographie wurde eine weitere RP-C18-Chromatographie, mit Wasser/Acetonitril als Eluenten durchgeführt, um das reine Diphosphat **27** in einer Ausbeute von 13 % zu erhalten. Das Pyrophosphat aus zwei Thiazol-Einheiten konnte nicht isoliert werden.



**Abb. 36:**  $^{31}\text{P}$ -NMR des Kupplungsprodukts **27**. Das Singulett der 2'-Phosphatgruppe bei -2 ppm (lila) und die Doublets des Pyrophosphats bei -11.5 ppm (grün) (243 MHz, 25 °C,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

Die Signale im  $^{31}\text{P}$ -Spektrum sind, wie erwartet, ein Singulett (lila) für die 2'-Phosphatgruppe bei -2 ppm und die Doublets (grün) für das Phosphatrückgrat im Bereich um -11 ppm. Diese Ergebnisse deuten auf eine erfolgreiche Kopplung der beiden Monophosphate hin.

## 6.2 Synthese des Thiazol-NADP-Derivats

Für die biologischen Untersuchungen der Calciumfreisetzung ist neben der aktiven Verbindung auch eine Referenzverbindung als Negativkontrolle wichtig. Dadurch können Faktoren, wie Spaltprodukte, identifiziert werden, die die Ergebnisse beeinflussen können. Zu diesem Zweck sollte ein NADP-Derivat **49** synthetisiert werden, welches nach intrazellulärer Spaltung der Maske das Amid keine Freisetzung von Calcium zur Folge hat (Kapitel 4.4.5) und bis auf die Carboxyfunktion am Thiazol die gleiche Struktur besitzt (Abb. 37).<sup>[86]</sup>

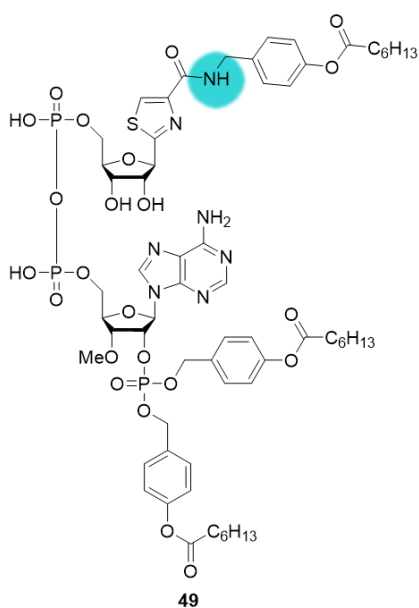


Abb. 37: Thiazol-Nicotinsäureamid-Derivat **49**.

### 6.2.1 Synthese der bioreversiblen Amino-Schutzgruppe

Um in folgenden Schritten die Maskierung über eine Amidbindung an die Zielverbindungen zu koppeln, wurde die Syntheseroute mit dem 4-Hydroxybenzylamin **50** begonnen und zunächst die benzyliche Aminogruppe mit einer *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)-Schutzgruppe geschützt.<sup>[9]</sup> Anschließend wurde mittels Heptanoylchlorid der Ester in einer Ausbeute von 56 % dargestellt. Die Spaltung der Boc-Schutzgruppe sollte mit Acetylchlorid in trockenem Ethanol erfolgen. Durch die Reaktion des Acetylchlorids mit Ethanol wird *in situ* HCl erzeugt, welches zur säurekatalysierten Spaltung der Schutzgruppe führt.<sup>[125]</sup>

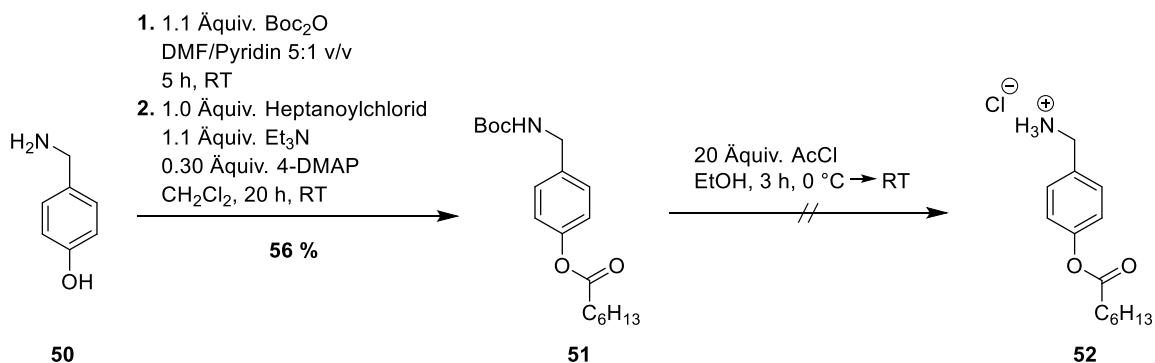
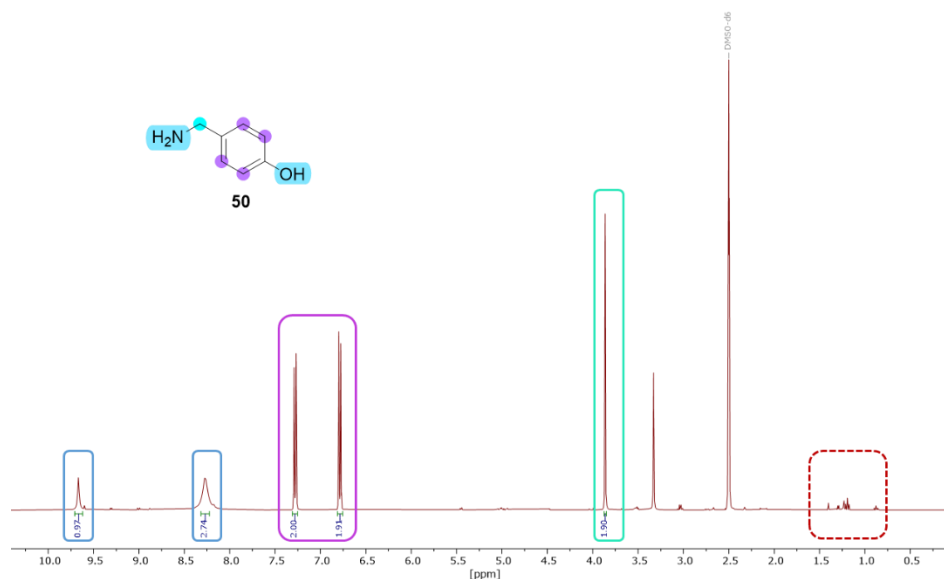


Abb. 38: Synthese der bioreversiblen Amino-Schutzgruppe **52**.

Jedoch wurde beobachtet, dass neben der Entschützung der Aminogruppe ebenfalls der Ester gespalten wurde und somit kein Produkt isoliert werden konnte (Abb. 39).

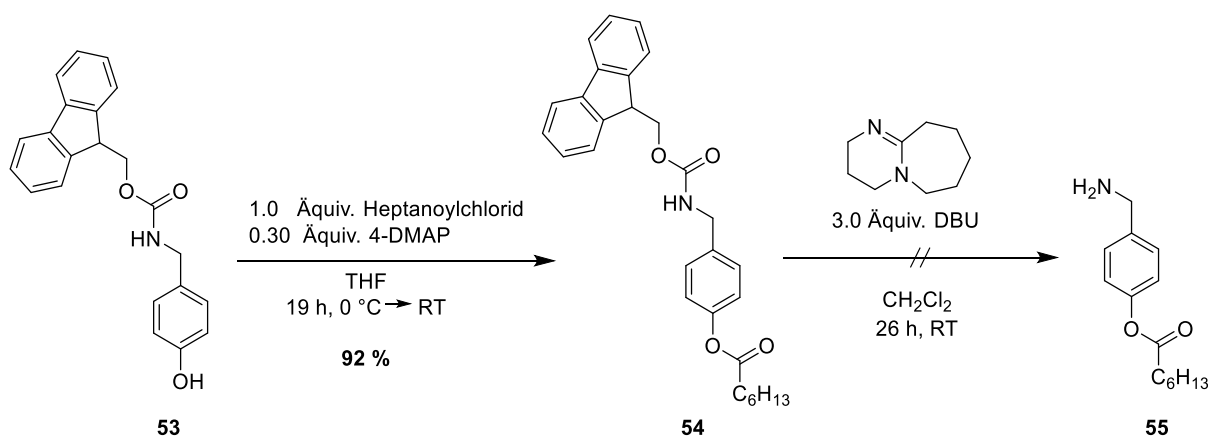


**Abb. 39:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Spaltung der Boc-Schutzgruppe mit Acetylchlorid in Ethanol bei simultaner Abspaltung des Esters. Das entstandene Produkt ist 4-Hydroxybenzylamin **50** (400 MHz, 25 °C,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

Im Spektrum sind die Protonen des Aromaten (lila) sowie die der Benzylgruppe gut erkennbar (grün). Die beiden Protonen der Aminofunktion sowie das Proton der Hydroxygruppe sind im Bereich zwischen 8.0 und 10.0 ppm zu beobachten (blau). Im Bereich zwischen 1.0 und 1.5 ppm sind die Protonen der Alkylkette zu erwarten, die außer einem Rest von ca. 1 % nicht mehr vorhanden sind (Abb. 39).

Eine Hydrolyse der Esterfunktion der Alkylkette ist unter den wasserfreien Bedingungen eher unwahrscheinlich. Allerdings wird vermutet, dass unter saurer Katalyse Ethanol als Nucleophil den Carbonylkohlenstoff angegriffen hat, wodurch vermutlich eine Umesterung stattgefunden hat.<sup>[126]</sup>

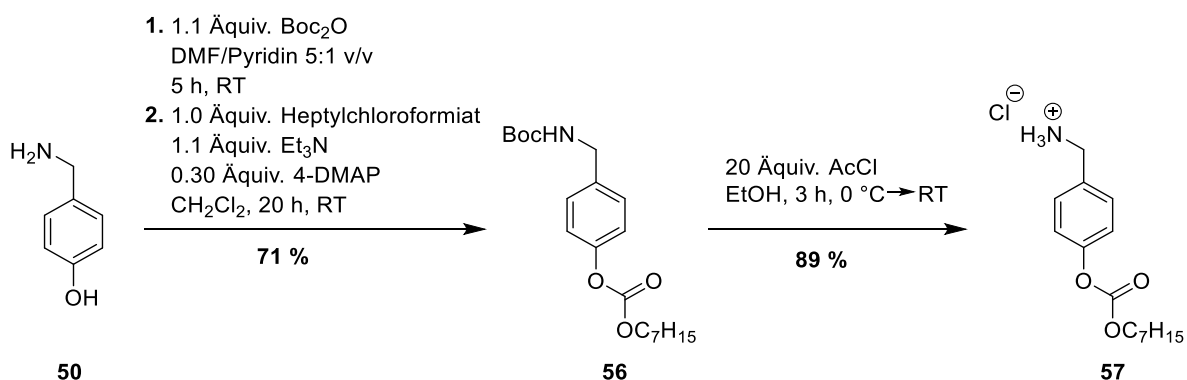
Daraufhin wurde eine andere Schutzgruppe verwendet, die unter milderen Bedingungen gespalten werden kann. Dafür wurde die Fluorenyl-methoxycarbonyl (Fmoc)-Schutzgruppe gewählt. Das Fmoc-geschützte 4-Hydroxybenzylamin **53** reagierte zunächst mit dem Heptanoylchlorid und die Verbindung **54** konnte in einer Ausbeute von 92 % erhalten werden (Abb. 40). Zur Spaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) gewählt. DBU ist eine nicht-nucleophile, starke Base, die zudem sterisch anspruchsvoll ist, sodass erwartet wurde, dass der Ester vor der Spaltung geschützt ist.<sup>[127]</sup>



**Abb. 40:** Veresterung der phenolischen Hydroxygruppe mit Heptanoylchlorid und der anschließende Versuch der Spaltung der Fmoc-Schutzgruppe mittels DBU.

Leider konnte auch mit dieser Methode das Produkt nicht erhalten werden. Aus dem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum ist ersichtlich, dass neben der Fmoc-Schutzgruppe auch der Ester erneut gespalten wurde.

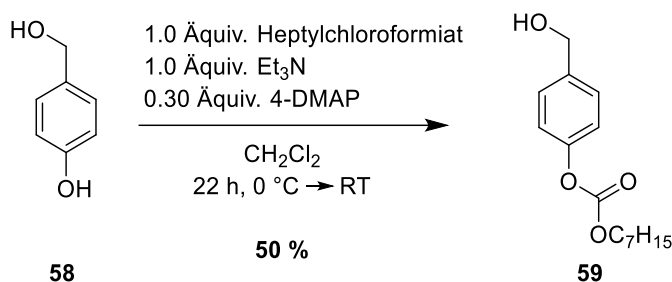
Da durch die Spaltung des Esters die Synthese der Amino-AB-Maske nicht möglich war, wurde diese modifiziert und es wurde im Folgenden auf eine Carbonateinheit zurückgegriffen. Im Rahmen der Untersuchungen zur Alkoxy-carbonyloxybenzyl-Maske (ACB) konnte bei einer höheren chemischen Stabilität eine gleichbleibend effiziente und schnelle enzymatische Spaltbarkeit festgestellt werden.<sup>[8]</sup> Carbonate haben im Gegensatz zu Estern eine stärker ausgeprägte Resonanz, die sich aufgrund der zwei Sauerstoffatome in der Delokalisierung ihrer Elektronen auswirkt, was zur Stabilität gegenüber Nucleophilen beiträgt.<sup>[125]</sup> Nach der Einführung der Boc-Schutzgruppe an der Aminogruppe wurde das Carbonat durch einen nucleophilen Angriff der phenolischen Hydroxygruppe an das Chlorformiat dargestellt (Abb. 41).



**Abb. 41:** Synthese der bioreversiblen Amino-Carbonat-Schutzgruppe **57**.

Die Aminocarbonat-Schutzgruppe **57** konnte dabei in einer guten Ausbeute von 89 % erhalten werden. Nebenprodukte, die auf den Verlust der Alkylkette hindeuten könnten, wurden während der Reaktion und auch nach der Aufarbeitung nicht beobachtet.

Da die Referenz-Verbindung eine ACB-Maske trägt, musste diese Veränderung für die Vergleichbarkeit ebenfalls bei der NAADP-Verbindung eingeführt werden. Die Synthese der ACB-Maskierung ist in Abbildung 42 gezeigt.

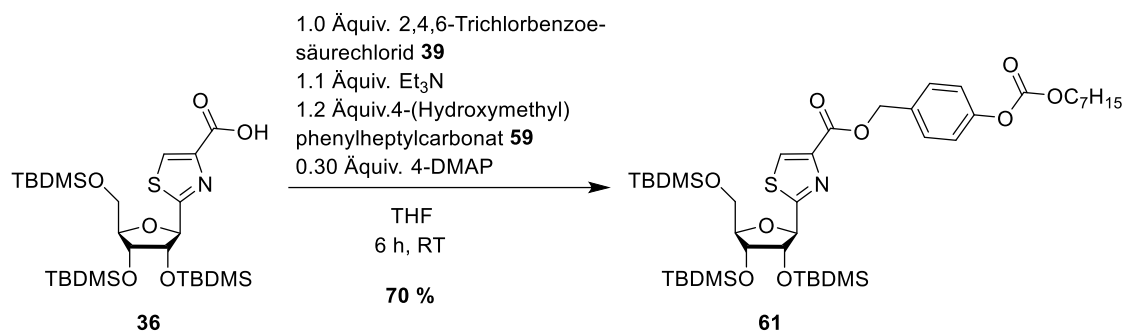


**Abb. 42:** Synthese der ACB-C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>-Maskierung **59**.

Aufgrund der unterschiedlichen Aciditäten der phenolischen (pKs 10) und der aliphatischen Hydroxygruppe (pKs 18) wird von einer Schutzgruppe abgesehen. Das bei einer Deprotonierung entstehende Phenolat-Ion ist durch den Aromaten mesomeriestabilisiert, und die Elektronen sind delokalisiert.<sup>[126][128]</sup> Die ACB-Maske **59** konnte mit einer Ausbeute von 50 % erhalten werden. Die Vollständigkeit der Alkylkette konnte mit einem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum bestätigt werden.

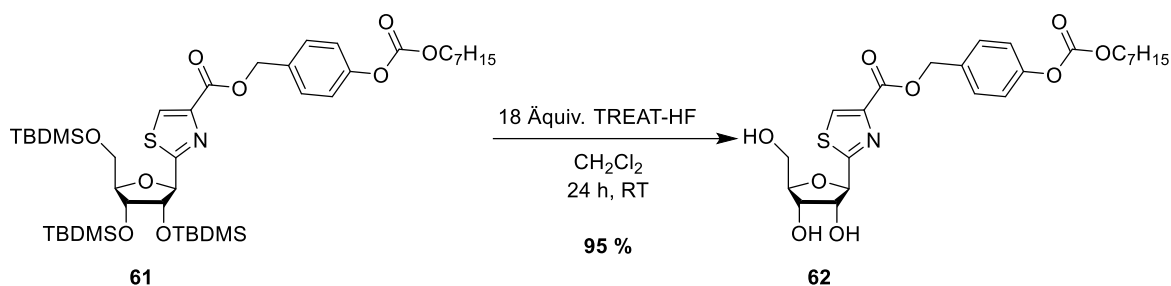
### 6.3 Synthese der Thiazol-Derivate mit ACB-Maskierung

Zunächst wurde das NAADP-Derivat **60** synthetisiert, wobei die ACB-Maskierung durch die bereits zuvor genutzte YAMAGUCHI-Veresterung an das Nucleosid **36** gekuppelt wurde. Die Aktivierung der Carbonsäure mittels 2,4,6-Trichlorbenzoesäurechlorid **39** und 4-DMAP **41** ermöglicht einen nucleophilen Angriff des Alkohols, wodurch das gewünschte Produkt **61** mit einer Ausbeute von 70 % erhalten werden konnte (Abb. 43).



**Abb. 43:** YAMAGUCHI-Veresterung der Carbonsäure des Nucleosids **36**.<sup>[118]</sup>

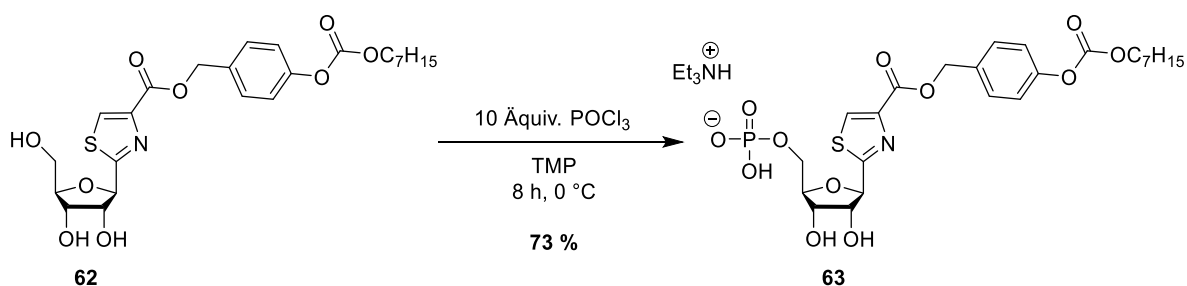
Für die Spaltung der TBDMS-Gruppen wurde der Fluoridionendonator TREAT-HF verwendet, sodass die TBDMS-Schutzgruppen orthogonal zu der ACB-Maske gespalten werden (Abb. 44).



**Abb. 44:** Spaltung der Silylschutzgruppen mit TREAT-HF.

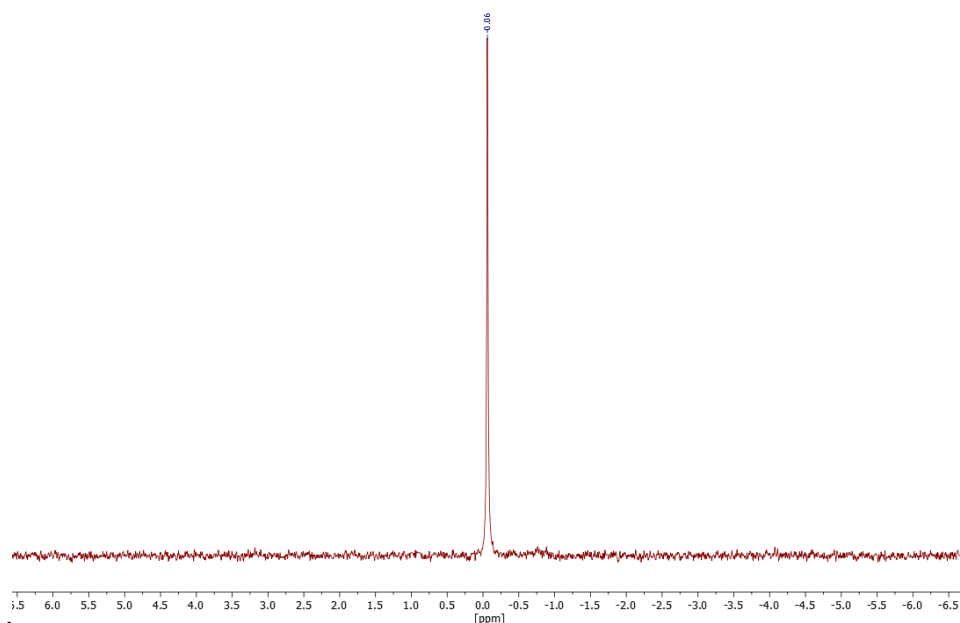
Durch die Verwendung von 18 Äquivalenten TREAT-HF konnte eine sehr gute Ausbeute von 95 % erzielt werden. Die Verwendung von weniger TREAT-HF hatte eine starke Verlängerung der Reaktionszeit und eine Verminderung der Ausbeute zur Folge, da neben dem Produkt auch das Nebenprodukt mit einer verbliebenden TBDMS-Schutzgruppe erhalten wurde.

Für die anschließende Kupplung sollte das Nucleosid durch die bereits in Kapitel 6.1 etablierte YOSHIKAWA-Phosphorylierung selektiv in das 5'-Monophosphat **63** überführt werden (Abb. 45).<sup>[115]</sup>



**Abb. 45:** Selektive YOSHIKAWA-Phosphorylierung der 5'-Hydroxygruppe.<sup>[115]</sup>

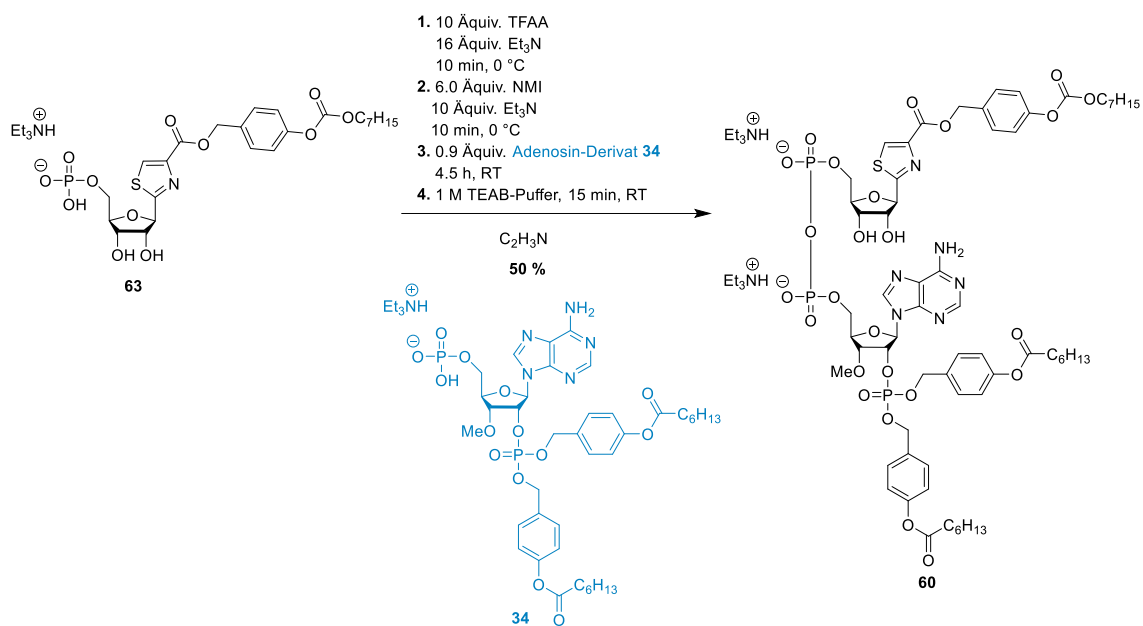
Für diese Reaktion wurde die Menge an Phosphorylchlorid auf 10 Äquivalente erhöht, da nach einer Reaktionsdauer von 5 Stunden lediglich ein geringer Umsatz mittels HPLC-Analyse festgestellt werden konnte. Die Reaktion konnte erst nach 8 Stunden durch die Zugabe eines 1 M TEAB-Puffers beendet werden. Nach der Reinigung mittels RP-18-Säulenchromatographie wurde das Produkt mit einer Ausbeute von 73 % isoliert.



**Abb. 46:**  $^{31}\text{P}$ -NMR des 5'-Monophosphats **63** nach RP-C18-säulenchromatographischer Reinigung (243 MHz, 25 °C,  $\text{DMSO}-d_6$ )

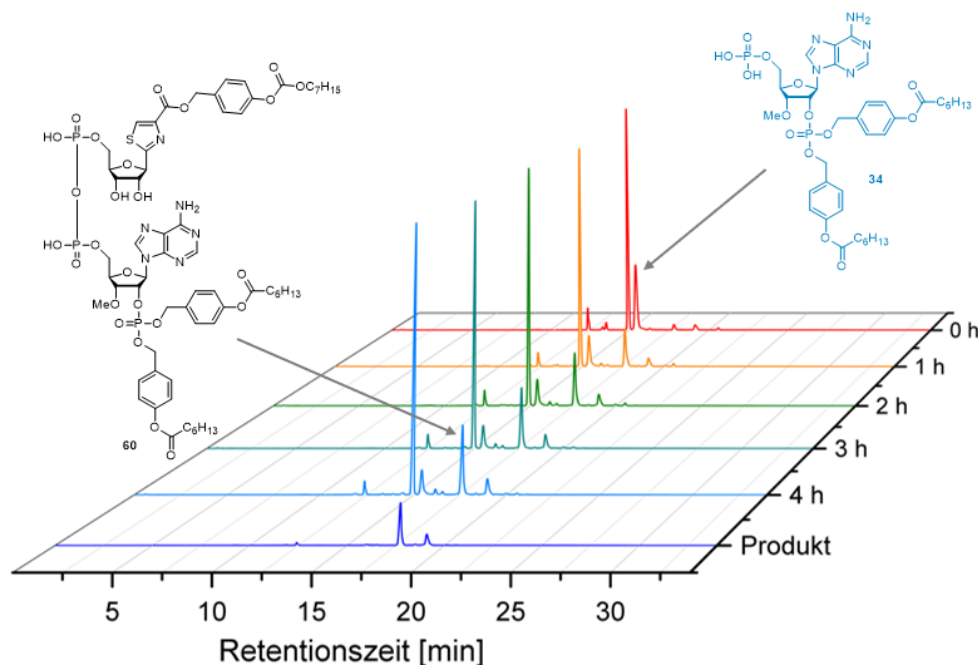
Die analytischen Daten aus dem  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum zeigen ein Singulett bei -0.06 ppm, welches aufgrund der Verschiebung eindeutig dem Monophosphat zugeordnet werden kann (Abb. 46). Weitere Nebenprodukte wie diphosphorylierte Produkte sind nicht zu erkennen.

Das synthetisierte Monophosphat **63** wurde im nächsten Schritt an das Adenosin-Derivat **34** gekuppelt. Dafür wurde erneut auf die Methode von MOHAMADY *et al.* zurückgegriffen.<sup>[124]</sup>



**Abb. 47:** Kupplung der Monophosphate **63** und **34** nach MOHAMADY *et al.*<sup>[124]</sup>

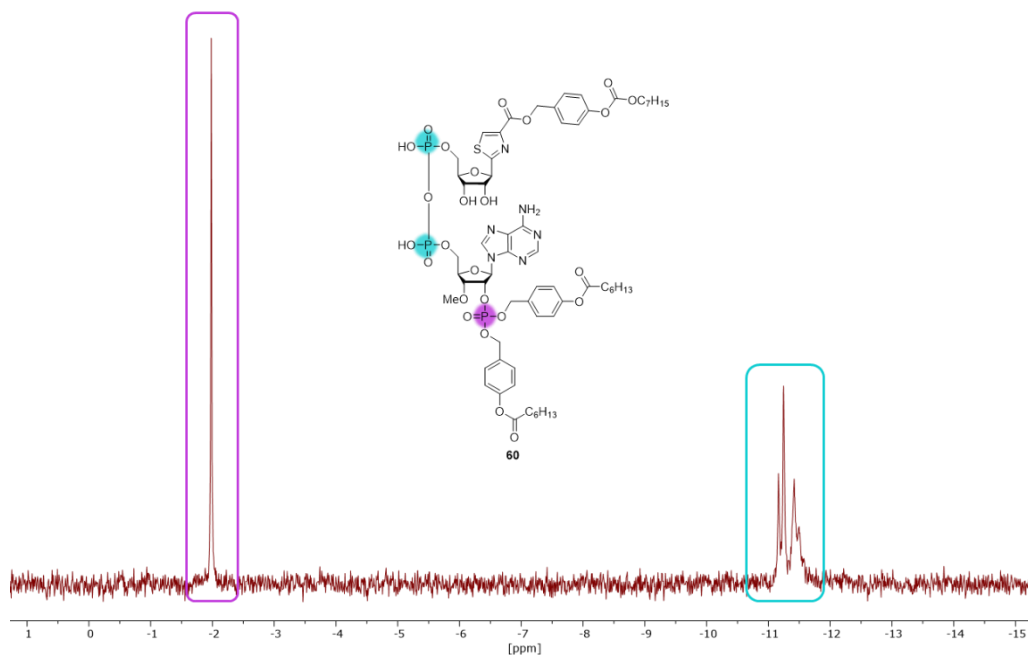
Die Reaktion wurde HPLC verfolgt, wobei zunächst nur das NMI und das Adenosin-Derivat **34** zu beobachten sind (Abb. 48). Ein weiterer Peak bildet sich nach 1 Stunde bei 17.6 Minuten. Nach 4.5 Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 M TEAB-Puffer beendet, da kein weiterer Umsatz des Adenosin-Derivats **34** zu beobachten war.



**Abb. 48:** HPLC-Reaktionsverlaufskontrolle der Kupplung der Monophosphate **34** und **63**.

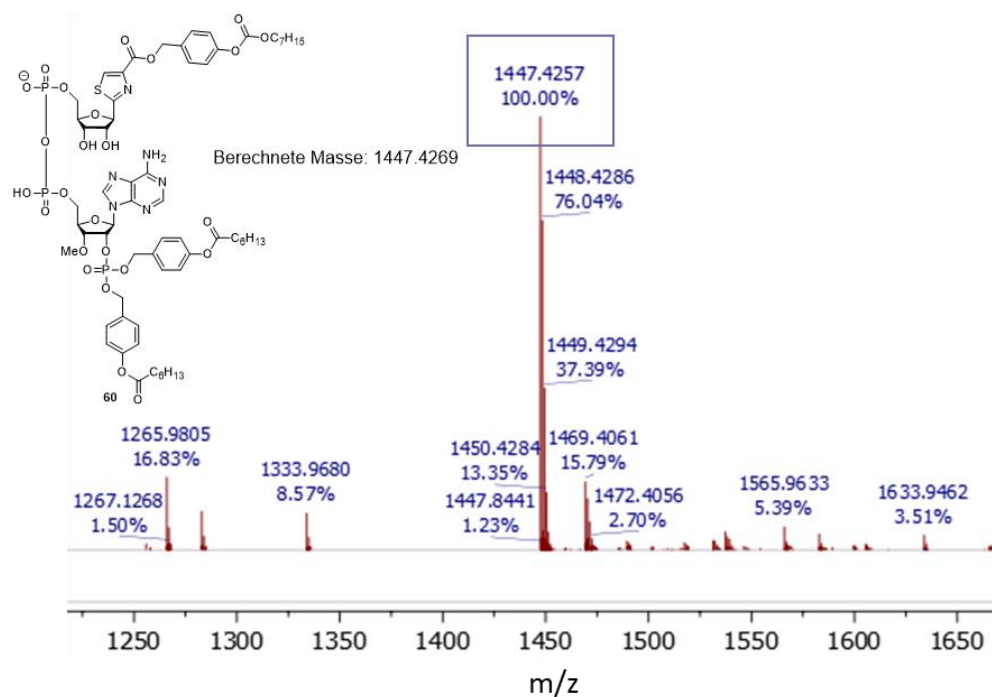
Die Reinigung erfolgte mittels einer automatisierten RP-C18-Säulenchromatographie. Dabei wurden zunächst 1 M TEAB-Puffer/Wasser als Eluenten verwendet, gefolgt von einem

weiteren Reinigungsschritt mit Acetonitril/Wasser. Das  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum zeigt ein Singulett bei -2 ppm und zwei Dubletts bei -11 ppm, was auf eine erfolgreiche Bildung des Pyrophosphats hindeutet (Abb. 49).



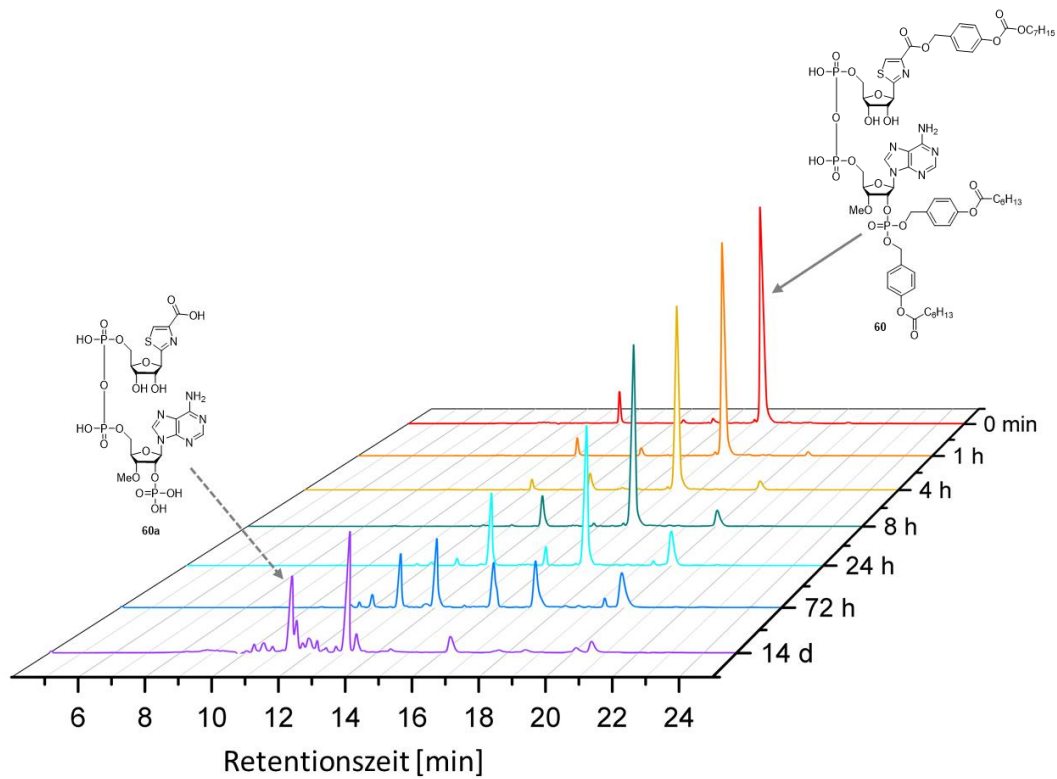
**Abb. 49:**  $^{31}\text{P}$ -NMR des Kupplungsprodukts **60** mit einem Signal des 2'-Phosphats (lila) und zwei Dubletts (grün) des Diphosphatrückgrats (243 MHz, 25 °C,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

Im Massenspektrum wurde außerdem die zu erwartende Molekülionenmasse mit 1447.4257 Da detektiert. Dies entspricht der theoretischen Masse des einfach deprotonierten Pyrophosphats (Abb. 50).



**Abb. 50:** MS-ESI-Spektrum des gekuppelten Diphosphats **60**. Messung im negativen Modus.

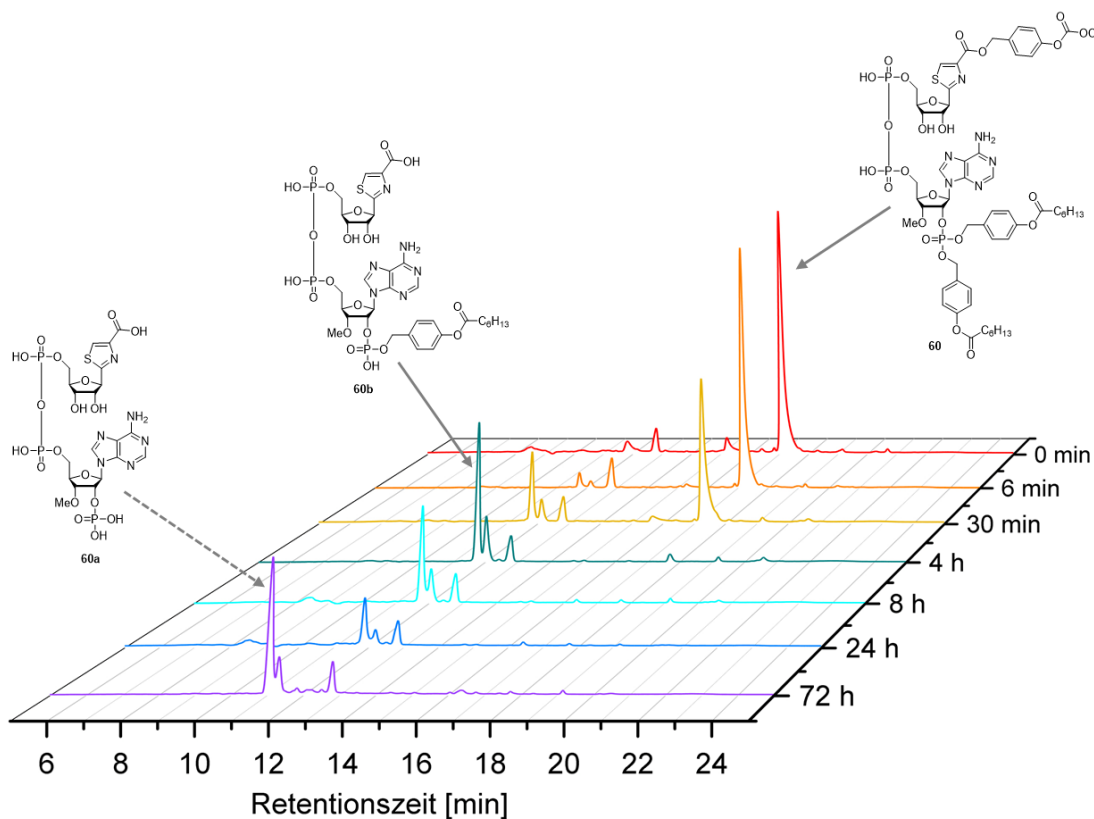
Abschließend wurde in Hydrolysestudien die chemische sowie die enzymatische Stabilität untersucht. Dafür wurden die Bedingungen aus Kapitel 7.5.1 und 7.5.2 verwendet. Für die Untersuchung der chemischen Stabilität wurde die Zielverbindung **60** in PBS-Puffer bei 37 °C für 14 Tage inkubiert (Abb. 51).



**Abb. 51:** Ausschnitt des chemischen Hydrolyseverlaufs der Zielverbindung **60** in PBS-Puffer.

Die bioreversibel maskierte Verbindung **60** hat eine Retentionszeit von 17 min. Nach 24 Stunden kann eine signifikante Abnahme der vollgeschützten Verbindung **60** beobachtet werden und es wurde eine Halbwertszeit von  $t_{1/2} = 22$  Stunden bestimmt. Dabei werden zwei weitere Peaks bei 11.3 min und 13.0 min gebildet. Es wird vermutet, dass der Peak bei 11.3 min aufgrund des Absorptionsspektrums die vollständig demaskierte Verbindung **60a** ist. Dies konnte LC-MS-technisch jedoch nicht nachgewiesen werden.

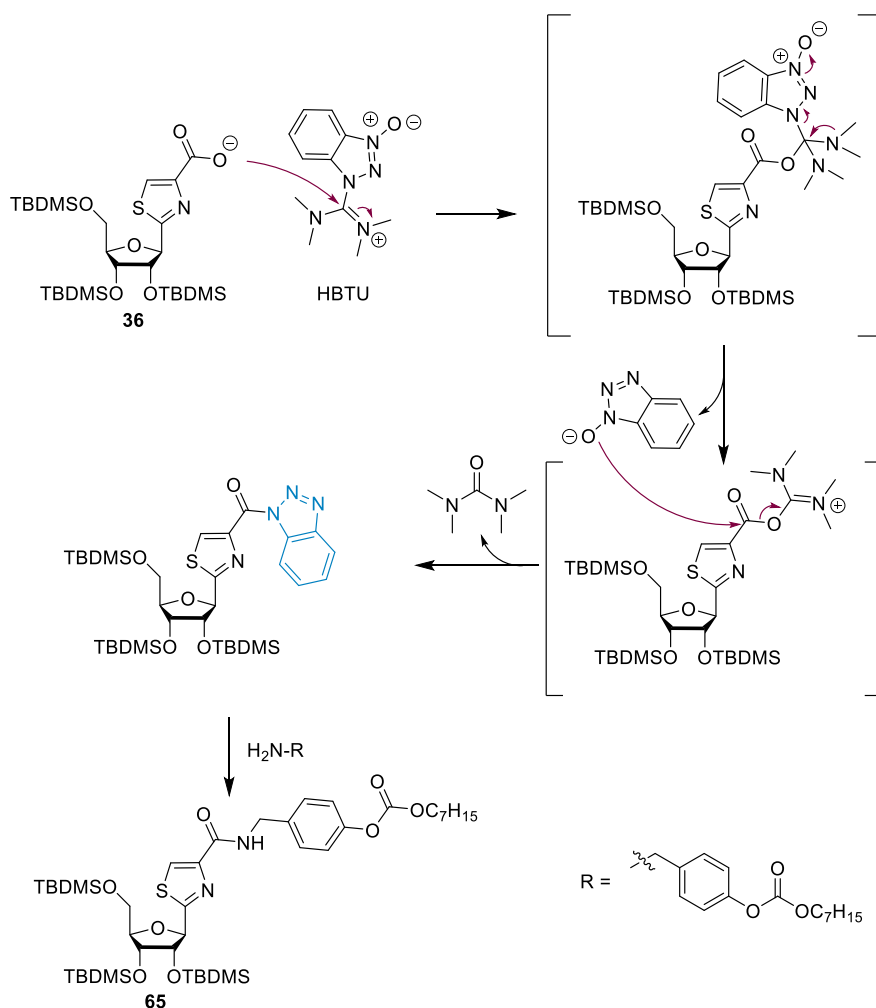
Die enzymatische Stabilität wird durch die Inkubation der Zielverbindung in PLE-Lösung (*Pig Liver Esterases*) untersucht (Abb. 52). Enzymatische Hydrolysestudien laufen typischerweise unter milden Bedingungen ab (z. B. in Wasser bei Raumtemperatur und neutralem pH-Wert), was sie für empfindliche Substrate geeignet macht.



**Abb. 52:** Ausschnitt des enzymatischen Hydrolyseverlaufs der bioreversibel geschützten Verbindung **60** in PLE.

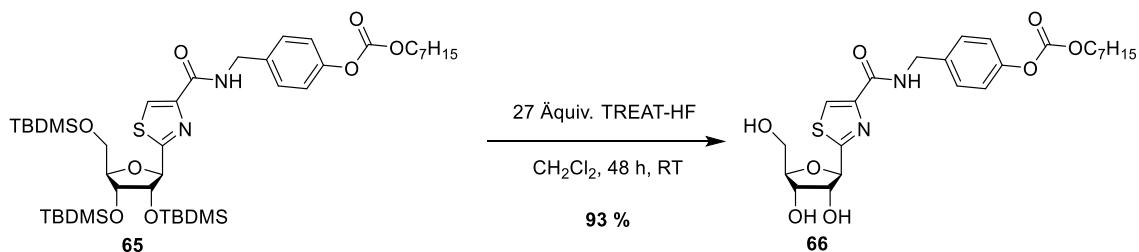
Nach 30 min Inkubationszeit kann eine deutliche Abnahme des Diphosphats **60** beobachtet werden, wobei sich ein Peak bei 11.9 min bildet. Dieser konnte mittels LC-MS als die einfach maskierte Verbindung **60b** identifiziert werden. Aufgrund der unterschiedlichen Massen der AB bzw. ACB-Maske kann geschlossen werden, dass die verbliebene Maskierung eine AB-Maske ist (Abb. 52, **60b**). Nach 72 Stunden wurde das Abfallen des Peaks von Verbindung **60b** und die Zunahme eines Peaks bei 11.0 min beobachtet. Aufgrund der Verschiebung der Retentionszeit und der Veränderungen im Absorptionsspektrum wird vermutet, dass es sich hierbei um die vollständig demaskierte Verbindung **60a** handelt, was jedoch durch LC-MS nicht nachgewiesen werden konnte. Die Halbwertszeit der Hydrolyse der Verbindung **60** wurde auf  $t_{1/2} = 62$  Minuten bestimmt.





**Abb. 54:** Vorgeschlagener Mechanismus der Bildung des Hydroxybenzotriazol-Esters mittels HBTU mit anschließender Amidierung.<sup>[131]</sup>

Im Anschluss erfolgte die Spaltung der Silylschutzgruppen mit TREAT-HF (Abb. 55). Hierbei greifen die Fluorid-Ionen nucleophil das vierbindige Siliciumatom an, was zur Abspaltung des Alkohols führt.<sup>[132]</sup>

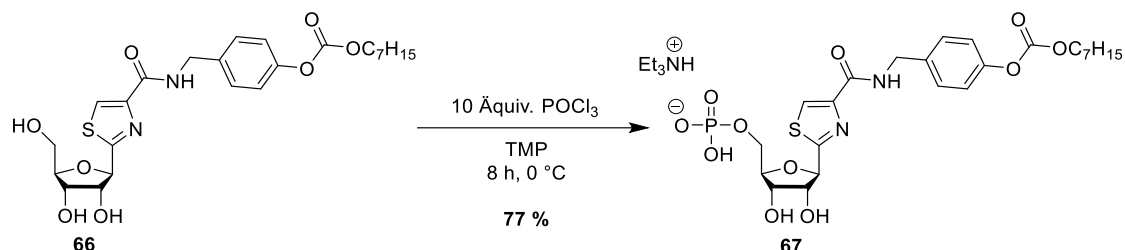


**Abb. 55:** Spaltung der Silylschutzgruppen orthogonal zur Amid-Schutzgruppe mit TREAT-HF.

Zunächst wurden wie in vorheriger Desilylierung 18 Äquivalente von TREAT-HF eingesetzt. Nach 8 Stunden konnte jedoch kein vollständiger Umsatz des Edukts 65 beobachtet werden. In der Folge wurden weitere 9.0 Äquivalente zugefügt und die Reaktion weitere

40 Stunden gerührt. Dünnschichtchromatographisch konnte nach dieser Zeit der vollständige Umsatz des Edukts **65** sowie die Abwesenheit von Nebenprodukten festgestellt werden.

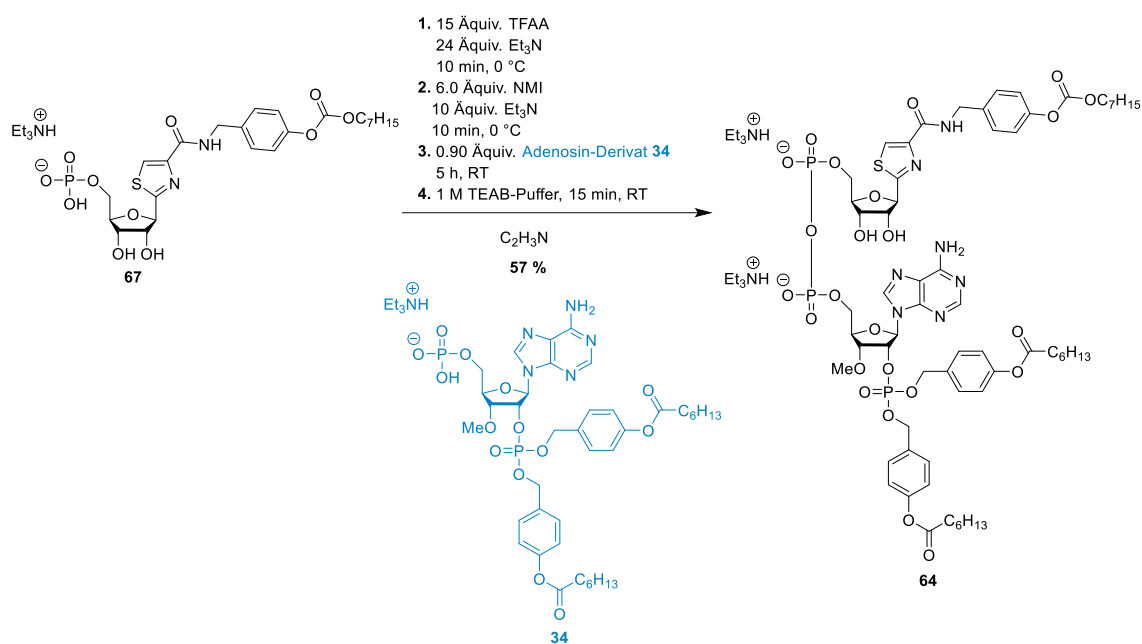
Im nächsten Schritt erfolgte die 5'-selektive Phosphorylierung nach YOSHIKAWA (Abb. 56). Das Nucleosid **66** wurde in TMP gelöst und auf 0 °C gekühlt.<sup>[115]</sup>



**Abb. 56:** YOSHIKAWA-Phosphorylierung der Verbindung **66**.

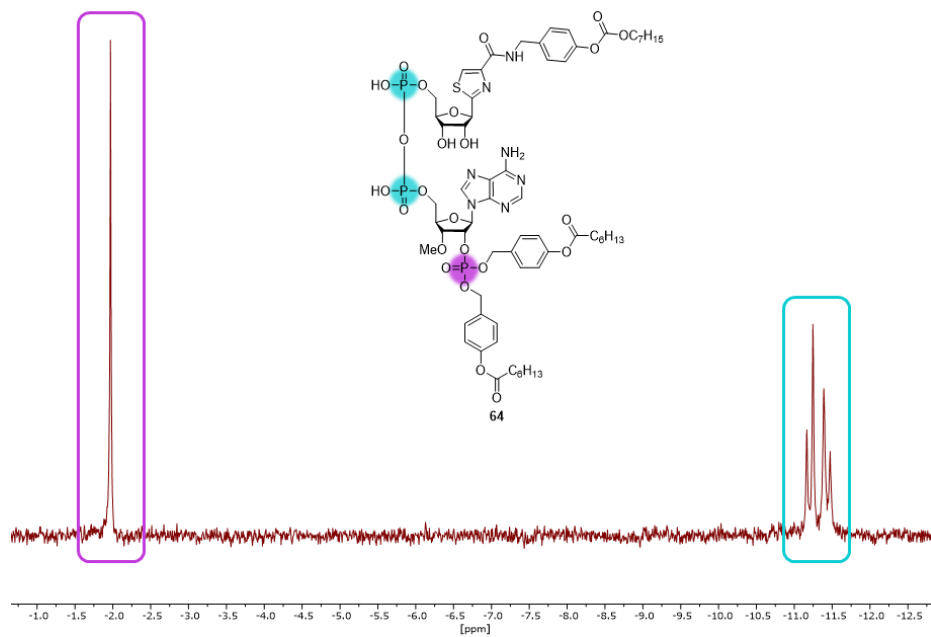
Nach 8 Stunden konnte mittels HPLC kein weiterer Umsatz festgestellt werden, woraufhin die Reaktion durch Zugabe eines 1 M TEAB-Puffers beendet wurde. Das TMP wurde durch das Waschen der wässrigen Phase mit Dichlormethan entfernt. Im Anschluss erfolgte die Reinigung des Rohprodukts mittels automatisierter RP-C18-Säulenchromatographie, wodurch das reine Monophosphat **67** mit einer Ausbeute von 77 % isoliert werden konnte.

Die Kupplung zum Diphosphat **64** wurde anschließend gemäß den Methoden von MOHAMADY *et al.* durchgeführt (Abb. 57). In Anbetracht der geringen Ausbeute der Thiazol-NAADP-Verbindung **60** (13 %) wurde eine Erhöhung der Äquivalente von Triethylamin und Trifluoressigsäureanhydrid vorgenommen, da die HPLC-Chromatogramme kein aktiviertes Monophosphat zeigten und damit eine unvollständige Aktivierung ausgeschlossen werden sollte. Darüber hinaus ermöglicht die Erhöhung der Äquivalente die Eliminierung von eventuell vorhandenem Restwasser in der Reaktion, welches die Kupplung stören könnte.<sup>[124]</sup>



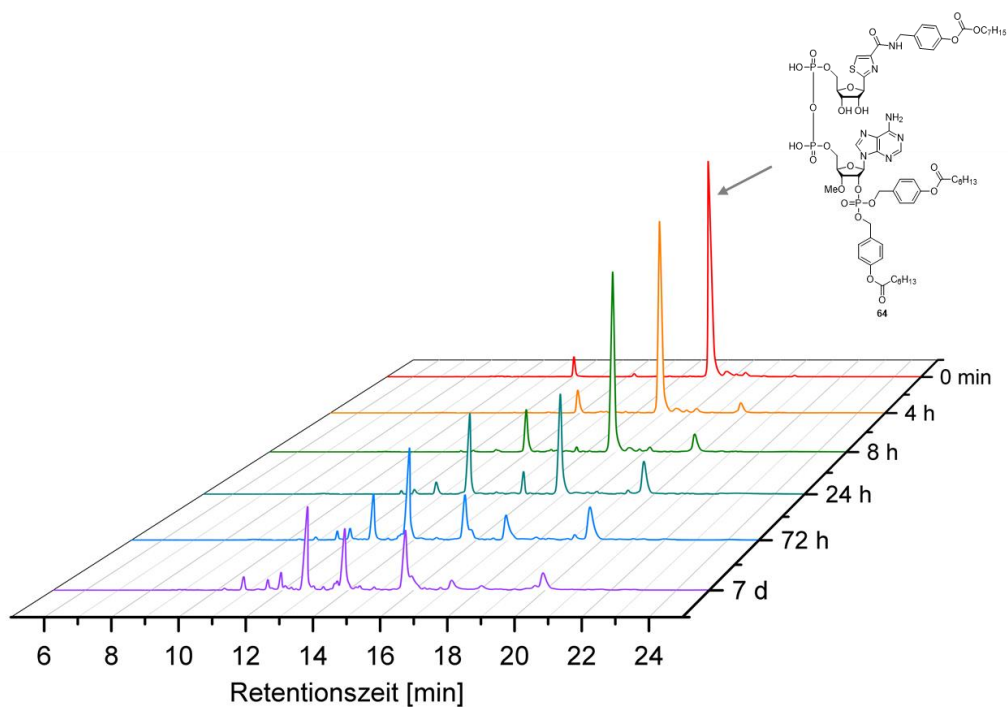
**Abb. 57:** Kupplung der Monophosphate **67** und **34** nach MOHAMADY *et al.* zum bioreversibel geschützten Diphosphat **64**.

Nach einer Reaktionszeit von fünf Stunden konnte das Diphosphat **64** mit einer Ausbeute von 57 % isoliert werden. In dem <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum sind die für Diphosphate charakteristischen Dubletts bei -11.5 ppm erkennbar (Abb. 58). Des Weiteren konnte neben dem Singulett bei -2 ppm (2'-Phosphat) kein weiteres Signal beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass neben dem Produkt **64** keine weiteren Monophosphate der Edukte **67** und **34** vorhanden sind.



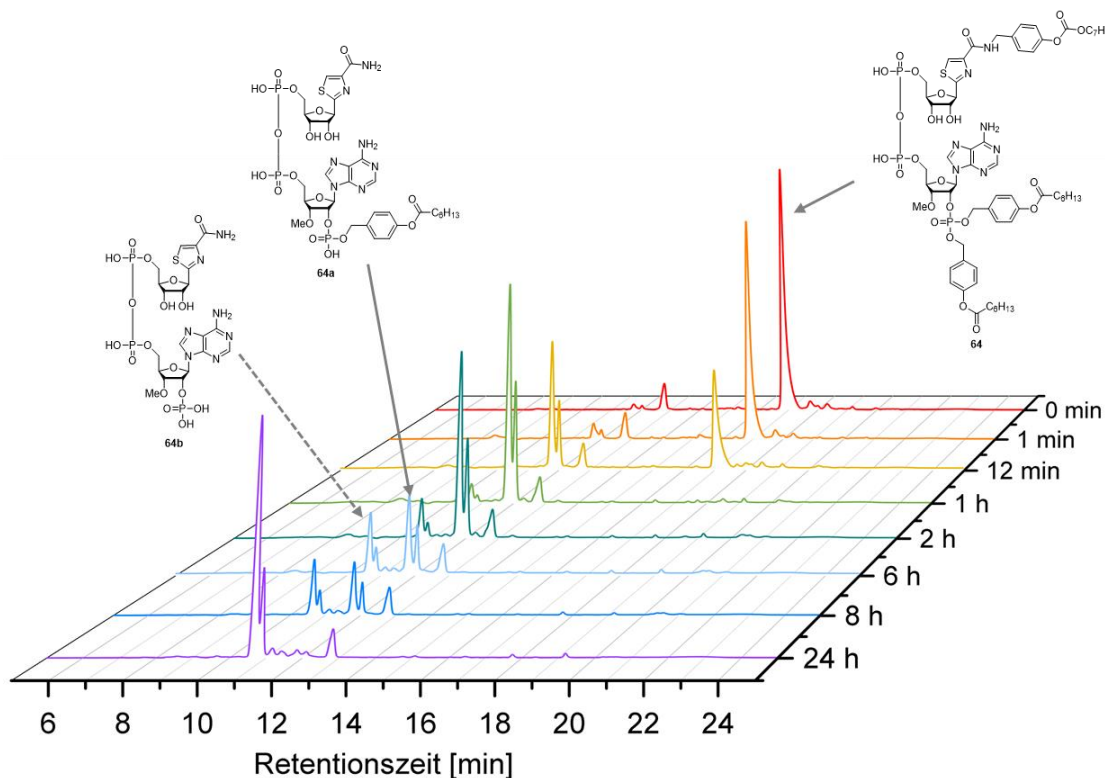
**Abb. 58:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum der Pyrophosphatverbindung **64** mit den Signalen der 2'-Phosphatgruppe (lila) sowie zwei Dubletts für das Diphosphatrückgrat (grün) (243 MHz, 25 °C,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

Die abschließende Untersuchung der chemischen und enzymatischen Stabilität wurde gemäß den Bedingungen in Kapitel 7.5.1 und 7.5.2 durchgeführt. Die chemische Stabilität wurde durch Inkubation in PBS-Puffer untersucht (Abb. 59).



**Abb. 59:** Ausschnitt des chemischen Hydrolyseverlaufs der ACB-maskierten Verbindung **64** in PBS-Puffer.

Für die Zielverbindung **64** konnte eine Retentionszeit von 16 Minuten beobachtet werden. Nach 24 Stunden konnte eine deutliche Abnahme der vollgeschützten Verbindung **64** verzeichnet werden wobei eine Halbwertszeit von  $t_{1/2} = 29$  Stunden bestimmt wurde. Innerhalb der ersten 72 Stunden konnten zudem drei zusätzliche Signale bei Retentionszeiten von 15, 13 und 12 Minuten beobachtet werden. Der enzymatische Hydrolyseverlauf in PLE ist in Abbildung 60 gezeigt.

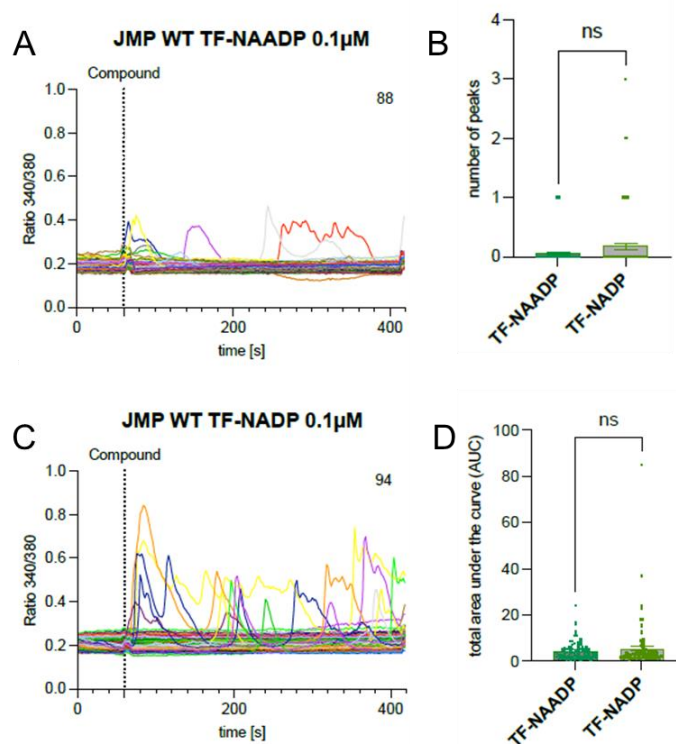


**Abb. 60:** Ausschnitt des enzymatischen Hydrolyseverlaufs der ACB-maskierten Verbindung **64** in PLE.

Nach einer Inkubationszeit von 12 Minuten zeigt die Verbindung **64**, die eine Retentionszeit von 16 Minuten aufweist, eine signifikante Reduktion. Bereits nach einer Minute lässt sich eine Erhöhung der Intensität eines Peaks bei einer Retentionszeit von 11,8 min feststellen. Dieser konnte mittels LC-MS als die einfach maskierte Verbindung **64a** identifiziert werden. Nach 60 Minuten bildet sich ein Peak bei 11,0 min, wobei ein Peakabfall bei 11,8 min beobachtet werden konnte. Es wird vermutet, dass es sich hierbei um die vollständig demaskierte Verbindung **64b** handelt, die jedoch mittels LC-MS nicht nachgewiesen werden konnte. Für die Halbwertszeit des Zerfalls der Verbindung wurden  $t_{1/2} = 15,3$  Minuten bestimmt. Aufgrund der Halbwertszeiten ist die Verbindung **64** für biologische Untersuchungen geeignet. Die hohe Halbwertszeit von  $t_{1/2} = 29$  Stunden für die chemische Stabilität garantiert eine gute Handhabbarkeit für biologische Studien.

### 6.3.2 Untersuchungen zu den calciumfreisetzenden Eigenschaften des NAADP-Derivats **60** und des NADP-Derivats **64**

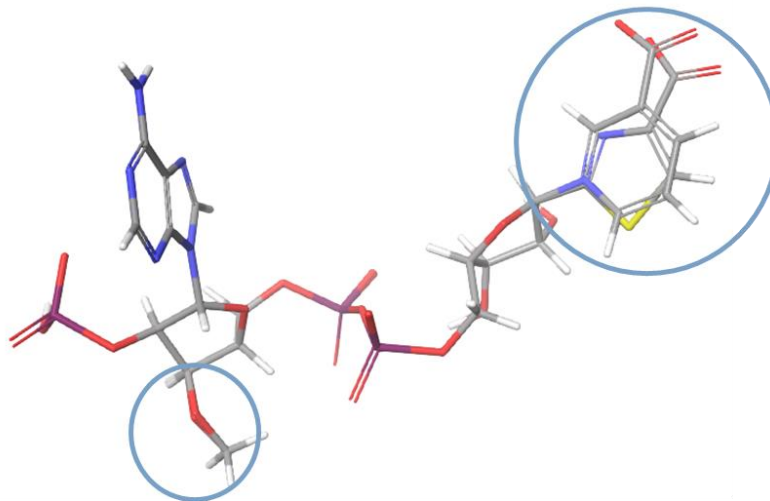
Die biologischen Untersuchungen wurden im Arbeitskreis um GUSE durchgeführt (Abb. 61). Die Zugabe der Thiazol-NAADP Verbindung **60** sollte eine Calciumfreisetzung der Zellen auslösen. Die Zellen wurden mit Fura-2-AM beladen, einem fluoreszierenden Calcium-Indikator, der durch AM-Ester membranpermeabel wird und so in die Zelle eindringen kann. Intrazellulär wird Fura-2-AM durch Esterasen hydrolysiert und als polares, aktives Molekül freigesetzt. Es bindet an Calcium-Ionen mit hoher Affinität, wobei die Bindung von Calcium die fluoreszierenden Eigenschaften verändert. Fura-2 ist ein ratiometrischer Calcium-Indikator und wird bei den Wellenlängen 340 und 380 nm angeregt. Durch das Messen der Verhältnisse der Fluoreszenz bei diesen Wellenlängen kann die intrazelluläre Calcium-Konzentration präzise bestimmt werden.<sup>[38][133]</sup>



**Abb. 61:** Bioassay zur calciumfreisetzenden Eigenschaft der Verbindung **60** und der Referenzverbindung **64** in Jurkat WT Zellen (JMP). Die Zellen wurden mit Fura-2-AM beladen und bei 37 °C inkubiert. Die Endkonzentration der Thiazol-Derivate beträgt 100 nM in Calcium-Messpuffer. **A** zeigt die Messung der Thiazol-NAADP-Verbindung **60**, **C** die Messung des Thiazol-NADP-Derivats **64**. **B** stellt die Anzahl der Peaks dar, die pro Zelle gemessen werden. **D** zeigt die Fläche, die unterhalb der einzelnen Kurven liegt, wobei die Baseline subtrahiert wurde. Korrektur für Mehrfachtests: t-Test, Mann-Whitney-Test.

Nach 420 Sekunden wurde zur Überprüfung der Zellaktivität der nicht-kompetitive Inhibitor Thapsigargin (TG) hinzugefügt. Thapsigargin hemmt den aktiven Rücktransport von  $\text{Ca}^{2+}$  in das endoplasmatische Retikulum (ER) und das sarkoplasmatische Retikulum (SR), indem es an die SERCA-Pumpe bindet. Diese Inhibition führt zu einem Anstieg der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.<sup>[38]</sup>

Die Tatsache, dass nur sehr wenige Zellen eine Änderung der Calciumkonzentration aufweisen, lässt vermuten, dass entweder das Thiazolmotiv die Interaktion mit den Bindungsproteinen HN1L/JPT2 und Lsm12 beeinträchtigt oder dass das Molekül zwar gebunden wird, jedoch die nachfolgende Calciumfreisetzung ausbleibt. In ersten Messungen wurden JMP WT Zellen mit dem Thiazol-Derivat **60** inkubiert und anschließend mit dem murinen monoklonalen Antikörper OKT3 behandelt. Dieser aktiviert durch die Bindung an den CD3-Rezeptor eine Calciumfreisetzung. Die beobachtete Verminderung der Calciumfreisetzung im Vergleich zur Probe ohne vorherige Inkubation lässt die Vermutung zu, dass das Thiazol-Derivat **60** eine antagonistische Wirkung aufweist. In Abbildung 62 sind das native NAADP **5** sowie das Thiazol-Derivat **60** in einer überlagerten Darstellung gezeigt.



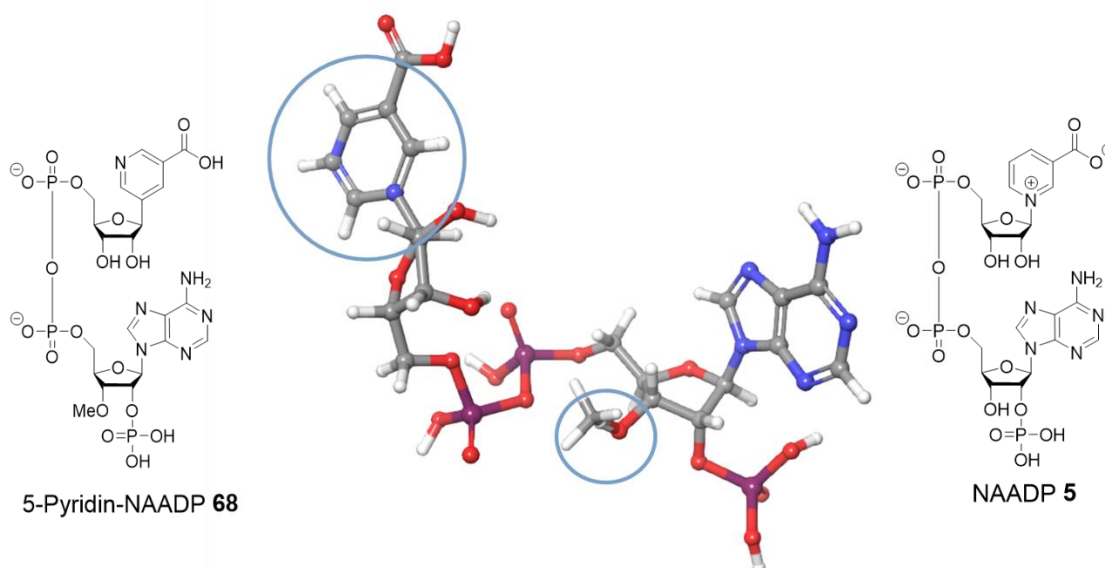
**Abb. 62:** Überlagerung des Thiazol-NAADP-Derivat **60** mit dem nativen NAADP **5**. Berechnungen durchgeführt mit Hilfe des Programms Schrödinger Maestro.

Die Überlagerung der beiden Strukturen verdeutlicht, dass neben der eher geringeren Abweichung der Methoxygruppe am Adenosin-Baustein auch eine Abweichung der Nicotinsäure und des Thiazol-Rings besteht. Dieser Unterschied führt dazu, dass der Carbonsäurerest in einem anderen Winkel steht. Dies könnte zur Folge haben, dass die Wechselwirkungen der Aminosäureketten des Zielenzym schwächer sind und die Bindung entweder nicht ausreicht, um das Enzym zu aktivieren, oder dass die für die Funktion des Enzyms wichtigen Konformationsänderungen nicht ausgelöst werden können.<sup>[28]</sup> Beide Fälle könnten letztlich zu einem Funktionsverlust führen, der eine Calciumfreisetzung verhindert.

Letzteres könnte zudem eine antagonistische Wirkung hervorrufen, die selbst bei einer nachträglichen Zugabe von NAADP **5** die Calciumfreisetzung weiterhin unterdrücken könnte.

#### 6.4 Synthese der 5-Pyridin-Verbindung

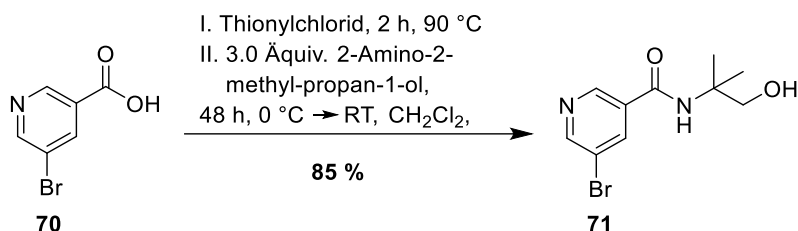
Die 5-Pyridin-NAADP-Verbindung **68** sollte aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zum nativen NAADP **5** synthetisiert werden (Abb. 63). Bei der Überlagerung der Strukturen ist keine entscheidende Abweichung der strukturellen Merkmale (Kapitel 4.4.6) zu erkennen. Es gibt zwar geringe Abweichungen aufgrund der Größe der Methoxygruppe, jedoch haben biologische Tests mit weiteren 3'-OMe-NAADP-Derivaten gezeigt, dass diese keinen negativen Einfluss auf die calciumfreisetzenden Eigenschaften hat. Im Gegensatz zu dem Thiazolring verhält sich die Nicotinsäure deckungsgleich mit dem nativen NAADP **5**, auch wenn die Position des Stickstoffs geändert wurde.<sup>[89]</sup>



**Abb. 63:** Kalkulierte Strukturen des 5-Pyridin-NAADP **68** und des nativen NAADP **5** im Vergleich. Erstellt mit Schrödingers Maestro.

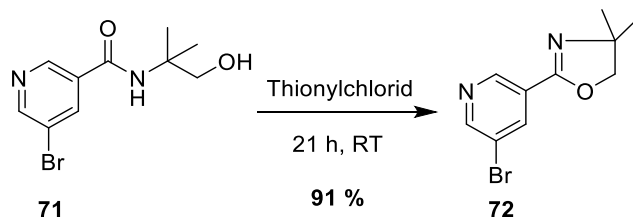
Im Rahmen der Untersuchungen zum 5-Pyridin-Derivat **69** wurde zunächst der vielversprechende Ansatz einer Metall-Halogen-Austausch-Reaktion erprobt, um ein nucleophiles Kohlenstoffzentrum zu erzeugen (Abb. 66). Dieses Zentrum sollte anschließend das elektrophile Carbonylkohlenstoffatom des Lactons angreifen und eine glycosidische Bindung erhalten werden.<sup>[134]</sup>

Als Startverbindung wurde die 5-Bromnicotinsäure **70** gewählt, die zunächst durch einen Oxazolidinring an der Carbonsäurefunktion geschützt wurde (Abb. 64). Dafür ist es zunächst notwendig die Verbindung **71** zu synthetisieren.<sup>[135]</sup>



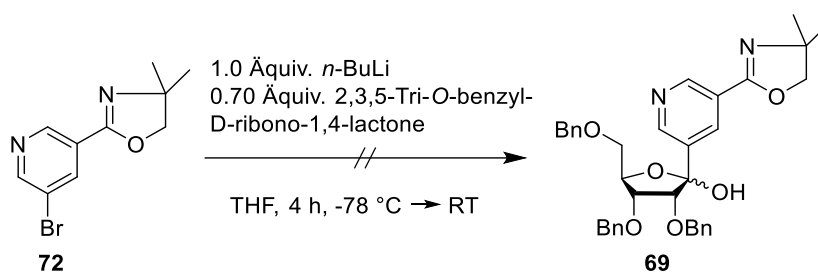
**Abb. 64:** Synthese des Säurechlorids mit anschließender Bildung des Amids **71**.

Im ersten Schritt der Reaktion erfolgte die *in situ* Herstellung des Säurechlorid unter Verwendung von Thionylchlorid. Anschließend greift das Amin das Carbonylkohlenstoffatom nucleophil an. Die anschließende Cyclisierung unter Wasserabspaltung wird durch die Aktivierung der Carbonylfunktion beim Rühren in Thionylchlorid initiiert (Abb. 65). Nach 21 Stunden wurde das Produkt **72** in einer guten Ausbeute von 91 % isoliert.



**Abb. 65:** Ringschluss zur Synthese des Oxazolinrings der Verbindung **72**.

Für die Metall-Halogen-Austausch-Reaktion wurde die starke Base *n*-Butyllithium verwendet, wobei das hochpolarisierte Kohlenstoff-Lithium-Elektronenpaar das Bromatom des Pyridinrings nucleophil angreift. Durch den Austausch weist das Kohlenstoffatom, das mit Lithium koordiniert ist, eine erhöhte Elektronendichte auf und greift nucleophil das Carbonylkohlenstoffatom an.<sup>[128]</sup>

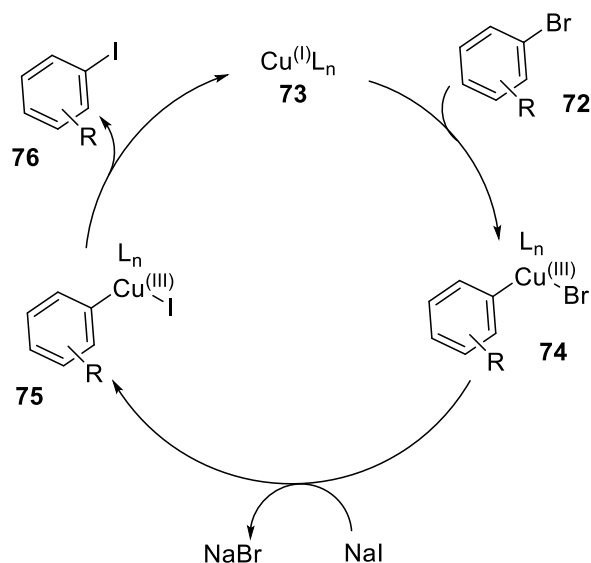


**Abb. 66:** Glycosylierungsreaktion zur Synthese der benzylierten Verbindung **69**.

Die Reaktion wurde bei einer Temperatur von -78 °C durchgeführt, bis festgestellt wurde, dass kein Fortschritt des Reaktionsumsatzes erkennbar war. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Jedoch konnte auch bei Raumtemperatur kein Umsatz dünn-schichtchromatographisch beobachtet werden. Das Stickstoffatom im Aromaten wirkt sich primär durch einen elektronischen Effekt negativ auf die Reaktion aus, indem es Elektronendichte vom nucleophilen Kohlenstoffatom abzieht.<sup>[128]</sup>

Ein alternativer Ansatz ist die Anwendung der Turbo-Grignard-Reaktion. Diese Variante der Grignard-Reaktion nutzt Komplexe aus Isopropylmagnesiumchlorid und Lithiumchlorid. Diese Turbo-Grignard-Reagenzien sind auch als "Turbo-Hauser-Reagenzien" bekannt und bieten spezifische Vorteile gegenüber herkömmlichen Grignard-Reagenzien. Durch die Zugabe von Lithiumchlorid erfolgt eine Steigerung der Reaktivität der Grignard-Reagenzien. Dies erlaubt die effiziente Umsetzung auch weniger reaktiver Substrate, die mit herkömmlichen Grignard-Reagenzien problematisch sein könnten.

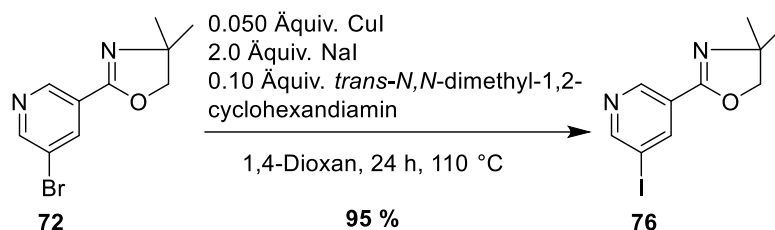
Für die anschließende Turbo-Grignard-Reaktion wurden mit Iodarylen bessere Ausbeuten postuliert. Es sollte daher eine milde Methode für die Umhalogenierung gewählt werden, um die Spaltung des Oxazolinrings zu verhindern. Bei der „aromatischen FINKELSTEIN“-Methode wird ein Katalysatorsystem mit 5 Mol-% CuI und 10 Mol-% eines 1,2-Diamin-Liganden verwendet.<sup>[136][137]</sup> Bei dieser Methode wird eine Vielzahl von polaren funktionellen Gruppen toleriert, und sogar N-H-haltige Substrate wie Sulfonamide, Amide und Indole sind mit den Reaktionsbedingungen kompatibel.<sup>[138]</sup>



**Abb. 67:** Vorgeschlagener Katalysezyklus der aromatischen FINKELSTEIN-Reaktion.<sup>[138]</sup>

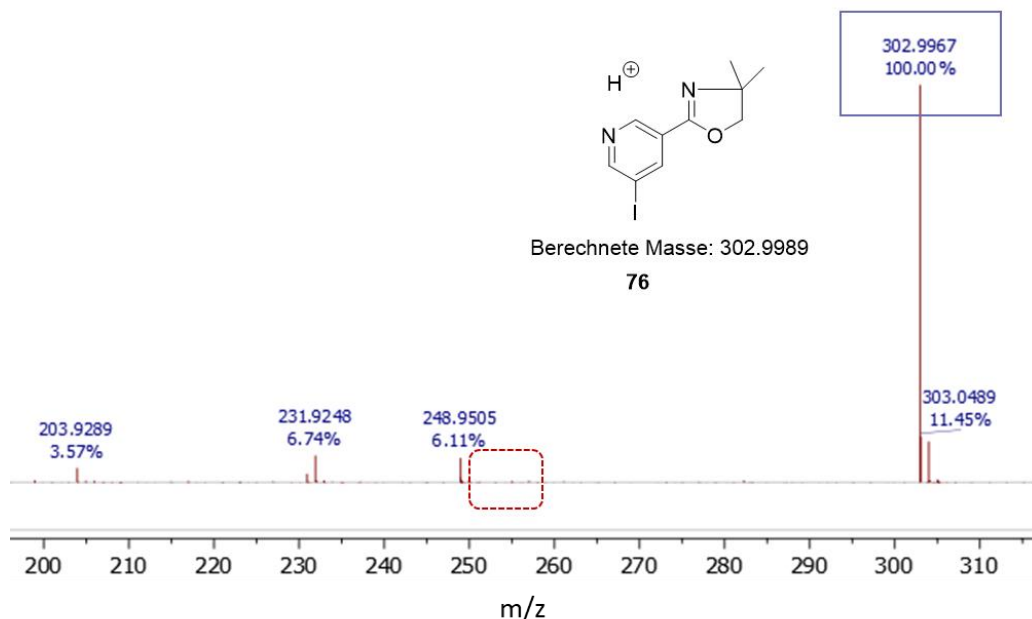
Der Kupfer(I)-Katalysator bildet in Anwesenheit des 1,2-Diamin-Liganden einen stabilen Kupfer-Ligand-Komplex **73** (Abb. 67). Durch eine oxidative Additionsreaktion interagiert dieser Komplex mit dem aromatischen Halogenid **72**, wobei das Kupfer von Cu(I) auf Cu(III) oxidiert wird.<sup>[139]</sup> Anschließend erfolgt der Halogenaustausch über das Natriumiodid, bei dem Natriumbromid als Nebenprodukt ausfällt. Nach der reduktiven Eliminierung des Cu(III)

zu Cu(I) erhält man die iodiertere Verbindung **76**.<sup>[136]</sup> Experimente mit makrocyclischer Arylkupfer(III)-Modellsysteme unterstützen diesen Mechanismus.<sup>[139]</sup>



**Abb. 68:** Aromatische FINKELSTEIN-Reaktion zur Synthese der Verbindung **76**.

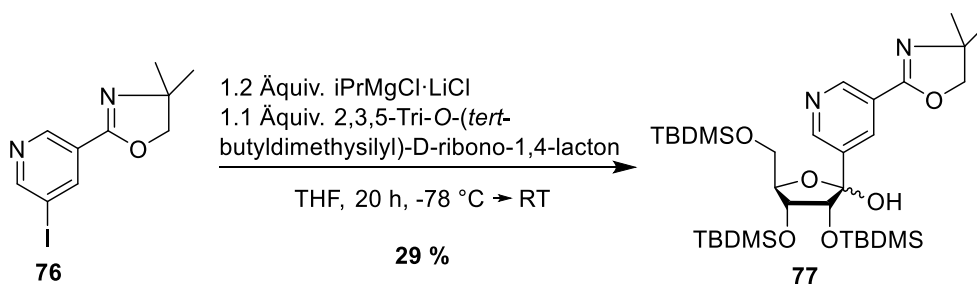
Die Charakterisierung des Produkts erfolgte zum einen durch den Vergleich der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren des Edukts **72** mit dem Produkt **76**. Es wird eine Hochfeldverschiebung der Protonen in direkter Nachbarschaft der Halogene beobachtet. Im <sup>1</sup>H-NMR des Produkt **76** ist nur eine Verbindung erkennbar, welches durch das Massenspektrum eindeutig dem iodierten Produkt **72** zuzuordnen ist (Abb. 69).



**Abb. 69:** HRMS-ESI der iodierten Verbindung **76**. Gemessen in positiven Modus.

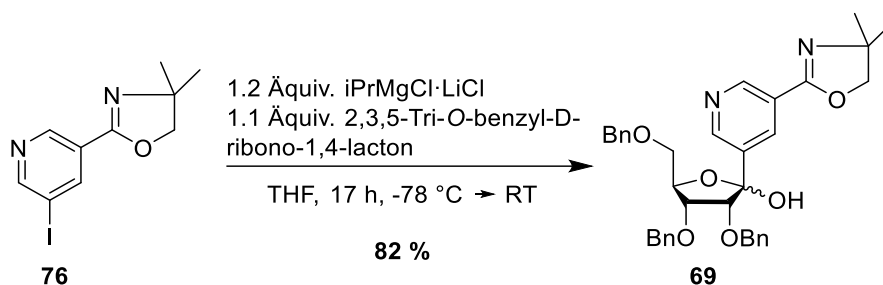
Neben dem Produktpeak bei 302.9967 (blauer Kasten) ist kein weiteres bromiertes Molekül erkennbar, das bei 255.0128 sowie aufgrund der Isotopenverteilung bei 257.0108 erwartet worden wäre (roter Kasten).

Anschließend wurde das erhaltene iodierte Produkt **76** in einer Turbo-Grignard-Reaktion mit einer Isopropylmagnesiumchlorid-Lithiumchlorid-Komplexlösung und 2,4,6-Tri-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*D*-ribo-*lacton* verwendet (Abb. 70). Dafür wurde zunächst das TBDMS-geschützte Lacton verwendet, da Silylschutzgruppen orthogonal zu der für die Lipophilitätssteigerung notwendigen Maskierung gespalten werden können.



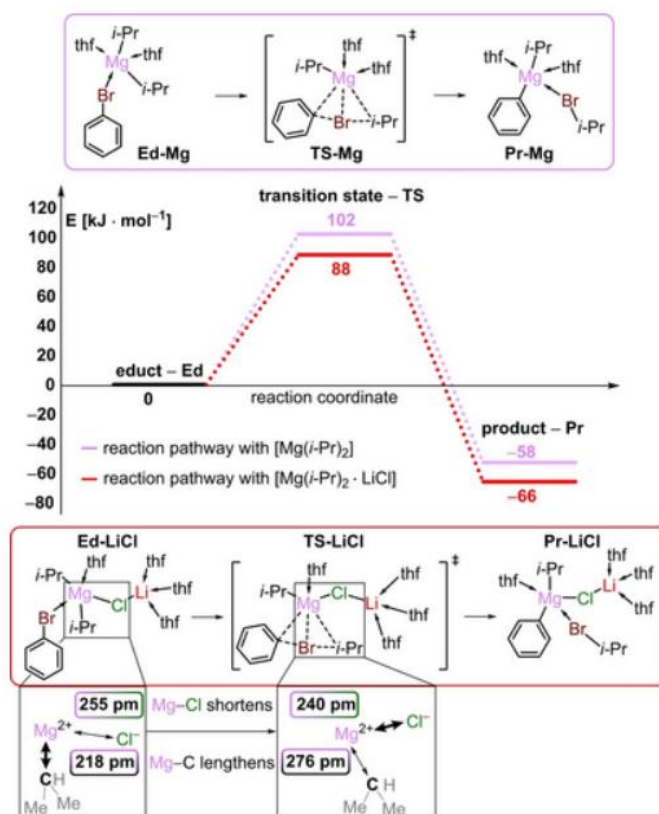
**Abb. 70:** Glycosylierungsreaktion zum TBDMS-geschützten Produkt **77**.

Die Ausbeute war jedoch mit 29 % deutlich geringer als mit dem benzylierten 2,4,6-Tri-*O*-benzyl-*D*-ribo-1,4-lacton, sodass dieser Ansatz wieder verworfen wurde (Abb. 71).<sup>[140]</sup> Ein möglicher Grund könnte der sterische Anspruch der TBDMS-Gruppen sein, der insbesondere an der 2'- und 5'-Position den Angriff der aktivierten Grignard-Verbindung verhindern könnte.



**Abb. 71:** Turbo-Grignard-Reaktion zur Synthese der Verbindung **69**.

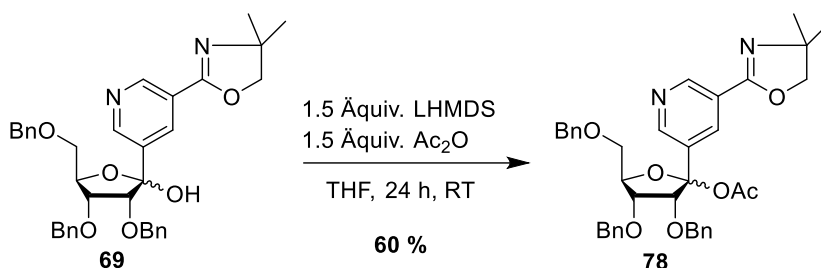
Wie ursprünglich von KNOCHEL *et al.* berichtet, erhöht Lithiumchlorid die Fähigkeit von Isopropylmagnesiumchlorid zu Transmetallierungsreaktionen.<sup>[141]</sup> Die Zugabe von Lithiumchlorid führt zu einem erweiterten Schlenk-Gleichgewicht über das ursprüngliche hinaus, indem Aggregate der Formel  $[i\text{PrMgCl}\cdot\text{LiCl}]_2$  entstehen, die von vier THF-Molekülen solvatisiert werden (Abb. 72). Tatsächlich liegt ein Gemisch aus mehreren Aggregaten vor, die alle durch Gleichgewichte miteinander verbunden sind.<sup>[142]</sup>



**Abb. 72:** Quantenchemische Berechnungen eines Mg-Br-Austauschs im Vergleich zwischen  $[i\text{Pr}_2\text{Mg}\cdot 2\text{THF}]$  (rosa) und  $[i\text{Pr}_2\text{Mg}\cdot\text{LiCl}\cdot 2\text{THF}]$  (rot). Durch den Einbau von LiCl wird die Aktivierungsenergie herabgesetzt.<sup>[141]</sup>

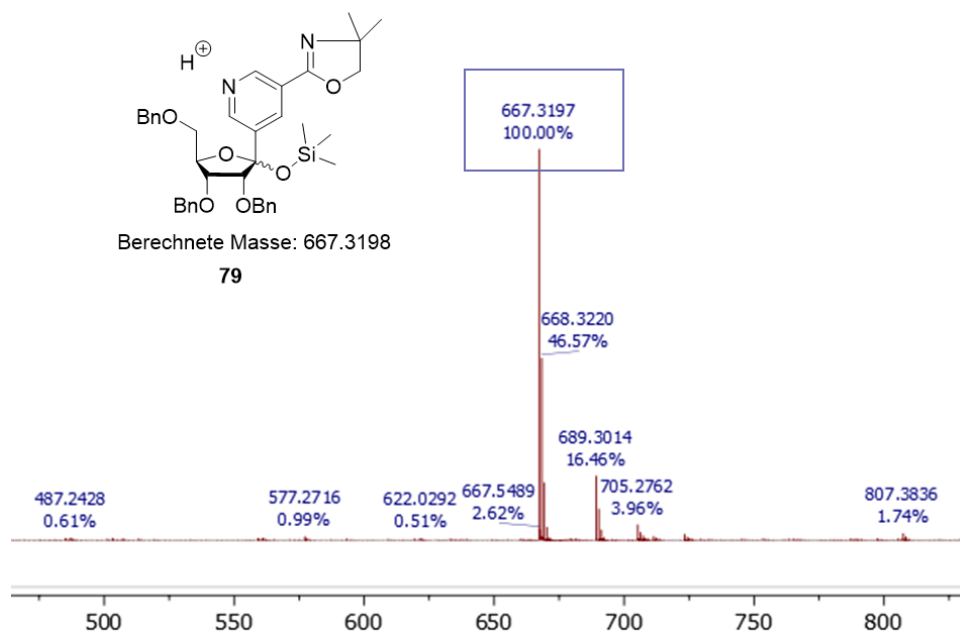
Zuletzt konnten STROHMANN *et al.* durch quantenchemische Berechnungen eines Mg-Br-Austauschs zeigen, dass der Einbau von Lithiumchlorid tatsächlich eine Erniedrigung der Aktivierungsenergie zur Folge hat, indem es den Übergangszustand dieser Reaktion stabilisiert (Abb. 72).<sup>[141]</sup>

Nach der Kupplung der Base bleibt die Hydroxygruppe an der 1'-Position bestehen, die zunächst durch eine Acetylierung in eine bessere Abgangsgruppe überführt wurde. Dafür wurde neben Essigsäureanhydrid die nicht-nucleophile starke Base Lithium-bis(trimethylsilyl)amid (LHMDS) eingesetzt (Abb. 73).<sup>[143]</sup>



**Abb. 73:** Acetylierung der 1'-Hydroxygruppe der Verbindung **69**.

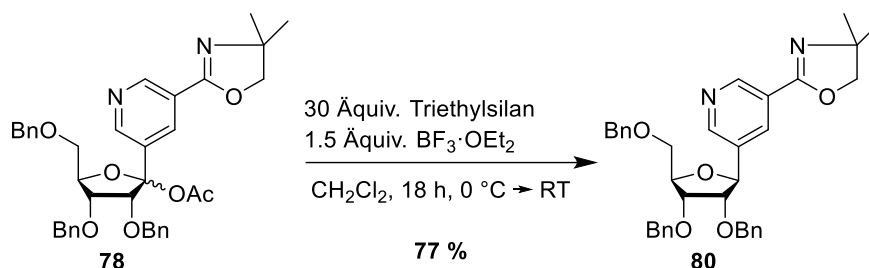
Um die Ausbeute zu steigern, wurden zunächst die Stoffmengenverhältnisse angepasst. Eine Erhöhung der Äquivalente an LHMDS führte jedoch zur Bildung eines trimethylsilylierten Nebenprodukts **79** (Abb. 74).



**Abb. 74:** HRMS-ESI-Spektrum des Nebenprodukts **79** der Acetylierung der 1'-Hydroxygruppe. Messung im positiven Modus.

Dieses Nebenprodukt konnte durch eine nachfolgende Reaktion mit LHMDs und Essigsäureanhydrid in das acetylierte Produkt überführt werden.

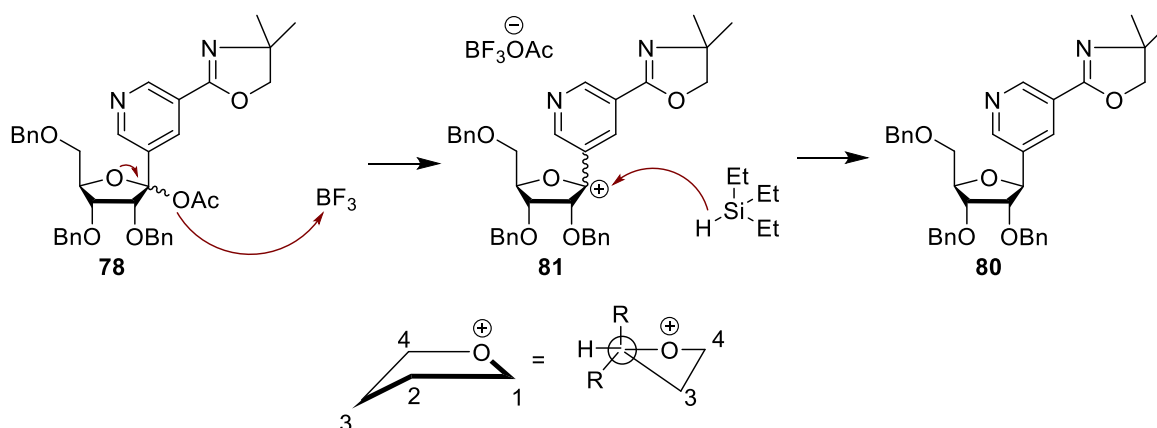
Die anschließende Abspaltung der Acetylgruppe wurde mit Triethylsilan und  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  durchgeführt (Abb. 75). Nach 18 Stunden konnte dünn-schichtchromatographisch der vollständige Umsatz beobachtet werden.



**Abb. 75:** Reaktionsbedingungen der Spaltung der Acetylgruppe der Verbindung **78**.

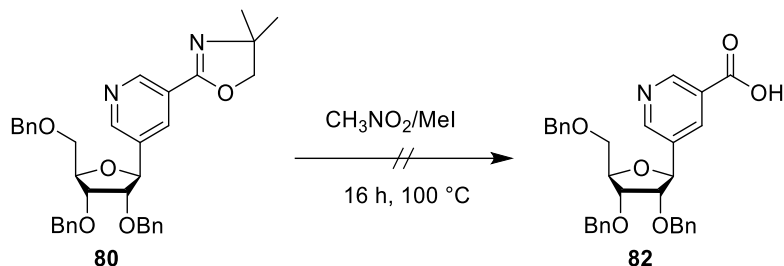
Durch eine säulenchromatographische Reinigung konnten 77 % des  $\beta$ -Produkts **80** isoliert werden. Das Bortrifluorid greift bei der Deacetylierung das Sauerstoffatom der 1'-Acetylgruppe elektrophil an und spaltet diese ab (Abb. 76). Das entstehende Oxocarbeniumion **81** wird durch das Sauerstoffatom der Furanose stabilisiert. Anschließend fungiert

das Triethylsilan als Hydriddonor, indem es selektiv von der *re*-Seite des Zuckers angreift, sodass ausschließlich das  $\beta$ -Produkt **80** entsteht. Ein weiterer entscheidender Faktor ist die Konformation des Übergangszustandes, wobei in diesem Fall das  $\text{E}_3$ -Konformer vorliegt. Die Stabilisierung dieser Konformation erfolgt durch die pseudoäquatoriale 2'-Position sowie die pseudoaxiale 3'-Position. Die vorliegende Struktur ermöglicht es, dass Nucleophile ausschließlich von der  $\alpha$ -Seite angreifen können, wodurch der Heteroaromat auf die  $\beta$ -Seite verdrängt wird.<sup>[144][145]</sup>



**Abb. 76:** Mechanistische Darstellung der Deacetylierung des Lactols **78**.

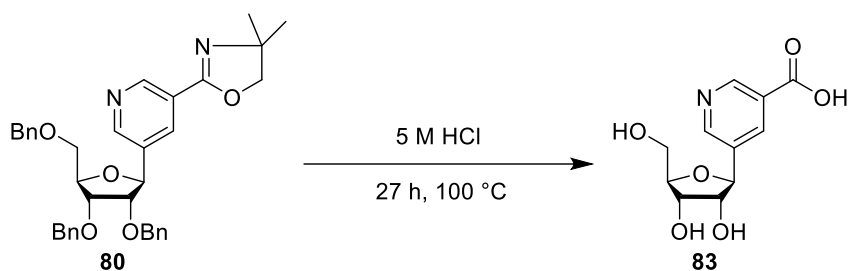
Zusätzlich könnten dirigierende Effekte zwischen dem Sauerstoffatom und dem Siliciumatom den Angriff von der unteren Position begünstigen, sodass das  $\beta$ -Produkt **80** entsteht. Im nächsten Schritt der Synthese sollte die Oxazolin-Schutzgruppe orthogonal zu den Benzylschutzgruppen gespalten werden. Dafür sollte zunächst Methyljodid verwendet werden (Abb. 77).<sup>[146]</sup>



**Abb. 77:** Spaltung des Oxazolinrings durch Methyljodid.

Das Produkt **82** konnte nach 16 Stunden nicht isoliert werden. Die Benzylschutzgruppen waren zwar noch an der Ribose, jedoch konnten die zu erwartenden aromatischen Protonen im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nicht beobachtet werden, sodass davon auszugehen ist, dass die Nucleobase abgespalten wurde.

Als Alternative wurde die Oxazolin-Schutzgruppe mit 5 M Salzsäure entfernt, was jedoch den Nachteil hat, dass die Benzylschutzgruppen ebenfalls gespalten wurden (Abb. 78).<sup>[135]</sup>

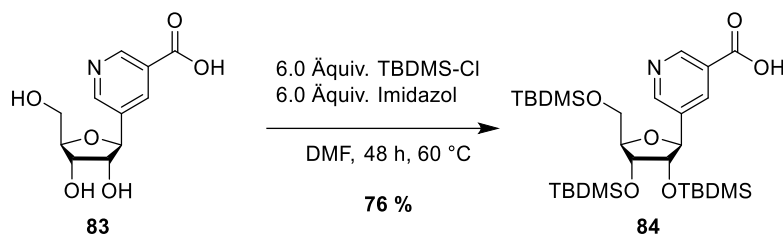


**Abb. 78:** Spaltung der Benzyl-Schutzgruppen sowie des Oxazolinrings.

Nach 27 Stunden bei 100 °C wurde die Reaktionslösung neutralisiert und lyophilisiert. Anschließend wurde das Rohprodukt mit einer RP-C8-Säulenchromatographie gereinigt. Das Produkt **83** konnte lediglich in Verbindung mit Natriumchlorid-Salzen isoliert werden, was dazu führte, dass der folgende Reaktionsschritt mit einem verunreinigten Produkt durchgeführt werden musste.

Um die 2'-, 3'- und 5'-Hydroxygruppen für folgende Reaktionen zu schützen, wurden Silylschutzgruppen eingesetzt. Diese sind orthogonal zur ACB-Maske spaltbar, welche im

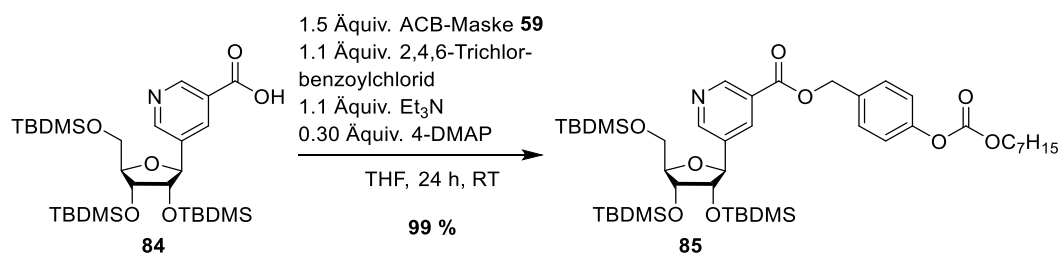
nächsten Reaktionsschritt an das Molekül gekuppelt werden soll. Für die Schützung wurden *tert*-Butyldimethylsilylchlorid und Imidazol verwendet (Abb. 79).



**Abb. 79:** Silylierung der Hydroxygruppen der Verbindung **83**.

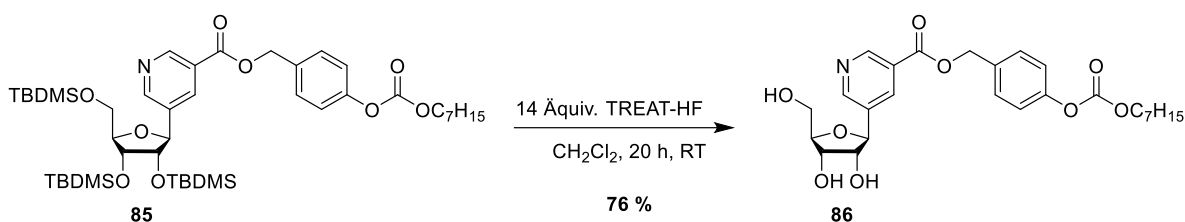
Durch die Erhöhung der Temperatur konnte bei dieser Reaktion eine Ausbeute von 76 % erzielt werden. Im ersten Schritt greift Imidazol das Siliciumatom des TBDMS-Cl nucleophil an, und das Chlorid-Ion wird abgespalten. Anschließend greift die Hydroxygruppe des D-Ribosids das Siliciumatom des 3-(*tert*-Butyldimethylsilyl)imidazoliumchlorids nucleophil an, wobei sich nach Abspaltung des Imidazols das Oxoniumion bildet. In der anschließenden Deprotonierung durch Imidazol werden der Silylether und das Imidazoliumchlorid gebildet.<sup>[128]</sup>

Für die Kupplung der ACB-Maske wurde auf die bewährte YAMAGUCHI-Methode zurückgegriffen (Kapitel 6.3).<sup>[118]</sup>



**Abb. 80:** YAMAGUCHI-Veresterung der Verbindung **84** mit der ACB-Maske **59**.

Nach 24 Stunden konnte die Verbindung **85** in einer sehr guten Ausbeute von 99 % isoliert werden (Abb. 80). Auch für die anschließende Spaltung der Silylschutzgruppen wurde auf eine bewährte Methode zurückgegriffen und TREAT-HF verwendet (Kapitel 6.1).

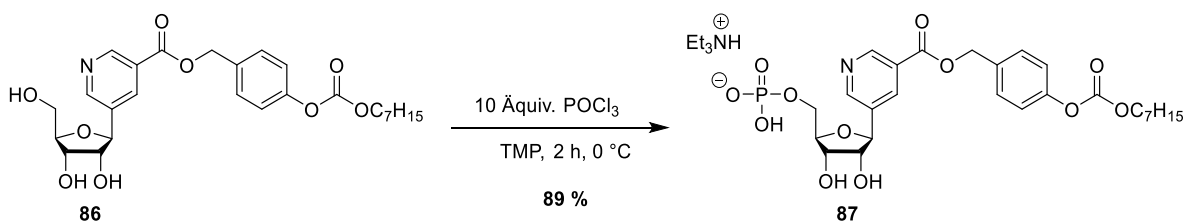


**Abb. 81:** Spaltung der TBDMS-Schutzgruppen durch Fluorid-Ionen.

Durch weitere Synthesen anderer Verbindungen wurde erkannt, dass eine Erhöhung auf 18 bzw. 27 Äquivalente an TREAT-HF die Ausbeute steigerte. Die Verwendung geringerer

Äquivalente von TREAT-HF führte zur Bildung von Nebenprodukten, die jeweils eine oder zwei TBDMS-Gruppen enthielten.

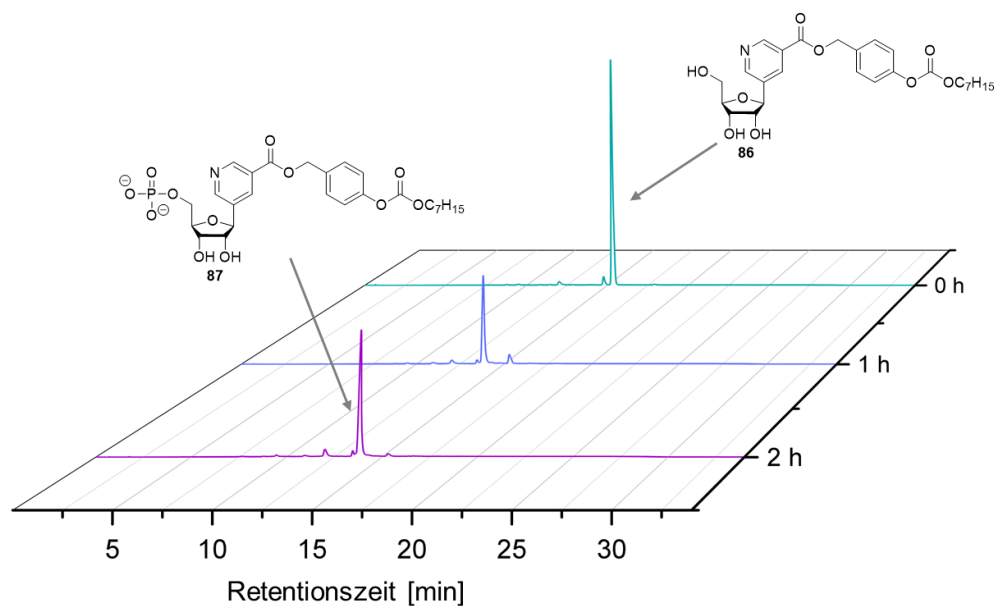
Die Phosphorylierung der 5'-Position wurde anschließend mit der YOSHIKAWA-Methode durchgeführt, die in vorherigen Reaktionen sehr gute Ergebnisse lieferte (Abb. 82).<sup>[115]</sup>



**Abb. 82:** YOSHIKAWA-Phosphorylierung der Verbindung **86**.

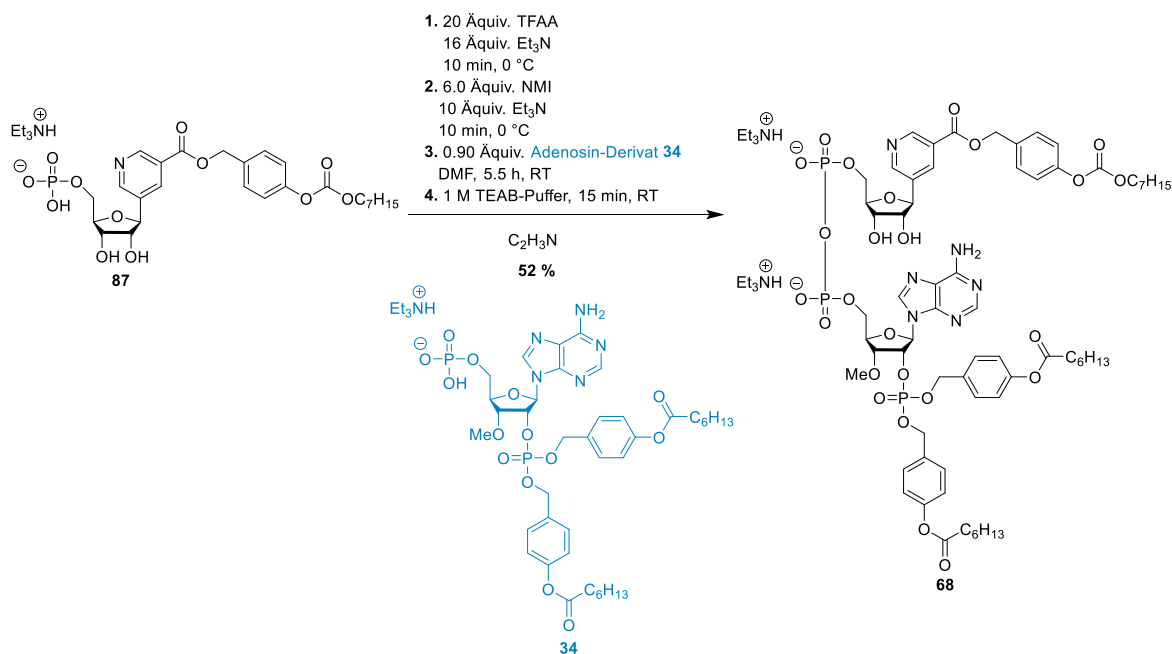
Die Reaktionsverfolgung erfolgte mittels HPLC, wobei bereits nach 2 Stunden der vollständige Umsatz beobachtet werden konnte. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1 M TEAB-Puffer beendet und nach einer RP-C18-Säulenchromatographie wurden 89 % des Monophosphats **87** erhalten.

Im Chromatogramm der Abbildung 83 ist zu sehen, dass sich die Verbindung **86** innerhalb einer Stunde nahezu vollständig umsetzt.



**Abb. 83:** Reaktionsverlaufskontrolle der YOSHIKAWA-Reaktion mittels HPLC.

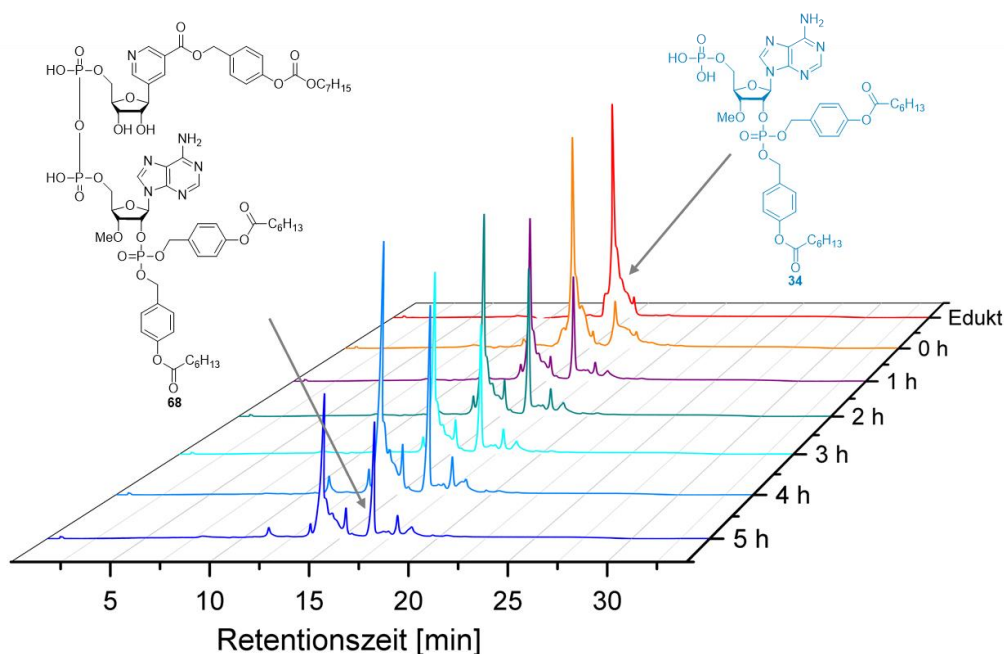
Das erhaltene ACB-geschützte Derivat **87** wurde anschließend mit dem 3'-OMe-Adenosinmonophosphat **34** nach den Bedingungen von MOHAMADY *et al.* gekuppelt (Abb. 84).<sup>[124]</sup>



**Abb. 84:** Synthese der Pyrophosphatverbindung **68** aus dem Monophosphat **87** und dem 3'-OMe-Adenosinmonophosphat **34**.

Nach einer Stunde konnte mittels HPLC neben dem Adenosinderivat die Entstehung eines Signals bei 16.6 Minuten beobachtet werden (Abb. 85). Das 5-Pyridin-Monophosphat **87**

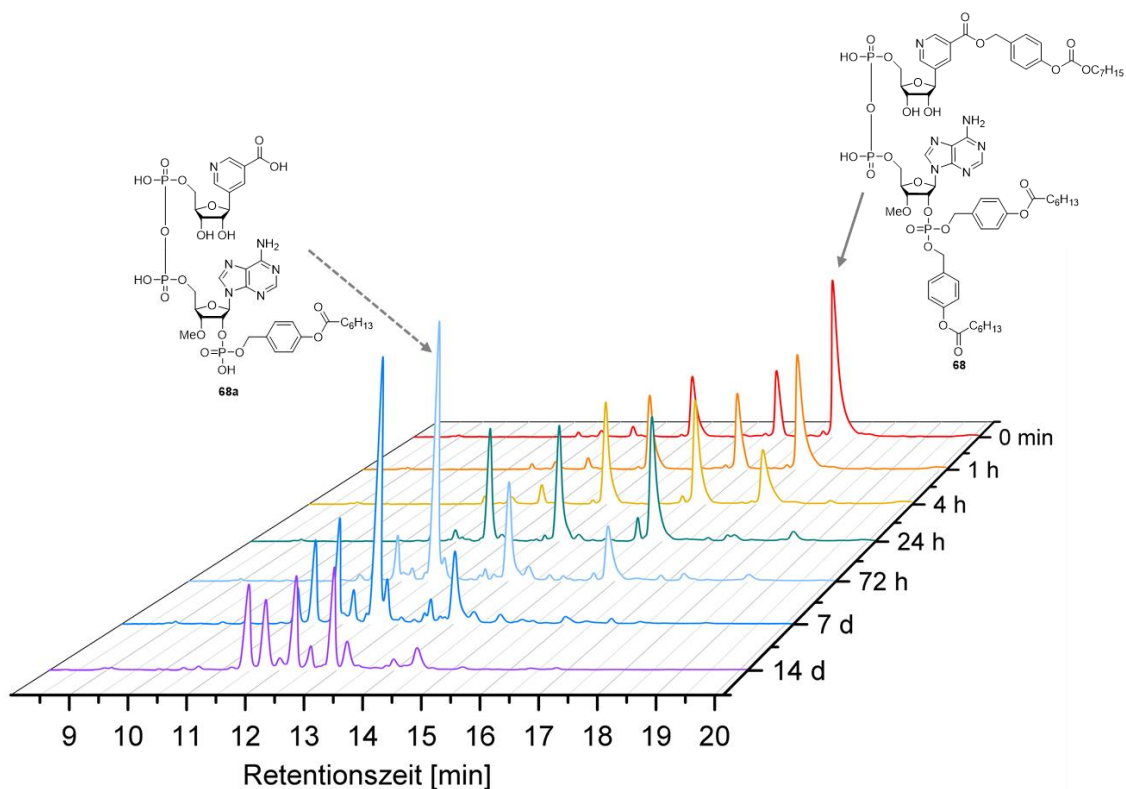
konnte nach der Aktivierung mit TFAA nicht beobachtet werden. Nach einer Reaktionszeit von 5 Stunden konnte kein weiterer Umsatz der Unterschusskomponente festgestellt werden, sodass die Reaktion beendet wurde.



**Abb. 85:** Reaktionsverlaufskontrolle der Kupplung der Monophosphate **87** und **34** mittels HPLC.

Im Anschluss erfolgte eine Reinigung des Rohprodukts mittels automatisierter RP-18-Säulenchromatographie. Die Reinigung mittels eines Wasser/TEAB-Puffer-Gradienten führte zu einer gleichmäßigeren Verteilung der Gegenionen, was wiederum eine geringere Signalbreite und reduziertes Tailing (Schweifbildung) im Chromatogramm bewirkte. Durch eine weitere RP-Chromatographie mit Wasser/Acetonitril konnte die reine Zielverbindung **68** in einer Ausbeute von 52 % isoliert werden.

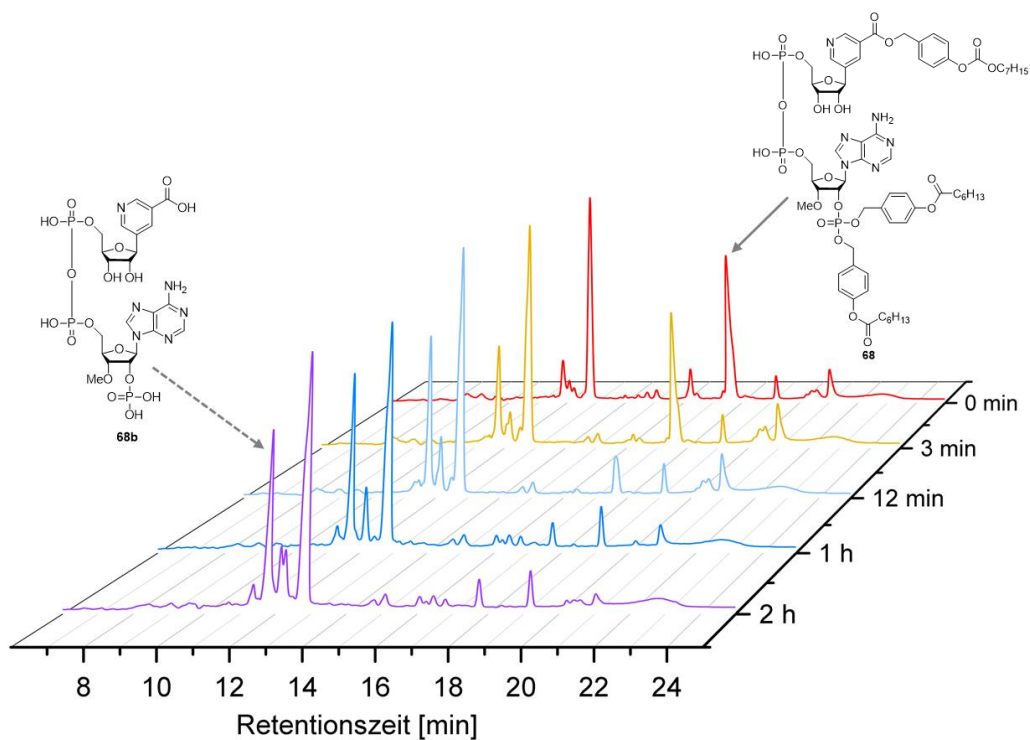
Die Zielverbindung **68** wurde anschließend in Hydrolysestudien auf die chemische sowie die enzymatische Stabilität getestet. Zunächst wurde dafür die Verbindung **68** in PBS-Puffer gelöst und bei 37 °C im Inkubator 14 Tage gelagert. In Abbildung 86 ist der Hydrolyseverlauf dargestellt.



**Abb. 86:** Chemischer Hydrolyseverlauf der Zielverbindung **68** in PBS-Puffer.

Die bioreversibel geschützte Verbindung **68** hat eine Retentionszeit von 17 Minuten. Bereits nach 60 Minuten kann die Spaltung einer Schutzgruppe durch das Auftreten eines weiteren Peaks bei 12.5 Minuten beobachtet werden. Anhand des Absorptionsspektrums und der Retentionszeit wird vermutet, dass es sich dabei um die einfach maskierte Verbindung **68a** handelt. Nach 72 Stunden treten weitere Peaks auf, die jedoch nicht identifiziert werden konnten. Die Halbwertszeit wurde mit  $t_{1/2} = 1.1$  Stunden bestimmt, was darauf hindeutet, dass die Esterfunktion für Veresterungsreaktionen durch Nucleophile sehr gut zugänglich ist. Zudem können die elektronenziehenden Eigenschaften des Pyridinrings die Angreifbarkeit der Carbonylfunktion für Nucleophile erhöhen.

Für die enzymatische Hydrolyse wurde die Verbindung **68** in PLE-Lösung inkubiert (Abb. 87).

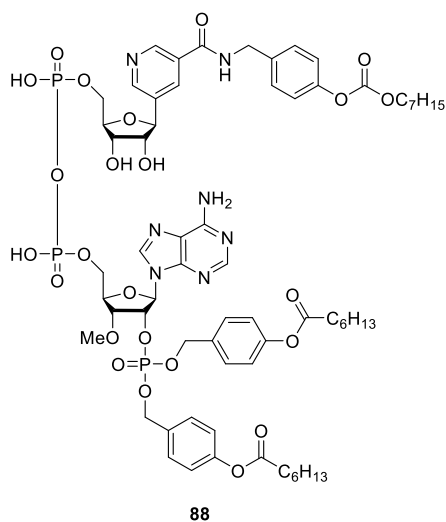


**Abb. 87:** Enzymatischer Hydrolyseverlauf der Zielverbindung **68** in PLE-Lösung.

Für die Hydrolyse wurde eine PLE-Lösung eingesetzt, um eine schnelle Spaltung der Schutzgruppen zu ermöglichen. Es lässt sich feststellen, dass bereits zu Beginn der Hydrolyse ein Peak bei 12.2 Minuten auftritt. Durch eine Co-Injektion konnte dieser Peak jedoch der PLE-Lösung zugeordnet werden. Bereits nach 12 Minuten zeigt sich eine deutliche Abnahme der geschützten Verbindung. Es bilden sich zwei Peaks bei einer Retentionszeit von 11 Minuten. Die Halbwertszeit wurde mit  $t_{1/2} = 5.7$  Minuten bestimmt. Aufgrund der Retentionszeit und der Absorptionsspektren wird vermutet, dass es sich bei dem Peak bei 11.2 Minuten um die vollentschützte Verbindung **68a** handelt. Dies deutet darauf hin, dass sich mindestens eine Schutzgruppe innerhalb weniger Minuten abspaltet.

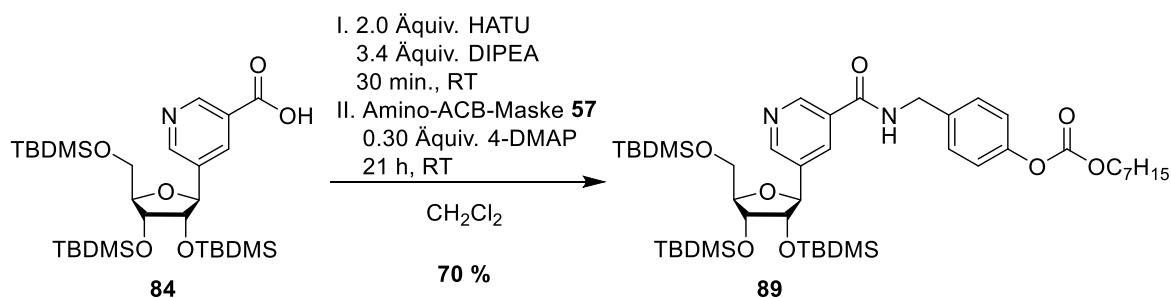
### 6.4.1 Synthese der 5-Pyridin-NADP-Derivat

Für biologische Untersuchungen sind Referenzverbindungen essentiell, um Störfaktoren auszuschließen. Dafür wurde das bewährte NADP-Derivat gewählt, welches in biologischen Untersuchungen keine Calciumfreisetzung zur Folge hat (Abb. 88).



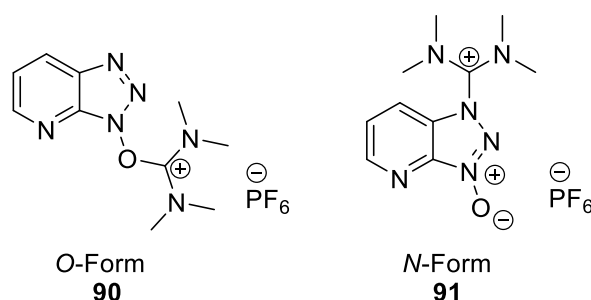
**Abb. 88:** 5-Pyridin-3'-OMe-NADP-Derivat **88**.

Im ersten Schritt wurde dafür die Amino-ACB-Maske **57** mit dem Kupplungsreagenz HATU und der Base DIPEA an die Verbindung **84** gekuppelt (Abb. 89).<sup>[129]</sup>



**Abb. 89:** Kupplung der Amino-ACB-Maske **57** an die Verbindung **84**.

Das Kupplungsreagenz [*O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N,N*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat] (HATU) kann in zwei Formen vorliegen, als Uroniumsalz (*O*-Form **90**) oder als das weniger reaktive Iminiumsalz (*N*-Form **91**) (Abb. 90). Durch die Verwendung von DIPEA wird die *O*-Form beibehalten. Durch die Verwendung von Triethylamin kann die *O*-Form in die weniger reaktive *N*-Form umgelagert werden, sodass auf Triethylamin explizit verzichtet wurde.<sup>[130][147]</sup>

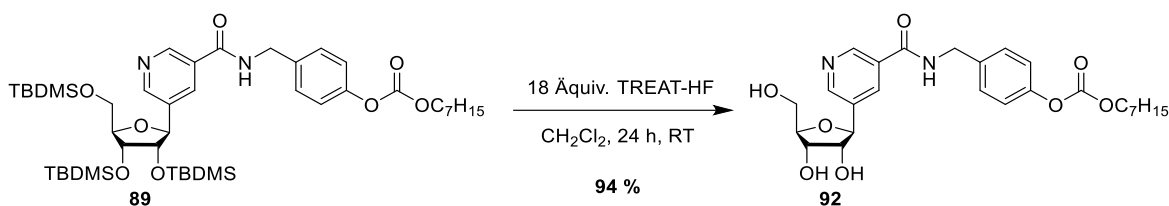


**Abb. 90:** O- und N-Form von HATU.

Der Reaktionsmechanismus der Carbonsäureaktivierung beginnt mit dem Angriff des Carboxylat-Anions auf den elektrophilen Kohlenstoff des Uroniums am HATU und bildet das instabile O-Acyl(tetramethyl)isouronium-Salz. Das anionische Benzotriazol-N-Oxid greift anschließend das Isouroniumsalz an, wodurch unter Abspaltung von Tetramethylharnstoff der aktive Ester entsteht. Im letzten Schritt greift im Fall der Reaktion in Abbildung 89 das Amin der Maske den Carbonylkohlenstoff des Aktivesters an und bildet das Amid.<sup>[130]</sup>

Die Annahme, dass HATU durch erhöhte Reaktivität und Stabilität während der Reaktion zu höheren Ausbeuten führt, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da durch die Verwendung von HBTU bei der Thiazol-Verbindung **65** eine Ausbeute von 78 % erzielt werden konnte.<sup>[147]</sup>

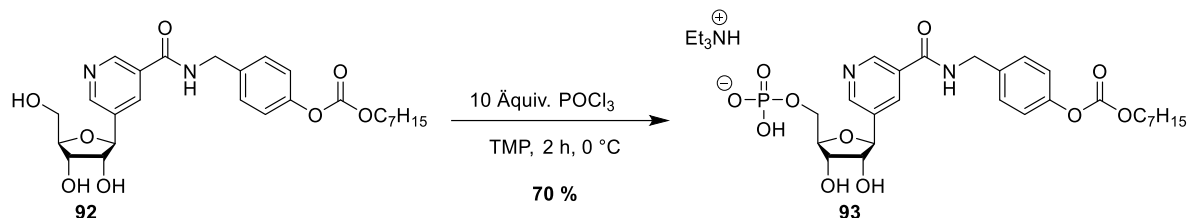
Im Anschluss wurde die Spaltung der Silylschutzgruppen mit 18 Äquivalenten TREAT-HF durchgeführt (Abb. 91). Nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden wurde die Reaktion durch die Zugabe von Kieselgur beendet. Im Anschluss wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt, wodurch eine sehr gute Ausbeute von 94 % erzielt wurde.



**Abb. 91:** Spaltung der TBDMS-Schutzgruppen mittels TREAT-HF.

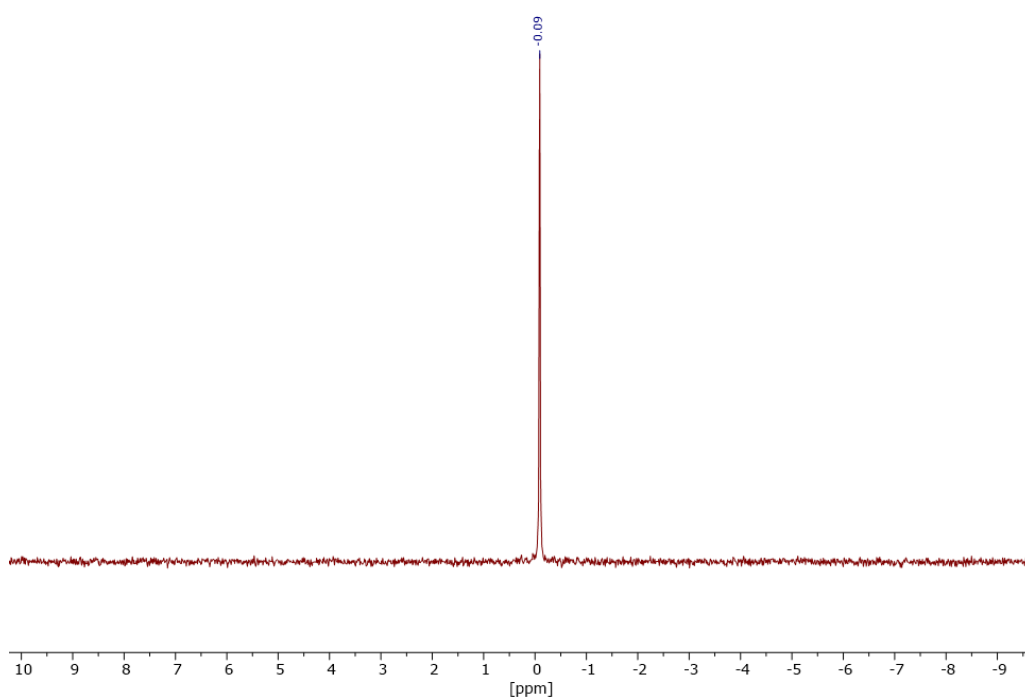
Die freie 5'-Hydroxygruppe wurde anschließend via YOSHIKAWA 5'-selektiv monophosphoryliert (Abb. 92).<sup>[115]</sup> Dabei wurden die bewährten Reaktionsbedingungen verwendet (Kapitel 6.4). Die Reaktionsverfolgung mittels HPLC zeigte auch hier, wie bei dem NAADP-Derivat **87**, eine schnelle Umsetzung des Edukts. Nach zwei Stunden wurde ein Anstieg eines potenziellen Nebenprodukts, wie beispielsweise des Diphosphats, chromatographisch nachgewiesen. Infolgedessen wurde die Reaktion durch Zugabe einer 1 M TEAB-Puffer-

lösung beendet, und das Rohprodukt wurde durch RP-C18-Säulenchromatographie gereinigt.



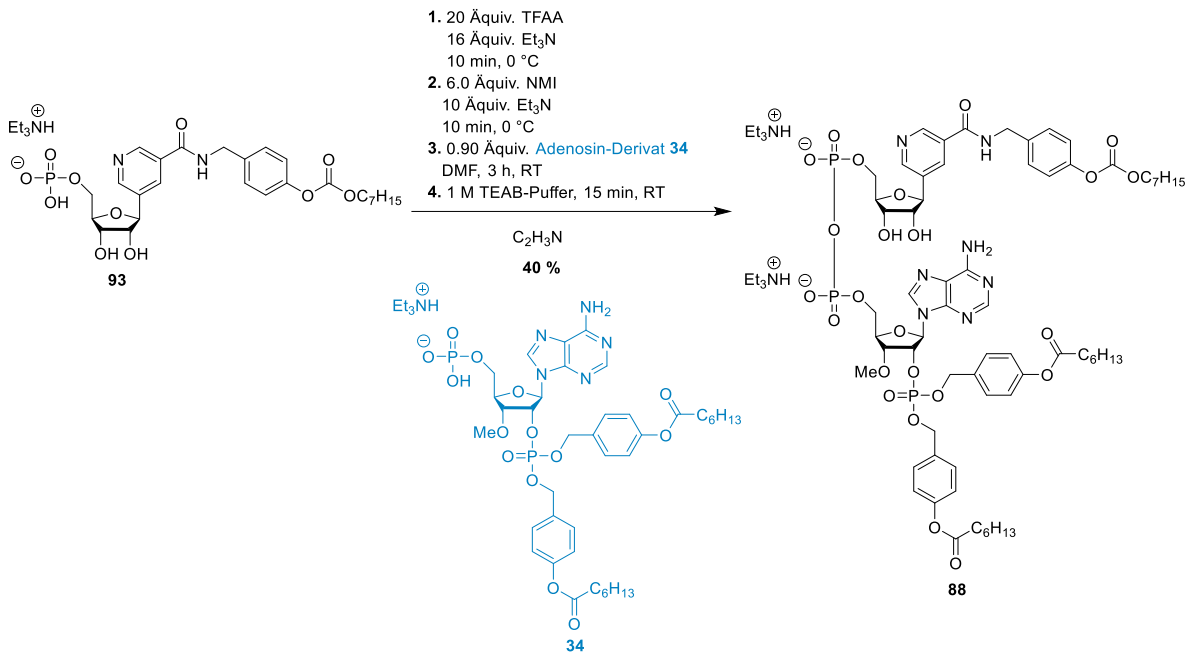
**Abb. 92:** YOSHIKAWA-Phosphorylierung der Verbindung **92**.

Das <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum zeigt ein reines Monophosphat mit einem Signal bei -0.09 ppm (Abb. 93).



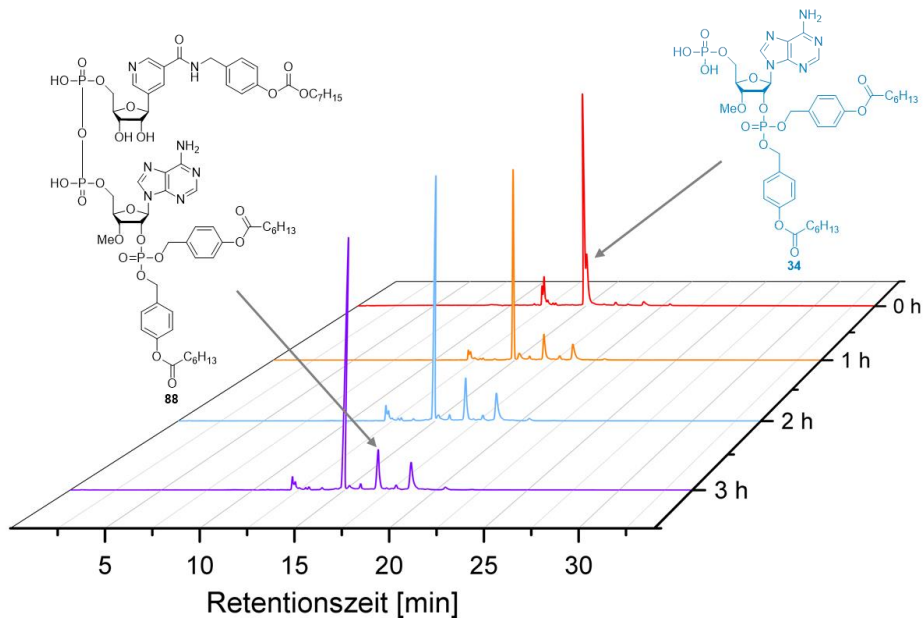
**Abb. 93:** <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum des Monophosphats **93** (243 MHz, 25 °C, DMSO-*d*<sub>6</sub>).

Im nächsten Schritt wurde die Zielverbindung **88** durch die Kupplung an das 3'-OMe-Adenosinmonophosphat **34** erhalten. Dafür wurden, wie schon zuvor, die Kupplungsbedingungen von MOHAMADY *et al.* verwendet (Abb. 94).<sup>[124]</sup>



**Abb. 94:** Kupplung der Monophosphate **93** und **34** zur Synthese des Pyrophosphats **88**.

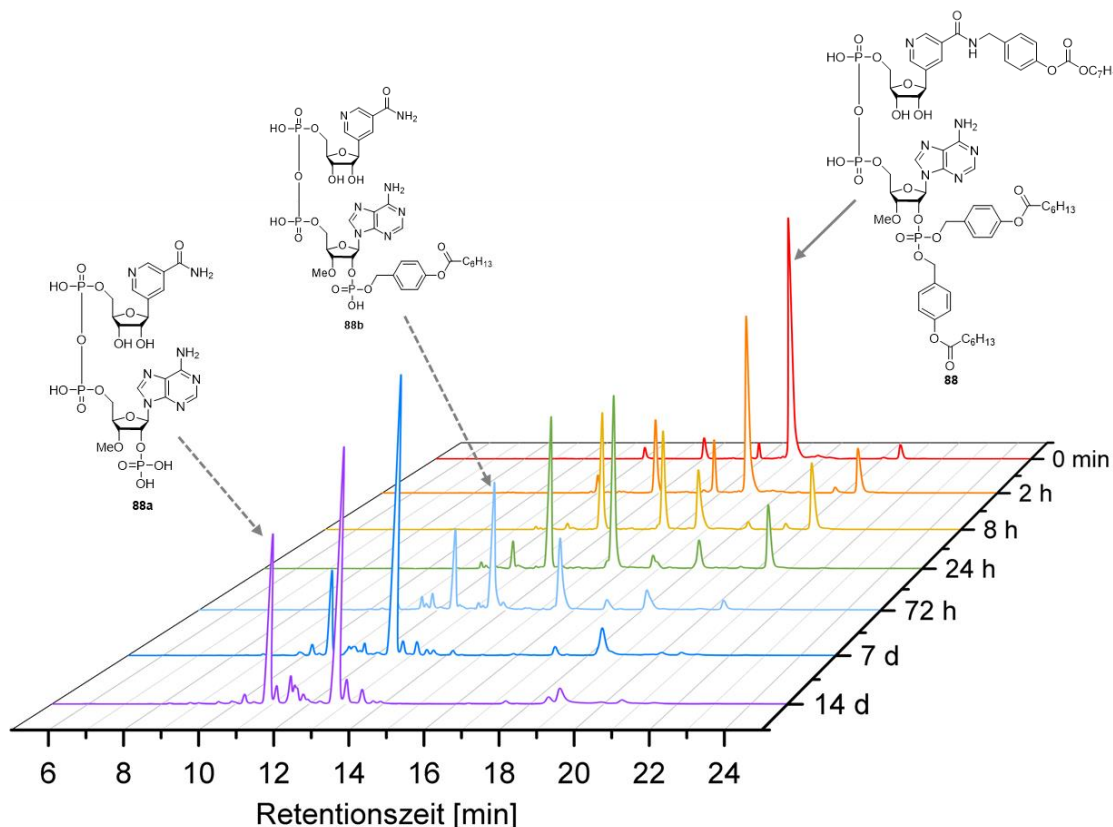
Nach der Zugabe des Adenosin-Derivats **34** zum aktivierten Baustein **93** wurden bereits nach 1 Stunde zwei neue Peaks beobachtet (Abb. 95). Nach einer Reaktionszeit von 3 Stunden wurde kein weiterer Umsatz festgestellt, sodass die Reaktion durch die Zugabe einer 1 M TEAB-Pufferlösung beendet wurde.



**Abb. 95:** Reaktionsverlaufkontrolle mittels HPLC der Kupplungsreaktion der Monophosphate **93** und **34**.

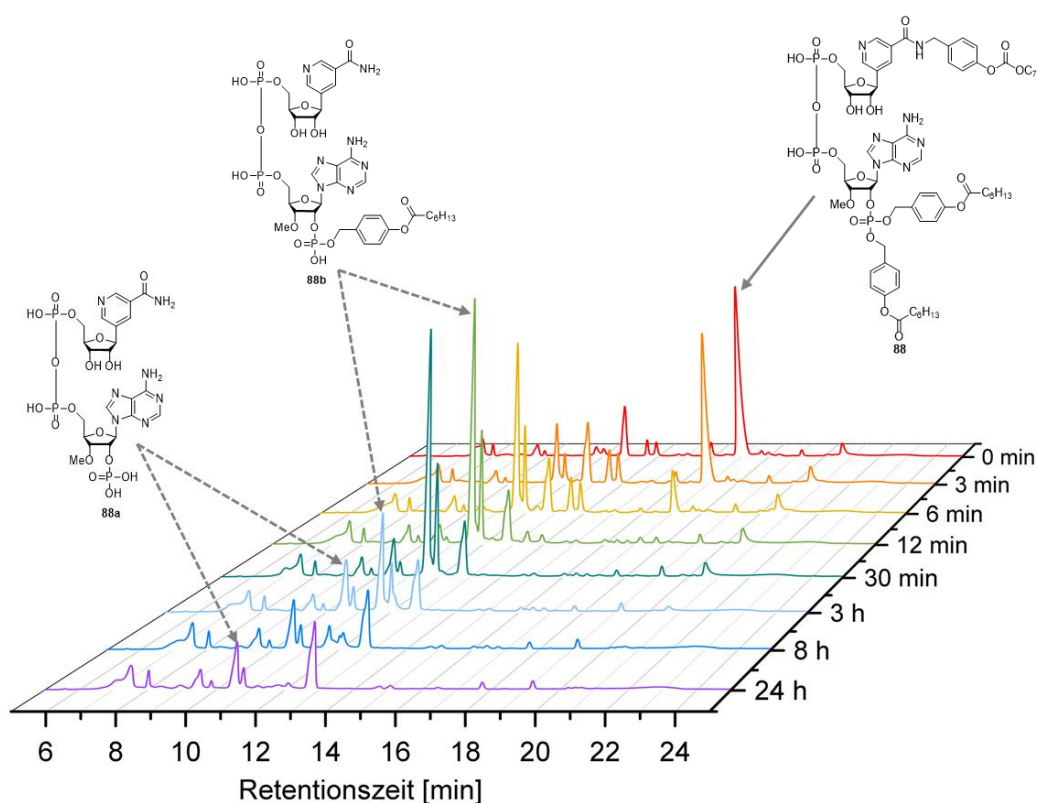
Nach mehreren RP-C18-Säulenchromatographie-Reinigungen mit Wasser/TEAB-Puffer sowie Wasser/Acetonitril-Gradienten konnte die Zielverbindung **88** mit einer Ausbeute von 40 % erhalten werden. Dabei konnte der zweite Peak bei 19 Minuten nicht isoliert werden. Es könnte sich um ein Pyrophosphat handeln, welches aus einem aktivierten und einem nicht aktivierten Baustein der Verbindung **93** besteht.

Die chemische und enzymatische Hydrolyse wurde unter den in Kapitel 7.5.1 und 7.5.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die bioreversibel geschützte Zielverbindung **88** zeigt eine Retentionszeit von 16.9 Minuten (Abb. 96). Nach 8 Stunden ist eine signifikante Abnahme der vollständig geschützten Verbindung **88** zu beobachten. Die Halbwertszeit wurde auf  $t_{1/2} = 2.8$  Stunden bestimmt. Bereits nach 30 Minuten erscheinen zwei zusätzliche Peaks bei 13 und 12 Minuten. Der Peak bei 13 Minuten intensiviert sich zunächst in den ersten 48 Stunden und nimmt anschließend ab, sodass nach 7 Tagen ausschließlich der Peak bei 12.0 Minuten sowie ein weiterer bei 10.8 Minuten beobachtet wird. Aufgrund der Retentionszeiten und der Absorptionsspektren wird vermutet, dass es sich bei dem Peak um 10.8 Minuten die vollständig demaskierte Verbindung **88a** gebildet haben.



**Abb. 96:** Ausschnitt der chemischen Hydrolyse der Zielverbindung **88** in PBS-Puffer.

Anschließend wurde die enzymatische Hydrolyse mit PLE-Lösung durchgeführt. Die Zielverbindung **88** hat eine Retentionszeit von 16.9 Minuten (Abb. 97). Bereits nach 6 Minuten konnte eine signifikante Abnahme des vollgeschützten Diphosphats **88** beobachtet werden, wobei eine Halbwertszeit von  $t_{1/2} = 5.1$  Minuten bestimmt wurde. Nach drei Minuten konnte ein weiterer Peak verzeichnet werden, der nach 11.7 Minuten eluierte. Es wird vermutet, dass sich die einfach maskierte Verbindung **88b** gebildet hat. Nach 20 Minuten kann das Entstehen eines weiteren Peaks bei 10.6 Minuten beobachtet werden, wobei der erste Peak abnimmt. Dabei wird anhand der Retentionszeit vermutet, dass es sich um die vollständig entschützte Verbindung **88a** handelt.

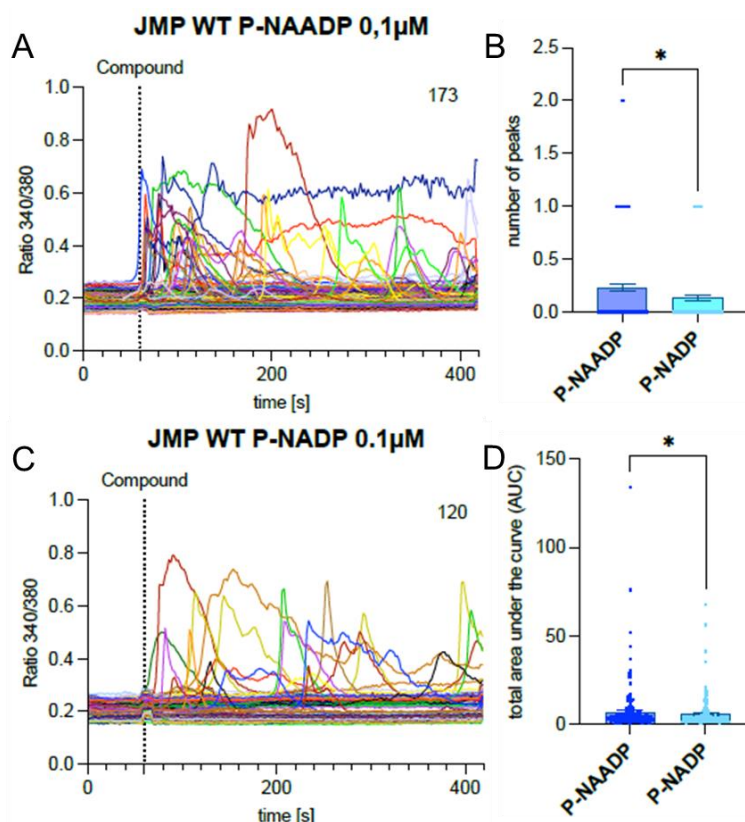


**Abb. 97:** Ausschnitt der enzymatischen Hydrolyse der Verbindung **88** in PLE-Lösung.

Aufgrund der Halbwertszeit der Stabilitätsstudie in PBS von  $t_{1/2} = 2.8$  Stunden sowie der Halbwertszeiten der enzymatischen Hydrolyse von  $t_{1/2} = 5.1$  Minuten ist die vorliegende Verbindung **88** für biologische Untersuchungen geeignet.

### 6.4.2 Untersuchungen zu den calciumfreisetzenden Eigenschaften des NAADP-Derivats **68** und des NADP-Derivats **88**

Die biologischen Untersuchungen der Verbindungen folgten wie analog zu der Thiazol-Verbindungen **60** und **64** an Jurkat WT Zellen, die mit Fura2-AM beladen wurden.



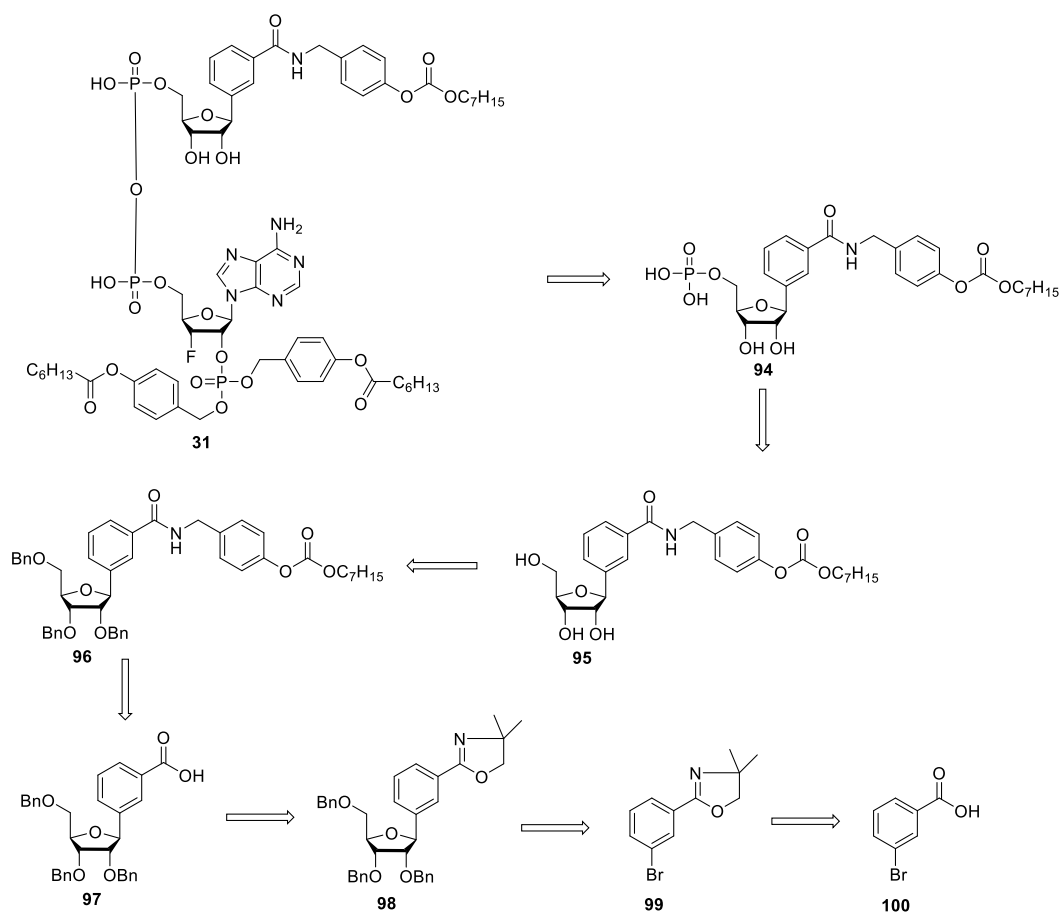
**Abb. 98:** Bioassay zur Untersuchung des calciumfreisetzenden Potentials der Verbindung **68** und der Referenzverbindung **88** in Jurkat WT Zellen. Die Zellen wurden mit Fura-2-AM beladen und bei 37 °C inkubiert. Die Endkonzentration der 5-Pyridin-Derivate beträgt 100 nM in Calcium-Messpuffer. **A** zeigt die Messung der 5-Pyridin-NAADP-Verbindung **68**, **C** die Messung des 5-Pyridin-NADP-Derivats **68**. **B** stellt die Anzahl der Peaks dar, die pro Zelle gemessen werden. **D** zeigt die Fläche, die unterhalb der einzelnen Kurven liegt, wobei die Baseline subtrahiert wird. Korrektur für Mehrfachtests: t-Test, Mann-Whitney-Test. \* $P < 0.05$ .

In Abbildung 98 kann durch die signifikante Änderung der Anzahl der Peaks **B** sowie der Vergrößerung der Fläche unter den Kurven **D** die calciumfreisetzende Wirkung des 5-Pyridin-Derivats **68** beobachtet werden. Damit ist das 5-Pyridin-NAADP-Derivat **68** eine vielversprechende Verbindung für weitere biologische Untersuchungen.

### 6.5 Synthese der 3'-F-MASTER-NADP Referenzverbindung

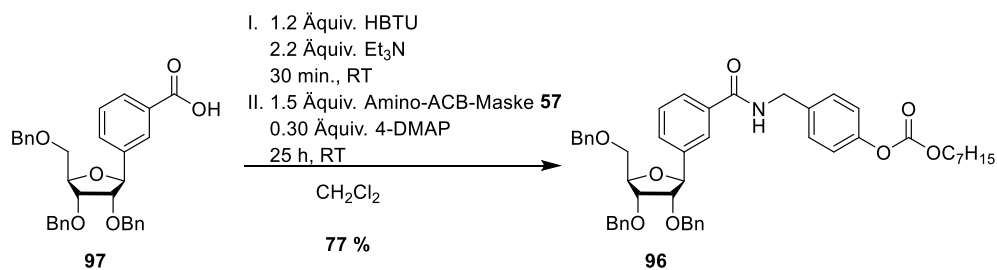
Eine weitere Referenz-Verbindung, die für die biologischen Untersuchungen am Universitätsklinikum Eppendorf benötigt wurde, ist die 3'-MASTER-NADP-Verbindung **31**. Bei dem oberen Baustein wurde, wie bei den bereits hergestellten Referenz-Verbindungen, das NADP-Motiv verwendet, um zu zeigen, dass bei der Zugabe und der intrazellulären Abspaltung der Masken kein signifikanter Anstieg der Calciumkonzentration detektiert wird. Wie in Kapitel 4.6 (Abb. 20) gezeigt, führt die Zugabe des NAADP-Derivats **25** zu einer starken Erhöhung der Calciumkonzentration.

Das NADP-Derivat **31** sollte durch die Kupplung des Monophosphats **94** mit dem 3'-F-Adenosinmonophosphats synthetisiert werden (Abb. 99). Das Monophosphat **94** sollte durch eine YOSHIKAWA-Phosphorylierung aus dem Nucleosid **95** gewonnen werden. Dieses sollte durch die Spaltung der Benzoylschutzgruppen und der vorherigen Kupplung der Amino-ACB-Maske **57** synthetisiert werden. Die Benzoesäureverbindung **96** sollte durch Spaltung des Oxazolinrings erhalten werden, welcher für die Kupplung mit dem Lacton essenziell war. Als Ausgangsverbindung sollte die 3-Brombenzoesäure **100** verwendet werden.



**Abb. 99:** Die retrosynthetische Darstellung der Synthesestrategie für die 3'-F-MASTER-NADP-Verbindung **31**.

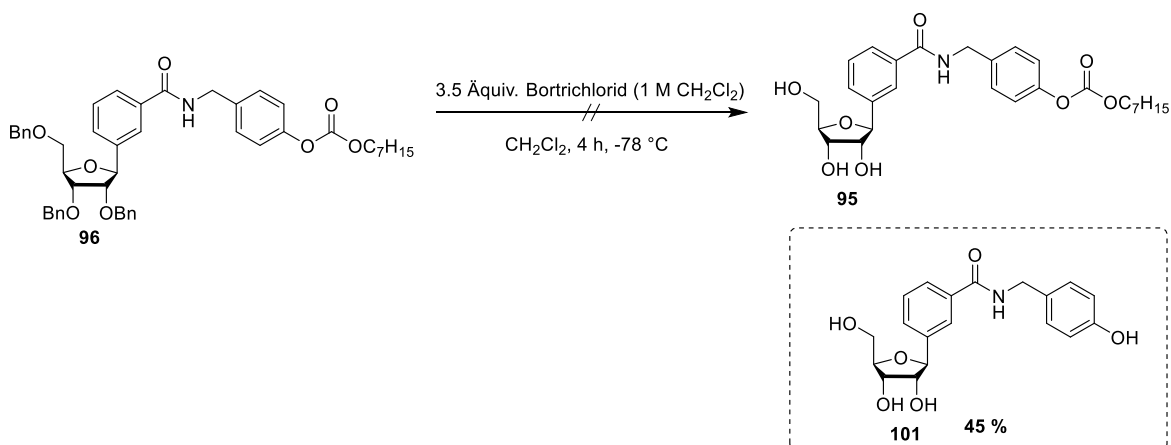
Im ersten Schritt dieser Syntheseroute zur Darstellung der benzylgeschützten Verbindung **97** wurden nach den Bedingungen von KRUKENBERG *et al.* durchgeführt.<sup>[7]</sup> Anschließend erfolgte die Kupplung der Amino-ACB-Maske mit dem Kupplungsreagenz HBTU (Abb. 100).<sup>[129]</sup>



**Abb. 100:** Kupplung der Amino-ACB-Maske **57** an Verbindung **97** mithilfe des Kupplungsreagenz HBTU.

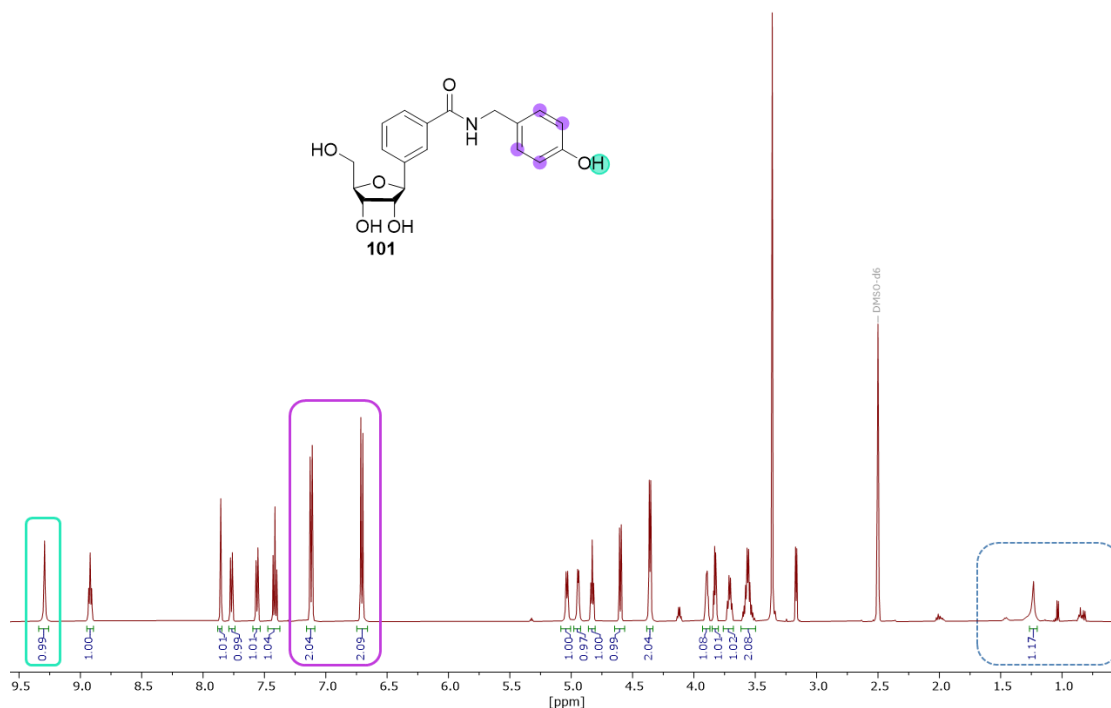
Das Kupplungsreagenz wurde zuvor bereits bei der Synthese des Thiazol-NADP-Derivats **65** verwendet (Abb. 53). Dabei konnten 78 % des Produkts erhalten werden. Bei der Verwendung des reaktiveren HATUs in der Synthese des 5-Pyridin-NADP-Derivats **89** konnten entgegen der Erwartung etwas weniger (70 %) erhalten werden.

Im nächsten Schritt sollten die Benzylschutzgruppen abgespalten werden. Dafür wurde die Verbindung **96** zusammen mit 3.5 Äquivalenten Bortrichlorid bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 4 Stunden gerührt (Abb. 101).<sup>[148]</sup> Dünnschichtchromatographisch konnte der vollständige Umsatz beobachtet werden. Nachdem die Reaktion durch die Zugabe einer wässrigen, gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung beendet wurde, konnte das gewünschte Produkt anschließend nicht isoliert werden. Stattdessen wurde die Verbindung **101** in einer Ausbeute von 45 % erhalten, wobei eine Spaltung des Esters stattfand.



**Abb. 101:** Spaltung der Benzylschutzgruppen mit Bortrichloridlösung.

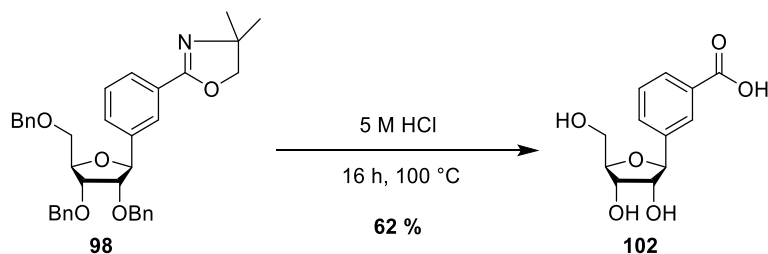
Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ist zu erkennen, dass die Alkylkette sowie der Carbonylkohlenstoff vollständig fehlen (Abb. 102). Durch das aprotische NMR-Lösungsmittel  $\text{DMSO-}d_6$  konnte die phenolische Hydroxygruppe identifiziert werden, die sich in *para*-Position am Aromaten befindet (Abb. 102, grün). Die starke Lewis-Säure Bortrichlorid, kann an einen der Carbonylsauerstoffe koordinieren und dadurch das Carbonylkohlenstoffatom reaktiver für nucleophile Angriffe machen. Die stark polarisierte Sauerstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung kann bei der Zugabe einer wässrigen Lösung eine tetraedrische Zwischenstufe ausbilden, die schließlich zur Abspaltung des Phenols führt. In weiteren Arbeiten hat sich gezeigt, dass das Produkt erhalten werden konnte, wenn die Reaktionslösung in einen großen Überschuss an auf  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlter Natriumhydrogencarbonatlösung gegeben wurde.<sup>[7]</sup>



**Abb. 102:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **101** mit den Signalen für den Aromaten der Maske (pink), sowie dem phenolischen Proton (grün) und der fehlenden Alkylkette (blauer Kasten) (500 MHz, 25 °C,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

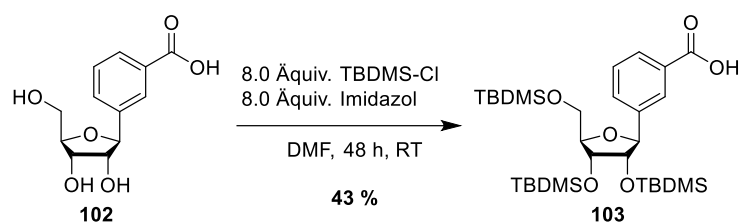
Die Vermutung, dass die Maskierung bei einer nachfolgenden Zellapplikation möglicherweise nur teilweise gespalten werden könnte, wurde durch eine Hydrolyse in PLE widerlegt, da während der Inkubation ebenfalls die 4-Hydroxybenzyl-Gruppe eliminiert wurde.

Da die Spaltung der Benzylschutzgruppen auf diesem Weg zunächst nicht möglich war, wurden sie ausgehend von der Verbindung **98** durch das Sieden in 5 M Salzsäure zusammen mit dem Oxazolinring entfernt (Abb. 103).<sup>[135]</sup> Das Nucleosid **102** konnte nach einer RP-C18-Säulenchromatographischen Reinigung in einer Ausbeute von 62 % erhalten werden.



**Abb. 103:** Spaltung der Benzylschutzgruppen sowie des Oxazolinrings durch 5 M Salzsäure.<sup>[135]</sup>

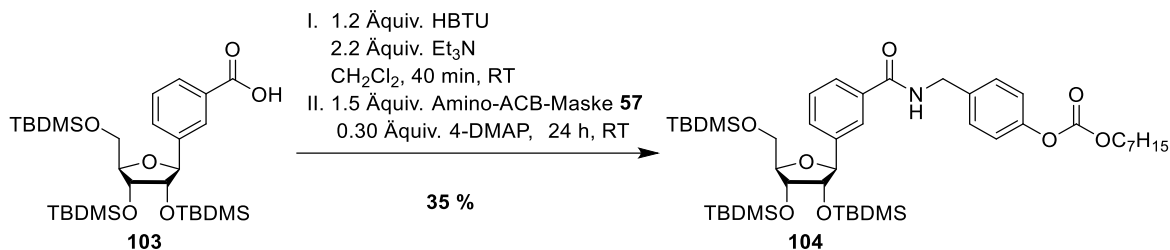
Anschließend sollten die Hydroxygruppen vor der Kupplung mit der Amino-ACB-Maske **57** mit TBDMS-Schutzgruppen versehen werden (Abb. 104).



**Abb. 104:** Synthese der Verbindung **103** durch Silylierung der Hydroxygruppen.

Nach 24 Stunden konnte mittels Dünnschichtchromatographie die Bildung mehrerer Verbindungen festgestellt werden. Nach weiteren 24 Stunden wurde kein weiterer Fortschritt festgestellt, weshalb die Reaktion abgebrochen wurde. Die TBDMS-geschützte Verbindung **103** wurde mit einer Ausbeute von 43 % isoliert. Nachfolgende Untersuchungen an ähnlichen Molekülen zeigten, dass eine Erhöhung der Äquivalente sowie eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 60 °C zu einer Verbesserung der Ausbeute und einer geringen Menge an einfach bzw. zweifach TBDMS-geschützten Nebenprodukten führten (S. 74, Abb. 79).

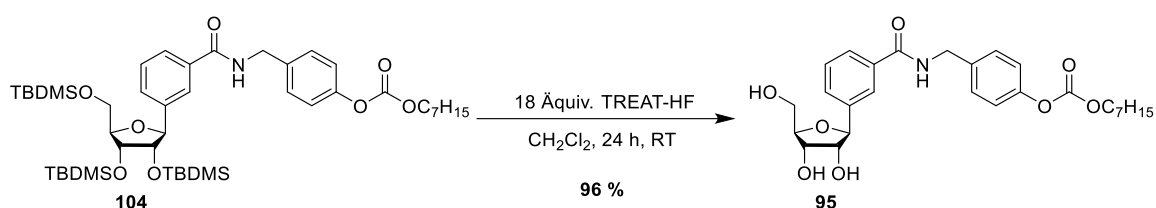
Für die Kupplung der Amino-ACB-Maske **57** an die freie Carbonsäure **103** wurde das Kupplungsreagenz HBTU verwendet (Abb. 105). Nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden konnte die Verbindung **104** in einer Ausbeute von 35 % isoliert werden.



**Abb. 105:** Kupplung der Amino-ACB-Maske **57** mit Hilfe von HBTU an die Verbindung **103**.

Der Ausbeuteverlust gegenüber der Reaktion bei dem Thiazol-Derivat **65** in Abb. 53, bei der eine Ausbeute von 78 % erreicht wurde, könnte durch die Größe der TBDMS-Schutzgruppen erklärt werden. Durch den Einsatz von Triethylsilyl-Schutzgruppen könnte dieser Effekt minimiert werden.

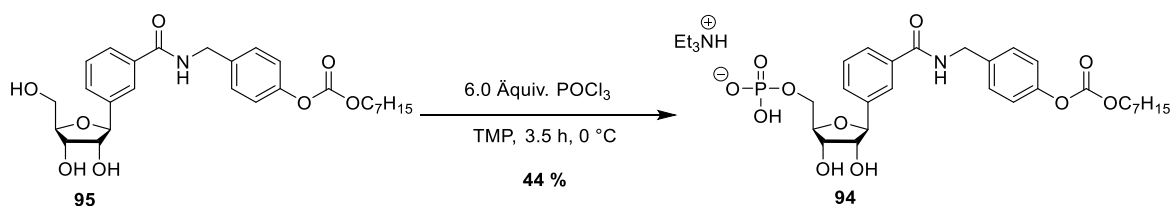
Um das entschützte Nucleosid **95** zu erhalten, wurden die TBDMS-Schutzgruppen durch TREAT-HF gespalten.



**Abb. 106:** Spaltung der TBDMS-Schutzgruppen durch TREAT-HF.

Durch die selektive Spaltung der Silylether durch TREAT-HF konnte nach 24 Stunden Röhren bei Raumtemperatur die entschützte Verbindung **95** in einer sehr guten Ausbeute von 96 % isoliert werden (Abb. 106).

Die entschützte 5'-Position wurde anschließend in einer YOSHIKAWA-Phosphorylierung selektiv monophosphoryliert.<sup>[115]</sup> Es wurden 6.0 Äquivalente Phosphorylchlorid zu dem in TMP gelösten Nucleosid **95** gegeben und 3.5 Stunden bei 0 °C gerührt (Abb. 107). Die Reaktion mittels HPLC überwacht, wobei nach 3.5 Stunden die Bildung eines Nebenprodukts festgestellt wurde, woraufhin die Reaktion durch Zugabe von 1 M TEAB-Puffer abgebrochen wurde.

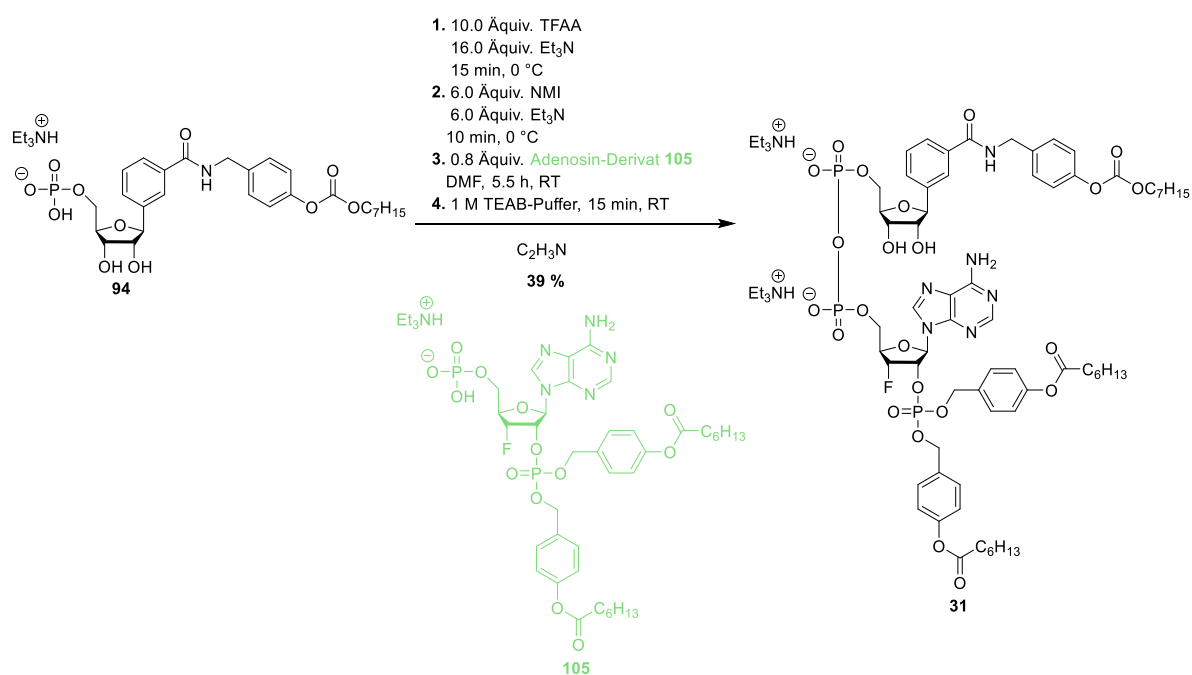


**Abb. 107:** 5'-Selektive YOSHIKAWA-Phosphorylierung der Verbindung **95**.

Das Monophosphat **94** konnte nach einer RP-C18-Säulenchromatographie in einer Ausbeute von 44 % erhalten werden. Im Vergleich zu den Phosphorylierungsreaktionen der Thiazol- **67** bzw. Pyridin-Derivate **93** (77 % und 70 %) könnte die geringere Ausbeute eine Folge der geringeren Anzahl an Äquivalenten Phosphorylchlorid sein. In weiteren Reaktionen hat sich gezeigt, dass eine Erhöhung der Äquivalente dazu führt, dass sich mehr Monophosphat bildet und die Reaktion nach wenigen Stunden beendet werden kann. Eine Verringerung der Anzahl an Äquivalenten führte jedoch dazu, dass das Edukt deutlich langsamer umgesetzt wurde, wobei die Bildung des Diphosphats nach mehreren Stunden nachgewiesen werden konnte.

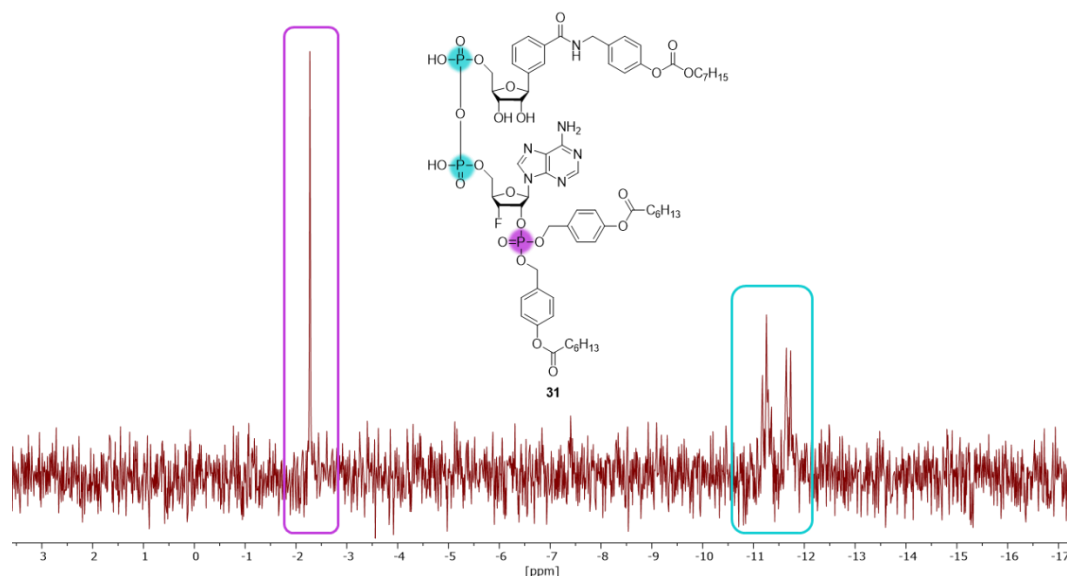
Der letzte Schritt ist die Kupplung zum Pyrophosphat **31** nach der Methode von MOHAMADY *et al.*<sup>[124]</sup> Nachdem das Monophosphat **94** durch die Reaktion mit Trifluoressigsäure und NMI aktiviert wurde, wird das Adenosin-Derivat **105** zugegeben, welches das elektrophile *N*-Methylimidazol aktivierte Monophosphat angreift.

Nach 5.5 Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe eines 1 M TEAB-Puffers beendet, und das Rohprodukt wurde mittels RP-C18-Säulenchromatographie gereinigt. Es war bereits bekannt, dass sich die Zielverbindung **31** nur schwer vom 3'-F-Adenosin-Derivat **105** abtrennen lässt, weshalb nur 0.8 Äquivalente verwendet wurden (Abb. 108). Trotzdem wurden im  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum Anteile des Monophosphats festgestellt. Durch eine RP-C18-Säulenchromatographie mit 0.05 M TEAB-Puffer konnten beide Verbindungen getrennt werden.



**Abb. 108:** Kupplungsreaktion der Monophosphate **94** und **105**.

Das  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum zeigt die erwarteten Signale bei -2 ppm für das 2'-Phosphat (lila) und die Dubletts bei -11.5 ppm für das Diphosphatrückgrat (grün) (Abb. 109). Da kein weiteres Signal zu beobachten ist, kann ausgeschlossen werden, dass weiteres Monophosphat vorhanden ist. Anhand des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums kann zudem die Vollständigkeit der AB- und ACB-Masken bestätigt werden.



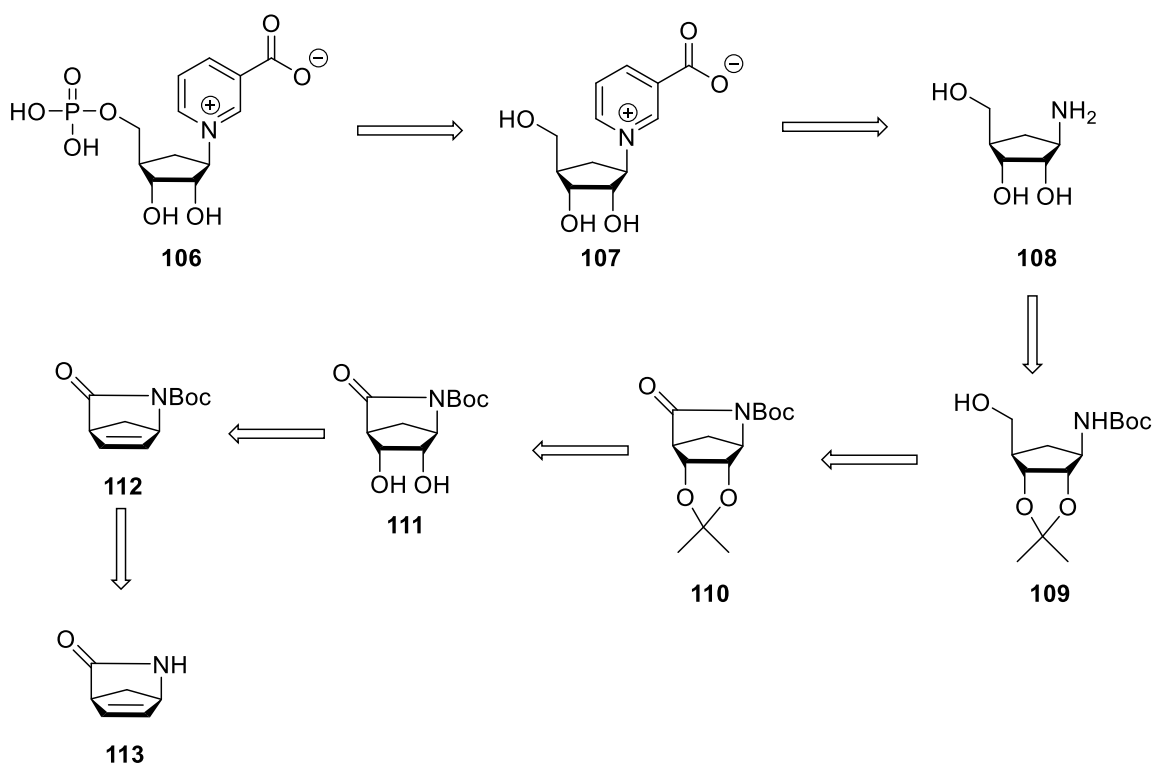
**Abb. 109:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum des Pyrophosphats **31** (243 MHz, 25 °C,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

Im Rahmen der Evaluierung der NADP-Referenzsubstanzen wurde die Verbindung **31** als geeignet festgestellt und zur weiteren Untersuchung an die Arbeitsgruppe von GUSE gesendet.

## 6.6 Synthese eines carbocyclischen NAADP-Derivat

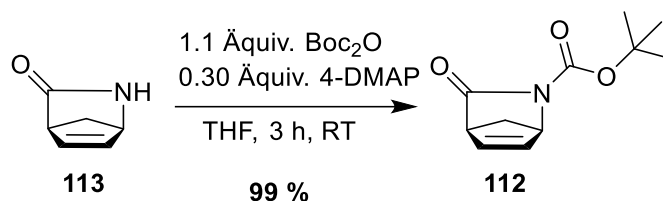
Eine weitere Idee ein NAADP-Derivat zu synthetisieren, welches dem nativen NAADP besonders ähnlich ist, sollte mit einem carbocyclischen Derivat realisiert werden, wobei eine positive Ladung im Nicotinsäure Baustein vorhanden ist. Die Idee zu einem carbocyclischen NAADP-Derivat entstand aus der Notwendigkeit, die glycosidische Bindung zu stabilisieren, da die *N*-glycosidische Bindung aufgrund des Acetalcharakters labiler gegenüber chemischen Reaktionen ist.<sup>[9]</sup> Da zunächst die *C*-glycosidischen Verbindungen synthetisiert wurden, sollte zudem die Alternative erforscht werden, die zwar das geladene Stickstoffatom enthält, die Bindung aber im Gegensatz zum nativen NAADP durch den Carbocyclus anstelle der Ribose im Nicotinsäurebaustein stabilisiert ist. Auf carbocyclische Strukturen basieren eine Vielzahl an Wirkstoffen wie zum Beispiel die antiviralen Wirkstoffe Abacavir und Carbovir.<sup>[149]</sup> Durch den Carbocyclus sind diese Analoga stabiler gegenüber enzymatischen Abbauprozessen und chemischen Reaktionen.<sup>[150]</sup>

Das Zielmolekül dieser Synthese ist der 5'-monophosphorylierte carbocyclische Nicotinsäurebaustein **106**. Dieser sollte aus einer YOSHIKAWA-Phosphorylierung des Nucleosids **107** synthetisiert werden. Durch eine ZINCKE-Reaktion sollte das Nucleosid **107** aus dem carbocyclischen Amin **108** und dem ZINCKE-Salz synthetisiert werden. Das Amin **108** sollte durch eine Entschützung mit Salzsäure entstehen, sodass es als Hydrochlorid vorliegt. Die Verbindung **109** sollte durch eine reduktive Ringöffnung mit Natriumborhydrid hergestellt werden. Die Hydroxygruppen sollten dafür zunächst durch eine Isopropylidengruppe geschützt werden. Die Hydroxygruppen der Verbindung **111** sollten durch eine UPJOHN-Dihydroxylierung addiert werden. Für eine bessere Handhabbarkeit sollte das Amin der Startverbindung **113** mit einer Boc-Gruppe geschützt werden.



**Abb. 110:** Darstellung der retrosynthetischen Analyse des carbocyclischen NAADP-Derivats **106**.

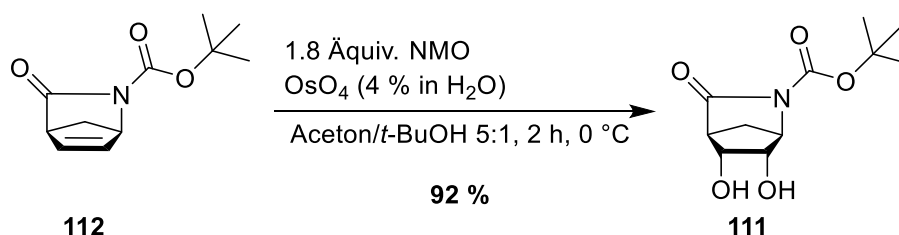
Im ersten Schritt der Synthese wird die sekundäre Aminofunktion mit einer (Boc)-Schutzgruppe geschützt (Abb. 111).



**Abb. 111:** Boc-Schützung der sekundären Aminfunktion des (-)-Vince-Lactams **113**.

Nach 3 Stunden Rühren bei Raumtemperatur konnte der vollständige Umsatz dünnschichtchromatographisch beobachtet werden. Nach einer säulenchromatographischen Reinigung wurde eine Ausbeute von 99 % erzielt.

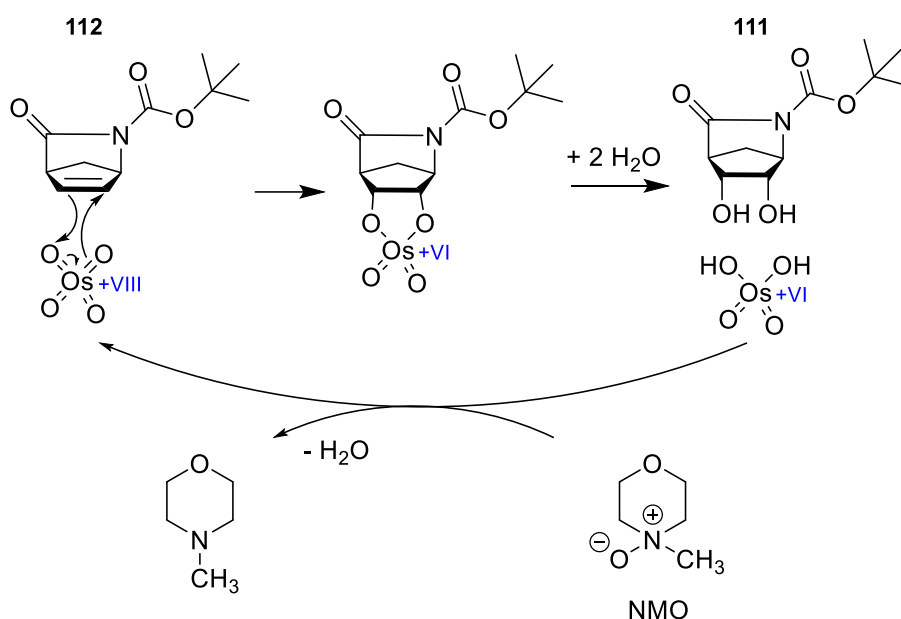
Die anschließende Dihydroxylierung wurde mit der UPJOHN-Methode durchgeführt (Abb. 112). Dabei wurde Osmium-(VIII)-oxid und *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid (NMO) eingesetzt.<sup>[151]</sup>



**Abb. 112:** UPJOHN-Dihydroxylierung der Verbindung **112**.

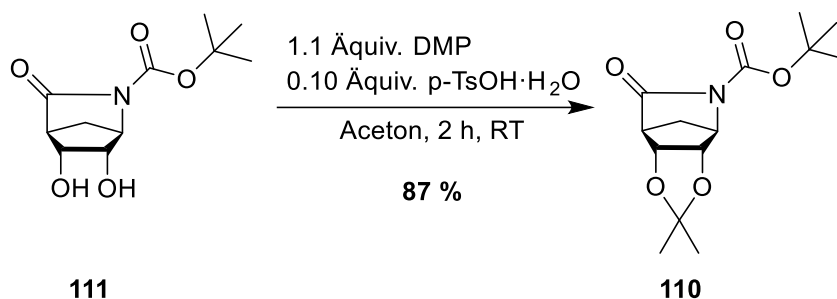
Nach mehreren Versuchen wurde festgestellt, dass es entscheidend ist, die Reaktionslösung mit einer Dinatriumdisulfit-Lösung zu beenden. Die Verwendung einer Natriumsulfid-Lösung, wie in zahlreichen Literaturquellen beschrieben, führte zu einem erheblichen Verlust der Ausbeute, sodass nur 10-17 % des Produkts erhalten blieben. Nebenprodukte bzw. Abbauprodukte konnten nicht isoliert und identifiziert werden, da sie sich vermutlich in der wässrigen Phase des Natriumsulfids befanden.<sup>[152]</sup>

Durch die UPJOHN-Dihydroxylierung können syn-selektiv 1,2-Diole aus Alkenen hergestellt werden. Die Reaktion beginnt mit einer 1,3-dipolaren Cycloaddition des OsO<sub>4</sub> an die Doppelbindung **112** (Abb. 113). Der entstandene fünfgliedrige Zyklus ist ein Diester der Osmium(VI)-säure, welcher durch das vorhandene Wasser hydrolysiert wird und das Produkt **111** freisetzt. Die entstandene Osmium(VI)-säure wird anschließend durch das NMO oxidiert und kann mit einem weiteren Alken reagieren.<sup>[153][154]</sup>



**Abb. 113:** Mechanismus der UPJOHN-Dihydroxylierung mit Osmiumtetroxid und NMO als Oxidationsreagenzien.<sup>[154]</sup>

Für die Schützung der vicinalen Hydroxygruppen wurden eine Isopropylidenschutzgruppe verwendet (Abb. 114). Die Reaktion bewirkt die Bildung eines thermodynamisch bevorzugten Fünfrings. Ein Vorteil der Verwendung einer Isopropylidenschutzgruppe ist die Spaltung durch Säure, so wie es auch bei der Boc-Schutzgruppe der Fall ist. Dadurch können beide Schutzgruppen in einem Schritt gespalten werden.



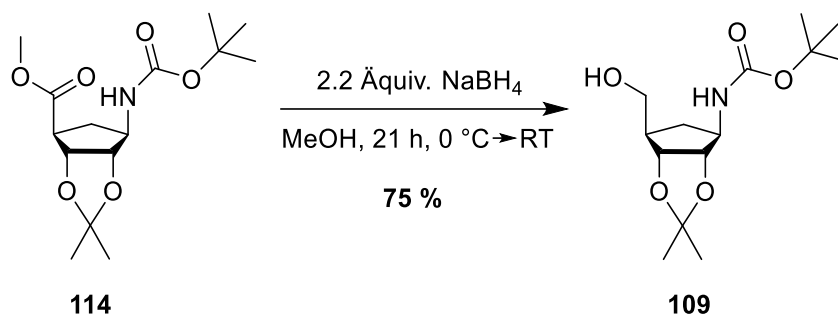
**Abb. 114:** Schützung der Hydroxygruppen mit einer Isopropylidengruppe.

Nach Beendigung der Reaktion und säulenchromatographischer Reinigung konnte das Produkt **110** in einer Ausbeute von 87 % erhalten werden.

Die Ringöffnung mittels Natriumborhydrid stellt den nächsten Schritt in der Synthese dar und sollte den 5'-Alkohol liefern.<sup>[155]</sup> Zunächst wurde jedoch neben dem Alkohol **109** auch der Ester **114** in erheblicher Menge erhalten (Abb. 115). Dieser konnte eindeutig durch ESI-MS- und <sup>1</sup>H-NMR-Spektren identifiziert werden. Zusätzlich zu dem berechneten Ionenpeak wurde auch ein Peak bei 653.3233 Da beobachtet. Dieser stimmt mit der exakten Masse



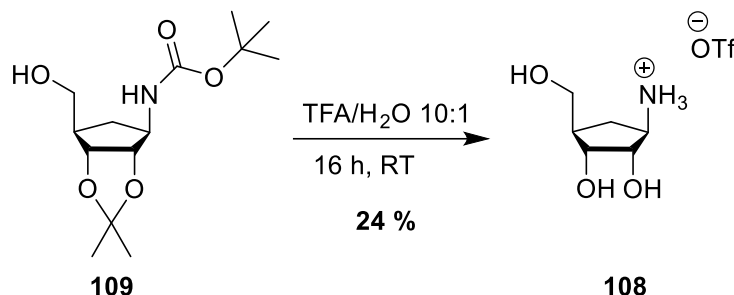
Der Ester **114** wurde anschließend wiederholt mit Natriumborhydrid umgesetzt (Abb. 117).



**Abb. 117:** Reduktion des Esters zum primären Alkohol **97** mit Natriumborhydrid.

Nach 21 Stunden Rühren bei Raumtemperatur konnte das Produkt **109** mit einer Ausbeute von 75 % erhalten werden. Es konnten jedoch auch 15 % des Esters **114** reisoliert werden. Auf einen Austausch des Lösungsmittels wurde verzichtet, da Methanol die Reaktivität des Natriumborhydrids erhöht und so die Reaktion ermöglicht.<sup>[157]</sup>

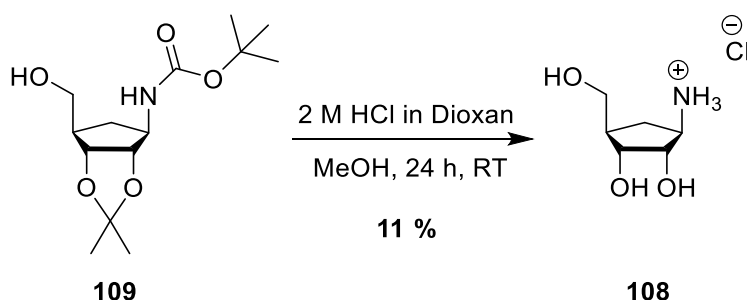
Die Isopropyliden- und Boc-Schutzgruppe wurden im nächsten Schritt durch die Zugabe von Trifluoressigsäure entfernt (Abb. 118).



**Abb. 118:** Entschützung der Verbindung **109** mit Trifluoressigsäure (TFA) und Wasser.

Nach Beendigung der Reaktion wurden alle flüchtigen Bestandteile entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit 1 M Natronlauge neutralisiert. Nach einer automatisierten RP-C18-Säulenchromatographie sowie einer Anionenaustauschsäule konnte nur ein stark mit Trifluoressigsäure verunreinigtes Produkt **108** erhalten werden. Da dieser Überschuss für die anschließende ZINCKE-Reaktion störend sein könnte, wurde das Produkt mehrfach mit einer RP-C8-Säulenchromatographie gereinigt und mittels <sup>19</sup>F-NMR-Spektroskopie auf Salze untersucht, sodass eine saubere Fraktion in einer Ausbeute von 24 % erhalten werden konnte.

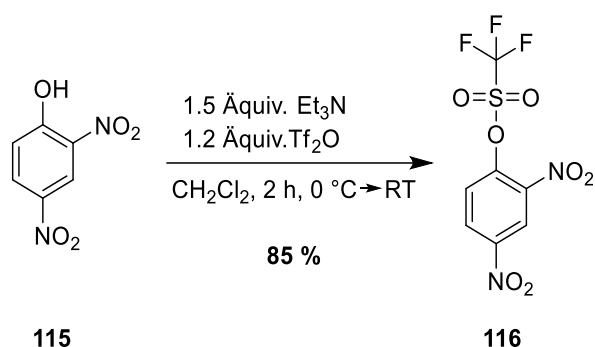
Eine Alternative wurde mit 2 M Salzsäure in Dioxan durchgeführt, wobei das Hydrochlorid **108** entsteht (Abb. 119).



**Abb. 119:** Spaltung der Schutzgruppen mit 2 M HCl in Dioxan.

Nach 24 Stunden wurde die Reaktion beendet und alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde zunächst mit einer RP-C8-Säulenchromatographie und anschließend durch eine Ionenaustauschsäule gereinigt, um überschüssige Salze zu entfernen. Ein Nachteil dieser Reaktion ist jedoch, dass es nicht möglich ist, die Chlorid-Ionen in NMR-Spektren zu identifizieren.

Für die anschließende ZINCKE-Reaktion wurde zunächst das ZINCKE-Salz hergestellt (Abb. 120). Dafür wurde 2,4-Dinitrophenol **115** mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid ( $\text{ Tf}_2\text{O}$ ) aktiviert.<sup>[9]</sup>

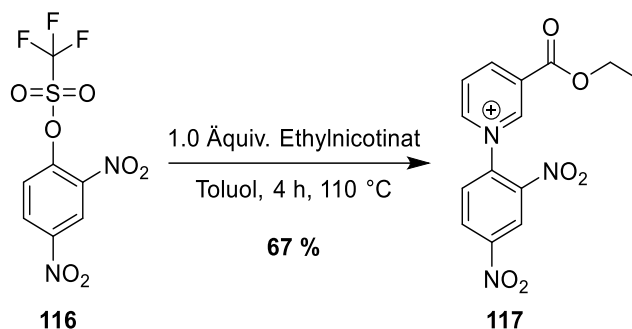


**Abb. 120:** Aktivierung des 2,4-Dinitrophenols **115** zur Bildung des ZINCKE-Salzes.

Die Einführung der sehr guten Triflat-Abgangsgruppe wurde unter basischen Bedingungen durchgeführt. Nach einer säulenchromatographischen Reinigung konnte das Produkt **116** in einer Ausbeute von 85 % erhalten werden. Das Produkt **116** konnte zum einen über das Massenspektrum identifiziert werden. Zum anderen wurde im  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum das zu erwartende Signal für das Triflat bei -72 ppm beobachtet.

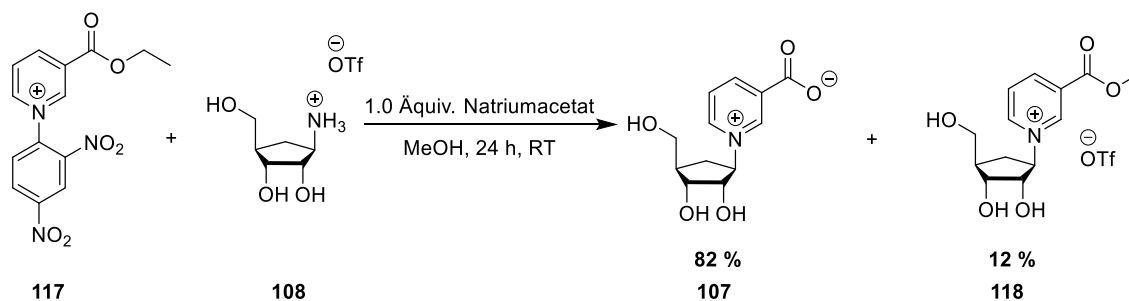
Die anschließende Kupplung des Ethylnicotinats mit 2,4-Dinitrophenyltrifluormethansulfonat **116** wurde unter Siedehitze in Toluol durchgeführt (Abb. 121). Die Färbung der Reaktionslösung deutete auf die Bildung des ZINCKE-Salzes hin. Mechanistisch erfolgt die Bildung

des ZINCKE-Salzes durch eine aromatische nucleophile Substitution am Stickstoff des Ethylnicotinats.<sup>[158]</sup> Da durch die stark elektronenziehenden Substituenten der nitrierte Aromat sehr elektronarm ist und die Triflatgruppe eine gute Abgangsgruppe darstellt, ist diese Reaktion sehr begünstigt.



**Abb. 121:** Bildung des ZINCKE-Salzes **117** aus dem Ethylnicotinat und dem aktivierten 2,4-Dinitrophenyl-trifluormethanolsulfonats **116**.

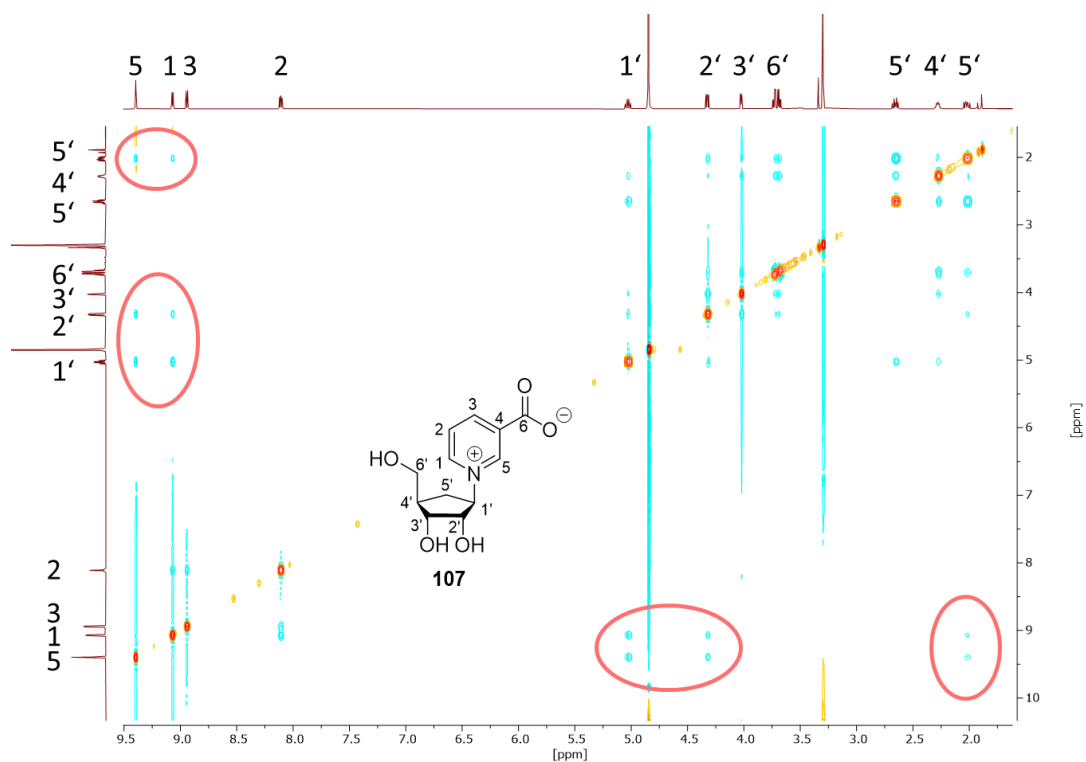
Das ZINCKE-Salz **116** wurde anschließend mit dem carbocyclischen Amin **108** in einer ZINCKE-Reaktion umgesetzt (Abb. 122).<sup>[158]</sup>



**Abb. 122:** ZINCKE-Reaktion zur Bildung der Verbindung **107** und **118**.

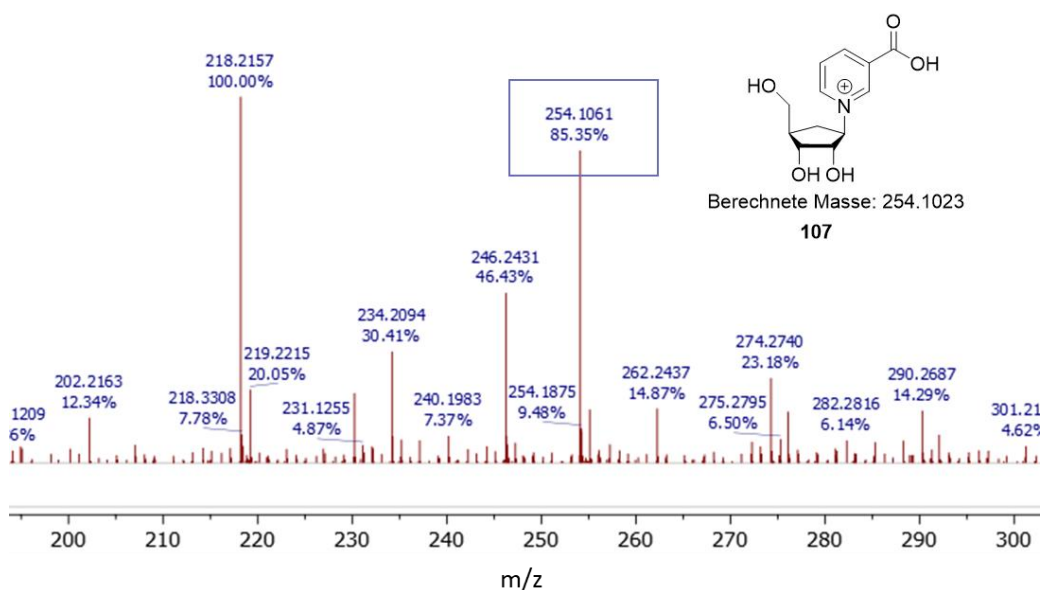
Das ZINCKE-Salz **117** und das Amin **108** wurden in Methanol gel\u00f6st und mit Natriumacetat versetzt, wodurch sich die Reaktionsl\u00f6sung r\u00f6tlich f\u00e4rbte. Nach 24 Stunden wurde die Reaktion beendet und eine 25%ige Ammoniakl\u00f6sung zugegeben. Die L\u00f6sung wurde 10 Minuten lang ger\u00fchrt und die Bildung eines Niederschlags konnte beobachtet werden, bei dem es sich vermutlich um das Dinitroanilin handelte. Dieser wurde abgetrennt und das L\u00f6sungsmittel entfernt. Der erwartete Ethylester konnte nicht erhalten werden, jedoch wurden die Nicotins\u00e4ure **107** in einer Ausbeute von 82 % und der Methylester **118** in einer Ausbeute von 12 % identifiziert. Es wird vermutet, dass w\u00e4hrend der w\u00e4ssrigen basischen Aufarbeitung der Reaktionsl\u00f6sung eine Umesterung mit Methanol sowie eine Verseifung stattgefunden hat.

Die erfolgreiche Kupplung beider Bausteine kann sehr gut im NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*)-Spektrum beobachtet werden (Abb. 123). Dabei wurden die räumlichen Kopplungen zwischen den aromatischen Protonen und denen des Carbocyclus eindeutig identifiziert.



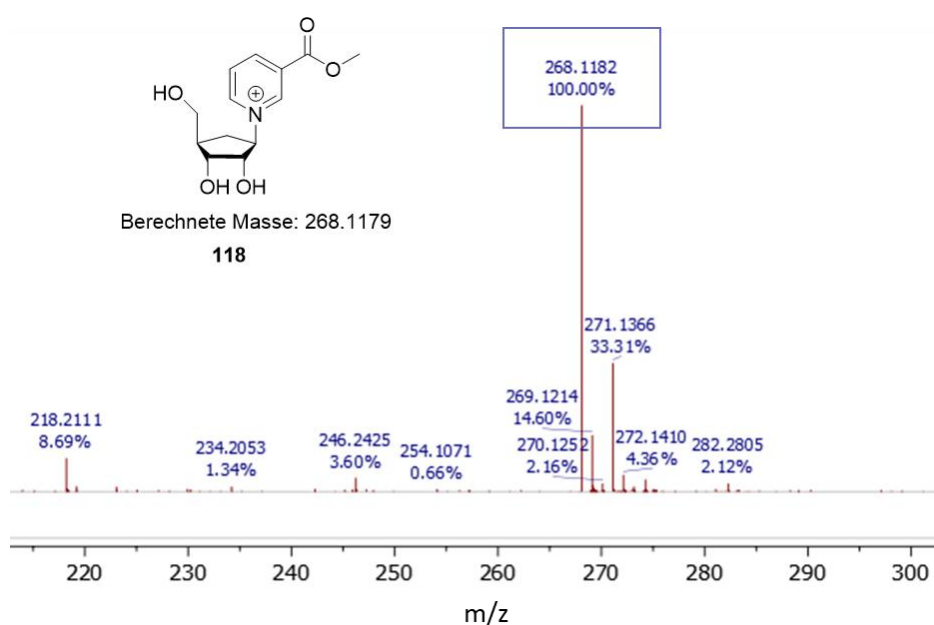
**Abb. 123:** Ausschnitt des NOESY-NMR-Spektrums der Verbindung **107**. Die Kupplungen der aromatischen Ringprotonen zu denen des Carbocyclus sind eindeutig zu beobachten (rot) (600 MHz, 25 °C, DMSO-*d*<sub>6</sub>).

Neben der eindeutigen Identifizierung der Protonen im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum konnte im HR-ESI-MS zunächst eindeutig der Nicotinsäurebaustein **107** nachgewiesen werden (Abb. 124).



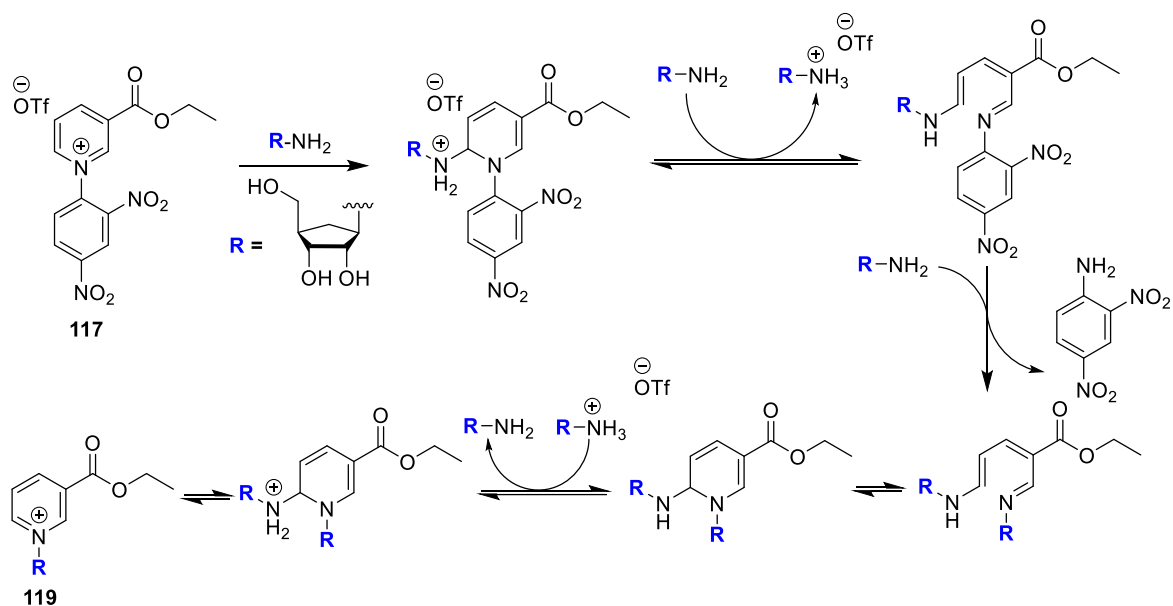
**Abb. 124:** HR-ESI-MS-Spektrum der Verbindung **107**. Gemessen im positiven Modus.

Neben der Nicotinsäure **107** konnte auch der Methylester **118** zum einen über die Methylgruppe des Esters im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sowie über das HR-ESI-MS-Spektrum eindeutig identifiziert werden (Abb. 125).



**Abb. 125:** HR-ESI-MS-Spektrum der Verbindung **118**. Gemessen im positiven Messmodus.

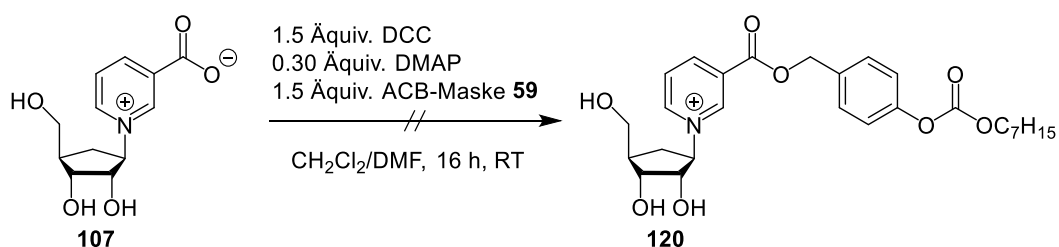
Die ZINCKE-Reaktion folgt einem SN(ANRORC)-Mechanismus (**A**ddition of the **N**ucleophile, **R**ing **O**pening and **R**ing **C**losure in nucleophilic attack on ring system), der aus drei Teilschritten besteht (Abb. 126).<sup>[159]</sup>



**Abb. 126:** Vorgeschlagener Mechanismus der ZINCKE-Reaktion.<sup>[158][160]</sup>

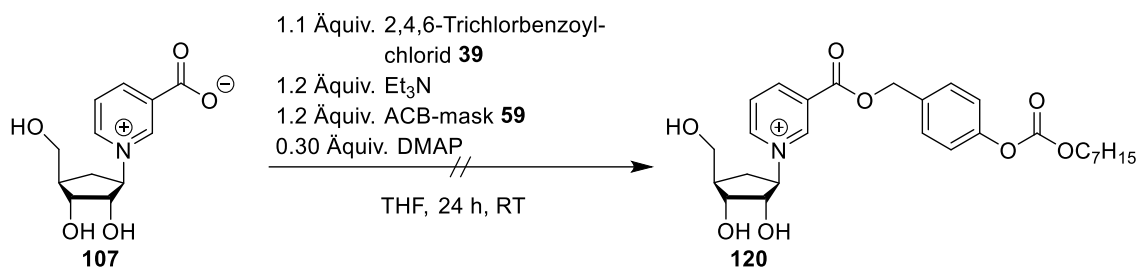
Zunächst führt der nucleophile Angriff des Amins zur Ringöffnung des Pyridiniumrings. Ein weiteres Amin verdrängt durch einen nucleophilen Angriff das 2,4-Dinitroanilin und es entsteht das *trans-cis*-Isomer (Dianilsalz), welches durch eine sigmatrope Umlagerung einen Ringschluss bilden kann. Zuletzt wird durch die Spaltung der Aminogruppe der Pyridinring rearomatisiert und das Pyridiniumsalz gebildet.<sup>[161]</sup>

Die Schützung der Carbonsäure **107** mit einer ACB-Maske **59** wurde zuvor von DEKIERT über eine Veresterung versucht. Dabei wurde die Carbonsäure zunächst mit einer Trichloracetamidat-Abgangsgruppe versehen, damit daraufhin eine synergistische säurekatalysierte Veresterung durchgeführt werden konnte. Da durch diese Methode nur eine Ausbeute von 3 % erreicht werden konnte, wurden weitere Veresterungsmethoden erprobt. Zunächst wurde eine STEGLICH-Veresterung durchgeführt.



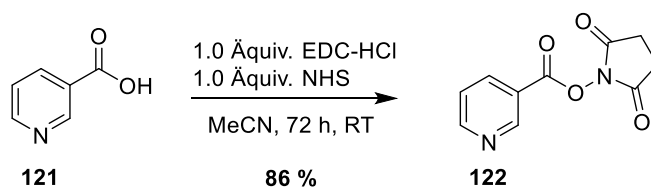
**Abb. 127:** STEGLICH-Veresterung des Nucleosids **107**.

Auch nach 16 Stunden Rühren bei Raumtemperatur konnte dünn-schichtchromatographisch kein Umsatz beobachtet werden. Auch durch die zuvor erfolgreich angewendete YAMAGUCHI-Veresterung konnte das Produkt **120** nicht erhalten werden.



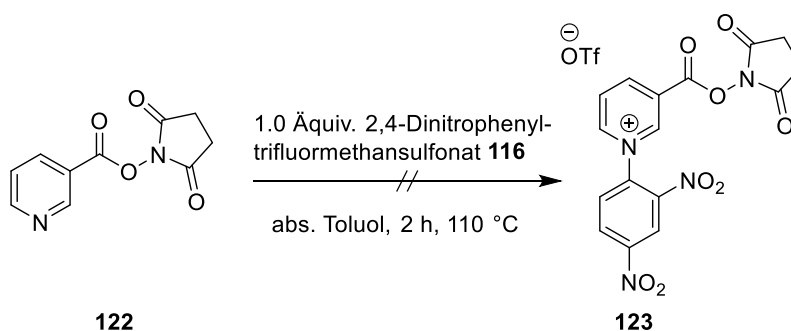
**Abb. 128:** Synthese der maskierten Verbindung **120** mittels YAMAGUCHI-Veresterung.

Das Edukt **107** konnte in beiden Fällen reisoliert werden, sodass vermutet wird, dass der zwitterionische Charakter der Nicotinsäure eine Veresterung verhinderte. Daher wurde in einem weiteren Ansatz versucht, die Carboxylgruppe vor der ZINCKE-Reaktion durch die Bildung eines *N*-Hydrosuccinimid-Esters (NHS-Ester) zu aktivieren. Dafür wurde zunächst die Nicotinsäure **121** mit dem Aktivierungsreagenz 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und *N*-Hydrosuccinimid umgesetzt.<sup>[162]</sup>



**Abb. 129:** Veresterung der Nicotinsäure **121** mittels EDC-HCl und *N*-Hydrosuccinimid.

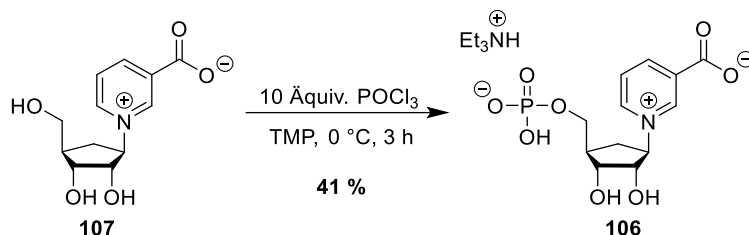
Nach 72 Stunden Rühren bei Raumtemperatur konnte der NHS-Ester **122** in einer Ausbeute von 86 % erhalten werden. Anschließend sollte das für die ZINCKE-Reaktion benötigte ZINCKE-Salz **122** gebildet werden.



**Abb. 130:** Bildung des NHS-ZINCKE-Salzes **123**.

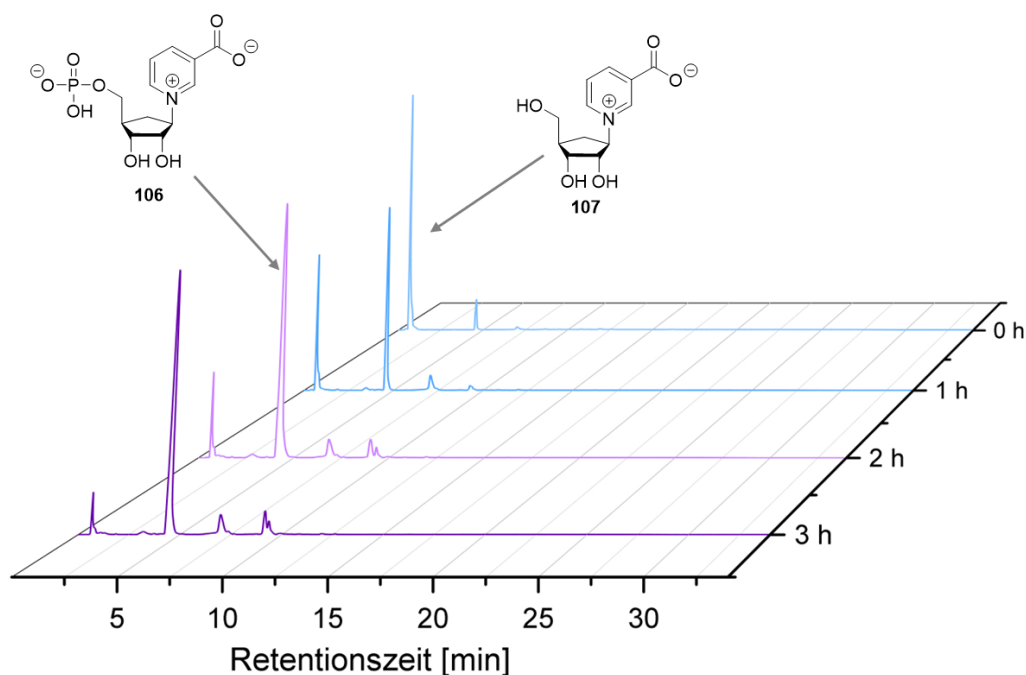
Der NHS-Ester der Nicotinsäure **122** wurde zusammen mit 2,4-Dinitrophenyltrifluormethansulfonat **116** in Toluol gelöst und für 2 Stunden bei 110 °C gerührt. Anschließend konnte dünnschichtchromatographisch der vollständige Umsatz der Unterschusskomponente

beobachtet werden. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels konnte jedoch kein Produkt erhalten werden. Es wird zwar vermutet, dass der NHS-Ester gespalten wurde, jedoch konnte auch keine Nicotinsäureverbindung isoliert werden. Aufgrund der Schwierigkeit, die Maske an die Nicotinsäure zu koppeln, wurde das unmaskierte Nukleosid **107** monophosphoryliert. Die daraus resultierende Abnahme der Lipophilie könnte durch eine Verlängerung der Alkylketten der Maskierungen des Adenosinbausteins ausgeglichen werden.



**Abb. 131:** YOSHIKAWA-Phosphorylierung der 5'-Position der carbocyclischen Nicotinsäureverbindung **107**.

Die Carbocyclusverbindung **107** kann bei einer Retentionszeit von 0.6 Minuten beobachtet werden (Abb. 132). Nach einer Reaktionszeit von einer Stunde zeigt sich ein zusätzlicher Peak bei 4.5 Minuten.



**Abb. 132:** Reaktionsverfolgung der 5'-Phosphorylierung der Verbindung **107** mittels HPLC.

Gleichzeitig wird beobachtet, dass der Peak bei 0.6 Minuten über einen Zeitraum von drei Stunden eine kontinuierliche Intensitätsabnahme aufweist. Nach Ablauf von drei Stunden wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1 M TEAB-Puffer beendet.

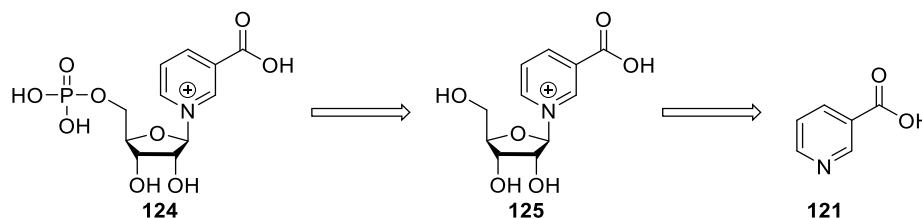
Das Rohprodukt wurde durch eine automatisierte RP-C18-Säulenchromatographie gereinigt.

Zukünftig kann die Kupplung dieses Bausteins an Adenosin-Derivaten erprobt werden. Aufgrund der fehlenden Maskierung der Carbonsäure sind Derivate erforderlich, die durch die Einführung längerer Alkylketten eine erhöhte Lipophilie aufweisen.

### 6.7 Synthese eines Nicotinsäure-Mononucleotids

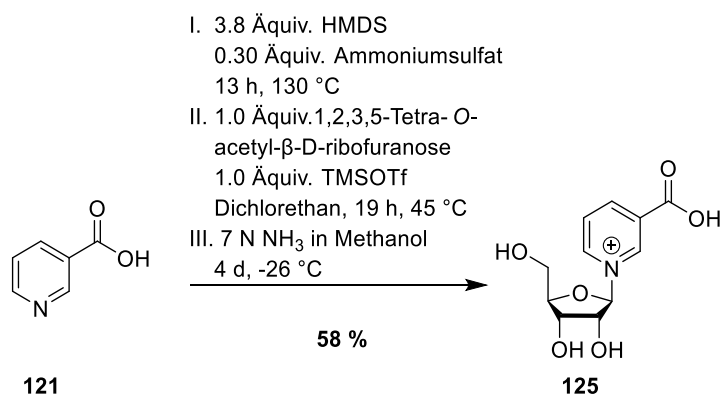
Neben dem carbocyclischen Nucleotid **106** sollte auch ein 'natives' NAADP-Derivat **124** erforscht werden. Dafür wurde auf die Struktur zurückgegriffen, die schon DEKIERT verwendet hat, um die Ähnlichkeit zu dem nativen NAADP zu behalten.<sup>[9]</sup>

Das Monophosphat **124** sollte durch eine YOSHIKAWA-Phosphorylierung aus dem Nucleosid **125** synthetisiert werden. Das Nucleosid **125** sollte durch eine Kupplung der Nicotinsäure **121** mit der 1,2,3,5-Tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranose hergestellt werden (Abb. 133). Sowohl die Nicotinsäure **121** als auch die tetraacetylierte Ribose sind kommerziell erhältlich.



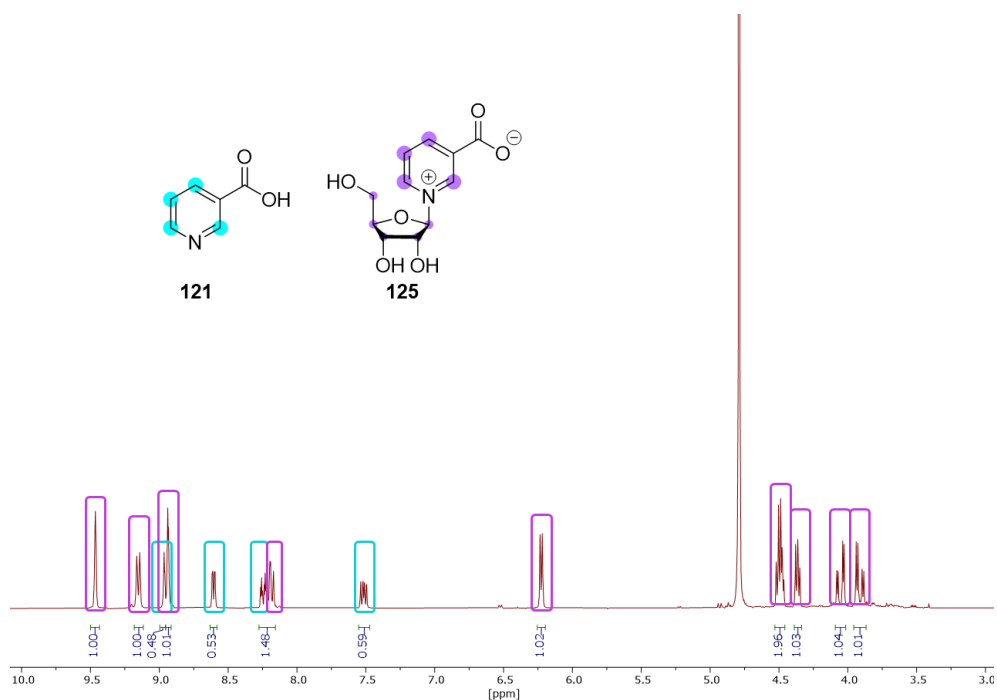
**Abb. 133:** Retrosynthetische Analyse der Synthese des Monophosphats **124**.

Der erste Schritt der Synthese beginnt mit der Aktivierung der Nicotinsäure **121**, die dafür in HMDS und Ammoniumsulfat 13 Stunden zum Sieden erhitzt wurde (Abb. 134). Anschließend wurde die tetraacetylierte Ribose zugegeben, und durch eine TMSOTf-katalysierte Kondensationsreaktion bildet sich das Produkt **125**.



**Abb. 134:** Synthese des Nucleosids **125**.<sup>[163]</sup>

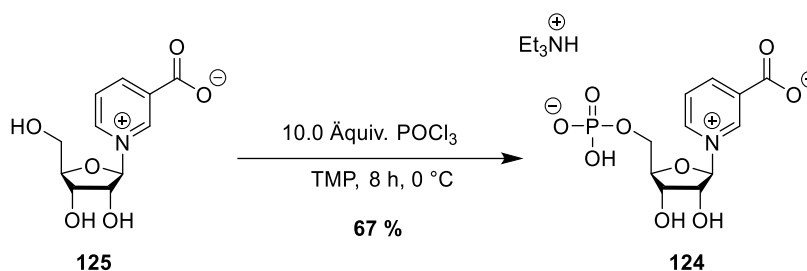
Nach 19 Stunden Rühren bei 45 °C wurde die Reaktionslösung durch die Zugabe einer wässrigen, gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung beendet und die wässrige Phase mit Dichlormethan gewaschen. Anschließend wurde die wässrige Phase lyophilisiert und in ein Druckgefäß überführt. Das Gefäß wurde auf -70 °C gekühlt und es wurde 7 N Ammoniak in Methanol zugegeben, um die Acetylschutzgruppen zu spalten. Das Gefäß wurde für 4 Tage bei -26 °C gelagert. Der entstandene Feststoff wurde filtriert und gewaschen. Anschließend wurde das Rohprodukt über eine RP-C18-Säulenchromatographie gereinigt. Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum konnte neben dem Produkt **125** auch noch weitere aromatische Signale beobachten werden, die vermutlich auf die verbleibende Nicotinsäure **121** hindeuten (Abb. 124).



**Abb. 135:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des Nucleosids **125** sowie des Edukts Nicotinsäure **121** (400 MHz, 25 °C, D<sub>2</sub>O).

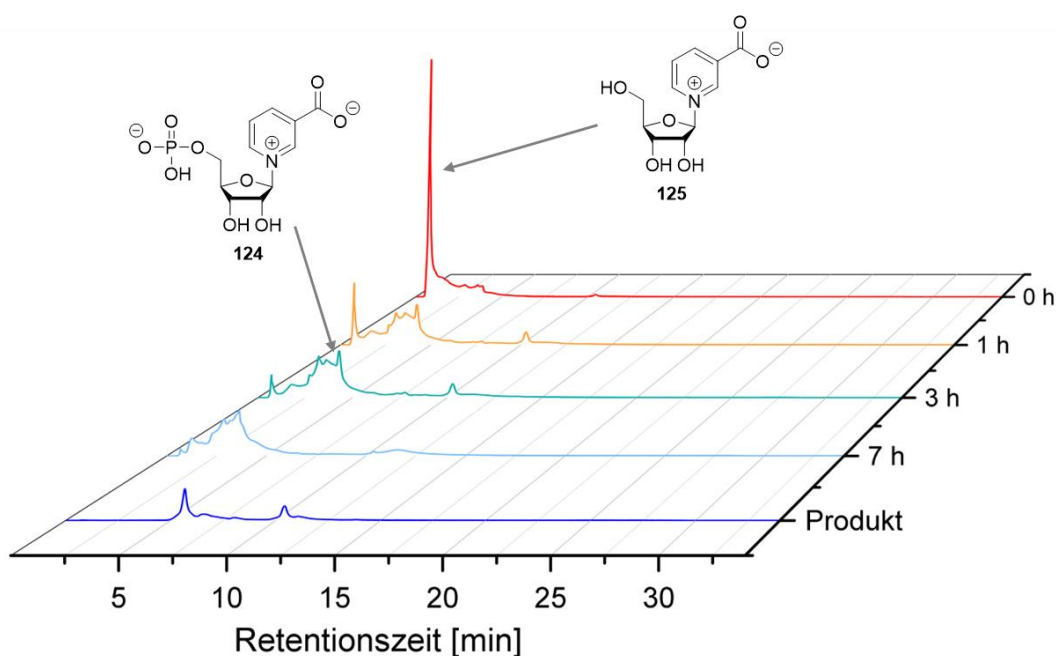
Es wurde eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt und es konnten Verbindungen isoliert werden. Die Zielverbindung **125** wurde in einer Ausbeute von 58 % isoliert.

In einer YOSHIKAWA-Phosphorylierung wurde die 5'-Position anschließend phosphoryliert.<sup>[115]</sup> Dabei wurde das Nucleosid **125** in TMP suspendiert und langsam bei 0 °C Phosphorylchlorid zugetropft, wobei sich das Nucleosid **125** langsam löste (Abb. 136).



**Abb. 136:** YOSHIKAWA-Phosphorylierung zur Synthese der Verbindung **124**.

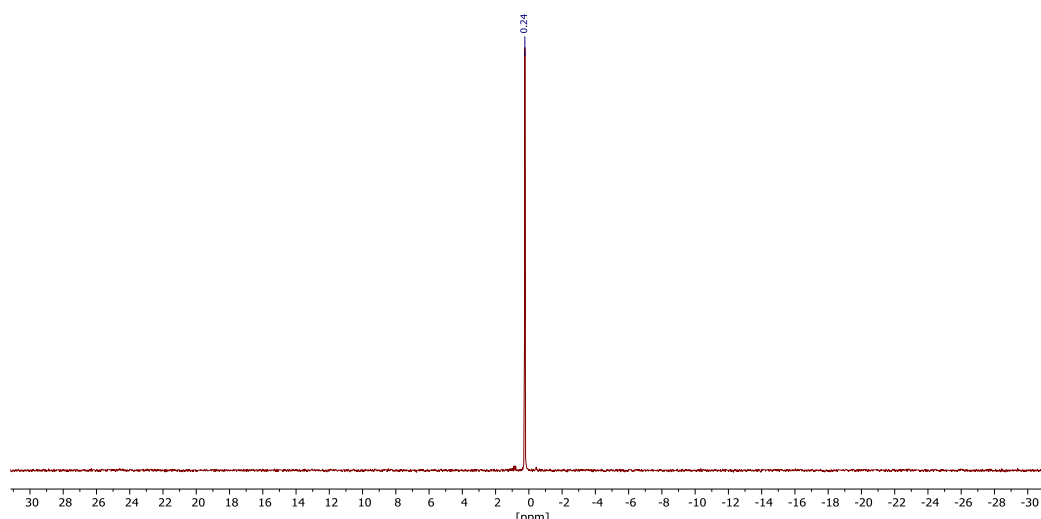
Der Reaktionsverlauf wurde mithilfe der HPLC überwacht, wobei mehrere Peaks zu beobachten waren (Abb. 137). Das Edukt **125** zeigt einen deutlichen Peak bei 0.9 Minuten und wird im Verlauf von 7 Stunden nahezu vollständig umgesetzt, sodass es kaum noch nachweisbar ist.



**Abb. 137:** Reaktionsverfolgung mittels HPLC der YOSHIKAWA-Reaktion.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 M TEAB-Puffer beendet und das Rohprodukt wurde mittels RP-C18-Säulenchromatographie gereinigt. Da das erhaltene Mono-

phosphat **124** sehr polar ist, zeigte es nur eine schlechte Retention auf C18-Kieselgel. Daher wurde eine Ionenaustauschchromatographie durchgeführt, bei der die Triethylammonium-Gegenionen mit Protonen ausgetauscht werden sollten. Trotz einer deutlichen Verringerung der Anzahl an Ionen konnte im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum noch ein Überschuss an Triethylammonium nachgewiesen werden, sodass eine weitere Ionenaustauschchromatographie durchgeführt wurde, die das gewünschte Produkt **124** in einer Ausbeute von 67 % lieferte. Das  $^{31}\text{P-NMR}$ -Spektrum zeigt ein Signal bei 0.24 ppm, ohne Anzeichen weiterer Signale, die auf Diphosphate hindeuten könnten (Abb. 138).



**Abb. 138:**  $^{31}\text{P-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **124** (122 MHz, 25 °C,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

Zukünftig kann die Kupplung des erhaltenen Monophosphats **124** in einer Kupplungsreaktion, die schon zuvor mit anderen Monophosphaten durchgeführt, mit einem 3'-OMe- $\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ -Adenosin-Derivat erprobt werden.

Die Kupplung soll zukünftig mit einem Adenosin-Derivat durchgeführt werden, welches zwei  $\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ -AB-Alkylketten trägt, welche die fehlende Maske des oberen Bausteins im Hinblick auf die Lipophilie ausgleichen sollen. Da eine längere Kettenlänge auch eine Erhöhung der Halbwertszeit der enzymatischen Spaltung bedeutet, könnten zukünftige Kupplungspartner Bausteine mit Photogruppen sein, die unabhängig mit einem Laser die Spaltung der Masken induzieren.<sup>[8]</sup>

## 6.8 Fazit

Zusammenfassend wurden zwei bioreversibel geschützte NAADP-Analoga sowie drei NADP-Referenzsubstanzen synthetisiert. Dazu wurden Stabilitäts- und Enzymhydrolysestudien durchgeführt, die neben einer ausreichenden Stabilität auch eine verlässliche und schnelle Spaltung der Schutzgruppen zeigten. Das Thiazol-AB-NAADP-Derivat **27** wurde in 11 Syntheseschritten mit einer Gesamtausbeute von 4 % hergestellt. Die Synthese der Amino-AB-Schutzgruppe **52** für die NAADP-Referenzverbindung **27** führte aufgrund einer Esterspaltung der Alkylkette nicht zum gewünschten Produkt, sodass für weitere Reaktionen auf die ACB-Schutzgruppe zurückgegriffen wurde (Kapitel 6.2.1).

Mit der ACB-Schutzgruppe **59** konnte das Thiazol-ACB-NAADP-Derivat **60** mit einer Gesamtausbeute von 14 % synthetisiert werden. In Hydrolysestudien wurde die chemische sowie enzymatische Stabilität untersucht, wobei gezeigt wurde, dass das NAADP-Derivat **60** eine gute chemische Stabilität mit einer Halbwertszeit von  $t_{1/2} = 22$  Stunden aufweist. Die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgt jedoch innerhalb kurzer Zeit ( $t_{1/2} = 62$  Minuten) und das aktive Molekül wird freigesetzt (Kapitel 6.3). Das Thiazol-ACB-NADP-Derivat **64** wurde ebenfalls in 11 Syntheseschritten mit einer Gesamtausbeute von 14 % dargestellt und zeigte ähnliche Ergebnisse bezüglich der chemischen und enzymatischen Stabilität (Kapitel 6.3.1) (Tab. 1). Die Untersuchungen der calciumfreisetzenden Eigenschaften zeigten, dass nur eine schwache, nicht signifikante  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung initiiert wird. Die Inkubation von Jurkat T-Lymphozyten mit dem Derivat **60** sowie die anschließende Stimulation mit OKT3 zur Calciumfreisetzung lassen in ersten Tests die Vermutung zu, dass das Thiazol-Derivat **60** eine antagonistische Wirkung aufweist. Eine mögliche pharmazeutische Relevanz wird im Rahmen des SFB1328 zukünftig untersucht.

Darüber hinaus wurde das Pyridin-NAADP-Derivat **68** in 12 Syntheseschritten mit einer Gesamtausbeute von 6 % synthetisiert (Kapitel 6.4). Das analoge NADP-Derivat **88** konnte ebenfalls in 12 Schritten mit einer Gesamtausbeute von 5 % hergestellt werden (Kapitel 6.4.1). In Hydrolysestudien konnte für beide Derivate die chemische Stabilität sowie die enzymatische Spaltung aller Schutzgruppen bewiesen werden. Durch die signifikante Änderung der Anzahl der Peaks **B** sowie der Vergrößerung der Fläche unter den Kurven **D** die calciumfreisetzende Wirkung des 5-Pyridin-Derivats **68** beobachtet werden (Abb.98).

**Tab. 1:** Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) der Thiazol-Derivate **60** und **64** und der 5-Pyridin-Derivate **68** und **88** inkubiert in PBS- oder PLE-Lösung.

	$t_{1/2}$ (PBS)	$t_{1/2}$ (PLE)
<b>Thiazol-3'-OMe-NAADP-Derivat 60</b>	22 h	62.0 min
<b>Thiazol-3'-OMe-NADP-Derivat 64</b>	29 h	15.3 min
<b>5-Pyridin-3'-OMe-NAADP-Derivat 68</b>	1.1 h	5.8 min
<b>5-Pyridin-3'-OMe-NADP-Derivat 88</b>	2.8 h	5.1 min

Weitere Derivate, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden, sind das 3'-F-MASTER-NADP-Derivat, welches als Referenzsubstanz im Arbeitskreis GUSE getestet wird und die Monophosphate des carbocyclischen NAADP- **106** sowie des 'natives' NAADP-Derivats **124**, die aus zeitlichen Gründen nicht mit den jeweiligen Adenosinbausteinen gekoppelt werden konnten. Die Monophosphate **106** und **124** sind jedoch gute Anwärter für die Erprobung der Kupplung mit Adenosin-Bausteinen, die entweder AB-Schutzgruppen oder Photogruppen mit längerer Alkylkette zur Verbesserung der Lipophilie besitzen.

## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Edukte und Reagenzien

Sämtliche Edukte und Reagenzien wurden vom Hersteller in Synthesequalität bezogen und ohne weitere Reinigung für die Synthese verwendet.

#### Lösungsmittel

**Acetonitril:**  $\text{CH}_3\text{CN}$  [41.05 g/mol]; Sdp.: 82 °C;  $\rho = 0.78 \text{ g/cm}^3$

- 1) HiPerSolv CHROMANORM® gradient grade for HPLC (VWR 83639.320-2.5L)
- 2) absolut; aus der Lösungsmittel-Trocknungsanlage MB SPS-800 der Firma MBraun erhalten und über Molsieb (0.4 nm) aufbewahrt
- 3) absolut über Molsieb, max. 0.005 %  $\text{H}_2\text{O}$  (Acros 326811000)

**Chloroform:**  $\text{CHCl}_3$  [119.38 g/mol]; Sdp.: 61 °C;  $\rho = 1.48 \text{ g/cm}^3$

- 1) AnalaR NORMAPUR grade stabilisiert mit 0.6 % Ethanol (VWR 22711.324)
- 2) Euroisotop (D007H 100 mL)

**Dichlormethan:**  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  [84.93 g/mol]; Sdp.: 40 °C;  $\rho = 1.3 \text{ g/cm}^3$

- 1) technische Qualität; bei Normaldruck destilliert
- 2) absolut; aus der Lösungsmittel-Trocknungsanlage MB SPS-800 der Firma MBraun erhalten und über Molsieb (0.4 nm) aufbewahrt

**DMF:**  $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}$  [73.10 g/mol]; Sdp.: 153 °C;  $\rho = 0.95 \text{ g/cm}^3$

- 1) absolut; über Molsieb, max. 0.005 %  $\text{H}_2\text{O}$  (Acros 10534341)

**DMSO:**  $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$  [78.13 g/mol]; Sdp.: 189 °C;  $\rho = 1.1 \text{ g/cm}^3$

- 1) absolut über Molsieb, max. 0.005 %  $\text{H}_2\text{O}$  (Acros 00002089)
- 2) Deutero (00905-10 mL-s)

**Ethylacetat:** EtOAc [84.93 g/mol]; Sdp.: 77 °C;  $\rho = 0.89 \text{ g/cm}^3$  1) technische Qualität; bei Normaldruck destilliert

**Methanol:** CH<sub>3</sub>OH [32.04 g/mol]; Sdp.: 64 °C;  $\rho = 0.79 \text{ g/cm}^3$

1) technische Qualität; bei Normaldruck destilliert

2) absolut; aus der Lösungsmittel-Trocknungsanlage MB SPS-800 der Firma MBraun erhalten und über Molsieb (0.3 nm) aufbewahrt

3) absolut über Molsieb, max. 0.005 % H<sub>2</sub>O (Acros 00004595)

4) Euroisotop (D024FE)

**Petrolether:** Sdp.: 50 – 70 °C

1) technische Qualität; bei Normaldruck destilliert

**THF:** C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O [72.11 g/mol]; Sdp.: 66 °C;  $\rho = 0.89 \text{ g/cm}^3$

1) HiPerSolv CHROMANORM® gradient grade, for HPLC (VWR28559.320-2.5L)

2) absolut; aus der Lösungsmittel-Trocknungsanlage MB SPS-800 der Firma MBraun erhalten und über Molsieb (0.4 nm) aufbewahrt

**Triethylamin:** C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>N [101.19 g/mol]; Sdp.: 89 °C;  $\rho = 0.72 \text{ g/cm}^3$

1) mind. 99.5 %, zur Synthese (Roth X875.3-1.0L)

2) absolut mit Septum der Firma Aldrich (Al 471283)

**Pyridin:** C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N [79.10 g/mol]; Sdp.: 115 °C,  $\rho = 0.98 \text{ g/cm}^3$

1) absolut aus der Lösungsmittel Trocknungsanlage MB SPS 800 der Firma MBraun erhalten und über Molsieb (0.4 nm) aufbewahrt

2) absolut über Molsieb, max. 0.005 % H<sub>2</sub>O (Acros 364420010)

## 7.2 Chromatographie

### Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel und Fluoreszenzindikator beschichtete Aluminiumfolien (Macherey-Nagel ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254 Nr. 818333; Schichtdicke 0.2 mm) verwendet. Alle R<sub>F</sub>-Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt,

wobei die Laufstrecke 5 cm betrug. Die Detektion der UV-aktiven Verbindungen erfolgte mittels UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm. Als Färbereagens diente ein Gemisch aus 5 g Vanillin, 900 mL Methanol, 100 mL Essigsäure und 35 mL konz. Schwefelsäure. Hanessian-Stain: 5 g Ammoniummolybdat, 1 g Cer(IV)-sulfat, 10 mL konz. Schwefelsäure und 90 mL dest. Wasser.

### Säulenchromatographie

Für säulenchromatographische Trennungen wurde Kieselgel der Firma Macherey-Nagel (Kieselgel 60 M, 0.04-0.063 mm, 230-400 mesh) verwendet.

### Ionenaustauschchromatographie

Zum Austausch der Kationen wurde das Ionentauscherharz DOWEX 50W-X8, 50-100 mesh der Firma Sigma-Aldrich verwendet.

### Anionenaustauschchromatographie

Die Anionenaustauschchromatographie wurde mit DEAE Sephadex A-25 der Firma Cytiva durchgeführt.

### Automatisierte Normalphase- (NP-)/reversed phase-(RP-)Chromatographie

Für die automatisierte Chromatographie wurde sowohl für die Normal- als auch die Umkehrphasenchromatographie der automatisierte puriFlash®430 der Firma Interchim mit UV-Detektor verwendet. Für Normalphasentrennungen wurden *self-packed* Kartuschen eingesetzt, die mit Macherey-Nagel Kieselgel 60 M (siehe *Säulenchromatographie*) befüllt wurden. Für die RP-18-Chromatographie wurden Säulen von Macherey-Nagel (Chromabond® Flash RS 40 C18 ec oder C8 ec) verwendet.

### Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*) (HPLC)

Die analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde an einer Agilent Technologies Anlage, Modell 1260 Infinity II, durchgeführt.

Software: Agilent OpenLab CDS

Pumpe: 1260 Quat Pump VL

Autosampler: 1260 Vialsampler

Detektor: 1260, Dioden Array Detector (DAD)

1260 FLD Spectra, Fluoreszenz Detektor (FLD)

Analytische Säule: EC 125/3 Nukleodur 100-5 C18 ec der Firma Macherey-Nagel

Für alle HPLC-Anwendungen wurde Acetonitril des Reinheitsgrades "HPLC grade" der Firma VWR sowie Reinstwasser (Milli-Q) zum Ansetzen der Pufferlösungen verwendet.

### HPLC-Methoden:

Methode A: Von 0 min bis 20 min: TBAA-Laufpuffer (2 mM) mit einem Acetonitrilgradienten (5-80 %), von 20 min bis 30 min: isokratisch (20 % Laufpuffer, 80 % Acetonitril), von 30 min bis 33 min: Laufpuffer mit einem Acetonitrilgradienten (80-5 %), von 33 min bis 34 min: isokratisch (95 % Laufpuffer, 5 % Acetonitril). Flussrate: 1.0 mL/min, HPLC-Säule: Nukleodur 100-5 C18 ec, UV-Detektion bei Wellenlängen von 250 nm, 260 nm, 265 nm, 270 nm und 330 nm.

### HPLC-Laufpuffer:

TBAA-Laufpuffer (2 mM): 3000 mL Reinstwasser wurden mit 10.1 mL einer 1.5 M Lösung von Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid in Wasser (ca. 10 %) versetzt und mit verdünnter Essigsäure auf einen pH-Wert von 6.0 eingestellt.

### HPLC-gekoppelte Massenspektrometrie

LC-MS-Analysen wurden an einem Thermoquest 6224-TOF-LC/MSN Spektrometer der Marke Agilent Technologies und Bruker maXis ESI-Q-TOF, gekoppelt an einer Dionex Ultimate 3000 UPLC, durchgeführt. Als analytische Säule wurde eine Atlantis™ Premier BEH C18 AX VanGuard Fit Säule (2.1 x 150 mm, 2.5 µm) verwendet.

Für die LC-MS-Analyse wurde die Standardmethode verwendet mit isokratischem Verlauf von H<sub>2</sub>O/Acetonitril mit 0.1 % FA 95:5 zu 0:100 v/v.

## **7.3 Spektroskopie und Spektrometrie**

### Infrarotspektroskopie

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte mittels eines Bruker Alpha-P IR-Spektrometers bei Raumtemperatur in einem Messbereich von 400 – 4000 cm<sup>-1</sup>.

### Kernresonanzspektroskopie

Die NMR-Spektren wurden in den spektroskopischen Abteilungen des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg unter der Leitung von Dr. Thomas Hackl gemessen.

<sup>1</sup>H-NMR: Bruker Fourier 300 (300 MHz); Bruker AV 3400 (400 MHz); Bruker AV500 (500 MHz); Bruker AV3600 (600 MHz). Die Standardisierung erfolgte gegen DMSO-*d*<sub>6</sub> (δ = 2.50 ppm), MeOH-*d*<sub>4</sub> (δ = 4.87 ppm), CDCl<sub>3</sub> (δ = 7.26 ppm) und CH<sub>3</sub>CN-*d*<sub>3</sub> (δ = 2.13 ppm). Die Aufnahmen erfolgten von -4 bis 16 ppm.

<sup>13</sup>C-NMR: Bruker Fourier 300 (75 MHz), Bruker AV 400 (101 MHz), Bruker AV500 (125 MHz) Bruker AV3600 (150 MHz). Die Standardisierung erfolgte gegen DMSO-*d*<sub>6</sub> ( $\delta$  = 39.52 ppm), MeOH-*d*<sub>4</sub> ( $\delta$  = 49.00 ppm), CDCl<sub>3</sub> ( $\delta$  = 77.16 ppm). Die Aufnahmen erfolgten in einem Messbereich von -10 bis 200 ppm.

<sup>31</sup>P-NMR: Bruker AV 400 (162 MHz), Bruker AV500 (202 MHz) Bruker AV3600 (243 MHz). Die Aufnahmen erfolgten in einem Messbereich von -200 bis 300 ppm.

<sup>19</sup>F-NMR: Bruker AV3600 (565 MHz). Die Aufnahmen erfolgten in einem Messbereich von -300 bis 250 ppm.

### Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden in der massenspektrometrischen Abteilung des Fachbereichs Chemie unter der Leitung von Dr. Maria Riedner und Dr. Jennifer Menzel aufgenommen. Die ESI-Massenspektren wurden mit einem Thermoquest 6224-TOF-LC/MSN Spektrometer der Marke Agilent Technologies und einem Bruker maXis ESI-Q-TOF gekoppelt an eine Dionex Ultimate 3000 UPLC im Direkteinlass gemessen.

## 7.4 Weitere Geräte

### Gefriertrocknungsanlage

Wässrige Lösungen wurden mit einem Alpha 2-4 LDplus mit einem vertikalen Trockenrechen (121224) der Firma Christ lyophilisiert.

### Wasseraufbereitungsanlage

Reinstwasser (Milli-Q) wurde durch ein arium® pro UV-Reinstwassersystem der Firma Sartorius gewonnen.

## 7.5 Bioanalytische Methoden und Hydrolysestudien

### 7.5.1 Hydrolysestudien in PBS Puffer

Für die Studien zur Bestimmung der chemischen Stabilität der BisAB-TriPPPro-Verbindungen wurden die Diphosphate in PBS-Puffer (Dulbecco's *Phosphat Buffered Saline* der Firma Gibco) bei 37 °C inkubiert. Hierzu wurde zunächst eine 25 mM Stammlösung der Diphosphate in DMSO hergestellt. Anschließend wurde die Inkubationslösung mit einem finalen Volumen von 610  $\mu$ L (0.92 mM) hergestellt, indem 22.4  $\mu$ L der Stammlösung mit

305  $\mu\text{L}$  PBS-Puffer, 192.2  $\mu\text{L}$  Wasser und 90.6  $\mu\text{L}$  DMSO versetzt wurden. Die Inkubation erfolgte ohne internen Standard im Thermomixer. Zu entsprechenden Zeitpunkten wurden Aliquote von 35  $\mu\text{L}$  entnommen und mit einem Injektionsvolumen von 30  $\mu\text{L}$  mittels RP-HPL-Chromatographie analysiert (Methode A).

### 7.5.2 Hydrolysestudien in Zellextrakten

Für die Inkubation der Derivate wurde ein Reaktionsvolumen von 600  $\mu\text{L}$  mit einer Derivatkonzentration von 0.917 mM erstellt. Hierzu wurden 428.6  $\mu\text{L}$  des Zellextrakts, 150  $\mu\text{L}$  Wasser und 20.6  $\mu\text{L}$  der Derivat-Stammlösung (25 mM in DMSO) zusammengegeben und anschließend für 24 Stunden bei 37 °C im Thermomixer inkubiert.

Zur Analyse wurden zu entsprechenden Zeitpunkten Aliquote von 60  $\mu\text{L}$  abgenommen und mit 120  $\mu\text{L}$  gekühltem Methanol oder Acetonitril versetzt. Anschließend erfolgte eine zehnmütige Lagerung bei 0 °C, um die Fällung der unlöslichen Zellbestandteile zu vervollständigen. Die Suspension wurde zentrifugiert (16000 rpm, 4 °C, 10 min) und der erhaltene Überstand über einen Spritzenfilter (Chromafil RC-20/15 MS, 0.2  $\mu\text{m}$  der Firma Macherey-Nagel) filtriert. Die so erhaltene Lösung wurde mit einem Injektionsvolumen von 60  $\mu\text{L}$  mittels RP-HPL-Chromatographie (Methode A) analysiert.

### 7.5.3 Bestimmung der Hydrolysehalbwertszeit

Um die Hydrolysehalbwertszeiten zu bestimmen, wurden die Integrale der jeweiligen Signale, die mittels HPLC aufgenommen wurden, gegen die Dauer der Hydrolyse aufgetragen. Mithilfe des Kalkulationsprogramms OriginPro 2019 und unter der Annahme, dass die Reaktion einer Pseudo-Erster-Ordnung folgt, wurden exponentielle Ausgleichskurven ermittelt. Die Exponentialfunktion wird wie folgt beschrieben:

$$[A]_t = [A]_0 \cdot e^{-kt} \quad (\text{Gl.1})$$

$[A]_t$  = Konzentration zum Zeitpunkt t

$[A]_0$  = Anfangskonzentration

k = Geschwindigkeitskonstante

Mithilfe der bestimmten Konstante  $k$  kann mit folgender Formel die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  berechnet werden:

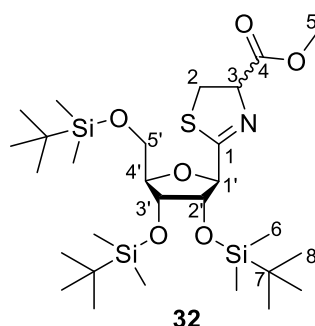
$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (\text{Gl.2})$$

## 7.6 Synthesen

### 7.6.1 Synthese des Thiazol-AB-NAADP-Derivats 27

#### 7.6.1.1 Synthese des Methyl-2-[2,3,5-tris-O-[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]- $\beta$ -D-ribofuranosyl]-4,5-dihydrothiazol-4-carboxylat 32

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 1.3 g (2.6 mmol, 1.0 Äquiv.) 2,3,5-Tri-O-[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]- $\beta$ -D-ribonitril in 50 mL abs. Methanol gelöst und 0.54 mL (3.9 mmol, 1.5 Äquiv.) abs. Triethylamin zugetropft. Anschließend wurden 0.67 g (3.9 mmol, 1.5 Äquiv.) L-Cysteinmethylester-Hydrochlorid zu der Lösung gegeben und für 17 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  aufgenommen. Die organische Phase wurde mit gesättigter wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung und gesättigter wässriger Natriumchloridlösung gewaschen und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 40:1 zu 10:1 v/v) gereinigt.



32

$\text{C}_{28}\text{H}_{57}\text{NO}_6\text{SSi}_3$   
620.0800 g/mol

**Ausbeute:** 0.80 g (1.3 mmol, 50 %) einer leicht gelblichen Flüssigkeit.

Es wurde ein Diastereomerenmisch erhalten. Aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnte ein Verhältnis von 1:0.8 bestimmt werden.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.4 (PE/EE 10:1 v/v).

**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 5.18 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 9.6$  Hz, 1H, 3), 5.12 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 9.9, 7.9$  Hz, 1H, 3 diast.), 4.47 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9, 4.2$  Hz, 2H, 1', 1' diast.), 4.22 (m, 2H, 2'), 4.14 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 7.0, 4.4$  Hz, 1H, 2' diast.), 4.07 - 4.02 (m, 2H, 3', 3' diast.), 3.87 (q,  $^3J_{\text{HH}} = 3.8$  Hz, 2H, 4', 4' diast.), 3.69 (s, 3H, 5), 3.67 (s, 3H, 5 diast.), 3.66 - 3.60 (m, 4H, 5', 5' diast.), 3.58 - 3.43 (m, 2H, 2), 0.98 - 0.74 (m, 50H, 8, 8 diast.), 0.26 - -0.16 (m, 33H, 6, 6 diast.).

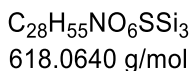
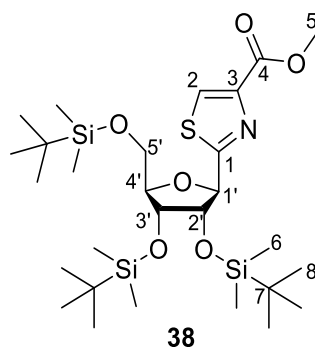
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 174.1, 173.8 (C-1), 170.6, 170.5 (C-4), 85.7, 85.4 (C-4'), 80.6, 80.5 (C-1'), 77.8, 77.5 (C-3), 75.9, 75.5 (C-2'), 73.0, 72.4 (C-3'), 63.0 (C-5'), 52.2 (C-5), 33.3, 33.1 (C-2), 25.9, 25.8, 25.7, 25.6, 25.5 (C-8), 18.0, 17.7, 17.6 (C-7), -4.1, -4.3, -4.6, -4.7, -4.8, -5.0, -5.2, -5.5, -5.6 (C-6).

**IR:** (Film) [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 2952, 2929, 2896, 2857, 1746, 1621, 1472, 1463, 1437, 1389, 1361, 1251, 1218, 1156, 1112, 1078, 1005, 965, 938, 874, 833, 774, 730, 671, 550, 500, 398.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{28}\text{H}_{58}\text{NO}_6\text{SSi}_3$  [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup> 620.3287, gefunden: 620.3408.

### 7.6.1.2 Synthese von Methyl-2-[2,3,5-tris-O-[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]- $\beta$ -D-ribofuranosyl]-4-thiazolcarboxylat **38**

Unter Stickstoffatmosphäre wurde 0.69 g (1.1 mmol, 1.0 Äquiv.) Methyl-2-[2,3,5-tris-O-[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]- $\beta$ -D-ribofuranosyl]-4,5-dihydrothiazol-4-carboxylat **32** in 40 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 0.33 mL (2.2 mmol, 2.0 Äquiv.) DBU und 0.12 mL (1.22 mmol, 1.1 Äquiv.) Bromtrichlormethan zugetropft und 14 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  aufgenommen. Die organische Phase wurde mit gesättigter wässriger Ammoniumchloridlösung und gesättigter wässriger Natriumchloridlösung gewaschen und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 9:1 v/v) gereinigt.



**Ausbeute:** 0.65 g (1.05 mmol, 95 %) einer gelblichen Flüssigkeit.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.47 (PE/EE 10:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.18 (s, 1H, 2), 5.22 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.9 Hz, 1H, 1'), 4.14 - 4.05 (m, 3H, 2', 3', 4'), 3.93 (s, 3H, 5), 3.81 - 3.72 (m, 2H, 5'), 0.92 (s, 27H, 8), 0.11, 0.08, 0.07, -0.09, -0.22 (s, 18H, 6).

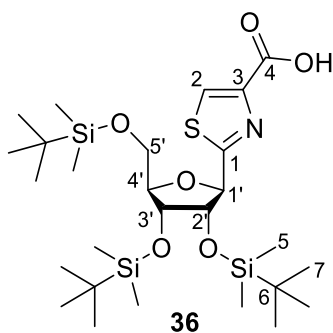
**<sup>13</sup>C-NMR:** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 172.8 (C-3), 162.1 (C-4), 146.6 (C-1), 128.1 (C-2), 86.7 (C-4'), 80.9 (C-1'), 79.4 (C-2'), 74.0 (C-3'), 63.5 (C-5'), 52.4 (C-5), 26.2 (C<sub>TBDMS</sub>-8), 25.9 (C<sub>TBDMS</sub>-8), 18.6 (C<sub>TBDMS</sub>-7), 18.2 (C<sub>TBDMS</sub>-7), 18.1 (C<sub>TBDMS</sub>-7), -4.3, -4.4, -4.5, -5.2, -5.4 (C<sub>TBDMS</sub>-6).

**IR:** (Film) [cm<sup>-1</sup>]: 2952, 2989, 2857, 1746, 1724, 1472, 1362, 1317, 1250, 1207, 1157, 1113, 994, 964, 938, 874, 834, 775, 670, 400.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>28</sub>H<sub>56</sub>NO<sub>6</sub>SSi<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 618.3131, gefunden: 618.3144.

### 7.6.1.3 Synthese von 2-[2,3,5-Tris-O-[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]-β-D-ribofuranosyl]-4-thiazolcarboxylsäure **36**

Es wurden 0.65 g (1.1 mmol, 1.0 Äquiv.) Methyl-2-[2,3,5-tris-O-[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]-β-D-ribofuranosyl]-4-thiazolcarboxylat **38** in 25 mL Methanol gelöst und 0.58 g (2.1 mmol, 4.0 Äquiv.) Kaliumcarbonat zugegeben. Nach Zugabe von 0.5 mL Wasser wurde die Lösung 24 Stunden bei Raumtemperatur und 5 Stunden bei 65 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde der pH-Wert mit halbkonzentrierter Essigsäure auf 6 eingestellt. Die flüchtigen Bestandteile wurden unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 3:1 v/v) gereinigt.



$C_{27}H_{53}NO_6SSi_3$   
604.0370 g/mol

**Ausbeute:** 0.50 g (0.53 mmol, 79 %) einer leicht gelblichen Flüssigkeit.

**R<sub>f</sub> -Wert:** 0.59 (PE/EE 3:1 v/v + 1 vol% Essigsäure).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.24 (s, 1H, 2), 5.14 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.6 Hz, 1H, 1'), 4.13 - 4.06 (m, 3H, 2', 3', 4'), 3.80 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.4 Hz, 1H, 5'), 3.75 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.0 Hz, 1H, 5''), 0.92 (s, 9H, 7), 0.92 (s, 9H, 7), 0.85 (s, 9H, 7), 0.11 (s, 6H, 5), 0.09 (s, 3H, 5), 0.08 (s, 3H, 5), -0.04 (s, 3H, 5), -0.23 (s, 3H, 5).

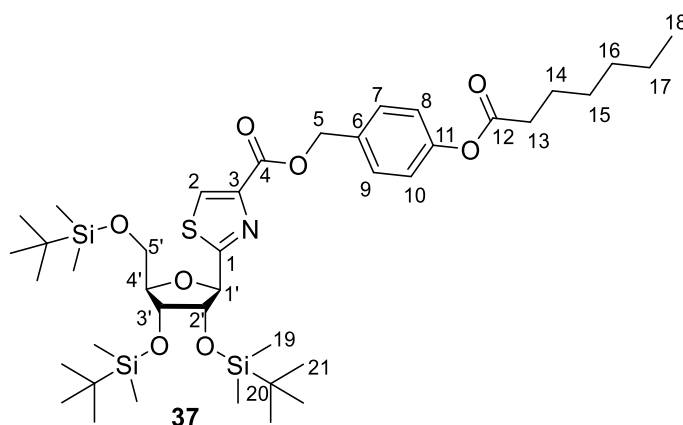
**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 173.1 (C-3), 145.8 (C-4), 127.8 (C-2), 86.8 (C-4'), 81.1 (C-1'), 79.3 (C-2'), 73.9 (C-3'), 63.4 (C-5'), 26.2 (C<sub>TBDMS</sub>-7), 26.0 (C<sub>TBDMS</sub>-7), 25.8 (C<sub>TBDMS</sub>-7), 18.6 (C<sub>q</sub>-6), 18.2 (C<sub>q</sub>-6), 18.1 (C<sub>q</sub>-6), -4.3 (C<sub>TBDMS</sub>-5), -5.2 (C<sub>TBDMS</sub>-5), -5.4 (C<sub>TBDMS</sub>-5).

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 2952, 2928, 2895, 2856, 1709, 1507, 1471, 1462, 1389, 1361, 1251, 1218, 1187, 1156, 1112, 1004, 964, 938, 872, 831, 773, 670, 587, 550, 493.

**HRMS-ESI:** (m/z) berechnet für C<sub>27</sub>H<sub>52</sub>NO<sub>6</sub>SSi<sub>3</sub> [M-H]<sup>-</sup> 602.2829, gefunden: 602.2631.

#### 7.6.1.4 Synthese von 2-(2,3,5-Tri-O-[tertbutyldimethylsilyl]-β-D-ribofuranosyl)-thiazol-4-carbonsäure-4-(heptanoyloxy)benzylester 37

Unter Stickstoffatmosphäre wurde 0.12 g (0.20 mmol, 1.0 Äquiv.) 2-[2,3,5-tris-O-[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]-β-D-ribofuranosyl]-4-thiazolcarboxylsäure **36** in 10 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und 0.062 g (0.30 mmol, 1.5 Äquiv.) DCC zugegeben. Anschließend wurde eine katalytische Menge 4-DMAP (0.007 g, 0.06 mmol, 0.3 Äquiv.) zugegeben und 4-(Hydroxymethyl)-phenylhexanoat (0.07 g, 0.3 mmol, 1.5 Äquiv.), gelöst in 3 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, zugetropft. Die Lösung wurde 21 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und nach Beendigung der Reaktion alle flüchtigen Bestandteile entfernt.



$C_{41}H_{71}NO_8SSi_3$   
822.3330 g/mol

**Ausbeute:** 0.023 g (0.028 mmol, 14 %) eines farblosen Öls.

**R<sub>f</sub> -Wert:** 0.42 (PE/EE 9:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.17 (s, 1H, 2), 7.48 – 7.44 (m, 2H, 7, 9), 7.09 - 7.06 (m, 2H, 8, 10) 5.42 (d, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 12.4 Hz, 1H, 5a), 5.31 (d, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 12.3 Hz, 1H, 5b), 5.21 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.0, 3.0 Hz, 1H, 1'), 4.12 - 4.09 (m, 2H, 2', 3'), 4.06 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.4 Hz, 1H, 4'), 3.79 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.1 Hz, 3.6 Hz, 1H, 5'a), 3.74 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.3 Hz, 1H, 5'b), 2.55 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.5 Hz, 2H, 13), 1.75 (m, 2H, 14), 1.44 - 1.38 (m, 2H, 15), 1.38 – 1.30 (m, 4H, 16, 17), 0.91 (s, 9H, 21), 0.91 (s, 9H, 21), 0.89 - 0.85 (m, 9H, 21), 0.83 (s, 3H, 18), 0.10 (s, 6H, 19), 0.08 (s, 3H, 19), 0.07 (s, 3H, 19), -0.08 (s, 3H, 19), -0.20 (s, 3H, 19).

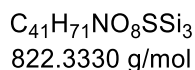
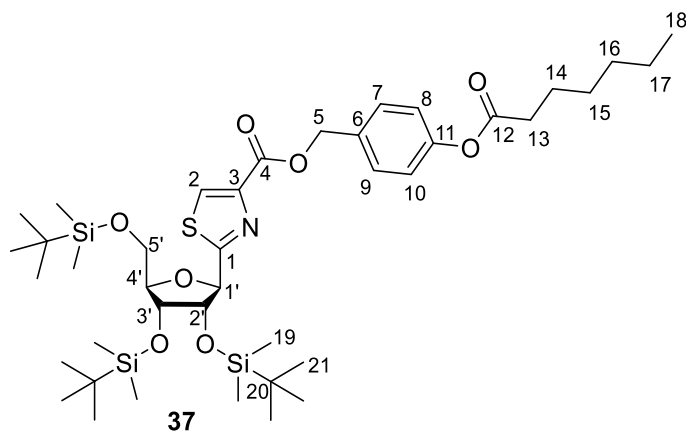
**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 172.8 (C<sub>q</sub>-1), 172.4 (C<sub>q</sub>-12), 161.4 (C<sub>q</sub>-4), 150.8 (C<sub>q</sub>-1), 146.6 (C<sub>q</sub>-3), 133.4 (C<sub>q</sub>-11), 129.8 (C-7, 9), 128.4 (C-2), 121.8 (C-8, 10), 86.4 (C-4'), 81.3 (C-1'), 79.4 (C-2/3), 73.8 (C-2/3), 66.4 (C-5), 63.4 (C-5'), 34.5 (C-13), 31.6 (C-16, 17), 28.9 (C-15), 26.2 (C<sub>TBDMS</sub>-21), 25.9 (C<sub>TBDMS</sub>-21), 25.0 (C-14), 22.6 (C<sub>q</sub>-20), 18.6 (C<sub>q</sub>-20), 18.1 (C<sub>q</sub>-20), 14.2 (C-18), -4.1, -4.4, -4.5, -5.1 (C<sub>TBDMS</sub>-19).

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 2955, 2928, 2856, 1760, 1744, 1720, 1607, 1508, 1471, 1464, 1361, 1315, 1251, 1196, 1165, 1140, 1090, 1020, 994, 964, 936, 873, 833, 774, 728, 670, 565, 501.

**HRMS-ESI+:** (m/z) berechnet für C<sub>41</sub>H<sub>72</sub>NO<sub>8</sub>SSi<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 822.4281, gefunden: 822.4230.

### 7.6.1.5 Synthese von 2-(2,3,5-Tri-O-[tertbutyldimethylsilyl]- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-thiazol-4-carbonsäure-4-(heptanoyloxy)benzylester **37**

Unter Ausschluss von Wasser und Sauerstoff wurden 0.89 g (1.48 mmol, 1.0 Äquiv.) 2-[2,3,5-tris-O-[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]- $\beta$ -D-ribofuranosyl]-4-thiazolcarboxy-säure **36**, 0.34 mL (2.2 mmol, 1.5 Äquiv.) 2,4,6-Trichlorbenzoesäurechlorid **39** und 0.33 mL (2.4 mmol, 1.6 Äquiv.) abs. Triethylamin in 25 mL THF gelöst und bei Raumtemperatur 30 Minuten gerührt. Anschließend wurde 0.567 g (2.40 mmol, 1.6 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)-phenylhexanoat, gelöst in 1 mL THF, zugetropft und eine katalytische Menge 4-DMAP (0.05 g, 0.44 mmol, 0.3 Äquiv.) zugegeben. Nach 20-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von gesättigter wässriger Natriumchloridlösung beendet und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 19:1 v/v) gereinigt.



**Ausbeute:** 0.099 g (0.12 mmol, 60 %) eines leicht gelben Öls.

**R<sub>f</sub> -Wert:** 0.45 (PE/EE 9:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 8.62 (s, 1H, 2), 7.47-7.49 (m, 2H, 7, 9), 7.11-7.13 (m, 2H, 8, 10), 5.32 (m, 2H, 5), 4.95 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.5 Hz, 1'), 4.12-4.08 (m, 2H, 2', 3'), 4.00-3.98 (m, 1H, 4'), 3.74 (m, 2H, 5'), 2.57 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3 Hz, 13), 1.63 (tt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3 Hz, 14), 1.31 (m, 6H, 15, 16, 17), 0.90 (s, 9H, 21), 0.87 (m, 12H, 20, 18), 0.76 (s, 9H, 21), 0.07-0.09 (m, 12H, 19), -0.12 (s, 3H, 19), -0.27 (s, 3H, 19).

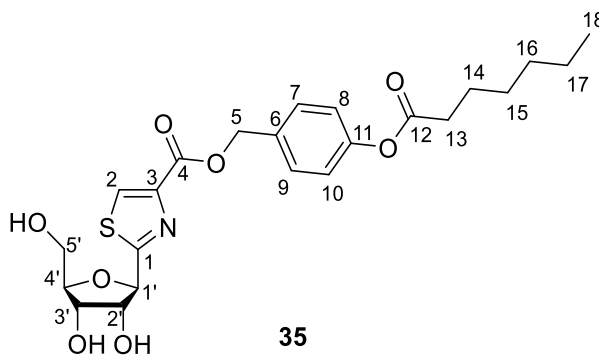
**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 171.7 (C<sub>q</sub>-4), 170.8 (C<sub>q</sub>-12), 160.5 (C-1) 150.3 (C-6), 133.3 (C-11), 129.4 (C-7, 9), 121.7 (C-8, 10), 86.1 (C-4'), 80.2 (C-1'), 78.6 (C-2/3), 73.5 (C-2/3), 65.5 (C-5), 62.9 (C-5'), 33.5 (C-13), 30.9, 27.9, 21.9 (C-15/16/17), 25.8, 25.7, 25.5 (C<sub>q</sub>-20), 24.3 (C-14), 21.9 (C-15/16/17), -4.6, -4.7, -4.8, -4.9, -5.5, -5.6, -5.7 (C-19).

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 2953, 2928, 2856, 1759, 1743, 1720, 1609, 1509, 1471, 1462, 1361, 1315, 1251, 1195, 1164, 1140, 1090, 1019, 994, 964, 937, 873, 833, 774, 728, 670, 565, 500.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>41</sub>H<sub>72</sub>NO<sub>8</sub>SSi<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 822.4281, gefunden: 822.4300.

### 7.6.1.6 Synthese von 2-(2,3,5-Tri-hydroxy-β-D-ribofuranosyl)-thiazol-4-carbonsäure-4-(heptanoyloxy)-benzylester **35**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 1.11 g (1.35 mmol, 1.0 Äquiv.) der maskierten Verbindung **37** in 25 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und 0.5 mL (24.2 mmol, 18.0 Äquiv.) TREAT-HF langsam zugegeben. Nach 24 Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von Kieselgur beendet, alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v) gereinigt.



**35**  
C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>8</sub>S  
479.5440 g/mol

**Ausbeute:** 0.46 g (0.96 mmol, 71 %) eines farblosen Waxes.

**R<sub>f</sub> -Wert:** 0.59 (EE/MeOH 9:1 + 1 vol% Essigsäure v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 8.56 (s, 1H, 2), 7.57 – 7.44 (m, 2H, 7, 9), 7.20 – 7.09 (m, 2H, 8, 10), 5.41 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.1 Hz, 2'-OH), 5.33 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 2.5 Hz, 2H, 5), 5.02 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.4 Hz, 1H, 3'-OH), 4.93 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.0 Hz, 1'), 4.84 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.4 Hz, 1H, 5'-OH), 4.01 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.3 Hz, 3.4 Hz, 1H, 2'), 3.94 – 3.78 (m, 3H, 4), 3.59 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> =

5.6, 3.7 Hz, 1H, 5''), 3.51 (dt,  $^2J_{\text{HH}} = 11.8$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 5.0$  Hz, 5'), 2.57 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 7.4$  Hz, 2H, 13), 1.66 – 1.60 (m, 2H, 14), 1.42 – 1.22 (m, 6H, 15, 16,17), 0.90 – 0.86 (m, 3H, 18).

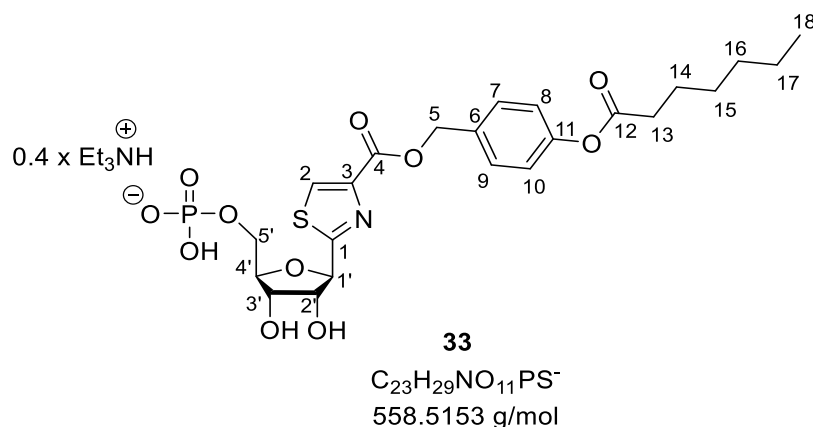
$^{13}\text{C-NMR}$ : (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 173.2 (C-1), 171.8 (C-12), 160.6 (C-4), 150.3 (C-6), 145.6 (C-3), 133.5 (C-11), 129.6 (C-2), 127.9 (C-7, 9), 121.9 (C-8, 10), 84.9 (C-3'), 82.1 (C-1'), 76.9 (C-2'), 71.2 (C-4'), 65.6 (C-5), 61.7 (5'), 33.4 (13), 30.9 (C-15, 16,17), 28.0 (C-15, 16, 17), 24.3 (C-14), 21.9 (C-15/16/17), 13.9 (C-18).

**IR**:  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3447, 3274, 3094, 2955, 2926, 2857, 1753, 1737, 1715, 1607, 1507, 1478, 1446, 1416, 1377, 1338, 1295, 1271, 1212, 1197, 1165, 1148, 1124, 1091, 1047, 1030, 981, 943, 922, 900, 871, 842, 778, 753, 656, 603, 588, 569, 529, 497.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>**: (m/z) berechnet für  $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{NO}_8\text{S}$  [M+H]<sup>+</sup> 480.1687, gefunden: 480.1612.

#### 7.6.1.7 Synthese von 2-(2,3,5-Tri-hydroxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-thiazol-4-carbonsäure-4-(heptanoyloxy)-benzylester-5-monophosphat **33**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.023 g (0.049 mmol, 1.0 Äquiv.) der maskierten Verbindung **35** in 1.0 mL Trimethylphosphat **44** gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es wurde 0.018 mL (0.19 mmol, 4.0 Äquiv.) Phosphoroxychlorid **45** zugetropft und die Reaktion 6 Stunden bei 0 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurden 5 mL 1 M TEAB-Puffer zugegeben und die wässrige Phase mit Hexan gewaschen. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP18-Kieselgel gereinigt.



**Ausbeute**: 0.026 mg (0.046 mmol, 94 %) eines farblosen Feststoffs.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 8.58 (s, 1H, 2), 7.54 – 7.46 (m, 2H, 7, 9), 7.16 – 7.11 (m, 2H, 8, 10), 5.38 – 5.30 (m, 2H, 5), 4.97 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.7 Hz, 1H, 1'), 4.09 – 4.00 (m, 3H, 3, 4, 5'), 3.89 (dt, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 21.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.5 Hz, 2H, 2, 5''), 2.57 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, 2H, 13), 1.63 (tt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, 2H, 14), 1.42 – 1.22 (m, 6H, 15, 16, 17), 0.89 – 0.85 (m, 3H, 18).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 172.7 (C-1), 171.8 (C-12), 160.6 (C-4), 150.3 (C-6), 145.7 (C-3), 133.46 (C-11), 129.9 (C-2), 129.6 (C-7, 9), 121.9 (C-8, 10), 82.5 (C-1'), 82.4 (C-3'), 76.7 (C-2'), 71.1 (C-4'), 65.7 (C-5'), 65.6 (C-5), 33.5 (C-13), 30.9 (C-16, 17), 28.05 (C-15), 24.28 (C-14), 21.94 (C-16, 17), 13.9 (C-18).

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm]: -0.10.

**HRMS-ESI:** (m/z) berechnet für C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>11</sub>PS<sup>-</sup> [M]<sup>-</sup> 558.1204, gefunden: 558.1173.

#### 7.6.1.8 Synthese von Thiazol-AB-3'-OMe-MASTER-NAADP 27

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.074 mL (0.53 mmol, 16 Äquiv.) Et<sub>3</sub>N in 1.0 mL abs. Acetonitril gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 0.46 mL (0.33 mmol, 10 Äquiv.) TFAA langsam zugetropft und 10 min bei 0 °C gerührt. Die Verbindung **33** (0.02 g, 0.03 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde in 1.0 mL abs. Acetonitril gelöst und die TFAA-Lösung bei 0°C zugetropft. Nach 15 min Rühren bei Raumtemperatur wurden alle flüchtigen Bestandteile entfernt. Der Rückstand wurde in 1.0 mL abs. Acetonitril gelöst und es wurden 0.016 mL (0.20 mmol, 6.0 Äquiv.) NMI und 0.034 mL (0.334 mmol, 10.0 Äquiv.) abs. Et<sub>3</sub>N zugetropft und die Lösung 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Das 3'-OMe-Adenosinderivat **34** (0.027 g, 0.03 mmol, 0.9 Äquiv.) wurde in 1.0 mL abs. Acetonitril und 0.2 mL abs. DMF gelöst und zu der Reaktionslösung getropft. Die Reaktion wurde 5.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend durch die Entfernung aller flüchtigen Bestandteile beendet. Das Rohprodukt wurde in 1M TEAB-Puffer aufgenommen und mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel gereinigt.

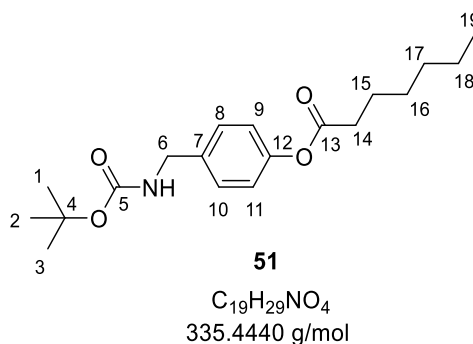


<sup>31</sup>P-NMR (243 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm]: -1.97 (s, P-2'), -11.26 (d, <sup>2,2</sup>J<sub>PP</sub> = 20.4 Hz, P-5'α), -11.52 (d, <sup>2,2</sup>J<sub>PP</sub> = 19.9 Hz, P-5'β).

HRMS-ESI: (m/z) berechnet für C<sub>62</sub>H<sub>80</sub>N<sub>6</sub>O<sub>14</sub>P<sub>3</sub>S<sup>-</sup> [M]<sup>-</sup> 1417.4163, gefunden: 1417.4116.

### 7.6.1.9 Synthese *tert*-butyl-(heptanoyl)benzylcarbamat **51**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 0.18 g (1.45 mmol, 1.10 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylamin **50** in abs. DMF und abs. Pyridin (5:1 v/v) gelöst und langsam bei 0 °C 0.35 mL (1.53 mmol, 1.10 Äquiv.) Di-*tert*-butyldicarbonat zugetropft. Die Reaktionslösung wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend durch die Zugabe von 5 mL Wasser und 5 mL Ethylacetat beendet. Die organische Phase wurde mit wässriger gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend wurde das Rohprodukt in 6 mL abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und 0.2 mL (1.5 mmol, 1.1 Äquiv.) abs. Triethylamin zugetropft. Nach der Zugabe von 0.05 g (0.40 mmol, 0.30 Äquiv.) 4-DMAP wurde das in 6 mL abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöste Heptanoylchlorid (0.21 mL, 1.35 mmol, 1.00 Äquiv.) langsam zu der Reaktionslösung zugetropft. Nach Beendigung der Reaktion wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 4:1 v/v) gereinigt.



**Ausbeute:** 0.27 g (0.81 mmol, 56 %) eines leicht gelben Öls.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.2 (PE/EE 9:1 v/v).

<sup>1</sup>H-NMR: (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 7.39 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.2 Hz, 1H, -NH), 7.25 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = Hz, 2H, 8, 10), 7.04 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.4 Hz, 2H, 9, 11), 4.11 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.2 Hz, 1H, 6), 1.39 (s, 9H, 1, 2, 3), 1.35 – 1.14 (m, 10H, 14, 15, 16, 17, 18), 1.03 – 0.72 (m, 3H, 19).

<sup>13</sup>C-NMR: (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 155.7 (C-5), 149.1 (C-7), 137.7 (C-13), 127.9 (C-7, 10), 121.5 (C-9, 11), 77.8 (C-4), 42.8 (C-6), 30.9, 28.0, 27.2 21.9 (C-14, 15, 16, 17, 18), 28.2 (C-1, 2, 3), 13.9 (C-19).

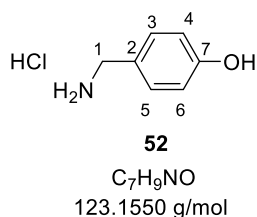
**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 3365, 2956, 2929, 2859, 1757, 1699, 1506, 1456, 1390, 1365, 1251, 1196, 1143, 1101, 1047, 1017, 931, 915, 864, 780, 727, 575, 501, 464.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{NO}_4\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  358.1989, gefunden: 358.1999.

#### 7.6.1.10 Syntheseversuch von 4-(Aminomethyl)phenylheptanoyl\*hydrochlorid **52**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.14 g (0.42 mmol, 1.0 Äquiv.) *tert*-butyl-(4-(((Heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl)carbamate **51** in 10 mL abs. Ethanol gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden langsam 0.6 mL (8.3 mmol, 20.0 Äquiv.) Acetylchlorid zugetropft und die Reaktionslösung für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde daraufhin unter vermindertem Druck entfernt.

**Anmerkung:** Das erwartete Produkt **51** konnte nicht isoliert werden. Die analytischen Daten deuten darauf hin, dass die Alkylkette gespalten wurde und der Ethylester unter vermindertem Druck entfernt wurde, sodass nur noch Reste im NMR-Spektrum zu identifizieren sind. Die erhaltene Verbindung ist der 4-(Aminomethyl)phenylheptanoyl\*hydrochlorid **52**.



**Ausbeute:** 0.032 g (0.26 mmol, 62 %) eines farblosen Feststoffs.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 9.68 (s, 1H, -OH), 8.58 (s, 2H, -NH<sub>2</sub>), 7.75 – 7.08 (m, 2H, 3, 5), 6.96 – 6.46 (m, 2H, 4, 6), 3.86 (s, 2H, 1).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (126 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 158.1 (C-7), 131.0 (C-3, C-5), 128.5 (C-2), 115.5 (C-4, C-6), 42.2 (C-1).

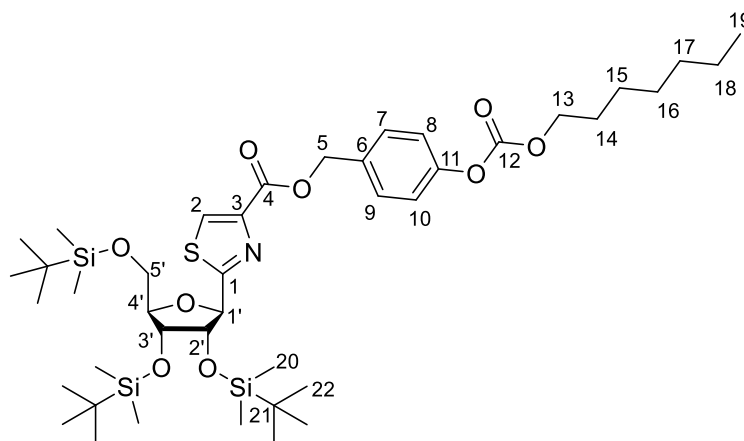
**IR:**  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] (Film) = 2968, 2894, 2706, 2577, 2544, 1686, 1614, 1596, 1516, 1469, 1442, 1385, 1347, 1331, 1294, 1260, 1212, 1177, 1109, 1072, 961, 868, 843, 823, 749, 709, 644, 625, 545, 484, 448.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** konnte Massenspektrometrisch nicht identifiziert werden.

## 7.6.2 Synthese der Thiazol-ACB-NAADP-Verbindung 60

7.6.2.1 Synthese von 2-(2,3,5-Tri-O-[*tert*-butyldimethylsilyl]- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-4-(heptanoyloxycarboxy)benzyl-thiazol 61

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.099 g (0.16 mmol, 1.0 Äquiv.) der TBDMS-geschützten Carbonsäure **36** und 0.026 mL (0.16 mmol, 1.0 Äquiv.) 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid **39** in 3.0 mL abs. THF gelöst und 0.025 mL (0.18 mmol, 1.1 Äquiv.) Et<sub>3</sub>N zugetropft. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur 30 min gerührt. Anschließend wurden 0.052 g (0.20 mmol, 1.2 Äquiv.) des 4-(Hydroxymethyl)phenylheptylcarbonats **59** in 1 mL abs. THF gelöst und zu der Reaktionslösung getropft. Nach Zugabe von 6.0 mg (0.052 mmol, 0.3 Äquiv.) 4-DMAP wurde die Lösung 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von gesättigter wässriger Natriumchloridlösung beendet und dreimal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 19:1 v/v) gereinigt.

**61**

C<sub>42</sub>H<sub>73</sub>NO<sub>9</sub>SSi<sub>3</sub>  
852.3590 g/mol

**Ausbeute:** 0.098 g (0.11 mmol, 70 %) einer farblosen Flüssigkeit.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.47 (PE/EE 9:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 8.17 (s, 1H, 2), 7.47 (m, 2H, 7, 9), 7.18 (m, 2H, 8, 10), 5.56 – 5.27 (m, 2H, 5), 5.25 – 5.13 (m, 1H, 1), 4.24 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7 Hz, 2H, 13), 4.15 – 4.02 (m, 3H, 2', 3', 4'), 3.82 – 3.68 (m, 2H, 5'), 1.73 (tt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.0 Hz, 2H, 14), 1.34 (m, 6H,

15, 16, 17), 0.91 (s, 23H, 22, 19), 0.83 (s, 7H, 22), 0.15 – 0.03 (m, 12H, 20), -0.08 (s, 3H, 20), -0.20 (s, 3H, 20).

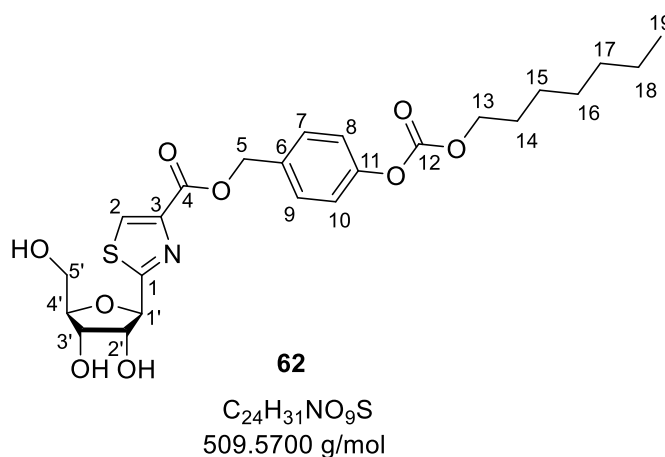
**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 172.7 (C-1), 161.3 (C-4), 153.8 (C-12), 151.2 (C-6), 146.7 (C-3), 133.7 (C-11), 129.8 (C-7, 9), 128.5 (C-2), 121.4 (C-8, 10), 86.4 (C-4'), 81.4 (C-1'), 79.4 (C-2'), 73.8 (C-3'), 69.2 (C-13), 66.2 (C-5), 63.4 (C-5'), 31.8, 28.9 (C-18, 17), 28.7 (C-14), 25.9, 25.7 (C<sub>TBDMS</sub>-22), 22.6 (C-15,16), 26.2, 18.6, 18.1 (C<sub>TBDMS</sub>-21), 14.2 (C-19).

**IR:** (Film) [cm<sup>-1</sup>]: 2954, 2928, 2856, 1762, 1720, 1609, 1510, 1471, 1463, 1389, 1362, 1315, 1249, 1218, 1164, 1112, 1088, 1018, 1003, 964, 938, 874, 833, 774, 728, 670, 589, 548, 504.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>41</sub>H<sub>74</sub>NO<sub>8</sub>SSi<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 874.4216, gefunden: 874.4216.

### 7.6.2.2 Synthese von 2-(2,3,5-Tri-hydroxy-β-D-ribofuranosyl)-thiazol-4-carbonsäure-4-(heptyloxycarbonyloxy)-benzylester **62**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.099 g (0.12 mmol, 1.0 Äquiv.) der Verbindung **61** in 3.0 mL abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und 0.35 mL (2.09 mmol, 18.0 Äquiv.) TREAT-HF zugetropft. Nach 24 Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von Kieselgur beendet, flüchtige Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v) gereinigt.



**Ausbeute:** 0.056 g (0.11 mmol, 95 %) einer farblosen Flüssigkeit.

**R<sub>f</sub> -Wert:** 0.61 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 8.56 (s, 1H, 2), 7.55 – 7.48 (m, 2H, 7, 9), 7.32 – 7.18 (m, 2H, 8,10), 5.40 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.2 Hz, 1H, 2'-OH), 5.34 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 1.7 Hz, 2H, 5), 5.01 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.4 Hz, 1H, 3'-OH), 4.93 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.0 Hz, 1H, 2'-OH, 1'), 4.84 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.4 Hz, 1H, 5'-OH), 4.20 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.6 Hz, 2H, 13), 4.01 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.2, 4.9 Hz, 1H, 2'), 3.95 – 3.76 (m, 2H, 3', 4'), 3.59 (m, 1H, 5'a), 3.51 (m, 1H, 5'b), 1.66 (tt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7 Hz, 2H, 14), 1.43 – 1.11 (m, 8H, 15, 16, 17, 18), 0.92 – 0.71 (m, 3H, 19).

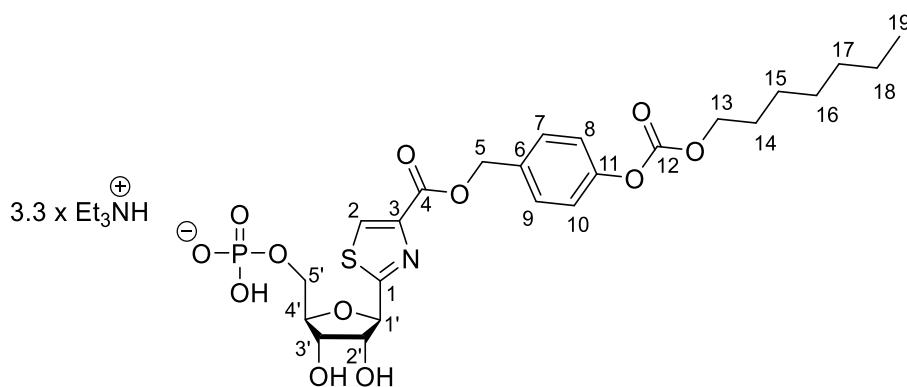
**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 173.2 (C-1), 160.6 (C-4), 153.0 (C-12), 150.6 (C-6), 145.5 (C-3), 133.9 (C-11), 129.8 (C-7, 9), 129.6 (C-2), 121.4 (C-8, 10), 84.9 (C-4'), 82.1 (C-1'), 77.0 (C-2'), 71.1 (C-3'), 68.6 (C-13), 65.5 (C-5), 61.7 (C-5'), 27.9 (C-14), 31.1, 28.3, 25.1, 21.9 (C-15, 16, 17, 18), 13.9 (C-19).

**IR:** (Film) [cm<sup>-1</sup>]: 3439, 3349, 3087, 2955, 2924, 2856, 1758, 1734, 1711, 1608, 1509, 1479, 1460, 1378, 1335, 1256, 1213, 1199, 1169, 1125, 1098, 1049, 1018, 961, 902, 880, 856, 830, 777, 747, 698, 655, 605, 548, 532, 503, 448, 411.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>9</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 510.1792, gefunden: 510.1789.

### 7.6.2.3 Synthese von [2-(2,3,5-Tri-hydroxy-β-D-ribofuranosyl)-thiazol-4-carbonsäure-4-(heptyloxycarbonyloxy)-benzylester]-5-monophosphat 63

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.095 g (0.186 mmol, 1.0 Äquiv.) der maskierten Verbindung **62** in 1.0 mL Trimethylphosphat **44** gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es wurde 0.174 mL (1.86 mmol, 10.0 Äquiv.) Phosphoroxychlorid **45** zugetropft und die Reaktion 8 Stunden bei 0 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurden 5 mL 1 M TEAB-Puffer zugegeben und die wässrige Phase mit Hexan gewaschen. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-C18-Kieselgel gereinigt.



**63**

$C_{24}H_{31}NO_{12}PS^-$

588.5413 g/mol

**Ausbeute:** 0.093 (0.135 mmol, 73 %) eines farblosen Feststoffs.

**$^1H$ -NMR:** (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.56 (s, 1H, 2), 7.64 – 7.41 (m, 2H, 7, 9), 7.36 – 7.18 (m, 2H, 8, 10), 5.45 – 5.27 (m, 2H, 5), 4.93 (d,  $^3J_{HH}$  = 4.6 Hz, 1H, 1'), 4.19 (t,  $^3J_{HH}$  = 6.6 Hz, 2H, 13), 4.04 (t,  $^3J_{HH}$  = 4.7 Hz, 1H, 2'), 4.00 (dt,  $^3J_{HH}$  = 4.9 Hz, 1H, 4'), 3.89 (t,  $^3J_{HH}$  = 5.2 Hz, 1H, 3'), 3.82 (m, 2H, 5'), 2.94 (bs, 7H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 1.65 (dt,  $^3J_{HH}$  = 8.1, 6.6 Hz, 2H, 14), 1.43 – 1.21 (m, 8H, 15, 16, 17, 18), 1.13 (t,  $^3J_{HH}$  = 7.2 Hz, 10H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>), 0.87 (t,  $^3J_{HH}$  = 6.9 Hz, 3H, 19).

**$^{13}C$ -NMR:** (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 173.3 (C-1), 160.6 (C-4), 153.1 (C-12), 150.6 (C-6), 145.6 (C-3), 133.9 (C-11), 129.9 (C-2), 129.6 (C-7, 9), 121.9 (C-8, 10), 83.0 (C-4'), 82.2 (C-1'), 77.0 (C-2'), 71.7 (C-3'), 68.6 (C-13), 65.5 (C-5), 64.7 (C-5'), 45.3 (C- Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 31.1, 28.3, 25.1, 22.0 (C-15, 16, 17, 18), 28.0 (C-14), 13.9 (C-19), 8.7 (C- Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>).

**$^{31}P$ -NMR** (162 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm]: -0.06.

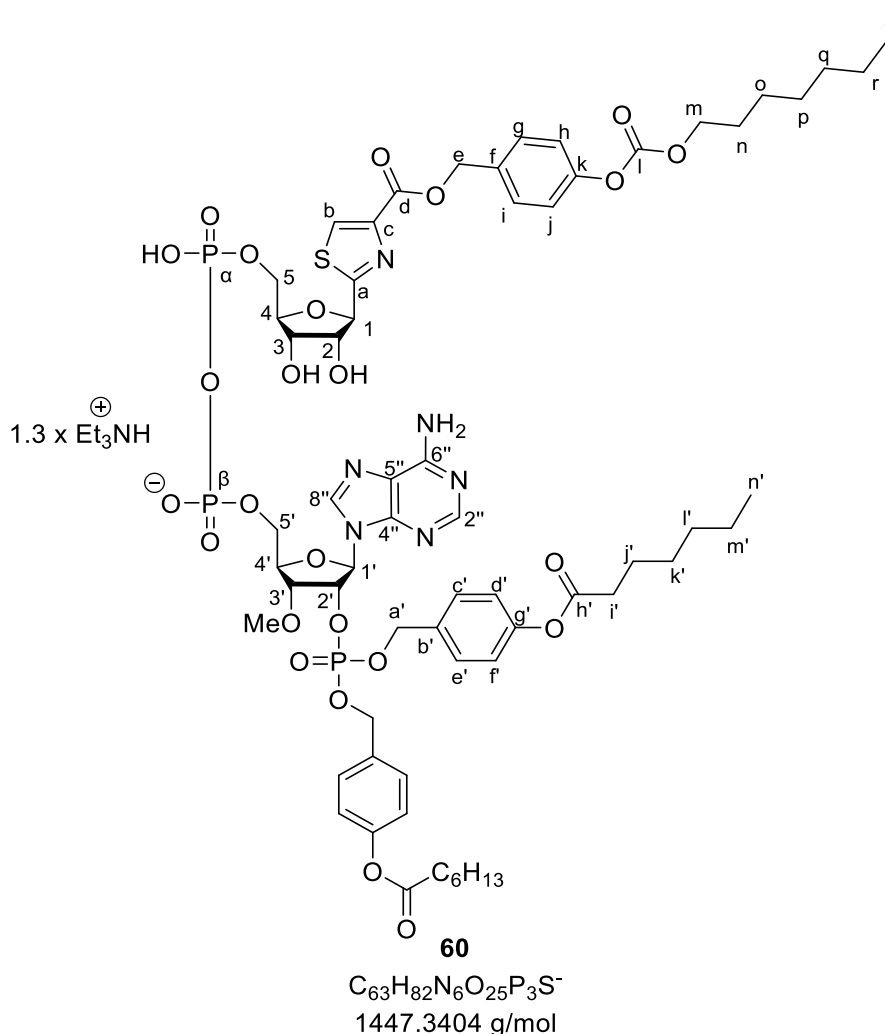
**IR:** (Film) [ $cm^{-1}$ ]: 2930, 2857, 2603, 2529, 2497, 1759, 1727, 1509, 1476, 1396, 1246, 1197, 1169, 1036, 958, 850, 807, 778, 758, 499.

**HRMS-ESI:** (m/z) berechnet für  $C_{24}H_{31}NO_{12}PS^-$  [M]<sup>-</sup> 588.1310, gefunden: 588.1314.

#### 7.6.2.4 Synthese von Thiazol-3'-OMe-MASTER-NAADP 60

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.064 mL (0.464 mmol, 16.0 Äquiv.) abs. Et<sub>3</sub>N in 1.0 mL abs. Acetonitril gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 0.04 mL (0.29 mmol, 10 Äquiv.) TFAA langsam zugetropft und 15 min bei 0 °C gerührt. Die Verbindung **63** (0.02 g, 0.03 mmol, 1 Äquiv.) wurde in 1.0 mL abs. Acetonitril gelöst und die TFAA-

Lösung bei 0°C zugetropft. Nach 15 min Rühren bei Raumtemperatur wurden alle flüchtigen Bestandteile entfernt. Der Rückstand wurde in 1.0 mL abs. Acetonitril gelöst und es wurden 0.014 mL (0.17 mmol, 6.0 Äquiv.) NMI und 0.04 mL (0.29 mmol, 10.0 Äquiv.) abs. Et<sub>3</sub>N zugetropft und die Lösung 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Das 3'-OMe-Adenosinderivat **34** (0.024 g, 0.026 mmol, 0.9 Äquiv.) wurde in 1.0 mL abs. Acetonitril und 0.2 mL abs. DMF gelöst und zu der Reaktionslösung getropft. Die Reaktion wurde 4.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend durch die Entfernung aller flüchtigen Bestandteile beendet. Das Rohprodukt wurde in 1M TEAB-Puffer aufgenommen und mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-C18-Kieselgel gereinigt.



**Ausbeute:** 0.023 g (0.014 mmol, 50 %) eines farblosen Feststoffs.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 8.52 (s, 1H, b), 8.48 (s, 1H, 2''), 8.13 (s, 1H, 8''), 7.61 – 7.40 (m, 2H, g, i), 7.32 (m, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.9, 2.4 Hz, 2H, c', e'), 7.29 – 7.15 (m, 4H, h, j, c', e'), 7.14 – 7.06 (m, 2H, d', f'), 7.04 – 7.02 (m, 2H, d', f'), 6.20 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.4 Hz, 1H, 1'), 5.57 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.2, 4.8 Hz, 1H, 2'), 5.33 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.5 Hz, 2H, e), 5.04 – 4.91 (m, 3H, a', 4'),

4.86 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 8.2, 4.7$  Hz, 2H, a'), 4.27 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 4.1$  Hz, 1H, 1), 4.20 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 6.6, 5.8$  Hz, 4H, 3', n), 4.02 (m, 6H, 2, 3, 4), 3.38 (s, 3H, -OMe), 3.06 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 7.4$  Hz, 7H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 2.56 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 7.4$  Hz, 4H, i'), 1.70 – 1.50 (m, 6H, n, j'), 1.44 – 1.23 (m, 24H, o, p, q, r, k', l', m'), 1.15 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 7.2$  Hz, 12H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>), 0.87 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 6.7$  Hz, 9H, s, n').

**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 171.6 (C-h'), 162.7 (C-d), 153.1 (C-l), 150.6 (f, k, b', g'), 136.1 (C-12), 129.6, 129.2, 129.1 (C-g, i, c', e'), 121.8, 121.7, 121.4 (C-h, j, d', f'), 86.1 (C-1), 78.0 (C-3), 82.2, 76.8, 70.5 (C-2', 3', 4'), 68.4, 68.3, 68.2 (C-a', n), 65.4 (C-e), 57.8 (C-OMe), 45.5 (C- Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 33.4 (C-i'), 31.1, 30.9, 28.2, 28.1, 22.0, 21.9 (C-o, p, q, r, k', l', m'), 27.9, 24.2 (C-n, j'), 13.9 (C-s, n'), 8.5 (C- Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>).

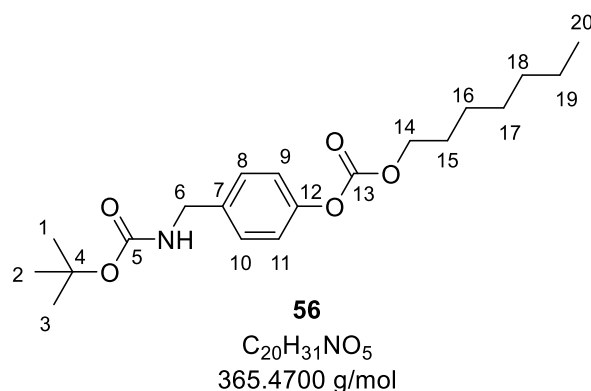
**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm]: -1.98 (s, P-2'), -11.21 (d,  $^{2,2}J_{\text{PP}} = 19.9$  Hz, P-5' $\alpha$ ), -11.42 (d,  $^{2,2}J_{\text{PP}} = 18.5$  Hz, P-5' $\beta$ ).

**HRMS-ESI:** (m/z) berechnet für C<sub>63</sub>H<sub>82</sub>N<sub>6</sub>O<sub>25</sub>P<sub>3</sub>S<sup>-</sup> [M]<sup>-</sup> 1447.4269, gefunden: 1447.4249.

### 7.6.3 Synthese der Thiazol-ACB-NADP-Verbindung 64

#### 7.6.3.1 *tert*-Butyl-4-(Heptyloxycarbonyloxybenzyl)carbamat 56

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.23 g (10.0 mmol, 1.00 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylamin **50** in abs. DMF und abs. Pyridin (5:1 v/v) gelöst und langsam bei 0 °C 2.4 mL (11 mmol, 1.1 Äquiv.) Di-*tert*-butyldicarbonat zugetropft. Die Reaktionslösung wurde 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend durch die Zugabe von 30 mL Wasser und 30 mL Ethylacetat beendet. Die organische Phase wurde mit wässriger gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend wurde das Rohprodukt in 40 mL abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und 1.53 mL (11.0 mmol, 1.10 Äquiv.) abs. Triethylamin zugetropft. Nach der Zugabe von 0.37 g (3.0 mmol, 0.30 Äquiv.) 4-DMAP wurde das in 20 mL abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöste Heptylchloroformiat (1.78 mL, 10.0 mmol, 1.00 Äquiv.) langsam zu der Reaktionslösung zugetropft. Nach Beendigung der Reaktion wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 4:1 v/v) gereinigt.



**Ausbeute:** 2.46 g (7.05 mmol, 71 %) eines leicht gelben Öls.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.60 (PE/EE 4:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 7.71 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.2 Hz, -NH), 7.26-7.24 (m, 2H, H-8, H-10), 7.16-7.14 (m, 2H, H-9, H-11), 4.18 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.6 Hz, 2H, H-14), 4.12-4.10 (m, 2H, H-6), 1.65 (m, 2H, H-15), 1.38 (s, 9H, CH<sub>3</sub>-Boc), 1.35-1.24 (m, 8H, H-16, H-17, H-18, H-19), 0.86 (m, 3H, H-20).

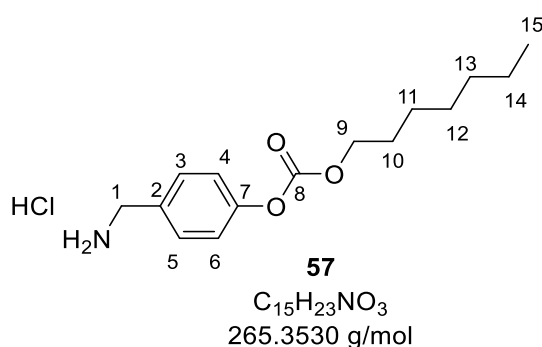
**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 155.9 (C-5), 153.2 (C-13), 149.5 (C-12), 138.1 (C-7), 128.1 (C-8, C-10), 121.1 (C-9, C-11), 77.9 (C-4), 68.5 (C-14), 42.8 (C-6), 31.1 (C-15), 28.3 (CH<sub>3</sub>-Boc), 28.0 (C-16), 25.1 (C-17), 22.0 (C-18), 22.0 (C-19), 14.0 (C-20).

**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3366, 2960, 2930, 2859, 1758, 1696, 1508, 1456, 1391, 1367, 1246, 1216, 1145, 1048, 1017, 948, 930, 893, 864, 834, 780, 725, 600, 550, 503, 462, 438.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>5</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 388.2094, gefunden: 388.2102.

### 7.6.3.2 Synthese von 4-(Aminomethyl)phenylheptylcarbonat\*hydrochlorid 57

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 2.46 g (7.05 mmol, 1.0 Äquiv.) *tert*-butyl-4-(((Heptyloxy)carbonyl)oxy)benzylcarbamate **56** in 35 mL abs. Ethanol gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden langsam 10.1 mL (141 mmol, 20.0 Äquiv.) Acetylchlorid zugetropft und die Reaktionslösung für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde daraufhin unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt ohne weitere Reinigung verwendet.



**Ausbeute:** 1.89 g (6.26 mmol, 89 %) eines farblosen Feststoffs.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.45 (PE/EE 2:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 8.64 (s, 3H, -NH<sub>3</sub>), 7.76 – 7.50 (m, 2H, 3, 5), 7.42 – 7.01 (m, 2H, 4, 6), 4.19 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.6 Hz, 2H, 9), 4.01 (s, 2H, 1), 1.75 – 1.59 (m, 2H, 10), 1.41 – 1.15 (m, 8H, 11, 12, 13, 14), 0.86 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, 3H, 15).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 153.1 (C-8), 150.7 (C-2), 132.1 (C-7), 130.4 (C-3, 5), 121.4 (C-4, 6), 68.7 (C-9), 41.5 (C-1), 31.1, 28.3, 25.1, 22.0 (C-11, 12, 13, 14), 28.0 (C-10), 13.9 (C-15).

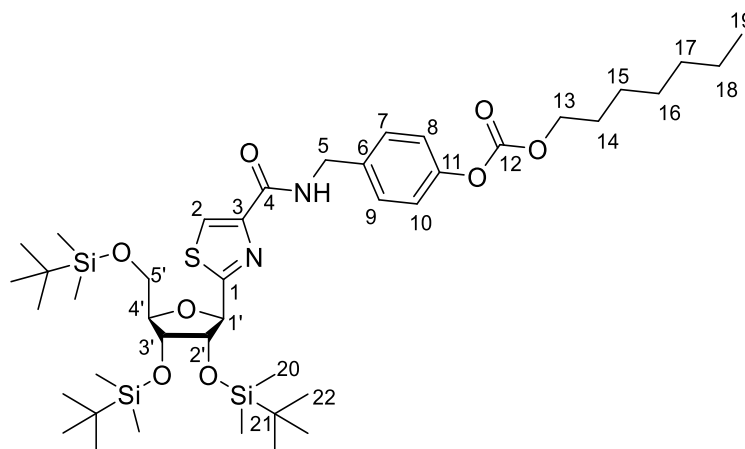
**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 2958, 2922, 2856, 2576, 1758, 1614, 1596, 1512, 1465, 1385, 1331, 1255, 1209, 1178, 1112, 1075, 1023, 961, 879, 868, 823, 780, 749, 709, 645, 631, 590, 546, 529, 511, 485, 447.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 266.1751, gefunden: 266.1726.

### 7.6.3.3 Synthese von 2-(2,3,5-Tri-O-[tertbutyldimethylsilyl]-β-D-ribofuranosyl)-thiazol-4-(heptyloxycarbonyloxy)benzylbenzamid 65

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.10 g (0.17 mmol, 1.0 Äquiv.) der TBDMS-geschützten Carbonsäure **36** in 2.0 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und 0.084 mL (0.50 mmol, 3.0 Äquiv.) DIPEA sowie 0.13 g (0.33 mmol, 2.0 Äquiv.) HBTU zugegeben. Die Amino-ACB-Maske **57** (0.075 g, 0.25 mmol, 1.5 Äquiv.) wurde in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> suspendiert und 4-DMAP (6.0 mg, 0.05 mmol, 0.3 Äquiv.) zugegeben. Die Suspension wurde zu der Reaktionslösung getropft und die Reaktion bei Raumtemperatur 21 Stunden gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von gesättigter wässriger Natriumchloridlösung beendet und die wässrige Phase dreimal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet

und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulen-  
chromatographisch an Kieselgel (PE/EE 7:1 v/v) gereinigt.



**65**

$C_{42}H_{74}N_2O_8SSi_3$

851.3750 g/mol

**Ausbeute:** 0.11 g (0.13 mmol, 78 %) eines farblosen Öls.

**$^1H$ -NMR:** (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.79 (t,  $^3J_{HH}$  = 6.4 Hz, 1H, -NH), 8.31 (s, 1H, 2), 7.47 – 7.30 (m, 1H, 7, 9), 7.19 – 7.08 (m, 1H, 8, 10), 4.98 (d,  $^3J_{HH}$  = 7.7 Hz, 1H, 1'), 4.52 (dd,  $^2J_{HH}$  = 15.0 Hz,  $^3J_{HH}$  = 6.7 Hz, 1H, 5), 4.37 (dd,  $^2J_{HH}$  = 15.0 Hz,  $^3J_{HH}$  = 5.9 Hz, 1H, 5), 4.26 – 4.16 (m, 2H, 13), 4.13 – 4.07 (m, 2H, 2', 3'), 4.04 – 3.89 (m, 1H, 4'), 3.76 (d,  $^3J_{HH}$  = 3.4 Hz, 2H, 5'), 1.65 (t,  $^3J_{HH}$  = 7.2 Hz, 2H, 14), 1.37 – 1.21 (m, 8H, 15, 16, 17, 18), 0.95 – 0.81 (m, 21H, 22, 19), 0.73 (s, 9H, 22), 0.16 – 0.02 (m, 12H, 20), -0.14 (s, 3H, 20), -0.31 (s, 1H, 20).

**$^{13}C$ -NMR:** (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 170.9 (C-1), 160.3 (C-TBDMS-20), 153.5 (C-12), 149.2 (C-6), 137.5 (C-11), 128.4 (C-7, 9), 124.8 (C-2), 120.9 (C-8, 10), 86.5 (C-4'), 79.9 (C-1'), 79.2 (C-3'), 73.8 (C-2'), 68.4 (C-13), 63.0 (C-5'), 41.6 (C-5), 31.1, 28.2, 25.1, 22.0 (C-15, 16, 17, 18), 28.0 (C-14), 25.8, 25.6, 25.5 (C-TBDMS-22), 13.9 (C-19).

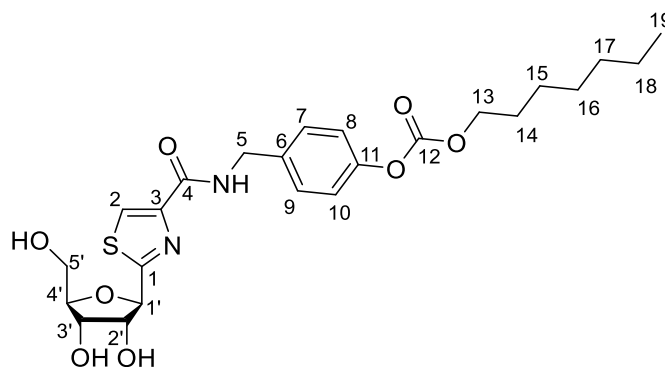
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.20 (PE/EE 7:1 v/v).

**IR:** (Film) [ $cm^{-1}$ ]: 3412, 2953, 2928, 2856, 1761, 1676, 1540, 1508, 1471, 1463, 1389, 1361, 1249, 1216, 1155, 1111, 1075, 1017, 1005, 963, 938, 874, 833, 775, 727, 670, 590, 545, 510.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $C_{42}H_{75}N_2O_8SSi_3$  [M+H]<sup>+</sup> 851.4546, gefunden: 851.4575.

### 7.6.3.4 Synthese von 2-(2,3,5-Tri-hydroxy-β-D-ribofuranosyl)-thiazol-4-(heptyloxy)-carbonyloxybenzyl-benzamid **66**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.099 g (0.116 mmol, 1.0 Äquiv.) der Verbindung **65** in 3.0 mL abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und 0.28 mL (2.09 mmol, 18.0 Äquiv.) TREAT-HF zugetropft. Die Reaktion wurde nach 48 Stunden rühren bei Raumtemperatur durch Zugabe von Kieselgur beendet, flüchtige Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v) gereinigt.



**66**

C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S  
508.5860 g/mol

**Ausbeute:** 0.05 g (0.11 mmol, 95 %) eines farblosen Öls.

**R<sub>f</sub> -Wert:** 0.34 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, Aceton-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 8.48 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.4 Hz, 1H, -NH), 8.17 (s, 1H, 2), 7.60 – 7.33 (m, 2H, 7, 9), 7.31 – 7.05 (m, 2H, 8, 10), 5.02 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.1 Hz, 1H, 1'), 4.72 – 4.50 (m, 2H, 5), 4.29 – 4.23 (m, 1H, 2'), 4.17 – 4.14 (m, 1H, 3'), 4.22 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7 Hz, 2H, 13), 4.10 – 3.97 (m, 1H, 4'), 3.78 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.8, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.7 Hz, 1H, 5'), 3.71 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.6 Hz, 1H, 5'), 1.71 (tt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.1, 6.5 Hz, 2H, 14), 1.58 – 1.15 (m, 9H, 15, 16, 17, 18), 1.01 – 0.75 (m, 3H, 19).

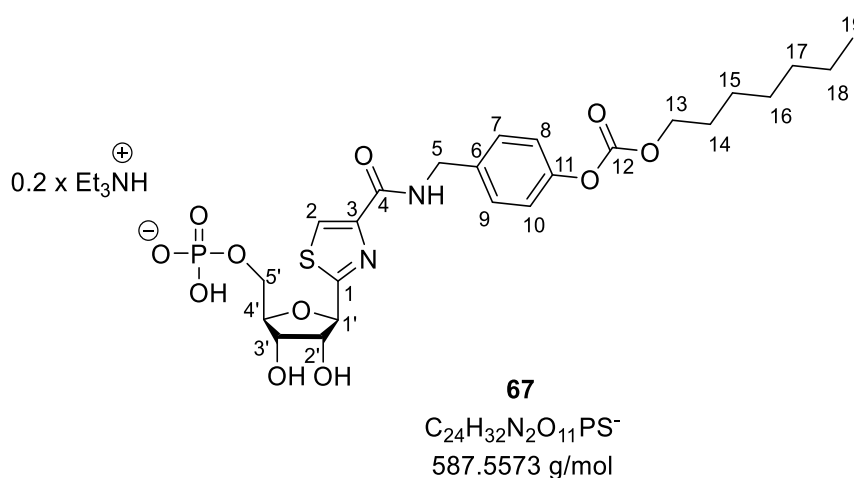
**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, Aceton-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 173.1 (C-1), 161.6 (C-4), 154.4 (C-12), 151.1 (C-3), 151.0 (C-6), 138.1 (C-11), 129.6 (C-7, 9), 124.3 (C-2), 121.8 (C-8, 10), 86.1 (C-4'), 83.2 (C-1'), 77.9 (C-2'), 72.5 (C-3'), 69.3 (C-13), 63.0 (C-5'), 42.7 (C-5), 32.3, 29.4, 26.2, 23.1 (C-15, 16, 17, 18), 29.5 (C-14), 14.2 (C-19).

**IR:** (Film) [cm<sup>-1</sup>]: 3374, 2926, 2857, 1757, 1646, 1547, 1507, 1467, 1421, 1393, 1357, 1246, 1215, 1169, 1052, 1016, 920, 850, 779, 724, 617, 521.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>24</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 509.1952, gefunden: 509.1914.

### 7.6.3.5 Synthese von [2-(2,3,5-Tri-hydroxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-thiazol-4-(heptyloxy-carbonyloxybenzyl)-benzamid]-5-monophosphat **67**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.14 g (0.27 mmol, 1.0 Äquiv.) der maskierten Verbindung **66** in 1.0 mL Trimethylphosphat **44** gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es wurden 0.25 mL (2.7 mmol, 10.0 Äquiv.) Phosphoroxychlorid **45** zugetropft und die Reaktion 3 Stunden bei 0 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurden 5 mL 1 M TEAB-Puffer zugegeben und die wässrige Phase mit Hexan gewaschen. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-C18-Kieselgel gereinigt.



**Ausbeute:** 0.122 g (0.21 mmol, 77 %) eines farblosen Feststoffs.

**$^1H$ -NMR:** (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 9.00 (t,  $^3J_{HH}$  = 6.3 Hz, 1H, -NH), 8.22 (s, 1H, 2), 7.49 – 7.27 (m, 2H, 7, 9), 7.27 – 7.00 (m, 2H, 9, 10), 4.94 (d,  $^3J_{HH}$  = 4.5 Hz, 1H, 1'), 4.44 (d,  $^3J_{HH}$  = 6.3 Hz, 2H, 5), 4.17 (t,  $^3J_{HH}$  = 6.6 Hz, 2H, 13), 4.13 (t,  $^3J_{HH}$  = 4.6 Hz, 1H, 2'), 4.00 (dt,  $^3J_{HH}$  = 4.9 Hz, 1H, 4'), 3.94 (t,  $^3J_{HH}$  = 5.1 Hz, 1H, 3'), 3.83 (m, 2H, 5'), 2.91 (q,  $^3J_{HH}$  = 7.3 Hz, 1H, Et<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>), 1.98 – 1.53 (m, 2H, 14), 1.48 – 1.17 (m, 8H, 15, 16, 17, 18), 1.12 (t,  $^3J_{HH}$  = 7.2 Hz, 2H, Et<sub>2</sub>N-CH<sub>3</sub>), 0.98 – 0.67 (m, 3H, 19).

**$^{13}C$ -NMR:** (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 172.5 (C-1), 160.6 (C-4), 153.2 (C-12), 149.8 (C-3), 149.5 (C-11), 137.6 (C-6), 128.6 (C-7, 9), 124.3 (C-2), 121.0 (C-8, 10), 83.0 (C-4'), 82.1 (C-1'), 76.9 (C-2'), 71.9 (C-3'), 68.5 (C-13), 64.7 (C-5'), 45.1 (C-Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 41.7 (C-5), 31.1, 28.4, 25.0, 22.0 (C-15, 16, 17, 18), 27.9 (C-14), 13.9 (C-19), 8.9 (C-Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>).

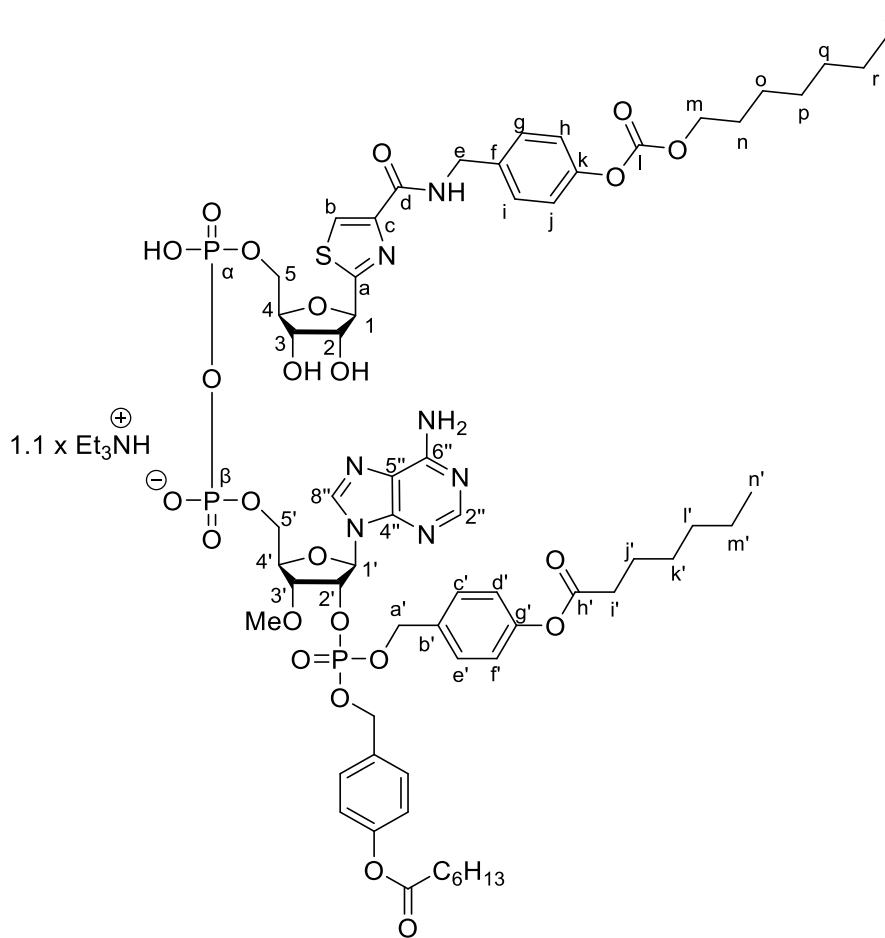
**$^{31}P$ -NMR** (123 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm]: -0.10.

**IR:** (Film) [cm<sup>-1</sup>]: 3247, 3064, 2928, 2857, 2681, 2491, 1757, 1653, 1600, 1543, 1508, 1455, 1393, 1300, 1242, 1213, 1167, 1121, 1040, 918, 836, 809, 779, 745, 710, 635, 609, 500, 416.

**HRMS-ESI:** (m/z) berechnet für  $C_{24}H_{32}N_2O_{11}PS^- [M]^-$  587.1470, gefunden: 587.1483.

#### 7.6.3.6 Synthese von Thiazol-3'-OMe-MASTER-NADP 64

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.099 mL (0.717 mmol, 24.0 Äquiv.) abs.  $Et_3N$  in 1.0 mL abs. Acetonitril gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 0.062 mL (0.45 mmol, 15 Äquiv.) TFAA langsam zugetropft und 15 min bei 0 °C gerührt. Das Monophosphat **67** (0.018 g, 0.030 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde in 1.0 mL abs. Acetonitril gelöst und die TFAA-Lösung bei 0 °C zugetropft. Nach 15 min Rühren bei Raumtemperatur wurden alle flüchtigen Bestandteile entfernt. Der Rückstand wurde in 1.0 mL abs. Acetonitril gelöst und es wurden 0.014 mL (0.18 mmol, 6.0 Äquiv.) NMI und 0.04 mL (0.30 mmol, 10.0 Äquiv.) abs.  $Et_3N$  zugetropft und die Lösung 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Das 3'-OMe-Adenosinderivat **34** (0.025 g, 0.027 mmol, 0.9 Äquiv.) wurde in 1.0 mL abs. Acetonitril und 0.2 mL abs. DMF gelöst und zu der Reaktionslösung getropft. Die Reaktion wurde 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend durch die Entfernung aller flüchtigen Bestandteile beendet. Das Rohprodukt wurde in 1 M TEAB-Puffer aufgenommen und mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-C18-Kieselgel gereinigt.



**64**

$C_{63}H_{83}N_7O_{24}P_3S^-$   
1446.3564 g/mol

**Ausbeute:** 0.025 g (0.017 mmol, 57 %) eines farblosen Feststoffs.

**$^1H$ -NMR:** (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.99 (t,  $^3J_{HH}$  = 6.4 Hz, 1H, -NH), 8.47 (s, 1H, b), 8.20 (s, 1H, 2''), 8.14 (s, 1H, 8''), 7.43 – 7.28 (m, 4H, g, i, c', e'), 7.28 – 7.19 (m, 2H, c', e'), 7.18 – 7.11 (m, 2H, h, j), 7.11 – 7.06 (m, 2H, d', f'), 7.06 – 7.02 (m, 2H, d', f'), 6.20 (d,  $^3J_{HH}$  = 5.4 Hz, 1H, 1'), 5.57 (dt,  $^3J_{HH}$  = 8.0, 5.2 Hz, 1H, 2'), 5.09 – 4.91 (m, 3H, a', 4'), 4.91 – 4.79 (m, 2H, a'), 4.54 – 4.38 (m, 2H, e), 4.27 (d,  $^3J_{HH}$  = 4.1 Hz, 1H, 1), 4.21 (t,  $^3J_{HH}$  = 4.5 Hz, 1H, 3'), 4.17 (t,  $^3J_{HH}$  = 6.6 Hz, 2H, m), 4.14 (t,  $^3J_{HH}$  = 4.1 Hz, 1H, 2), 4.09 – 3.99 (m, 4H, 3, 4, 5, 5'), 3.38 (s, 3H, -OMe), 3.06 (q,  $^3J_{HH}$  = 7.4 Hz, 6H, Et<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>), 2.56 (t,  $^3J_{HH}$  = 7.4 Hz, 4H, i'), 1.64 (ddt,  $^2J_{HH}$  = 15.1, 11.5 Hz,  $^3J_{HH}$  = 7.1 Hz, 6H, j', n), 1.45 – 1.21 (m, 20H, o, p, q, r, K', l', m'), 1.16 (t,  $^3J_{HH}$  = 7.3 Hz, 9H, Et<sub>2</sub>N-CH<sub>3</sub>), 0.87 (t,  $^3J_{HH}$  = 7.0 Hz, 9H, s, n').

**$^{13}C$ -NMR:** (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 171.7 (C-l, h'), 160.6 (C-d), 156.1 (C-4''/ 5''), 153.2 (C-l), 150.4 (C-6''), 149.9, 149.4 (C-f/k/b'/g'), 149.5 (C-4''/5''), 137.6 (C-b), 129.2, 129.1, 128.5 (C-g, i, c', e'), 124.3 (C-2''), 121.8, 121.7, 121.0 (C-h, j, d', f'), 85.4 (C-1), 82.4 (C-4, 4'), 80.9 (C-2), 78.2 (C-3), 76.7 (C-2, 2'), 70.7 (C-3'), 68.5 (C-m, a', 16), 57.8 (C-OMe),

45.5 (C-Et<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>), 41.7 (C-e), 33.4 (C-i'), 31.1, 30.9, 28.2, 27.9, 25.1, 21.9 (C-o, p, q, r, j', k', l', m'), 28.0, 24.3 (C-n, i'), 13.9 (C-s, n'), 8.5 (C-Et<sub>2</sub>N-CH<sub>3</sub>).

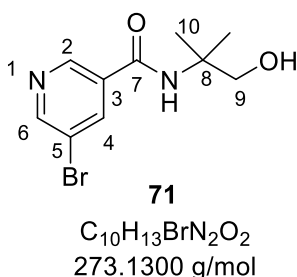
<sup>31</sup>P-NMR (243 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm]: -1.97 (s, P-2'), -11.21 (d, <sup>2,2</sup>J<sub>PP</sub> = 19.8 Hz, P-5'α), -11.43 (d, <sup>2,2</sup>J<sub>PP</sub> = 19.9 Hz, P-5'β).

**HRMS-ESI:** (m/z) berechnet für C<sub>63</sub>H<sub>83</sub>N<sub>7</sub>O<sub>24</sub>P<sub>3</sub>S [M]<sup>-</sup> 1446.4429, gefunden: 1446.4408.

## 7.6.4 Synthese des 5-Pyridin-ACB-NAADP-Derivats 68

### 7.6.4.1 Synthese von 5-Bromo-*N*-(1-hydroxy-2-methylpropan-2-yl)nicotinamid 71

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 1.65 g (8.19 mmol, 1.00 Äquiv.) 5-Bromnicotinsäure **70** in 15 mL Thionylchlorid gelöst und 2 Stunden zum Sieden erhitzt. Anschließend wurden die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 10 mL abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und zu einer 0 °C kalten Lösung aus 2.35 mL (24.6 mmol, 3.00 Äquiv.) 2-Amino-2-methylpropan-1-ol in 10 mL abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> getropft. Nach 48 Stunden wurden die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (EE) gereinigt.



**Ausbeute:** 1.9 g (7.0 mmol, 85 %) eines farblosen Feststoffs.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.034 (EE).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 8.90 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.8 Hz, 1H, 2), 8.82 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.2 Hz, 1H, 6), 8.38 (t, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.1 Hz, 1H, 4), 7.90 (s, 1H, -NH), 4.80 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.1 Hz, 1H, -OH), 3.52 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.1 Hz, 2H, 9), 1.30 (s, 6H, 10).

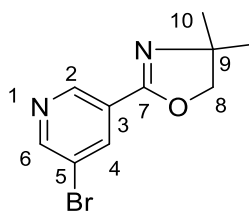
**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 163.5 (C-7), 152.0 (C-6), 147.2 (C-2), 137.4 (C-4), 132.7 (C-3), 119.8 (C-5), 66.7 (C-9), 55.5 (C-8), 23.5 (C-10).

**IR:** (Film) [cm<sup>-1</sup>]: 3343, 3204, 3050, 2997, 2972, 2925, 2872, 2713, 2458, 1666, 1587, 1564, 1536, 1474, 1453, 1416, 1392, 1363, 1318, 1275, 1237, 1193, 1172, 1134, 1106, 1047, 1023, 986, 945, 906, 892, 801, 760, 735, 692, 655, 586, 511, 461, 433, 410.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 273.0233, gefunden: 273.0238.

#### 7.6.4.2 Synthese von 3-Bromo-5-(4,4'-dimethyl-1,3-oxazolin-2-yl)pyridin **72**

Die Verbindung **71** (1.9 g, 7.0 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde in 17 mL Thionylchlorid gelöst und bei Raumtemperatur 21 Stunden gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurden die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 10 mL abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. Die organische Phase wurde zweimal mit 2 M NaOH gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (EE) gereinigt.



**72**  
C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>BrN<sub>2</sub>O  
255.1150 g/mol

**Ausbeute:** 1.62 g (6.35 mmol, 91 %) eines farblosen Feststoffs.

**R<sub>f</sub> -Wert:** 0.50 (EE).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 8.95 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.8 Hz, 1H, 2), 8.88 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.4 Hz, 1H, 6), 8.33 (t, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.1 Hz, 1H, 4), 4.16 (s, 2H, 8), 1.30 (s, 6H, 10).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 157.8 (C-7), 152.8 (C-6), 146.8 (C-2), 137.4 (C-4), 125.3 (C-3), 120.2 (C-5), 78.7 (C-8), 67.8 (C-9), 28.0 (C-10).

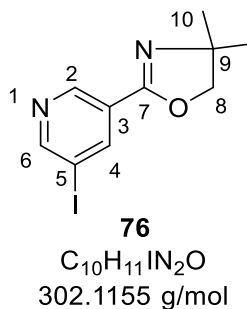
**IR:** ν [cm<sup>-1</sup>] (Film) = 3057, 3032, 2962, 2929, 2890, 2869, 1934, 1650, 1464, 1440, 1412, 1361, 1348, 1316, 1298, 1246, 1217, 1177, 1161, 1136, 1094, 1077, 1011, 987, 968, 925, 898, 876, 816, 750, 722, 688, 651, 614, 528, 497.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>BrN<sub>2</sub>O [M+H]<sup>+</sup> 255.0128, gefunden: 255.0122.

#### 7.6.4.3 Synthese von 3-Iodo-5-(4,4'-dimethyl-1,3-oxazolin-2-yl)pyridin **76**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.26 g (1.0 mmol, 1.0 Äquiv.) der Verbindung **72**, 9.5 mg (0.05 mmol, 0.05 Äquiv.) CuI und 0.3 g (2.0 mmol, 2.0 Äquiv.) NaI zusammengegeben

und unter vermindertem Druck für 10 min flüchtige Bestandteile entfernt. Anschließend wurde 1.0 mL abs. 1,4-Dioxan zugegeben und 0.016 mL (0.10 mmol, 0.10 Äquiv.) zuge-  
tropft. Die Reaktionslösung wurde 24 Stunden bei 110 °C zum Sieden erhitzt. Nach Been-  
digung der Reaktion wurde die Lösung in 25 %ige Ammoniak-Lösung gegeben und an-  
schließend 20 mL Wasser zugegeben. Die wässrige Phase wurde mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert und  
das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.



**Ausbeute:** 0.29 g (0.95 mmol, 95 %) leicht beiger Feststoffs.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.50 (PE/EE 2:3 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 8.97 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.1 Hz, 1H, 2), 8.94 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.9 Hz, 1H, 6), 8.47 (t, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.0 Hz, 1H, 4), 4.15 (s, 2H, 8), 1.29 (s, 6H, 10).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 158.3 (C-7), 158.1 (C-2), 147.3 (C-6), 143.3 (C-4), 125.8 (C-5), 94.5 (C-3), 79.2 (C-8), 68.2 (C-9), 28.6 (C-10).

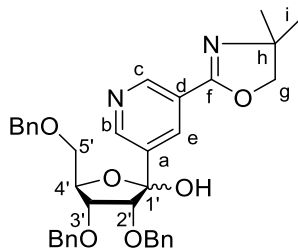
**IR:** (Film) [cm<sup>-1</sup>]: 3051, 3031, 2959, 2927, 2888, 2866, 1934, 1650, 1462, 1433, 1413, 1381, 1360, 1347, 1316, 1298, 1245, 1216, 1187, 1177, 1158, 1128, 1394, 1068, 1009, 986, 966, 921, 897, 873, 817, 738, 720, 688, 645, 614, 525, 493, 416.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>IN<sub>2</sub>O [M+H]<sup>+</sup> 302.9989, gefunden: 303.0073.

#### 7.6.4.4 Synthese von 2,3,5-Tri-O-benzyl-ribofuranosyl-1-hydroxy-1-(3-iodo-5-(4,4'-dimethyl-1,3-oxazolin-2-yl)pyridin) 69

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 2.23 g (7.37 mmol, 1.00 Äquiv.) der iodierten Verbindung **76** in 30 mL abs. THF gelöst und auf -78 °C gekühlt. Es wurden 6.8 mL (8.8 mmol, 1.2 Äquiv., 1.3 M in THF) der Isopropylmagnesiumchlorid-Lithiumchlorid-Komplex -Lösung über 20 min zugetropft. Anschließend wurden 3.39 g (8.10 mmol, 1.1 Äquiv.) des 2,3,5-Tri-O-benzyl-D-ribo-1,4-lactons in 7 mL THF gelöst und zugetropft. Die Reaktionslösung wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und für 17 Stunden gerührt. Nach

Beendigung der Reaktion wurden 10 mL Wasser zugegeben und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 2:3 v/v) gereinigt.



**69**

$C_{36}H_{38}N_2O_6$   
594.7080 g/mol

**Ausbeute:** 3.59 g (6.04 mmol, 82 %) gelbes viskoses Harz.

Es wurde ein 1:0.2 Diastereomergemisch erhalten. Es wurde im Folgenden nur ein Diastereomer ausgewertet.

**$R_f$  -Wert:** 0.30 (PE/EE 2:3 v/v).

**$^1\text{H-NMR}$ :** (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.92 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 2.1$  Hz, 1H, c), 8.78 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 2.1$  Hz, 1H, b), 8.22 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 2.1$  Hz, 1H, e), 7.45 – 7.12 (m, 15H, -OBn), 4.71 – 4.49 (m, 2H, -OBn-CH<sub>2</sub>), 4.44 – 4.25 (m, 3H, 4', -OBn-CH<sub>2</sub>), 4.22 – 4.07 (m, 2H, g), 4.06 – 3.98 (m, 1H, 2'), 3.98 – 3.85 (m, 3H, 3', -OBn-CH<sub>2</sub>), 3.73 – 3.58 (m, 2H, 5'), 1.41 – 1.19 (m, 6H, i).

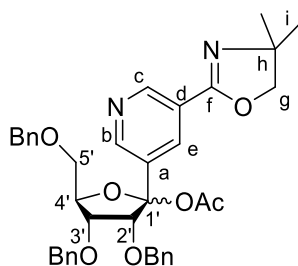
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 158.9 (C-f), 151.0 (C-b), 147.6 (C-c), 138.3, 138.0, 137.7 (C<sub>q</sub>-OBn), 134.4 (C-e), 128.2, 127.9, 127.7, 127.6, 127.3 (C-OBn), 122.5 (C-d), 104.9 (C-a), 82.2 (C-2'), 80.4 (C-4'), 80.1 (C-3'), 78.5 (C-g), 72.5 (C-OBn-CH<sub>2</sub>), 72.3 (C-OBn-CH<sub>2</sub>, 5'), 67.6 (C-h), 28.2 (C-i).

**IR:** (Film) [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 3062, 3030, 2966, 2927, 2865, 1735, 1650, 1600, 1496, 1453, 1355, 1322, 1245, 1202, 1075, 1045, 1024, 987, 963, 910, 818, 734, 723, 695, 615, 603, 462.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $C_{36}H_{39}N_2O_6$  [M+H]<sup>+</sup> 595.2803, gefunden: 595.2818.

#### 7.6.4.5 Synthese von 1-O-Acetyl-2,3,5-tri-O-benzyl-ribofuranosyl-1-(3-iodo-5-(4,4'-dimethyl-1,3-oxazolin-2-yl)pyridin) 78

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 3.59 g (6.04 mmol, 1.00 Äquiv.) der Verbindung **69** in 22 mL abs. THF gelöst. Es wurden 9.1 mL (9.1 mmol, 1.5 Äquiv., 1 M in THF) Lithium-bis(trimethylsilyl)amid bei Raumtemperatur zugetropft und für weitere 15 min gerührt. Anschließend wurden 0.9 mL (9.1 mmol, 1.5 Äquiv.) Essigsäureanhydrid zugetropft und die Reaktion 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser beendet und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 2:3 v/v) gereinigt.



**78**

$C_{38}H_{40}N_2O_7$   
636.7450 g/mol

**Ausbeute:** 2.32 g (3.64 mmol, 60 %) eines farblosen Harzes.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.45 (PE/EE 2:3 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 8.90 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.0 Hz, 1H, c), 8.71 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.2 Hz, 1H, b), 8.21 (t, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.1 Hz, 1H, e), 7.48 – 7.03 (m, 15H, -OBn), 4.71 – 4.49 (m, 5H, 4', -OBn-CH<sub>2</sub>), 4.38 (d, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.8 Hz, 2H, -OBn-CH<sub>2</sub>), 4.24 – 4.04 (m, 3H, 3', g), 3.84 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.7 Hz, 1H, 2'), 3.70 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.6 Hz, 1H, 5'), 3.63 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.6 Hz, 1H, 5'), 2.01 (s, 3H, -OAc), 1.31 (s, 3H, i), 1.29 (s, 3H, i).

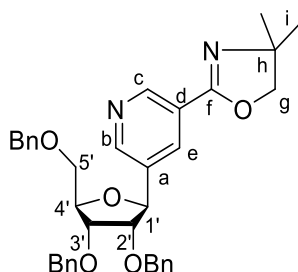
**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 168.3 (C-OAc), 158.7 (C-f), 148.4 (C-b), 147.7 (C-c), 138.4, 138.1, 137.2 (C<sub>q</sub>-OBn), 135.7 (C-1'), 131.6 (C-e), 128.2, 128.1, 128.0, 128.0, 127.8, 127.6, 127.5, 127.4, 127.3 (C-OBn), 123.1 (C-d), 104.0 (C-h), 84.3 (C-2'), 84.0 (C-4'), 78.6 (C-g), 75.3 (C-3'), 72.5, 72.2, 71.3 (C-CH<sub>2</sub>-OBn), 69.7 (C-5'), 67.7 (C- ), 28.2, 28.1 (C-i), 21.9 (C-OAc).

**IR:** (Film) [cm<sup>-1</sup>]: 3063, 3030, 2967, 2927, 2866, 1747, 1651, 1599, 1496, 1454, 1432, 1363, 1326, 1241, 1221, 1203, 1146, 1099, 1043, 1025, 1005, 977, 911, 874, 819, 735, 723, 696, 605, 545, 482, 446.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>38</sub>H<sub>41</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> 637.2908, gefunden: 637.2923.

#### 7.6.4.6 Synthese von 2,3,5-Tri-O-benzyl-ribofuranosyl-1-(3-iodo-5-(4,4'-dimethyl-1,3-oxazolin-2-yl)pyridin) 80

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 2.27 g (3.57 mmol, 1.00 Äquiv.) der acetylierten Verbindung **78** in 20 mL abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dazu wurden 17 mL (96 mmol, 30 Äquiv.) Triethylsilan und 0.65 mL (4.79 mmol, 1.5 Äquiv.) BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> getropft. Die Reaktionslösung wurde 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend durch die Zugabe von wässriger gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung beendet. Die wässrige Phase wurde dreimal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert und anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 40:1 zu 30:1 v/v) gereinigt.



**80**

C<sub>36</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>  
578.7090 g/mol

**Ausbeute:** 1.58 g (2.73 mmol, 77 %) eines leicht gelben Öls.

**R<sub>f</sub> -Wert:** 0.39 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 30:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 8.90 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.1 Hz, 1H, c), 8.69 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.1 Hz, 1H, b), 8.23 (t, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.1 Hz, 1H, e), 7.59 – 7.00 (m, 15H, -OBn), 4.99 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz, 1H, 1'), 4.79 – 4.50 (m, 5H, -CH<sub>2</sub>-OBn), 4.44 (d, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.7 Hz, 1H, -CH<sub>2</sub>-OBn), 4.30 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.7 Hz, 1H, 4'), 4.22 – 4.02 (m, 3H, 3', g), 3.96 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2, 4.9 Hz, 1H, 2'), 3.68 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.8 Hz, 1H, 5'), 3.61 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.9 Hz, 1H, 5'), 1.29 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.5 Hz, 6H, i).

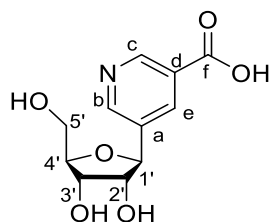
**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 158.8 (C-f), 150.1 (C-b), 147.8 (C-c), 138.2, 137.8, 136.1 (C<sub>q</sub>-OBn), 132.7 (C-e), 128.2, 128.1, 127.9, 127.7, 127.6, 127.4, 127.3 (C-OBn, d), 123.4 (C-f), 83.3 (C-2'), 81.9 (C-4'), 80.0 (C-1'), 78.5 (C-g'), 77.2 (C-3'), 72.5, 71.3, 71.0 (C-CH<sub>2</sub>-OBn), 70.1 (C-5'), 67.6 (C-h), 28.2, 28.1 (C-i).

**IR:** (Film) [cm<sup>-1</sup>]: 3062, 3030, 2964, 2866, 1736, 1651, 1596, 1496, 1453, 1422, 16352, 1321, 1291, 1245, 1196, 1074, 1025, 990, 0972, 908, 845, 817, 734, 722, 695, 614, 564, 485, 465.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>36</sub>H<sub>39</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 579.2853, gefunden: 579.2837.

#### 7.6.4.7 Synthese von 5-(β-D-Ribofuanosyl)-3-nicotinsäure **83**

Die benzylierte Verbindung **80** (0.541 g, 0.935 mmol, 1.00 Äquiv.) wurde in 6.0 mL 5 M Salzsäure gelöst und zum Sieden erhitzt. Nach 27 Stunden wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur abgekühlt und mit einer 2 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> auf pH 8 eingestellt. Die wässrige Lösung wurde mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gewaschen und anschließend mit einer 2 M Salzsäure neutralisiert. Unter vermindertem Druck wurde das Wasser entfernt und das Rohprodukt mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-C18-Kieselgel gereinigt.



**83**  
C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>6</sub>  
255.2260 g/mol

**Ausbeute:** 0.328 g (1.29 mmol, 138 %) eines beigen Feststoffs. Aufgrund der Ausbeute wird davon ausgegangen, dass sich Natriumchlorid-Salze im Produkt befinden.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>): δ [ppm] = 8.98 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.0 Hz, 1H, c), 8.62 (dd, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.1, 0.6 Hz, 1H, b), 8.46 – 8.33 (m, 1H, e), 4.81 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3 Hz, 1H, 1'), 4.09 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.5, 3.5 Hz, 1H, 3'), 4.03 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.8, 3.6 Hz, 1H, 4'), 3.90 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3, 5.5 Hz, 1H, 2'), 3.82 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 12.0, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.6 Hz, 1H, 5'), 3.77 – 3.70 (m, 1H, 5').

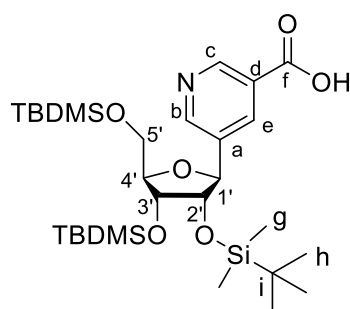
**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>): δ [ppm] = 172.5 (C-f), 150.4 (C-c), 149.2 (C-b), 137.89 (C-a), 136.4 (C-e), 135.0 (C-d), 87.2 (C-4'), 82.8 (C-1'), 79.3 (C-2'), 73.3 (C-3'), 63.7 (C-5').

**IR:** (Film) [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 3228, 2919, 1609, 1593, 1556, 1437, 1379, 1214, 1110, 1022, 824, 768, 694, 673, 613, 566, 531.

**HRMS-ESI:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{NO}_6$  [M-H]<sup>-</sup>: 254.0670, gefunden: 254.0646.

#### 7.6.4.8 Synthese von (2,3,5-Tri-O-[tertbutyldimethylsilyl]- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-3-nicotinsäure **84**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.4 g (1.6 mmol, 1.0 Äquiv.) Verbindung **83** in 20 mL abs. DMF gelöst und 1.4 g (9.3 mmol, 6.0 Äquiv.) TBDMS-Cl und 0.63 g (9.3 mmol, 6.0 Äquiv.) Imidazol zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 48 Stunden bei 60 °C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. Die organische Phase wurde mit wässriger, gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und wässriger, gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 3:1 v/v mit 2 % Essigsäure) gereinigt.



**84**

$\text{C}_{29}\text{H}_{55}\text{NO}_6\text{Si}_3$   
598.0150 g/mol

**Ausbeute:** 0.703 g (1.18 mmol, 76 %) eines farblosen Feststoffs.

**R<sub>f</sub> -Wert:** 0.55 (PE/EE 3:1 v/v + 1vol % Essigsäure).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.99 (d,  $^4J_{\text{HH}} = 2.0$  Hz, 1H, c), 8.74 (d,  $^4J_{\text{HH}} = 2.1$  Hz, 1H, b), 8.26 (t,  $^4J_{\text{HH}} = 2.1$  Hz, 1H, e), 4.75 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 8.6$  Hz, 1H, 1'), 4.11 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 4.5$  Hz, 1H, 3'), 4.02 – 3.98 (m, 1H, 4'), 3.94 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 8.6, 4.4$  Hz, 1H, 2'), 3.82 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 11.2, ^3J_{\text{HH}} = 3.6$  Hz, 1H, 5'), 3.77 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 11.2, ^3J_{\text{HH}} = 2.8$  Hz, 1H, 5'), 0.92 (s, 9H, h), 0.89 (s, 9H, h), 0.75 (s, 9H, h), 0.11 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 7.7, 6.7$  Hz, 13H, g), -0.14 (s, 3H, g), -0.57 (s, 3H, g).

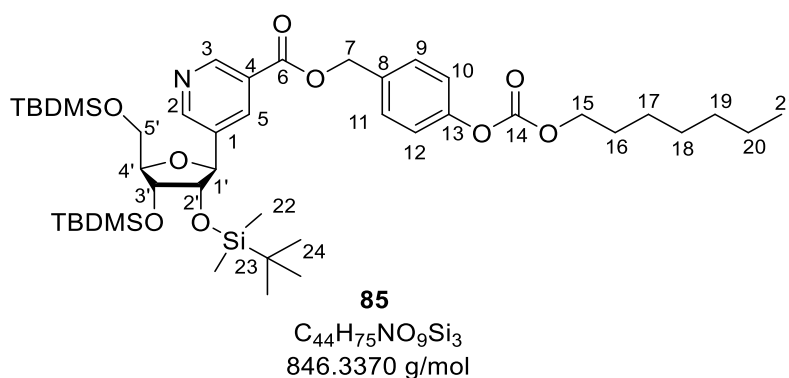
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 166.1 (C-f), 151.8 (C-b), 149.7 (C-c), 134.9 (C-e), 86.7 (C-4'), 79.3 (C-1'), 79.0 (C-2'), 74.1 (C-3'), 63.3 (C-5'), 25.8, 25.7, 25.5 (C-h), 17.9, 17.8, 17.5 (C-i), -4.5, -4.7, -4.8, -5.6, -5.7, -5.8 (C-g).

**IR:** (Film) [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 2951, 2929, 2896, 2857, 2479, 1872, 1713, 1589, 1471, 1462, 1423, 1388, 1360, 1288, 1251, 1224, 1150, 1107, 1057, 1005, 963, 937, 914, 876, 831, 810, 771, 712, 698, 672, 618, 599, 538.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{29}\text{H}_{56}\text{NO}_6\text{Si}_3$  [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup> 598.3410, gefunden: 598.3427.

#### 7.6.4.9 Synthese von (2,3,5-Tri-O-[tertbutyldimethylsilyl]- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-3-nicotinsäure-4-(heptanoyloxycarboxy)benzylester **85**

Unter Inertgasatmosphäre wurden 0.36 g (0.60 mmol, 1.0 Äquiv.) der Verbindung **84** in 7 mL abs. THF gelöst und 0.11 mL (0.66 mmol, 1.1 Äquiv.) 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid **39**, sowie 0.090 mL (0.66 mmol, 1.1 Äquiv.) Triethylamin zugetropft. Nach der Zugabe von 0.03 g (0.2 mmol, 0.3 Äquiv.) 4-DMAP wurde die in 2 mL abs. THF gelöste Carbonat Maske **59** (0.23 g, 0.9 mmol, 1.5 Äquiv.) langsam zugetropft und die Reaktionslösung bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von wässriger, gesättigter Natriumchloridlösung beendet und die wässrige Phase dreimal mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 30:1 zu 20:1 v/v) gereinigt.



**Ausbeute:** 0.52 g (0.62 mmol, quant.) eines leicht gelben viskosen Öls.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.14 (PE/EE 20:1 v/v).

**$^1\text{H-NMR}$ :** (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 9.07 (d,  $^4J_{\text{HH}} = 2.1$  Hz, 1H, 3), 8.80 (d,  $^4J_{\text{HH}} = 2.1$  Hz, 1H, 2), 8.25 (t,  $^4J_{\text{HH}} = 2.1$  Hz, 1H, 5), 7.68 – 7.47 (m, 2H, 9, 11), 7.34 – 7.17 (m, 2H, 10, 12), 5.68 – 5.22 (m, 2H, 7), 4.77 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 8.5$  Hz, 1H, 1'), 4.19 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 6.6$  Hz, 2H, 15), 4.11 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 4.5$  Hz, 1H, 3'), 4.08 – 3.97 (m, 2H, 4'), 3.92 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 8.6, 4.4$  Hz, 1H, 2'),

3.88 – 3.70 (m, 2H, 5'), 1.69 – 1.62 (m, 2H, 16), 1.32 – 1.24 (m, 8H, 17, 18, 19, 20), 0.92 (s, 9H, 24), 0.86 (s, 12H, 24, 21), 0.74 (s, 9H, 24), 0.28 – -0.01 (m, 12H, 22, 24), -0.14 (s, 3H, 22), -0.57 (s, 3H, 22).

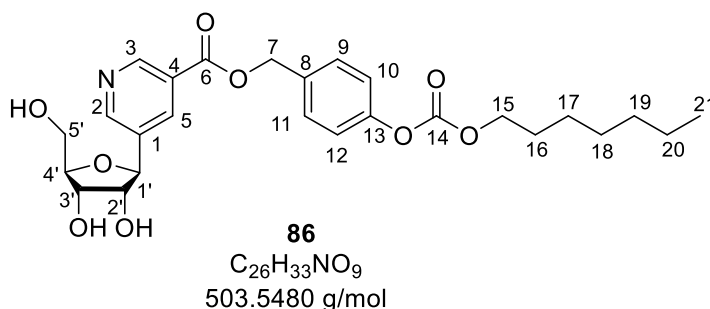
**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 164.5 (C-6), 153.0 (C-14), 152.3 (C-2), 150.6 (C-8), 149.6 (C-c), 136.1 (C-1), 134.6 (C-5), 133.6 (C-13), 129.5 (C-9, 11), 125.2 (C-4), 121.4 (C-10, 12), 86.5 (C-4'), 79.2 (C-1'), 78.9 (C-2'), 74.0 (C-3'), 68.6 (C-15), 65.9 (C-7), 63.3 (C-5'), 31.1, 28.2, 25.1, 21.9 (C-17, 18, 19, 20), 25.7, 25.4 (C-24), 17.9, 17.7, 17.4 (C-23), 13.8 (C-21), -4.5, -4.6, -4.7 (C-22).

**IR:** (Film) [cm<sup>-1</sup>]: 2953, 2928, 2856, 1762, 1727, 1600, 1578, 1510, 1471, 1462, 1429, 1388, 1361, 1250, 1218, 1199, 1150, 1106, 1026, 1004, 965, 937, 909, 871, 831, 773, 719, 701, 671, 639, 597, 536, 501.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>44</sub>H<sub>76</sub>NO<sub>9</sub>Si<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 846.4822, gefunden: 846.4833.

#### 7.6.4.10 Synthese von 2-(2,3,5-Tri-hydroxy-β-D-ribofuranosyl)-nicotinsäure-4-(heptanoyloxy)-benzylester **86**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.52 g (0.61 mmol, 1.0 Äquiv.) Verbindung **85** in 15 mL abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und 1.61 mL (8.60 mmol, 14.0 Äquiv., 37 % HF) TREAT-HF langsam zugetropft. Nach 20 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von festem Kieselgur beendet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 20:1 v/v) gereinigt.



**Ausbeute:** 0.23 g (0.46 mmol, 76 %) einer farblosen Flüssigkeit.

**R<sub>f</sub> -Wert:** 0.20 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 20:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 9.05 – 8.84 (m, 1H, 3), 8.72 (s, 1H, 2), 8.26 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.3 Hz, 1H, 5), 7.40 (m, 2H, 9, 11), 7.16 (m, 2H, 10, 12), 5.27 (s, 2H, 7), 4.73 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, 1H, 1'), 4.22 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7 Hz, 2H, 15), 4.13 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.8 Hz, 1H, 3'), 4.01 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub>

=

3.9 Hz, 1H, 4'), 3.89 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 6.3$  Hz, 1H, 2'), 3.80 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 12.2$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 3.5$  Hz, 1H, 5'), 3.71 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 12.2$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 4.0$  Hz, 1H, 5'), 1.72 (p,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8$  Hz, 2H, 16), 1.55 – 1.15 (m, 8H, 17, 18, 19, 20), 1.10 – 0.63 (m, 3H, 21).

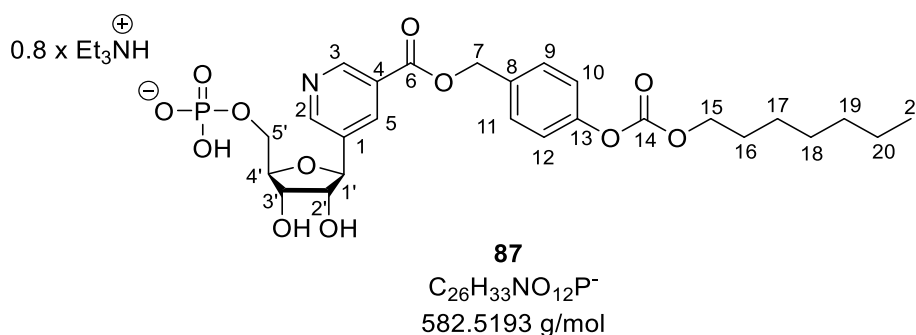
$^{13}\text{C-NMR}$ : (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 164.9 (C-6), 153.8 (C-14), 151.2 (C-8), 151.0 (C-2), 149.5 (C-3), 136.6 (C-1), 135.5 (C-5), 133.3 (C-13), 129.8 (C-9, 11), 125.9 (C-4), 121.5 (C-10, 12), 85.5 (C-4'), 81.4 (C-1'), 77.5 (C-2'), 71.6 (C-3), 69.3 (C-15), 66.8 (C-7), 62.7 (C-5'), 31.8, 29.0, 25.7, 22.6 (C-17, 18, 19, 20), 28.6 (C-16), 14.2 (C-21).

**IR**: (Film) [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 3473, 3351, 2956, 2925, 2856, 1758, 1574, 1508, 1448, 1329, 1304, 1296, 1247, 1196, 1123, 1110, 1070, 1032, 1017, 954, 935, 904, 890, 820, 763, 700, 606, 529, 504, 432.

**HRMS-ESI**<sup>+</sup>: (m/z) berechnet für  $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{NO}_9$  [M+H]<sup>+</sup> 504.2228, gefunden: 504.2269.

#### 7.6.4.11 Synthese von [2-(2,3,5-Tri-hydroxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-nicotinsäure-4-(heptanoyloxy)-benzylester]-5-monophosphat **87**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.11 g (0.22 mmol, 1.0 Äquiv.) der Verbindung **86** wurden in 5 mL Trimethylphosphat **44** gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden langsam 0.21 mL (2.2 mmol, 10 Äquiv.) Phosphorylchlorid **45** zugetropft und die Reaktionslösung 1.5 Stunden bei 0 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 5 mL 1 M TEAB-Puffer beendet. Nach 25-minütigem Rühren bei 0 °C wurde die wässrige Lösung einmal mit Hexan gewaschen und anschließend lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel gereinigt.



**Ausbeute**: 0.133 g (0.194 mmol, 89 %) eines farblosen Feststoffs.

$^1\text{H-NMR}$ : (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 9.03 (d,  $^4J_{\text{HH}} = 2.1$  Hz, 1H, 3), 8.84 (d,  $^4J_{\text{HH}} = 2.1$  Hz, 1H, 2), 8.24 (t,  $^4J_{\text{HH}} = 2.2$  Hz, 1H, 5), 7.65 – 7.43 (m, 2H, 9, 11), 7.38 – 7.12 (m, 2H, 10),

12), 5.40 (s, 2H, 7), 4.71 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 7.6$  Hz, 1H, 1'), 4.19 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 6.6$  Hz, 2H, 15), 4.10 – 3.91 (m, 2H, 3', 4'), 3.83 (m, 1H, 2'), 3.00 – 2.89 (m, 6H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 1.66 (tt,  $^3J_{\text{HH}} = 8.1$ , 6.6 Hz, 2H, 16), 1.46 – 1.19 (m, 8H, 17, 18, 19, 20), 1.13 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 7.2$  Hz, 9H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>), 0.86 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz, 3H, 21).

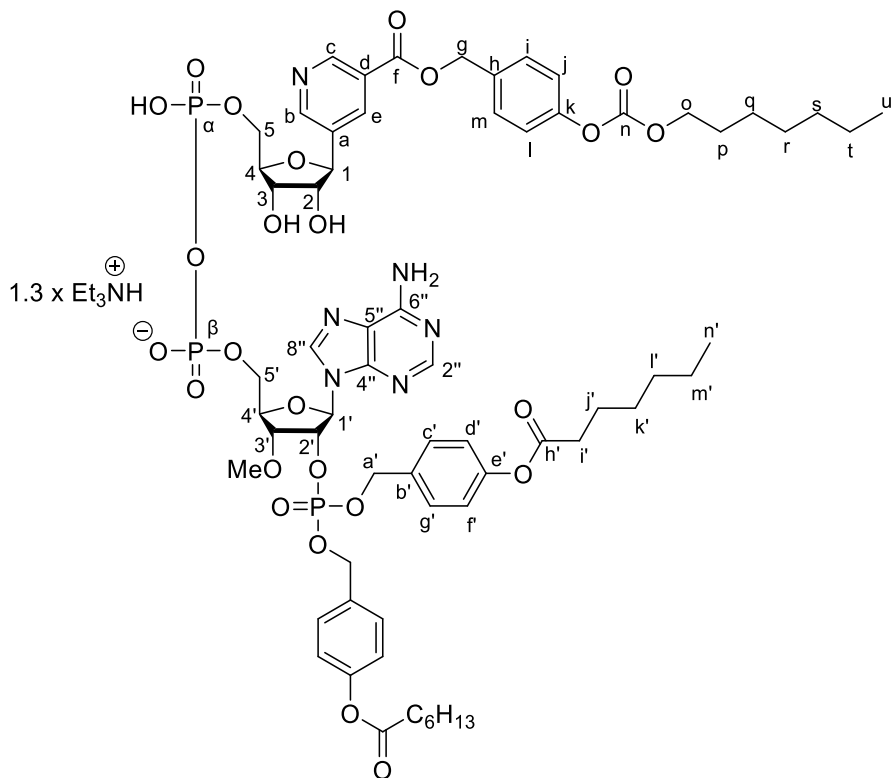
**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 164.7 (C-6), 153.1 (C-14), 151.6 (C-2), 150.6 (C-4), 149.0 (C-3), 134.1 (C-5), 129.4 (C-9, 11), 125.1 (C-), 121.4 (C-10, 12), 84.2 (C-3'/4'), 80.1 (C-1'), 77.5 (C-2'), 71.7 (C-3'/4'), 68.6 (C-15), 65.9 (C-7), 64.7 (C-5'), 45.3 (C-Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 31.1, 28.2, 25.1, 21.9 (C-17, 18, 19, 20), 27.9 (C-16), 13.9 (C-21).

**<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm]: -0.12 (s).

**HRMS-ESI:** (m/z) berechnet für C<sub>26</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>12</sub>P [M-H]<sup>-</sup>: 582.1746, gefunden: 582.1722.

#### 7.6.4.12 Synthese von 5-N-3'-OMe-MASTER-NAADP 68

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.071 mL (0.514 mmol, 16.0 Äquiv.) abs. Et<sub>3</sub>N in 1.0 mL abs. Acetonitril gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 0.089 mL (0.643 mmol, 20.0 Äquiv.) TFAA langsam zugetropft und 15 min bei 0 °C gerührt. Das Monophosphat **87** (0.018 g, 0.030 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde in 1.0 mL abs. Acetonitril gelöst und die TFAA-Lösung bei 0 °C zugetropft. Nach 10 min Rühren bei Raumtemperatur wurden alle flüchtigen Bestandteile entfernt. Der Rückstand wurde in 1.0 mL abs. Acetonitril gelöst und es wurden 0.015 mL (0.16 mmol, 6.0 Äquiv.) NMI und 0.05 mL (0.32 mmol, 10.0 Äquiv.) abs. Et<sub>3</sub>N zugetropft und die Lösung 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Das 3'-OMe-Adenosinderivat **34** (0.026 g, 0.029 mmol, 0.9 Äquiv.) wurde in 1.0 mL abs. Acetonitril und 0.2 mL abs. DMF gelöst und zu der Reaktionslösung getropft. Die Reaktion wurde 5.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend durch die Entfernung aller flüchtigen Bestandteile beendet. Das Rohprodukt wurde in 1 M TEAB-Puffer aufgenommen und mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-C18-Kieselgel gereinigt.



68

$C_{65}H_{84}N_6O_{25}P_3^-$

1441.3184 g/mol

**Ausbeute:** 0.024 g (0.015 mmol, 52 %) eines farblosen Feststoffs.

**$^1H$ -NMR:** (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 9.02 (d,  $^4J_{HH} = 2.1$  Hz, 1H, c), 8.83 (d,  $^4J_{HH} = 2.1$  Hz, 1H, b), 8.46 (s, 1H, 2''), 8.25 (t,  $^3J_{HH} = 2.2$  Hz, 1H, e), 8.14 (s, 1H, 8''), 7.63 – 7.50 (m, 2H, i, m), 7.35 – 7.29 (m, 2H, c', g'), 7.25 (m, 4H, j, l, c', g'), 7.10 – 7.06 (m, 2H, d', f'), 7.06 – 7.01 (m, 2H, d', f'), 6.20 (d,  $^3J_{HH} = 5.2$  Hz, 1H, 1'), 5.56 (dt,  $^3J_{HH} = 9.5, 5.1$  Hz, 1H, 2'), 5.39 (s, 2H, g), 5.10 – 4.90 (m, 2H, a'), 4.91 – 4.81 (m, 2H, a'), 4.74 (d,  $^3J_{HH} = 7.2$  Hz, 1H, 1), 4.27 (dt,  $^3J_{HH} = 4.2$  Hz, 1H, 4'), 4.24 – 4.12 (m, 4H, 3, o, 4), 4.05 (dd,  $^2J_{HH} = 14.7$  Hz,  $^3J_{HH} = 4.5$  Hz, 5H, 5', 5; 3), 3.78 (dd,  $^3J_{HH} = 7.3, 4.6$  Hz, 1H, 2), 3.39 (s, 3H, -OMe), 3.09 (q,  $^3J_{HH} = 7.3, 4.6$  Hz, 5H, Et<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>), 2.56 (t,  $^3J_{HH} = 7.4$  Hz, 4H, i'), 1.72 – 1.56 (m, 6H, p, j'), 1.40 – 1.20 (m, 20H, q, r, s, t, k', l', m'), 1.17 (t,  $^3J_{HH} = 7.3$  Hz, 8H, Et<sub>2</sub>N-CH<sub>3</sub>), 0.92 – 0.81 (m, 9H, u, n').

**$^{13}C$ -NMR:** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 171.8 (C-h'), 164.7 (C-f), 153.3 (C-n), 150.8, 152.9, 150.5 (C-h, k, b', e'), 133.7 (C-d), 129.5, 129.2, 129.1 (C, i, m, c', g'), 121.8, 121.4, 121.1 (C-j, l, d', f'), 85.4 (C-1'), 83.4 (C-3), 80.8 (C-4'), 80.3 (C-1), 78.1 (C-3'), 77.1 (C-2), 76.5 (C-2'), 70.8 (C-4), 68.3 (C-o), 68.0 (C-a'), 65.7 (C-5, 5'), 65.6 (C-g), 57.3 (C-OMe), 45.7 (C-Et<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>), 30.9 (C-i'), 29.5, 28.6, 27.8, 21.9 (C-q, r, s, t, k', l', m'), 28.0, 24.3 (p, j'), 13.9 (C-u, n'), 8.6 (C-Et<sub>2</sub>N-CH<sub>3</sub>).

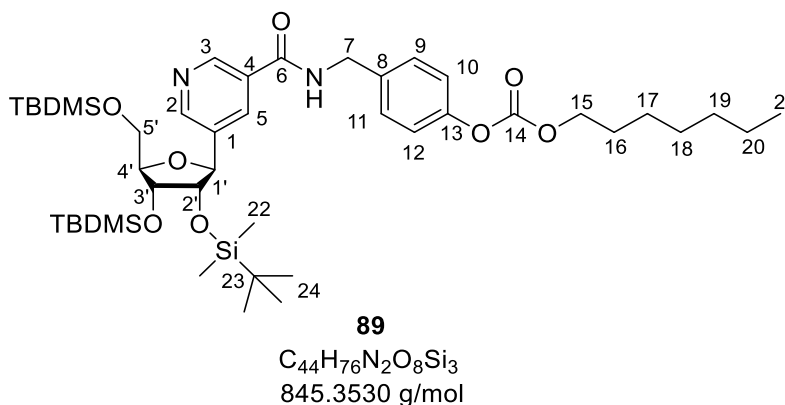
<sup>31</sup>P-NMR (243 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm]: -1.98 (s, P-2'), -10.91 (d, <sup>2,2</sup>J<sub>PP</sub> = 18.6 Hz, P-5'α), -11.10 (d, <sup>2,2</sup>J<sub>PP</sub> = 18.4 Hz, P-5'β).

HRMS-ESI: (m/z) berechnet für C<sub>65</sub>H<sub>84</sub>N<sub>6</sub>O<sub>25</sub>P<sub>3</sub> [M-H]<sup>-</sup> 1441.4704, gefunden: 1441.4710.

### 7.6.5 Synthese des 5-Pyridin-ACB-NADP-Derivats **88**

#### 7.6.5.1 Synthese von (2,3,5-Tri-O-[*tert*-butyldimethylsilyl]-β-D-ribofuranosyl)-3-nicotinamid-4-(heptanoyloxycarboyl)benzylamid **89**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.31 g (0.50 mmol, 1.0 Äquiv.) der TBDMS-geschützten Carbonsäure **84** in 5 mL abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. Dazu wurden 0.44 g (1.15 mmol, 2.0 Äquiv.) HATU und 0.29 mL (1.73 mmol, 3.4 Äquiv.) DIPEA gegeben und die Reaktionslösung 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die in 5 mL abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöste Amino-ACB-Maske **57** zugetropft sowie 0.02 g (0.15 mmol, 0.30 Äquiv.) 4-DMAP zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 21 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion anschließend durch die Zugabe von wässriger gesättigter Natriumchloridlösung beendet. Die wässrige Phase wurde dreimal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 3:1 v/v) gereinigt.



**Ausbeute:** 0.30 g (0.35 mmol, 70 %) eines leicht gelblichen Öls.

**R<sub>f</sub> -Wert:** 0.48 (PE/EE 2:1 v/v).

<sup>1</sup>H-NMR: (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 9.21 (s, 1H, 3), 8.77 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.9 Hz, 1H, 2), 8.29 (s, 1H, 5), 7.50 – 7.32 (m, 2H, 9, 11), 7.21 – 7.04 (m, 2H, 10, 12), 4.88 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.5 Hz, 1H, 1'), 4.65 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 14.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.6 Hz, 2H, 7), 4.24 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7 Hz, 2H, 15), 4.14 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.3 Hz, 1H, 3'), 4.08 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.5 Hz, 1H, 4'), 3.85 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.6, 4.3 Hz, 1H, 2'),

3.77 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 3.4$  Hz, 2H, 5'), 1.90 – 1.69 (m, 2H, 16), 1.52 – 1.37 (m, 2H, 17), 1.38 – 1.23 (m, 6H, 18, 19, 20), 0.94 (s, 9H, 24), 0.89 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 4.9$  Hz, 12H, 21, 24), 0.81 (s, 9H, 24), 0.15 – 0.05 (m, 12H, 22), -0.10 (s, 3H, 22), -0.48 (s, 3H, 22).

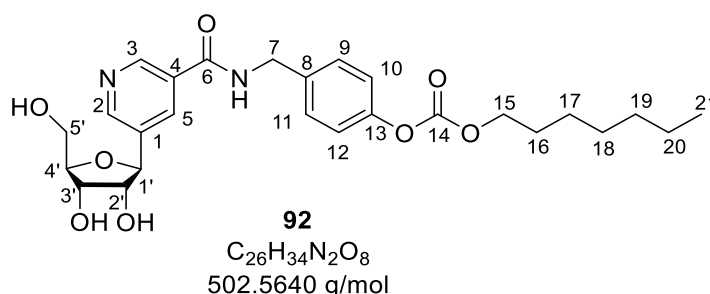
$^{13}\text{C-NMR}$ : (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 153.8 (C-14), 150.7 (C-13), 135.8 (C-8), 129.5 (C-9, 11), 121.6 (C-10, 12), 87.3 (C-4'), 79.8 (C-1'), 79.6 (C-2'), 74.4 (C-3'), 69.2 (C-15), 63.9 (C-5'), 43.7 (C-7), 31.8, 29.0, 22.6 (C-18, 20, 21), 28.7 (C-15), 26.1, 26.0, 25.9 (C-24), 25.8 (C-17), 18.5, 18.2, 18.0 (C-23), 14.2 (C-21), -4.1, -4.3, -4.4, -5.1, -5.3, -5.4 (C-22).

**IR**: (Film) [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 2953, 2928, 2856, 1761, 1649, 1599, 1536, 1509, 1471, 1462, 1429, 1389, 1361, 1249, 1216, 1150, 1108, 1079, 1026, 1017, 1005, 966, 937, 873, 832, 773, 706, 670, 611, 533, 502.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>**: (m/z) berechnet für  $\text{C}_{44}\text{H}_{77}\text{N}_2\text{O}_8\text{Si}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  845.4982, gefunden: 845.4999.

### 7.6.5.2 Synthese von 2-(2,3,5-Tri-hydroxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-nicotinsäure-4-(heptanoyloxy)-benzylamid **92**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.29 g (0.34 mmol, 1.0 Äquiv.) der maskierten Verbindung **89** in 10 mL abs.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. Anschließend wurde langsam 1.0 mL (6.2 mmol, 18 Äquiv., 37 %) Triethylamin-trihydrofluorid zur Reaktionslösung zugetropft und bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von festem Kieselgur beendet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  19:1 zu 9:1 v/v) gereinigt.



**Ausbeute**: 0.16 g (0.32 mmol, 94 %) einer farblosen viskosen Flüssigkeit.

**R<sub>f</sub>-Wert**: 0.21 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1 v/v).

$^1\text{H-NMR}$ : (600 MHz,  $\text{MeOD-}d_4$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.94 (d,  $^4J_{\text{HH}} = 2.1$  Hz, 1H, 3), 8.79 (d,  $^4J_{\text{HH}} = 2.0$  Hz, 1H, 2), 8.39 (t,  $^4J_{\text{HH}} = 2.1$  Hz, 1H, 5), 7.52 – 7.33 (m, 2H, 9, 11), 7.28 – 7.00 (m, 2H, 10, 12), 4.82 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 7.6$  Hz, 1H, 1'), 4.60 (s, 2H, 7), 4.22 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 6.6$  Hz, 2H, 15), 4.10 (dd,

$^3J_{\text{HH}} = 5.5, 3.3 \text{ Hz}$ , 1H, 3'), 4.04 (dt,  $^3J_{\text{HH}} = 4.4, 3.4 \text{ Hz}$ , 1H, 4'), 3.88 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 7.6, 5.5 \text{ Hz}$ , 1H, 2'), 3.81 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 12.0 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 3.6 \text{ Hz}$ , 1H, 5'), 3.74 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 12.0 \text{ Hz}$ ,  $^3J_{\text{HH}} = 4.4 \text{ Hz}$ , 1H, 5'), 1.84 – 1.59 (m, 2H, 16), 1.52 – 1.24 (m, 8H, 17, 18, 19, 20), 0.91 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 7.0 \text{ Hz}$ , 3H, 21).

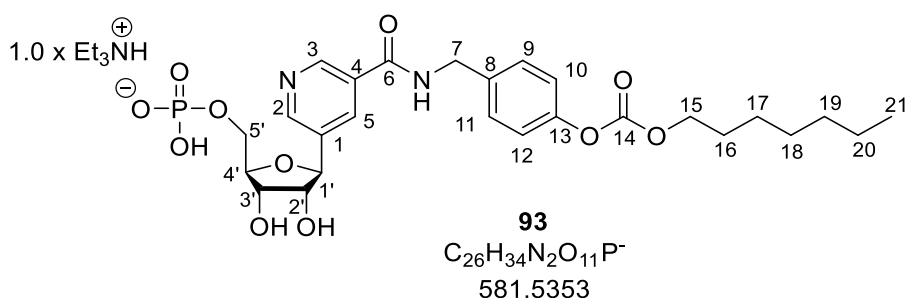
$^{13}\text{C-NMR}$ : (151 MHz, MeOD- $d_4$ ):  $\delta$  [ppm] = 167.4 (C-6), 155.3 (C-14), 151.9 (C-8), 150.2 (C-2), 147.9 (C-3), 138.9 (C-1), 137.7 (C-13), 135.1 (C-5), 131.8 (C-4), 129.9 (C-9, 11), 122.3 (C-10, 12), 87.4 (C-4'), 82.1 (C-1'), 79.2 (C-2'), 73.0 (C-3'), 70.0 (C-15), 63.4 (C-5'), 44.0 (C-7), 32.8, 29.6, 26.7, 23.5 (C-17, 18, 19, 20), 30.0 (C-16), 14.4 (C-21).

**IR:** (Film) [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 3301, 2927, 2857, 1757, 1646, 1600, 1542, 1508, 1457, 1432, 1393, 1360, 1246, 1215, 1169, 1015, 917, 882, 838, 779, 763, 707, 612, 519, 416.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_8$  [M+H]<sup>+</sup> 503.2388, gefunden: 503.2448.

### 7.6.5.3 Synthese von [2-(2,3,5-Tri-hydroxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-nicotinsäure-4-(heptan-oyloxy)-benzylamid]-5-monophosphat **93**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 0.06 g (0.12 mmol, 1.0 Äquiv.) des Nucleosids **93** in 1 mL Trimethylphosphat **44** gelöst. Dazu wurden bei 0 °C langsam 0.11 mL (1.2 mmol, 10 Äquiv.) Phosphorylchlorid **45** zugetropft. Nach 2 Stunden bei 0 °C konnte mittels HPLC ein vollständiger Umsatz beobachtet werden. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 4 mL 1 M TEAB-Puffer beendet. Nach 30-minütigem Rühren bei 0 °C wurde die wässrige Lösung mit Hexan gewaschen und anschließend lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-C18-Kieselgel gereinigt.



**Ausbeute:** 0.06 g (0.08 mmol, 70 %) eines farblosen Feststoffs.

$^1\text{H-NMR}$ : (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.94 (d,  $^4J_{\text{HH}} = 2.2 \text{ Hz}$ , 1H, 3), 8.64 (m, 1H, 5), 8.59 (d,  $^4J_{\text{HH}} = 1.9 \text{ Hz}$ , 1H, 2), 7.54 – 7.34 (m, 2H, 9, 11), 7.28 – 7.05 (m, 2H, 10, 12), 4.71 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 7.6 \text{ Hz}$ , 1H, 1'), 4.56 – 4.34 (m, 2H, 7), 4.17 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 6.6 \text{ Hz}$ , 2H, 15), 4.08 – 3.93

(m, 3H, 3', 4', 5'), 3.89 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 7.7, 4.8$  Hz, 1H, 2'), 3.82 (dt,  $^2J_{\text{HH}} = 11.2$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 4.3$  Hz, 1H, 5'), 3.01 (q,  $^3J_{\text{HH}} = 7.2$  Hz, 6H, Et<sub>3</sub>NH-CH<sub>2</sub>), 1.64 (tt,  $^3J_{\text{HH}} = 6.9$  Hz, 2H, 16), 1.44 – 1.22 (m, 8H, 17, 18, 19, 20), 1.14 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 7.3$  Hz, 9H, Et<sub>3</sub>NH-CH<sub>3</sub>), 1.00 – 0.67 (m, 3H, 21).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>):  $\delta$  [ppm] = 151.5 (C-2), 149.9 (C-3), 132.2 (C-5), 129.3 (C-8), 128.6 (C-7, 11), 121.7 (C-13), 120.9 (C-10, 12), 84.1 (C-3'/4'), 80.4 (C-1'), 77.9 (C-2'), 72.2 (C-3'/4'), 68.4 (C-15), 64.9 (C-5'), 45.4 (C-Et<sub>3</sub>NH-CH<sub>2</sub>), 31.1, 28.2, 25.1, 22.0 (C-17, 18, 19, 20), 27.9 (C-16), 13.9 (C-21), 8.5 (C-Et<sub>3</sub>NH-CH<sub>3</sub>).

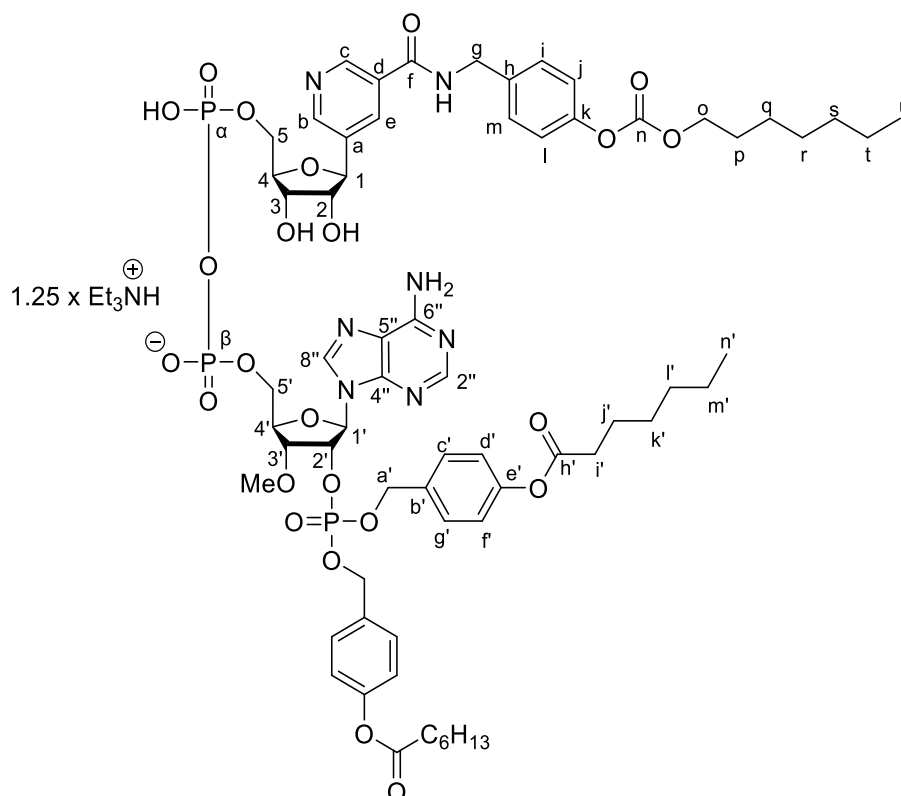
**<sup>31</sup>P-NMR** (202 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm]: 0.73 (s).

**IR:** (Film) [cm<sup>-1</sup>]: 3247, 3064, 2928, 2857, 2681, 2491, 1757, 1653, 1600, 1543, 1508, 1455, 1393, 1300, 1242, 1213, 1167, 1121, 1040, 918, 836, 809, 779, 745, 710, 635, 609, 500, 416.

**HRMS-ESI:** (m/z) berechnet für C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub>P [M-H]<sup>-</sup> 581.1906, gefunden: 581.1602.

#### 7.6.5.4 Synthese von 5-Pyridin-3'-OMe-MASTER-NADP 88

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.062 mL (0.45 mmol, 16.0 Äquiv.) abs. Et<sub>3</sub>N in 1.0 mL abs. Acetonitril gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 0.039 mL (0.28 mmol, 20.0 Äquiv.) TFAA langsam zugetropft und 15 min. bei 0 °C gerührt. Das Monophosphat **93** (0.019 g, 0.028 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde in 1.0 mL abs. Acetonitril gelöst und die TFAA-Lösung bei 0 °C zugetropft. Nach 10-minütigem Rühren bei Raumtemperatur wurden alle flüchtigen Bestandteile entfernt. Der Rückstand wurde in 1.0 mL abs. Acetonitril gelöst und es wurden 0.013 mL (0.16 mmol, 6.0 Äquiv.) NMI und 0.04 mL (0.28 mmol, 10.0 Äquiv.) abs. Et<sub>3</sub>N zugetropft und die Lösung 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Das 3'-OMe-Adenosinderivat **34** (0.023 g, 0.025 mmol, 0.9 Äquiv.) wurde in 1.0 mL abs. Acetonitril und 0.2 mL abs. DMF gelöst und zu der Reaktionslösung getropft. Die Reaktion wurde 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend durch die Entfernung aller flüchtigen Bestandteile beendet. Das Rohprodukt wurde in 1 M TEAB-Puffer aufgenommen und mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-C18-Kieselgel gereinigt.


**88**
 $C_{65}H_{85}N_7O_{24}P_3^-$   
 1440.3344 g/mol

**Ausbeute:** 0.016 g (0.01 mmol, 40 %) eines farblosen Feststoffs.

**$^1H$ -NMR:** (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 9.45 (s, 1H, -NH<sub>2</sub>), 8.92 (d,  $^3J_{HH}$  = 2.0 Hz, 1H, c), 8.59 (s, 1H, b), 8.47 (s, 1H, 2''), 8.13 (s, 1H, e), 7.42 (m, 2H, i, m), 7.37 – 7.28 (m, 3H, c', g'), 7.28 – 7.16 (m, 2H, c', g'), 7.12 – 7.05 (m, 4H, j, l, d', f'), 7.05 – 7.01 (m, 2H, d', f'), 6.19 (d,  $^3J_{HH}$  = 5.3 Hz, 1H, 1'), 5.56 (dt,  $^3J_{HH}$  = 8.1, 5.1 Hz, 1H, 2'), 5.07 – 4.90 (m, 2H, a'), 4.90 – 4.80 (m, 2H, a'), 4.74 (d,  $^3J_{HH}$  = 6.7 Hz, 1H, 1), 4.44 (d,  $^3J_{HH}$  = 5.5 Hz, 2H, g), 4.24 (dt,  $^3J_{HH}$  = 4.2 Hz, 1H, 4'), 4.18 (t,  $^3J_{HH}$  = 4.5 Hz, 1H, 3'), 4.15 (t,  $^3J_{HH}$  = 6.7 Hz, 2H, o), 4.09 (m, 2H, 3, 5'), 4.04 (d,  $^2J_{HH}$  = 17.3 Hz, 1H, 5', 4), 3.88 (dd,  $^3J_{HH}$  = 6.8, 4.8 Hz, 1H, 2'), 3.34 (s, 3H, -OMe), 3.06 (q,  $^3J_{HH}$  = 7.3 Hz, 7H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 2.56 (t,  $^3J_{HH}$  = 7.4 Hz, 4H, i'), 1.63 (p,  $^3J_{HH}$  = 7.5 Hz, 6H, p, j'), 1.43 – 1.19 (m, 20H, q, r, s, t, k', l', m'), 1.15 (t,  $^3J_{HH}$  = 7.3 Hz, 10H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>), 0.86 (dt,  $^2J_{HH}$  = 11.5 Hz,  $^3J_{HH}$  = 6.9 Hz, 9H, u, n').

**$^{13}C$ -NMR:** (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 171.7 (C-h'), 153.2 (C-n), 152.8 (C-e), 150.4 (C-b), 149.4 (C-h, k, b', e'), 148.4 (C-c), 138.4 (C-2''), 129.2, 129.1, 128.8 (C-i, m, c', g'), 121.8, 121.7, 120.8 (C-j, l, d', f'), 85.5 (C-1), 83.5 (C-4), 80.8 (C-4'), 80.3 (C-1'), 78.2 (C-3, 2'), 76.7 (C-2), 68.4 (C-o), 68.2 (C-a'), 65.1 (C-5, 5'), 57.7 (C-OMe), 45.5 (C-Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 42.2 (C-g), 33.5 (C-i'), 31.1, 30.9, 28.2, 28.0, 25.1, 22.0, 21.9 (C-q, r, s, t, k', l', m'), 28.1, 24.3 (C-p, j'), 13.9 (C-u, n'), 8.5 (C-Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>).

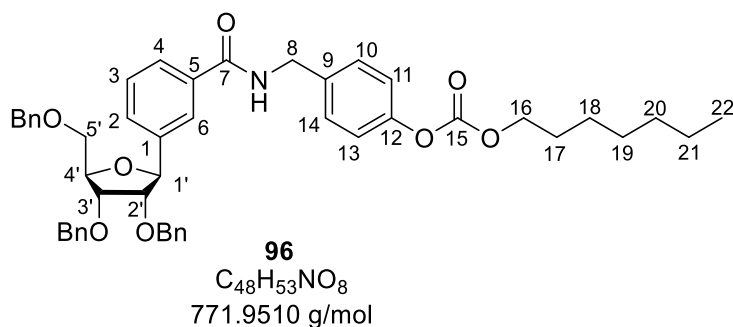
<sup>31</sup>P-NMR (243 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm]: -1.97 (s, P-2'), -11.29 (d, <sup>2,2</sup>J<sub>PP</sub> = 20.5 Hz, P-5α), -11.53 (d, <sup>2,2</sup>J<sub>PP</sub> = 21.0 Hz, P-5'β).

HRMS-ESI: (m/z) berechnet für C<sub>65</sub>H<sub>85</sub>NO<sub>24</sub>P<sub>3</sub> [M-H]<sup>-</sup> 1440.4864, gefunden: 1440.4837.

## 7.6.6 Synthese des 3'-F-MASTER-NADP-Derivats 31

### 7.6.6.1 Synthese von 2,3,5-Tri-O-benzyl-ribofuranosyl-1-(4-(((heptyloxy)carbonyloxy)benzyl)-benzamid 96

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 0.99 g (1.9 mmol, 1.0 Äquiv.) 2,3,5-Tri-O-benzyl-ribofuranosyl-1-benzoesäure **97** in 11 mL abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. Dazu wurden 0.86 (2.3 mmol, 1.2 Äquiv.) HBTU und 0.58 mL (4.2 mmol, 2.2 Äquiv.) Triethylamin gegeben. Die Reaktionslösung wurde 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 0.85 g (2.8 mmol, 1.5 Äquiv.) 4-(Aminomethyl)phenylheptylcarbonat\*hydrochlorid **57** und 0.07 g (0.5 mmol, 0.3 Äquiv.) 4-DMAP in 10 mL abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und zu der Reaktionslösung zugetropft. Nach 25 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch die Zugabe von wässriger gesättigter Natriumchloridlösung beendet. Die wässrige Phase wurde dreimal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 2:1 v/v) gereinigt.



**Ausbeute:** 1.12 g (1.45 mmol, 77 %) eines farblosen Öls.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.33 (PE/EE 2:1 v/v).

<sup>1</sup>H-NMR: (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 9.07 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.0 Hz, 1H, -NH), 7.93 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 1.9 Hz, 1H, 6), 7.81 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.8, 1.5 Hz, 1H, 2), 7.56 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.7 Hz, 1H, 4), 7.47 – 7.06 (m, 18H, 3, -OBn, 10, 14), 7.20 – 7.13 (m, 2H, 11, 13), 4.93 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7 Hz, 1H, 1'), 4.69 – 4.33 (m, 8H, -OBn-CH<sub>2</sub>, 8), 4.27 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.1 Hz, 1H, 4'), 4.18 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.6 Hz, 2H, 16),

4.13 – 4.04 (m, 1H, 3'), 3.92 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 6.8, 4.9$  Hz, 1H, 2'), 3.74 – 3.55 (m, 2H, 5'), 1.65 (p,  $^3J_{\text{HH}} = 6.6$  Hz, 2H, 17), 1.44 – 1.20 (m, 8H, 18, 19, 20, 21), 0.93 – 0.77 (m, 3H, 22).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (101 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 166.1 (C-7), 153.1 (C-15), 149.5 (C-1), 138.3, 138.2, (C<sub>q</sub>-OBn), 137.9 (C-12), 129.0 (C-4), 128.4 (C-10, 14), 128.3, 128.2, 128.1, 127.8, 127.5, 127.4, 127.3 (C-OBn), 126.5 (C-2), 125.4 (C-6), 121.1 (C-11, 13), 83.4 (C-2'), 81.5 (C-1'), 81.3 (C-4'), 77.3 (C-3'), 72.4, 71.2, 71.0 (C-OBn-CH<sub>2</sub>), 70.3 (C-5'), 68.5 (C-16), 42.1 (C-8), 31.1, 28.2, 25.1, 22.0 (C-18, 19, 20, 21), 28.0 (C-17), 13.9 (C-22).

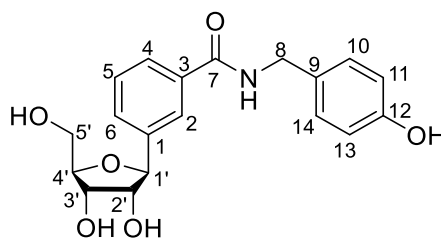
**IR:** (Film) [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 3327, 3063, 3030, 2925, 2857, 1757, 1644, 1606, 1586, 1530, 1508, 1481, 1453, 1390, 1357, 1245, 1214, 1168, 1125, 1076, 1053, 1026, 1016, 958, 910, 816, 779, 733, 695, 608, 535, 499.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>48</sub>H<sub>54</sub>NO<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup> 772.3844, gefunden: 772.3821.

### 7.6.6.2 Synthese von (1-(4-(((Heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl)benzamid)-ribofuranosyl **101**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.45 g (0.58 mmol, 1.0 Äquiv.) die maskierte Verbindung **96** in 15 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und auf -78 °C gekühlt. Dazu wurden 2.03 mL (2.03 mmol, 3.50 Äquiv., 1 M in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) Bortrichlorid-Lösung getropft und die Reaktionslösung 4 Stunden bei -78 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde eine wässrige gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung zugegeben und die wässrige Phase dreimal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v) gereinigt.

**Anmerkung:** Das gewünschte Produkt **95** konnte nicht erhalten werden. Es wurde durch die Reaktion ein Teil der ACB-Maske abgespalten und das *N*-((4-Hydroxyphenyl)methyl)-3-β-D-ribofuranosylbenzamid **101** isoliert.



**101**  
C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>6</sub>  
359.3780 g/mol

**Ausbeute:** 0.093 g (0.259 mmol, 45 %) eines farblosen Öls.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.33 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 9.29 (s, 1H, 9-OH), 8.92 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.0 Hz, 1H, -NH), 7.86 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 1.9 Hz, 1H, 2), 7.77 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.7, 1.5 Hz, 1H, 7), 7.56 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.7, 1.5 Hz, 1H, 6), 7.41 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.7 Hz, 1H, 5), 7.22 – 6.97 (m, 2H, 10, 14), 6.83 – 6.54 (m, 2H, 11, 13), 5.04 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, 1H, 2'-OH), 4.94 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.7 Hz, 1H, 3'-OH), 4.83 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.6 Hz, 1H, 5'-OH), 4.60 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz, 1H, 1'), 4.36 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.9 Hz, 2H, 8), 3.90 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.3 Hz, 1H, 3'), 3.83 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.4 Hz, 1H, 4'), 3.71 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.3 Hz, 1H, 2'), 3.57 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.3, 5.6 Hz, 2H, 5').

**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 166.8 (C-7), 156.4 (C-9), 141.6 (C-1), 134.3 (C-3), 129.9 (C-10, 14), 129.0 (C-6), 128.6 (C-10, 14), 128.0 (C-5), 126.2 (C-4), 125.3 (C-2), 115.0 (C-11, 13), 85.3 (C-4'), 82.8 (C-1'), 77.5 (C-2'), 71.4 (C-3'), 62.1 (C-5'), 42.2 (C-8).

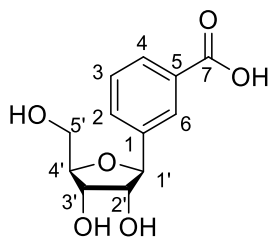
**IR:** (Film) [cm<sup>-1</sup>]: 3262, 2923, 254, 2126, 1638, 1614, 1585, 1541, 1515, 1482, 1448, 1308, 1268, 1234, 1171, 1106, 1046, 1021, 996, 883, 821, 759, 699, 613, 577, 495, 426.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> 360.1353, gefunden: 360.1353.

### Alternativ Route über die TBDMS-Schutzgruppen

#### 7.6.6.3 Synthese von 3-β-D-Ribofuranosylbenzoesäure 102

Es wurden 0.65 g (1.1 mmol, 1.00 Äquiv.) 2,3,5-Tri-O-benzyl-ribofuranosyl-1-(2-(3-bromophenyl)-4,4-dimethyl-4,5-dihydrooxazol) **98** in 5 mL 5 M HCl gelöst und 16 Stunden zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur abgekühlt und festes Kaliumcarbonat zugegeben. Die wässrige Phase wurde mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gewaschen und anschließend mit 2 M HCl neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-C18-Kieselgel gereinigt.



**102**  
 $C_{12}H_{14}O_6$   
 254.2380 g/mol

**Ausbeute:** 0.18 g (0.70 mmol, 62 %) eines farblosen Öls.

**$^1H$ -NMR:** (400 MHz, MeOD- $d_4$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.04 (t,  $^3J_{HH} = 1.8$  Hz, 1H, 6), 7.87 (dt,  $^3J_{HH} = 7.7$ , 1.5 Hz, 1H, 4), 7.48 (dt,  $^3J_{HH} = 7.6$ , 1.7 Hz, 1H, 2), 7.33 (t,  $^3J_{HH} = 7.6$  Hz, 1H, 3), 4.76 (d,  $^3J_{HH} = 6.7$  Hz, 1H, 1'), 4.05 (dd,  $^3J_{HH} = 5.6$ , 4.1 Hz, 1H, 3'), 3.99 (dt,  $^3J_{HH} = 4.9$ , 3.7 Hz, 1H, 4'), 3.90 (dd,  $^3J_{HH} = 6.7$ , 5.5 Hz, 1H, 2'), 3.82 (dd,  $^2J_{HH} = 12.1$  Hz,  $^3J_{HH} = 3.6$  Hz, 1H, 5'), 3.74 (dd,  $^2J_{HH} = 12.1$  Hz,  $^3J_{HH} = 5.0$  Hz, 1H, 5').

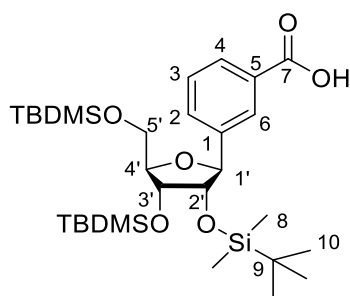
**$^{13}C$ -NMR:** (101 MHz, MeOD- $d_4$ ):  $\delta$  [ppm] = 175.4 (C-7), 141.5 (C-1), 139.3 (C-5), 129.7 (C-2), 129.4 (C-4), 128.6 (C-3), 128.0 (C-6), 86.4 (C-4'), 85.5 (C-1'), 79.3 (C-2'), 73.1 (C-3'), 63.8 (C-5').

**IR:** (Film) [ $cm^{-1}$ ]: 3230, 2922, 1608, 1594, 1555, 1437, 1379, 1214, 1111, 1022, 824, 768, 690, 663, 613, 566, 528.

**MS-ESI:** (m/z) berechnet für  $C_{12}H_{13}O_6$  [M-H] $^-$ : 253.0718, gefunden: 253.0675.

#### 7.6.6.4 Synthese von (2,3,5-Tri-O-[tertbutyldimethylsilyl]- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-3-benzoesäure **103**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.44 g (1.7 mmol, 1.0 Äquiv.) 3- $\beta$ -D-Ribofuranosylbenzoesäure **102** in 15 mL abs. DMF gelöst. Dazu wurden 2.07 g (13.8 mmol, 8.00 Äquiv.) TBDMS-Cl und 0.94 g (14 mmol, 8.0 Äquiv.) Imidazol gegeben und die Reaktionslösung 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 5:1 v/v) gereinigt.



**103**  
 $C_{30}H_{56}O_6Si_3$   
 597.0270 g/mol

**Ausbeute:** 0.44 g (0.73 mmol, 43 %) eines farblosen Wachses.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.65 (PE/EE 4:1 v/v + 1 vol% Essigsäure).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 8.15 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 1.8 Hz, 1H, 6), 8.03 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.8, 1.5 Hz, 1H, 4), 7.72 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.8, 1.5 Hz, 1H, 2), 7.42 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.7 Hz, 1H, 3), 4.84 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.3 Hz, 1H, 1'), 4.14 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.4, 1.3 Hz, 1H, 3'), 4.11 – 4.01 (m, 1H, 4'), 3.87 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.3, 4.4 Hz, 1H, 2'), 3.85 – 3.78 (m, 2H, 5'), 0.94 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.2 Hz, 18H, 10), 0.79 (s, 9H, 10), 0.35 – -0.02 (m, 12H, 8), -0.14 (s, 3H, 8), -0.51 (s, 3H, 8).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 172.6 (C-7), 141.5 (C-1), 132.5 (C-2), 129.8 (C-4), 129.2 (C-5), 128.9 (C-3), 128.4 (C-6), 86.8 (C-4'), 82.2 (C-1'), 79.7 (C-2'), 74.3 (C-3'), 63.9 (C-5'), 26.1, 26.0, 25.9 (C-10), 18.5, 18.2, 18.1 (C-9), -4.2, -4.3, -4.4, -5.3, -5.4 (C-8).

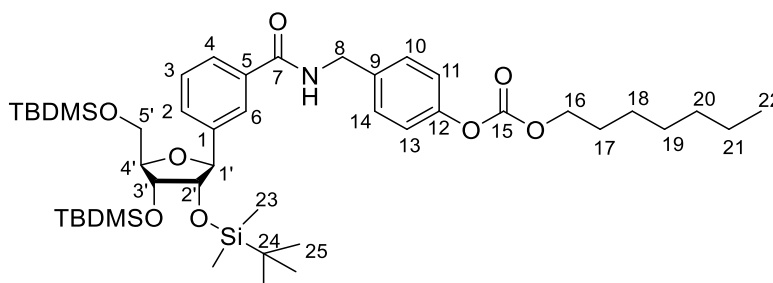
**IR:** (Film) [cm<sup>-1</sup>]: 3673, 2952, 2928, 2900, 2856, 1691, 1610, 1590, 1471, 1461, , 1409, 1389, 1361, 1289, 1252, 1223, 1212, 1150, 1107, 1052, 1005, 964, 938, 926, 876, 831, 773, 707, 681, 668, 638, 613, 597, 555, 498.

**MS-ESI:** (m/z) berechnet für C<sub>30</sub>H<sub>55</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>3</sub> [M-H]<sup>-</sup> 595.3312, gefunden: 595.3133.

#### 7.6.6.5 Synthese von (2,3,5-Tri-O-[tertbutyldimethylsilyl]-β-D-ribofuranosyl)-3-benzamid-4-(((heptanoyloxy)carbonyl)oxy)benzyl **104**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 0.44 g (0.73 mmol, 1.0 Äquiv.) die TBDMS-geschützte Verbindung **103** in 5 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. Es wurden 0.33 g (0.88 mmol, 1.2 Äquiv.) HBTU und 0.23 mL (1.6 mmol, 2.2 Äquiv.) abs. Et<sub>3</sub>N zugegeben und die Reaktionslösung 40 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 0.33 g (1.1 mmol, 1.5 Äquiv.) 4-(Aminomethyl)phenylheptylcarbonat-hydrochlorid **57** und 0.072 g (0.59 mmol, 0.30 Äquiv.) 4-DMAP, gelöst in 5 mL abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, zugegeben und die Reaktionslösung 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von wässriger gesättigter

Natriumchloridlösung beendet und die wässrige Phase dreimal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 3:1 v/v) gereinigt.



**104**

C<sub>45</sub>H<sub>77</sub>NO<sub>8</sub>Si<sub>3</sub>  
844.3650 g/mol

**Ausbeute:** 0.22 g (0.25 mmol, 35 %) einer farblosen Flüssigkeit.

**R<sub>f</sub> -Wert:** 0.45 (PE/EE 3:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.75 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.7, 1.5 Hz, 1H, 2), 7.72 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 1.8 Hz, 1H, 6), 7.62 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.8, 1.5 Hz, 1H, 4), 7.40 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.7 Hz, 1H, 3), 7.38 – 7.34 (m, 2H, 10, 14), 7.19 – 7.14 (m, 2H, 11, 13), 4.81 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.3 Hz, 1H, 1'), 4.64 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 14.8, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.7 Hz, 2H, 8), 4.24 (td, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7, 0.9 Hz, 3H, 16), 4.16 – 4.06 (m, 2H, 3'), 4.04 (tt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.4, 1.6 Hz, 1H, 4'), 3.81 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.3, 4.4 Hz, 1H, 2'), 3.78 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.5 Hz, 2H, 5'), 1.92 – 1.68 (m, 2H, 17), 1.59 (td, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 14.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.4 Hz, 2H, 18), 1.52 – 1.19 (m, 8H, 19, 20, 21), 1.13 – 0.84 (m, 21H, 22, 25), 0.77 (s, 9H, 25), 0.10 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.4, 1.8 Hz, 12H, 23), -0.14 (s, 3H, 23), -0.52 (s, 3H, 23).

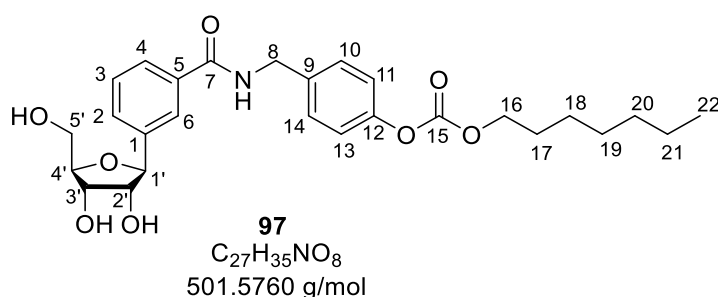
**<sup>13</sup>C-NMR:** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 167.4 (C-7), 153.8 (C-15), 150.7 (C-12), 141.4 (C-1), 136.2 (C-9), 134.1 (C-5), 130.2 (C-4), 129.3 (C-3), 128.7 (C-10, 14), 127.0 (C-2), 125.0 (C-6), 121.6 (C-11, 13), 86.7 (C-4'), 82.2 (C-1'), 79.7 (C-2'), 74.3 (C-3'), 69.2 (C-16), 63.9 (C-5'), 43.6 (C-8), 31.8, 29.8, 28.7, 22.7 (C-18, 19, 20, 21), 29.0 (C-17), 26.1, 26.0, 25.9 (C-25), 18.2, 18.1, 17.8 (C-24), -4.2, -4.3, -4.4, -5.3, -5.4, -5.7 (C-23).

**IR:** (Film) [cm<sup>-1</sup>]: 3325, 2952, 2928, 2895, 2856, 1724, 1642, 1614, 1586, 1516, 1471, 1462, 1372, 1360, 1250, 1151, 1106, 1078, 1044, 1005, 965, 939, 872, 831, 773, 685, 670, 608, 576, 494.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>45</sub>H<sub>78</sub>NO<sub>8</sub>Si<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 844.5030, gefunden: 844.5059.

### 7.6.6.6 Synthese von 2-(2,3,5-Tri-hydroxy-β-D-ribofuranosyl)-benzoesäure-4-(heptan-oyloxy)-benzylamid **104**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.22 g (0.25 mmol, 1.00 Äquiv.) der maskierten Verbindung **104** in 5 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und langsam 0.56 mL (4.6 mmol, 18 Äquiv., 37 %) TREAT-HF getropft. Die Reaktionslösung wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde festes Kieselgur zur Reaktionslösung gegeben und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v) gereinigt.



**Ausbeute:** 0.12 g (0.24 mmol, 96 %) einer farblosen Flüssigkeit.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.25 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.84 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 1.9 Hz, 1H, 6), 7.63 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.9, 1.4 Hz, 1H, 4), 7.48 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.7 Hz, 1H, 2), 7.34 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.7 Hz, 1H, 3), 7.31 – 7.27 (m, 2H, 10, 14), 7.18 – 7.00 (m, 2H, 11, 13), 4.70 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.6 Hz, 1H, 1'), 4.53 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.8 Hz, 2H, 8), 4.22 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7 Hz, 2H, 16), 4.03 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.1 Hz, 1H, 3'), 3.96 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.9 Hz, 1H, 4'), 3.80 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 12.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.0 Hz, 2H, 2', 5'), 3.67 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 12.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.1 Hz, 1H, 5'), 1.73 (dt, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 14.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.9 Hz, 2H, 17), 1.55 – 1.14 (m, 8H, 18, 19, 20, 21), 1.05 – 0.56 (m, 3H, 22).

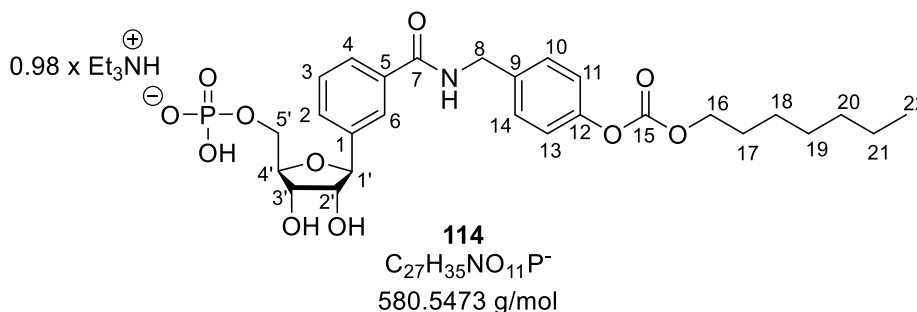
**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 168.0 (C-7), 154.2 (C-15), 150.6 (C-12), 140.8 (C-5), 136.3 (C-9), 129.7 (C-2), 129.2 (C-10, 14), 128.8 (C-3), 126.6 (C-4), 124.8 (C-6), 121.5 (C-11, 13), 84.9 (C-4'), 83.8 (C-1'), 77.6 (C-2'), 71.6 (C-3'), 69.4 (C-16), 62.7 (C-5'), 43.6 (C-8), 31.8, 29.0, 25.8, 22.7 (C-18, 19, 20, 21), 28.7 (C-17), 14.2 (C-22).

**IR:** (Film) [cm<sup>-1</sup>]: 3389, 3064, 2927, 2857, 1757, 1638, 1606, 1584, 1538, 1508, 1467, 1432, 1392, 1360, 1246, 1214, 1170, 1049, 1016, 838, 816, 779, 750, 697, 610, 520.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>27</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup> 502.2435, gefunden: 502.2434.

### 7.6.6.7 Synthese von [2-(2,3,5-Tri-hydroxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-benzoesäure-4-(heptanoyloxy)-benzylamid]-5-monophosphat **94**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 0.12 g (0.24 mmol, 1.0 Äquiv.) des Nucleosids **94** in 2.2 mL TMP **44** gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 0.121 mL (1.45 mmol, 6.00 Äquiv.) Phosphorylchlorid **45** langsam zugetropft und die Reaktionslösung 3.5 Stunden bei 0 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurden 5 mL einer 1 M TEAB-Pufferlösung zugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde dreimal mit Hexan gewaschen und die wässrige Phase lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel gereinigt.



**Ausbeute:** 0.073 g (0.11 mmol, 44 %) eines farblosen Feststoffs.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>):  $\delta$  [ppm] = 8.05 (t,  $^3J_{HH}$  = 1.8 Hz, 1H, 6), 7.79 (ddd,  $^3J_{HH}$  = 7.8, 1.9 Hz,  $^4J_{HH}$  = 1.2 Hz, 1H, 4), 7.70 – 7.59 (m, 1H, 2), 7.53 – 7.40 (m, 3H, 3, 10, 14), 7.19 – 7.08 (m, 2H, 11, 13), 4.77 (d,  $^3J_{HH}$  = 7.4 Hz, 1H, 1'), 4.59 (d,  $^3J_{HH}$  = 2.5 Hz, 2H, 8), 4.27 – 4.18 (m, 3H, 3', 16), 4.17 – 4.05 (m, 3H, 4', 5'), 4.00 (dd,  $^3J_{HH}$  = 7.4, 5.3 Hz, 1H, 2'), 3.27 – 3.01 (m, 7H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 1.71 (tt,  $^3J_{HH}$  = 8.2, 6.6 Hz, 2H, 17), 1.55 – 1.16 (m, 18H, 18, 19, 20, 21, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>), 1.14 – 0.79 (m, 3H, 22).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>):  $\delta$  [ppm] = 168.7 (C-7), 155.3 (C-15), 152.2 (C-12), 142.8 (C-1), 138.4 (C-9), 135.5 (C-5), 131.0 (C-2), 129.9 (C-10, 14), 129.4 (C-3), 127.9 (C-4), 125.9 (C-6), 122.1 (C-11, 13), 85.5 (C-4'), 84.7 (C-1'), 79.3 (C-2'), 73.5 (C-3'), 69.9 (C-16), 66.7 (C-5'), 47.8 (C-Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 44.0 (C-8), 32.9, 30.0, 26.8, 23.6 (C-18, 19, 20, 21), 29.7 (C-17), 14.4 (C-22), 9.2 (C-Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>).

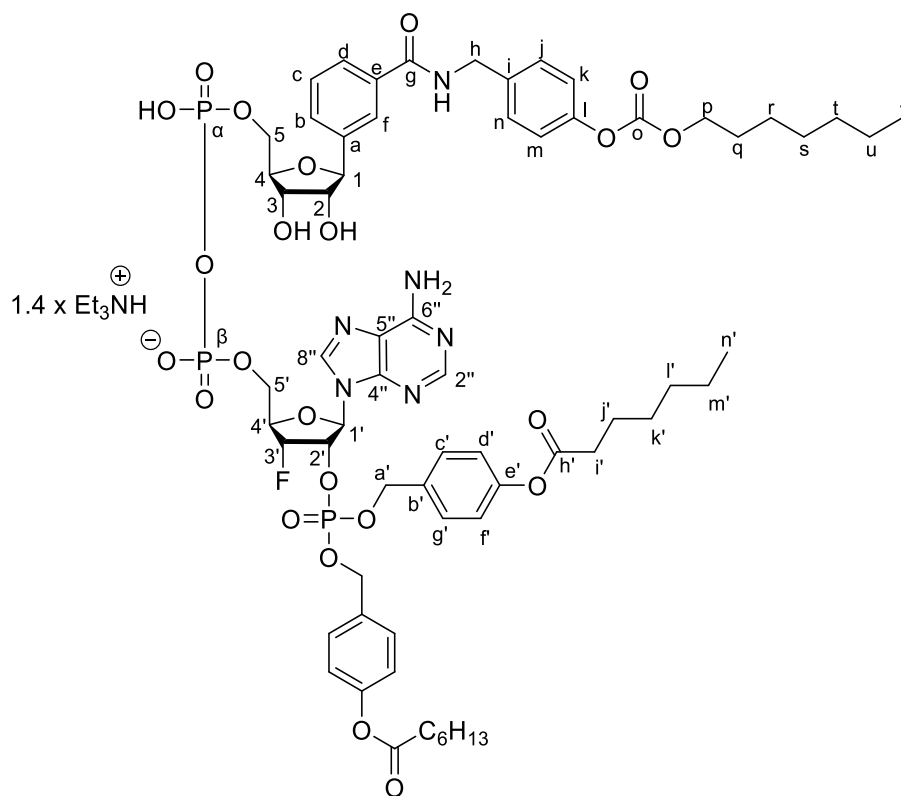
**<sup>31</sup>P-NMR** (243 MHz, MeOD-*d*<sub>4</sub>):  $\delta$  [ppm]: -0.97.

**IR:** (Film) [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 3271, 3065, 2927, 2857, 2493, 1757, 1639, 1606, 1585, 1537, 1508, 1466, 1392, 1245, 1214, 1166, 1039, 1017, 921, 815, 780, 746, 699, 607, 501.

**HRMS-ESI:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{NO}_8$  [M-H]<sup>-</sup> 580.1955, gefunden: 580.1951.

#### 7.6.6.8 Synthese von 3'-F-MASTER-NADP 31

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.048 mL (0.34 mmol, 16.0 Äquiv.) abs.  $\text{Et}_3\text{N}$  in 1.0 mL abs. Acetonitril gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 0.031 mL (0.22 mmol, 10 Äquiv.) TFAA langsam zugetropft und 15 min. bei 0 °C gerührt. Das Monophosphat **94** (0.015 g, 0.022 mmol, 1.0 Äquiv.) wurden in 1.0 mL abs. Acetonitril gelöst und die TFAA-Lösung bei 0 °C zugetropft. Nach 15 min Rühren bei Raumtemperatur wurden alle flüchtigen Bestandteile entfernt. Der Rückstand wurde in 1.0 mL abs. Acetonitril gelöst und es wurden 0.011 mL (0.14 mmol, 6.0 Äquiv.) NMI und 0.016 mL (0.13 mmol, 6.0 Äquiv.) abs.  $\text{Et}_3\text{N}$  zugetropft und die Lösung 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Das 3'-F-Adenosinderivat **105** (0.017 g, 0.018 mmol, 0.8 Äquiv.) wurde in 1.0 mL abs. Acetonitril und 0.2 mL abs. DMF gelöst und zu der Reaktionslösung getropft. Die Reaktion wurde 5.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend durch die Entfernung aller flüchtigen Bestandteile beendet. Das Rohprodukt wurde in 1 M TEAB-Puffer aufgenommen und mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel gereinigt.



31

$C_{65}H_{83}FN_6O_{23}P_3^-$   
1427.3108 g/mol

**Ausbeute:** 12.3 mg (0.00862 mmol, 39 %) eines farblosen Feststoffs.

**$^1H$ -NMR:** (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.56 (s, 1H, 2''), 8.14 (s, 1H, 8''), 8.06 (s, 1H, f), 7.77 (d,  $^3J_{HH}$  = 7.7 Hz, 1H, d), 7.48 (d,  $^3J_{HH}$  = 7.7 Hz, 1H, b), 7.38 (td,  $^3J_{HH}$  = 10.8, 9.2, 5.5 Hz, 3H, c, j, n), 7.27 (d,  $^3J_{HH}$  = 8.5 Hz, 2H, c', g'), 7.18 – 7.09 (m, 4H, k, m, c', g'), 7.09 – 7.03 (m, 2H, d', f'), 7.03 – 6.98 (m, 2H, d', f'), 6.24 (d,  $^3J_{HH}$  = 7.7 Hz, 1H, 1'), 4.94 (dd,  $^3J_{HH}$  = 11.9 Hz, 8.0 Hz, 1H, 4'), 4.91 – 4.84 (m, 1H, 2'), 4.77 (t,  $^3J_{HH}$  = 8.0 Hz, 2H, h), 4.66 (d,  $^3J_{HH}$  = 6.4 Hz, 1H, 1), 4.44 (m, 2H, a'), 4.16 (t,  $^3J_{HH}$  = 6.7 Hz, 2H, p), 4.11 (d,  $^3J_{HH}$  = 5.3 Hz, 4H, 5, 5'), 4.05 (t,  $^3J_{HH}$  = 4.4 Hz, 1H, 4), 4.03 – 3.95 (m, 1H, 3), 3.80 (m, 1H, 2), 3.09 (d,  $^3J_{HH}$  = 7.3 Hz, 11H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>2</sub>), 2.56 (t,  $^3J_{HH}$  = 7.4 Hz, 2H, i'), 1.62 (p,  $^3J_{HH}$  = 7.6 Hz, 6H, q, j'), 1.41 – 1.20 (m, 20H, r, s, t, u, k', l', m', n'), 1.17 (t,  $^3J_{HH}$  = 7.3 Hz, 14H, Et<sub>3</sub>N-CH<sub>3</sub>), 0.96 – 0.67 (m, 9H, v, n').

**$^{31}P$ -NMR** (243 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm]: -2.27 (s, P-2'), -11.21 (d,  $^{2,2}J_{PP}$  = 19.2 Hz, P-5' $\alpha$ ), -11.96 (d,  $^{2,2}J_{PP}$  = 21.1 Hz, P-5' $\beta$ ).

**$^{19}F$ -NMR** (565 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm]: -198.1.

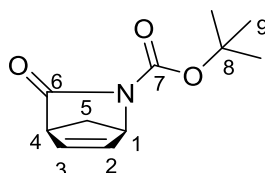
**IR:** (Film) [cm<sup>-1</sup>]: 3154, 3064, 2929, 2859, 2508, 2322, 2222, 2208, 2193, 2162, 2139, 1755, 1692, 1648, 1606, 1538, 1508, 1467, 1422, 1378, 1242, 1215, 1200, 1167, 1104, 1065, 1039, 1011, 936, 814, 712, 627, 552, 499, 471.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>65</sub>H<sub>85</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>23</sub>P<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1429.4857, gefunden: 1429.4849.

## 7.6.7 Synthese des carbocyclischen NAADP-Derivats 106

### 7.6.7.1 Synthese von *tert*-Butyl-(1*R*,4*S*)-3-oxo-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-ene-2-carboxylat 112

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 2.0 g (18.3 mmol, 1.0 Äquiv.) 2-Azabicyclo-[2.2.1]hept-5-en-3-on **113** in 10 mL abs. THF gelöst und 0.67 g (5.5 mmol, 0.3 Äquiv.) 4-DMAP zugegeben. Anschließend wurden langsam 4.4 g (20 mmol, 1.1 Äquiv.) Di-*tert*-butyldicarbonat zugetropft und die Reaktionslösung 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Vakuum entfernt und der Rückstand in Ethylacetat gelöst. Die organische Phase wurde mit Wasser und wässriger gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt ohne weitere Reinigung für die nächste Reaktion verwendet.



**112**  
C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>  
209.2450 g/mol

**Ausbeute:** 3.80 g (18.2 mmol, 99 %) eines rosa Feststoffs.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.62 (PE/EE 1:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** <sup>1</sup>H-NMR: (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 6.97 (m, 1H, 3), 6.74 (m, 1H, 2), 4.89 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 2.0 Hz, 1H, 4), 3.22 (m, 1H, 1), 2.28 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 8.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 1.7 Hz, 1H, 5), 2.05 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 8.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 1.6 Hz, 1H, 5'), 1.41 (s, 9H, 9).

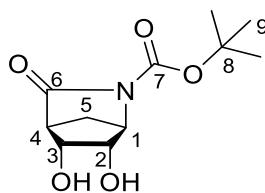
**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 175.5 (C-6), 149.8 (C-7), 140.4 (C-3), 138.2 (C-2), 81.66 (C-8), 62.2 (C-4), 54.4 (C-5), 53.9 (C-1), 27.7 (C-9).

**IR:** (Film) [cm<sup>-1</sup>]: 2975, 1750, 1703, 1457, 1393, 1222, 994, 855, 763, 705.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 232.0944, gefunden: 232.0992.

### 7.6.7.2 Synthese von *tert*-Butyl-(1R, 4S, 5R, 6S)-5, 6-dihydroxy-3-oxo-2-azabi-cyclo-[2.2.1]heptene-2-carboxylat **111**

Es wurden 3.7 g (18 mmol, 1.0 Äquiv.) der Verbindung **112** in 15 mL frisch destilliertem Aceton und 15 mL *tert*-Butanol gelöst und 3.6 g (31 mmol, 1.8 Äquiv.) *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid zugegeben. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt und 2.0 mL (0.31 mmol, 4 % in Wasser) Osmium(VIII)-oxid langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wurde 2 Stunden bei 0 °C gerührt und die Reaktion anschließend durch die Zugabe einer wässrigen gesättigten Natriumdisulfidlösung beendet. Die wässrige Lösung wurde fünfmal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 2:3 v/v) gereinigt.



**111**  
C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub>  
243.2590 g/mol

**Ausbeute:** 3.74 g (15.4 mmol, 87 %) eines farblosen Feststoffs.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.23 (PE/EE 1:4 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 5.23 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.4 Hz, 1H, 2-OH), 5.16 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.7 Hz, 1H, 3-OH), 4.16 – 4.03 (m, 1H, 4), 3.95 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.1, 5.7, 1.6 Hz, 1H, 3), 3.86 (tt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.9, 1.4 Hz, 1H, 2), 2.50 (m, 1H, 1), 1.96 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 1.5 Hz, 1H, 5), 1.86 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 1.8 Hz, 1H, 5'), 1.43 (s, 9H).

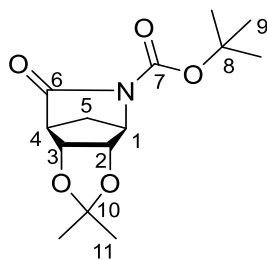
**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 172.1 (C-6), 148.7 (C-7), 81.9 (C-8), 70.1 (C-2), 67.7 (C-3), 61.9 (C-4), 53.4 (C-1), 31.3 (C-5), 27.7 (C-9).

**IR:** (Film) [cm<sup>-1</sup>]: 3408, 2979, 2933, 1777, 1715, 1368, 1255, 1144, 946, 776.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 266.0999, gefunden: 266.0955.

### 7.6.7.3 Synthese von *tert*-Butyl-(3*S*,4*R*,7*S*,7*R*)-2,2-dimethyl-6-oxotetrahydro-4,7-meth-ano[1,3]dioxolo[4,5-*c*]pyridine-5(4*H*)-carboxylat **110**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 3.94 g (16.2 mmol, 1.00 Äquiv.) des geschützten dihydroxylierten (-)-Vince-Lactams **111** und 2.19 mL (17.8 mmol, 1.10 Äquiv.) DMP in abs. Aceton gelöst. Im Anschluss wurden 0.308 g (1.62 mmol, 0.100 Äquiv.) *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde festes Natriumhydrogencarbonat zugegeben. Die Lösung wurde filtriert und das Lösungsmittel des erhaltenen Filtrats wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der gelbe Rückstand wurde in Ethylacetat gelöst und einmal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, zweimal mit Wasser und anschließend mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt konnte ohne weitere Reinigung weiterverwendet werden.



**110**  
C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>  
283.3240 g/mol

**Ausbeute:** 4.02 g (14.0 mmol, 87 %) eines beigen Feststoffs.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.53 (PE/EE 1:2 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 4.57 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.5, 1.3 Hz, 1H, 2), 4.48 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.4, 1.4 Hz, 1H, 3), 4.31 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 1.6 Hz, 1H, 4), 2.76 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 2.3, 1.3 Hz, 1H, 1), 2.00 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 1.7 Hz, 1H, 5), 1.91 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 1.4 Hz, 1H, 5), 1.44 (s, 9H, 9), 1.38 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz, 3H, 11), 1.29 (s, 3H, 11).

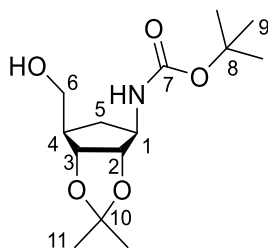
**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 171.1 (C-6), 148.5 (C-7), 112.9 (C-10), 82.2 (C-8), 79.2 (C-3), 77.0 (C-2), 59.5 (C-4), 50.1 (C-1), 30.8 (C-5), 27.5 (C-9), 25.3, 24.3 (C-11).

**IR:** (Film) [cm<sup>-1</sup>]: 2981, 2943, 1764, 1729, 1350, 1145, 1127, 1065, 992, 837, 621, 518.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 306.1312, gefunden: 306.1292.

#### 7.6.7.4 Synthese von *tert*-Butyl-((3*S*,4*R*,6*R*,6*R*)-6-(hydroxymethyl)-2,2-dimethyl-tetrahydro-4*H*-cyclopenta[*d*][1,3]dioxol-4-yl)carbamat **109**

Es wurden 0.28 g (1.0 mmol, 1.00 Äquiv.) des dihydroxylierten geschützten (-)-Vincelactams **110** unter Stickstoffatmosphäre in 2 mL trockenem Methanol gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 0.08 g (2.2 mmol, 2.20 Äquiv.) NaBH<sub>4</sub> portionsweise zugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden weitere 20 mg (0.5 mmol, 0.270 Äquiv.) NaBH<sub>4</sub> zugegeben. Nach 24 Stunden wurde der pH-Wert, durch die Zugabe von 5 mL 1 M HCl auf 6 eingestellt, und so die Reaktion beendet. Die wässrige Phase wurde fünfmal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde zweimal säulenchromatographisch an Kieselgel (I. PE/EE 1:2 v/v, II. PE/EE 2:1 v/v) gereinigt.

**109**

C<sub>14</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>5</sub>  
287.3560 g/mol

**Ausbeute:** 0.23 g (0.81 mmol, 81 %) eines farblosen Feststoffs.

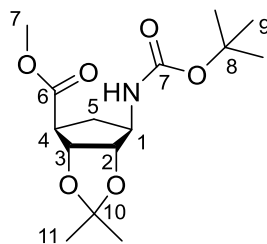
**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.42 (PE/EE 1:2 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 6.92 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.7 Hz, 1H, -NH), 4.77 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.0 Hz, 1H, -OH), 4.33 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7, 3.6 Hz, 1H, 3), 4.26 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8, 4.0 Hz, 1H, 2), 3.70 (m, 1H, 1), 3.38 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.0 Hz, 2H, 6), 2.21 – 1.86 (m, 3H, 4, 5), 1.37 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.9 Hz, 12H, 9, 11), 1.19 (s, 3H, 11).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 154.9 (C-7), 110.7 (C-10), 84.9 (C-2), 81.4 (C-3), 77.7 (C-8), 62.2 (C-6), 56.5 (C-1), 46.3 (C-4), 33.4 (C-5), 28.2, 27.3 (C-9, 11), 24.6 (C-11).

**IR:** (Film) [cm<sup>-1</sup>]: 3497, 3347, 3267, 2981, 2926, 1676, 1538, 1163, 1023, 862.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>14</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>5</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 310.1625, gefunden: 310.1609.



**114**

$C_{15}H_{25}NO_6$   
315.3660 g/mol

**Nebenprodukt:** 0.04 g (0.13 mmol, 13 %) eines farblosen Feststoffs.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.70 (PE/EE 2:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 6.91 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.6 Hz, 1H, -NH), 4.71 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8, 4.8 Hz, 1H, 3), 4.36 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8, 3.8 Hz, 1H, 2), 3.75 (s, 1H, 1), 3.62 (s, 3H, 7), 2.80 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.3, 7.5, 4.7 Hz, 1H, 4), 2.17 (dt, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.6, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz, 1H, 5), 1.86 (dt, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.9 Hz, 1H, 5), 1.38 (m, 12H, 9, 11), 1.20 (s, 3H, 11).

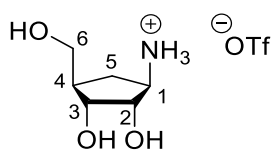
**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 173.4 (C-6), 154.8 (C-7), 111.7 (C-10), 84.3 (C-3), 81.3 (C-2), 78.0 (C-8), 56.3 (C-1), 51.8 (C-7), 48.4 (C-4), 33.3 (C-5), 28.2 (C-11), 27.1 (C-9), 24.8 (C-11).

**IR:** (Film) [cm<sup>-1</sup>]: 3375, 2977, 2931, 1709, 1885, 1510, 1381, 1363, 1243, 1159, 1061, 999, 878, 629, 537.

**MS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>15</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>6</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 338.1574, gefunden: 338.1600.

#### 7.6.7.5 Synthese von (1R,2S,3R,5R)-3-Amino-5-(hydroxymethyl)cyclopentane-1,2-diol **108**

Es wurden 2.17 g (7.55 mmol, 1.00 Äquiv.) des geschützten Cyclopentans **109** in 0.1 mL Wasser und 10 mL Trifluoressigsäure gelöst. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden langsam 20 mL Wasser zugefügt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und mit 1 M NaOH wurde ein pH-Wert von ca. 8 eingestellt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über eine RP-C18-Säule gereinigt.



**108**  
 $C_6H_{13}NO_3$   
 147.1740 g/mol

**Ausbeute:** 262 mg (1.78 mmol, 24 %) eines farblosen bis leicht gelben Öls.

**$^1H$ -NMR:** (400 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  [ppm] = 4.01 – 3.80 (m, 2H, 2, 3), 3.74 – 3.54 (m, 2H, 6), 3.54 – 3.37 (m, 1H, 1), 2.30 (dt,  $^2J_{HH} = 13.2$ ,  $^3J_{HH} = 8.3$  Hz, 1H, 5), 2.23 – 2.05 (m, 1H, 4), 1.26 (ddd,  $^2J_{HH} = 13.3$ ,  $^3J_{HH} = 9.9$ , 8.8 Hz, 1H, 5).

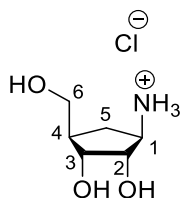
**$^{13}C$ -NMR:** (101 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  [ppm] = 75.6 (C-2/3), 72.2 (C-2/3), 62.9 (C-6), 54.8 (C-1), 44.6 (C-4), 28.2 (C-5).

**IR:** (Film) [ $cm^{-1}$ ]: 3367, 2941, 1671, 1443, 1184, 1129, 842, 801, 723, 599, 517, 442.

**HRMS-ESI+:** (m/z) berechnet für  $C_6H_{14}NO_3$  [M+H]<sup>+</sup> 148.0968, gefunden: 148.0944.

#### 7.6.7.6 Synthese von (1R,2S,3R,5R)-3-Amino-5-(hydroxymethyl)cyclopentane-1,2-diol **108**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 0.3 g (1.0 mmol, 1.0 Äquiv.) des geschützten Cyclopentans **109** in 8 mL abs. Methanol gelöst und 1 mL HCl (2 M) in Dioxan zu getropft. Nach 24 Rühren bei Raumtemperatur wurde die Lösung mit 1 M NaOH auf den pH-Wert 7 eingestellt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über eine RP-C18-Säule gereinigt.



**108**  
 $C_6H_{13}NO_3$   
 147.1740 g/mol

**Ausbeute:** 0.16 g (0.98 mmol, 94 %) eines farblosen Feststoffs.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = 4.11 – 3.77 (m, 2H, 2, 3), 3.77 – 3.54 (m, 2H, 6), 3.54 – 3.36 (m, 1H, 1), 2.30 (dt, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.3 Hz, 2H), 2.15 (dtt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.7, 6.3, 3.9, 2.5 Hz, 1H, 4), 1.26 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.9, 8.8 Hz, 1H, 5).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = 75.5 (C-3), 72.3 (C-2), 62.9 (C-6), 54.8 (C-1), 44.6 (C-4), 28.2 (C-5).

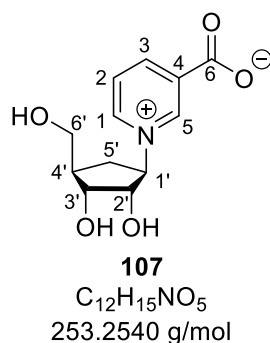
**IR:** (Film) [cm<sup>-1</sup>]: 3310, 2929, 2357, 2338, 1615, 1519, 1455, 1395, 1337, 1215, 1103, 1055, 1018, 958, 905, 812, 733, 608, 590, 549, 530, 475, 442.

**HRMS-ESI+:** (m/z) berechnet für C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 148.0968, gefunden: 148.0987.

### 7.6.7.7 Synthese von 1-((1R,2S,3R,4R)-2,3-Dihydroxy-4-(hydroxymethyl)cyclopentyl)-3-(ethoxycarbonyl)pyridin-1-ium 107

Unter einer Stickstoffatmosphäre wurden 72.5 mg (0.492 mmol, 1.05 Äquiv.) des Cyclopentan-trifluoracetat **108** gelöst in 4 mL abs. Methanol zu 212 mg (0.454 mmol, 0.970 Äquiv.) des Ethylnicotinat-Zinckesalz **117** gelöst in 4 mL abs. Methanol gegeben. Anschließend wurden 38.4 mg (0.468 mmol, 1.00 Äquiv.) Natriumacetat zugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurden 0.5 mL 25 %ige Ammoniak zugegeben und die Lösung wurde für 10 Minuten gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser suspendiert, filtriert und mit Wasser gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Zur vollständigen Entfernung des Wassers wurde der Rückstand zweimal in Methanol gelöst, welches wieder unter vermindertem Druck entfernt wurde. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch über eine RP-Säule gereinigt und daraufhin lyophilisiert.

**Anmerkung:** Der Ethylester **114** konnte nicht erhalten werden. Dafür wurde die Carbonsäure **107** erhalten.



**Ausbeute:** 95.1 mg (0.375 mmol, 82 %) eines leicht gelben Feststoffes.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = 9.28 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 1.6 Hz, 1H, 5), 9.01 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.3, 1.5 Hz, 1H, 1), 8.90 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.1, 1.4 Hz, 1H, 3), 8.15 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.0, 6.1 Hz, 1H, 2), 5.04 (td, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.6, 9.3 Hz, 1H, 1'), 4.42 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.4, 5.9 Hz, 1H, 2'), 4.10 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.9, 3.1 Hz, 1H, 3'), 3.75 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.0 Hz, 2H, 6'), 2.69 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.3 Hz, 1H, 5'), 2.34 (tt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.0, 6.1, 3.3 Hz, 1H, 4'), 1.96 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 13.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 11.0, 8.6 Hz, 1H, 5').

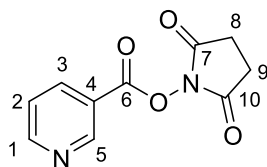
**<sup>13</sup>C-NMR:** (151 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = 145.7 (C-3), 144.1 (C-1), 143.6 (C-5), 137.3 (C-4), 128.1 (C-3), 76.8 (C-2'), 75.1 (C-1'), 71.7 (C-3'), 62.6 (C-6'), 44.6 (C-4'), 29.4 (C-5').

**IR:** (Film) [cm<sup>-1</sup>]: 3670, 2987, 2900, 2357, 2020, 1393, 1227, 1066, 892.

**HRMS-ESI+:** (m/z) für C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 254.1023, gefunden: 254.1022.

### 7.6.7.8 Synthese des Nicotinsäure-*N*-Hydroxysuccinimidesters **122**

Unter Stickstoff als Inertgasatmosphäre wurden 1.0 g ( 8.1 mmol, 1.0 Äquiv.) Nicotinsäure **121** in 10 mL abs. Acetonitril suspendiert. Dazu wurden 1.6 g (8.1 mmol, 1.0 Äquiv.) 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid gegeben und 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 0.94 g (8.1 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*-Hydroxysuccinimid zugegeben und die Reaktionslösung 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. Die organische Phase wurde mit wässriger gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und wässriger gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt ohne weitere Reinigung verwendet.



**122**

C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>  
220.1840 g/mol

**Ausbeute:** 1.53 g (6.96 mmol, 86 %) eines farblosen Öls.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 9.23 (dd, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.4, 0.9 Hz, 1H, 5), 8.99 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.9, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.7 Hz, 1H, 1), 8.48 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.0, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.0 Hz, 1H, 3), 7.71 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.0, 4.9, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 0.9 Hz, 1H, 2), 2.91 (s, 4H, 8, 9).

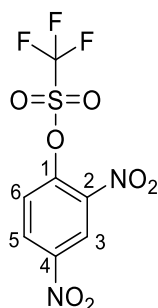
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 170.1 (C-7, 10), 161.0 (C-6), 155.7 (C-1), 150.4 (C-5), 137.8 (C-3), 124.6 (C-2), 121.0 (C-4), 25.6 (C-8, 9).

**IR:** (Film) [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 3494, 3067, 2978, 2938, 1796, 1773, 1720, 1651, 1588, 1473, 1425, 1366, 1334, 1307, 1264, 1244, 1200, 1130, 1070, 1045, 987, 845, 828, 813, 753, 720, 696, 639, 620, 600, 558, 467, 426, 409.

**MS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  221.0557, gefunden: 221.0637.

#### 7.6.7.9 Synthese von 2,4-Dinitrophenyl-trifluormethansulfonat **116**

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 1.0 g (5.4 mmol, 1.0 Äquiv.) 2,4-Dinitrophenol **115** und 1.14 mL (8.15 mmol, 1.50 Äquiv.)  $\text{Et}_3\text{N}$  in 15 mL abs. Dichlormethan gelöst. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt und es wurden 1.1 mL (6.5 mmol, 1.2 Äquiv.)  $\text{Tf}_2\text{O}$  langsam zutropft. Die Reaktionslösung wurde für 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zum Abbruch der Reaktion wurden 20 mL Wasser zugegeben und die wässrige Phase wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 5:1 v/v) gereinigt.



**116**

$\text{C}_7\text{H}_3\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$   
316.1632 g/mol

**Ausbeute:** 1.46 g (4.61 mmol, 85 %) eines beigen Feststoffs.

**$R_f$ -Wert:** 0.4 (PE/EE 4:1 v/v).

**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.71 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 2.9$  Hz, 1H, 3), 8.38 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 9.2, 2.9$  Hz, 1H, 5), 7.30 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 9.2$  Hz, 1H, 6).

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 157.0 (C-4), 138.5 (C-1), 130.8 (C-2), 129.3 (C-5), 121.9 (C-3), 119.6 (C-6).

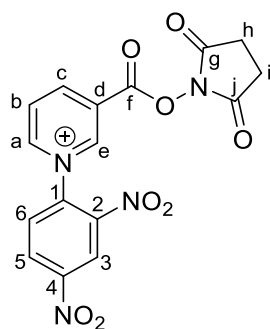
**$^{19}\text{F-NMR}$ :** (565 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = - 72.7.

**IR:** (Film) [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 3115, 2887, 1606, 1541, 1432, 1342, 1209, 1064, 923, 832, 736, 605, 475.

**MS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $\text{C}_7\text{H}_3\text{F}_3\text{N}_2\text{OSNa}$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup> 338.9505, gefunden: 338.2484.

#### 7.6.7.10 Synthese des NHS-Zincke-Salzes **123**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.1 g (0.5 mmol, 1.0 Äquiv.) Nicotinsäure-*N*-Hydroxysuccinimidesters **122** in 5.0 mL abs. Toluol gegeben. Anschließend wurden 0.17 g (0.55 mmol, 1.2 Äquiv.) 2,4-Dinitrophenyl-trifluormethansulfonat **116** zugegeben und die Reaktionslösung 2 Stunden zum Sieden erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  suspendiert und filtriert.



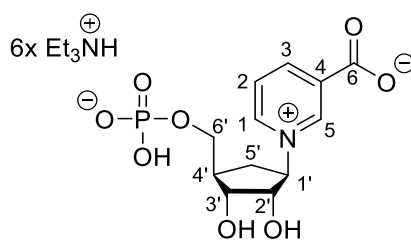
**123**

$\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}_8^+$   
387.0571 g/mol

**Anmerkung:** Das Produkt konnte nicht isoliert werden.

#### 7.6.9.11 Synthese des carbocyclischen Monophosphats **106**

Unter Stickstoff als Inertgasatmosphäre wurden 0.011 g (0.041 mmol, 1.0 Äquiv.) der carbocyclischen Verbindung **107** in 2 mL abs. TMP **44** gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und es wurden 0.039 mL (0.41 mmol, 10 Äquiv.)  $\text{POCl}_3$  **45** zugetropft. Die Reaktionsverfolgung wurde mittels HPLC durchgeführt. Die Lösung wurde 3 Stunden gerührt und durch die Zugabe von 1 M TEAB-Puffer beendet. Das Rohprodukt wurde durch eine automatisierte RP-C18-Säulenchromatographie gereinigt.



**106**

$C_{12}H_{15}NO_8P^-$   
332.2253 g/mol

**Ausbeute:** 0.05 g ( 0.06 mmol, 56 %) eines farblosen Feststoffs.

**$^1H$ -NMR:** (300 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  [ppm] = 9.30 (s, 1H, 5), 9.09 (d,  $^3J_{HH}$  = 6.2 Hz, 1H, 1), 8.92 (dt,  $^3J_{HH}$  = 8.1,  $^4J_{HH}$  = 1.4 Hz, 1H, 3), 8.18 (dd,  $^3J_{HH}$  = 6.3, 8.2 Hz, 1H, 2), 5.08 (dt,  $^3J_{HH}$  = 9.5 Hz, 1H, 1'), 4.47 (dd,  $^3J_{HH}$  = 9.5, 5.7 Hz, 1H, 2'), 4.19 (dd,  $^3J_{HH}$  = 5.7, 2.6 Hz, 1H, 3'), 4.05 (dt,  $^2J_{HH}$  = 9.9,  $^3J_{HH}$  = 4.9 Hz, 1H, 6'), 3.96 (dt,  $^2J_{HH}$  = 10.2 Hz,  $^3J_{HH}$  = 5.0 Hz, 1H, 6'), 3.20 (q,  $^3J_{HH}$  = 7.3 Hz, 6H,  $Et_3NH-CH_2$ ), 2.72 (dt,  $^2J_{HH}$  = 13.3 Hz,  $^3J_{HH}$  = 8.6 Hz, 1H, 5'), 2.52 - 2.40 (m, 1H, 4'), 2.37 – 2.00 (m, 1H, 5'), 1.27 (t,  $^3J_{HH}$  = 7.3 Hz, 9H,  $Et_3NH-CH_3$ ).

**$^{13}C$ -NMR:** (151 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 163.1 (C-6), 147.0 (C-3), 144.1 (C-5), 142.8 (C-1), 127.5 (C-2), 80.0 (C-2'), 75.7 (C-4), 74.5 (C-1'), 72.3 (C-3'), 65.6 (C-6'), 44.7 (C- $Et_3NH-CH_2$ ), 43.9 (C-4'), 29.9 (C-5'), 9.0 (C- $Et_3NH-CH_3$ ).

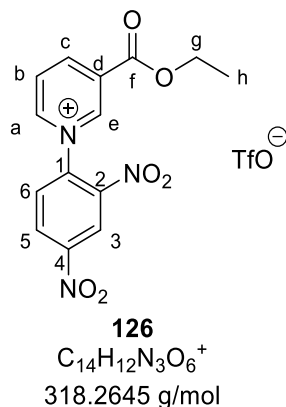
**$^{31}P$ -NMR** (122 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  [ppm]: -0.08.

**IR:** (Film) [ $cm^{-1}$ ]: 2979, 2946, 2604, 2496, 1642, 1612, 1476, 1397, 1364, 1059, 1037, 945, 839, 806, 772, 686, 515, 462.

**MS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $C_{12}H_{17}NO_8P$  [ $M+H$ ]<sup>+</sup> 334.0686, gefunden: 334.0688.

#### 7.6.7.12 Synthese des 1-(2,4-Dinitrophenyl)-3-(Ethoxy-carbonyl)pyridin-1-ium\* triflat 126

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 439 mg (1.39 mmol, 1.20 Äquiv.) 2,4-Dinitrophenyl-trifluormethansulfonat **116** und 0.194 mL (1.16 mmol, 1.00 Äquiv.) Ethylnicotinat in 3 mL abs. Toluol gelöst. Die Reaktion wurde 4 Stunden zum Sieden erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Suspension auf Raumtemperatur gekühlt und filtriert. Der Niederschlag wurde dreimal mit Dichlormethan gewaschen. Der Feststoff wurde anschließend unter vermindertem Druck getrocknet.



**Ausbeute:** 438 mg (0.938 mmol, 67%) eines beigen Feststoffs.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.61 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 9.97 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.7 Hz, 1H, e), 9.56 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.1, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.4 Hz, 1H, a), 9.33 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.1, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.6 Hz, 1H, c), 9.14 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 2.5 Hz, 1H, 6), 8.99 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.7, 2.5 Hz, 1H, 5), 8.56 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.2, 6.1 Hz, 1H, b), 8.38 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.7 Hz, 1H, 3), 4.62 – 4.23 (m, 2H, g), 1.37 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz, 3H, h).

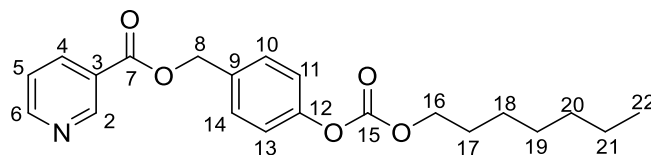
**<sup>13</sup>C-NMR:** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 161.5 (C-f), 149.3 (C-a), 148.3 (C-c), 147.5 (C-e), 132.0 (C-3), 130.2 (C-5), 128.2 (C-b), 121.2 (C-6), 63.0 (C-g), 14.0 (C-h).

**IR:** (Film) [cm<sup>-1</sup>]: 3111, 3080, 1731, 1611, 15442, 1331, 1242, 1136, 1042, 745, 682, 633, 516.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) für C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> [M]<sup>+</sup> 318.0721, gefunden: 318.0717.

#### 7.6.7.13 Synthese des 4-(((Heptyloxy)carbonyloxy)benzyl)nicotinat **127**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 0.62 g (5.0 mmol, 1.5 Äquiv.) Nicotinsäure **121** in 25 mL abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. Dazu wurden 0.53 mL (3.36 mmol, 1.00 Äquiv.) 2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid **39** und 0.52 mL (3.69 mmol, 1.10 Äquiv.) Et<sub>3</sub>N getropft und die Reaktionslösung 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden 0.83 g (3.10 mmol, 0.62 Äquiv.) 4-(Hydroxymethyl)phenylheptylcarbonat **59** in 5 mL abs. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und zur Reaktionslösung getropft. Anschließend wurden 0.12 g (1.0 mmol, 0.3 Äquiv.) 4-DMAP zu der Lösung gegeben und 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde wässrige gesättigte Natriumchloridlösung zugegeben und die wässrige Phase dreimal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 2:1 v/v) gereinigt.



**127**

$C_{21}H_{25}NO_5$   
371.4330 g/mol

**Ausbeute:** 0.9 g (2.4 mmol, 78 %) eines farblosen Feststoffs.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.25 (PE/EE 3:1 v/v).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 9.13 (dd, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.2, 0.9 Hz, 1H, 2), 8.83 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.8, 1.7 Hz, 1H, 6), 8.33 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.0, 2.0 Hz, 1H, 4), 7.73 – 7.45 (m, 3H, 5, 10, 14), 7.45 – 7.03 (m, 2H, 11, 13), 5.39 (s, 2H, 8), 4.19 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.6 Hz, 2H, 16), 1.65 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.0, 6.4 Hz, 2H, 17), 1.48 – 1.15 (m, 8H, 18, 19, 20, 21), 0.86 (s, 3H, 22).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 164.5 (C-7), 153.8 (C-6), 153.0 (C-15), 150.6 (C-12), 150.1 (C-2), 137.0 (C-4), 133.7 (C-9), 129.5 (C-10, 14), 124.0 (C-5), 121.4 (C-11, 13), 68.6 (C-16), 65.9 (C-8), 31.1, 28.2, 25.1, 22.0 (C-18, 19, 20, 21), 28.0 (C-17), 13.9 (C-22).

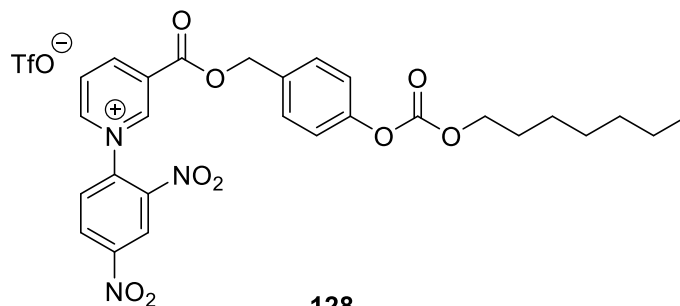
**IR:** (Film) [cm<sup>-1</sup>]: 2955, 2928, 2857, 1758, 1722, 1590, 1547, 1509, 1465, 1419, 1376, 1326, 1244, 1205, 1106, 1084, 1040, 1018, 956, 932, 894, 822, 778, 738, 701, 643, 619, 605, 541, 501, 426.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 372.1805, gefunden: 372.1835.

#### 7.6.7.14 Synthese des 1-(2,4-Dinitrophenyl)-3-(((4-(((heptyloxy)carbonyl)oxy)benzyl)oxy)carbonyl)pyridin-1-ium

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.89 g (2.4 mmol, 1.00 Äquiv.) 4-(((Heptyloxy)carbonyl)oxy)benzylnicotinat **127** und 0.91 g (2.88 mmol, 1.20 Äquiv.) 2,4-Dinitrophenyl-trifluormethansulfonat **116** in abs. Toluol gelöst und für 17 Stunden zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das vermeintliche Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (99:1 zu 19:1 zu 9:1 v/v) gereinigt.

**Ausbeute:** Es konnte kein Produkt isoliert werden.

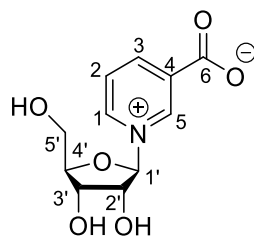
**128** $C_{27}H_{28}N_3O_9^+$ 

538.5325 g/mol

## 7.6.8 Synthese des Nicotinsäure-mononucleotid 124

### 7.6.8.1 Synthese des Nicotinsäureribosid 125

Unter Stickstoff als Inertgasatmosphäre wurden 0.50 g (4.1 mmol, 1.0 Äquiv.) Nicotinsäure **121** in 3.2 mL (15 mmol, 3.8 Äquiv.) Hexamethyldisilazan gelöst. Es wurden 0.20 g (1.2 mmol, 0.30 Äquiv.) Ammoniumsulfat zugegeben und die Lösung für 18 Stunden zum Sieden erhitzt. Anschließend wurden alle flüchtigen Komponenten unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 5 mL abs. Dichlorethan gelöst. Nach der Zugabe von 1.3 g (4.1 mmol, 1.0 Äquiv.)  $\beta$ -D-Ribofuranose-1,2,3,5-tetraacetat und 0.74 mL (4.1 mmol, 1.0 Äquiv.) Trimethylsilyltrifluormethansulfonat wurde die Lösung für 24 Stunden auf 45 °C erwärmt. Die Reaktion wurde unter starkem Rühren durch die Zugabe von kaltem Wasser beendet und die Lösung mit Natriumhydrogencarbonat auf einen pH-Wert von 7 neutralisiert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Dichlormethan gewaschen und anschließend lyophilisiert. Der erhaltene Feststoff wurde in 7 N Ammoniak in Methanol suspendiert und bei -70 °C im Druckgefäß gelagert. Anschließend wurden alle flüchtigen Komponenten unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Methanol gelöst. Es wurde kaltes Aceton zu der Lösung gegeben, wobei sich ein Niederschlag bildete, der filtriert und getrocknet wurde. Die Reinigung erfolgte mittels RP-C18-Säulenchromatographie und einer Sephadex-Anionenaustausch Säule (H<sub>2</sub>O/1 M TEAB-Puffer).



**125**  
 $C_{11}H_{13}NO_6$   
 255.2260 g/mol

**Ausbeute:** 0.6 g (2.4 mmol, 58 %) eines leicht beige Feststoffs.

**$^1\text{H-NMR}$ :** (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 9.48 (s, 1H, 5), 9.17 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.3$  Hz, 1H, 1), 8.97 (dt,  $^3J_{\text{HH}} = 8.0, 1.5$  Hz, 1H, 3), 8.21 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 8.0, 6.2$  Hz, 1H, 2), 6.24 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 4.6$  Hz, 1H, 1'), 4.69 – 4.45 (m, 2H, 3', 4'), 4.38 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 5.0, 4.0$  Hz, 1H, 2'), 4.07 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 12.9$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 2.9$  Hz, 2H, 5'), 3.93 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 12.9$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 3.8$  Hz, 3H, 5').

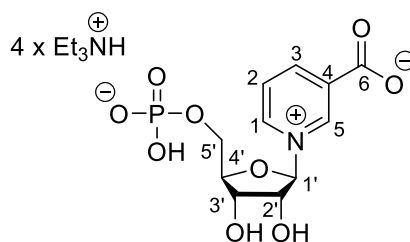
**$^{13}\text{C-NMR}$ :** (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 160.6 (C-6), 147.0 (C-3), 141.3 (C-1), 140.9 (C-5), 137.3 (C-4), 128.0 (C-2), 99.6 (C-1'), 87.6 (C-4'), 77.5 (C-3'), 70.0 (C-2'), 60.4 (C-5').

**IR:** (Film) [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 31199, 3113, 3074, 2921, 2858, 2562, 2357, 2334, 1641, 1605, 1580, 1557, 1376, 1135, 1089, 1027, 996, 880, 832, 760, 725, 697, 677, 616, 564, 547, 537, 523, 505.

**HRMS-ESI<sup>+</sup>:** (m/z) berechnet für  $C_{11}H_{14}NO_6$  [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup> 256.0816, gefunden: 256.0861.

#### 7.6.8.2 Synthese von Nicotinsäure-mononucleotid 124

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.1 g (0.4 mmol, 1.0 Äquiv.) Nicotinsäureribosid **125** in 7 mL TMP **44** gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 0.37 mL (3.9 mmol, 10 Äquiv.)  $\text{POCl}_3$  **45** zugetropft und die Reaktionslösung 18 Stunden bei 0 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 mL 1 M TEAB-Puffer beendet und für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung dreimal mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gewaschen und die wässrige Phase RP-C18-säulenchromatographisch gereinigt. Wegen der hohen Anzahl an Triethylammonium-Gegenionen wurde eine weitere Ionenaustausch-chromatographie durchgeführt. Anschließend wurde der Eluent lyophilisiert und wiederholt mit einer RP-C18-Säulenchromatographie gereinigt.



**124**  
 $C_{11}H_{13}NO_9P^-$   
 334.1973 g/mol

**Ausbeute:** 0.07 g (0.16 mmol, 41 %) einer farblosen Flüssigkeit.

**$^1H$ -NMR:** (400 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  [ppm] = 9.49 (s, 1H, 5), 9.33 (dt,  $^3J_{HH} = 6.2, 1.5$  Hz, 1H, 1), 9.08 (dt,  $^3J_{HH} = 8.1, 1.5$  Hz, 1H, 3), 8.31 (dd,  $^3J_{HH} = 8.0, 6.3$  Hz, 1H, 2), 6.25 (d,  $^3J_{HH} = 5.3$  Hz, 1H, 1'), 4.66 (dt,  $^3J_{HH} = 2.6$  Hz, 1H, 4'), 4.58 (t,  $^3J_{HH} = 5.1$  Hz, 1H, 3'), 4.47 (dd,  $^3J_{HH} = 5.0, 2.8$  Hz, 1H, 2'), 4.33 (ddd,  $^2J_{HH} = 12.0$  Hz,  $^3J_{HH} = 4.0, 2.4$  Hz, 1H, 5'), 4.19 (ddd,  $^2J_{HH} = 12.0$  Hz,  $^3J_{HH} = 5.1, 2.3$  Hz, 1H, 5'), 3.22 (q,  $^3J_{HH} = 7.3$  Hz, 9H,  $Et_3N-CH_2$ ), 1.30 (t,  $^3J_{HH} = 7.3$  Hz, 12H,  $Et_2N-CH_3$ ).

**$^{13}C$ -NMR:** (101 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  [ppm] = 165.3 (C-6), 147.5 (C-3), 142.2 (C-1), 141.7 (C-5), 133.2 (C-4), 128.4 (C-2), 99.8 (C-1'), 86.9 (C-4'), 77.6 (C-2'), 71.0 (C-3'), 63.9 (C-5'), 46.7 ( $Et_3N-CH_2$ ), 8.3 ( $Et_2N-CH_3$ ).

**$^{31}P$ -NMR** (123 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  [ppm]: 0.24.






**IR:** (Film) [ $cm^{-1}$ ]: 3251, 2986, 2949, 2846, 2685, 2497, 1640, 1612, 1461, 1373, 1182, 1035, 989, 806, 749, 676, 468.

**HRMS-ESI:** (m/z) berechnet für  $C_{11}H_{13}NO_9P^-$  [M] $^-$  334.0333, gefunden: 334.0335.









## 8 Gefahrenstoffverzeichnis

In der folgenden Tabelle sind Verbindungen, Reagenzien und Lösungsmittel aufgeführt, die im Rahmen dieser Promotion verwendet wurden. Diese Gefahrstoffe sind nach GHS (CLP-Verordnung 1272/2008/EG) eingestuft und die entsprechenden Gefahrensymbole sowie die H- und P-Sätze angegeben. Die Stoffe, für die keine bekannte Einstufung existiert, sind als gefährlich einzustufen. Es ist unbedingt zu vermeiden, sich oder andere Personen mit diesen Substanzen zu kontaminieren und diese Stoffe in die Umwelt einzubringen.

Tab. 2: Gefahrenstoffverzeichnis.<sup>[164]</sup>

Substanz	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
Aceton	 Gefahr	225, 319, 336, EUH066	210, 240, 305+351+338, 403+233
Acetonitril	 Gefahr	225, 332, 302, 312, 319	210, 240, 302+352, 305+351+338, 403+233
Acetylchlorid	 Gefahr	225, 302, 314, EUH014	P210, 280, 305+350+338, 310
2-Amino-2-methylpropan-1-ol	 Achtung	302, 315, 318, 335	280, 301+312+330, 304+340+312, 305+351+338+ 310
Ammoniak	 Gefahr	225, 314, 301, 311, 331, 370	280, 305+351+338, 310, 310, 302+352, 260
Ammoniumsulfat	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		










Gefahrenstoffverzeichnis

Substanz	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
<b>2-Azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-one</b>	 Gefahr	302, 317, 318	261, 264, 270, 272, 280, 301+312, 302+352, 305+351+338, 310, 321, 330, 333+313, 363, 501
<b>Benzylalkohol</b>	 Achtung	302+332, 319	301+312+330, 304+340+312, 305+351+338
<b>Bortrichlorid</b>	 Gefahr	280, 300, 330, 314 EUH014, 017	260, 280, 303+361+353+315, 304+340+315, 305+351+338, 403, 405
<b>Bortrifluorid-diethyl-etherat</b>	 Gefahr	226, 302, 314, 330, 372	260, 280, 284, 305+351+338, 310, EUH014
<b>5-Bromnicotinsäure</b>	-	-	-
<b>Bromtrichlormethan</b>	 Achtung	302, 315, 319	264, 270, 280, 301+312, 302+352, 305+351+338
<b>Butyllithium</b>	 Gefahr	225, 250, 360, 304, 314, 336, 361f, 373, 411 EUH014	210, 231+232, 280, 301,+310+331, 303+361+353, 305+351+338+310, 370+378
<b>L-Cystein</b>	 Achtung	30, 4	301+312+330
<b>Chloroform-d</b>	 Gefahr	302, 315, , 319, 331, 351, 361d, 372	302+352, 304+340, 305+351+338, 308+310









Gefahrenstoffverzeichnis

Substanz	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
<b>1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en</b>	 Gefahr	290, 301, 314, 412	234, 273, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
<b>1,1-Dichlorethan</b>	 Gefahr	225, 302, 319, 335, 412	210, 261, 273, 305+351+338
<b>Dichlormethan</b>	 Achtung	315, 319, 335, 336, 351, 373	261, 281, 305+351+338
<b>Diethylether</b>	 Gefahr	224, 302, 336, EUH019, EUH066	210, 240, 403+235
<b>Diisobutylaluminiumhydrid</b>	 Gefahr	250, 260, 314	231+323, 280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338+310
<b>Diisopropylethylamin</b>	 Gefahr	225, 302, 331, 318, 335	210, 280, 301+312+330, 304+340+311, 305+351+338+310
<b>2,2-Dimethoxypropan</b>	 Gefahr	225, 319	210, 305+351+338
<b>N,N-Dimethylformamid</b>	 Gefahr	226, 312, 332, 319, 360D	201, 210, 302+352, 304+340, 305+351+338, 308+313
<b>Dimethylsulfoxid (deuteriert)</b>	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		






Gefahrenstoffverzeichnis

Substanz	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
<b>Di-tert-butyl dicarbonat</b>	 Gefahr	226, 330, 315, 317, 318, 335	210, 260, 280, 304+340+310, 305+351+338+ 310, 370+378
<b>Essigsäure (konz.)</b>	 Gefahr	226, 290, 314	210, 280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310
<b>Essigsäureanhydrid</b>	 Gefahr	226, 302, 331, 314, 335	210, 280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310
<b>Ethylacetat</b>	 Gefahr	225, 319, 336, EUH066	210, 233, 240, 305+351+338, 403+235
<b>Ethylnicotinat</b>	 Achtung	315, 319	280, 305+351+338
<b>HATU</b>	 Gefahr	228, 315, 319, 335	210, 261, 305+351+338
<b>HBTU</b>	 Gefahr	317	261, 272, 280, 302+352, 333+313, 362+364
<b>1-Heptanol</b>	 Achtung	319	305+351+338
<b>Hexan</b>	 Gefahr	225, 304, 361, 373, 315, 336, 411	210, 260, 201, 261, 273, 280, 301+310, 303+361+353, 405, 501a








Gefahrenstoffverzeichnis

Substanz	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
4-Hydroxybenzylalkohol	 Achtung	319	305+351+338
Imidazol	 Gefahr	360D, 302, 314	201, 280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310
Iodmethan	 Gefahr	301+331, 312, 315, 335, 351	201, 280, 301+310+352, 304+340, 311
Isopropylmagnesiumchlorid-Lithiumchlorid-Komplex -Lösung	 Gefahr	225, 314, 335, 336, 351	202, 210, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
Kaliumcarbonat	 Achtung	315, 319, 335	261, 264, 271, 280, 302+352, 305+351+338
Kaliumhydroxid	 Gefahr	290, 302, 314	234, 260, 280, 301+312, 303+361+353, 305+351+338
Kaliumpermanganat	 Gefahr	272, 302, 314, 410	221, 273, 280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310
Kieselgel	-	-	260
2,6-Lutidin	 Achtung	226, 302, 315, 319	210, 270, 280, 302+352+332+313 +362+364, 305+351+338, 370+378










Gefahrenstoffverzeichnis

Substanz	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
<b>Natriumacetat</b>	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
<b>Natriumborhydrid</b>	 Gefahr	260, 301, 314, 360FD EUH014	231+232, 260, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
<b>Natriumchlorid</b>	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
<b>Natriumhydroxid</b>	 Gefahr	290, 314	280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310
<b>Natriumiodid</b>	 Gefahr	315, 319, 372, 400	260, 364, 273, 302+352, 305+351+338, 314
<b>Natriumhydrogencarbonat</b>	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
<b>Natriumsulfat</b>	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
<b>Natriumsulfit</b>	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
<b>N-Ethyl-diisopropylamin</b>	 Gefahr	225, 302, 318, 331, 335, 411	210, 273, 280, 301+312, 304+340+311, 305+351+338
<b>Nicotinsäure</b>	 Achtung	319	305+351+338









Gefahrenstoffverzeichnis

Substanz	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
<b>N-Methylimidazol</b>	 Gefahr	302, 311, 314	280, 270, 280, 301+312, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338
<b>N-Methylmorpholin-N-oxid</b>	 Gefahr	228, 361f	202, 210, 240, 241, 280, 308+313
<b>Nitromethan</b>	 Achtung	226, 302+332, 351, 361d	210, 308+313
<b>Osmium(VIII)-oxid</b>	 Gefahr	300+310+330, 314	260, 370, 380, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
<b>Petrolether</b>	 Gefahr	225, 304, 315, 336, 361f, 373, 411	201, 210, 301+310, 331, 370+378, 501
<b>p-Toluolsulfonsäure</b>	 Achtung	315, 319, 335	302+352, 305+351+338
<b>Pyridin</b>	 Gefahr	225, 332, 302, 312, 319, 315	210, 280, 305+351+338
<b>D-Ribose</b>	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
<b>β-D-Ribofuranose-1,2,3,5-tetraacetat</b>	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
<b>D-(+)-Ribono-1,4-lacton</b>	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		




Gefahrenstoffverzeichnis

Substanz	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
<b>Super-Hydride®-Lösung</b>	 Gefahr	225, 260, 302, 314, 335, 351	260, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
<b>Schwefelsäure (konz.)</b>	 Gefahr	290, 314	280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310
<b>tert-Butanol</b>	 Gefahr	225, 332, 319, 335, 336	210 240, 305+351+338, 403+233
<b>tert-Butyldimethylchlorsilan</b>	 Gefahr	228, 314	260, 280, 305+351+338, 310
<b>Tetrahydrofuran</b>	 Gefahr	225 302, 319, 335, 351 EUH019	210, 280, 301+312+330, 305+351+338, 370+378, 403+235
<b>Thionylchlorid</b>	 Gefahr	302, 331, 314, 335, EUH 014, 029	280, 301+330+331, 34+340, 305+351+338, 308+310
<b>trans-N,N-dimethyl-1,2-cyclohexandiamin</b>	 Gefahr	314	301+330+331, 280, 305+351+338, 310, 264
<b>2,4,6-Trichlorbenzoylchlorid</b>	 Gefahr	314	280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338, 363, 405
<b>Triethylsilan</b>	 Gefahr	225, 410	210, 303+361+353, 403+233

Gefahrenstoffverzeichnis

Substanz	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
Trifluormethansulfonsäureanhydrid	 Gefahr	302, 314	280, 305+351+338, 310
Trimethylphosphat	 Gefahr	302, 315, 319, 340, 351	301+330+331, 312, 302+352, 337+313, 201, 280
Trimethylsilyltrifluoromethansulfonat	 Gefahr	226, 302, 314	280, 301+330+331, 305+351+338
Triethylamin	 Gefahr	225, 302, 311+331, 314, 335	210, 280, 303+361+353, 304+340, 310, 305+351+338, 403+233
Triethylamin-trihydrofluorid	 Gefahr	300+310+300, 314	260, 271, 280, 303+361+353, 304+340, 310, 305+351+338
Trifluoressigsäureanhydrid	 Gefahr	332, 314, 412, EUH 014	261, 273, 280, 303+361+353, 304
Trifluormethansulfonsäureanhydrid	 Gefahr	302, 314	280, 301+330+331, 305+351+338, 309+310
Trimethylsilylcyanid	 Gefahr	225, 300+310+330, 410	210, 260, 262, 273, 280, 301+310+330, 304+340+310, 370, 378, 391, 403+233
2,3,5-Tri-O-benzyl-D-ribo-1,4-lacton	-	-	-

## Gefahrenstoffverzeichnis

Substanz	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
<b>Toluol</b>	 Gefahr	225, 304, 315, 336, 361d, 373, 412	201, 210, 273, 301+310+331, 302+352, 308+313
<b>Vanillin</b>	 Achtung	319	305+351+338
<b>Zinn(IV)chlorid</b>	 Gefahr	314, 412	273, 280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310

**Tab. 3:** Verwendete KMR-Stoffe der Kategorien 1A und 1B.<sup>[164]</sup>

CAS-Nummer	Stoffname	Verfahren und eingesetzte Menge	Kategorie
288-32-4	Imidazol	Silylierungsreaktion, 50 g	1B
68-12-2	<i>N,N</i> -Dimethylformamid	Lösungsmittel, 3 L	1B
865-49-6	Deuteriochloroform	NMR-Lösungsmittel, 0.5 L	1B

## 9 Literaturverzeichnis

- [1] D. L. Clapper, T. F. Walseth, P. J. Dargie, H. C. Lee, Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol trisphosphate., *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 9561–9568.
- [2] W. Dammermann, A. H. Guse, Functional Ryanodine Receptor Expression Is Required for NAADP-mediated Local Ca<sup>2+</sup> Signaling in T-lymphocytes, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 21394–21399.
- [3] I. Berg, B. V. L. Potter, G. W. Mayr, A. H. Guse, Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (Naadp+) Is an Essential Regulator of T-Lymphocyte Ca<sup>2+</sup>-Signaling, *J. Cell Biol.* **2000**, *150*, 581–588.
- [4] H. G. Roggenkamp, I. Khansahib, L. C. Hernandez C., Y. Zhang, D. Lodygin, A. Krüger, F. Gu, F. Möckl, A. Löhndorf, V. Wolters, D. Woike, A. Rosche, A. Bauche, D. Schetelig, R. Werner, H. Schlüter, A. V. Failla, C. Meier, R. Fliegert, T. F. Walseth, A. Flügel, B.-P. Diercks, A. H. Guse, HN1L/JPT2: A signaling protein that connects NAADP generation to Ca<sup>2+</sup> microdomain formation, *Sci. Signal.* **2021**, *14*, 1–12.
- [5] G. S. Gunaratne, E. Brailoiu, S. He, E. M. Unterwald, S. Patel, J. T. Slama, T. F. Walseth, J. S. Marchant, Essential requirement for JPT2 in NAADP-evoked Ca<sup>2+</sup> signaling, *Sci. Signal.* **2021**, *14*, 1–12.
- [6] A. Ruthenbeck, E. Marangoni, B.-P. Diercks, A. Krüger, V. O. Nikolaev, A. H. Guse, C. Meier, Membrane-Permeable Octanoyloxybenzyl-Masked cNMPs As Novel Tools for Non-Invasive Cell Assays, *Molecules* **2018**, *23*, 2960.
- [7] S. Krukenberg, F. Möckl, M. Weiß, P. Dekiert, M. Hofmann, F. Gerlach, K. J. Winterberg, D. Kovacevic, I. Khansahib, B. Troost, M. Hinrichs, V. Granato, M. Nawrocki, T. Hub, V. Tsvilovskyy, R. Medert, L.-M. Woelk, F. Förster, H. Li, R. Werner, M. Altfeld, S. Huber, O. B. Clarke, M. Freichel, B.-P. Diercks, C. Meier, A. H. Guse, MASTER-NAADP: a membrane permeable precursor of the Ca<sup>2+</sup> mobilizing second messenger NAADP, *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 8008.
- [8] T. Gollnest, *Das TriPPP-Pro-Konzept: Entwicklung und Charakterisierung von anti-viralen Nukleosidtriphosphat-Prodrugs*, Dissertation, Universität Hamburg, **2015**.

- [9] P. Dekiert, *Synthese von membranpermeablen, chemisch stabilisierten NAADP-Derivaten*, Dissertation, Universität Hamburg, **2021**.
- [10] S. Rasmussen, M. E. Allentoft, K. Nielsen, L. Orlando, M. Sikora, K.-G. Sjögren, A. G. Pedersen, M. Schubert, A. Van Dam, C. M. O. Kapel, H. B. Nielsen, S. Brunak, P. Avetisyan, A. Epimakhov, M. V. Khalyapin, A. Gnuni, A. Kriiska, I. Lasak, M. Metspalu, V. Moiseyev, A. Gromov, D. Pokutta, L. Saag, L. Varul, L. Yepiskoposyan, T. Sicheritz-Pontén, R. A. Foley, M. M. Lahr, R. Nielsen, K. Kristiansen, E. Willerslev, Early Divergent Strains of *Yersinia pestis* in Eurasia 5,000 Years Ago, *Cell* **2015**, *163*, 571–582.
- [11] R. Acuna-Soto, Megadrought and Megadeath in 16th Century Mexico, *Emerg. Infect. Dis.* **2002**, *8*, 360–362.
- [12] A. M. W. K. Wurm, *Infektionskrankheiten. In: Ludwig Heilmeyer (Hrsg.): Lehr-buch der Inneren Medizin.*, 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin/ Göttingen/Heidelberg, **1961**.
- [13] D. R. Flower, *Bioinformatics for Vaccinology*, Wiley Verlag, Birmingham, **2008**.
- [14] L. G. P. C. Heinrich, M. Müller, *Löffler/Petrides Biochemie und Patho-biochemie*, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, **2014**.
- [15] G. Löffler, P. E. Petrides, *Biochemie & Pathobiochemie 25: Kommunikation zwischen Zellen: Rezeptoren und Signaltransduktion*, *Biochem. und Pathobiochemie* **2007**.
- [16] H. C. Lee, R. Aarhus, A Derivative of NADP Mobilizes Calcium Stores Insensitive to Inositol Trisphosphate and Cyclic ADP-ribose, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 2152–2157.
- [17] J. M. Cancela, Two different but converging messenger pathways to intracellular Ca<sup>2+</sup> release: the roles of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, cyclic ADP-ribose and inositol trisphosphate, *EMBO J.* **2000**, *19*, 2549–2557.
- [18] S. Feske, Calcium signalling in lymphocyte activation and disease, *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 690–702.
- [19] M. S. Perin, V. A. Fried, G. A. Mignery, R. Jahn, T. C. Südhof, Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C, *Nature* **1990**, *345*, 260–263.
- [20] M. J. Berridge, P. Lipp, M. D. Bootman, 2000-Review-Calcium Signalling, *Nat. Rev.* **2000**, *1*, 11–21.

- 
- [21] R. S. Lewis, Calcium Signaling Mechanisms in T Lymphocytes, *Annu. Rev. Immunol.* **2001**, *19*, 497–521.
- [22] R. Fliegert, J. Heeren, F. Koch-Nolte, V. O. Nikolaev, C. Lohr, C. Meier, A. H. Guse, Adenine nucleotides as paracrine mediators and intracellular second messengers in immunity and inflammation, *Biochem. Soc. Trans.* **2019**, *47*, 329–337.
- [23] K. Winterberg, V. Schwentner, C. Meier, A. H. Guse, DUOX2 acts a coincidence detector to activate the NAADP - IL-17 axis in T-cells, **2024**, Submitted.
- [24] A. H. Guse, NAADP Signaling: New Kids on the Block, *Cells* **2022**, *11*, 1054.
- [25] J. Zhang, X. Guan, K. Shah, J. Yan, Lsm12 is an NAADP receptor and a two-pore channel regulatory protein required for calcium mobilization from acidic organelles, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 4739.
- [26] F. Macian, NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function, *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5*, 472–484.
- [27] M. J. Berridge, M. D. Bootman, H. L. Roderick, Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 517–529.
- [28] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Stryer Biochemie*, Springer Berlin Heidelberg, **2013**.
- [29] C. Toyoshima, H. Nomura, Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium, *Nature* **2002**, *418*, 605–611.
- [30] M. J. Berridge, Calcium microdomains: Organization and function, *Cell Calcium* **2006**, *40*, 405–412.
- [31] M. J. Berridge, P. Lipp, M. D. Bootman, The versatility and universality of calcium signalling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**.
- [32] M. J. Berridge, Calcium signalling and cell proliferation, *BioEssays* **1995**.
- [33] B. Zhang, J. M. Watt, C. Cordiglieri, W. Dammermann, M. F. Mahon, A. Flügel, A. H. Guse, B. V. L. Potter, Small Molecule Antagonists of NAADP-Induced Ca<sup>2+</sup> Release in T-Lymphocytes Suggest Potential Therapeutic Agents for Autoimmune Disease, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 16775.
- [34] P. Hundehage, L. Epping, S. Meuth, Calcium Homeostasis in Multiple Sclerosis, *Neurol. Int. Open* **2017**, *01*, E127–E135.

- 
- [35] F. Horn, *Biochemie des Menschen - Lehrbuch für das Medizinstudium*, 8. Auflage, Thieme, **2020**.
- [36] G. Meşe, G. Richard, T. W. White, Gap Junctions: Basic Structure and Function, *J. Invest. Dermatol.* **2007**, *127*, 2516–2524.
- [37] A. O'Brien, *Receptor Binding in Drug Research*, 5. Ausgabe, Taylor & Francis Inc, **1986**.
- [38] P. W. B. Albert, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, *Molecular Biology Of The Cell 5th*, 5., Garland Publishing Inc, **2007**, Vol. 5.
- [39] S. P. H. Alexander, A. Mathie, J. A. Peters, Guide to Receptors and Channels, 2nd edition (2007 Revision), *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *150*, S1.
- [40] T. K. Bjarnadóttir, D. E. Gloriam, S. H. Hellstrand, H. Kristiansson, R. Fredriksson, H. B. Schiöth, Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse, *Genomics* **2006**, *88*, 263–273.
- [41] D. Hilger, M. Masureel, B. K. Kobilka, Structure and dynamics of GPCR signaling complexes, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2018**, *25*, 4–12.
- [42] M. Nobles, A. Benians, A. Tinker, Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 18706–18711.
- [43] N. Melzer, G. Hicking, K. Göbel, H. Wiendl, TRPM2 Cation Channels Modulate T Cell Effector Functions and Contribute to Autoimmune CNS Inflammation, *PLoS One* **2012**, *7*, 1–6.
- [44] A. H. Guse, C. P. da Silva, I. Berg, A. L. Skapenko, K. Weber, P. Heyer, M. Hohenegger, G. A. Ashamu, H. Schulze-Koops, B. V. L. Potter, G. W. Mayr, Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose, *Nature* **1999**, *398*, 70–73.
- [45] A. Miyawaki, J. Llopis, R. Heim, J. M. McCaffery, J. A. Adams, M. Ikura, R. Y. Tsien, Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup>-based on green fluorescent proteins and calmodulin, *Nature* **1997**, *388*, 882–887.
- [46] U. B. Kaupp, R. Seifert, Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels, *Physiol. Rev.* **2002**, *82*, 769–824.

- 
- [47] F. J. Garcia-Cozar, H. Okamura, J. F. Aramburu, K. T. Y. Shaw, L. Pelletier, R. Showalter, E. Villafranca, A. Rao, Two-site Interaction of Nuclear Factor of Activated T Cells with Activated Calcineurin, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 23877–23883.
- [48] A. T. Pores-Fernando, A. Zweifach, Calcium influx and signaling in cytotoxic T-lymphocyte lytic granule exocytosis, *Immunol Rev.* **2009**.
- [49] K. A. Christensen, J. T. Myers, J. A. Swanson, pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages., *J. Cell Sci.* **2002**, *115*, 599–607.
- [50] E. Lloyd-Evans, A. J. Morgan, X. He, D. A. Smith, E. Elliot-Smith, D. J. Sillence, G. C. Churchill, E. H. Schuchman, A. Galione, F. M. Platt, Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium, *Nat. Med.* **2008**, *14*, 1247–1255.
- [51] E. W. McCleskey, Calcium channels: cellular roles and molecular mechanisms, *Curr. Opin. Neurobiol.* **1994**, *4*, 304–312.
- [52] D. E. Clapham, Calcium Signaling, *Cell* **2007**, *131*, 1047–1058.
- [53] G. C. Churchill, Y. Okada, J. M. Thomas, A. A. Genazzani, S. Patel, A. Galione, NAADP Mobilizes Ca<sup>2+</sup> from Reserve Granules, Lysosome-Related Organelles, in Sea Urchin Eggs, *Cell* **2002**, *111*, 703–708.
- [54] E. Finch, T. Turner, S. Goldin, Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release, *Science (80- )*. **1991**, *252*, 443–446.
- [55] M. Endo, M. Tanaka, Y. Ogawa, Calcium Induced release of calcium from the Sarcoplasmic Reticulum of Skinned Skeletal Muscle Fibres, *Nature* **1970**, *228*, 34–36.
- [56] A. Gasser, S. Bruhn, A. H. Guse, Second Messenger Function of Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate Revealed by an Improved Enzymatic Cycling Assay, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 16906–16913.
- [57] J. M. Cancela, G. C. Churchill, A. Galione, Coordination of agonist-induced Ca<sup>2+</sup>-signalling patterns by NAADP in pancreatic acinar cells, *Nature* **1999**, *398*, 74–76.
- [58] B. J. Kim, K. H. Park, C. Y. Yim, S. Takasawa, H. Okamoto, M. J. Im, U. H. Kim, Generation of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate and cyclic ADP-ribose by glucagon-like peptide-1 evokes Ca<sup>2+</sup> signal that is essential for insulin secretion in mouse pancreatic islets, *Diabetes* **2008**, *57*, 868–878.

- 
- [59] M. Yamasaki, J. M. Thomas, G. C. Churchill, C. Garnham, A. M. Lewis, J. M. Cancela, S. Patel, A. Galione, Role of NAADP and cADPR in the induction and maintenance of agonist-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  spiking in mouse pancreatic acinar cells, *Curr. Biol.* **2005**, *15*, 874–878.
- [60] H. Streb, R. F. Irvine, M. J. Berridge, I. Schulz, Release of  $\text{Ca}^{2+}$  from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate, *Nature* **1983**, *306*, 67–69.
- [61] L. Missiaen, C. W. Taylor, M. J. Berridge, Spontaneous calcium release from inositol trisphosphate-sensitive calcium stores, *Nature* **1991**, *352*, 241–244.
- [62] M. Kolisek, A. Beck, A. Fleig, R. Penner, Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels, *Mol. Cell* **2005**, *18*, 61–69.
- [63] A. De Flora, L. Guida, L. Franco, E. Zocchi, The CD38/cyclic ADP-ribose system: A topological paradox, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1997**, *29*, 1149–1166.
- [64] Y. J. Zhao, C. M. C. Lam, H. C. Lee, The Membrane-Bound Enzyme CD38 Exists in Two Opposing Orientations, *Sci. Signal.* **2012**, *5*, 1–10.
- [65] L. G. Mészáros, J. Bak, A. Chu, Cyclic ADP-ribose as an endogenous regulator of the non-skeletal type ryanodine receptor  $\text{Ca}^{2+}$  channel, *Nature* **1993**, *364*, 76–79.
- [66] H. Higashida, A. B. Salmina, R. Y. Olovyannikova, M. Hashii, S. Yokoyama, K. Koizumi, D. Jin, H.-X. Liu, O. Lopatina, S. Amina, M. S. Islam, J.-J. Huang, M. Noda, Cyclic ADP-ribose as a universal calcium signal molecule in the nervous system, *Neurochem. Int.* **2007**, *51*, 192–199.
- [67] E. N. Chini, K. W. Beers, T. P. Dousa, Nicotinate Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP) Triggers a Specific Calcium Release System in Sea Urchin Eggs, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 3216–3223.
- [68] R. Aarhus, R. M. Graeff, D. M. Dickey, T. F. Walseth, C. L. Hon, ADP-ribosyl Cyclase and CD38 Catalyze the Synthesis of a Calcium-mobilizing Metabolite from  $\text{NADP}^+$ , *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 30327–30333.

- 
- [69] F. Gu, A. Krüger, H. G. Roggenkamp, R. Alpers, D. Lodygin, V. Jaquet, F. Möckl, L. C. Hernandez C., K. Winterberg, A. Bauche, A. Rosche, H. Grasberger, J. Y. Kao, D. Schetelig, R. Werner, K. Schröder, M. Carty, A. G. Bowie, S. Huber, C. Meier, H.-W. Mittrücker, J. Heeren, K.-H. Krause, A. Flügel, B.-P. Diercks, A. H. Guse, Dual NADPH oxidases DUOX1 and DUOX2 synthesize NAADP and are necessary for Ca<sup>2+</sup> signaling during T cell activation, *Sci. Signal.* **2021**, *14*.
- [70] C. Angeletti, A. Amici, J. Gilley, A. Loreto, A. G. Trapanotto, C. Antoniou, E. Merlini, M. P. Coleman, G. Orsomando, SARM1 is a multi-functional NAD(P)ase with prominent base exchange activity, all regulated by multiple physiologically relevant NAD metabolites, *iScience* **2022**, *25*, 103812.
- [71] T. L. Leto, S. Morand, D. Hurt, T. Ueyama, Targeting and Regulation of Reactive Oxygen Species Generation by Nox Family NADPH Oxidases, *Antioxid. Redox Signal.* **2009**, *11*, 2607–2619.
- [72] M. Ruas, L. C. Davis, C. Chen, A. J. Morgan, K. Chuang, T. F. Walseth, C. Grimm, C. Garnham, T. Powell, N. Platt, F. M. Platt, M. Biel, C. Wahl-Schott, J. Parrington, A. Galione, Expression of Ca<sup>2+</sup>-permeable two-pore channels rescues NAADP signalling in TPC<sup>-</sup>deficient cells, *EMBO J.* **2015**, *34*, 1743–1758.
- [73] S. Gerndt, C.-C. Chen, Y.-K. Chao, Y. Yuan, S. Burgstaller, A. Scotto Rosato, E. Krogsaeter, N. Urban, K. Jacob, O. N. P. Nguyen, M. T. Miller, M. Keller, A. M. Vollmar, T. Gudermann, S. Zierler, J. Schredelseker, M. Schaefer, M. Biel, R. Malli, C. Wahl-Schott, F. Bracher, S. Patel, C. Grimm, Agonist-mediated switching of ion selectivity in TPC2 differentially promotes lysosomal function, *Elife* **2020**, *9*, 1–63.
- [74] I. M. A. Wolf, B.-P. Diercks, E. Gattkowsky, F. Czarniak, J. Kempinski, R. Werner, D. Schetelig, H.-W. Mittrücker, V. Schumacher, M. von Osten, D. Lodygin, A. Flügel, R. Fliegert, A. H. Guse, Frontrunners of T cell activation: Initial, localized Ca<sup>2+</sup> signals mediated by NAADP and the type 1 ryanodine receptor, *Sci. Signal.* **2015**, *8*, 1–12.
- [75] A. Mojžišová, O. Križanová, L. Žáčiková, V. Komínková, K. Ondriaš, Effect of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate on ryanodine calcium release channel in heart, *Pflügers Arch.* **2001**, *441*, 674–677.
- [76] J. T. Lanner, D. K. Georgiou, A. D. Joshi, S. L. Hamilton, Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2*, a003996–a003996.

- 
- [77] M. Hohenegger, J. Suko, R. Gscheidlinger, H. Drobny, A. Zidar, Nicotinic acid–adenine dinucleotide phosphate activates the skeletal muscle ryanodine receptor, *Biochem. J.* **2002**, 367, 423–431.
- [78] M. F. Langhorst, N. Schwarzmann, A. H. Guse, Ca<sup>2+</sup> release via ryanodine receptors and Ca<sup>2+</sup> entry: major mechanisms in NAADP-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling in T-lymphocytes, *Cell. Signal.* **2004**, 16, 1283–1289.
- [79] E. Brailoiu, D. Churamani, X. Cai, M. G. Schrlau, G. C. Brailoiu, X. Gao, R. Hooper, M. J. Boulware, N. J. Dun, J. S. Marchant, S. Patel, Essential requirement for two-pore channel 1 in NAADP-mediated calcium signaling, *J. Cell Biol.* **2009**, 186, 201–209.
- [80] L. C. Davis, A. J. Morgan, J.-L. Chen, C. M. Snead, D. Bloor-Young, E. Shenderov, M. N. Stanton-Humphreys, S. J. Conway, G. C. Churchill, J. Parrington, V. Cerundolo, A. Galione, NAADP Activates Two-Pore Channels on T Cell Cytolytic Granules to Stimulate Exocytosis and Killing, *Curr. Biol.* **2012**, 22, 2331–2337.
- [81] P. J. Calcraft, M. Ruas, Z. Pan, X. Cheng, A. Arredouani, X. Hao, J. Tang, K. Rietdorf, L. Teboul, K. Chuang, P. Lin, R. Xiao, C. Wang, Y. Zhu, Y. Lin, C. N. Wyatt, J. Parrington, J. Ma, A. M. Evans, A. Galione, M. X. Zhu, NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels, *Nature* **2009**, 459, 596–600.
- [82] X. Wang, X. Zhang, X. Dong, M. Samie, X. Li, X. Cheng, A. Goschka, D. Shen, Y. Zhou, J. Harlow, M. X. Zhu, D. E. Clapham, D. Ren, H. Xu, TPC Proteins Are Phosphoinositide- Activated Sodium-Selective Ion Channels in Endosomes and Lysosomes, *Cell* **2012**, 151, 372–383.
- [83] T. F. Walseth, Y. Lin-Moshier, P. Jain, M. Ruas, J. Parrington, A. Galione, J. S. Marchant, J. T. Slama, Photoaffinity Labeling of High Affinity Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP)-Binding Proteins in Sea Urchin Egg, *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 2308–2315.
- [84] Y. Lin-Moshier, T. F. Walseth, D. Churamani, S. M. Davidson, J. T. Slama, R. Hooper, E. Brailoiu, S. Patel, J. S. Marchant, Photoaffinity Labeling of Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP) Targets in Mammalian Cells, *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 2296–2307.
- [85] A. H. Guse, Linking NAADP to Ion Channel Activity: A Unifying Hypothesis, *Sci. Signal.* **2012**, 5.

- 
- [86] H. C. Lee, R. Aarhus, Structural Determinants of Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate Important for Its Calcium-mobilizing Activity, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 20378–20383.
- [87] P. Jain, J. T. Slama, L. A. Perez-Haddock, T. F. Walseth, Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate Analogues Containing Substituted Nicotinic Acid: Effect of Modification on Ca<sup>2+</sup> Release, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7599–7612.
- [88] A. Ramadan, *NAADP-Mediated Calcium Release in Mammalian Cells: Regulation of Naive and Effector T Cell Functions by NAADP*, University of Toledo, **2014**.
- [89] S. Krukenberg, *Synthese von membranpermeablen, stabilisierten, lipophil maskierten und photocaged NAADP-Derivaten*, Dissertation, Universität Hamburg, **2025**.
- [90] F.-X. Boittin, A. Galione, A. M. Evans, Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate Mediates Ca<sup>2+</sup> Signals and Contraction in Arterial Smooth Muscle via a Two-Pool Mechanism, *Circ. Res.* **2002**, *91*, 1168–1175.
- [91] H. C. Lee, R. Aarhus, K. R. Gee, T. Kestner, Caged Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 4172–4178.
- [92] R. Parkesh, A. M. Lewis, P. K. Aley, A. Arredouani, S. Rossi, R. Tavares, S. R. Vasudevan, D. Rosen, A. Galione, J. Dowden, G. C. Churchill, Cell-permeant NAADP: A novel chemical tool enabling the study of Ca<sup>2+</sup> signalling in intact cells, *Cell Calcium* **2008**.
- [93] C. Schultz, M. Vajanaphanich, A. T. Harootunian, P. J. Sammak, K. E. Barrett, R. Y. Tsien, Acetoxymethyl esters of phosphates, enhancement of the permeability and potency of cAMP., *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 6316–6322.
- [94] W. Thomson, D. Nicholls, W. J. Irwin, J. S. Al-Mushadani, S. Freeman, A. Karpas, J. Petrik, N. Mahmood, A. J. Hay, Synthesis, bioactivation and anti-HIV activity of the bis(4-acyloxybenzyl) and mono(4-acyloxybenzyl) esters of the 5'-monophosphate of AZT, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, No. 11, 1239–1245.
- [95] S. Freeman, W. J. Irwin, A. G. Mitchell, D. Nicholls, W. Thomson, Bioreversible protection for the phospho group: chemical stability and bioactivation of di(4-acetoxybenzyl) methylphosphonate with carboxyesterase, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, *01*, 875.
- [96] P. L. Carl, P. K. Chakravarty, J. A. Katzenellenbogen, A novel connector linkage applicable in prodrug design, *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 479–480.

- 
- [97] T. Gollnest, T. D. de Oliveira, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier, Lipophilic prodrugs of nucleoside triphosphates as biochemical probes and potential antivirals, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8716.
- [98] T. Gollnest, T. Dinis de Oliveira, A. Rath, I. Hauber, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier, Membrane-permeable Triphosphate Prodrugs of Nucleoside Analogues, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2016**, *55*, 5255–5258.
- [99] H. J. Jessen, T. Schulz, J. Balzarini, C. Meier, Bioreversible Protection of Nucleoside Diphosphates, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2008**, *47*, 8719–8722.
- [100] L. Hedstrom, IMP Dehydrogenase: Structure, Mechanism, and Inhibition, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2903–2928.
- [101] W. Zhu, J. Yang, P. Yuan, Z. Sun, C. Wang, W. Sun, S. Zhang, Rapid determination of total residues of ribavirin and its metabolites in chicken and chicken products by ultra-performance hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry, *Chinese J. Chromatogr.* **2013**, *31*, 934.
- [102] A. A. Elfiky, Anti-HCV, nucleotide inhibitors, repurposing against COVID-19, *Life Sci.* **2020**, *248*, 117477.
- [103] K. Pahnke, C. Meier, Synthesis of a Bioreversibly Masked Lipophilic Adenosine Diphosphate Ribose Derivative, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 1616–1626.
- [104] H. J. Jessen, *Untersuchungen zur intrazellulären Freisetzung von Nucleosidphosphaten*, Universität Hamburg, **2008**.
- [105] A. G. Mitchell, W. Thomson, D. Nicholls, W. J. Irwin, S. Freeman, Bioreversible protection for the phospho group: bioactivation of the di(4-acyloxybenzyl) and mono(4-acyloxybenzyl) phosphoesters of methylphosphonate and phosphonoacetate, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1992**, *19*, 2345.
- [106] D. Bonnaffé, B. Dupraz, J. Ughetto-Monfrin, A. Namane, Y. Henin, T. Huynh Dinh, Potential Lipophilic Nucleotide Prodrugs: Synthesis, Hydrolysis, and Antiretroviral Activity of AZT and d4T Acyl Nucleotides, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 895–902.
- [107] T. Schulz, J. Balzarini, C. Meier, The Di PP ro Approach: Synthesis, Hydrolysis, and Antiviral Activity of Lipophilic d4T Diphosphate Prodrugs, *ChemMedChem* **2014**, *9*, 762–775.

- 
- [108] L. Hedstrom, C. C. Wang, Mycophenolic acid and thiazole adenine dinucleotide inhibition of *Trichomonas foetus* inosine 5'-monophosphate dehydrogenase: implications on enzyme mechanism, *Biochemistry* **1990**, *29*, 849–854.
- [109] J. A. Walker, W. Liu, D. S. Wise, J. C. Drach, L. B. Townsend, Synthesis and Antiviral Evaluation of Certain Novel Pyrazinoic Acid C-Nucleosides, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1236–1241.
- [110] S. Krukenberg, *Synthese eines lipophil maskierten Synthesebausteins zur Darstellung eines NAADP-Analogons*, Universität Hamburg, **2020**.
- [111] P. Franchetti, L. Cappellacci, S. Marchetti, C. Martini, B. Costa, K. Varani, P. A. Borea, M. Grifantini, c-nucleoside analogues of furanfurin as ligands to  $\alpha 1$  adenosine receptors, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2367–2373.
- [112] J. D. Graci, C. E. Cameron, Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses, *Rev. Med. Virol.* **2006**, *16*, 37–48.
- [113] K. W. Pankiewicz, S. E. Patterson, P. L. Black, H. N. Jayaram, D. Risal, B. M. Goldstein, L. J. Stuyver, R. F. Schinazi, Cofactor mimics as selective inhibitors of NAD-dependent inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) the major therapeutic target., *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 887–900.
- [114] M. Hofmann, *Synthese eines chemisch-stabilisierten, lipophil-maskierten Nicotinsäurenucleosid-Analogons als Synthesebaustein für die totalsynthetische Darstellung von NAADP-Derivaten*, Masterarbeit, Universität Hamburg, **2020**.
- [115] M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi, A Novel Method for Phosphorylation, *Tetrahedron Lett.* **1967**, *8*, 5065–5068.
- [116] D. R. Williams, P. D. Lowder, Y.-G. Gu, D. A. Brooks, Studies of mild dehydrogenations in heterocyclic systems, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 331–334.
- [117] B. Neises, W. Steglich, Einfaches Verfahren zur Veresterung von Carbonsäuren, *Angew. Chemie* **1978**, *90*, 556–557.
- [118] Y. Nishio, A. Kawazu, S. Hirano, H. Matsubara, Preparation of fluorous Yamaguchi reagents and evaluation of their reactivity in esterification, *Tetrahedron* **2016**, *72*, 720–725.
- [119] Strategic applications of named reactions in organic synthesis: background and detailed mechanisms, *Choice Rev. Online* **2006**, *44*, 44-0320-44–0320.

- [120] P. G. M. Wuts, T. W. Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th, Wiley, **2006**.
- [121] M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi, Studies of Phosphorylation. III. Selective Phosphorylation of Unprotected Nucleosides, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1969**, *42*, 3505–3508.
- [122] T. Ikemoto, A. Haze, H. Hatano, Y. Kitamoto, M. Ishida, K. Nara, Phosphorylation of Nucleosides with Phosphorus Oxychloride in Trialkyl Phosphate., *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 210–215.
- [123] K. Kusashio, M. Yoshikawa, Studies of Phosphorylation. II. Reaction of 2', 3'- O - Isopropylideneinosine and -guanosine with Phosphoryl Chloride<sup>1</sup>, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1968**, *41*, 142–149.
- [124] S. Mohamady, D. L. Jakeman, An Improved Method for the Synthesis of Nucleoside Triphosphate Analogues, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10588–10591.
- [125] J. A. Miller, Organic Chemistry (Bruice, Paula Yurkanis), *J. Chem. Educ.* **1996**, *73*, A92.
- [126] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, *Organische Chemie*, Springer Berlin Heidelberg, **2013**.
- [127] S. Gandhi, B. List, Catalytic Asymmetric Three-Component Synthesis of Homoallylic Amines, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, *52*, 2573–2576.
- [128] P. A. Wender, *Advanced Organic Chemistry*, Advanced Organic Chemistry, Springer US, Boston, MA, **2007**.
- [129] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, New coupling reagents in peptide chemistry, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927–1930.
- [130] E. Valeur, M. Bradley, Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606–631.
- [131] S. Agudo-Álvarez, S. S. Díaz-Mínguez, R. Benito-Arenas, The amide group and its preparation methods by acid-amine coupling reactions: an overview, *Pure Appl. Chem.* **2024**, *96*, 691–707.
- [132] E. Westman, R. Stromberg, Removal of t-butyldimethylsilyl protection in RNA-synthesis. Triethylamine trihydrofluoride (TEA, 3HF) is a more reliable alternative to tetrabutylammonium fluoride (TBAF), **1994**, *22*.

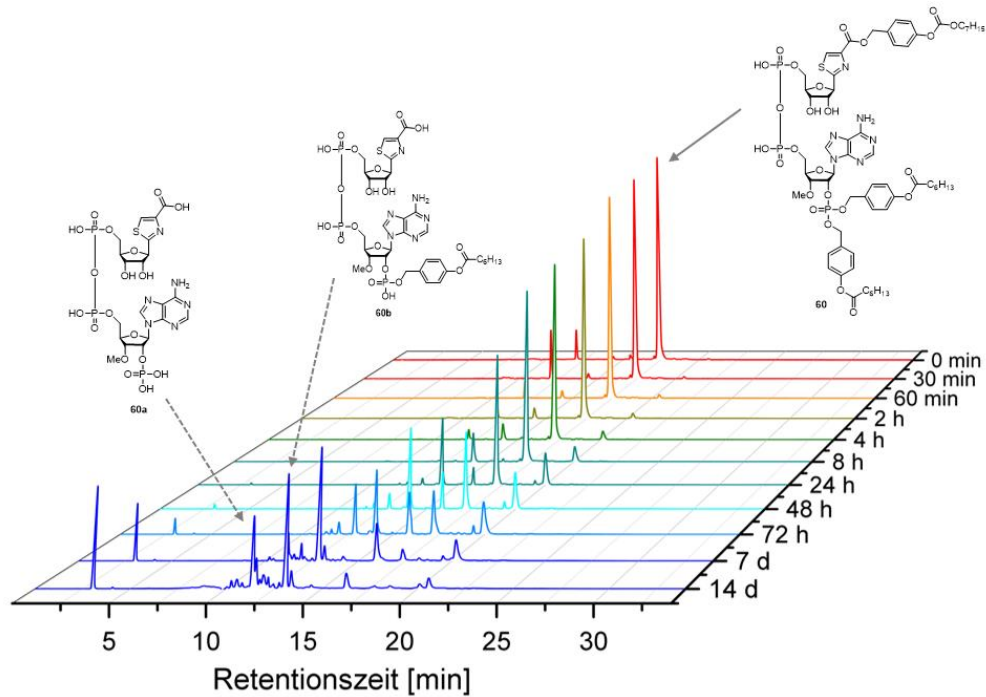
- 
- [133] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Lakowicz, J. R., Ed., Springer US, Boston, MA, **2006**.
- [134] K. Krohn, H. Heins, K. Wielckens, Synthesis and cytotoxic activity of C-glycosidic nicotinamide riboside analogs, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 511–517.
- [135] N. Robert, A. Bonneau, C. Hoarau, F. Marsais, Unusual Sterically Controlled Regioselective Lithiation of 3-Bromo-5-(4,4'-dimethyl)oxazolinyipyridine. Straight-forward Access to Highly Substituted Nicotinic Acid Derivatives, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 6071–6074.
- [136] A. Klapars, S. L. Buchwald, Copper-Catalyzed Halogen Exchange in Aryl Halides: An Aromatic Finkelstein Reaction, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14844–14845.
- [137] X. Feng, L. Li, X. Yu, Y. Yamamoto, M. Bao, Copper-catalyzed conversion of aryl and heteroaryl bromides into the corresponding iodide, *Catal. Today* **2016**, *274*, 129–132.
- [138] G. Evano, A. Nitelet, P. Thilmany, D. F. Dewez, Metal-Mediated Halogen Exchange in Aryl and Vinyl Halides: A Review, *Front. Chem.* **2018**, *6*, 1–18.
- [139] A. Casitas, M. Canta, M. Solà, M. Costas, X. Ribas, Nucleophilic Aryl Fluorination and Aryl Halide Exchange Mediated by a Cu I /Cu III Catalytic Cycle, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19386–19392.
- [140] D. F. Vargas, E. L. Larghi, T. S. Kaufman, Evolution of the Synthesis of Remdesivir. Classical Approaches and Most Recent Advances, *ACS Omega* **2021**, *6*, 19356–19363.
- [141] A. Hermann, R. Seymen, L. Brieger, J. Kleinheider, B. Grabe, W. Hiller, C. Strohmann, Comprehensive Study of the Enhanced Reactivity of Turbo-Grignard Reagents, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2023**, *62*.
- [142] A. Krasovskiy, B. F. Straub, P. Knochel, Highly Efficient Reagents for Br/Mg Exchange, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2006**, *45*, 159–162.
- [143] M. Štefko, L. Slavětínská, B. Klepetářová, M. Hocek, General and Modular Synthesis of Isomeric 5-Substituted Pyridin-2-yl and 6-Substituted Pyridin-3-yl C-Ribonucleosides Bearing Diverse Alkyl, Aryl, Hetaryl, Amino, Carbamoyl, and Hydroxy Groups, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 6619–6635.

- 
- [144] C. H. Larsen, B. H. Ridgway, J. T. Shaw, D. M. Smith, K. A. Woerpel, Stereoselective C-Glycosylation Reactions of Ribose Derivatives: Electronic Effects of Five-Membered Ring Oxocarbenium Ions, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10879–10884.
- [145] C. H. Larsen, B. H. Ridgway, J. T. Shaw, K. A. Woerpel, A stereoelectronic model to explain the highly stereoselective reactions of nucleophiles with five-membered-ring oxocarbenium ions, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 12208–12209.
- [146] E. Calzada, C. A. Clarke, C. Roussin-Bouchard, R. H. Wightman, Synthesis of C-glycofuranosides by the stereoselective reduction of hemiacetals, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1995**, No. 5, 517–518.
- [147] I. Abdelmoty, F. Albericio, L. A. Carpino, B. M. Foxman, S. A. Kates, Structural studies of reagents for peptide bond formation: Crystal and molecular structures of HBTU and HATU, *Lett. Pept. Sci.* **1994**, *1*, 57–67.
- [148] C. Sousa, P. J. Silva, Erratum: BBr<sub>3</sub>-Assisted Cleavage of Most Ethers Does Not Follow the Commonly Assumed Mechanism, *European J. Org. Chem.* **2013**, No. 35, 8048–8049.
- [149] V. P. X. Liu, P. Zhan, L. Menendez-Arias, *Antiviral Drug Discovery and Development*, Advances in Experimental Medicine and Biology, Springer Singapore, Singapore, **2021**, Vol. 1322.
- [150] E. De Clercq, Antiviral Agents: Characteristic Activity Spectrum Depending on the Molecular Target With Which They Interact, *AdvVirusRes* **1993**, *42*, 1–55.
- [151] B. G. Szczepankiewicz, H. Dai, K. J. Koppetsch, D. Qian, F. Jiang, C. Mao, R. B. Perni, Synthesis of Carba-NAD and the Structures of Its Ternary Complexes with SIRT3 and SIRT5, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 7319–7329.
- [152] T. Carell, *Carbocyclic nucleoside analogue*, Universität München, WO 2020/245351 A1 (51), **2020**.
- [153] V. VanRheenen, R. C. Kelly, D. Y. Cha, An improved catalytic OsO<sub>4</sub> oxidation of olefins to 1,2-glycols using tertiary amine oxides as the oxidant, *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17*, 1973–1976.
- [154] R. Valiulin, Upjohn Dihydroxylation,. In *Organic Chemistry: 100 Must-Know Mechanisms*; De Gruyter, **2023**; pp 232–233.

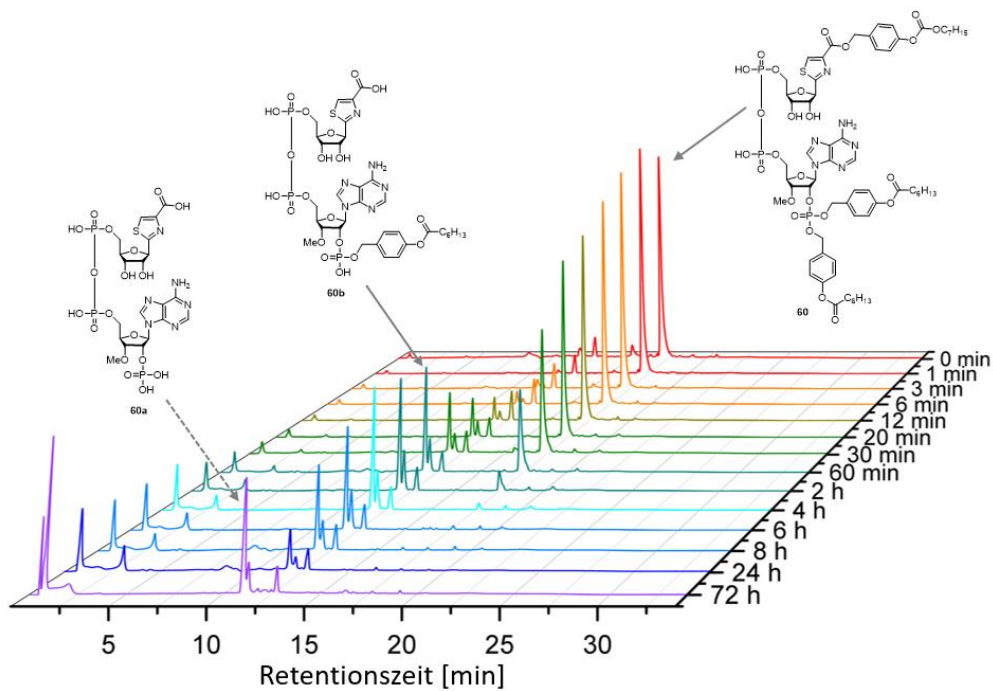
- 
- [155] U. S. Singh, R. C. Mishra, R. Shankar, C. K. Chu, Stereoselective Synthesis of 2'-Fluoro-6'-methylene Carbocyclic Adenosine via Vince Lactam, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 3917–3923.
- [156] C. Vicent, V. Martinez-Agramunt, V. Gandhi, C. Larriba-Andaluz, D. G. Gusev, E. Peris, Ion Mobility Mass Spectrometry Uncovers Guest-Induced Distortions in a Supramolecular Organometallic Metallosquare, *Angew. Chemie* **2021**, *133*, 15540–15545.
- [157] N. Boechat, J. C. S. da Costa, J. de Souza Mendonça, P. S. M. de Oliveira, M. Vinícius Nora De Souza, A simple reduction of methyl aromatic esters to alcohols using sodium borohydride–methanol system, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 6021–6022.
- [158] F. Gonçalves, R. Freitas, Modification of Chitosan by Zincke Reaction: Synthesis of a Novel Polycationic Chitosan-Pyridinium Derivative, *J. Braz. Chem. Soc.* **2019**, *30*, 2318–2323.
- [159] H. C. Van der Plas, The SN(ANRORC) mechanism: a new mechanism for nucleophilic substitution, *Acc. Chem. Res.* **1978**, *11*, 462–468.
- [160] J. J. Li, Zincke reaction,. In *Name Reactions*; Springer Berlin Heidelberg, **2003**; pp 451–452.
- [161] E. N. Marvell, T. H. Li, C. Paik, Formation of phenylpyridinium chloride from 5-anilino-N-phenyl-2,4-pentadienyliidiminium chloride in acidic media, *Tetrahedron Lett.* **1973**, *14*, 2089–2092.
- [162] N. M. R. McNeil, E. W. J. Gates, N. Firoozi, N. J. Cundy, J. Leccese, S. Eisinga, J. D. A. Tyndall, G. Adhikary, R. L. Eckert, J. W. Keillor, Structure-activity relationships of N-terminal variants of peptidomimetic tissue transglutaminase inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *232*, 114172.
- [163] S. Tanimori, T. Ohta, M. Kiriata, An efficient chemical synthesis of nicotinamide riboside (NAR) and analogues, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1135–1137.
- [164] GESTIS-Stoffdatenbank, [www.dguv.de/ifa/stoffdatenbank](http://www.dguv.de/ifa/stoffdatenbank) (aufgerufen am 14.11.2024).

## 10 Anhang

### 10.1 Hydrolysestudien der Thiazol-Verbindungen 60 und 64



**Abb. 139:** Chemische Hydrolyse der Thiazol-Verbindung 60 in PBS-Puffer.



**Abb. 140:** Enzymatische Hydrolyse der Thiazol-Verbindung 60 in PLE-Lösung.

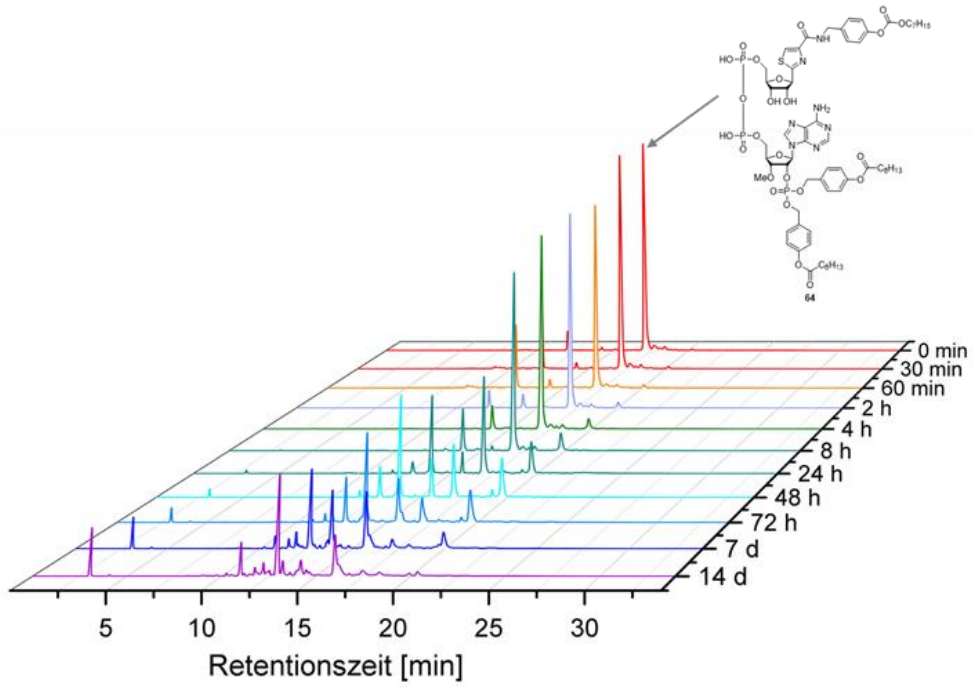


Abb. 141: Chemischer Hydrolyseverlauf der Thiazol-Verbindung 64 in PBS-Puffer.

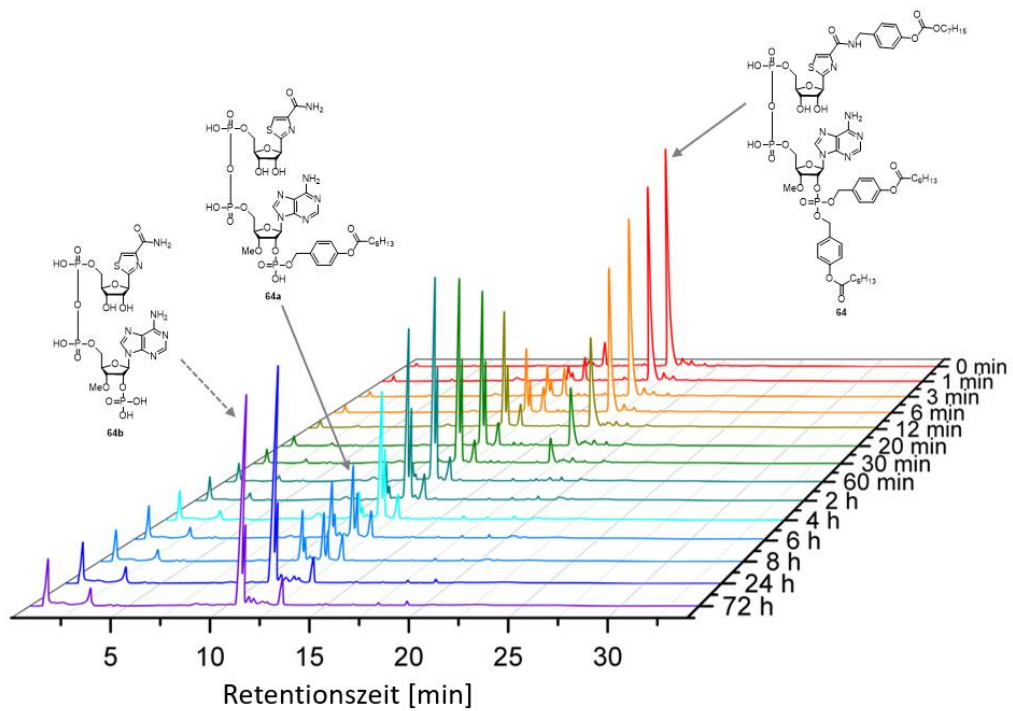


Abb. 142: Enzymatischer Hydrolyseverlauf der Thiazol-Verbindung 64 in PLE-Lösung.

## 10.2 Hydrolysestudien der 5-Pyridin-Verbindungen 68 und 88

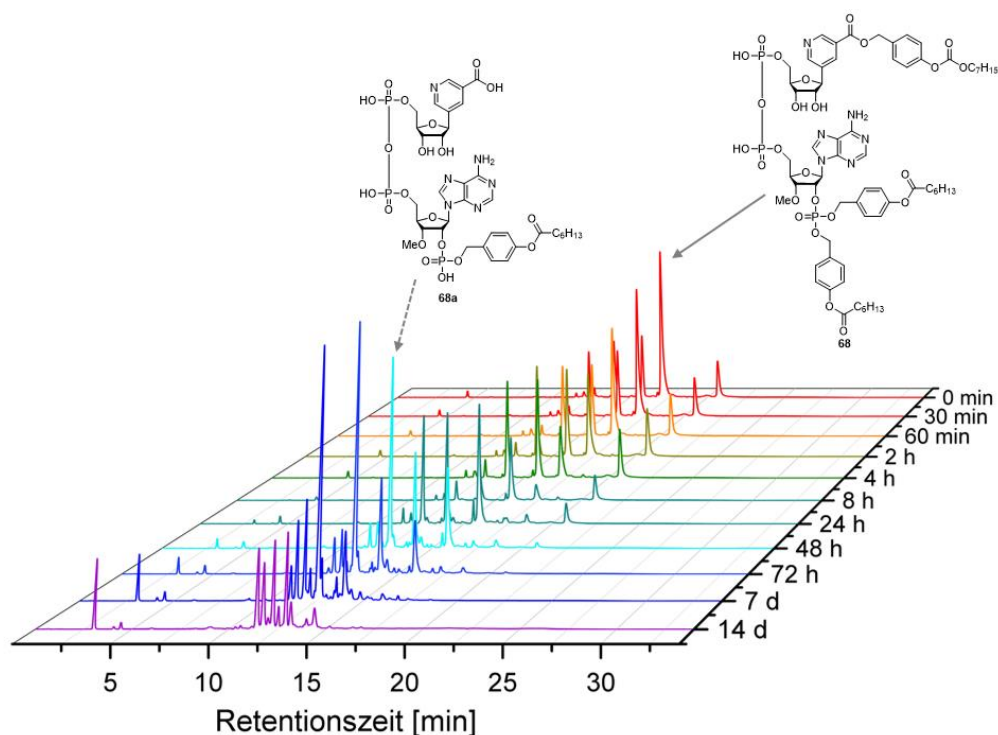


Abb. 143: Chemischer Hydrolyseverlauf der 5-Pyridin-Verbindung 68 in PBS-Puffer.

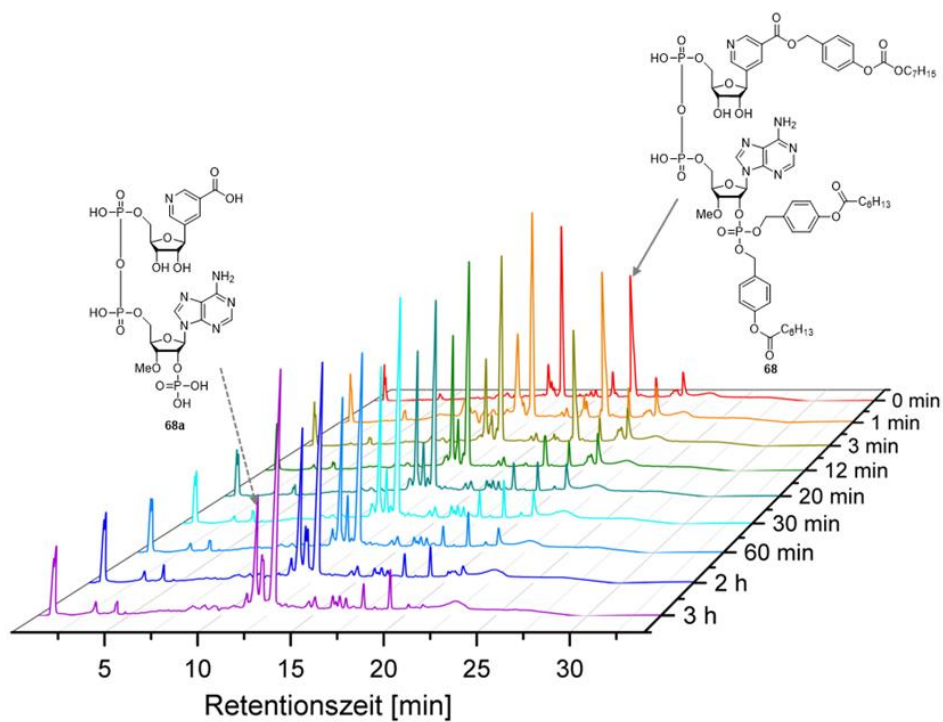


Abb. 144: Enzymatischer Hydrolyseverlauf der 5-Pyridin-Verbindung 68 in PLE-Lösung.

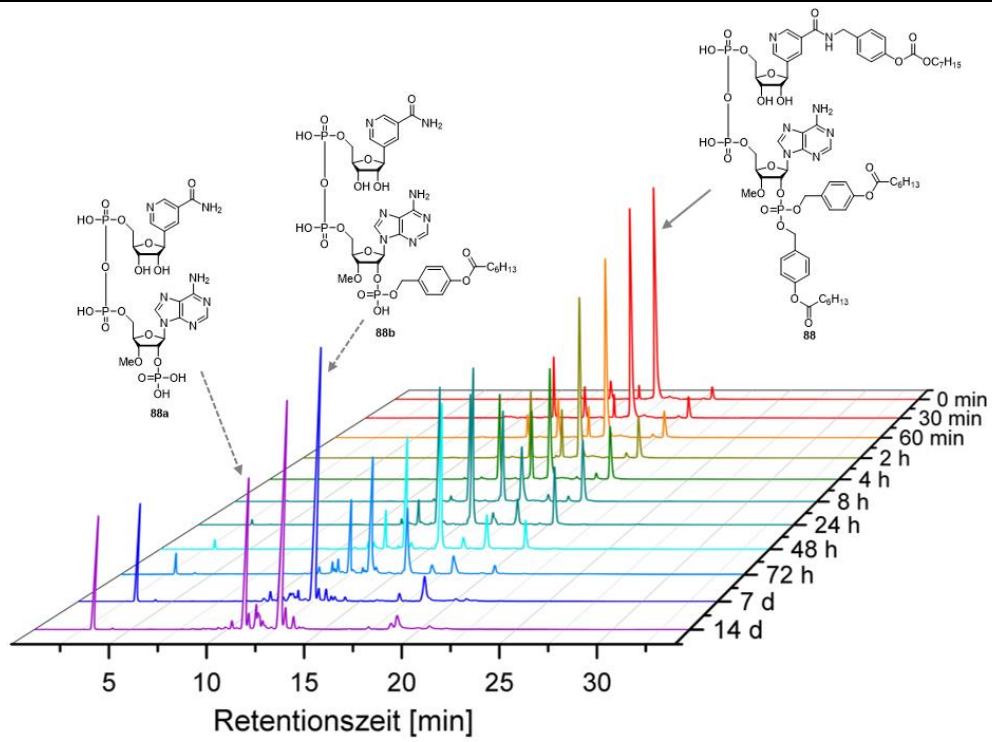


Abb. 145: Chemischer Hydrolyseverlauf der 5-Pyridin-Verbindung **88** in PBS-Puffer.

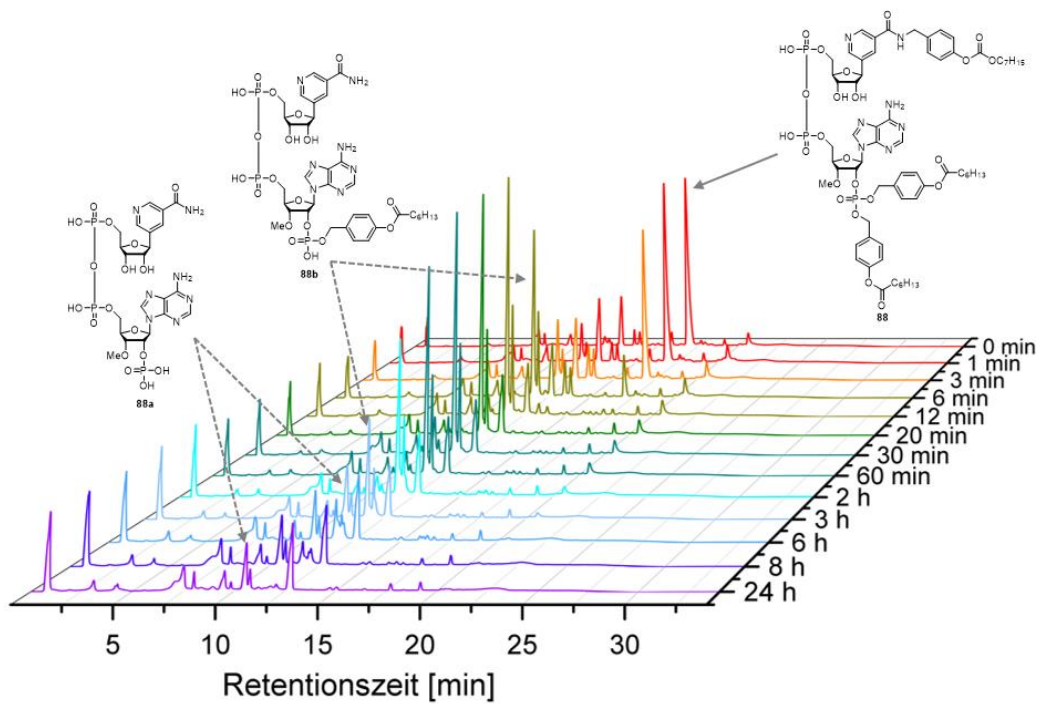


Abb. 146: Enzymatischer Hydrolyseverlauf der 5-Pyridin-Verbindung **88** in PLE-Lösung.

## 11 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Meier für die interessante und herausfordernde Themenstellung sowie den gewährten wissenschaftlichen Freiraum. Herrn Prof. Dr. Holl danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und Prof. Dr. Maison sowie Dr. Hackl für den Beisitz im Dissertationskolloquium.

Den Mitarbeitern der NMR- und MS-Abteilung unter der Leitung von Dr. Thomas Hackl, Dr. Maria Riedner und Dr. Jennifer Menzel danke ich für die zahlreichen Messungen. Besonders Thorsten Mix, Claudia Wontorra und Erik Mordhorst danke ich für die vielen Rücksprachen und die Berücksichtigung von Sonderwünschen. Bei Dr. Jennifer Menzel bedanke ich mich für die LC-MS-Messungen, die viele Stunden ihrer Zeit in Anspruch genommen haben.

Außerdem danke ich dem Arbeitskreis um Prof. Dr. Dr. A. H. Guse vom UKE für die Durchführung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Imagings, insbesondere Dr. Björn Dierks, Franziska Möckl und Dr. Mariella Weiß für den regen wissenschaftlichen Austausch.

Ein weiterer Dank geht an meine Bachelorandin Paulina Warneke, die mit mir in die Tiefen der Carbocyclen eingestiegen ist und es glücklicherweise auch rechtzeitig wieder herausgeschafft hat. An meine Praktikanten Tim-Oliver Kindler, Lorenz Harbacher und Musawer Ahmad sowie an unsere Laborantin Erika Werner geht ein großer Dank für ihre praktische Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit.

Für die akribische Durchsicht dieser Arbeit möchte ich Alja Wölk, Iven Knaack, Jannik Kessler, Nils Jeschik, Kimberly Hanson und Kathrin Lembcke danken.

Ein großer Dank geht an den gesamten Arbeitskreis Meier für die tolle Atmosphäre, die wir geschaffen haben, und in der es sehr viel Spaß gemacht hat, die letzten Jahre zusammenzuarbeiten. Die vielen Kaffee- und Kekspausen, in denen wir viele fachliche Probleme besprochen haben, waren sehr wertvoll. Ein großer Dank geht dabei an Michelle Vogts, die sich fast schon leidenschaftlich um die HPLC gekümmert hat, damit alle zuverlässig an ihre Daten kommen.

Meiner Boulder-Crew danke ich für die vielen Sessions, in denen wir über uns hinausgewachsen sind! Wir haben gelernt, dass wir so viel mehr erreichen, wenn wir uns einfach mal trauen.

## Danksagung

---

Ein ganz besonderer Dank geht an das Labor 515 mit Sahra Tajdar, Dominik Werz und Sarah Krukenberg! Es war eine unvergessliche Zeit mit musikalischen Darbietungen, Tanzeinlagen, Herbie, kaputten Notduschen, Kuchenwetten sowie Basketball- und Volleyballspielen. Mit all den verrückten Geschichten hätten wir wirklich eine Sitcom starten können! Danke für diese unvergesslichen Jahre.

Meinen Freunden Jannik Kessler und Joshua Kollar möchte ich für den Rückhalt und die gegenseitige Unterstützung danken, die im Studium und der Promotion so wichtig ist. Im Besonderen möchte ich Dennis Bäcker danken, der in meiner schwersten Zeit für mich da war und mich bedingungslos unterstützt hat. Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, dass sie mir nie das Gefühl gegeben hat, im Studium oder in der Promotion unter Druck zu stehen, und dass sie mir finanziell unter die Arme gegriffen hat, wenn es doch einmal knapp wurde.

**Dankeschön!**

## 12 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben. Sofern im Zuge der Erstellung der vorliegenden Dissertationsschrift generative Künstliche Intelligenz (gKI) basierte elektronische Hilfsmittel verwendet wurden, versichere ich, dass meine eigene Leistung im Vordergrund stand und dass eine vollständige Dokumentation aller verwendeten Hilfsmittel gemäß der Guten wissenschaftlichen Praxis vorliegt. Ich trage die Verantwortung für eventuell durch die gKI generierte fehlerhafte oder verzerrte Inhalte, fehlerhafte Referenzen, Verstöße gegen das Datenschutz- und Urheberrecht oder Plagiate.

07.05.25, Hamburg

M. Holmann

---

Datum, Ort

Unterschrift