

**Synthese potentieller Inhibitoren, die auf die ADPR-
bindende Macrodomäne Mac1 von SARS-CoV-2 abzielen
sowie
Synthese fluorogener ADPR-Derivate zur Etablierung
eines Inhibitor-Assays für SARS-CoV-2-Mac1**

Synthesis of potential Inhibitors that target the ADPR-binding Macrodomain Mac1
of SARS-CoV-2 and synthesis of fluorogenic labeled ADPR derivatives for the
establishment of an inhibitor assay for SARS-CoV-2-Mac1

Dissertation

Zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades an der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften

von

Sahra Jasmin Tajdar (geboren Massoud)

vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Universität Hamburg

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 im Zeitraum von Juni 2021 bis Dezember 2024 angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Chris Meier

2. Gutachter: Prof. Dr. Ralph Holl

Prüfungskommission Disputation:

Prof. Dr. Chris Meier (Vorsitz)

Prof Dr. Wolfgang Maison (stellv. Vorsitz)

Dr. Thomas Hackl

Datum der Disputation: 18.07.2025

Druckfreigabe: 28.07.2025

*„Die Möglichkeit, dass Träume wahr werden können,
macht das Leben erst interessant“*

Paulo Coelho

*„You see, some things I can teach you.
Some you learn from books.
But there are things, well,
you have to see and feel.“*

Khaled Hosseini: A Thousand Splendid Suns

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1 Zusammenfassung	1
2 Abstract	4
3 Einleitung	7
4 Kenntnisstand	8
4.1 Das Coronavirus SARS-CoV-2	8
4.1.1 Genomstruktur von Coronaviren	8
4.1.2 Viruspartikelbau von Coronaviren	9
4.2 Interferone und ihre Rolle im Immunsystem	10
4.2.1 Regulation der IFN-Antwort mittels der ADP-Ribosylierung	12
4.3 Immunpathogenese von SARS-CoV-2	15
4.4 Das Nichtstrukturprotein nsp3 von SARS-CoV-2	16
4.4.1 Die Macrodomäne Mac1	17
4.4.1.1 Mac1-Inhibitoren	21
4.4.1.2 Vorarbeiten zur Struktur-Wirkungsbeziehung (SAR) von SARS-CoV-2-Mac1	23
4.5 Bisherige Therapie- und Präventionsmaßnahmen gegen COVID-19	25
4.6 Die Verwendung von Prodrugs	27
4.6.1 Das DiPPro- und TriPPPPro-Konzept	28
5 Aufgabenstellung	31
6 Resultate und Diskussion	33
6.1 Synthese von potentiellen Mac1-Inhibitoren	33
6.1.1 Darstellung von Tetrahydrofurfuryl-Adenosindiphosphat 12	33
6.1.1.1 Testung der inhibitorischen Aktivität von Tetrahydrofurfuryl-Adenosindiphosphat 12	47
6.1.2 Darstellung von β -Ethyl-Adenosindiphosphat 27	48
6.1.2.1 Testung der inhibitorischen Aktivität von β -Ethyl-Adenosindiphosphat 27	51

6.1.3	Darstellung von β -Methyl-GS441524-Diphosphat 30	52
6.1.3.1	Testung der inhibitorischen Aktivität von β -Methyl-GS441524-Diphosphat 30 gegen die virale Macrodomäne Mac1	58
6.1.3.2	Testung der inhibitorischen Aktivität von β -Methyl-GS441524-Diphosphat 30 gegen die humanen Macrodomänen MacroD1 und MacroD2	59
6.1.4	AB-Maskierung von β -Methyl-GS441524-Diphosphat 30.....	60
6.1.4.1	Chemische Hydrolyse von Verbindung 36 in PBS-Puffer	72
6.1.4.2	Enzymatische Hydrolyse von Verbindung 36 in PLE.....	73
6.1.4.3	Zellaufnahmestudien von C11-AB- β -Methyl-GS441524-Diphosphat 36	74
6.1.5	Darstellung von β -Ethyl-GS441524-Phosphat-Phosphonat 49	76
6.1.5.1	Testung der inhibitorischen Aktivität von β -Ethyl-GS441524-Phosphat-Phosphonat 49 gegen die virale Macrodomäne Mac1	81
6.1.6	AB-Maskierung von β -Ethyl-GS441524-Phosphat-Phosphonat 49.....	82
6.1.6.1	Chemische Hydrolyse aller maskierten Phosphat-Phosphonate in PBS-Puffer	93
6.1.6.2	Enzymatische Hydrolyse aller maskierten Phosphat-Phosphonate in PLE	97
6.1.6.3	Vergleich der antiviralen Aktivität der Prodrugs 36 und 50 in Zellkultur-Infektions-Assays	101
6.1.7	Darstellung von 7-Deazaadenosindiphosphatribose 62	102
6.1.7.1	Testung der inhibitorischen Aktivität von 7-Deazaadenosindiphosphatribose 62 gegen die virale Macrodomäne Mac1	114
6.2	Entwicklung eines kontinuierlichen Enzym-Assays	115
6.2.1	Synthese von 4-(Trifluormethyl)umbelliferon-Adenosindiphosphatribose 80	115
6.2.1.1	Entwicklung eines kontinuierlichen Enzym-Assays für Mac1 unter Verwendung von TFMU-ADPR 80.....	121
6.2.2	Syntheserversuch von 7-Amino-4-(trifluormethyl)cumarin-Adenosindiphosphatribose 87	123
7	Experimenteller Teil.....	150
7.1	Allgemeines	150
7.1.1	Chemikalien	150
7.1.2	Lösungsmittel	150
7.1.3	Chromatographie.....	151
7.1.4	Ansetzen von Pufferlösungen.....	153
7.1.5	Spektroskopie und Spektrometrie	153

7.1.6	Weitere Geräte.....	154
7.2	Hydrolysestudien	155
7.2.1	Hydrolysestudien in PBS-Puffer.....	155
7.2.2	Hydrolysestudien mit PLE.....	155
7.3	Synthesen	156
7.3.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)	156
7.3.2	Synthesen zu Darstellung von Tetrahydrofurfuryl-Adenosindiphosphat 12 .	158
7.3.3	Synthesen zur Darstellung von β -Ethyl-Adenosindiphosphat 27	162
7.3.4	Synthesen zur Darstellung von β -Methyl-GS441524-Diphosphat 30	165
7.3.5	Synthesen zur Darstellung von β -(-Dodecanoyloxybenzyl-methyl)-GS441524-Diphosphat 36.....	168
7.3.6	Synthesen zur Darstellung von β -Ethyl-GS441524-phosphatphosphonat 49 173	
7.3.7	Synthesen zur Darstellung der AB-maskierten Phosphat-Phosphonate.....	175
7.3.8	Synthesen zur Darstellung von 7-Deazaadenosindiphosphat-ribose 62	182
7.3.9	Synthesen zur Darstellung von α -1-O-(4-(Trifluormethyl)umbellifer-7-yl)-Adenosindiphosphat-ribose 80	189
7.3.10	Synthesen zur Darstellung von 7-Amino-4-(trifluormethyl)cumarin-Adenosindiphosphat-ribose 87	193
8	Gefahrstoffverzeichnis.....	203
8.1	Verwendete Chemikalien	203
8.2	Verwendete KMR-Substanzen.....	211
9	Literatur	212
10	Danksagung	227
11	Eidesstattliche Erklärung.....	229

Abkürzungsverzeichnis

AB	Acyloxybenzyl
abs.	absolut
AcOH	Essigsäure
ADP	Adenosindiphosphat
ADPR	Adenosindiphosphatbose
AIBN	Azobis(<i>isobutyronitril</i>)
AMC	7-Amino-4-(trifluormethyl)cumarin
AMP	Adenosinmonophosphat
Äquiv.	Äquivalente
ARH	ADP-Ribosylhydrolase
ART	ADP-Ribosyltransferase
ber.	berechnet
BSA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)acetamid
bzw.	beziehungsweise
Calu3-Zellen	menschliche Lungenadenokarzinomzellen
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
CoV	Coronavirus
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i>
δ	chemische Verschiebung (NMR)
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCI	4,5-Dicyanoimidazol
demin.	demineralisiert
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DME	1,2-Dimethoxyethan
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMV	Doppelmembranvesikel
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPP	Diphenylphosphonat
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EtOAc	Ethylacetat

Abkürzungsverzeichnis

ESI	Elektrospray-Ionisation
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fm	9-Fluorenylmethyl
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
Gew.%	Gewichtsprozent
HCoV	humanpathogenes Coronavirus
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HR	<i>High Resolution</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HVR	hypervariable Region
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon-alpha-und-beta-Rezeptor
IR	Infrarotspektroskopie
IRF	Interferon-regulatorischer Faktor
ISG	Interferon-stimulierte Gene
ISGF	Interferon-stimulierter Wachstumsfaktor
<i>J</i>	skalare Kern-Kern-Kopplungskonstante
JAK	Januskinase
kb	Kilobase
K _D	Bindungsaffinität
konz.	konzentriert
λ	Wellenlänge
lat.	lateinisch
m	Multipllett
Mac1	Macrodomäne 1
MARylierung	mono-ADP-Ribosylierung
MAVS	<i>mitochondrial antiviral signaling protein</i>
<i>mCPBA</i>	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
MDA5	<i>melanoma differentiation-associated gene 5</i>
MeOH	Methanol
MeOD	Methanol (vierfach deuteriert)
MHV	murine Hepatitis-Virus
MeCN	Acetonitril

Abkürzungsverzeichnis

MERS-CoV	<i>Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus</i>
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NCS	<i>N</i> -Chlorsuccinimid
n.d.	<i>not determined</i>
NDP	Nucleosiddiphosphat
NMI	<i>N</i> -Methylimidazol
NMP	Nucleosidmonophosphat
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
nsp	Nichtstrukturprotein
NTP	Nucleosidtriphosphat
Nu	Nucleophil
Nucl	Nucleosid
ORF	<i>open reading frame</i>
p	Pentett
p.	page
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PARG	Poly(ADP-Ribose)-Glycohydrolase
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PARylierung	poly-ADP-Ribosylierung
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	Petrolether
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PLE	<i>pig liver esterase</i>
PL ^{pro}	papainähnliche Protease
pp	Polyprotein
ppm	<i>parts per million</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PTM	posttranslationale Modifikation
q	Quartett
Rem	Remdesivir
R _f	Retentionsfaktor
RIG-I	<i>retinoic acid-inducible gene 1</i>
RNA	Ribonucleinsäure

Abkürzungsverzeichnis

RP	<i>reversed phase</i>
Rt	Raumtemperatur
S.	Seite
SAR	Struktur-Wirkungsbeziehung
SARS-CoV	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus</i>
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Type 2</i>
Sdp.	Siedepunkt
SFB	Sonderforschungsbereich
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription 1</i>
t	Triplett
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TBAA	Tetra- <i>n</i> -butylammoniumacetat
TBDPSCI	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilylchlorid
TBK1	<i>TRAF family member-associated NF-κB activator binding kinase ϵ</i>
TBSCI	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid
TEAB	Triethylammoniumbicarbonat
<i>tert</i>	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
TFMU	4-(Trifluormethyl)umbelliferon
THF	Tetrahydrofuran
TIPDS	1,1,3,3-Tetra <i>is</i> opropyl-disiloxan
TM	Transmembran
TMP	Trimethylphosphat
TMSOTf	Trimethylsilyltrifluormethansulfonat
TRAF3	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiertes Faktor 3
β -TrCP	<i>β-transducin repeats-containing protein</i>
TREAT-HF	Triethylamin-Trihydrofluorid
TsCl	Tosylchlorid
Tyk	Tyrosinkinase
Ubl	ubiquitinähnliche Domäne
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
v/v	Volumenverhältnis

1 Zusammenfassung

Das β -Coronavirus SARS-CoV-2 wurde erstmals Ende 2019 in Wuhan, China identifiziert und hat neben SARS-CoV und MERS-CoV zu epidemischen und pandemischen Ausbrüchen von Coronavirusinfektionen geführt (Kapitel 4.1, S. 8). Infektionen mit diesem Virus können die Ursache für die Entwicklung von schweren sowie lebensbedrohlichen Atemwegserkrankungen, Lungenschäden und Multiorganversagen sein. Dabei deutet eine wachsende Zahl an Studien darauf hin, dass akute und tödliche Krankheitsverläufe mit einer dysregulierten und verzögerten Immunantwort zusammenhängen. Hierbei war insbesondere die Manipulation der Typ-I-Interferonantwort bedeutend für eine ungestörte Replikation des Virus und der Schwere von COVID-19 (Kapitel 4.3, S. 15f.). Als Teil des antiviralen Abwehrsystems unterliegt die Produktion von Interferonen einer komplexen Regulation. Hierbei werden die Signaltransduktionswege des Immunsystems von Poly-(ADP-Ribose)-Polymerasen und der ADP-Ribosylierung moduliert. Die ADP-Ribosylierung ist eine reversible posttranslationale Modifikation, bei der mindestens eine ADPR-Einheit mittels Poly-(ADP-Ribose)-Polymerasen auf ein Akzeptormolekül übertragen wird (Kapitel 4.2.1, S. 12ff.). Allerdings wird vermutet, dass die Macrodomäne Mac1 von Coronaviren die Fähigkeit besitzt die ADP-Ribosylierung umzukehren und über diesen Weg die angeborene Immunantwort zu umgehen. Dies macht die virale Macrodomäne Mac1 und ihre De-ADP-Ribosylierungsaktivität zu einem potentiellen Virulenzfaktor und stellt somit ein neues *Target* für die Bekämpfung von Coronavirusinfektionen dar (Kapitel 4.4.1.1, S. 21f.). Während bereits präventive Impfstoffe gegen SARS-CoV-2 zugelassen wurden, besteht weiterhin ein enormer Bedarf an der Erforschung und Entwicklung von therapeutischen Strategien und Breitbandvirostatika (Kapitel 4.5, S. 25f.).

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden potentielle Mac1-Inhibitoren synthetisiert und hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität getestet. Dabei wurden zunächst die Erkenntnisse von vorangegangenen Arbeiten zur Struktur-Wirkungsbeziehung, die in Kooperation mit dem Sonderforschungsbereich 1328 ermittelt wurden, evaluiert (Kapitel 4.4.1.2, S. 23ff.). Hierbei wurde ersichtlich, dass eine Minimierung der Struktur des nativen Substrats ADPR **25** ($IC_{50}(\text{SARS-CoV-2-Mac1}) = 24 \pm 5 \mu\text{M}$) zu β -Methyl-ADP **26** ($IC_{50}(\text{SARS-CoV-2-Mac1}) = 13 \pm 2 \mu\text{M}$) zu einer fast zweifachen Erhöhung der inhibitorischen Aktivität führte. Ein vollständiges Entfernen der terminalen Ribose von ADPR **25**, führte zu Werten im millimolaren Bereich. Aus diesem Grund wurden zunächst THF-ADP **12** und β -Ethyl-ADP **27** als potentielle Mac1-Inhibitoren synthetisiert, da hier die Substituenten an der β -Phosphatgruppe weniger sterisch anspruchsvoll sind (Kapitel 6.1, S. 33).

Für die Darstellung von THF-ADP **12** und β -Ethyl-ADP **27** wurde eine Syntheseroute über drei Schritte etabliert, die sich als sehr robust und reproduzierbar erwies (Kapitel 6.1.1 und 6.1.2, S. 33ff., S. 48ff.). Während THF-ADP **12** keine inhibitorische Aktivität gegenüber SARS-CoV-2-Mac1 aufwies (Kapitel 6.1.1.1, S. 47), wurde für β -Ethyl-ADP **27** ein IC_{50} (SARS-CoV-2-Mac1)-Wert von $40 \pm 6 \mu\text{M}$ ermittelt (Kapitel 6.1.2.1, S. 51f.). Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde festgestellt, dass keine der synthetisierten Verbindungen einen potenten Inhibitor gegen die virale Mac1 von Coronaviren darstellt.

Als Nächstes wurde auf Basis der obigen Erkenntnisse β -Methyl-ADP **26** als Leitstruktur gewählt und der Adenosinteil durch das Remdesivir-Nucleosid GS-441524 **4** ausgetauscht und die Methyleinheit als Minimalmotiv der β -Substitution beibehalten. Die Darstellung erfolgte analog zu den Synthesen der anderen beiden Verbindungen mit sehr guten Ausbeuten (Kapitel 6.1.3, S. 52ff.). Es konnte ein IC_{50} (SARS-CoV-2-Mac1)-Wert von $0.32 \pm 0.05 \mu\text{M}$ ermittelt werden, was die Verbindung β -Methyl-GS-DP **30** zu einem 40-fach besseren Inhibitor als das entsprechende methylierte Adenosin-Derivat **26** macht und somit eine 75-fach höhere inhibitorische Aktivität als das native ADPR **25** aufweist (Kapitel 6.1.3.1, S. 58). Zusätzlich wurde Verbindung **30** an humanen Macrodomänen getestet und es wurde keine Inhibition beobachtet. Dies lässt darauf schließen, dass β -Methyl-GS-DP **30** nicht nur einen potenten, sondern auch einen selektiven Inhibitor gegen die virale Macrodomäne darstellt (Kapitel 6.1.3.2, S. 59).

Mit diesen vielversprechenden pharmakologischen Eigenschaften wurde die Verbindung **30** für weitergehende zellbasierte Tests in eine membrangängige Prodrug-Form überführt. Hierzu wurde das sogenannte, von MEIER publizierte, DiPPro-Konzept angewendet. Die Verbindung **36** wurde mit einer C11-AB-Maske an der β -Phosphatgruppe versehen. Für die erfolgreiche Darstellung des Prodrugs **36** hat sich die *H*-Phosphonatroute als vielversprechende Synthesestrategie erwiesen. Jedoch wurde eine geringe Stabilität der Phosphoranhydridbindung der DiPPro-Verbindung **36** beobachtet (Kapitel 6.1.4, S. 60ff.). In Hydrolysestudien zur chemischen Stabilität konnte eine Halbwertszeit von $t_{1/2} = 61$ Stunden ermittelt werden, wobei bereits nach 30 Sekunden ein Zerfall zum Monophosphat **31** beobachtet werden konnte. Bei der enzymatischen Hydrolyse konnte keine Halbwertszeit bestimmt werden, da schon in der 0 Sekunden-Probe hauptsächlich das demaskierte Diphosphat **30** nachgewiesen wurde (Kapitel 6.1.4.1 und 6.1.4.2, S. 72ff.). Neben der chemischen und enzymatischen Stabilität wurde die DiPPro-Verbindung **36** hinsichtlich der Zellpermeabilität getestet. Bei Zellaufnahmestudien in Calu3-Zellen konnte eine effiziente und ausreichende Membranpermeabilität festgestellt werden (Kapitel 6.1.4.3, S. 74).

Für eine Stabilisierung der Phosphoranhydridbindung des Prodrugs **36** wurde die β -Phosphatgruppe mit einer Phosphonatgruppe ausgetauscht. Zunächst wurde das unmaskierte

Phosphat-Phosphonat **49** ausgehend von Ethanphosphonsäuredichlorid **53** in guten Ausbeuten synthetisiert (Kapitel 6.1.5, S. 76ff.). Für die inhibitorische Aktivität gegen die virale Mac1 konnte ein IC_{50} -Wert von $1.6 \pm 0.3 \mu\text{M}$ ermittelt werden. Damit ist die Verbindung **49** ein weniger potenter Inhibitor als das entsprechende Diphosphat **30**, jedoch noch immer rund 15-fach besser als ADPR **25**. Dies macht das Phosphat-Phosphonat **49** ebenfalls zu einem potenten Mac1-Inhibitor (Kapitel 6.1.5.1, S. 81).

Anschließend wurden die entsprechenden C8-AB- **56**, C11-AB- **50** und C14-AB-maskierten **57** Phosphat-Phosphonate synthetisiert. Auffällig war, dass die Reaktion zwischen dem Ethanphosphonsäuredichlorid **53** und der entsprechenden AB-Maske häufig zum zweifach-maskierten Phosphonat führte, weshalb die Ausbeuten moderat ausfielen (Kapitel 6.1.6, S. 82ff.). Die synthetisierten AB-maskierten Phosphat-Phosphonate **50**, **56** und **57** wurden in Hydrolysestudien hinsichtlich ihrer chemischen und enzymatischen Stabilität getestet. Während für die C11-AB- **50** und die C14-AB-maskierte Verbindung **57** Halbwertszeiten von $t_{1/2} = 21 \text{ h}$ und $t_{1/2} = 93 \text{ h}$ bestimmt wurden, konnte selbst nach vier Wochen keine vollständige chemische Hydrolyse des C8-AB-maskierten Phosphat-Phosphonats **56** beobachtet werden (Kapitel 6.1.6.1, S. 93ff.). Bei der enzymatischen Hydrolyse wurde eine längere Halbwertszeit bei längerer Alkylkette beobachtet (Kapitel 6.1.6.2, S. 97ff.).

Als neue Klasse von Mac1-Inhibitoren wurde 7-Deaza-ADPR **62** dargestellt, wobei die Synthese anlehnend an DROWN *et al.* und MOHAMADY *et al.* durchgeführt wurden (Kapitel 6.1.7, S. 102ff.). Mit einem $IC_{50}(\text{SARS-CoV-2-Mac1})$ -Wert von $15 \mu\text{M}$ ist 7-Deaza-ADPR **62** genauso wie das Phosphat-Phosphonat **49** ebenfalls ein vielversprechender Kandidat für eine Inhibition der viralen Mac1 (Kapitel 6.1.7.1, S. 114).

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein fluoreszenzmarkiertes ADPR-Derivat synthetisiert, um einen kontinuierlichen Enzym-Assay zu etablieren und damit die Hydrolaseaktivität von SARS-CoV-2-Mac1 zu untersuchen. Hierbei war vor allem zu berücksichtigen, dass die virale Mac1 lediglich α -1"-glycosidische Bindungen hydrolysieren kann. Zunächst wurde TFMU-ADPR **80** als fluorogenes Substrat über eine Syntheseroute anlehnend an DROWN *et al.* dargestellt, jedoch konnte nur eine geringe Selektivität für das virale Enzym festgestellt werden, was auf die vorhandene O-glycosidische Bindung zurückgeführt wurde (Kapitel 6.2.1 und 6.2.1.1, S. 115ff.).

In einem zweiten Ansatz erfolgte der Syntheseversuch von AMC-ADPR **87**, wobei zwei unterschiedliche Syntheserouten erprobt wurden. Über beide Synthesewege konnte kein Produkt **87** isoliert werden, was auf die potentielle Labilität der N-glycosidischen Bindung zurückgeführt wurde (Kapitel 6.2.2, S. 123ff.).

2 Abstract

The beta-coronavirus SARS-CoV-2 was first identified in late 2019 in Wuhan, China. Along with SARS-CoV and MERS-CoV, it has led to epidemic and pandemic outbreaks of coronavirus infections (chapter 4.1, p. 8). Infections with these viruses can result in life-threatening diseases of the respiratory system, severe lung injury and multi organ failure. A growing number of studies indicate that the acute and fatal courses are linked to a dysregulated and delayed immune response. In particular, the manipulation of the type-I interferon response was important for the undisturbed replication of the virus and the severity of COVID-19 (chapter 4.3, p. 15f.). As part of the antiviral defense system, interferon production is subject to complex regulation. Hereby, the signal transduction pathways of the human immune system are modulated by poly(ADP-ribose) polymerases and ADP-ribosylation. ADP-ribosylation is a reversible posttranslational modification, where at least one ADPR unit is transferred to an acceptor protein by poly(ADP-ribose) polymerases (chapter 4.2.1, p. 12ff.). However, it has been suggested that the macrodomain Mac1 of coronaviruses may have the ability to reverse ADP-ribosylation, thus, evade the innate immune response. This makes the viral macrodomain Mac1 and its de-ADP-ribosylation activity a potential virulence factor and thus represents a promising target to combat coronavirus infections (chapter 4.4.1.1, p. 21f.). While preventive vaccines against SARS-CoV-2 have already been approved, there is still a huge need for research and development of therapeutic strategies and broad-spectrum antivirals (chapter 4.5, p. 25f.).

In the first part of the present work, potential Mac1 inhibitors were synthesized and characterized regarding their inhibitory activity. Based on insights of previous work on the structure activity relationship, which were determined in cooperation with the *Sonderforschungsbereich 1328*, were first evaluated (chapter 4.4.1.2, p. 23ff.). It was shown that minimizing the lead structure ADPR **25** ($IC_{50}(\text{SARS-CoV-2-Mac1}) = 24 \pm 5 \mu\text{M}$) to β -methyl-ADP **26** ($IC_{50}(\text{SARS-CoV-2-Mac1}) = 13 \pm 2 \mu\text{M}$) led to a two-fold increase in inhibition. Complete removal of the terminal ribose from ADPR **25** resulted in values in the millimolar range. Therefore, THF-ADP **12** and β -Ethyl-ADP **27** were synthesized as potential Mac1 inhibitors, bearing sterically less demanding substituents at the β -phosphate group (chapter 6.1, p. 33).

A three-step synthesis route was established for the preparation of THF-ADP **12** and β -ethyl-ADP **27**, which proved to be very robust and reproducible (chapter 6.1.1 and 6.1.2, p. 33ff., p. 48ff.). While THF-ADP **12** showed no inhibitory activity against SARS-CoV-2-Mac1 (chapter 6.1.1.1, p. 47), an $IC_{50}(\text{SARS-CoV-2-Mac1})$ value of $40 \pm 6 \mu\text{M}$ was

determined for β -ethyl-ADP **27** (chapter 6.1.2.1, p. 51ff.). These results showed that none of the synthesized compounds are potent inhibitors against the viral Mac1 of coronaviruses. Next, with β -methyl-ADP **26** as the lead structure, the adenosine moiety was replaced by the Remdesivir nucleoside GS-441524 **4**. The synthesis was analogous to the synthesis of the previous two compounds and resulted in very good yields (chapter 6.1.3, p. 52ff.). With an IC_{50} (SARS-CoV-2-Mac1) value of $0.32 \pm 0.05 \mu\text{M}$, β -methyl-GS-DP **30** shows a 40-fold increase in inhibition, contrasting the respective methylated adenosine derivative **26** and even a 75-fold better inhibitor than ADPR **25** (chapter 6.1.3.1, p. 58). In addition, compound **30** was tested on human macrodomains and no inhibition was observed. This suggests that β -methyl-GS-DP **30** is not only a potent but also a selective inhibitor against the viral macrodomain (chapter 6.1.3.2, p. 59).

With these promising pharmacological properties, compound **30** was converted into a membrane-permeable derivative for further cell-based testing. The so-called DiPPro approach published by MEIER was used for this purpose. The DiPPro **36** was substituted with a C11-AB masking unit at the β -phosphate group. The *H*-phosphonate route proved to be a promising synthetic strategy for the successful preparation of prodrug **36**. However, low chemical stability of the phosphorus anhydride bond of DiPPro **36** was observed (chapter 6.1.4, p. 60ff.). The hydrolysis studies regarding the chemical stability indicated a half-life of 61 hours, and an incipient decomposition to the monophosphate **31** was observed after only 30 seconds. No half-life could be determined in the enzymatic hydrolysis, as the unmasked diphosphate **30** was identified as the primary constituent in the 0 second sample (chapter 6.1.4.1 and 6.1.4.2, p. 72ff.).

In addition to chemical and enzymatic stability, DiPPro **36** was also tested regarding cell permeability. In cell uptake studies with Calu3 cells, efficient and sufficient membrane permeability was observed (chapter 6.1.4.3, p. 74).

To stabilize the phosphorus anhydride bond of prodrug **36**, the β -phosphate group was replaced with a phosphonate moiety. First, the unmasked phosphate-phosphonate **49** was synthesized in good yields starting from ethylphosphonic dichloride **53** (chapter 6.1.5, p. 76ff.). An IC_{50} value of $1.6 \pm 0.3 \mu\text{M}$ was determined for the inhibitory activity against viral Mac1. Consequently, compound **49** is not such a strong inhibitor as the corresponding diphosphate **30**, but still around 15 times more powerful than ADPR **25** (chapter 6.1.5.1, p. 81).

Subsequently, the respective C8-AB **56**, C11-AB **50** and C14-AB masked **57** phosphate phosphonates were synthesized. It was noticed that the reaction between the ethylphosphonic dichloride **53** and the corresponding AB alcohols often led to the double substituted phosphonate, resulting in only moderate yields (chapter 6.1.6, p. 82ff.). The

synthesized AB-masked phosphate-phosphonates **50**, **56** and **57** were characterized in hydrolysis studies regarding their chemical and enzymatic stability. While half-lives of $t_{1/2} = 21$ h and $t_{1/2} = 93$ h were determined for the C11-AB- **50** and the C14-AB-masked compound **57**, no complete chemical hydrolysis of the C8-AB-masked phosphate phosphonate **56** was observed even after four weeks (chapter 6.1.6.1, p. 93ff.). During enzymatic hydrolysis, a longer half-life was observed with increasing lipophilicity of the masking unit (chapter 6.1.6.2, p. 97ff.).

As a new class of Mac1 inhibitors, 7-Deaza-ADPR **62** was synthesized according to DROWN *et al.* and MOHAMADY *et al.* (chapter 6.1.7, p. 102ff.). With an $IC_{50}(\text{SARS-CoV-2-Mac1})$ value of 15 μM 7-Deaza-ADPR **62** is, similar to phosphate phosphonate **49**, a promising candidate for the inhibition of viral Mac1 (chapter 6.1.7.1, p. 114).

In the second part of the work, a fluorogenic labeled ADPR derivative was synthesized to establish a continuous enzyme assay, allowing the investigation of the hydrolase activity of SARS-CoV-2-Mac1. Importantly, viral Mac1 is only able to hydrolyze α -1''-glycosidic bonds. Initially, TFMU-ADPR **80** was prepared as a fluorogenic substrate using a synthetic route based on DROWN *et al.* However, only low selectivity for the viral enzyme was observed, which was attributed to the O-glycosidic bond (chapter 6.2.1 and 6.2.1.1, p. 115ff.).

In a second approach, the synthesis of AMC-ADPR **87** was attempted using two different synthetic routes. No product **87** was isolated by either synthesis strategy, suggesting that the lability of the N-glycosidic bond makes synthetic access difficult.

3 Einleitung

Seit Beginn des 21. Jahrhunderts kam es bereits dreimal zur zoonotischen Übertragung von hochpathogenen Coronaviren auf den Menschen. SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Type 2*) war das jüngst aufgetretene Coronavirus, welches sich innerhalb weniger Monate weltweit verbreitete und zu einer Pandemie führte, die drei Jahre anhielt.^[1-3]

Mittlerweile kommt SARS-CoV-2 im Menschen endemisch vor und führt hauptsächlich zu Infektionen der Atemwege, die durch milde Krankheitssymptome begleitet werden.^[1,4] In schweren COVID-19-Fällen (*Coronavirus Disease 2019*) können hingegen lebensbedrohliche Atemwegserkrankungen und Lungenschäden auftreten, die ein Multiorganversagen zur Folge haben.^[5,6] Hierbei trägt eine ungenügende Immunantwort, die durch eine schwache Produktion von Typ-I-Interferonen (IFN-I) und eine verstärkte Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen gekennzeichnet ist, zu den schweren Formen der Erkrankung bei.^[7]

Ein wichtiger regulatorischer Faktor für die antivirale Immunreaktion einer Wirtszelle stellt die Adenosindiphosphat-Ribosylierung (ADP-Ribosylierung) dar. Sie ist eine der grundlegenden posttranslationalen Modifikationen, die reversibel ist und durch verschiedene zelluläre Enzyme wieder entfernt werden kann.^[8] Doch auch SARS-CoV-2 und andere Coronaviren codieren für ein virales Enzym, welche die ADPR-Hydrolaseaktivität aufweisen. Hierbei handelt es sich um die Macrodomäne 1 (Mac1), welche im Nichtstrukturprotein 3 (nsp3) von Coronaviren enthalten ist und zur Familie der MacroD-ähnlichen Macrodomänen gehört.^[9,10] Mac1 ist strukturell konserviert und kann ADP-ribosylierte Proteine binden und die Bindungsspaltung von ADPR zum Protein katalysieren.^[11] Diese sogenannte De-ADP-Ribosylierungsaktivität lässt vermuten, dass dieser Mechanismus von Coronaviren genutzt wird, um die Immunantwort der Wirtszelle zu umgehen und zu manipulieren, um so dem Immunsystem auszuweichen.^[12-14]

Es wurden bereits präventive SARS-CoV-2-Impfstoffe zugelassen, die für die weltweite Genesung von entscheidender Bedeutung waren. Jedoch besteht nach wie vor ein enormer Bedarf an der Identifizierung neuartiger Angriffspunkte für therapeutische Strategien und an der Entwicklung antiviraler Breitbandtherapeutika.^[15] Hierbei stellt die De-ADP-Ribosylierungsaktivität von Mac1 ein potentiell *Target* für neue antivirale Ansätze dar, weil sie im Hinblick auf die Virulenz von Coronaviren eine bedeutende Rolle zu spielen scheint.^[15-17] Zudem ist eine weitere Erforschung der virale Macrodomäne und ihre Hydrolaseaktivität von äußerstem Interesse, da sie strukturell in unterschiedlichen Virusarten konserviert^[18-20] ist und ein vielversprechendes *Target* für die Entwicklung von Breitbandvirostatika darstellt.

4 Kenntnisstand

4.1 Das Coronavirus SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) ist ein β -Coronavirus und wird der Unterfamilie *Orthocoronavirinae* in der Familie *Coronaviridae* zugeordnet. Diese Virusfamilie gehört zur Unterordnung *Cornidovirineae* in der Ordnung *Nidovirales*.^[1,21] Neben den β -Coronaviren besteht die Unterfamilie *Orthocoronavirinae* aus drei weiteren Gattungen, den α -, γ - und δ -Coronaviren. Während γ - und δ -Coronaviren ein breites Wirtsspektrum aufweisen, das Vogelarten umfasst, infizieren α - und β -Coronaviren ausschließlich Säugetiere.^[1,2]

Die sieben bekannten humanpathogenen Coronavirus-Spezies (HCoVs) sind HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, HCoV-OC43, SARS-CoV, MERS-CoV (*Middle East respiratory syndrome coronavirus*) und SARS-CoV-2. Während HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-HKU1 und HCoV-OC43 hauptsächlich zu Erkrankungen der oberen Atemwege mit milden Krankheitssymptomen führen und weltweit endemisch zirkulieren, haben SARS-CoV, MERS-CoV und SARS-CoV-2 über eine zoonotische Übertragung in den letzten zwanzig Jahren zu Epidemien und Pandemien geführt.^[21,22] Im Jahr 2002/2003 kam es zu einem epidemischen Ausbruch von SARS-CoV mit einer Sterblichkeitsrate von 10 %. Dabei wurden die ersten SARS-CoV-Infektionen in Südchina dokumentiert und verbreiteten sich innerhalb weniger Wochen in 29 Ländern. Nur einige Jahre später im Jahr 2012 führte MERS-CoV zu einer Epidemie auf der arabischen Halbinsel mit einer Sterblichkeitsrate von 35 %.^[23] Das verwandte SARS-CoV-2 war bis zum August 2024 für über 775 Millionen Fälle von COVID-19 (*Coronavirus disease 2019*) und für rund 7.1 Millionen Todesfälle weltweit verantwortlich.^[3] Das Virus wurde erstmals Ende 2019 in Wuhan, China identifiziert, verbreitete sich schnell auf der ganzen Welt und kennzeichnete, seit dem 21. Jahrhundert, die dritte zoonotische Einführung eines hochpathogenen Coronavirus.^[2,13]

4.1.1 Genomstruktur von Coronaviren

Das virale Genom von SARS-CoV-2 besitzt genau wie die anderen HCoVs eine einzelsträngige, nichtsegmentierte RNA in Plusstrangorientierung mit einer Basenlänge von ca. 30 kb^[24] und stellt bisher das größte bekannte RNA-Genom dar.^[25] Am 5'-Ende des SARS-CoV-2-Genoms gibt es eine m⁷G-cap-Struktur und am 3'-Ende einen poly(A)-Schwanz mit einer Länge von 30 bis 60 Nucleotiden (siehe Abbildung 1), die dazu beitragen, dass eine höhere Stabilität des viralen Genoms gewährleistet ist und ein Abbau der RNA mittels zellulärer Exoribonucleasen verhindert wird.^[24,26] Zusätzlich liegt zwischen der 5'-Cap-Struktur und dem Startcodon sowie zwischen dem Stoppcodon und dem

poly(A)-Schwanz am 3'-Ende jeweils eine untranslatierte Region (UTR) vor.^[21] Sie sind die Randbereiche der mRNA und codieren nicht für die eigentlichen Proteine, jedoch können in diesen Regionen verschiedene regulatorische Sequenzen liegen.^[27]

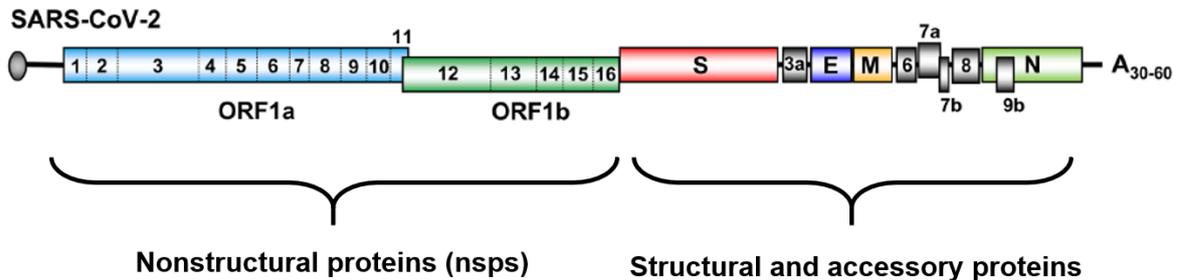


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Genomorganisation von SARS-CoV-2.^[24]

Generell können die Genome der verschiedenen Coronavirusspezies in der Anzahl ihrer offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF) variieren,^[26] wobei das Genom von SARS-CoV-2 aus 14 ORFs besteht.^[28] Die ersten beiden offenen Leserahmen ORF1a und ORF1b am 5'-Ende sind am größten und machen zwei Drittel der gesamten Genomlänge aus.^[26] Sie codieren für zwei Polyproteine, pp1a und pp1ab, wobei die Translation von ORF1a zur Synthese des Polyproteins 1a führt. Damit das Polyprotein 1ab gebildet werden kann, muss eine Verschiebung des ribosomalen Leserasters (*frame shift*) induziert werden, die dazu führt, dass das Stoppcodon am Ende des ORF1a überlesen wird. Dieser *frame shift* findet in 20 bis 30 % der Translation statt.^[29] Die beiden gebildeten Polyproteine können dann mithilfe von Proteasen in 16 unterschiedliche Nichtstrukturproteine (nsp) prozessiert werden, die für die Genexpression und die Pathogenese des Virus essentiell sind. Während pp1a für die Nichtstrukturproteine nsp1 bis nsp11 codiert, enthält pp1ab nsp1 bis nsp16.^[21] Im zum 3'-Ende orientierten Drittel des Genoms befinden sich die ORFs der Strukturproteine. In der Reihenfolge vom 5'- zum 3'-Ende codieren sie für die Spike- (S), Hüll- (E), Membran- (M) und Nucleocapsidproteine (N). Zusätzlich kommen in diesem Bereich unterschiedlich viele kleine ORFs vor, die überwiegend für kleine akzessorische Proteine codieren, dessen Funktionen bisher nicht bekannt sind.^[29,30]

4.1.2 Viruspartikelbau von Coronaviren

In Abbildung 2 ist der Aufbau eines Coronaviruspartikels dargestellt. Die membranumhüllten Viruspartikel besitzen einen Durchmesser von 80 bis 160 nm. Im Inneren des Partikels liegt die einzelsträngige RNA vor, die mit Nucleocapsidproteinen (N-Proteinen) assoziiert ist. Sie ist helikal angeordnet und weist einen Durchmesser von 10 bis 20 nm auf.^[23]

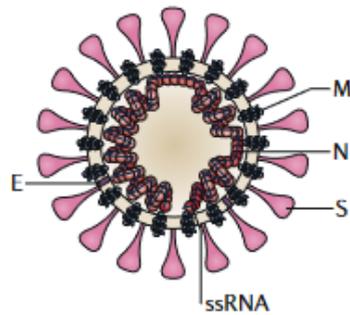


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Coronaviruspartikels mit abgebildeten Spike- (S), *Envelope*- (E), Membran- (N) und Nucleocapsid-Proteinen (N) sowie der einzelsträngigen RNA (ssRNA).^[23]

Definierte Aminosäuren des N-Proteins interagieren mit der carboxyterminalen Domäne des Membranproteins (M-Protein), welches in die Hüllmembran des Partikels eingelagert ist. Somit ist das Nucleocapsid über Proteinwechselwirkungen mit der Innenseite der Membran komplexiert. Im Virion ist das M-Protein das am häufigsten vorkommende Strukturproteinen und ist ein kleines Protein mit drei Transmembrandomänen, das vermutlich für die Form des Virions verantwortlich ist.^[21] Neben dem M-Protein sind auch das Hüllprotein (E-Protein, *Envelope*-Protein) und das Spike-Glycoprotein (S-Protein) mit der Virushülle assoziiert. Das E-Protein ist nur in geringen Mengen im Virion enthalten und ist ein Transmembranprotein. Die glycosylierten S-Proteine liegen in keulenförmigen Trimeren vor, die ungefähr 20 nm aus der Membranoberfläche herausragen und für das Erscheinungsbild der *Corona* (lat. Für Krone, Kranz) verantwortlich sind. Die Hämagglutinin-Esterase (HE-Protein) ist ein weiteres in die Hüllmembran eingelagertes Protein, welches jedoch nur in einer Untergruppe der Gattung Betacoronavirus vorhanden ist.^[21,29,31]

4.2 Interferone und ihre Rolle im Immunsystem

Interferone (IFN) sind Proteine und gehören zu den Zytokinen.^[32] Der Begriff „Interferon“ bezieht sich auf den Begriff der viralen Interferenz. Damit ist gemeint, dass Zellen, die einmal mit einem Virus infiziert wurden gegen nachfolgende Infektionen durch dasselbe oder ähnliche Viren resistent werden.^[33] Erste Beobachtungen im Jahr 1935 zeigten, dass Kaninchen nach einer Infektion mit dem Herpes simplex-Virus gegen anschließende Infektionen mit demselben Virus immun waren.^[34] Die Existenz von Interferonen konnte allerdings erst im Jahr 1957 von ISAACS UND LINDEMANN bei ihren Studien zu Virus-

interferenzen wissenschaftlich bestätigt werden. Bei ihren Untersuchungen entdeckten sie, dass Kükenzellen, die mit dem Influenzavirus infiziert wurden, einen Faktor produzierten, der einen virusresistenten Zustand vermittelte und somit gegen Viren aktiv war.^[35]

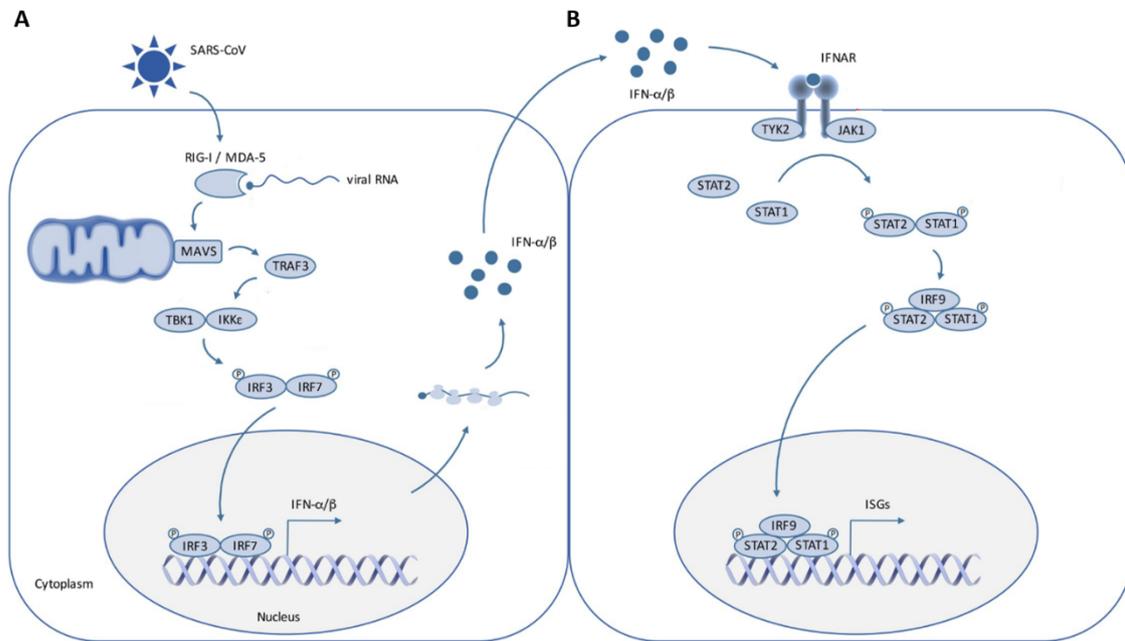


Abbildung 3: Vereinfachte, schematische Darstellung der Interferonantwort ausgelöst durch die Erkennung von viraler RNA. **A)** Signaltransduktionsweg zur Induktion von Typ-I-Interferonen. **B)** IFN-I-Signalweg in benachbarten Zellen zur Expression der antiviral und antiproliferativ aktiven Interferon-stimulierten Gene.^[13]

Interferone werden in Typ-I-, Typ-II- und Typ-III-IFNs eingeteilt und sind ein sehr bedeutender Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Die Typ-I-IFNs sind gemeinsam mit den Typ-III-IFNs die wichtigsten antiviralen Interferone und ihre Expression ist entscheidend, um einen ausreichenden antiviralen Schutz zu gewährleisten.^[5,13] Bei einer Virusinfektion wird das Pathogen über sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (PRRs, *Pattern recognition receptors*) erfasst, die sich auf der Zelloberfläche, im Cytosol oder in endosomalen Kompartimenten befinden. Sie erkennen konservierte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs, *Pathogen-associated molecular patterns*), z.B. virale Nucleinsäuren, der eindringenden Mikroorganismen.^[13] Die meisten RNA-Viren werden von den cytosolischen Rezeptoren RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*) und MDA5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*) detektiert, die anschließend mit dem Adapterprotein MAVS (*mitochondrial antiviral signaling protein*) interagieren.^[36] Die Aktivierung von MAVS führt zur Rekrutierung des Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziierten Faktors 3 (TRAF3) gefolgt von der Phosphorylierung der Interferon-regulatorischen Faktoren IRF3 und IRF7 durch die Kinasen TBK1 (*TRAF family member-associated NF-κB activator binding kinase*

1) und IKK ϵ (*inhibitor of nuclear factor κ B kinase ϵ*).^[36,37] Anschließend translozieren die phosphorylierten IRFs in den Nucleus, um die Expression von Typ-I-Interferonen zu induzieren (Abbildung 3A).^[38] Die Produktion der Interferone selbst führt allerdings noch zu keiner schützenden Wirkung der infizierten Zellen.^[32] Erst die Aktivierung der IFN-Signalkaskade in benachbarten und infizierten Zellen führt zur Produktion von Effektorproteinen, die die antiviralen und antiproliferativen Mechanismen in Gang setzen.^[13,32] Hierbei binden die Typ-I-Interferone an die Interferon-alpha-und-beta-Rezeptoren (IFNAR) und aktivieren dadurch die Kinasen Tyk2 (Tyrosinkinase 2) und JAK1 (Januskinase 1), welche wiederum STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*) und STAT2 phosphorylieren. Die STATs dimerisieren und interagieren mit der DNA-Bindungsdomäne IRF9, um den sogenannten IFN-stimulierten Wachstumsfaktor 3 (ISGF3)-Komplex zu bilden. Nachdem der ISGF3-Komplex in den Nucleus transloziert, binden sie an spezifische IFN-stimulierte Elemente zur Expression einer Vielzahl von Interferon-stimulierten Genen (ISGs, Abbildung 3B).^[13,39] Die exprimierten ISGs fördern einen antiviralen Zustand in den infizierten und benachbarten Zellen, schränken die Virusreplikation ein und induzieren eine Apoptose, um den Organismus vor einer Virusausbreitung am Infektionsort zu schützen.^[5,37]

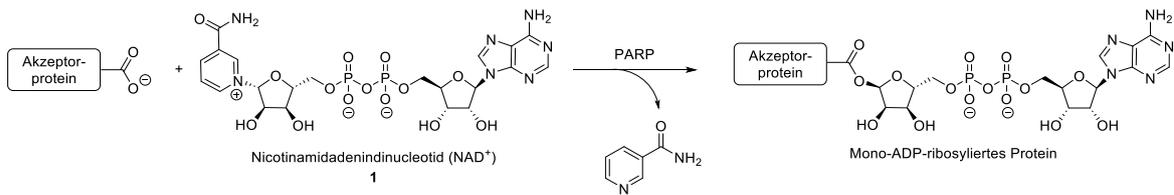
4.2.1 Regulation der IFN-Antwort mittels der ADP-Ribosylierung

Interferone und Interferon-induzierte ISGs sind sehr wichtig für die Erhaltung des antiviralen Zustands der Wirtszellen, sodass ihre Produktion einer komplexen Regulation unterliegt.^[37] Generell werden intrazelluläre Signaltransduktionswege durch posttranslationale Modifikationen (PTMs) moduliert.^[40] Eine wichtige PTM, die im Zusammenhang mit der Interferonantwort steht, ist die Adenosindiphosphat-Ribosylierung (ADP-Ribosylierung).^[41] Sie wurde erstmals im Jahr 1963 von CHAMBON *et al.* entdeckt^[42] und ist eine reversible posttranslationale Modifikation, bei der ADP-Ribose-(ADPR)-Einheiten auf das Zielsubstrat übertragen werden.^[41] Es wird zwischen der mono-ADP-Ribosylierung (MARYlierung) und der poly-ADP-Ribosylierung (PARYlierung) unterschieden. Bei der MARYlierung wird lediglich eine ADPR-Einheit von Nicotinamidadenindinucleotid (NAD⁺, **1**) kovalent an spezifische Aminosäureakzeptorstellen im Zielprotein gebunden. Dementsprechend werden bei einer PARYlierung mehrere ADPR-Einheiten auf Aminosäurereste von Zielproteinen übertragen.^[43] Dabei wird eine α -O-glycosidische Ribose-Ribose-Bindung zwischen der 2'-Position eines ADPR-Monomers mit der 1"-Position eines anderen gebildet (Abbildung 4, rot). Eine Verzweigung zwischen zwei terminalen Ribosemolekülen ist ebenfalls möglich (Abbildung 4, blau).^[44,45] Die Übertragung der PTM ist auf eine Vielzahl

von Aminosäuren möglich, wie z.B. Glutamat,^[46] Aspartat,^[47] Serin,^[48] Lysin,^[49] Arginin^[50] und Cystein,^[51] sodass nicht nur *O*-, sondern auch *S*- und *N*-glycosidische Bindungen auftreten.^[44] Zudem ist eine ADP-Ribosylierung von Nucleobasen möglich.^[43,52]

Die posttranslationale Modifikation wird durch sogenannte ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) ermöglicht. Die größte Familie der ARTs sind die Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen (PARPs).^[53] Sie sind im Zytoplasma als auch im Nucleus der Zellen lokalisiert.^[8,44] Bisher wurden 17 Mitglieder der PARP-Familie im Menschen identifiziert.^[53]

A) Mono-ADP-Ribosylierung (MARylierung)



B) Poly-ADP-ribosyliertes Protein (PARyliert)

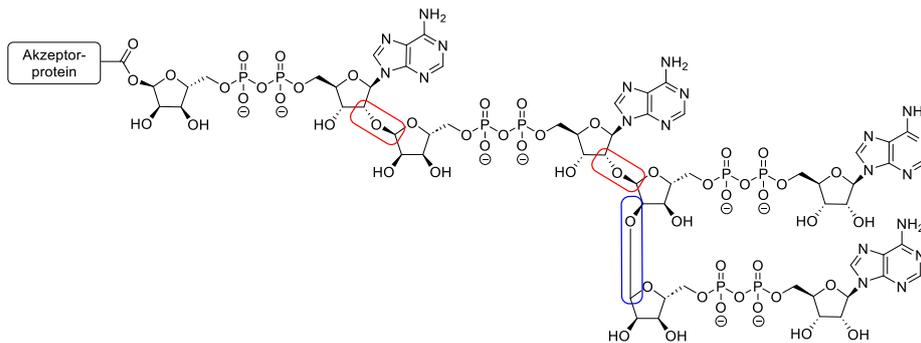


Abbildung 4: **A)** Mono-ADP-Ribosylierung eines Akzeptorproteins mit Nicotinamadendinucleotid **1** als Substrat. Die Reaktion wird durch Poly-(ADP-Ribose)-Polymerasen katalysiert, wobei Nicotinamid freigesetzt wird. **B)** Struktur eines poly-ADP-ribosylierten Proteins. Die α -O-glycosidischen Bindungen sind in rot dargestellt und die Verknüpfung zwischen den terminalen Riboseeinheiten ist in blau dargestellt.^[44,45]

MARylierende und PARylierende PARPs sind an einer Vielzahl von biologischen und pathologischen Prozessen beteiligt.^[8] Dazu gehört die Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden,^[54] die Regulierung der Gentranskription,^[55] die Antwort auf zellulären Stress^[56] sowie die Regulierung unterschiedlicher Signaltransduktionswege^[45]. Unter anderem werden die Signaltransduktionswege im antiviralen Abwehrsystem der Wirtszelle von den PARPs und der ADP-Ribosylierung beeinflusst.^[57] Hinzu kommt, dass einige der PARPs selbst Interferon-stimulierte Gene sind und somit antivirale Eigenschaften aufweisen.^[8,58–60] Die Typ-I-Interferonantwort wird an unterschiedlichen Stellen der Signalkaskade durch die PARPs moduliert, die eine Erhöhung oder eine Verringerung der Interferonproduktion verursachen können. Beispielsweise wird das Adapterprotein MAVS streng reguliert, da

ohne die Aktivierung von MAVS keine Translokation des IRF3/IRF7-Dimers in den Nucleus möglich ist und es somit zu keiner Produktion von Typ-I-IFNs kommt.^[13] Hierbei sind PARP5a und PARP5b beteiligt, die das Adapterprotein mit einer PARylierung versehen.^[37] Die Phosphorylierung von IRF3 wird durch die MARYlierung der Kinase TBK1 über PARP7 gesteuert^[61] und die Phosphorylierung von STAT1 wird durch PARP9 und PARP14 reguliert, die ebenfalls mono-ADP-ribosylieren.^[37] Weitere Beispiele sind die MARYlierung von β -TrCP (*β -transducin repeats-containing protein*), die eine Ligase für den Rezeptor IFNAR darstellt sowie die mono-ADP-Ribosylierung der katalytisch inaktiven PARP13, welche dann mit den Rezeptor RIG-I interagiert (Abbildung 5).^[62,63]

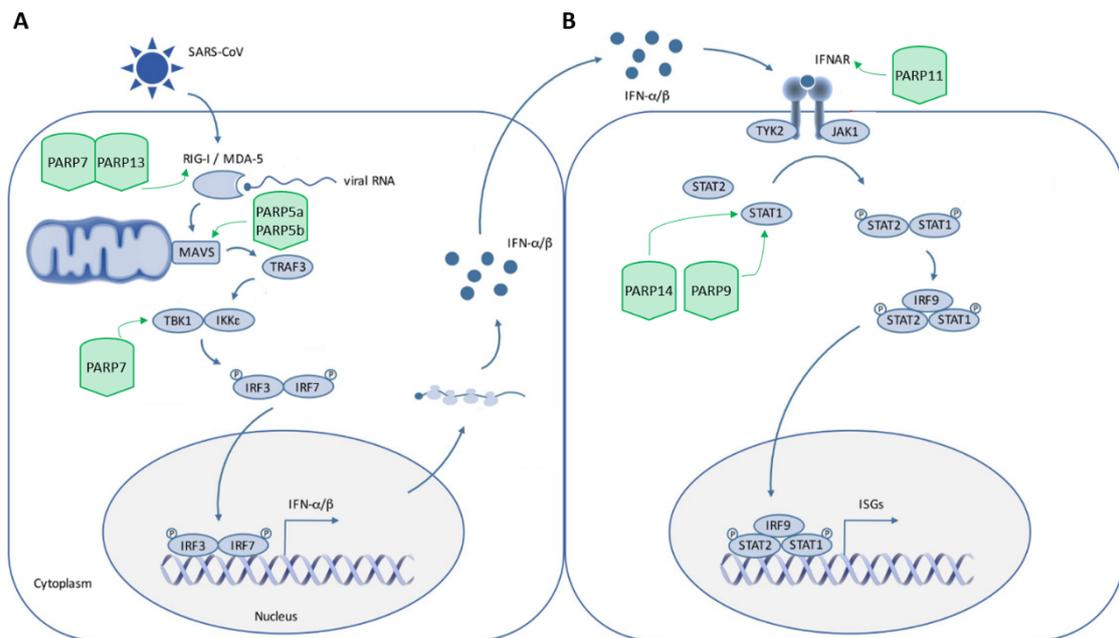


Abbildung 5: Vereinfachte, schematische Darstellung der Interferonantwort und die Interaktion mit den regulativ wirkenden (Poly-ADP-Ribose-Polymerasen, grün). **A)** in infizierten Zellen. **B)** in benachbarten Zellen.^[13,37]

Trotz des umfangreichen Wissens über die ADP-Ribosylierung und ihrer bedeutenden Rolle in der Immunantwort ist über die meisten menschlichen PARPs und die jeweiligen Zielsubstrate weniger bekannt.^[57,64]

Die ADP-Ribosylierung ist wie viele andere posttranslationale Modifikationen reversibel. Bislang wurden drei Protein-Superfamilien identifiziert, die die Modifikation vollständig entfernen können. Hierzu gehören Proteine, die entweder eine Macrodomäne, eine ADP-Ribosylhydrolase-(ARH)-Domäne oder eine NADAR-(*NAD⁺ and ADP-ribose*)-Domäne aufweisen. Die Existenz von Makrodomänen und ADP-Ribosylhydrolasen wurden in allen Lebewesen als auch in einigen Viren identifiziert.^[44]

4.3 Immunpathogenese von SARS-CoV-2

Die durch SARS-CoV-2 hervorgerufene Erkrankung COVID-19 ist in erster Linie eine akute Atemwegserkrankung, die über die respiratorische Aufnahme in Form von Tröpfchen oder Aerosole von infektiösen Personen übertragen wird.^[1] Im Allgemeinen ist bekannt, dass humane Coronaviren in der Bevölkerung zirkulieren und saisonale sowie leichte Infektionen der Atemwege verursachen, die mit Erkältungssymptomen verbunden sind.^[2] Allerdings wurde im Verlauf der COVID-19-Pandemie festgestellt, dass einige mit SARS-CoV-2 infizierte Personen überhaupt keine Krankheitssymptome aufwiesen, während andere lebensbedrohliche Atemwegserkrankungen und Lungenentzündungen entwickelten und nicht überlebten.^[5,21]

Vor allem bei jungen und nicht vorerkrankten Menschen resultierte eine Coronavirusinfektion häufig zu einem milden Krankheitsverlauf von COVID-19. Wichtig hierbei ist, dass es eine frühe und starke Interferonantwort gibt, sodass die Viruslast schnell minimiert wird und es zu einer hinreichenden Aktivierung von T- und B-Zellen kommt (Abbildung 6A).^[65] Die T- und B-Zellen (auch T- und B-Lymphozyten) sind gemeinsam ein entscheidender Bestandteil des adaptiven Immunsystems. Während die T-Zellen aktive Effektoren in der Immunantwort darstellen, werden B-Zellen benötigt, um Antikörper zu produzieren.^[66,67]

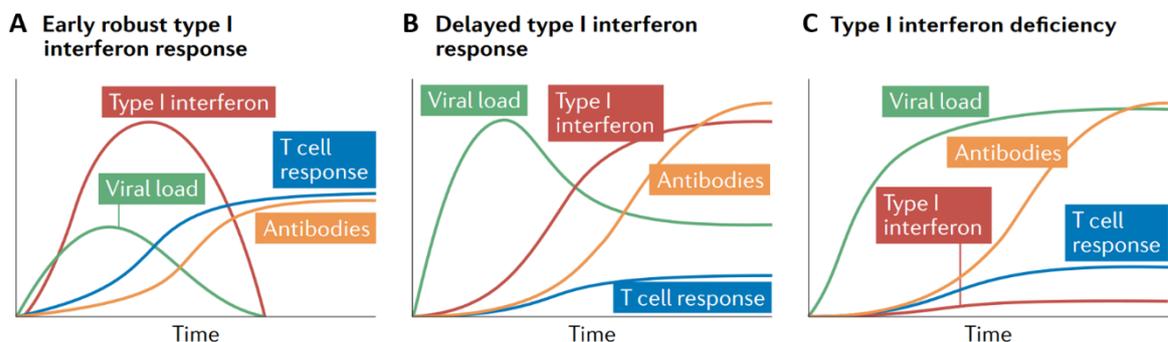


Abbildung 6: Zusammenhang zwischen der IFN-I-Antwort, der Viruslast sowie der T- und B-Zellen. **A)** Frühe IFN-I-Antwort, die zu milden Krankheitsverläufen führt. **B)** Verzögerte IFN-I-Antwort, die eine Ursache für schwere COVID-19-Fälle ist. **C)** Mangel an Typ-I-Interferonen, die zu lebensbedrohlichen COVID-19-Verläufe führen.^[65]

Eine wachsende Zahl an Studien deutet darauf hin, dass die Manifestation von kritischen und akuten COVID-19-Erkrankungen mit einer dysregulierten oder verschärften Immunantwort gegen SARS-CoV-2 zusammenhängt.^[68–71] Eine dysregulierte Immunantwort kann sich beispielsweise in einer verspäteten Typ-I-Interferonantwort äußern. Hierbei kann sich das Virus im frühen Stadium der Infektion ungestört replizieren und im Organismus ausbreiten, sodass es eine signifikante Erhöhung der Viruslast gibt. Wenn es dann zu einer Immunantwort kommt, wird sich diese in einer extremen Interferon- und Antikörper-

produktion zeigen, sodass sich ein hyperinflammatorischer Zustand in den Zellen einstellt. Hierbei besteht die Gefahr, dass trotz einer partiellen Beseitigung des Virus, weiterhin entzündungsfördernde Zytokine produziert werden und die Immunreaktion nicht abklingt (Abbildung 6B). Bei diesem Phänomen spricht man auch von einem Zytokinsturm, der eine T-Zell-Lymphopenie, Gewebeschäden oder auch Organversagen bis hin zum Tod zur Folge haben kann.^[72–74]

Bei Personen, die entweder genetisch oder serologisch einen Mangel an Typ-I-Interferonen aufweisen, wird die Replikation von SARS-CoV-2 nicht gehemmt, sodass auch hier schwere bis lebensbedrohliche COVID-19-Krankheitsverläufe auftreten. Bei solchen Patienten wurde, neben einer sehr niedrigen Interferonproduktion, eine Lymphopenie der T-Zellen beobachtet. Zur Kompensation tritt eine erhöhte Aktivierung von Antikörperreaktionen auf, die aber nicht ausreicht, um die Krankheit zu kontrollieren (Abbildung 6C).^[65]

Da eine effiziente Umgehung und Manipulation der Interferonantwort bedeutend für die ungestörte Replikation des Virus und der Schwere von COVID-19 sind, weist SARS-CoV-2 unterschiedliche Proteine auf, die dies ermöglichen.^[13,14] Darunter gehört unter anderem das Nichtstrukturprotein 3 (nsp3), welches für eine Macrodomäne codiert, die die posttranslationale Modifikation der ADP-Ribosylierung umkehren und somit aktiv in die Regulierung der Typ-I-Interferonantwort eingreifen kann.

4.4 Das Nichtstrukturprotein nsp3 von SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 codiert für 16 Nichtstrukturproteine (nsps), wobei nsp3 mit einem Molekulargewicht von 200 kDa das größte Nichtstrukturprotein darstellt.^[75] Nsp3 wird aus den Polyproteinen pp1a und pp1ab durch die papainähnliche Protease PL^{pro}, die selbst im nsp3 codiert wird, freigesetzt.^[76,77] Das membrangebundene Multidomänenprotein ist in Abbildung 7 dargestellt.

Neun der abgebildeten Domänen sind in jedem nsp3 aller Coronaviren enthalten. Dazu gehören die beiden ubiquitinähnlichen Domänen (Ubl1 und Ubl2), die papainähnliche Domäne (PL2^{pro}), die Macrodomäne Mac1 und eine hypervariable Region (HVR). Ferner sind die beiden Transmembrandomänen (TM1 und TM2), die nsp3-Ectodomäne (3Ecto) sowie eine konservierte Y-Domäne mit unbekannter Funktion ebenfalls in allen bekannten CoVs vorzufinden. Zusätzlich zu diesen Domänen besitzt nsp3 von SARS-CoV-2 zwei weitere Macrodomänen (Mac2 und Mac3), eine Domäne vor Ubl2 und PL2^{pro} (DPUP, *domain preceding Ubl2 and PL2^{pro}*), eine nucleinsäurebindende Domäne (NAB, *nucleic acid binding*) und eine β SM-Domäne (β -Coronavirus-spezifischer Marker).^[76]

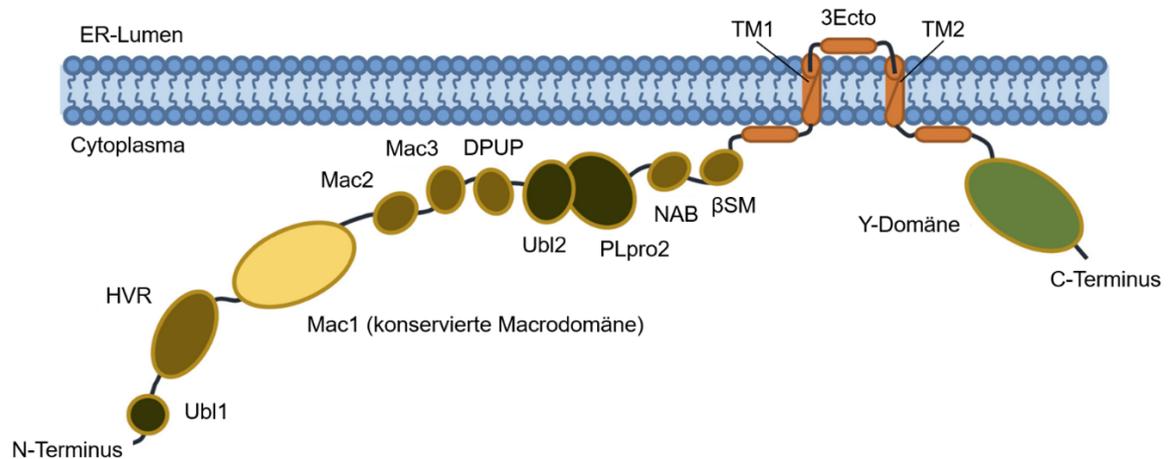


Abbildung 7: Vereinfachte, schematische Darstellung der Domänenorganisation des nsp3-Moleküls von SARS-CoV-2.^[78]

Das nsp3 ist neben nsp4 und nsp6 für die Bildung der Replikationsorganelle, explizit der Doppelmembranvesikel (DMV), erforderlich.^[75,76] Außerdem zeigen immer mehr Ergebnisse, dass die in nsp3 codierte Macrodomäne Mac1 essentiell für die Pathogenese des Coronavirus ist.^[57,78,79]

4.4.1 Die Macrodomäne Mac1

Die Macrodomäne Mac1 ist in allen Coronaviren konserviert und Homologe der Mac1 wurden ebenfalls in Alphaviren (z.B. Chikungunya-Virus),^[18,80] im Hepatitis-E-Virus^[19] und im Rubella-Virus (Röteln-Virus)^[20] identifiziert. Dies deutet darauf hin, dass die Macrodomäne eine wichtige Rolle bei der Replikation einer Gruppe von Positivstrang-RNA-Viren spielen könnte^[14] und sie sehr ähnlich zu den Macrodomänen Mac1 von Coronaviren sind. Sie sind alle Mitglieder der MacroD-ähnlichen Familie, die ebenfalls die humanen Homologen MacroD1 und MacroD2 umfasst.^[10] Mit einer Sequenzidentität von 71 % und einer Sequenzähnlichkeit von 82 % stellt Mac1 von SARS-CoV den nächsten strukturellen Verwandten zu SARS-CoV-2 dar.^[12]

Die Macrodomäne Mac1 wurde vor rund 30 Jahren identifiziert und erstmals als X-Domäne bezeichnet.^[81] Ursprünglich wurde angenommen, dass sie hauptsächlich als ADP-Ribose-1“-Phosphatase fungiert und die Phosphatgruppe aus dem ADP-Ribose-1“-Phosphat entfernt. Die Macrodomäne der humanen Coronaviren HCoV-229E und SARS-CoV erwies sich bereits als hochspezifisch für das ADP-Ribose-1“-Phosphat und in beiden Fällen konnte eine Phosphatase-Aktivität festgestellt werden.^[82,83] Jedoch hat sich herausgestellt, dass diese Aktivität nur moderat ablief und für die Synthese der viralen RNA entbehrlich ist. Ebenfalls konnte bisher kein Zusammenhang zwischen dem ADP-Ribose-1“-Phosphat und

dem angeborenen Immunsystem hergestellt werden. Somit konnte für diese Aktivität noch keinen direkten Einfluss auf die Fähigkeit von SARS-CoV-2 sich der Interferonantwort zu entziehen, festgestellt werden.^[9,80,84]

Stattdessen haben isotherme Titrationskalorimetrie-Experimente gezeigt, dass viele Proteine, die eine Macrodomäne besitzen, ADPR binden können.^[9,85] Außerdem konnte beobachtet werden, dass die humanen als auch viralen Macrodomänen die Fähigkeit besitzen, die Bindung zwischen den Aminosäureseitenketten und der ADPR-Einheit zu hydrolysieren. Hierbei konnte ebenfalls bewiesen werden, dass Mac1 von verschiedenen Virusarten die MARYlierung rückgängig machen kann, während sie nur eine minimale Hydrolyseaktivität für poly-ADP-ribosylierte Proteine zeigt.^[11,86]

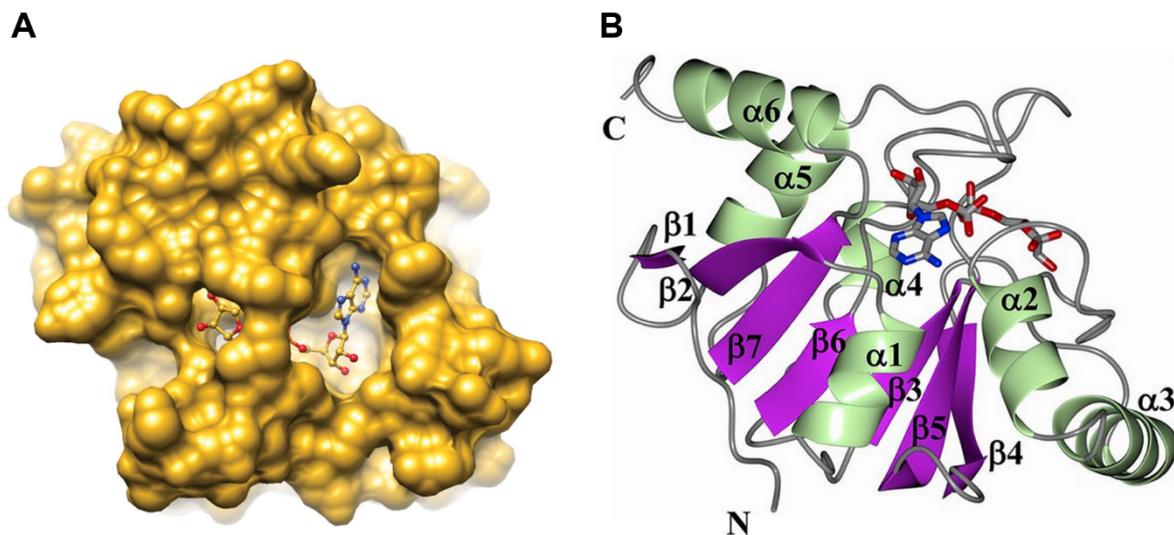


Abbildung 8: **A)** Oberflächendarstellung des SARS-CoV-2-Mac1-Proteins mit gebundenem ADPR (PDB 6W02). Die Molekülstruktur wurde als Kugel- und Stabdarstellung abgebildet.^[82] **B)** Kristallstruktur von SARS-CoV-2-Mac1 komplexiert mit dem Substrat ADPR (PDB 6W0J). Die Sekundärstrukturelemente wurden in unterschiedlichen Farben dargestellt, mit den β -Faltblättern in violett und den α -Helices in grün. Die Molekülstruktur wurde als Stäbchenmodell dargestellt.^[78]

In Abbildung 8 ist die Oberfläche des SARS-CoV-2-Mac1-Proteins mit gebundener ADPR (Abbildung 8A) sowie die Tertiärstruktur mit den visualisierten Sekundärstrukturelementen des Mac1-Proteins von SARS-CoV-2 dargestellt (Abbildung 8B). Strukturell weist SARS-CoV-2-Mac1 eine konservierte dreischichtige $\alpha/\beta/\alpha$ -Faltung auf, die typisch für die MacroD-Familie von Macrodomänen ist und anderen CoV-Mac1-Proteinen sehr ähnelt.^[82] Dabei besteht die zentrale β -Schicht aus einem siebensträngigen gemischten Blatt, gemäß der β -Faltblattfolge $\beta 1\uparrow$, $\beta 2\downarrow$, $\beta 7\downarrow$, $\beta 6\downarrow$, $\beta 3\downarrow$, $\beta 5\downarrow$, $\beta 4\uparrow$ und wird von zwei Schichten α -Helices flankiert. Auf einer Seite befinden sich die $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ - Helices und auf der anderen Seite die $\alpha 4$ -, $\alpha 5$ - und $\alpha 6$ -Helices.^[78,82]

Die Bindung von ADPR in der Bindetasche von Mac1 beruht hauptsächlich auf einer Vielzahl von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Substrat und Aminosäureseitenketten des Enzyms.^[87] Das entsprechende Bindungsmodell ist in Abbildung 9 dargestellt. Die Adenineinheit liegt in einer hauptsächlich hydrophoben Umgebung, die von Isoleucin-23, Valin-49, Prolin-125, Valin-155 und Phenylalanin-156 erzeugt wird. Außerdem liegen zwei direkte Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Stickstoffatom N6 der Aminofunktion und der Carboxylatgruppe der Asparaginsäure-22 (D22) sowie zwischen dem N1-Atom von Adenin und dem Hauptkettenamid von Isoleucin-23 (I23) vor. Weitere Wasserstoffbrücken werden über Wasser-vermittelte Kontakte zwischen Alanin-154 (A154) und dem N3 von Adenin gebildet.^[82]

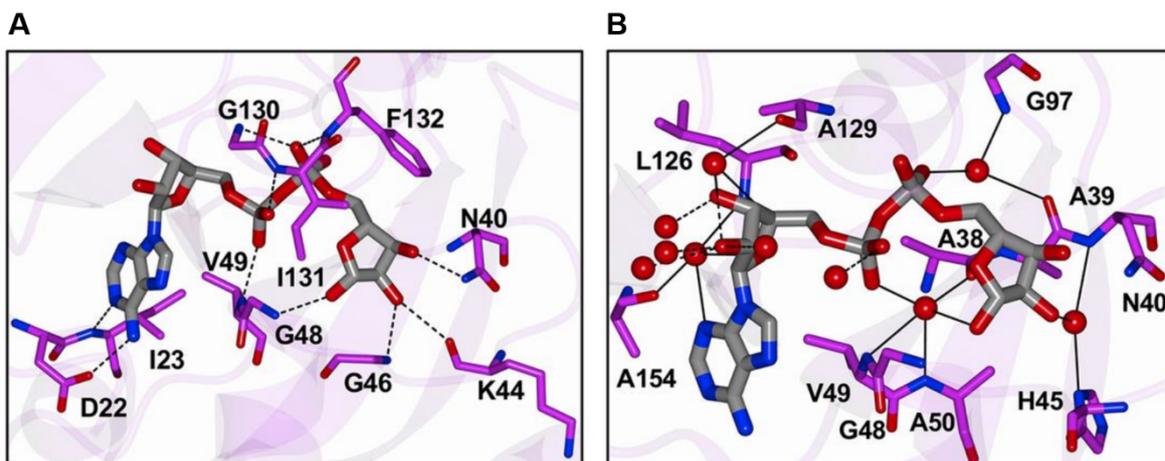


Abbildung 9: Bindungsmodell der Bindung des Substrats ADPR in der Bindetasche von SARS-CoV-2-Mac1. **A)** Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Enzym und dem Substrat dargestellt mit gestrichelten Linien. **B)** Interaktionen mit Wassermolekülen. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Substrat und Wasser sind mit gestrichelten Linien dargestellt. Wasser-vermittelte Kontakte zwischen Substrat und Enzym sind mit durchgezogenen Linien dargestellt.^[78]

Die proximale Ribose am Adenosin interagiert ausschließlich über Wasser-vermittelte Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminosäuren des Enzyms. Die Aminosäuresequenz der Bindetasche, die mit der Adenosineinheit wechselwirkt, ist nur begrenzt konserviert. Bei den anderen viralen Vertretern der CoVs werden die hydrophoben Reste durch andere hydrophobe Aminosäuren ersetzt.^[82] Die Diphosphatgruppe bildet eine Vielzahl an direkten Wasserstoffbrückenbindungen zu den Hauptkettenamiden von Valin-49 (V49), Serin-128, Glycin-130 (G130), Isoleucin-131 und Phenylalanin-132 (F132) aus. Die Aminosäuren G130, I131 und F132 gehen wichtige Interaktionen mit dem Substrat ADPR ein und stellen eine hochkonservierte Region in der Bindetasche dar.^[78] Zudem bestehen neben den direkten Wasserstoffbrückenbindungen zahlreiche Wasser-vermittelte Kontakte. Die distale Ribose wird durch hydrophobe Wechselwirkungen mit Phenylalanin-132 und Isoleucin-131

sowie durch eine Reihe von Wasserstoffbrückenbindungen mit Glycin-46, Glycin-48 und Asparagin-40 (N40) in der Bindetasche stabilisiert. Diese Aminosäuren sind ebenfalls hochkonserviert. Außerdem gibt es zusätzliche Interaktionen mit den Hauptkettenamiden von Asparagin-40, Lysin-44 (K44) und Alanin-50, die durch Wassermoleküle vermittelt werden.^[78,82,87]

Generell werden die meisten Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und dem Substrat über die Hauptkettenatome der Aminosäuren gebildet und die Seitenketten sind nur an wenigen Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt.^[82]

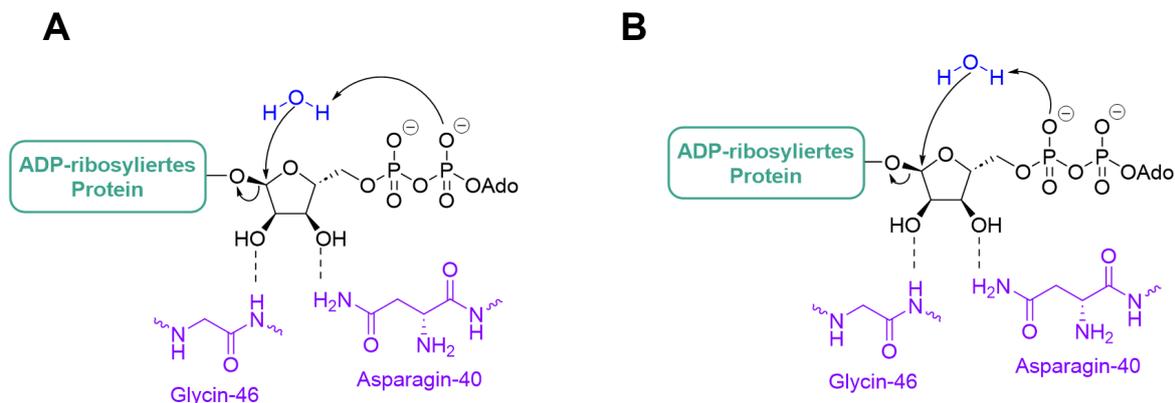


Abbildung 10: Vorgeschlagerener Hydrolysemechanismus über eine Wasser-assistierte S_N2 -Reaktion. **A)** Die Reaktion wird durch die Deprotonierung ausgehend von der α -Phosphatgruppe gestartet.^[88] **B)** Die Reaktion wird durch die Deprotonierung ausgehend von der β -Phosphatgruppe gestartet.^[89] Das Substratprotein ist in grün, ADPR in schwarz, das Wassermolekül in blau und die Aminosäuren der Macrodomäne in lila dargestellt.

Im Jahr 2013 wurde erstmals von JANKEVICIUS *et al.* ein Vorschlag für den Hydrolysemechanismus von ADPR durch humane Macrodomänen vorgeschlagen. Hierbei soll ein in der hMacroD2-Bindetasche vorhandenes Wassermolekül durch die α -Phosphatgruppe von ADPR deprotoniert werden. Anschließend soll dieses dann nucleophil über einen S_N2 -Mechanismus am C-1'-Atom angreifen und somit das ADPR vom Substratprotein trennen (Abbildung 10A).^[88] Im Jahr 2022 postulierten CORREY *et al.* allerdings in ihren umfangreichen Röntgenbeugungs- und Neutronenstreuungsexperimenten zum Effekt von Wasser im SARS-CoV-2-Mac1, dass ein Substrat-assistierter Mechanismus durch die Deprotonierung ausgehend von der β -Phosphatgruppe plausibler sei (Abbildung 10B).^[89]

4.4.1.1 Mac1-Inhibitoren

Obwohl die physiologischen Substrate und die genauen Mechanismen zwischen den antiviralen PARPs und den coronaviralen Macrodomänen noch unklar sind, wurde die Macrodomäne selbst intensiv untersucht, um sie mit der Virulenz von Coronaviren in Verbindung zu bringen.^[16,17] Mehrere Experimente verdeutlichten die Rolle von Mac1 in der Replikation und Pathogenese von Coronaviren.^[15] FEHR *et al.* führten Experimente mit BALB/c-Mäusen durch, die mit unterschiedlichen SARS-CoV-Mutanten infiziert wurden. Eine Mutante verfügte nicht mehr über die Fähigkeit mono-ADPR zu hydrolysieren (N1040A- und G1130V-Mutation), während eine andere noch eine partielle DeMARylierungs-Aktivität aufwies (D1022A- und H1045A-Mutation). Bei diesem Experiment überlebten alle Mäuse eine Infektion mit der Mutante ohne DeMARylierungs-Aktivität und nur 80 % der Mäuse überlebten, bei denen das Virus noch eine partielle Aktivität besaß.^[7] Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass bei einer Infektion mit einer N41A-SARS-CoV-Mutante es zwar keinen Einfluss auf die Replikation der Coronaviren gab, aber die Viruslast reduziert und die Interferonproduktion verstärkt wird, was sowohl zu einer Schwächung des murinen Hepatitis-Virus (MHV) als auch des SARS-Coronavirus in Infektionsmodellen führte.^[83,90]

Diese Ergebnisse implizieren, dass eine Inhibition der viralen Mac1 eine vielversprechende und neue therapeutische Strategie darstellen könnte. Aus diesem Grund wurde in den letzten Jahren eine Reihe von unterschiedlichen Screening-Tests entwickelt, um potentielle Mac1-Inhibitoren zu entdecken. Es wurden hauptsächlich *Crystallography*, *Virtual* und *High-Throughput*-Screenings durchgeführt und die jeweiligen Hit-Strukturen auf ihre Bindungs- und inhibitorische Affinität gegen SARS-CoV-2-Mac1 überprüft.^[91]

Hierbei wurde zum Beispiel beim Screening von einer Datenbank mit Wirkstoffen, die von der FDA (*Food and Drug Administration*) zugelassen wurden, zwei Strukturen als potentielle Inhibitoren vorgeschlagen. DASOVICH *et al.* identifizierten in ihren Tests, dass der Kinaseinhibitor Dasatinib **2** die virale Macrodomäne Mac1 inhibiert, aber nicht die humane Macrodomäne MacroD2, was diesen Wirkstoff zu einem selektiven Inhibitor macht.^[92] Allerdings ist Dasatinib **2** bereits bei einer mikromolaren Konzentration zytotoxisch.^[93]

Das von der FDA zugelassene Antibiotikum Aztreonam **3** hat sich bei Screening Assays von SCHULLER *et al.* ebenfalls als eine potentielle Hit-Struktur mit einer inhibitorischen Aktivität im mikromolaren Bereich herausgestellt.^[16]

Zudem haben erstmals NI *et al.* in ihren Screenings eine Reihe an Nucleosidanaloga berücksichtigt und diese auf ihre Bindung und inhibitorische Aktivität gegen SARS-CoV-2-Mac1 getestet. Hierbei hat sich herausgestellt, dass das Remdesivir-Nucleosid (GS-441524) **4** im aktiven Zentrum der Mac1 bindet.^[94] Im Jahr 2024 publizierten RIJKEMA

et al. die ersten ADPR-Analoga, die das Nucleosid GS-441524 anstelle von Adenosin vorwiesen. Dabei weist eines der Analoga eine Methoxy-Funktion **5** und die andere eine Azid-Funktion **6** an der 1''-Position der terminalen Ribose auf. Die ermittelte inhibitorische Aktivität beider Analoga liegt im nanomolaren Bereich (Verbindung **5**: 63 ± 5.0 nM, Verbindung **6**: 2.4 ± 1.5 nM), was mit der zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Nitrilgruppe des Analogons und dem Aspartat-157 des Enzyms begründet wurde. Ebenfalls wichtig bei beiden Verbindungen ist, dass sie in der α -Konfiguration vorliegen, da beobachtet werden konnte, dass der Methoxysubstituent in β -Konfiguration sterisch unvorteilhaft mit dem aktiven Zentrum interferiert. Dieser nachteilige Effekt konnte für das α -Anomer nicht beobachtet werden.^[95]

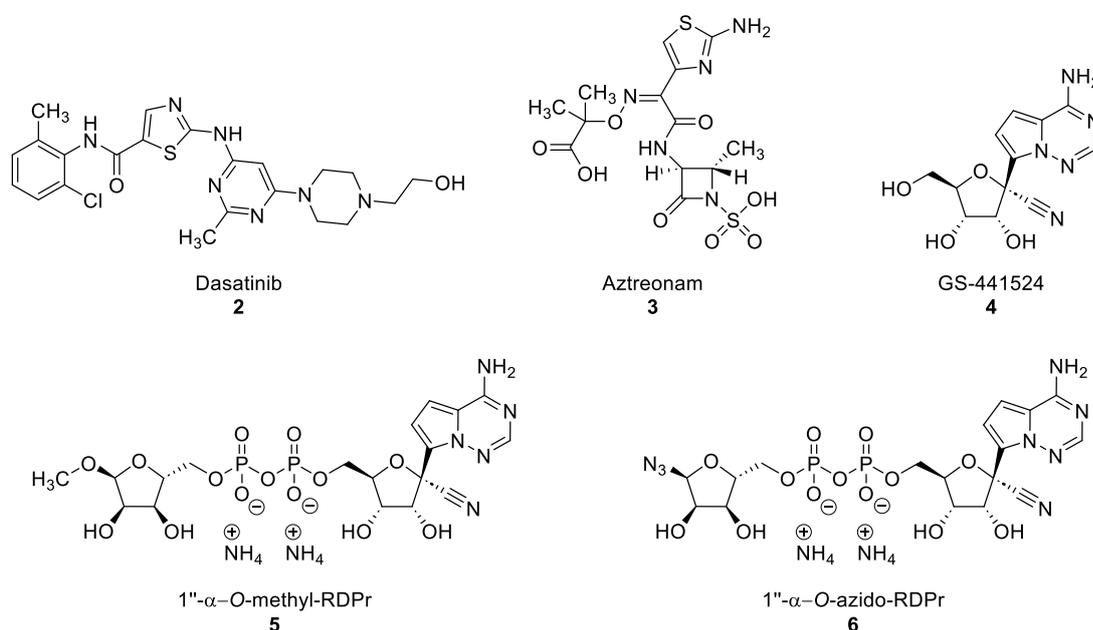


Abbildung 11: Strukturen der potentiellen Mac1-Inhibitoren, die bei unterschiedlichen Screening-Experimenten als Hit-Struktur vorgeschlagen wurden.

Zusätzlich gab es noch zahlreiche Screenings, bei denen unterschiedliche kleine Molekülstrukturen als Hit-Struktur identifiziert wurden.^[15,96–98]

Allerdings ist der Einsatz der identifizierten und potentiellen Mac1-Inhibitoren noch nicht ausgereift, da es teilweise Probleme mit der Stabilität, der Permeabilität oder Löslichkeit gab.^[15] Aus diesem Grund ist die Entwicklung von weiteren Mac1-Inhibitoren noch immer notwendig. Diese können dann nicht nur als antivirale Therapeutika mit inhibitorischer Aktivität verwendet werden, sondern auch in Enzym-Assays, um die Mac1-Funktion während der Infektion besser zu verstehen.^[91]

4.4.1.2 Vorarbeiten zur Struktur-Wirkungsbeziehung (SAR) von SARS-CoV-2-Mac1

Zur Entwicklung von potenten und selektiven Inhibitoren gegen die virale Macrodomäne wurden in Vorarbeiten von SANDMANN im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 1328 (SFB1328) eine Reihe an unterschiedlichen ADPR-Analoga hinsichtlich ihrer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) und der Bindungsaffinitäten (K_D) miteinander verglichen.^[99] Die Analoga wurden von POTTER *et al.* synthetisiert und ursprünglich für die Erforschung des Ionenkanals TRPM2 (*transient receptor potential melastatin 2*) eingesetzt.^[100,101]

Die synthetisierten ADPR-Derivate wiesen Modifikationen an der Nucleobase, dem Pyrophosphat oder der terminalen Ribose auf. Für das native Substrat ADPR wurde ein IC_{50} -Wert von 24 μ M bestimmt. ADPR weist im Vergleich zu den entsprechenden Derivaten mit Modifikationen an der Nucleobase eine höhere inhibitorische Aktivität auf (Abbildung 12).

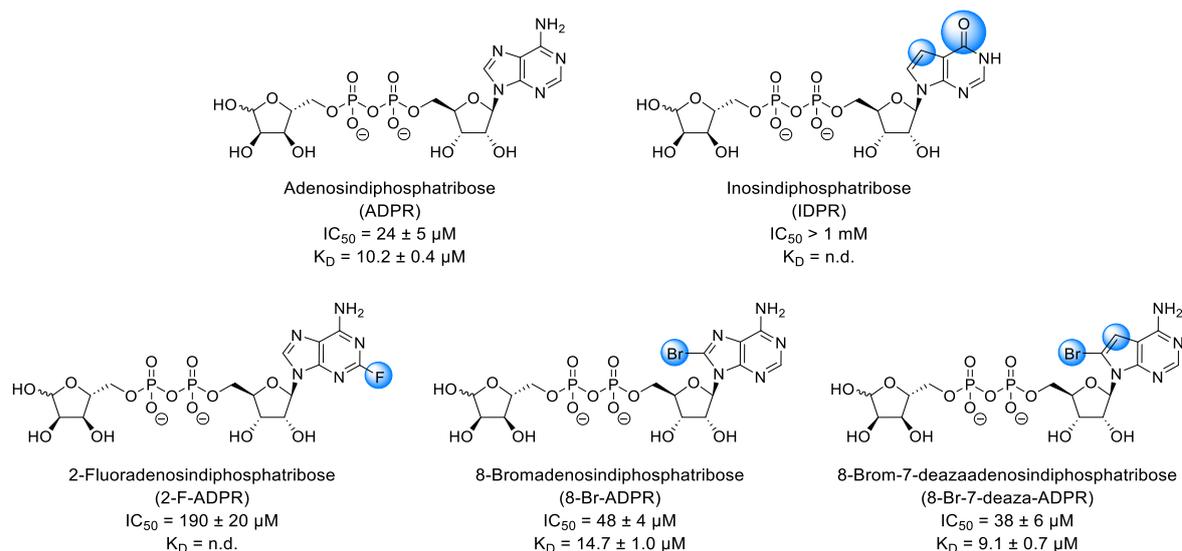


Abbildung 12: Strukturen von ADPR und unterschiedlicher ADPR-Analoga und ihre entsprechenden IC_{50} - und K_D -Werte getestet an SARS-CoV-2-Mac1. Die Modifikationen wurden an der Nucleobase eingeführt und sind mit einem blauen Kreis hervorgehoben. n.d. = *not determined* (nicht bestimmt).

Dies lässt darauf schließen, dass es eine geringe Toleranz für Änderungen am Adeninteil gibt. Beispielsweise konnte anhand von Inosindiphosphatbose (IDPR, $IC_{50} > 1$ mM, $K_D =$ n.d.) gezeigt werden, dass durch das Fehlen einer Wasserstoffbrücken-Donoreigenschaft an der 6-Position von Adenin eine entscheidende Ligand-Enzym-Wechselwirkung an dieser Position festgestellt wurde. Die Substitution eines Wasserstoffes mit Fluor an der 2-Position hat ebenfalls einen nachteiligen Effekt auf den IC_{50} -Wert, der für die 2-Fluoradenosindiphosphatbose (2-F-ADPR) 190 μ M beträgt. Die IC_{50} - und K_D -Werte für 8-Bromadenosindiphosphatbose (8-Br-ADPR, $IC_{50} = 48$ μ M, $K_D = 14.7$ μ M) und 8-Brom-7-deazaadenosin-

diphosphatbose (8-Br-7-deaza-ADPR, $IC_{50} = 38 \mu M$, $K_D = 9.1 \mu M$) sind vergleichbar, aber insgesamt immer noch nicht so gut wie die Werte für ADPR selbst. Dies führte zu der Folgerung, dass raumgreifende Substituenten eher nachteilig für die inhibitorische Aktivität sind. Allerdings konnte gezeigt werden, dass bei der 8-Br-7-deaza-ADPR bessere Werte für die inhibitorische Aktivität und die Bindungsaffinität ermittelt werden konnten als für 8-Br-ADPR, was impliziert, dass das fehlende Stickstoffatom an der 7-Position vorteilhaft für die Bindung des Derivates ist.

Die ADPR-Analoga mit modifizierter Pyrophosphateinheit sind keine Inhibitoren für Mac1 (Abbildung 13), was darauf schließen lässt, dass es viele wichtige konservierte Interaktionen zwischen dem Pyrophosphat und dem aktiven Zentrum und somit nur wenig Spielraum für eine Einführung an Modifikationen an dieser Position gibt.

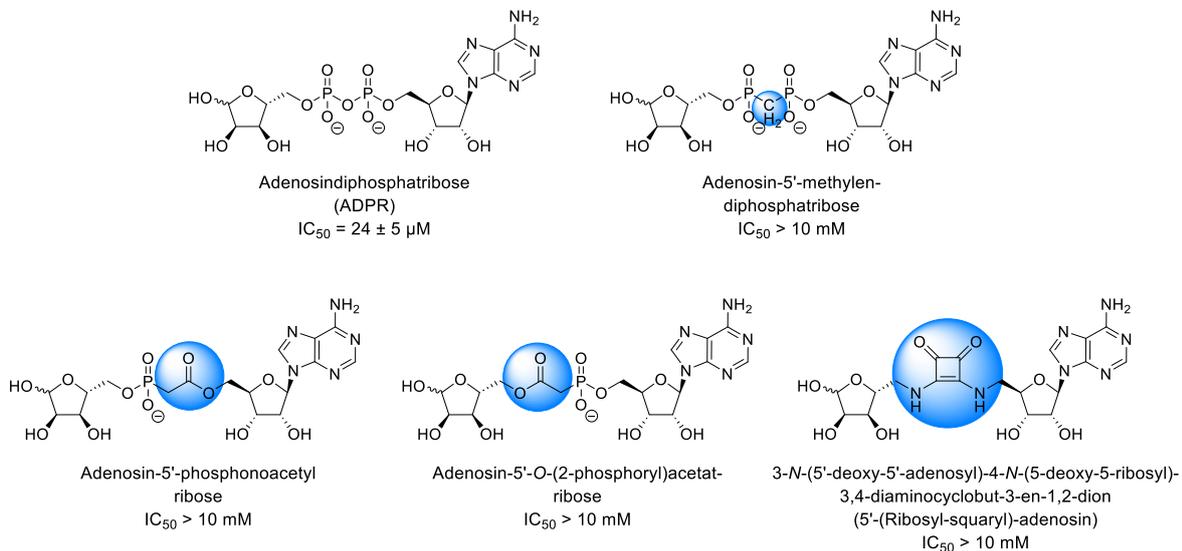


Abbildung 13: Strukturen von ADPR und unterschiedlicher ADPR-Analoga und ihre entsprechenden IC_{50} -Werte getestet an SARS-CoV-2-Mac1. Die Modifikationen wurden am Diphosphatteil eingeführt und sind mit einem blauen Kreis hervorgehoben.

Bei der Modifikation der terminalen Ribose konnte die Stereoselektivität von Mac1 hinsichtlich der Konfiguration der Anomere bestätigt werden, da die β -1'-O-Methyl-Adenosindiphosphatbose mit einem IC_{50} von $> 1 mM$ kein Mac1-Inhibitor darstellt, aber das entsprechende α -Anomer die Enzymaktivität inhibieren konnte. Allerdings ist der IC_{50} -Wert von α -1'-O-Methyl-Adenosindiphosphatbose ($IC_{50} = 79 \mu M$) dreifach höher als der IC_{50} -Wert von ADPR (Abbildung 14). Bei einem Austausch der terminalen Ribose mit beispielsweise Glucose konnte ebenfalls kein positiver Effekt erzielt werden, denn mit einem IC_{50} von $> 1 mM$ ist ADP-Glucose kein Inhibitor. Währenddessen führte eine Verkleinerung des Riboseteils bis hin zum Methylrest zu einer Senkung des IC_{50} -Wertes auf $13 \mu M$, der somit auch geringer als der IC_{50} -Wert von ADPR ist. Dies deutet darauf hin, dass

der Einsatz von sterisch anspruchsvollen Gruppen im Bereich der terminalen Ribose nicht favorisiert ist für die Bindung und Inhibition.

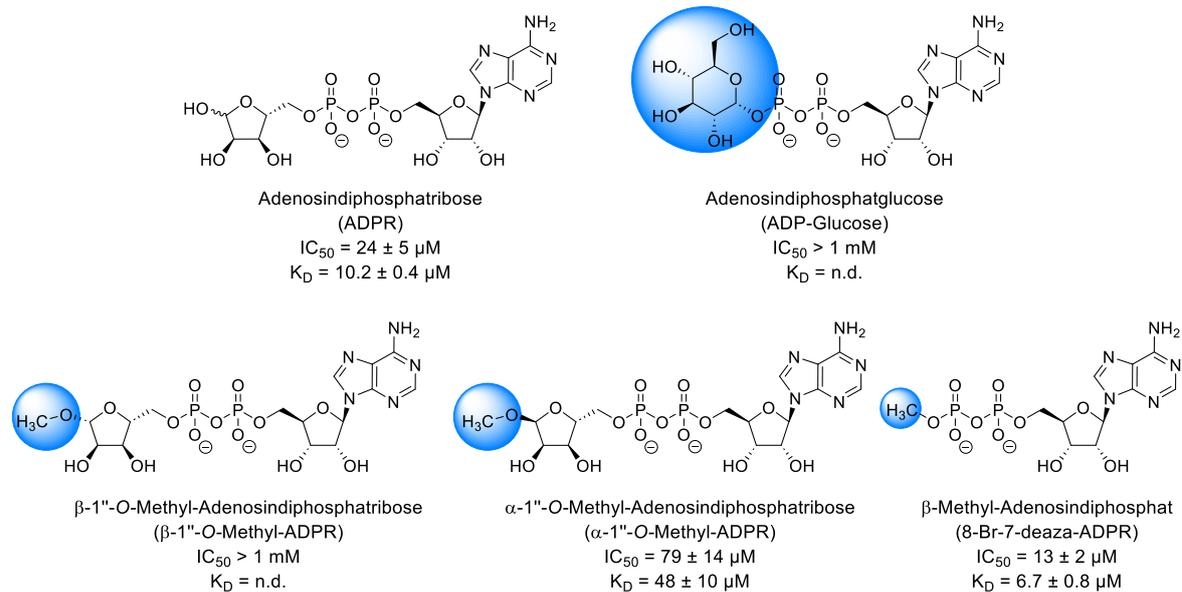


Abbildung 14: Strukturen von ADPR und unterschiedlicher ADPR-Analoga und ihre entsprechenden IC_{50} - und K_D -Werte getestet an SARS-CoV-2-Mac1. Die Modifikationen wurden an der terminalen Ribose eingeführt und sind mit einem blauen Kreis hervorgehoben. n.d. = *not determined* (nicht bestimmt).

4.5 Bisherige Therapie- und Präventionsmaßnahmen gegen COVID-19

Am 11.03.2020 wurde vom Generalsekretär der WHO (*World Health Organization*) der Ausbruch der SARS-CoV-2-Infektionen zu einer Pandemie erklärt. Infolge der rapiden Ausbreitung und der Schwere der Krankheit mussten Forscher und Pharmaunternehmen rasch Impfstoffe mit bereits vorhandenen oder neuen Technologien sowie wirksame antivirale Wirkstoffe entwickeln.^[3]

Zurzeit sind vier Impfstoffe in der Europäischen Union zugelassen. Dazu gehören Bimervax[®] (Zulassung: 30.03.2023), Comirnaty[®] (Zulassung: 21.12.2020), Nuvaxovid[®] (Zulassung: 20.12.2021) und Spikevax[®] (Zulassung: 06.01.2021). Bimervax[®] und Nuvaxovid[®] sind beides proteinbasierte Impfstoffe, die auf dem Spike-Protein von SARS-CoV-2 basieren.^[1,102] Comirnaty[®] und Spikevax[®] hingegen sind mRNA-basierte Impfstoffe, die beide das virale Spike-Protein von SARS-CoV-2 codieren.^[102,103] Die entwickelten Impfstoffe haben einen großen Beitrag zur Prävention von SARS-CoV-2-Infektionen und deren schweren Krankheitsverläufe geleistet.^[104]

Seit Ausbruch der Pandemie wurden neben den Impfstoffen auch medikamentöse Therapieempfehlungen von der Fachgruppe Intensivmedizin, Infektiologie und Notfall-

medizin (Fachgruppe COVRIN) zusammengestellt und vom Robert-Koch-Institut für alle Ärzte und Ärztinnen bereitgestellt. Hierbei wird vor allem eine medikamentöse Behandlung bei Personen empfohlen, die ein erhöhtes Risiko für einen schweren COVID-19-Verlauf haben, wie z.B. Personen mit Immunsuppression, mit Vorerkrankungen oder im fortgeschrittenen Alter.^[1]

Die empfohlenen Therapeutika lauten Paxlovid[®], Veklury[®], Dexamethason und Tocilizumab. Bei Paxlovid[®] handelt es sich um die beiden Stoffe Nirmatrelvir **7** und Ritonavir **8**, die als Proteaseinhibitor fungieren und hierdurch die Replikation von SARS-CoV-2 stören. Über die Langzeitnebenwirkungen von Paxlovid[®] ist noch nicht viel bekannt, aber häufige Nebenwirkungen, die zurzeit auftauchen, sind Kopfschmerzen, Erbrechen, Durchfall, Geschmacksverlust und in seltenen Fällen auch Muskelschmerzen und erhöhter Blutdruck.^[105]

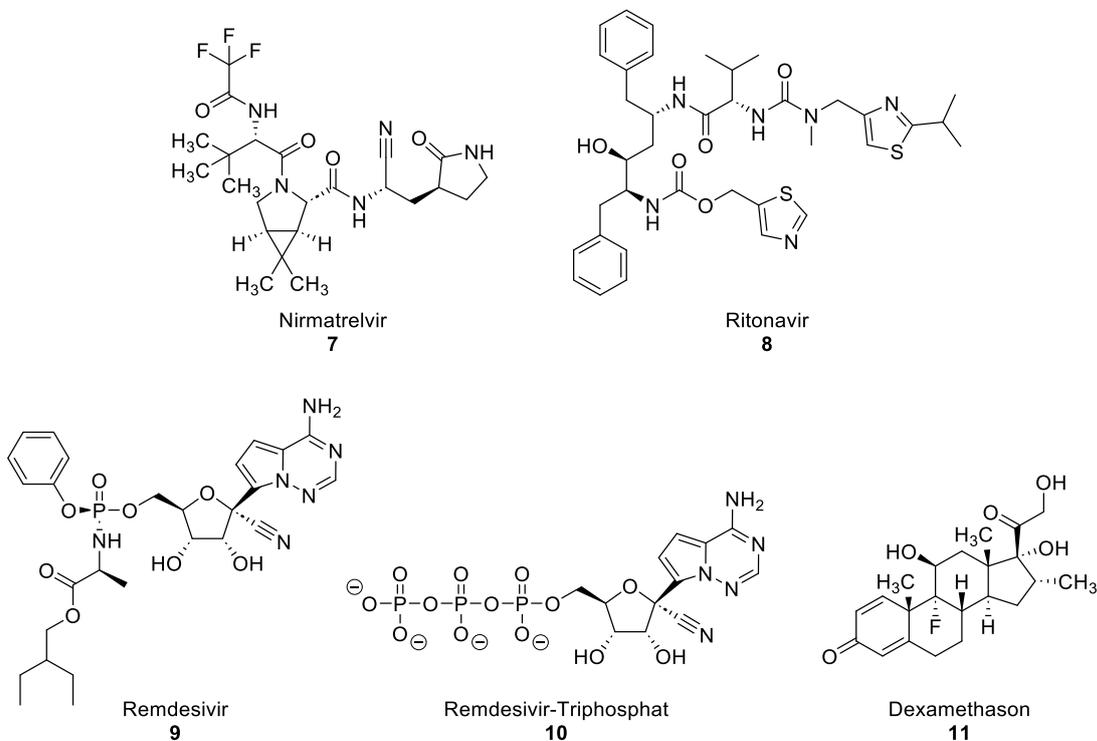


Abbildung 15: Strukturen der zugelassenen Wirkstoffe für die Behandlung von COVID-19.

Veklury[®] wird auch als Remdesivir **9** bezeichnet und ist ein Phosphoramidat-Prodrug eines 1'-Nitril-substituierten Adenosin-Analogons, das in der Zelle zu seiner aktiven Remdesivir-Triphosphat-Form **10** konvertiert wird. Das Triphosphat fungiert als Substrat für die RNA-abhängige RNA-Polymerase und konkurriert mit Adenosintriphosphat (ATP) um den Einbau in die virale RNA. Dementsprechend handelt es sich bei Remdesivir um einen Polymeraseinhibitor.^[106] Ursprünglich wurde Remdesivir **9** zur Behandlung von Ebola entwickelt, jedoch lieferte das Virostatikum im Einsatz gegen Ebolafieber in einer randomisierten Studie in

Kongo nur unzureichende Ergebnisse.^[107] Dennoch erhielt es am 03.07.2020, unter dem Handelsnamen Veklury, eine bedingte Zulassung zur Behandlung von COVID-19-Patienten durch die Europäische Arzneimittel Agentur (EMA, *European Medicines Agency*).^[108]

Zu den immunmodulatorischen Therapieansätzen gehört die Behandlung mit Dexamethason **11**. Es ist ein Glucocorticoid und besitzt entzündungshemmende Eigenschaften. Es wird von der WHO und der EMA bei der Behandlung von Patienten ab 12 Jahren, die eine zusätzliche Sauerstoffzufuhr oder künstliche Beatmung erfordert empfohlen.^[109,110]

Tocilizumab ist ein monoklonaler Antikörper und stellt einen Antagonisten zum Interleukin-6 (IL-6)-Rezeptor dar. Es wurde zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis zugelassen und gehört seit kurzem zu den therapeutischen Maßnahmen für das Zytokinsturm-Syndrom. Die Mehrzahl der mit COVID-19 hospitalisierten Patienten mit Ateminsuffizienz weisen Merkmale eines Zytokinsturmes, also eines hyperinflammatorischen Entzündungszustandes, auf und bei diesen Patienten stellt Tocilizumab eine vielversprechende Therapieoption dar.^[111]

4.6 Die Verwendung von Prodrugs

Prodrugs sind Substanzen, die selbst biologisch inaktiv sind, aber in der Zelle über enzymatische oder chemische Mechanismen in ihre aktive Form überführt werden können.^[112] Durch solche Vorläuferverbindungen können auftretende Probleme wie eine schlechte Wasserlöslichkeit, chemische Instabilität, unzureichende Aufnahme in die Zelle, *first-pass*-Effekte sowie Toxizität umgangen werden.^[112-114]

Außerdem müssen Prodrugs eine ausreichende Stabilität außerhalb der Zelle aufweisen, eine gute Membranpermeabilität besitzen, um die Zellmembran oder die Blut-Hirnschranke passieren zu können sowie eine schnelle Freisetzung des Wirkstoffs zu gewährleisten.^[112,114]

Seit vielen Jahrzehnten werden Nucleosidanaloga in der Krebsbekämpfung, in der antiviralen Chemotherapie sowie als Virostatika eingesetzt.^[113,115] Allerdings ist der aktive Metabolit der Nucleosidanaloga meistens die entsprechend phosphorylierte Spezies. Eine direkte Verabreichung der Nucleotide ist jedoch nicht möglich, da die negativen Ladungen der Phosphatgruppen die Diffusion durch die Zellmembran verhindern.^[112] Des Weiteren sind die Phosphate sehr anfällig gegenüber enzymatischem Abbau,^[115] weshalb unterschiedliche Nucleotid-Prodrugkonzepte entwickelt wurden.^[116-121]

4.6.1 Das DiPPro- und TriPPro-Konzept

Das DiPPro- und TriPPro-Konzept beruht auf einer Maskierung von Nucleosiddi- und Nucleosdtriphosphaten (NTP) mit zwei 4-Acyloxybenzylgruppen (AB-Gruppen). Das BisAB-Konzept wurde ursprünglich von THOMSON *et al.* für Nucleosidmonophosphate entwickelt^[121] und erstmals von MEIER *et al.* auf Nucleosiddi-^[122] und -triphosphate^[123] erfolgreich übertragen. Bei Diphosphaten werden die negativen Ladungen des β -Phosphats mit AB-Gruppen verestert und bei Triphosphaten ist es die γ -Phosphatgruppe, die verestert wird. Durch diese lipophile Maskierung wird den Prodrugs eine passive Diffusion durch die Zellmembran ermöglicht. Innerhalb der Zelle werden die Masken durch Esterasen oder Lipasen gespalten und der aktive Metabolit freigesetzt (Abbildung 16). Die erfolgreiche Zellaufnahme und Hydrolyse von DiPPro- und TriPPro-Verbindungen konnte erfolgreich auf verschiedene Nucleotide übertragen werden.^[123–126]

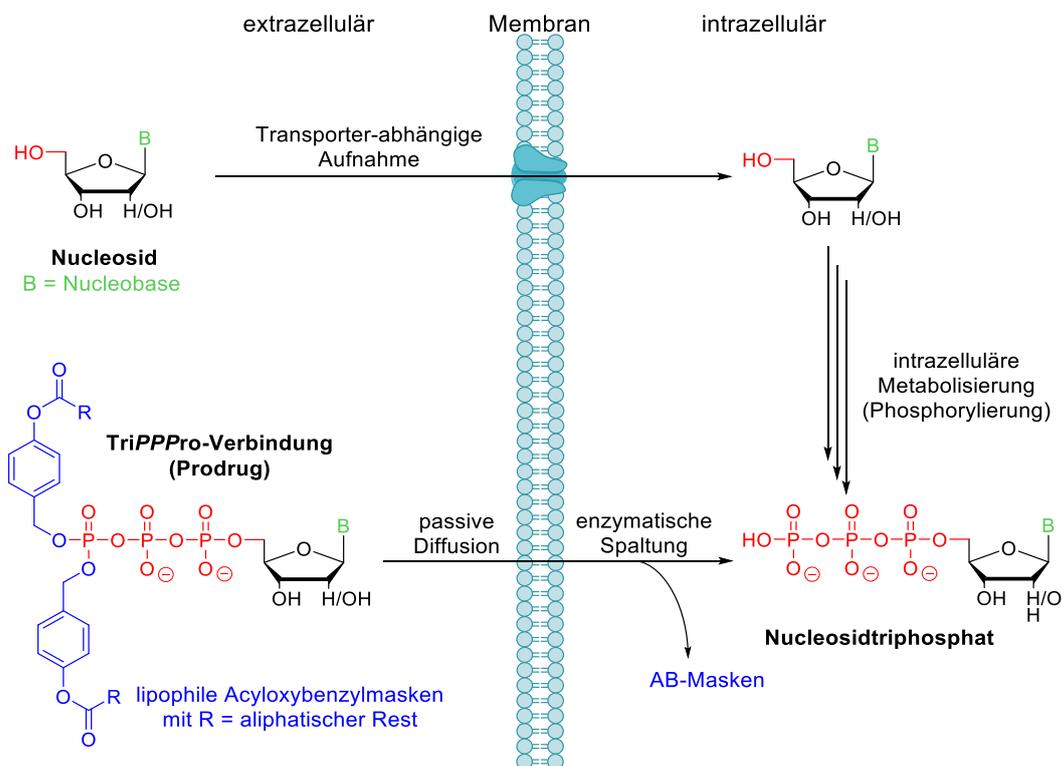


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Zellaufnahme über das TriPPro-Konzept im Vergleich zur direkten Verabreichung eines Nucleosids und der intrazellulären Metabolisierung.

Der enzymatische Spaltungsmechanismus einer TriPPro-Verbindung ist in Abbildung 17 dargestellt. Zuerst wird die phenolische Acylesterfunktion eines der Masken durch Esterasen oder Lipasen hydrolysiert. Dann folgt eine 1,6-Eliminierung. Dies führt zur Freisetzung des monomaskierten Nucleotids und von Chinonmethid, welches anschließend

zum 4-Hydroxybenzylalkohol hydrolysiert wird. Die Abspaltung der zweiten AB-Gruppe findet analog statt und das freie NTP wird gebildet.^[123,127]

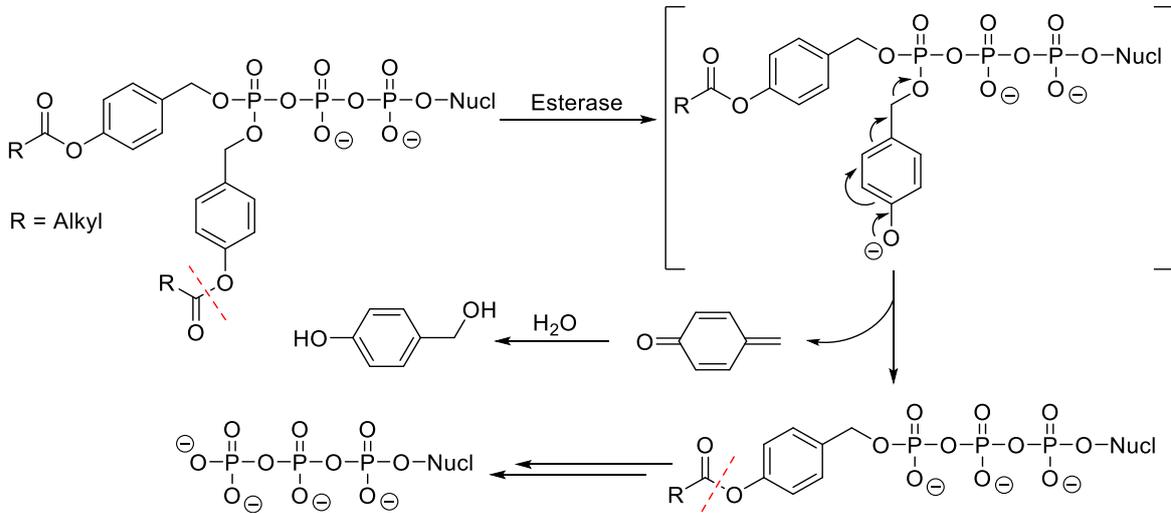


Abbildung 17: Enzymatische Hydrolyse der Acyloxybenzylgruppen durch eine Esterase. Die Spaltstellen sind mit einer rot gestrichelten Linie dargestellt.

Die AB-Masken können auch über eine chemische Hydrolyse gespalten werden. Hierbei konkurrieren bei einer TriPPPro-Verbindung drei mögliche Reaktionen miteinander, die zur Bildung des entsprechenden Tri-, Di- und Monophosphats führen (Abbildung 18).^[123]

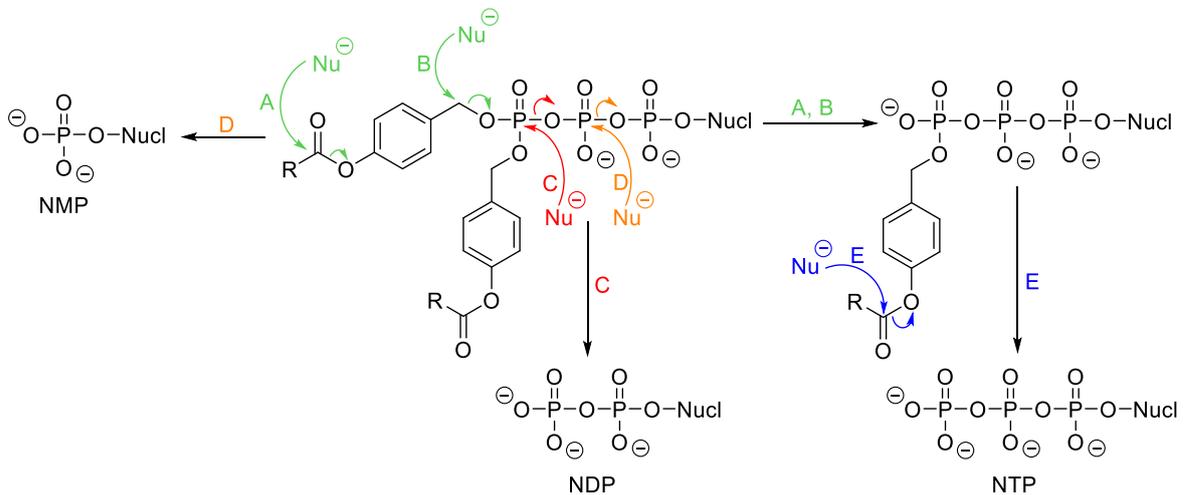


Abbildung 18: Chemische Hydrolyse der Acyloxybenzylgruppen am Beispiel einer TriPPPro-Verbindung, wobei es zur Bildung von Mono-, Di- und Triphosphat kommen kann.

In einem ersten Schritt kann ein nucleophiler Angriff am Benzylkohlenstoffatom (A) oder an der phenolischen Acylesterfunktion mit anschließender 1,6-Eliminierung (B) erfolgen. Außerdem kann auch eine Hydrolyse der Phosphoranhydridbindung erfolgen, die zur

Bildung des Di- (C) bzw. Monophosphats (D) führt. Nach Spaltung der ersten AB-Maske wird eine Hydrolyse der Phosphoranhydridbindung unwahrscheinlich, da die monomaskierte Verbindung eine zusätzliche negative Ladung aufweist, die vor Nucleophilen abschirmt. Des Weiteren ist dadurch der nucleophile Angriff an der benzylicischen Position nicht bevorzugt und es findet hauptsächlich eine Spaltung am phenolischen Acylester statt (E), die zur Bildung des freien NTPs führt.^[123,127–129]

5 Aufgabenstellung

In den letzten 23 Jahren haben bereits drei hochpathogene Coronaviren zum Ausbruch von Epidemien und einer Pandemie geführt, wobei letztere durch SARS-CoV-2 verursacht wurde. Innerhalb weniger Monate hat sich das Virus auf alle Kontinente ausgebreitet und weltweit für eine gesundheitliche Notlage gesorgt, die über 7 Millionen Menschenleben gefordert hat. Die Auswirkungen der jüngsten Pandemie und der früheren epidemischen Zustände machen die Bedeutsamkeit der Entwicklung von Breitbandtherapeutika gegen Coronaviren deutlich, um künftig auf solche viralen Ausbrüche besser vorbereitet zu sein.^[3,16]

Eine Infektion mit SARS-CoV-2 kann neben milden Erkältungssymptomen auch zu lebensbedrohlichen Atemwegserkrankungen und Lungenentzündungen bei Menschen führen. Solche schweren COVID-19-Fälle sind gekennzeichnet durch eine unausgewogene Immunreaktion, die durch eine schwache Produktion von Typ-I-Interferonen und eine verstärkte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine begleitet wird.^[13]

Es konnte gezeigt werden, dass die Hydrolaseaktivität der konservierten Macrodomäne Mac1 von Coronaviren eine entscheidende Rolle in ihrer Pathogenese spielt, indem sie der ADP-Ribosylierung und somit einer effektiven Immunantwort der Wirtszelle entgegenwirkt. Dies lässt darauf schließen, dass Mac1 ein wichtiger Virulenzfaktor ist und somit ein potentiell *Target* zur Wirkstoff- bzw. Inhibitorentwicklung darstellt.^[14] Im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 1328 (SFB1328, Teilprojekt A18) erfolgte die Synthese der Zielstrukturen im Arbeitskreis um MEIER und die entsprechenden biologischen Daten wurden in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von GUSE erhalten und ausgewertet.

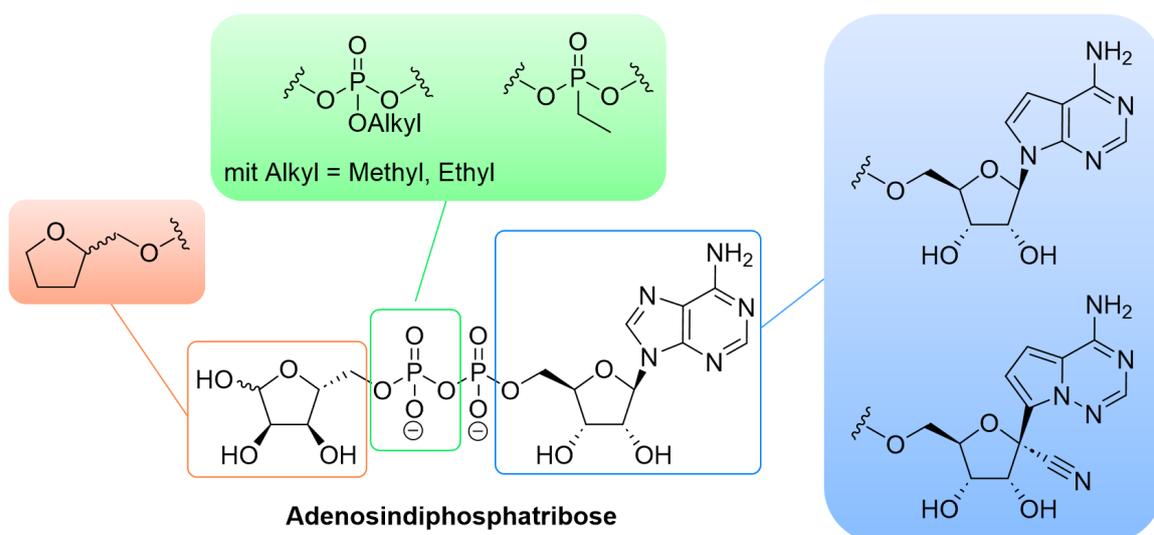


Abbildung 19: ADPR und die einzuführenden Modifikationen an der terminalen Ribose, der β -Phosphatgruppe oder der Adenosineinheit als potentielle Inhibitoren der viralen Macrodomäne Mac1.

Im ersten Teil der Arbeit sollte die Synthese von unterschiedlichen Modifikationen an ADPR, welches das native Substrat für Mac1 darstellt, erfolgen. Diese Analoga sollten anschließend hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität gegen SARS-CoV-2-Mac1 getestet werden. Die einzuführenden Modifikationen sind in Abbildung 19 zu sehen. Es sollten Modifikationen an der terminalen Ribose, der β -Phosphatgruppe, sowie der Nucleobase eingeführt werden. Die Modifikationen wurden ausgehend von den bereits bestehenden Kenntnissen, die in Kooperation mit dem Sonderforschungsbereich 1328 erlangt wurden, ausgewählt (vgl. Kapitel 4.4.1.1 und Kapitel 4.4.1.2).

Die Inhibitorstrukturen mit den besten pharmakologischen Eigenschaften sollten dann im nächsten Schritt, unter Anwendung des DiPPro-Konzepts, in eine membrangängige Spezies überführt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte ADPR an der 1'-Position mit einem Fluorophor versehen werden, um als Substrat für SARS-CoV-2-Mac1 eingesetzt zu werden (Abbildung 20). Mit diesem fluorogenen Substrat sollte, im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 1328 (Teilprojekt A18), ein Enzym-Assay entwickelt werden. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass der Fluorophor nur im ungebundenen Zustand fluoresziert, um das Auftreten von Hintergrundsignalen zu minimieren und einen direkten Indikator für die Hydrolaseaktivität des Enzyms zu erhalten. Das Assay soll anschließend dazu dienen, die De-ADP-Ribosylierungsaktivität von Mac1 näher zu untersuchen, da noch immer unklar ist, welche Proteine genau durch Mac1 hydrolysiert werden und über welche biologischen Prozesse dies stattfindet.

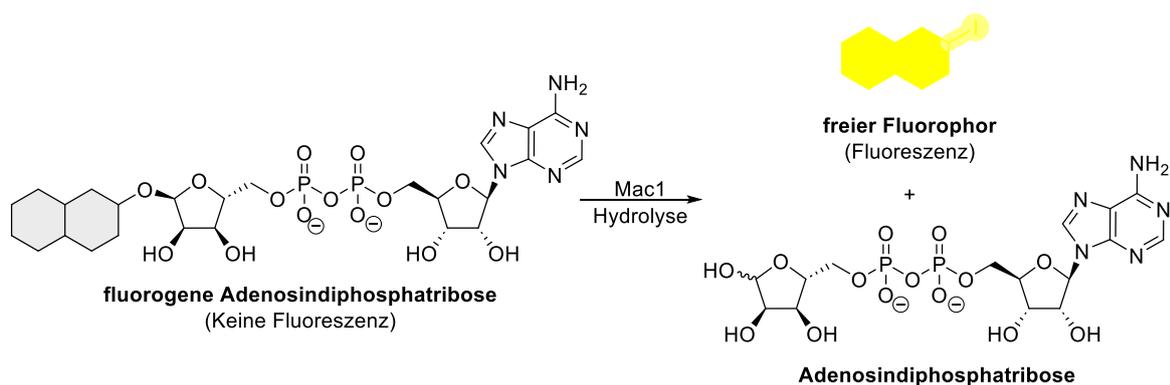


Abbildung 20: Schematische Darstellung der enzymatischen Umsetzung von dem fluoreszenzmarkierten ADPR mit Mac1. Der Fluoreszenzmarker fluoresziert erst nach der Abspaltung.

6 Resultate und Diskussion

6.1 Synthese von potentiellen Mac1-Inhibitoren

Das erste Ziel dieser Arbeit war es, unterschiedliche ADPR-Analoga zu synthetisieren und diese hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität gegen die Macrodomäne Mac1 von SARS-CoV-2 zu testen. In vorangegangenen Arbeiten von SANDMANN wurde ersichtlich, dass lediglich die Modifikation der terminalen Ribose zu einer Senkung des IC₅₀-Wertes führte.^[99] Bei dieser Modifikation handelte es sich lediglich um eine Methylgruppe, die an ein Sauerstoffatom der β -Phosphatgruppe von ADP gebunden war (vgl. Kapitel 4.4.1.2). Der Austausch der terminalen Ribose zu Glucose führte zu einer erheblichen Erhöhung des IC₅₀-Wertes. Daraus wurde geschlossen, dass größere Substituenten im Vergleich zu kleineren Substituenten einen nachteiligen Effekt auf die inhibitorische Aktivität haben. Aus diesem Grund sollte die terminale Ribose mit einem kleineren Substituenten ausgetauscht werden. Hierfür wurde ein Tetrahydrofurfurylrest ausgewählt, da dieser genauso wie Ribose einen Fünfring enthält, jedoch ähnlich wie die Methylgruppe aufgrund der fehlenden Alkoholfunktionen aliphatische Elemente besitzt.

6.1.1 Darstellung von Tetrahydrofurfuryl-Adenosindiphosphat **12**

Die Synthese von Tetrahydrofurfuryl-Adenosindiphosphat **12** sollte über eine direkte Kupplung zwischen Tetrahydrofurfurylalkohol **13** sowie Adenosindiphosphat **14** erfolgen, da beide Edukte kommerziell erhältlich sind. Somit sollte eine schnelle Darstellung der ersten Zielverbindung über eine sehr kurze Syntheseroute ermöglicht werden. Hierzu sollte vorher eine ausreichende Nucleophilie von ADP **14** gewährleistet sein, sodass die Natrium-Gegenionen mittels eines DOWEX[®]-Ionenaustauschers auf Triethylammonium gewechselt wurden. Die Reaktionsbedingungen der Kupplungsreaktion sind in Abbildung 21 aufgeführt. Sie wurden nach einem Protokoll von MOHAMADY *et al.* durchgeführt und die stöchiometrischen Mengen gemäß der Arbeiten von WITT angepasst.^[130,131]

Die Kupplung sollte über eine schrittweise Aktivierung des Adenosindiphosphats **14** erfolgen. Als erstes wurde ADP **14** mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) und Triethylamin für 10 Minuten bei 0 °C umgesetzt, wobei die ungeschützten Hydroxygruppen, die freie Aminofunktion und die Phosphatgruppe acyliert wurden, um Nebenreaktionen zu verhindern.^[132] Anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt, das gebildete gemischte Anhydrid erneut in trockenem Acetonitril gelöst, bei Raumtemperatur mit *N*-Methylimidazol, (NMI) sowie Triethylamin versetzt und für 10 Minuten gerührt. Das

entstandene Imidazolidat ist die aktive Spezies, sodass die Bildung dieses Imidazolidat-Intermediates wesentlich für eine erfolgreiche Kupplungsreaktion ist.^[132]

Anschließend wurde Tetrahydrofurfurylalkohol **13**, gelöst in Acetonitril, zum Imidazolidat-aktivierten ADP dazugegeben. Laut Literatur sei eine Reaktionszeit von zwei Stunden ausreichend für eine erfolgreiche Kupplung.^[130,132] Da allerdings die HPL-chromatographische Reaktionsverfolgung durch die nicht vorhandene UV-Aktivität der Unterschusskomponente **13** nicht möglich war, wurde die Reaktionszeit auf sechs Stunden bei Raumtemperatur verlängert, um einen vollständigen Umsatz gewährleisten zu können. Anschließend wurde die Reaktion beendet und säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel gereinigt. Das Produkt besitzt am Tetrahydrofurfuryl-Rest ein Chiralitätszentrum. Dies hat zur Folge, dass das entsprechende Produkt ein Gemisch beider Stereoisomere darstellt.

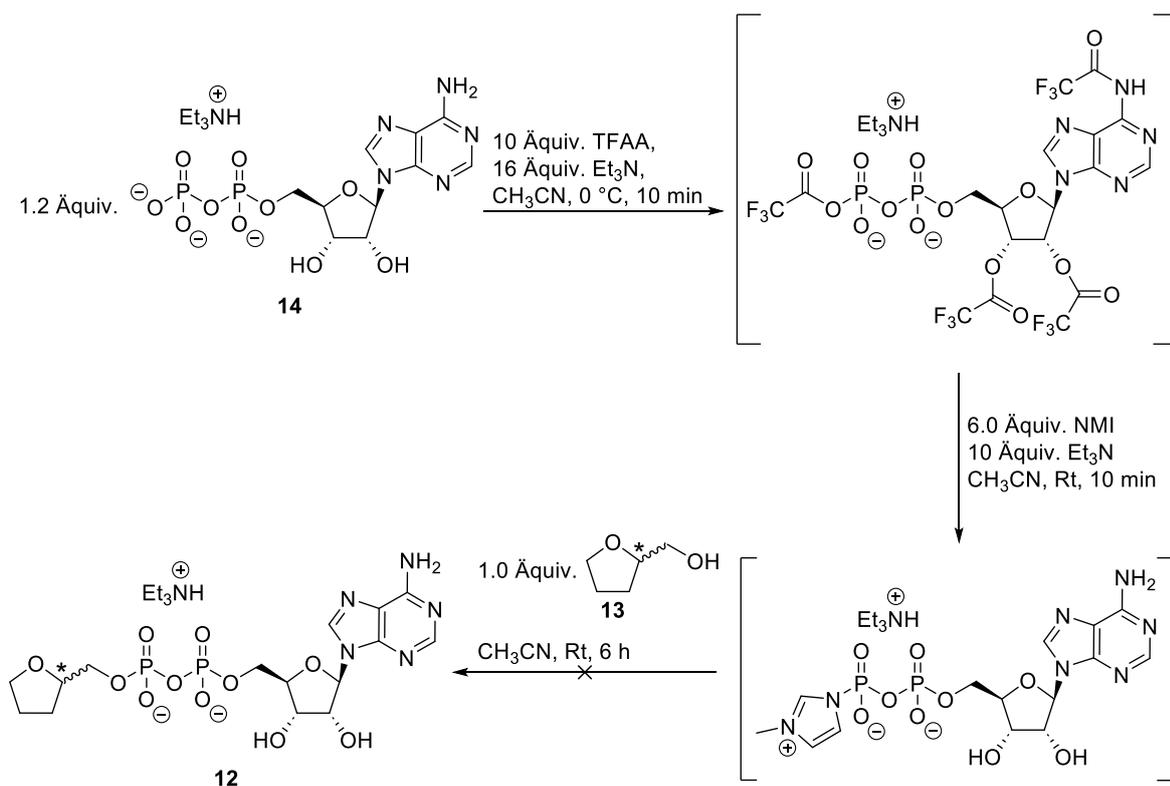


Abbildung 21: Reaktionsbedingungen zur Synthese des Stereoisomerengemisches Tetrahydrofurfuryl-Adenosindiphosphat **12** über eine schrittweise Aktivierung von ADP **14** und dem Umsatz mit Tetrahydrofurfurylalkohol **13**.

Nach der Reinigung konnte das gewünschte Produkt **12** nicht isoliert werden, sondern hauptsächlich das Edukt Adenosindiphosphat **14** zurückgewonnen werden. Bei dieser Reaktion hatte sich vermutlich zu wenig von dem aktiven Imidazolidat-Intermediat gebildet, das im nachfolgenden Schritt nucleophil vom Alkohol **13** angegriffen werden konnte. Das

könnte daran liegen, dass die Menge der eingesetzten Reagenzien nicht ausreichend für eine Aktivierung eines Diphosphats war, da sowohl in der Literatur als auch in den Arbeiten von WITT lediglich das Nucleosidmonophosphat in die aktive Spezies überführt wurde.^[131,132]

In einem nächsten Versuch wurde erneut die Kupplung an ADP **14** erprobt, jedoch wurden dieses Mal die Reaktionsbedingungen nach LUO *et al.* genutzt, die über diese Synthesestrategie bereits eine Reihe an unterschiedlichen ADPR-Analoga darstellen konnten.^[133] Hierfür musste zuerst der Alkohol **13** über eine nucleophile Substitution mit einer Tosylgruppe versehen werden. Die Reaktionsbedingungen der Tosylierung sind in Abbildung 22 dargestellt.^[134]

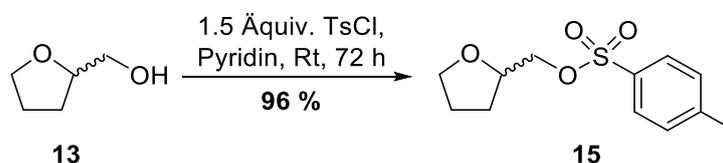


Abbildung 22: Reaktionsbedingungen zur Tosylierung von Tetrahydrofurfurylalkohol **13** mit Tosylchlorid.

Das Edukt **13** wurde in Pyridin gelöst, mit Tosylchlorid versetzt und für drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel konnte das tosylierte Produkt **15** in einer Ausbeute von 96 % erhalten werden.

Durch die Überführung der Alkoholgruppe in ein Sulfonsäureester wurde diese in eine bessere Abgangsgruppe umgewandelt, um somit die nachfolgende Kupplung über einen nucleophilen Angriff von ADP **14** zu begünstigen.

Zudem wurde ADP **14** für die nachfolgende Kupplung nicht als Triethylammonium-Salz, sondern als Tetrabutylammonium-Salz eingesetzt, um eine noch bessere Nucleophilie sowie Löslichkeit zu gewährleisten.

Die Kupplungsreaktion wurde unter den in Abbildung 23 dargestellten Reaktionsbedingungen durchgeführt.^[133]

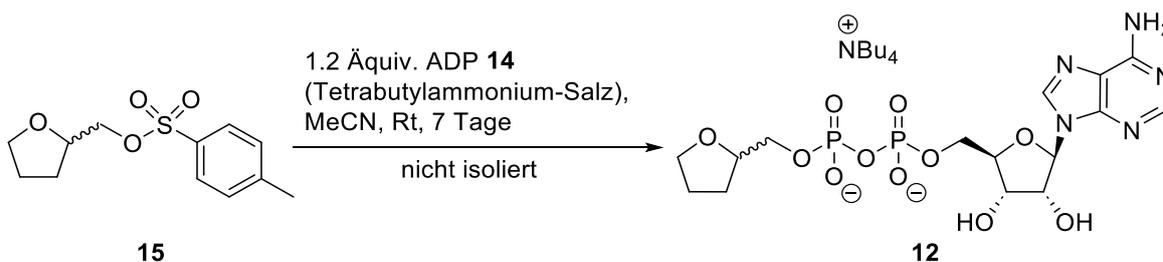


Abbildung 23: Reaktionsbedingungen zum Kupplungsversuch der tosylierten Verbindung **15** mit ADP **14** als Tetrabutylammoniumsalz.

Die Reaktion wurde in regelmäßigen Abständen dünnschichtchromatographisch auf den Umsatz des UV-aktiven Edukts **15** überprüft. Allerdings konnte selbst nach 7 Tagen kein vollständiger Umsatz beobachtet werden, weshalb die Reaktion beendet und säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel fraktioniert wurde. Es konnte das tosylierte Edukt **15** reisoliert werden, jedoch kein ADP **14**. Stattdessen wurde nach zweifacher säulenchromatographischer Reinigung an RP-18-Kieselgel hauptsächlich Adenosinmonophosphat **16** sowie das Produkt **12** identifiziert. Die Bildung des Monophosphats wurde mittels eines ^{31}P -NMR-Spektrums festgestellt, da hier ein Signal mit einer chemischen Verschiebung von -0.45 ppm detektiert wurde. So eine chemische Verschiebung ist sehr charakteristisch für Monophosphate (Abbildung 24). Der Bereich um ca. -10 ppm ist wiederum typisch für Pyrophosphate.

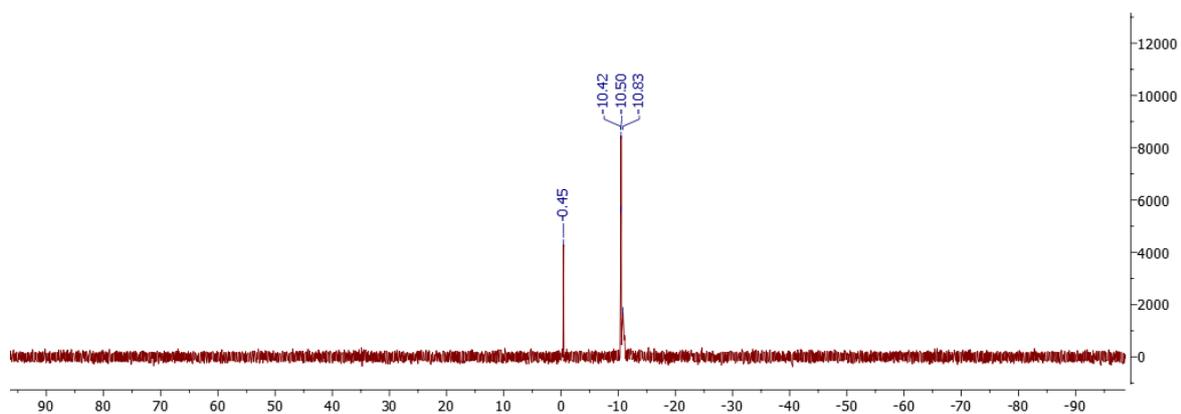


Abbildung 24: ^{31}P -NMR-Spektrum einer isolierten Fraktion nach der säulenchromatographischen Reinigung an RP-18-Kieselgel der Kupplungsreaktion zwischen ADP **14** und dem tosylierten THF-Derivat **15**. Die NMR-Probe wurde in $\text{DMSO-}d_6$ gelöst und die Messung erfolgte bei einer NMR-Frequenz von 243 Hz sowie einer Temperatur von 25 °C.

Zudem konnte schlussendlich die Bildung von AMP **16** anhand eines ESI-Massenspektrums bestätigt werden. Das entsprechende Massenspektrum ist in Abbildung **25** dargestellt. Neben einem Massepeak für AMP **16** mit einem m/z von 346.0541 konnte noch die Abgangsgruppe als Tosylat-Ion **17** mit einem m/z von 171.0151 sowie das gewünschte Produkt **12** mit einem m/z von 510.0699 detektiert werden. Allerdings wurde beobachtet, dass hauptsächlich AMP **16** mit einer relativen Intensität von 100 % den Basispeak darstellte und somit in einer großen Menge isoliert wurde. Es wäre möglich, dass während der säulenchromatographischen Reinigung an RP-18-Kieselgel, das nicht umgesetzte ADP **14** in Wasser zu AMP **16** hydrolysierte, weshalb kein ADP **14** reisoliert werden konnte.

Obwohl anhand des Massenspektrums festgestellt wurde, dass es ebenfalls zur Bildung des gewünschten Produktes **12** gekommen ist (Abbildung 25, grün), konnte dieses jedoch nicht rein aus den erhaltenen Fraktionen isoliert werden.

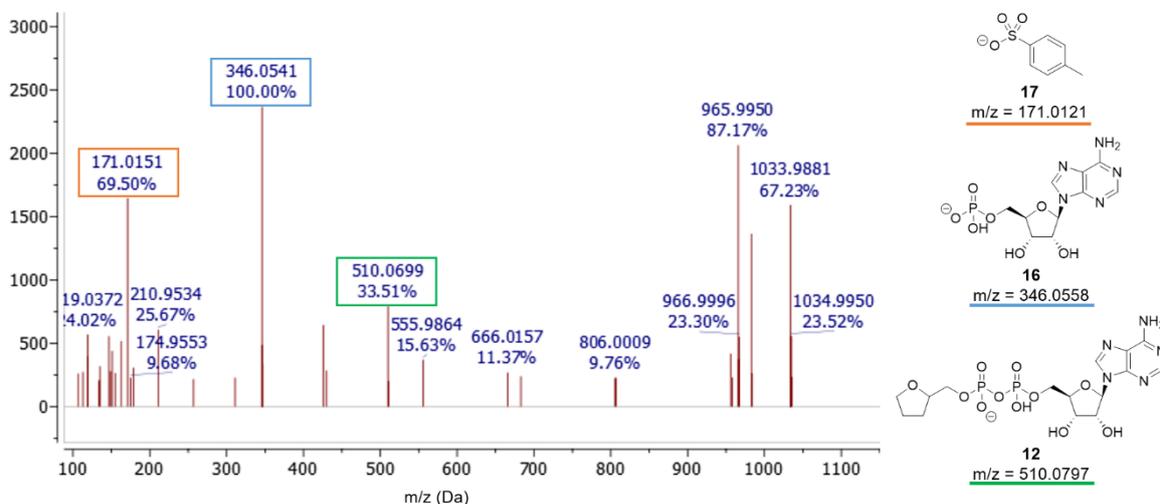


Abbildung 25: ESI-Massenspektrum einer isolierten Fraktion, gemessen im Negativionenmodus. Die berechneten Massen für die detektierten Verbindungen sind jeweils unter der Struktur aufgeführt und mit unterschiedlichen Farben unterlegt.

Da eine direkte Kupplung zwischen dem Alkohol **13** oder dem Sulfonsäureester **15** mit ADP **14** in beiden Fällen nicht zur erfolgreichen Isolation des gewünschten Derivats **12** führte, sollte eine neue Syntheseroute erprobt werden. Hierfür sollte in einem letzten Schritt die Kupplung an AMP **16** erfolgen, da die Überführung eines Monophosphats in die aktive Imidazolidat-Zwischenstufe bereits sehr gut erprobt ist und dadurch eine erfolgreiche Kupplung nach der Vorschrift von MOHAMADY *et al.* gewährleistet sein sollte. Dafür sollte in einem vorherigen Schritt der kommerziell erhältliche Alkohol **13** phosphoryliert werden, um das Phosphat **18** zu erhalten (Abbildung 26).

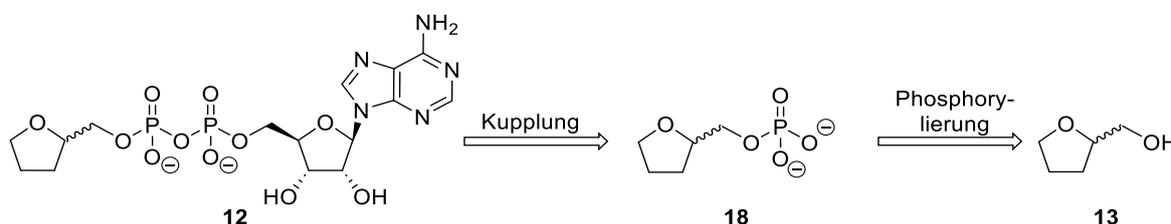


Abbildung 26: Retrosynthetisches Schema zur Darstellung des gewünschten ADPR-Derivats **12** ausgehend von dem kommerziell erhältlichen Tetrahydrofurfurylalkohol **13**.

Für die Phosphorylierung von Tetrahydrofurfurylalkohol **13** wurde die Phosphorylierungsstrategie nach YOSHIKAWA *et al.* ausgewählt.^[135] Ein Vorteil dieser Reaktion ist, dass die

Phosphorylierung lediglich über einen Syntheseschritt abläuft und nicht wie bei dem Einsatz von Phosphoramiditen in Kombination mit Schutzungs- bzw. Entschützungsreaktionen abläuft. Bei der Phosphorylierung nach YOSHIKAWA *et al.* wird Phosphorylchlorid als Reagenz und Trialkylphosphate, meist Trimethylphosphat (TMP) oder Triethylphosphat (TEP), als Lösungsmittel eingesetzt.^[135] Es wurde beobachtet, dass die Verwendung dieser beiden Chemikalien sowohl eine hohe Löslichkeit induzieren als auch zur Bildung einer aktiven Spezies **19** führen, die eine schnelle Reaktionszeit gewährleistet.^[136] Bei einer Reaktion mit dieser aktiven Spezies soll regioselektiv die 5'-Position des ungeschützten Nucleosids phosphoryliert werden und es entsteht das entsprechende Nucleosid-5'-dichlorphosphat **20**. Dieses muss in einem letzten Schritt hydrolysiert werden, um das Nucleosid-5'-monophosphat **21** zu erhalten (Abbildung 27).

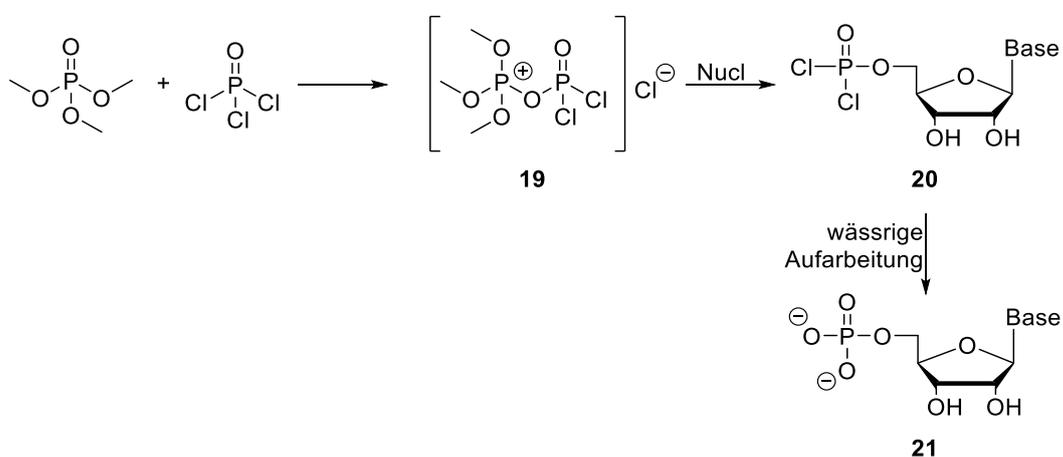


Abbildung 27: Bildung der postulierten aktiven Phosphorylierungsspezies **19** aus Trimethylphosphat und Phosphorylchlorid sowie anschließende regioselektive 5'-Phosphorylierung eines ungeschützten Nucleosids (Nucl) zur Darstellung des Monophosphats **21** nach YOSHIKAWA *et al.*^[136]

Außerdem wurde von YOSHIKAWA *et al.* beschrieben, dass die Selektivitäten gegenüber der Bildung von 5'-Monophosphaten erhöht werden kann, wenn geringe Mengen an Wasser eingesetzt werden. Das wurde damit begründet, dass dadurch der in der Reaktion freiwerdende Chlorwasserstoff zu sauren Reaktionsbedingungen führt und somit die 2'- und 3'-Hydroxyfunktionen protoniert vorlagen. Dies führte dazu, dass ausschließlich die 5'-Position einen ausreichenden nucleophilen Charakter aufwies, um mit der aktiven Spezies **19** zu reagieren.^[135,136] Allerdings konnte ebenfalls gezeigt werden, dass bei der Phosphorylierung von ungeschützten Nucleosiden gute Regioselektivitäten erzielt wurden, wenn die Reaktionsbedingungen leicht basisch waren. Hierbei wurde üblicherweise 1,8-Bis(*N,N*-dimethylamino)-naphthalin (Protonenschwamm) als Base eingesetzt.^[137,138]

Die Phosphorylierung des Alkohols wurde unter den in Abbildung 28 aufgeführten Reaktionsbedingungen durchgeführt. Hierbei wurde zunächst auf den Einsatz von Protonenschwamm unter basischen Bedingungen zurückgegriffen.^[137]

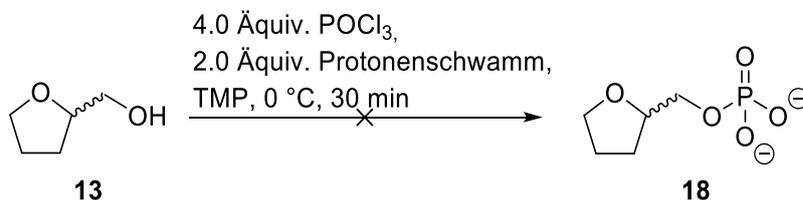


Abbildung 28: Reaktionsbedingungen zur Phosphorylierung des Alkohols **13** mit Phosphorylchlorid und dem Zusatz von Protonenschwamm als Base.^[137]

Bei der Zugabe von Phosphorylchlorid zur Reaktionslösung wurde beobachtet, dass es zu einer Dunkelfärbung kam und ein Feststoff ausfiel. Aus diesem Grund wurde der Fortschritt der Reaktion bereits nach 30 Minuten mittels Dünnschichtchromatographie überprüft und es wurde festgestellt, dass das gesamte Startmaterial **13** umgesetzt wurde. Nach einer wässrigen Aufarbeitung und der Abtrennung des Trimethylphosphats durch Dichlormethan konnte säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel kein Produkt isoliert werden.

Es wurde eine weitere Phosphorylierung mittels Phosphorylchlorid erprobt. Dieses Mal wurde Triethylamin anstatt des Protonenschwamms als Base eingesetzt und das Lösungsmittel wurde zu Tetrahydrofuran gewechselt (Abbildung 29).^[139]

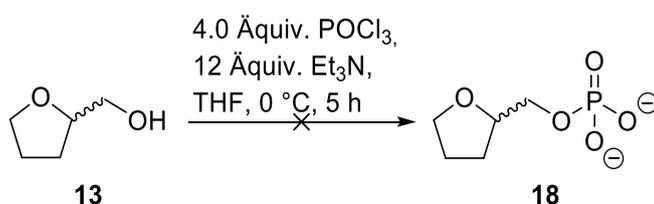


Abbildung 29: Reaktionsbedingungen zur Phosphorylierung des Alkohols **13** mit Phosphorylchlorid und dem Zusatz von Triethylamin als Base.^[139]

Auch bei dieser Reaktion wurde erneut die Bildung eines Niederschlags und eine Dunkelfärbung des Reaktionsgemisches beobachtet. Allerdings trat diese in diesem Fall langsam über die gesamte Reaktionszeit ein und nicht unmittelbar nach der Zugabe des Phosphorylchlorids, wie es bei der vorherigen YOSHIKAWA-Reaktion (Abbildung 28) der Fall war. Nach einer wässrigen Aufarbeitung wurde das Rohprodukt direkt säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel fraktioniert, allerdings wurde wieder nicht das gewünschte Produkt **18** isoliert.

Da die direkten Phosphorylierungen mit Phosphorylchlorid nicht erfolgreich waren, sollte eine andere Strategie erprobt werden. Dabei wurde der Ansatz über die Amiditchemie ausgewählt. Bei der Phosphorylierung mit einem Amiditreagenz handelt es sich um eine Phosphitylierung und eine anschließende Oxidation zum entsprechenden Phosphat. Die Phosphoramidite sind P(III)-Spezies, d.h. sie besitzen einen Phosphor mit der Oxidationsstufe +III. Sie weisen eine höhere Reaktivität als P(V)-Verbindungen auf und können bereits an Luftsauerstoff oxidieren, weshalb Reaktionen mit Phosphoramiditen möglichst unter Sauerstoff- und Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt werden sollten.^[140] Die Phosphoramiditchemie ist eine häufig verwendete Methode in der Synthese von Oligonucleotiden. Sie wurde in der Vergangenheit erfolgreich zur Synthese von unterschiedlichen Nucleosidmonophosphaten angewendet.^[131,141–143] Der Vorteil der Phosphorylierung mittels Phosphoramidite ist, dass im Vergleich zur YOSHIKAWA-Reaktion oder andere direkte Phosphorylierungsstrategien, lediglich äquimolare Mengen der Reagenzien eingesetzt werden können und nicht in einem großen Überschuss benötigt werden. Außerdem konnten PERTENBREITER, REIMER und WITT über die Phosphorylierung mittels Amidite eine Vielzahl an unterschiedlichen Nucleosidmonophosphaten erfolgreich synthetisieren und dabei stets gute Ausbeuten erreichen.^[131,142,144] Nachteilig an der Phosphoramidit-Synthese ist, dass die Regioselektivität der Reaktion nicht mittels der Anpassung des pH-Wertes erhöht werden kann, wie es bei der YOSHIKAWA-Reaktion der Fall ist. Stattdessen müssen beispielweise bei einem Nucleosid alle Hydroxyfunktionen des Zuckers, unter Berücksichtigung des Orthogonalitätsprinzips, geschützt werden, um einen nucleophilen Angriff dieser Alkoholgruppen zu vermeiden. Dies hat eine Erhöhung der Syntheseschritte durch potentielle Schützungs- und Entschützungsreaktionen zur Folge. Dieses Problem gibt es bei der Phosphorylierung von Tetrahydrofurfurylalkohol **13** jedoch nicht, da es lediglich eine freie Alkoholfunktion besitzt und somit zumindest keine zusätzlichen Schützungsreaktionen durchgeführt werden müssen. Das entsprechende Retrosyntheschema zur Darstellung des gewünschten Produktes **12** über die neue Phosphorylierungsstrategie ist in Abbildung 30 dargestellt.

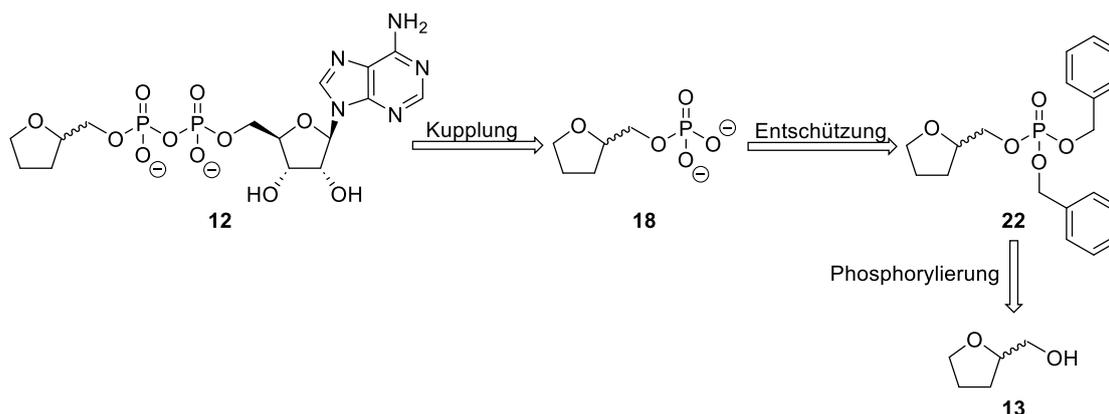


Abbildung 30: Retrosynthetisches Schema zur Darstellung des gewünschten Kupplungsproduktes **12** ausgehend von dem kommerziell erhältlichen Tetrahydrofurfurylalkohol **13**.

Das Produkt **12** sollte in einem letzten Schritt über die Kupplung des Phosphats **18** mit AMP **14** dargestellt werden. Das Phosphat **18** sollte über die Entschützung der Benzylgruppen und einer vorherigen Phosphorylierung des kommerziell erhältlichen Alkohols **13** mit Dibenzyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **23** hergestellt werden.

Die Reaktionsbedingungen zur Darstellung des Phosphats **22** sind in Abbildung 31 dargestellt.^[139,145]

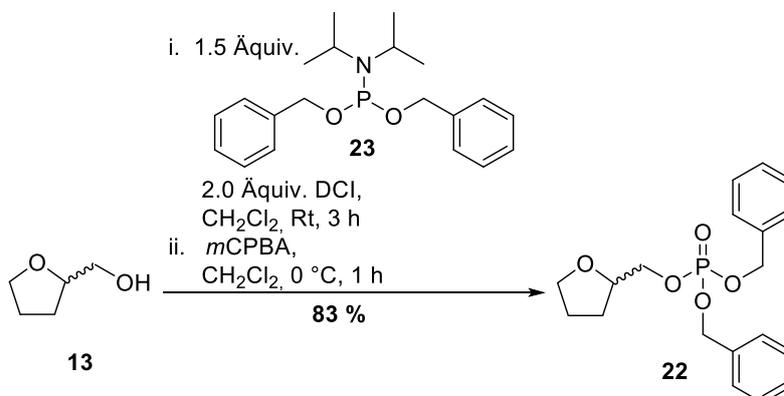


Abbildung 31: Reaktionsbedingungen zur Synthese des Phosphats **22** über eine Phosphorylierung mit Dibenzyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **23** und *meta*-Chlorperbenzoesäure.^[139]

Die Kupplung des Phosphoramidits **23** an die Hydroxygruppe des Alkohols **13** erfolgte Aktivator-vermittelt mit 4,5-Dicyanoimidazol (DCI). Die Verwendung von 1*H*-Tetrazol ist ebenfalls sehr gängig.^[146,147] Der Aktivator protoniert zunächst das Stickstoffatom des Phosphoramidits **23** und verdrängt anschließend durch einen nucleophilen Angriff Diisopropylamin (Abbildung 32).

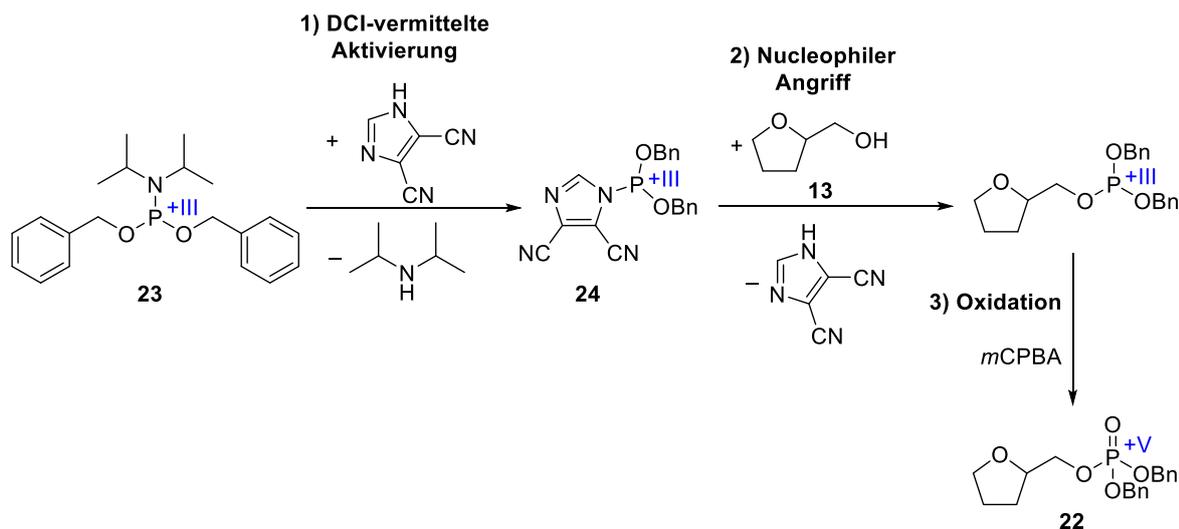


Abbildung 32: DCI-vermittelte Phosphitylierung mit Dibenzyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **23** und eine anschließende Oxidation zum Phosphat **22**. Die Oxidationsstufe des Phosphoratoms ist jeweils in blau dargestellt.^[147]

Das dabei gebildete aktive Phosphit **24** kann dann nucleophil von dem Alkohol **13** angegriffen werden und anschließend mittels eines Oxidationsmittels, beispielsweise *meta*-Chlorperbenzoesäure (*mCPBA*) oder *tert*-Butylhydroperoxid (*t*-BuOOH), zur Phosphor(V)-Spezies **22** oxidiert werden (Abbildung 32).^[147]

Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte das Produkt **22** in einer guten Ausbeute von 83 % erhalten werden. Diese Ausbeute stimmte mit den Ausbeuten überein, die PERTENBREITER, REIMER und WITT für die Phosphorylierungen unterschiedlichster Nucleoside bei der Verwendung von Phosphoramiditen erreichen konnten.^[131,142,144]

In einem nächsten Schritt mussten die Benzylschutzgruppen entfernt werden, um das Phosphat **18** zu erhalten. Hierbei wurde als Entschützungsreaktion die hydrogenolytische Spaltung ausgewählt (Abbildung 33).^[148]

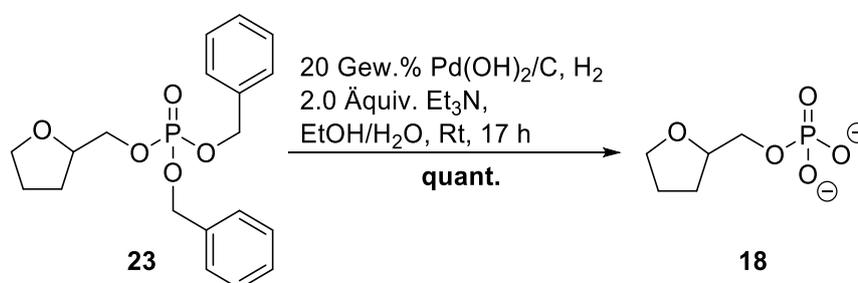


Abbildung 33: Reaktionsbedingungen zur hydrogenolytischen Spaltung der Benzylgruppen zur Darstellung des Produktes **18**.^[148]

Die katalytische Hydrierung mittels eines Palladiumkatalysators ist eine milde Methode, um Benzylether zu spalten. Die Reaktion findet auf der Oberfläche des Metalls Palladium statt, das auf einem inerten Träger, wie Aktivkohle dispergiert ist. Zunächst erfolgt die chemische Adsorption von Wasserstoff auf der Palladiumoberfläche. Anschließend wird der Benzylether über den elektronenreichen aromatischen Ring ebenfalls an den Katalysator koordiniert, sodass sich die C-O-Bindung in räumlicher Nähe zu den Wasserstoffatomen auf der Katalysatoroberfläche befindet und reduziert werden kann. Das Spaltprodukt der Hydrogenolyse ist Toluol und um das gewünschte entschützte Produkt **18** zu erhalten, muss dieser Reaktionsverlauf ein weiteres Mal mit der anderen Benzylgruppe durchlaufen werden (Abbildung 34).^[149,150]

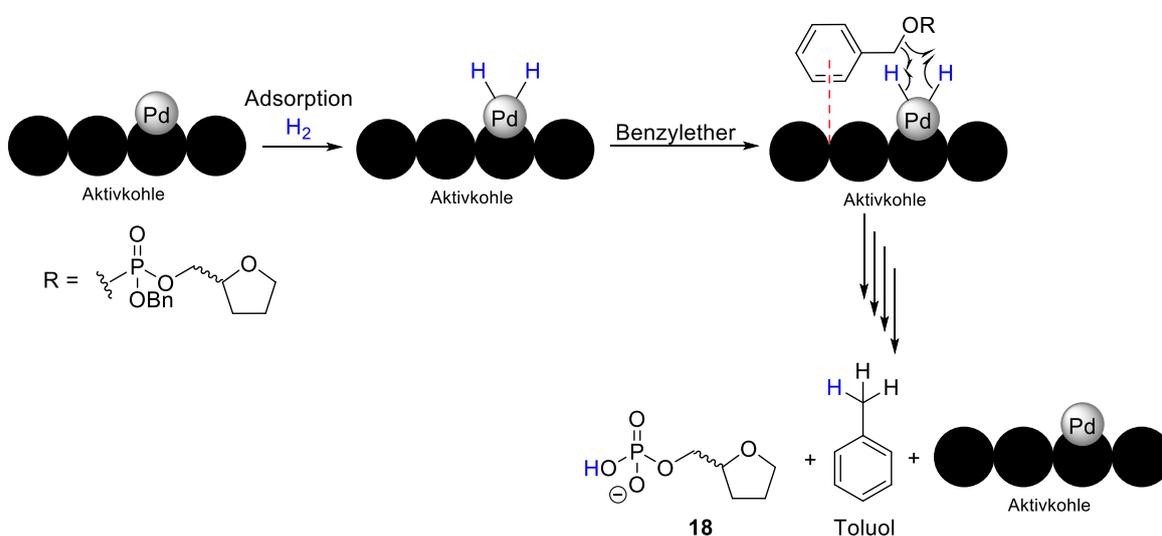


Abbildung 34: Postulierter Reaktionsverlauf zur Palladium-katalysierten Hydrierung von Benzylethern zur Bildung des entschützten Produktes **18** und Toluol als Spaltprodukt.^[149,150]

Das Produkt wurde aufgrund der Zugabe von Triethylamin als Triethylammoniumsalz mit einer quantitativen Ausbeute isoliert. Außerdem war es erheblich, dass für eine erfolgreiche und vollständige Hydrierung der Reaktionskolben nach Zugabe aller Reagenzien für fünf Minuten mit Wasserstoff gespült wurde, damit sichergestellt werden konnte, dass eine gesättigte Wasserstoffatmosphäre vorlag. Der Vorteil dieser Reaktion war, dass eine säulenchromatographische Reinigung nicht notwendig war, da alle verwendeten Reagenzien und entstandenen Spaltprodukte entweder mittels Filtration oder im Vakuum entfernt werden konnten. Da das Produkt **18** als entschützte Verbindung auch nicht mehr UV-aktiv war, wurde somit die Verwendung von Färbereagenzien als zusätzlicher Schritt zum sichtbar machen der isolierten Fraktionen nach der säulenchromatographischen Reinigung an RP-18-Kieselgel umgangen.

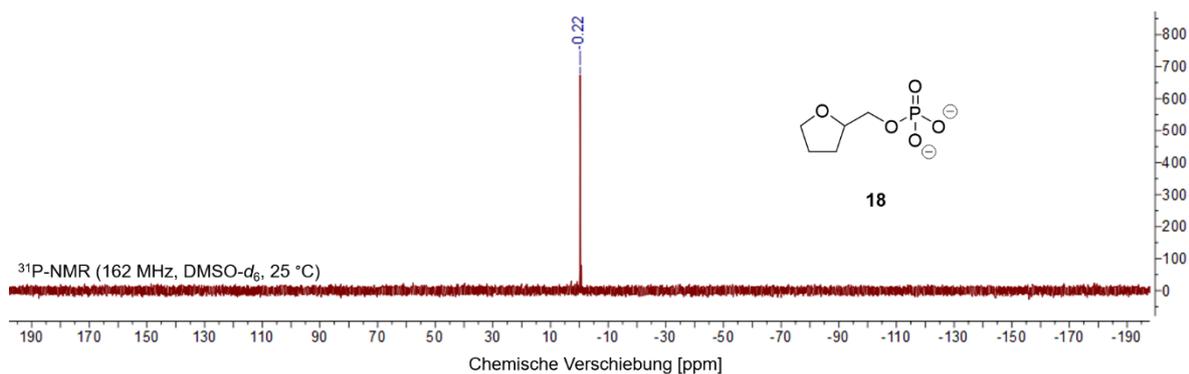


Abbildung 35: ³¹P-NMR-Spektrum des Monophosphats **18**, gemessen in DMSO-*d*₆ bei 162 MHz.

In Abbildung 35 ist das ³¹P-NMR-Spektrum von (Tetrahydrofuran-2-yl)methyl-Phosphat **18** dargestellt. Anhand des Spektrums konnte durch das Singulett bei -0.22 ppm das Vorhandensein einer Phosphatgruppe bestätigt werden. Anhand der ¹H-NMR-Spektren in Abbildung 36 war ersichtlich, dass die Entfernung der Benzylschutzgruppen erfolgreich war, da im Aromatenbereich (6.0 bis 8.0 ppm) keine charakteristischen Signale (Abbildung 36, unten) detektiert wurden. Alle weiteren Protonensignale konnten den jeweiligen Verbindungen **23** und **18** zugeordnet werden.

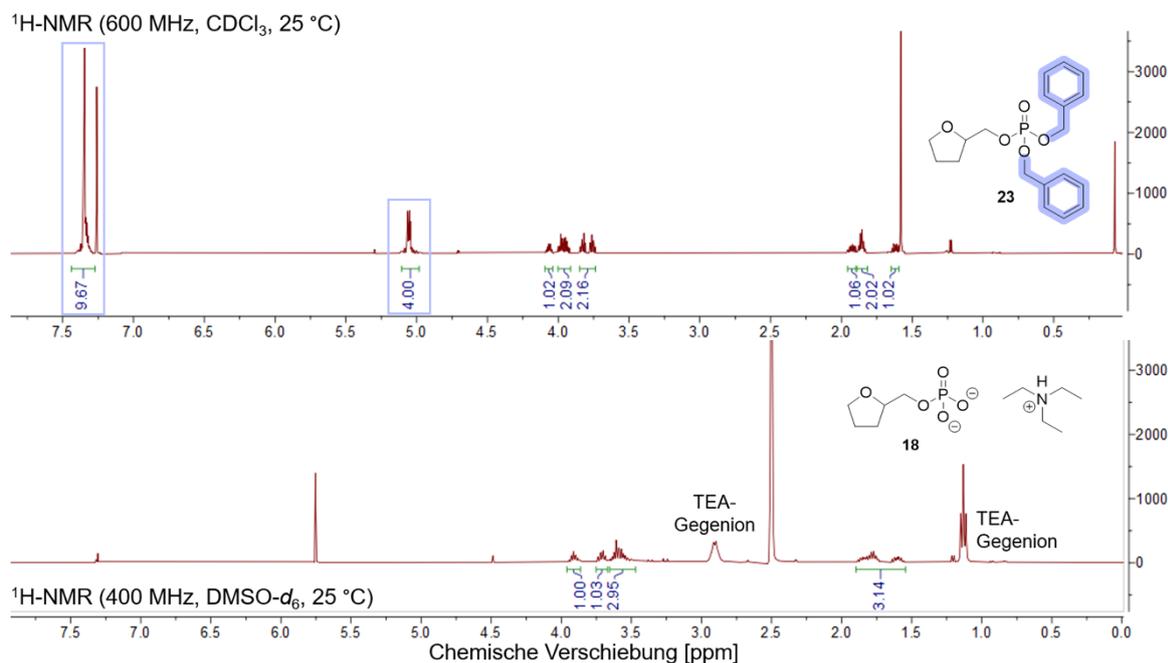


Abbildung 36: Vergleich der ¹H-NMR-Spektren des geschützten Phosphats **23** (oben) und der freien Phosphatverbindung **18** (unten). Die Benzylgruppen und ihre entsprechenden ¹H-NMR-Signale sind in lila hervorgehoben. Das obere Spektrum wurde in CDCl₃ aufgenommen und bei 600 MHz gemessen und das untere Spektrum wurde in DMSO-*d*₆ aufgenommen und bei 400 MHz gemessen.

Nach der erfolgreichen Synthese des Phosphats **18** sollte die Umsetzung zum entsprechenden Diphosphat-Derivat **12** erfolgen. Hierbei sollte (Tetrahydrofuran-2-yl)-methyl-Phosphat **18** mit Adenosinmonophosphat **16** gekuppelt werden. Die Reaktion sollte anlehnend an die Reaktion dargestellt in Abbildung 21 über eine schrittweise Aktivierung von AMP **16** erfolgen. Die Reaktionsbedingungen der Kupplungsreaktion sind in Abbildung **37** aufgeführt. Die Bedingungen entsprachen einem Protokoll von MOHAMADY *et al.* und die stöchiometrischen Mengen wurden, so wie in Arbeiten von WITT dokumentiert, angepasst.^[130,131]

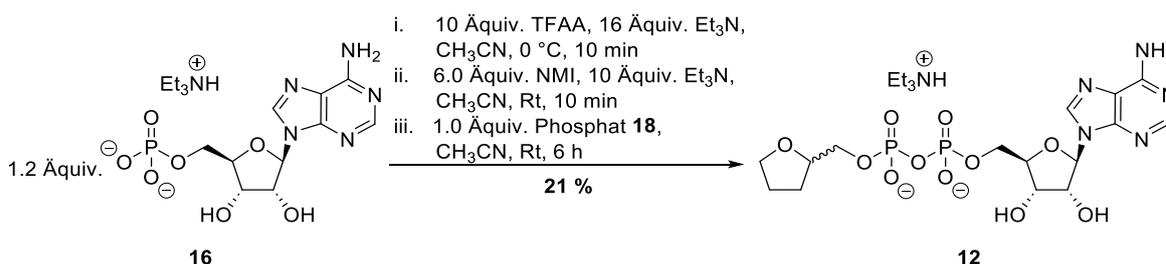


Abbildung 37: Reaktionsbedingungen zur Synthese der Diphosphatverbindung **12** über eine Imidazolidat-vermittelte Aktivierung von AMP **16** und eine anschließende Kupplung an (Tetrahydrofuran-2-yl)methyl-phosphat **18**.^[131,132]

Nach säulenchromatographischer Reinigung an RP-18-Kieselgel konnte das Produkt **12** isoliert werden. Die Darstellung des Produktes **12** wurde unter anderem mittels NMR-Spektroskopie bestätigt (Abbildung 38).

Im ³¹P-NMR-Spektrum war ersichtlich, dass das Produkt **12** als reines unsymmetrisches Diphosphat vorlag, da lediglich zwei Dubletts im charakteristischen Bereich für Diphosphate (-10 bis -12 ppm) detektiert wurden (Abbildung 38, oben), die die beiden Phosphatgruppen repräsentieren. Außerdem konnte auch anhand des ¹H-NMR-Spektrums die Reinheit bestätigt werden, da außer den Produktsignalen keine weiteren Protonensignale detektiert wurden (Abbildung 38, unten).

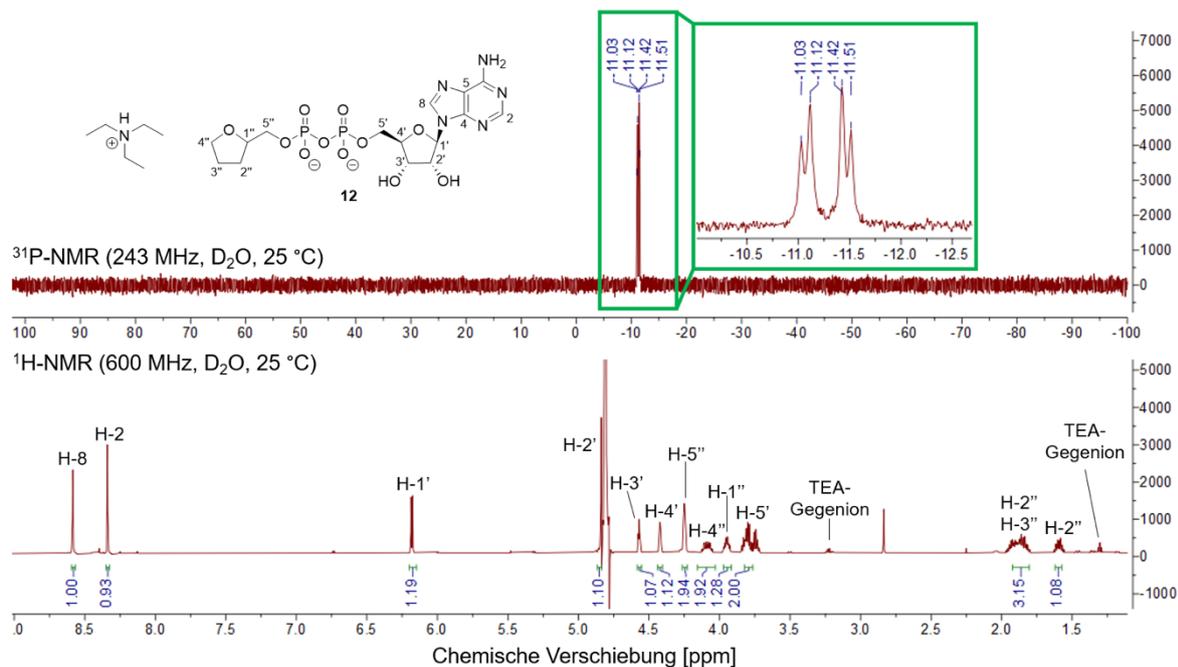


Abbildung 38: Oben: ^{31}P -NMR-Spektrum des Kupplungsproduktes **12**, aufgenommen in D_2O und 243 MHz. Das charakteristische Diphosphatsignal wurde in grün hervorgehoben. **Unten:** ^1H -NMR-Spektrum des Kupplungsproduktes **12**, aufgenommen in D_2O und 600 MHz.

Obwohl die Kupplung und die Isolierung des Produktes **12** erfolgreich waren, wurde das Diphosphat **12** lediglich in einer Ausbeute von 21 % erhalten. Auch als die Reaktion unter denselben Bedingungen wiederholt wurde, konnte das Produkt **12** wieder nur in einer niedrigen Ausbeute von 8 % isoliert werden. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass die Nucleophilie des Phosphats **18** als Triethylammoniumsalz nicht ausreichend war und der Einsatz des Phosphats **18** als Tetrabutylammoniumsalz eine Erhöhung der Ausbeute zur Folge haben könnte. Dieser Grund wird allerdings nicht als primäres Problem betrachtet, da MOHAMADY *et al.* beschrieben, dass hauptsächlich die Bildung des Imidazolidat-Intermediates wesentlich für eine erfolgreiche Kupplung ist und die Gegenionen lediglich einen Beitrag dazu leisten, dass sich die Monophosphate besser in Acetonitril lösen.^[132] Dies könnte also bedeuten, dass sich das Triethylammoniumsalz des Phosphats **18** nur teilweise in dem Lösungsmittel der Reaktion gelöst hatte und somit nur ein Bruchteil von dem eingewogenen Phosphat **18** im Acetonitril gelöst vorlag und zum Imidazolidat-Intermediat hinzugegeben wurde. Sollte diese Reaktion wiederholt werden, wäre der Einsatz von Dimethylformamid (DMF) als Lösungsmittel eine denkbare Alternative. Zusätzlich könnte die Aktivierung des Tetrahydrofurfuryl-Monophosphats **18** und die anschließende Kupplung an AMP **16** erprobt werden.

Außerdem ist anzumerken, dass im Allgemeinen das Tauschen der Gegenionen von beispielsweise Ammonium auf Triethylammonium nur sehr schlecht funktionierte. Dies ist

auch im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum für das Produkt **12** ersichtlich, da die Protonensignale der Gegenionen besonders klein sind (Abbildung 38, unten). Um also eine korrekte Angabe über die Menge der Gegenionen zu gewährleisten, wird davon abgeraten, das nach der Reaktion erhaltene Triethylammoniumsalz in die Ammoniumform zu überführen, um eventuelle Gemische an Gegenionen zu vermeiden.

6.1.1.1 Testung der inhibitorischen Aktivität von Tetrahydrofurfuryl-Adenosindiphosphat **12**

Das erfolgreich synthetisierte Diphosphat-Derivat **12** sollte nun zunächst auf die inhibitorische Aktivität gegen SARS-CoV-2-Mac1 getestet werden. Wie bereits in Kapitel 4.4.1.2 beschrieben, führte eine Verkleinerung des Riboseteils bis hin zum Methylrest zu einer Senkung des IC_{50} -Wertes auf $13\ \mu\text{M}$, der somit auch geringer als der IC_{50} -Wert von ADPR **25** war. Dies deutete darauf hin, dass der Einsatz von sterisch anspruchsvollen Gruppen im Bereich der terminalen Ribose nicht favorisiert war, weshalb das Tetrahydrofurfuryl-Derivat **12** synthetisiert wurde. Dieses ist kleiner als die terminale Ribose von ADPR **25** und sollte durch den hauptsächlich aliphatischen Charakter dieselben Wechselwirkungen wie der Methylrest von β -Methyl-ADP **26** eingehen.

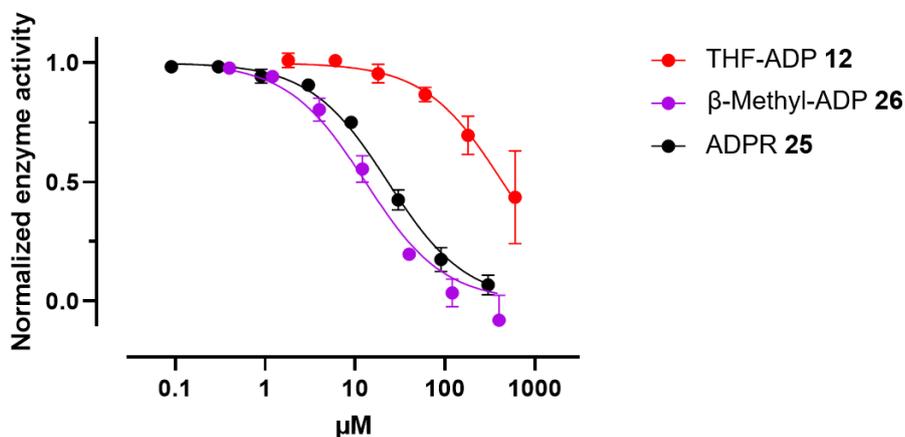


Abbildung 39: Graphen der inhibitorischen Aktivität gegen die isolierte SARS-CoV-2-Mac1 von THF-ADP **12** (rot), β -Methyl-ADP **26** (lila) und ADPR **25** (schwarz). Die Werte wurden in Kooperation mit SANDMANN am UKE (Projekt A18, SFB 1328) vermessen.

Das synthetisierte THF-ADP **12** wurde mit ADPR **25** und β -Methyl-ADP **26** verglichen. Da ADPR **25** das native Substrat von Mac1 darstellt, war es von Bedeutung, sowohl dessen Bindungsaffinität als auch die inhibitorische Aktivität zu übertreffen, um potentielle kompetitive Inhibitoren zu identifizieren. Mit einem IC_{50} von $535 \pm 376\ \mu\text{M}$ ist das Produkt **12** kein Inhibitor für die virale Mac1 (Abbildung 39). Der IC_{50} -Wert ist 40-fach höher als der

IC₅₀-Wert von der Verbindung **26**, die in den Screening-Studien die beste Aktivität und Affinität bezüglich SARS-CoV-2-Mac1 zeigte. Auch im Vergleich zum nativen Substrat **25** selbst zeigt das Tetrahydrofurfuryl-Derivat **12** eine 22-fach schlechtere inhibitorische Aktivität.

6.1.2 Darstellung von β -Ethyl-Adenosindiphosphat **27**

Da sich in den Experimenten zur Untersuchung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration von Tetrahydrofurfuryl-Adenosindiphosphat **12** herausstellte, dass diese Verbindung **12** kein Inhibitor für die virale Mac1 darstellt, sollte eine weitere Minimierung des terminalen Riboseteils in Betracht gezogen werden. Hierbei sollte ein Ethylrest an die β -Phosphatgruppe gebunden werden, sodass β -Ethyl-Adenosindiphosphat **27** erhalten wurde. Diese Verbindung ist strukturell sehr ähnlich zu β -Methyl-ADP **26** und weist lediglich eine Methylenruppe mehr auf. Außerdem ist sie kleiner als THF-ADP **12** und ADPR **25**, da der terminale Riboseteil komplett fehlt (Abbildung 40).

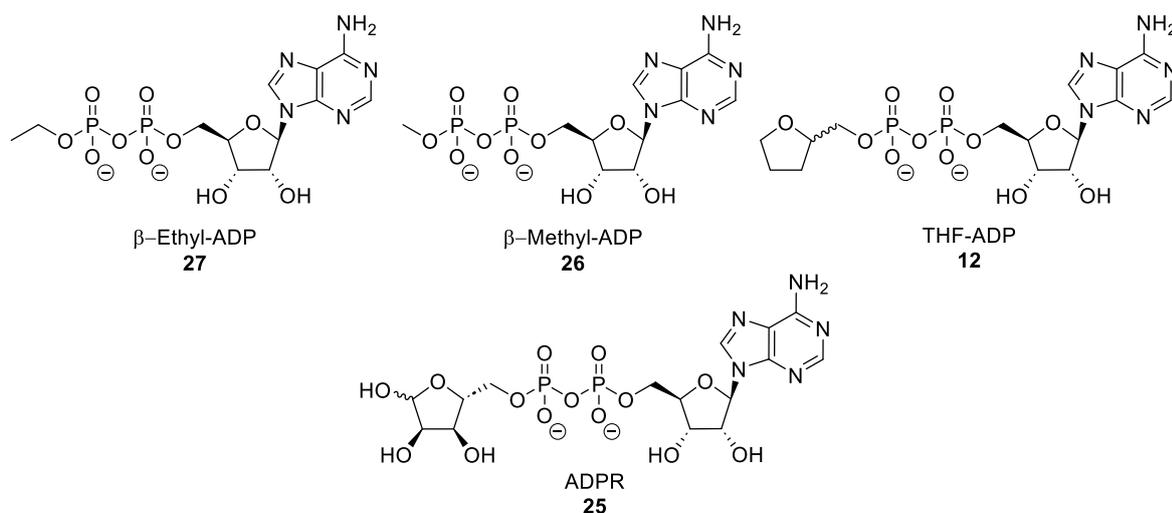


Abbildung 40: Strukturformeln der Verbindungen β -Ethyl-Adenosindiphosphat **27**, β -Methyl-ADP **26**, THF-ADP **12** und ADPR **25**

Die Synthese von β -Ethyl-ADP **27** sollte analog zur erfolgreichen Synthese von THF-ADP **12** erfolgen. Die Phosphorylierung sollte dementsprechend wieder über ein Phosphoramidit und eine anschließende Oxidation erfolgen. Die Reaktionsbedingungen zur Darstellung des Phosphats **28** sind in Abbildung 41 dargestellt.^[139,145]

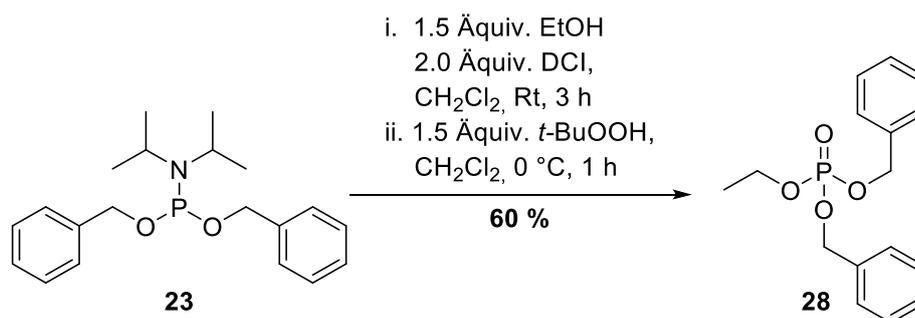


Abbildung 41: Reaktionsbedingungen zur Synthese des Phosphats **28** über eine Phosphorylierung mit Dibenzyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **23** und *tert*-Butylhydroperoxid.^[139]

In dieser Reaktion wurde anstatt des Alkohols das Phosphoramidit **23** als Unterschusskomponente eingesetzt, da für die Synthese des Phosphats **28** Ethanol als Alkohol eingesetzt wurde. Das Phosphoramidit **23** und Ethanol sind beide kommerziell erhältlich, wobei Ethanol kostengünstiger erworben werden kann der Reaktionspartner **23**.

Nach einer einstündigen Oxidation mit *t*-BuOOH wurde das Rohprodukt zweifach säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt und das Produkt **28** in einer Ausbeute von 60 % isoliert. Dabei wurde die erste säulenchromatographische Reinigung in Dichlormethan/Methanol durchgeführt, um zunächst das überschüssige DCI abzutrennen. Anschließend wurde für die Isolation des Produktes **28** Petrolether/Ethylacetat als mobile Phase verwendet.

In einem nächsten Reaktionsschritt wurden die Benzylschutzgruppen mittels Hydrogenolyse gespalten. Diese Reaktion erfolgte analog zur Synthese von Verbindung **22** (vgl. Abbildung 33) und die Reaktionsbedingungen sind in Abbildung 42 dargestellt.^[148]

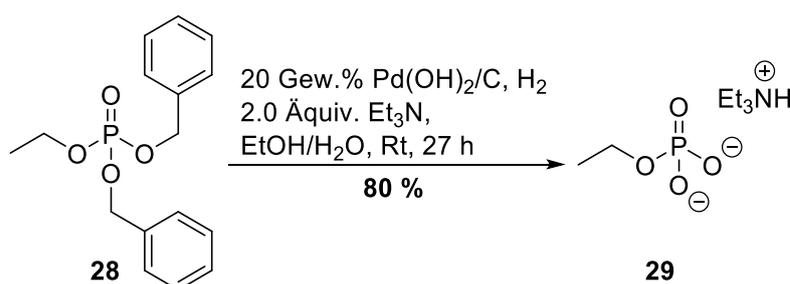


Abbildung 42: Reaktionsbedingungen zur hydrogenolytischen Spaltung der Benzylgruppen zur Darstellung des Produktes **29**.^[148]

Nach Rühren für 27 Stunden und Entfernen aller Reagenzien und Spaltprodukte mittels Filtration und Evaporation konnte das Produkt **29** als Triethylammoniumsalz in einer Ausbeute von 80 % erhalten werden.

Die erfolgreiche Synthese des Phosphats **29** wurde mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie bestätigt. Es konnte lediglich ein Phosphorsignal mit einer für Monophosphate typischen chemischen Verschiebung von -0.08 ppm detektiert werden (Abbildung 43, oben). Zusätzlich konnte die vollständige Spaltung der Benzylschutzgruppen anhand des ^1H -NMR-Spektrums festgestellt werden, da keine Protonensignale mit einer chemischen Verschiebung im Aromatenbereich detektiert wurden (Abbildung 43, unten). Es wurden außer der Produktsignale sowie der Triethylammonium-Gegenion-Signale keine weiteren Protonensignale beobachtet.

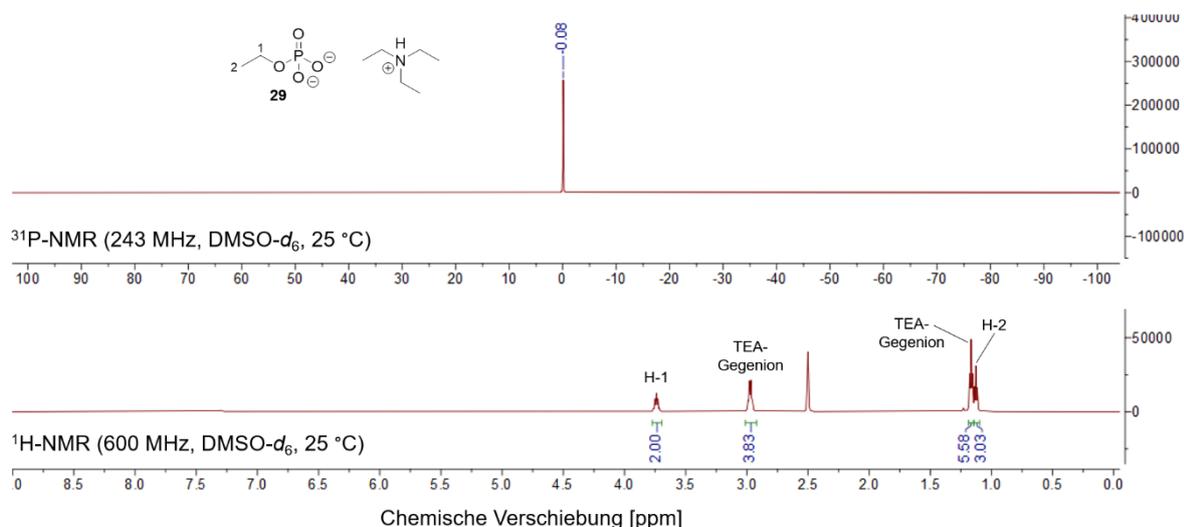


Abbildung 43: Oben: ^{31}P -NMR-Spektrum des Phosphats **29**, aufgenommen in DMSO- d_6 und 243 MHz. Unten: ^1H -NMR-Spektrum des Phosphats **29**, aufgenommen in DMSO- d_6 und 600 MHz.

In einem letzten Syntheseschritt sollte die Kupplungsreaktion zur Darstellung des Diphosphats **27** erfolgen. Die Reaktionsbedingungen dieser Kupplungsreaktion sind in Abbildung 44 dargestellt.^[131,132]

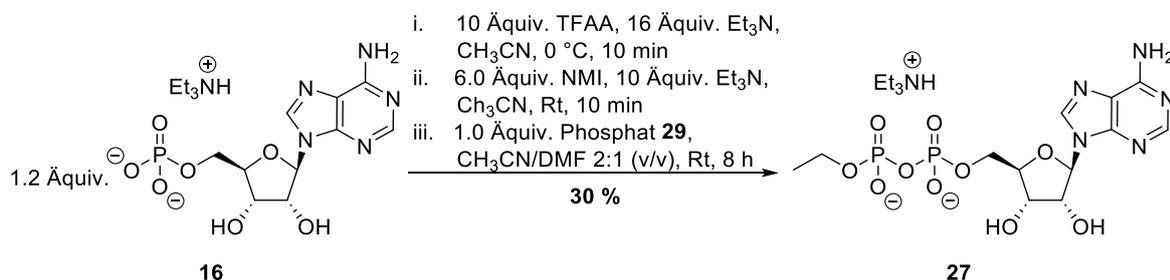


Abbildung 44: Reaktionsbedingungen zur Synthese der Diphosphatverbindung **27** über eine Imidazolidat-vermittelte Aktivierung von AMP **16** und eine anschließende Kupplung an Ethylphosphat **29**.^[131,132]

Nach mehrfacher säulenchromatographischer Reinigung an RP-18-Kieselgel konnte das Produkt **27** in einer Ausbeute von 30 % erhalten werden. Bei der Kupplungsreaktion zur Darstellung von THF-ADP **12** wurde bereits vermutet, dass sich das Monophosphat,

welches nicht mittels TFAA und NMI aktiviert wurde nur teilweise in Acetonitril löste. Deshalb wurde bei dieser Reaktion das Phosphat **29** in einem 2:1-Gemisch aus Acetonitril und DMF gelöst. Die Zugabe des Dimethylformamids führte tatsächlich zu einer Ausbeutesteigerung von 10 %. Die erfolgreiche Synthese des Diphosphats **27** wurde mittels ^{31}P -NMR- und ^1H -NMR-Spektroskopie bestätigt. Im ^{31}P -NMR-Spektrum wurden die beiden charakteristischen Dublettsignale für die beiden Phosphatgruppen beobachtet (Abbildung 45, oben). Auch im ^1H -NMR-Spektrum konnten außer der Protonensignale für das Produkt **27** und die Gegenionen keine weiteren Signale detektiert werden, was für eine Isolation des Diphosphats **27** sprach (Abbildung 45, unten).

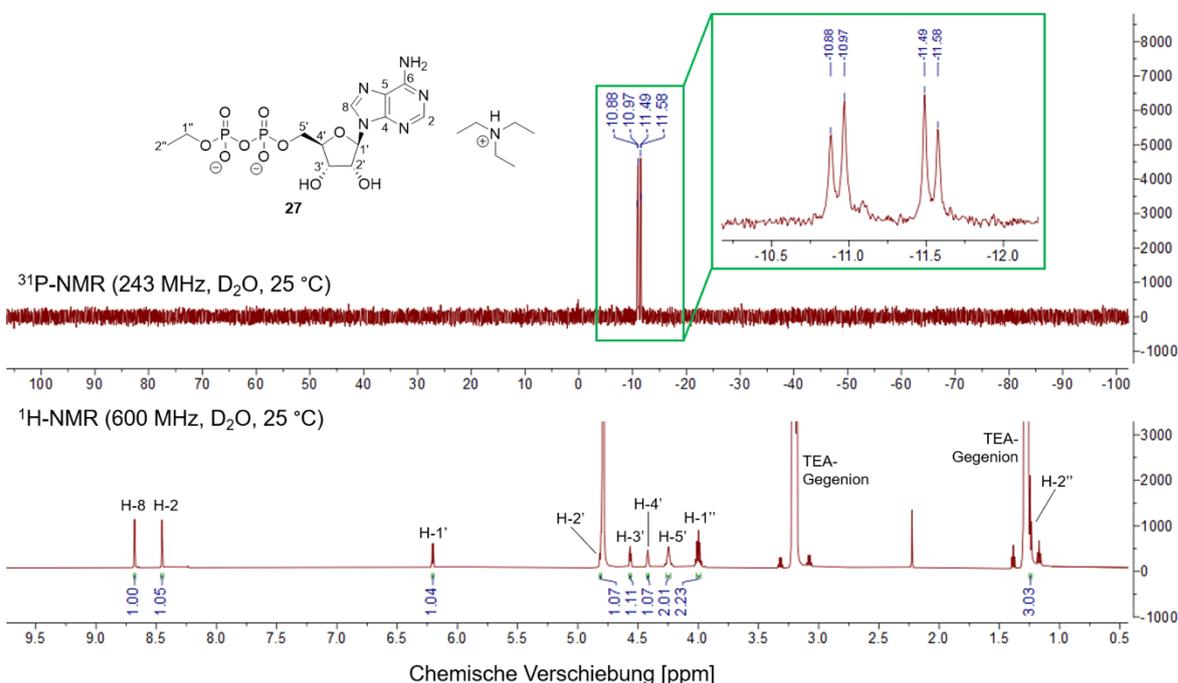


Abbildung 45: Oben: ^{31}P -NMR-Spektrum des Kupplungsproduktes **27**, aufgenommen in D_2O und 243 MHz. Das charakteristische Diphosphatsignal wurde in grün hervorgehoben. Unten: ^1H -NMR-Spektrum des Kupplungsproduktes **27**, aufgenommen in D_2O und 600 MHz.

6.1.2.1 Testung der inhibitorischen Aktivität von β -Ethyl-Adenosindiphosphat **27**

Das synthetisierte β -Ethyl-ADP **27** sollte ebenfalls auf die inhibitorische Aktivität gegen die virale Macrodomäne Mac1 getestet werden.

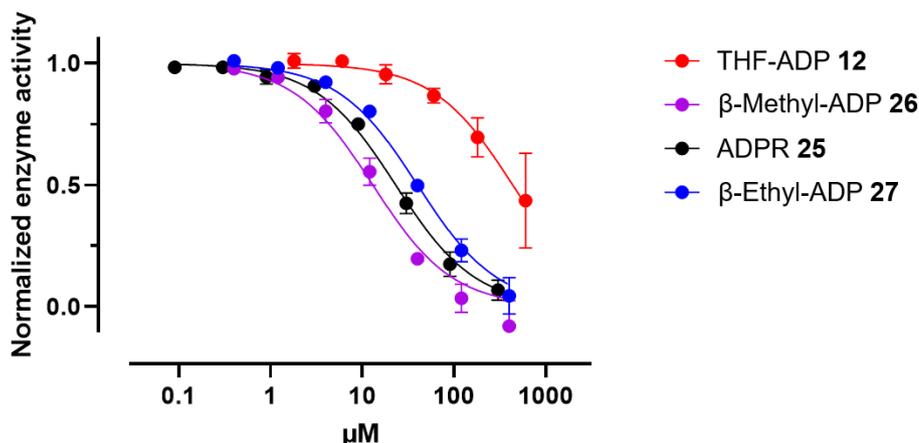


Abbildung 46: Graphen der inhibitorischen Aktivität gegen die isolierte SARS-CoV-2-Mac1 von THF-ADP **12** (rot), β-Methyl-ADP **26** (lila), ADPR **25** (schwarz) und β-Ethyl-ADP **27** (blau). Die Werte wurden in Kooperation mit SANDMANN am UKE (Projekt A18, SFB 1328) vermessen.

Die Minimierung ausgehend von einem Tetrahydrofurfuryl- zu einem Ethylrest im Bereich der terminalen Ribose bzw. an der β-Phosphatgruppe führte dazu, dass das Ethyl-Derivat **27** einen IC_{50} -Wert von $40 \pm 6 \mu\text{M}$ aufwies. Somit ist es im Vergleich zum THF-ADP **12** ein 14-fach besserer Inhibitor. Allerdings ist die inhibitorische Aktivität von Verbindung **27** noch immer schlechter als der IC_{50} -Wert von ADPR **25** und dreifach schlechter als das Methyl-Derivat **26** (Abbildung 46).

6.1.3 Darstellung von β-Methyl-GS441524-Diphosphat **30**

Es stellte sich heraus, dass THF-ADP **12** kein Inhibitor und β-Ethyl-ADP **27** nur ein schlechter Inhibitor für die Macrodomäne Mac1 von SARS-CoV-2 darstellt. Aus diesem Grund sollten andere potentielle Inhibitorstrukturen synthetisiert werden. Allerdings ist eine weitere Minimierung des Ethylrestes von β-Ethyl-ADP **27** bzw. des Methylrestes von β-Methyl-ADP **26** nicht vorteilhaft, denn bei Experimenten zur Bestimmung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration von ADP **14** wurde ein Wert im millimolaren Bereich festgestellt.^[99] Aufgrund dessen sollte eine Modifikation von anderen Strukturbausteinen des ADPRs **25** erfolgen. In Kapitel 4.4.1.2 wurde gezeigt, dass die Modifikation beider Phosphatgruppen nur einen kleinen Spielraum bietet und die meisten eingeführten Verbindungen mit Modifikationen an der Pyrophosphateinheit keine Inhibitoren für SARS-CoV-2-Mac1 darstellen (vgl. Abbildung 13).

Deshalb sollten in einem nächsten Schritt Verbindungen hergestellt werden, die Modifikationen an der Nucleobase aufweisen. Ni *et al.* konnten zeigen, dass das Remdesivir-Nucleosid GS-441524 **4** im aktiven Zentrum von Mac1 bindet und somit ein potentieller Strukturbaustein für die Synthese von potentiellen Mac1-Inhibitoren darstellt.^[94]

Diese Annahme konnte durch RIJPKEMA *et al.* bestätigt werden, da sie die ersten ADPR-Analoga mit dem Remdesivir-Nucleosid **4** als Nucleobase publizierten. Diese Analoga zeigten IC₅₀-Werte im nanomolaren Bereich (vgl. Kapitel 4.4.1.1).^[95]

In Arbeiten von SANDMANN wurde das Remdesivir-Nucleosid **4** und das entsprechende Mono- **31** und Diphosphat **32** bezüglich der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration gegen SARS-CoV-2-Mac1 getestet. Es stellte sich heraus, dass mit jeder zusätzlichen Phosphatgruppe die inhibitorische Aktivität der Remdesivir-Derivate stieg. Beispielsweise zeigt das Nucleosid **4** einen IC₅₀-Wert von 73 ± 3 µM und das entsprechende Monophosphat **31** einen IC₅₀-Wert von 44 ± 3 µM und sind somit 140-fach potenter als Adenosin **33** bzw. 230-fach potenter als AMP **16**, die die entsprechenden Nucleosid-Gegenstücke zu **4** und **31** darstellen. Mit einem IC₅₀ von 26 ± 2 µM ist Remdesivir-Diphosphat **32** genauso potent wie ADPR **25** (24 ± 5 µM, Abbildung 47).^[99]

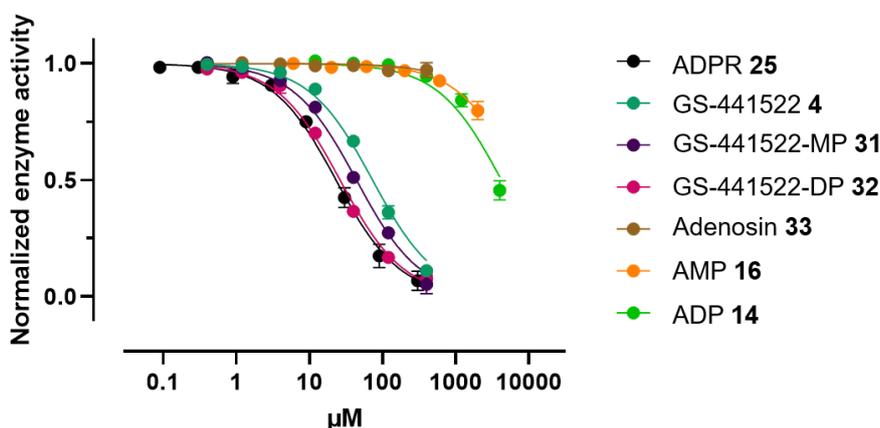


Abbildung 47: Graphen der inhibitorischen Aktivität gegen die isolierte SARS-CoV-2-Mac1 von den entsprechenden Adenosin- und GS-441524-Derivaten. Die Werte wurden in Kooperation mit SANDMANN am UKE (Projekt A18, SFB 1328) vermessen.

Mit diesen Erkenntnissen und dem Wissen, dass das Einführen eines Methylrests an der β-Phosphatgruppe zu einer besseren inhibitorischen Aktivität führte, sollte das in Abbildung **48** gezeigte Molekül **30** synthetisiert werden.

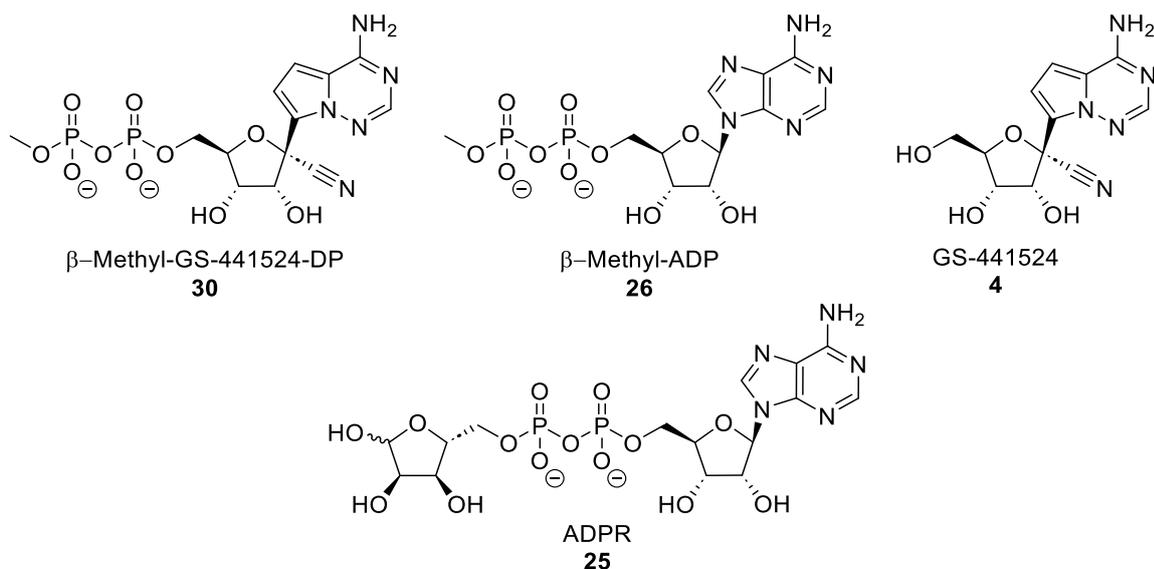


Abbildung 48: Strukturformeln der Verbindungen β -Methyl-GS-441524diphosphat **30**, β -Methyl-ADP **26**, GS-441524 **4** und ADPR **25**.

Die neue Inhibitorstruktur **30**, die synthetisiert werden soll, weist bezüglich der anfänglichen Leitstruktur ADPR **25** eine Kombination an unterschiedlichen Modifikationen auf. Zum einen wurde Adenosin **33** mit dem 1'-Nitril-substituierten 9-Deaza-Adenosin-Analogon (GS-441524) ersetzt. Außerdem fehlt die terminale Ribose komplett und es sollte wie bei dem Diphosphat **26** ein Methylrest an die β -Phosphatgruppe gebunden werden. Diese Verbindung **30** ist aus struktureller Sicht durch die Vielzahl an Modifikationen kein ADPR-Derivat, sondern vielmehr ein Remdesivir-Analogon.

Die Synthese des Diphosphats **30** sollte über die bereits bekannte Syntheseroute erfolgen (vgl. Abbildung 30). In einem letzten Schritt sollte das Diphosphat **30** über eine Kupplungsreaktion zwischen dem Phosphat **34** und dem Monophosphat **31** realisiert werden. Das Monophosphat **31** sollte über eine Phosphorylierungsreaktion ausgehend vom kommerziell erhältlichen Nucleosid **4** dargestellt werden. Das Phosphat **34** sollte zunächst über eine Spaltung der Benzylgruppen des geschützten Phosphats **35** synthetisiert werden. Dieses benzylierte Phosphat **35** sollte vorher über eine Phosphorylierung ausgehend vom kommerziell erhältlichen Dibenzyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **23** erfolgen (Abbildung **49**).

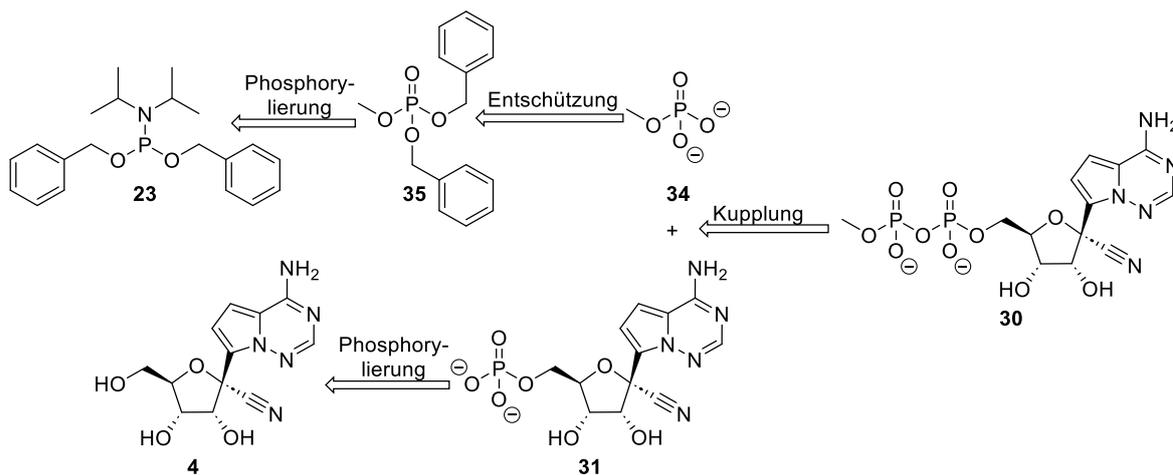


Abbildung 49: Retrosynthetisches Schema zur Darstellung des Diphosphats **30** ausgehend vom kommerziell erhältlichen Dibenzyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **23** und GS-441524 **4**.

Die Synthese des Phosphats **34** erfolgte über die in Abbildung 50 dargestellten Reaktionsbedingungen.^[139,145,148]

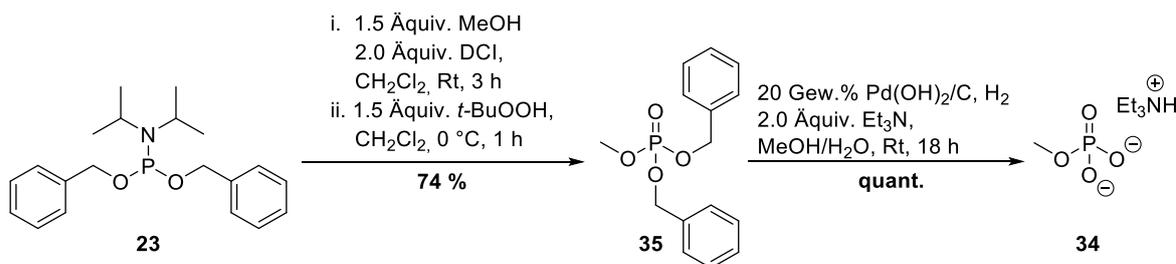


Abbildung 50: Reaktionsbedingungen zur Synthese des Phosphats **35** über eine Phosphorylierung mit Dibenzyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **23** und *tert*-Butylhydroperoxid sowie Reaktionsbedingungen zur hydrogenolytischen Spaltung der Benzylgruppen zur Darstellung des Produktes **34**.^[139,148]

Die Synthese und Reinigung des Produktes **34** erfolgte analog zu den Synthesen der bereits dargestellten Phosphate **18** und **29**. Das Produkt **34** konnte erfolgreich in einer Ausbeute von 74 % über zwei Stufen dargestellt werden. Um in einem nächsten Syntheseschritt mit der Kupplungsreaktion fortzufahren, muss zunächst das GS-441524-Monophosphat **31** hergestellt werden. Die Synthese des Monophosphats **31** erfolgte über eine YOSHIKAWA-Reaktion. Die entsprechenden Reaktionsbedingungen sind in Abbildung **51** dargestellt.^[135]

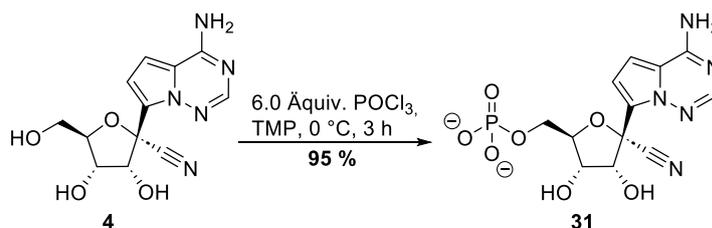


Abbildung 51: Phosphorylierung des Nucleosids GS-441524 **4** mit Phosphorylchlorid.^[135]

Wie bereits in Kapitel 6.1.1 beschrieben, kann die Selektivität gegenüber der 5'-Phosphorylierung erhöht werden, wenn entweder geringe Mengen an Wasser eingesetzt werden und saure Reaktionsbedingungen vorliegen oder mit einem Basenzusatz gearbeitet wird.^[136,137] Allerdings wurde in einem ersten Versuch die Phosphorylierung nach YOSHIKAWA ohne Wasser- oder Basenzusatz erprobt, da dies ebenfalls in vorangegangenen Arbeiten zur erfolgreichen Phosphorylierung von Nucleosiden führte.^[131,143] Die Synthese des Monophosphats **31** war erfolgreich mit einer Ausbeute von 95 % und die Phosphorylierung wurde mittels ³¹P-NMR-Spektrum bestätigt (Abbildung 52). Es wurde lediglich ein Singulett bei 0.06 ppm für das Monophosphat **31** detektiert.

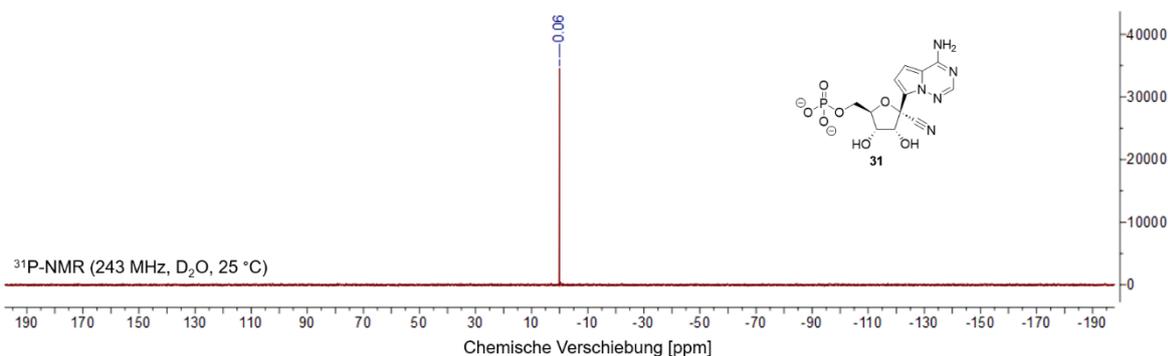


Abbildung 52: ³¹P-NMR-Spektrum des Monophosphats **31**, aufgenommen in D₂O und 243 MHz.

Allerdings konnte bei der Phosphorylierung des Nucleosids **4** nach YOSHIKAWA beobachtet werden, dass bei einer Vergrößerung des Reaktionsansatzes schlechtere Ausbeuten des Produkts **31** isoliert wurden. Bei einer Reaktion mit 0.34 mmol des Nucleosids **4** konnte die sehr gute Ausbeute von 95 % erhalten werden. Wurde aber die Menge des eingesetzten Edukts **4** auf 0.69 mmol verdoppelt, konnte lediglich eine Ausbeute von 55 % erreicht werden. Aufgrund dessen wurden die Phosphorylierung des Nucleosids **4** lediglich mit geringen Mengen des Eduktes **4** durchgeführt.

In einem letzten Reaktionsschritt wurde das Monophosphat **4** mit dem Phosphat **34** nach dem Protokoll von MOHAMADY *et al.* umgesetzt, um das Diphosphat **30** zu erhalten (Abbildung 53).^[131,132]

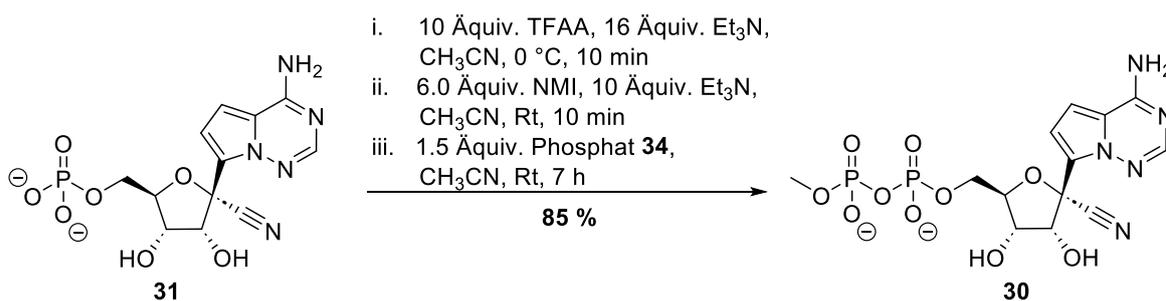


Abbildung 53: Reaktionsbedingungen zur Synthese der Diphosphatverbindung **30** über eine Imidazolidat-vermittelte Aktivierung von GS-441524-MP **31** und eine anschließende Kupplung an Methylphosphat **34**.^[131,132]

Nach mehrfacher säulenchromatographischer Reinigung konnte das Produkt in einer guten Ausbeute von 85 % isoliert werden. Im Vergleich zu den vorangegangenen Kupplungsreaktionen (vgl. Abbildung 37 und Abbildung 44) wurde in dieser Reaktion das Monophosphat, welches mit NMI aktiviert wurde, als Unterschusskomponente eingesetzt, obwohl dieses lediglich über einen Syntheseschritt hergestellt wurde. Das liegt daran, weil bereits das Remdesivir-Nucleosid **4** sehr teuer ist und somit der Einsatz als Unterschusskomponente die kostengünstigere Variante darstellt.

Die erfolgreiche Darstellung des Produktes **30** wurde auch hier mittels NMR-Spektroskopie bestätigt. Das ³¹P-NMR-Spektrum (Abbildung 54, oben) als auch das ¹H-NMR-Spektrum (Abbildung 54, unten) zeigten lediglich Signale des Diphosphats **30**, was eine Isolation dieser Verbindung **30** belegte.

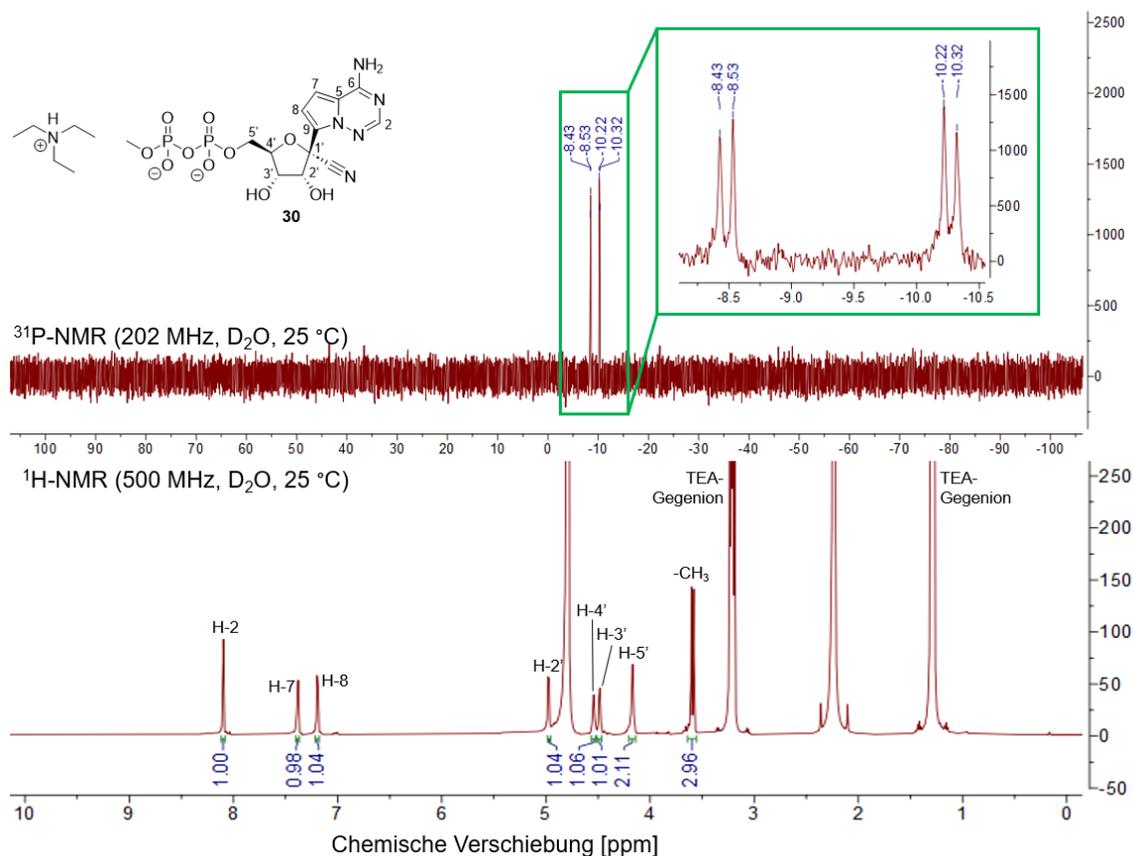


Abbildung 54: Oben: ³¹P-NMR-Spektrum des Kupplungsproduktes **30**, aufgenommen in D₂O und 202 MHz. Das charakteristische Diphosphat signal wurde in grün hervorgehoben. Unten: ¹H-NMR-Spektrum des Kupplungsproduktes **30**, aufgenommen in D₂O und 500 MHz

6.1.3.1 Testung der inhibitorischen Aktivität von β -Methyl-GS441524-Diphosphat **30** gegen die virale Macrodomäne Mac1

Das synthetisierte β -Methyl-GS441524-DP **30** wurde ebenfalls auf die inhibitorische Aktivität gegen die virale Macrodomäne Mac1 getestet (Abbildung 55). Diese Inhibitorstruktur weist im Vergleich zum Substrat **25** keine terminale Ribose auf. Außerdem wurde eine Methylgruppe in die β -Phosphatgruppe eingeführt und das Nucleosid Adenosin **33** mit dem Remdesivir-Nucleosid **4** ausgetauscht. Dieses Derivat **30** weist einen IC₅₀ von $0.32 \pm 0.05 \mu\text{M}$ auf und ist somit die bislang potenteste Verbindung für die Inhibition der viralen Macrodomäne.^[99] Die Verbindung **30** zeigt eine 40-fach bessere inhibitorische Aktivität als das entsprechende methylierte Adenosin-Derivat **26** und sogar eine 75-fach bessere als ADPR **25** selbst.

Zudem wurde das Molekül **30** zusätzlich auf die Bindungsaffinität getestet. Mit einem K_D von $0.17 \pm 0.01 \mu\text{M}$ weist das Diphosphat **30** eine hohe Bindungsaffinität im hohen nanomolaren Bereich auf, was diese Verbindung **30** zu einem potentiellen kompetitiven Inhibitor gegen die Enzymaktivität von Mac1 macht.

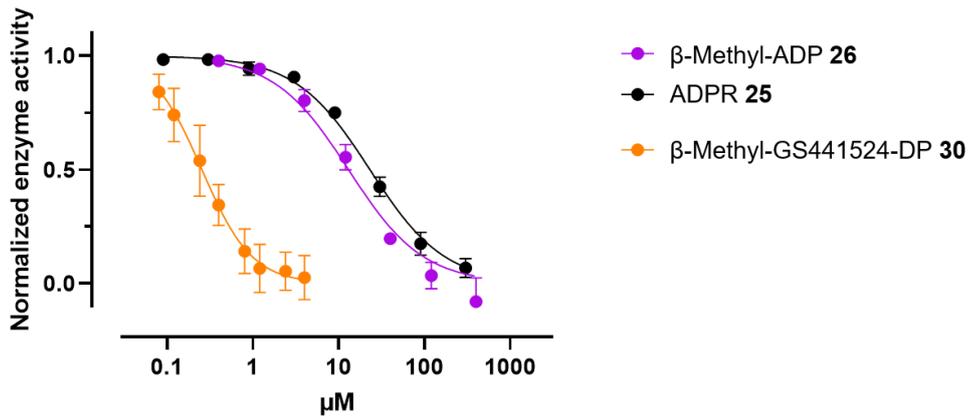


Abbildung 55: Graphen der inhibitorischen Aktivität gegen die isolierte SARS-CoV-2-Mac1 von β -Methyl-ADP 26 (lila), ADPR 25 (schwarz) und β -Methyl-GS441524-DP 30 (orange). Die Werte wurden in Kooperation mit SANDMANN am UKE (Projekt A18, SFB 1328) vermessen.

6.1.3.2 Testung der inhibitorischen Aktivität von β -Methyl-GS441524-Diphosphat 30 gegen die humanen Macrodomänen MacroD1 und MacroD2

Neben der Testung des potentiellen Inhibitors 30 gegen die virale Mac1 sollte überprüft werden, ob die Verbindung 30 auch an die humanen Macrodomänen MacroD1 und MacroD2 bindet und diese inhibiert. Anhand des Graphen in Abbildung 56 wird ersichtlich, dass es zu keiner signifikanten Inhibition der humanen Macrodomänen durch β -Methyl-GS441524-DP 30 kommt. Während die virale Mac1 bei Konzentrationen von $>10 \mu\text{M}$ der Verbindung 30 bereits vollständig inhibiert wird.

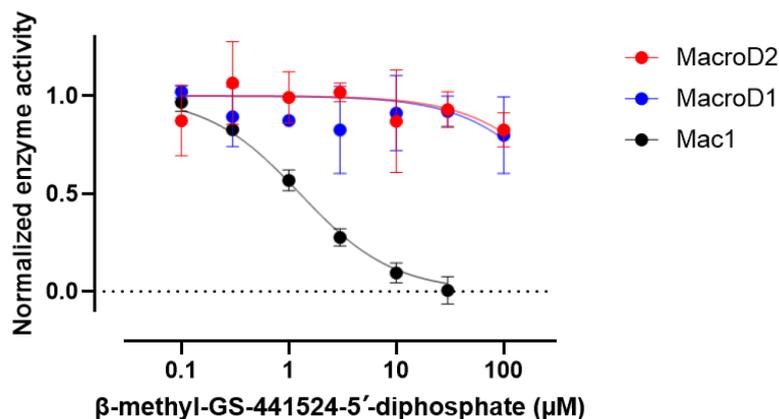


Abbildung 56: Testung der inhibitorischen Aktivität von β -Methyl-GS441524-DP 30 gegen die humanen Macrodomänen MacroD1 (blau) und MacroD2 (rot) und gegen die virale Macrodomäne Mac1 (schwarz). Die Werte wurden in Kooperation mit SANDMANN am UKE (Projekt A18, SFB 1328) vermessen.

Zusätzlich wurde die inhibitorische Aktivität gegen die humanen Macrodomänen von Verbindung **30** und ADPR **25** verglichen. Während das Diphosphat **30** bei einer Konzentration von >300 μM noch immer keine Inhibition von MacroD1 und MacroD2 zeigte, inhibierte ADPR **25** die humanen Macrodomänen bei dieser Konzentration nahezu vollständig. Dies lässt darauf schließen, dass die Verbindung **30** nicht nur ein potenter, sondern auch ein selektiver Inhibitor gegen die virale Macrodomäne darstellt (Abbildung 57).

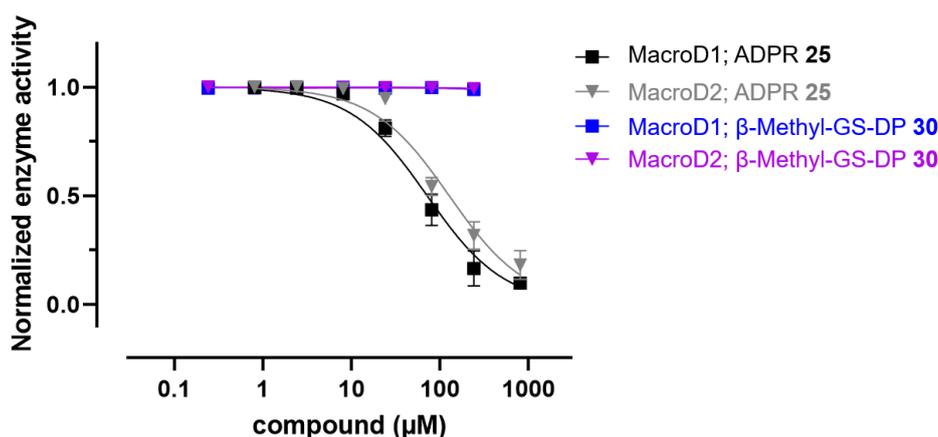


Abbildung 57: Vergleich der inhibitorischen Aktivität von ADPR **25** (schwarz und grau) und β -Methyl-GS441524-DP **30** (blau und lila) gegen die humanen Macrodomänen MacroD1 und MacroD2. Die Werte wurden in Kooperation mit SANDMANN am UKE (Projekt A18, SFB 1328) vermessen.

6.1.4 AB-Maskierung von β -Methyl-GS441524-Diphosphat **30**

Das Diphosphat **30** weist mit einem IC_{50} von $0.32 \pm 0.05 \mu\text{M}$ und einem K_D von $0.17 \pm 0.01 \mu\text{M}$ die bislang vielversprechendsten pharmakologischen Eigenschaften für einen kompetitiven Inhibitor gegen die virale Macrodomäne auf. Für weitergehende zellbasierte und *in vivo*-Tests ist die Synthese eines membrangängigen Prodrugs notwendig. Hierbei sollte auf das DiPPro-Konzept zurückgegriffen werden, bei dem Acyloxybenzylgruppen als Maskierungseinheit verwendet werden, welche enzymatisch mittels Esterasen oder Lipasen gespalten werden können.^[115] Für die Permeabilität der Prodrugs musste eine ausreichende Lipophilie der Verbindungen gewährleistet sein. Diese Lipophilie kann mittels der Kettenlänge des Alkylrestes gesteuert werden. RUTHENBECK und SCHNEIDER synthetisierten membranpermeable ADPR-Derivate, indem diese mit einer AB-Gruppe mit einer Acylkettenlänge von 8 Kohlenstoffatomen versehen wurden, der sogenannten C7-AB-Maske. Ferner wiesen einige dieser Moleküle eine photolabile Schutzgruppe auf, die je nach Wahl der Photomaske vermutlich zu einer minimalen Erhöhung der Lipophilie beitragen konnte.^[151,152] Anlehnend an diese Ergebnisse sollte das Diphosphat **30** an der

In einem ersten Schritt wurde die Acyloxybenzylmaske **40** synthetisiert. Die Synthesestrategie sowie die Reaktionsbedingungen zur Darstellung verschiedenster Acyloxybenzylmasken sind in der Gruppe um MEIER etabliert und wurden in einer Reihe von Arbeiten und Publikationen bereits detailliert erläutert.^[123,126,128,153–156]

Die Synthese der C11-AB-Maske **40** wurde ausgehend von den beiden kommerziell erhältlichen Edukten 4-Hydroxybenzylalkohol und dem entsprechenden Carbonsäurechlorid, Dodecansäureschlorid, durchgeführt. Die Darstellung war mit einer Ausbeute von 61 % erfolgreich und war vergleichbar zu den Ausbeuten in der Literatur.^[131,156]

Um nun in einem nächsten Schritt eine Phosphorspezies mit einer verknüpften AB-Maske zu erhalten, können unterschiedliche Routen zur Darstellung ausgewählt werden. In einem ersten Versuch sollte die Phosphoramiditroute angewendet werden, indem ein asymmetrisches Phosphoramidit synthetisiert wurde. Hierbei wurde zunächst die AB-Gruppe **40** mit Bis(diisopropyl)chlorphosphin **39** zum Phosphoramidit **38** umgesetzt. Die entsprechenden Reaktionsbedingungen sind in Abbildung 59 dargestellt.^[157]

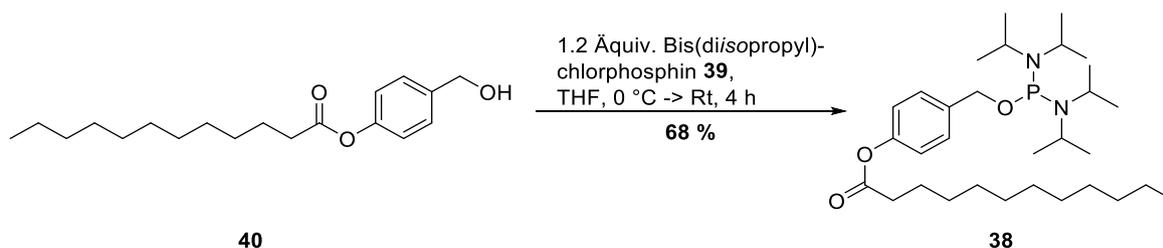


Abbildung 59: Reaktionsbedingungen zur Synthese des Phosphoramidits **38** ausgehend von 4-(Hydroxymethyl)phenyldodecanoat **40** und Bis(diisopropyl)chlorphosphin **39**.^[157]

Bei der Reinigung des Produktes ist darauf zu achten, dass Phosphoramidite säurelabil sind und sich dementsprechend bei einer Reinigung an der sauren stationären Phase des Kieselgels zersetzen.^[158] Aus diesem Grund wurde mit einem Zusatz von Triethylamin säulenchromatographisch gereinigt, um ein basisches Milieu zu erzielen. Nach der Reinigung konnte das Amidit **38** mit einer Ausbeute von 68 % isoliert werden. Zusätzlich konnte die Bildung einer geringen Menge eines Amidits mit zwei gebundenen C11-AB-Masken **40** beobachtet werden.

In einem nächsten Schritt sollte ein Methylrest in das Molekül **38** eingeführt werden, um ein asymmetrisches Phosphoramidit für die darauffolgende Kupplungsreaktion mit Rem-MP **31** zu erhalten. Die folgende Reaktion erfolgte Aktivator-vermittelt mit DCI. Die entsprechenden Reaktionsbedingungen sind in Abbildung 60 dargestellt.^[157]

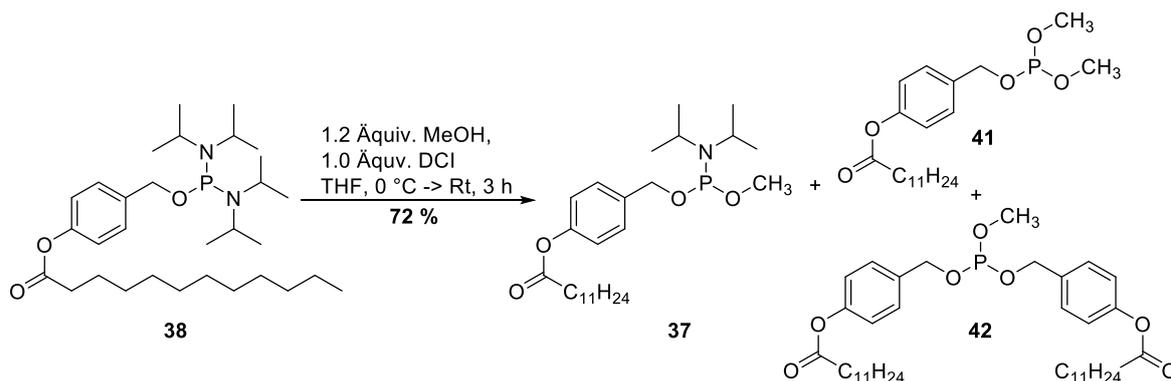


Abbildung 60: Reaktionsbedingungen zur Synthese des Phosphoramidits **37** mittels des Aktivators DCI.^[157] Es wurden neben dem gewünschten Produkt die Phosphoramidite **41** und **42** als Nebenprodukte erhalten.

Bei der Reinigung von Phosphoramiditen wurde bereits beschrieben, dass mit einem Zusatz von Triethylamin gearbeitet werden musste, um eine Zersetzung des Amidits zu einem Phosphoramidat zu verhindern. Zusätzlich musste ebenfalls darauf geachtet werden, dass die Retentionsfaktoren der Produkte groß bzw. die Verweildauer auf der stationären Phase möglichst gering waren, um die Phosphorverbindungen in der Oxidationsstufe +III zu behalten. Allerdings konnte so bei einer säulenchromatographischen Reinigung keine Trennung der unterschiedlichen Amidite **37**, **41** und **42** gewährleistet werden. Neben der Isolation des gewünschten Produktes **37** war ebenfalls die Bildung der zweifach methylierten Phosphorspezies **41** zu beobachten. Ferner wurde in der vorherigen Reaktion (vgl. Abbildung 59) die Bildung der zweifach maskierten Phosphorverbindung festgestellt, welche in der nachfolgenden Reaktion zur Verbindung **42** umgesetzt wurde. Die Bildung der unterschiedlichen Phosphorverbindungen konnte anhand des ³¹P-NMR-Spektrums beobachtet werden (Abbildung 61). Es wurde davon ausgegangen, dass das Phosphorsignal mit der höchsten Intensität bei 140.69 ppm das gewünschte Produkt **37** repräsentiert. Zusätzlich waren Signale bei 140.16 ppm, 147.93 ppm und 148.69 ppm ersichtlich. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass das Signal bei 147.93 ppm der Phosphorverbindung **41** mit zwei Methylgruppen und einer Maskierungseinheit zugeordnet werden kann. Das Signal bei 148.69 ppm könnte die Verbindung **42** mit einem Methylrest und zwei AB-Masken darstellen.

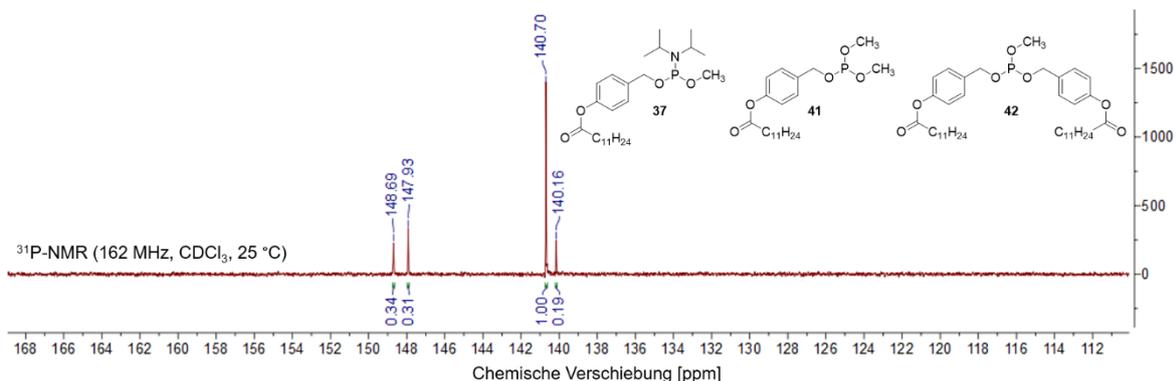


Abbildung 61: ³¹P-NMR-Spektrum der isolierten Fraktion nach der säulenchromatographischen Reinigung zur Darstellung des Phosphoramidits **37**, aufgenommen in CDCl₃ und 162 MHz.

Anhand der bestimmten Integrale in Abbildung 61 wurde festgestellt, dass das Verhältnis von Produkt zu den Nebenprodukten 1:0.84 betrug. Dies wies darauf hin, dass rund 40 % der isolierten Produktfraktion mit Nebenprodukten verunreinigt war. Bei einer nachfolgenden Kupplungsreaktion würde lediglich das Phosphoramidit **37** umgesetzt werden, da diese Phosphorspezies als einzige über eine Diisopropylamin-Gruppe verfügt. Allerdings wurde davon ausgegangen, dass die Ausbeute der Kupplungsreaktion gering sein würde, da fast die Hälfte des Phosphoramidits verunreinigt war. Aus diesem Grunde sollte eine alternative Reaktionsroute erprobt werden. Hierbei sollte auf die *H*-Phosphonat-Route zurückgegriffen werden.

H-Phosphonate sind Mono- und Diester der Phosphonsäure und liegen in Lösung in einem Gleichgewicht aus zwei Tautomeren vor, einer tetrakoordinierten **43** und einer trikoordinierten Form **44** (Abbildung 62). Bei beiden Verbindungen handelt es sich um eine Phosphor-III-Spezies, allerdings unterscheiden sie sich in ihrer Reaktivität. Bei dem trikoordinierten Phosphit **44** gibt es ein freies Elektronenpaar am Phosphorzentrum, weshalb solche Phosphorverbindungen gut mit unterschiedlichen Elektrophilen reagieren können. Bei den tetrakoordinierten Phosphonaten **43** liegt dieses freie Elektronenpaar nicht vor, weshalb sie weniger anfällig gegenüber Elektrophilen sind und somit stabiler und beständig gegen spontane Oxidationen sind. Das Gleichgewicht liegt hauptsächlich auf der Seite der *H*-Phosphonate **43**, die selbst bei Raumtemperatur stabil sind und über einen längeren Zeitraum gelagert werden können.^[159]

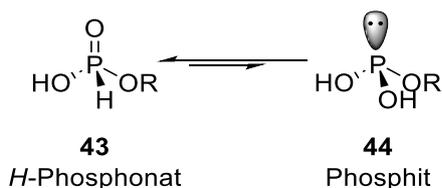


Abbildung 62: Das tautomere Gleichgewicht zwischen den beiden Phosphor-III-Spezies **43** und **44**.^[159]

In vorangegangenen Arbeiten wurden bereits eine Reihe an unterschiedlichen symmetrischen als auch asymmetrischen *H*-Phosphonaten erfolgreich hergestellt.^[131,142,155,157,160,161]

Die Retrosynthese zur Darstellung des gewünschten Diphosphats **36** über die *H*-Phosphonat-Route ist in Abbildung 63 dargestellt. Die Synthese des AB-maskierten Diphosphats **36** sollte in einem letzten Schritt über die Kupplung zwischen dem entsprechenden Monophosphat **31** und dem asymmetrischen *H*-Phosphonat **45** erfolgen. Das asymmetrische *H*-Phosphonat sollte in einem vorherigen Schritt ausgehend vom kommerziell erhältlichen Diphenylphosphonat (DPP) **46** synthetisiert werden. Das Endprodukt **36** der Reaktion wird als Stereoisomerengemisch isoliert, da an der β -Phosphatgruppe ein chirales Zentrum vorliegt. Diese Chiralität wurde durch das asymmetrische *H*-Phosphonat **45** eingeführt.

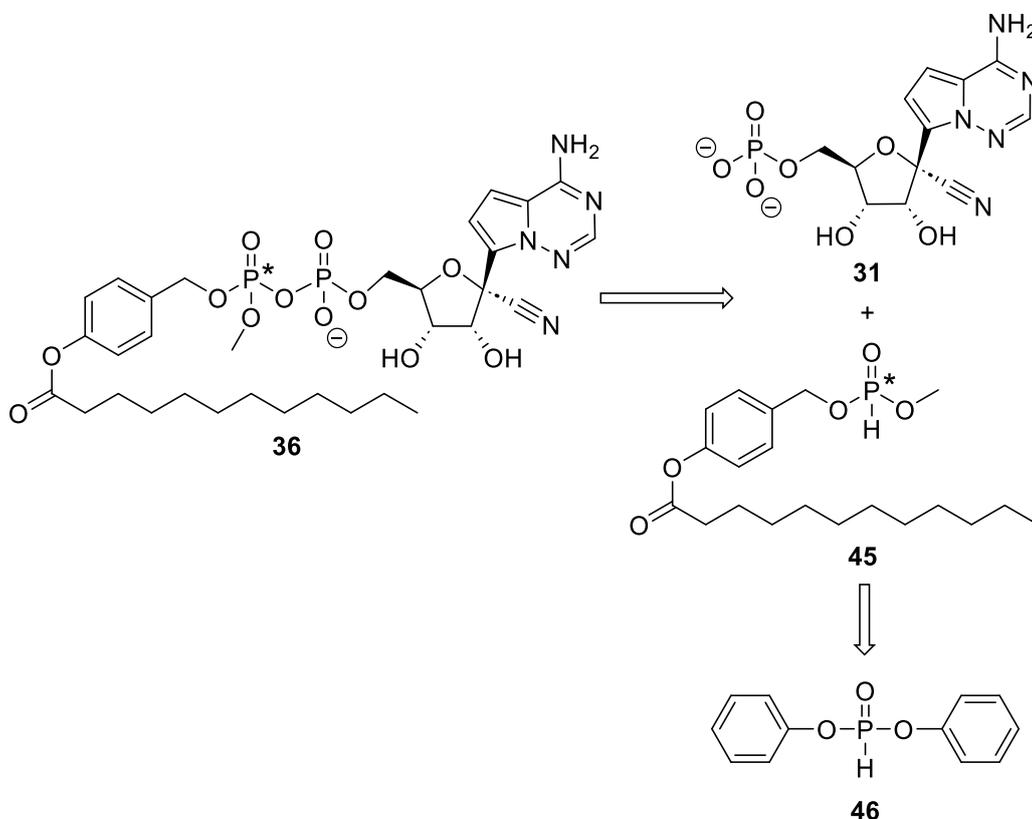


Abbildung 63: Retrosynthetisches Schema zur Darstellung des AB-maskierten Diphosphats **36** ausgehend vom kommerziell erhältlichen Diphenylphosphonat **46**.

Die Reaktionsbedingungen zur Synthese des asymmetrischen *H*-Phosphonats wurden in Abbildung 64 aufgeführt und erfolgten nach einer Vorschrift von ZHAO und JIA *et al.*^[162]

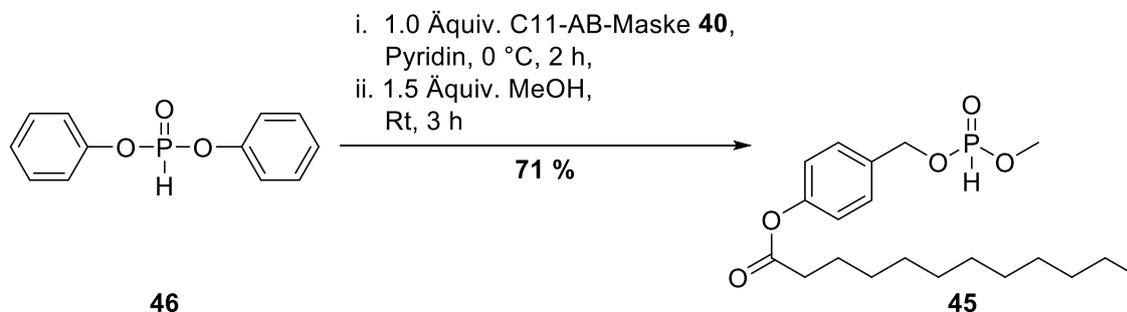


Abbildung 64: Reaktionsbedingungen zur Synthese des asymmetrischen *H*-Phosphonats **45**.^[162]

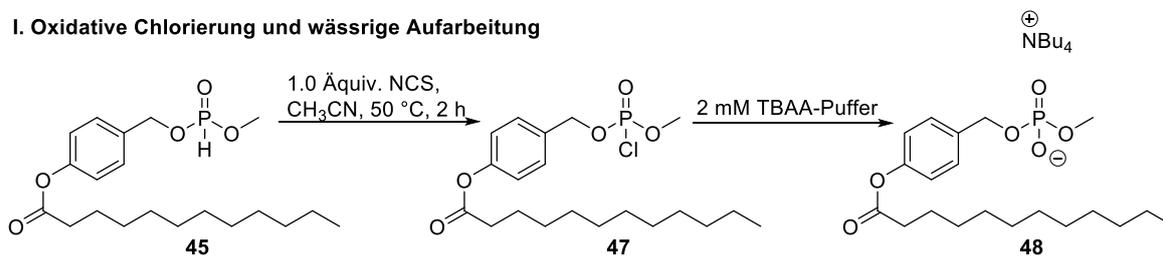
Zur Synthese des asymmetrischen *H*-Phosphonats **45** erfolgte die Zugabe der Alkohole schrittweise, um eine stufenweise Substitution des DPPs **46** zu erreichen. Hierbei wurde zunächst das Startmaterial **46** bei 0 °C mit lediglich 1.0 Äquiv. der AB-Maske **40** versetzt, um sicherzugehen, dass nur ein Phenolsubstituent mit einer Acyloxybenzylgruppe ersetzt wird. Daraufhin wurden 1.5 Äquiv. Methanol hinzugegeben, um den zweiten Phenolrest zu substituieren. Bei dieser Reaktion kann die Bildung vom symmetrischen *H*-Phosphonaten als ungewollte Nebenreaktion auftreten. Die Bildung dieser Verbindungen wurde allerdings nur in einer geringen Menge beobachtet und nicht isoliert. Das gewünschte asymmetrische *H*-Phosphonat **45** wurde in einer Ausbeute von 71 % erhalten.

Im nächsten Schritt sollte das asymmetrische *H*-Phosphonat **45** zum gewünschten Diphosphat **36** umgesetzt werden. Hierfür wurden Reaktionsbedingungen anlehnend an eine Vorschrift von GOLLNEST verwendet, die ursprünglich zur Synthese von TriPPP-Verbindungen etabliert und auf die eigenen Ansprüche angepasst wurde (Abbildung **65**).^[132,155]

Der erste Reaktionsschritt umfasst die oxidative Chlorierung des *H*-Phosphonats **45** zum Phosphorchloridat **47** mittels *N*-Chlorsuccinimid (NCS). Anschließend sollte dieses Phosphorchloridat **47** durch eine wässrige Aufarbeitung zum Phosphat **48** hydrolysiert werden. Hierfür wurde ein 2 mM Tetrabutylammoniumacetat-Puffer verwendet, um Tetrabutylammonium-Kationen als Gegenionen zum Phosphat **48** zu gewährleisten. Dies sollte eine ausreichende Nucleophilie sowie Löslichkeit des Phosphats **48** für den nachfolgenden Kupplungsschritt sicherstellen. Für die nachfolgende Kupplungsreaktion wurden das Monophosphat **31** als auch das frisch hergestellte Phosphat **48** über Nacht unter vermindertem Druck getrocknet. Die Synthese erfolgte über eine Imidazolidat-

vermittelte Aktivierung von Rem-MP **31** nach einer Vorschrift von MOHAMADY *et al.* mit einer Adaption der jeweils eingesetzten Stoffmengen nach Arbeiten von WITT.^[131,132]

I. Oxidative Chlorierung und wässrige Aufarbeitung



II. Imidazolidat-vermittelte Aktivierung und Kupplung

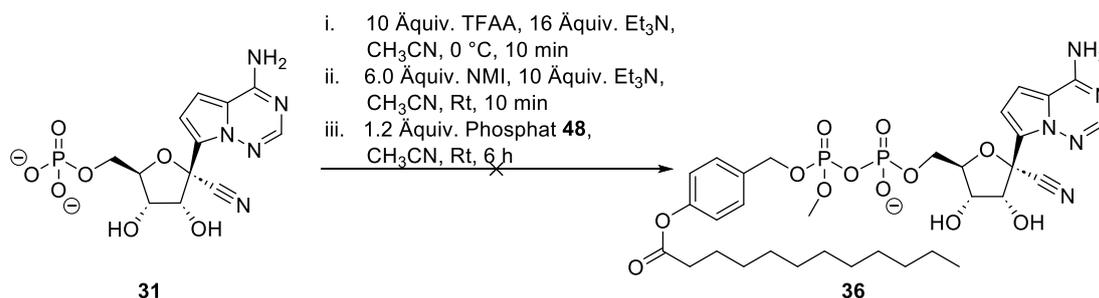


Abbildung 65: Reaktionsbedingungen des Syntheseversuchs zur Darstellung des AB-maskierten Diphosphats **36** über eine oxidative Chlorierung und Hydrolyse des *H*-Phosphonats **45** und anschließende Imidazolidat-vermittelte Kupplung mit dem GS-441524-Monophosphat **31**.^[132,155]

Nach säulenchromatographischer Reinigung an RP-18-Kieselgel konnte kein Produkt isoliert werden. Aufgrund dessen sollte die Synthese wiederholt werden, jedoch sollte im nachfolgenden Versuch die Bildung und Isolation des Phosphats **48** umgangen werden, indem das Phosphorchloridat **47** direkt als aktive Spezies eingesetzt und mit dem Monophosphat **31** umgesetzt wurde (Abbildung 66).^[162]

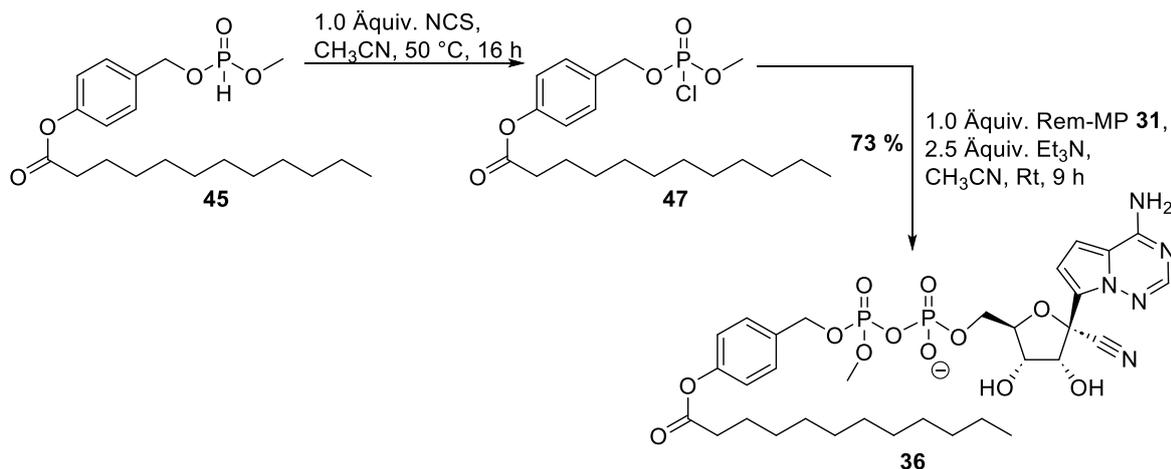


Abbildung 66: Reaktionsbedingungen zur Synthese des AB-maskierten Diphosphats **36** über eine oxidative Chlorierung des *H*-Phosphonats **45**.^[162]

Die Aktivierung des *H*-Phosphonats **45** über eine oxidative Chlorierung wurde bei 50 °C durchgeführt und der Reaktionsschritt zur Bildung des Phosphorchloridats **47** wurde für diese Reaktion NMR-spektroskopisch verfolgt. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass eine vollständige Umsetzung des *H*-Phosphonats **45** zum Phosphorchloridat **47** stattfand und somit lediglich die aktive Phosphorspezies für den nachfolgenden Kupplungsschritt vorlag. Die Reaktionsverfolgung der oxidativen Chlorierung erfolgte mittels ¹H-NMR-Spektroskopie (Abbildung 67). Es wurde ein ¹H-NMR-Spektrum nach drei Stunden Reaktionszeit (Abbildung 67, oben) und ein weiteres nach 16 Stunden Reaktionszeit aufgenommen (Abbildung 67, unten). Nach einer Reaktionszeit von drei Stunden war noch immer das charakteristische Dublett mit einer sehr großen Kopplungskonstante für ein *H*-Phosphonat ersichtlich. Nach Rühren über Nacht war dieses Dublett im ¹H-NMR-Spektrum nicht mehr vorhanden, was ein Indiz dafür war, dass das *H*-Phosphonat **45** über Nacht vollständig zum Phosphorchloridat **47** umgesetzt wurde. Anhand dieser Reaktionsverfolgung wurde außerdem ersichtlich, weshalb die vorherige Reaktion (vgl. Abbildung 65) nicht zur Isolation des gewünschten AB-maskierten Diphosphats **36** führte, sondern mittels ³¹P-NMR-Spektroskopie lediglich das Vorhandensein von Monophosphat identifiziert wurde.

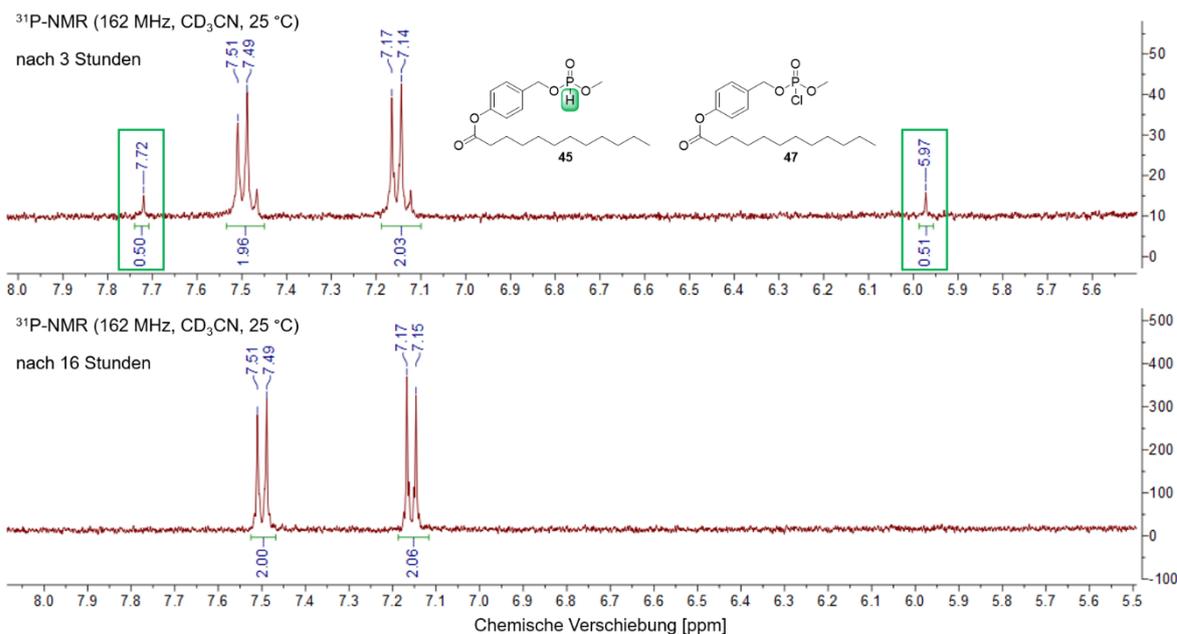


Abbildung 67: Oben: ^1H -NMR-Spektrum der Reaktionsverfolgung zur Bildung des Phosphorchloridats **47** ausgehend vom *H*-Phosphonat **45**, aufgenommen nach drei Stunden in CD_3CN und 162 MHz. Das charakteristische *H*-Phosphonatsignal wurde in grün hervorgehoben. **Unten:** ^1H -NMR-Spektrum der Reaktionsverfolgung zur Bildung des Phosphorchloridats **47** ausgehend vom *H*-Phosphonat **45**, aufgenommen nach 16 Stunden in CD_3CN und 162 MHz.

Für die nachfolgende Kupplungsreaktion wurde das GS-441524-Monophosphat **31** in Acetonitril gelöst und mit Triethylamin versetzt. Das zugesetzte Triethylamin sollte gewährleisten, dass ausreichend Triethylammonium-Gegenionen für eine bessere Löslichkeit vorhanden waren. Außerdem sollte dadurch der in der Reaktion freierwerdende Chlorwasserstoff abgefangen werden. Nach einer Reaktionszeit von neun Stunden bei Raumtemperatur und mehrfacher säulenchromatographischer Reinigung an RP-18-Kieselgel konnte das Produkt als Diastereomerenmischung in einer Ausbeute von 73 % isoliert werden.

Nach jedem säulenchromatographischen Schritt wurden von den isolierten Fraktionen ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektren aufgenommen, um den Fortschritt der Reinigung zu beobachten. Hierbei wurden besonders die aufgenommenen ^{31}P -NMR-Spektren zur Überprüfung der Reinheit genutzt (Abbildung 68). Es wurde festgestellt, dass nach zwei-, drei- und vierfacher säulenchromatographischer Reinigung noch immer signifikante Mengen Monophosphat in den ^{31}P -NMR-Spektren detektiert wurden.

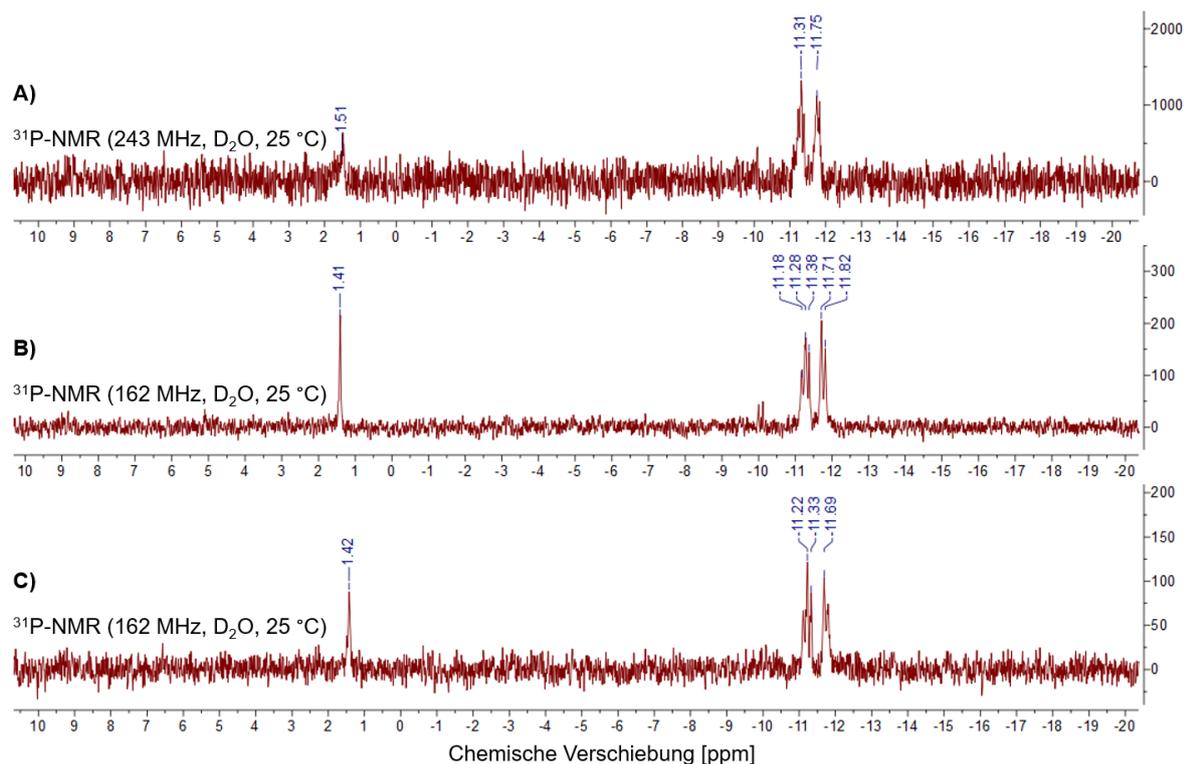


Abbildung 68: ^{31}P -NMR-Spektren nach **A)** zweifacher, **B)** dreifacher und **C)** vierfacher säulenchromatographischer Reinigung an RP-18-Kieselgel. Die Spektren wurden in D_2O und bei 243 MHz bzw. 162 MHz aufgenommen.

Jedoch wurde nach jedem Reinigungsschritt an RP-18-Kieselgel sichergestellt, dass lediglich das AB-maskierte Diphosphat **36** isoliert wurde. Dies konnte durch den gewählten Gradienten gewährleistet werden. Das Monophosphat **31** zeigte eine kurze Retentionszeit an RP-18-Kieselgel und wurde direkt bei 100 % Wasser isoliert. Für eine vollständige Trennung des Monophosphats **31** vom Diphosphat **36** wurde zunächst isokratisch mit Wasser eluiert und erst nach 10 Minuten der Anteil an Acetonitril stetig erhöht. Bei einem Verhältnis von Wasser/Acetonitril 1:1 (v/v) eluierte das gewünschte Produkt **36**. Obwohl die beiden Verbindungen **31** und **36** so unterschiedliche Retentionen zeigten, konnte kein sauberes ^{31}P -NMR-Spektrum aufgenommen werden. Es wurde festgestellt, dass das reine Diphosphat **36** detektiert wurde, wenn die Messung der Probe unmittelbar nach dem Lösen der Probe stattfand. Dies wurde zunächst anhand des in Abbildung 69 dargestellten HPL-Chromatogramms ersichtlich.

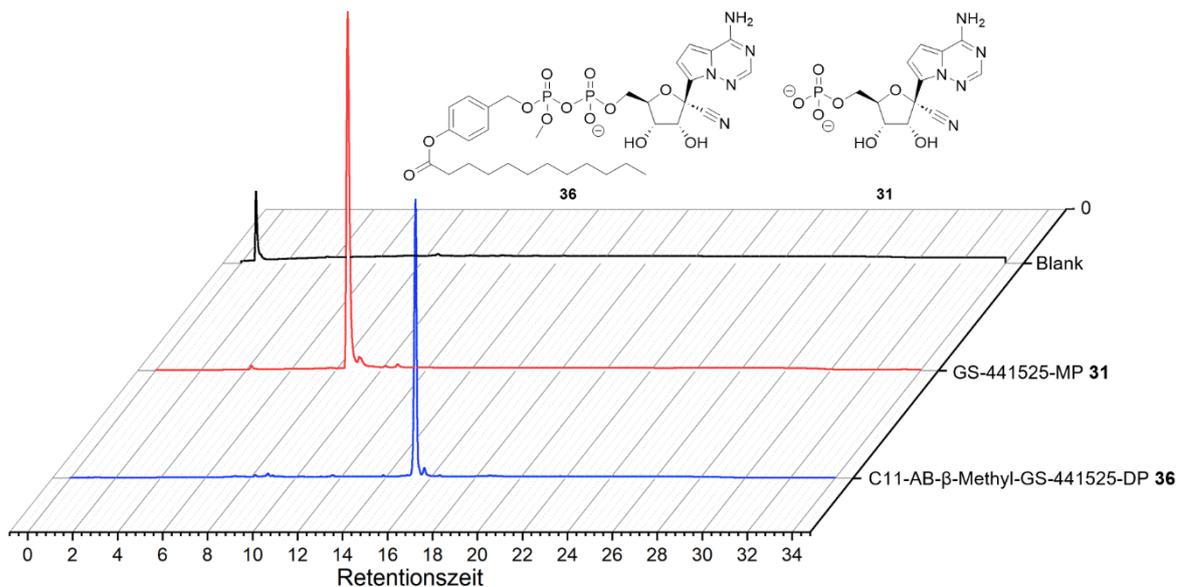


Abbildung 69: HPLC-Runs des Monophosphats **31** (rot), des AB-maskierten Diphosphats **36** (blau) und eines Blanks (schwarz).

In blau ist das Produkt **36** dargestellt, was eine Retentionszeit von 15.56 Minuten zeigt. Neben dem gewünschten Diphosphat **36** sind keine weiteren Verbindungen, insbesondere nicht das Monophosphat **31** (Abbildung 69, rot), ersichtlich. Dies bestätigt die Reinheit des Moleküls **36**.

Zusätzlich wurde ein weiteres ^{31}P -NMR-Spektrum aufgenommen. Jedoch verging dieses Mal vom Lösen der Probe bis zur Messung maximal 5 Minuten. Bei den ^{31}P -NMR-Spektren in Abbildung 68 vergingen zwischen Lösen und Messung des Diphosphats **36** mindestens 30 Minuten und es wurden jedes Mal signifikante Mengen Monophosphat **31** detektiert. Bei der schnellen Probenvorbereitung und Messung von 5 Minuten konnte im ^{31}P -NMR-Spektrum lediglich das Diphosphat **36** bei -11.38 ppm detektiert werden (Abbildung 70).

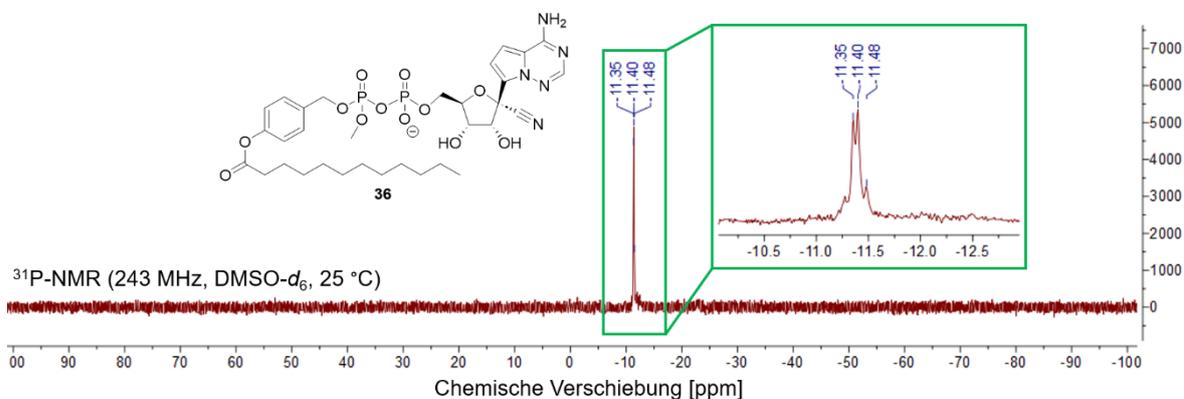


Abbildung 70: ^{31}P -NMR-Spektrum des gewünschten AB-maskierten Diphosphats **36**, aufgenommen in $\text{DMSO-}d_6$ und bei 243 MHz. Von der Probenvorbereitung bis zur -messung sind maximal 5 Minuten vergangen. Das Diphosphatsignal wurde in grün hervorgehoben.

Aus diesem Grund wird vermutet, dass die Phosphoranhydridbindung des AB-maskierten Diphosphats **36** nicht stabil ist, sobald die DiPPro-Verbindung **36** im gelösten Zustand vorliegt. Dies könnte daran liegen, dass durch die AB-Maske am β -Phosphat eine negative Ladung weniger vorliegt und die zweite negative Ladung durch diese ebenfalls abgeschirmt wird. Daraus resultierend könnte das Pyrophosphat anfällig gegenüber nucleophilen Angriffen sein, wobei Wasser vermutlich bereits nucleophil genug für eine Spaltung des Diphosphats **36** ist. Denn der Zerfall zum Monophosphat **31** konnte für das unmaskierte Diphosphat **30** nicht beobachtet werden. Mit diesen neuen Erkenntnissen wurde das Diphosphat **36** für alle weiteren Messungen entweder im Vakuum oder unter Inertgasatmosphäre gelagert und jedes Mal unmittelbar vor Benutzung gelöst und direkt aufgebraucht.

6.1.4.1 Chemische Hydrolyse von Verbindung **36** in PBS-Puffer

Für die Bestimmung der chemischen Stabilität wurde das zu untersuchende AB-maskierte Diphosphat **36** in PBS-Puffer, bei 37 °C und einem physiologischen pH von 7.3 inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Aliquote der Hydrolyselösung entnommen und ohne weitere Reinigung oder Aufarbeitung mittels HPLC vermessen. Die gebildeten Spaltprodukte wurden quantifiziert und die entsprechenden Halbwertszeiten der maskierten Verbindung ermittelt. Die genauen Spaltmechanismen der chemischen Hydrolyse wurden bereits detailliert in Kapitel 4.6.1 und Abbildung 18 beschrieben.

Die Verbindung **36** besitzt eine AB-Maske, bei der es zu einer chemisch induzierten Spaltung kommen kann. Im Folgenden sind die HPL-Chromatogramme der Hydrolyse nach 30 s, 1 h, 8 h, 72 h und 1 Woche zu sehen (Abbildung 71).

Wie vermutet, wurde bereits nach 30 Sekunden eine kleine Menge des Monophosphats **31** detektiert, was auf die zuvor festgestellte Instabilität des Prodrugs **36** zurückzuführen war. Ferner wurde im geringen Maße die AB-Maske chemisch gespalten. Allerdings war nach einer Inkubationszeit von acht Stunden die Verbindung **36** noch immer im Überschuss vorhanden. Erst nach einer Woche wurde die vollständige Spaltung der DiPPro-Verbindung **36** zum unmaskierten DP **30** und der Zerfall zum Monophosphat **31** beobachtet. Mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 61$ Stunden ist die chemische Spaltung der Maskierungseinheit mit einer C11-Alkylkette vergleichbar mit den in MEIER *et al.* bestimmten Halbwertszeiten von DiPPro-Verbindung mit ähnlichen Kettenlängen.^[125]

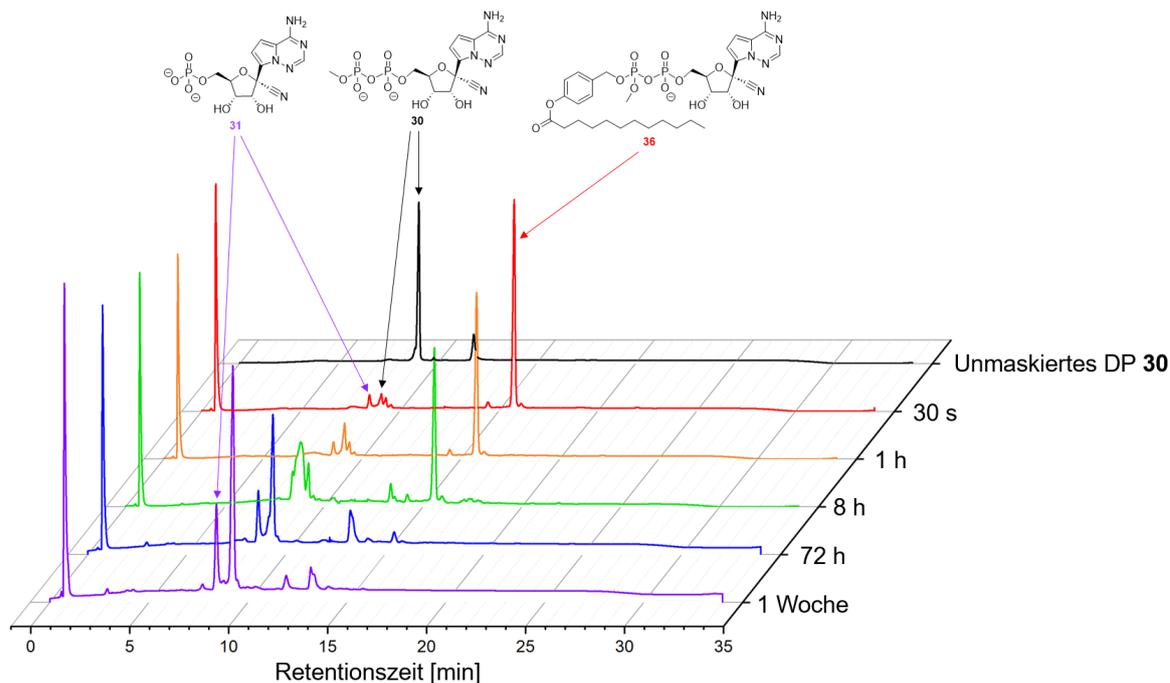


Abbildung 71: Hydrolyseverlauf des C11-AB-maskierten Diphosphats **36** nach Inkubation für insgesamt eine Woche in PBS-Puffer, bei 37 °C und bei einem physiologischen pH von 7.3.

6.1.4.2 Enzymatische Hydrolyse von Verbindung **36** in PLE

Für die Bestimmung der enzymatischen Stabilität kann eine Hydrolyse entweder mit Schweineleberesterase (PLE, *pig liver esterase*) oder mit Zellextrakt durchgeführt werden. Hier wurde das zu untersuchende AB-maskierte Diphosphat **36** mit PLE bei 37 °C und einem physiologischen pH von 7.3 inkubiert. Hierdurch sollte bestätigt werden, dass die Maskierungseinheit durch eine enzymatische Hydrolyse gespalten werden kann und das unmaskierte Diphosphat **30** nach dem Passieren der Zellmembran effizient freigesetzt wird. In Abbildung 72 ist der Hydrolyseverlauf der PLE-Hydrolyse von Verbindung **36** dargestellt. Bei der Hydrolyse fiel auf, dass bereits unmittelbar nach Zugabe des maskierten Diphosphats **36** zum PLE, nur noch sehr geringe Mengen der maskierten Verbindung **36** detektiert wurden und hauptsächlich unmaskiertes Diphosphat **30** zu erkennen war (0 s-Probe, orangefarbene Linie). Nach 30 s wurde die AB-Maske vollständig enzymatisch gespalten und es wurde lediglich das Diphosphat **30** detektiert. Da in der 0 s-Probe bereits hauptsächlich unmaskiertes Diphosphat **30** detektiert wurde, konnte keine Halbwertszeit berechnet werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Spaltung der AB-Maske schneller war als die ermittelten Halbwertszeiten von DiPPro-Verbindungen, die mit einer vergleichbaren AB-Maske hergestellt wurden. MEIER *et al.* und PERTENBREITER konnten für ihre Prodrugs Halbwertszeiten von wenigen Minuten bestimmen, wobei diese Werte nicht

eindeutig vergleichbar sind, da diese Hydrolysestudien mit Zellextrakt, anstatt von PLE durchgeführt wurden.^[125,144]

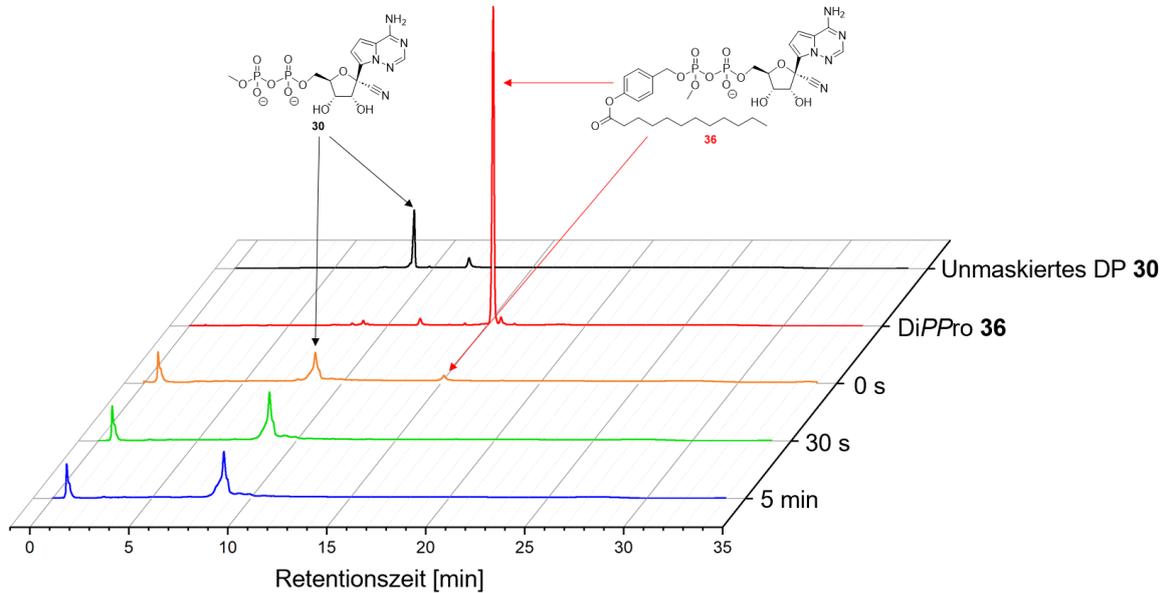


Abbildung 72: Hydrolyseverlauf des C11-AB-maskierten Diphosphats **36** nach Inkubation für insgesamt fünf Minuten mit PLE, bei 37 °C und bei einem physiologischen pH von 7.3.

6.1.4.3 Zellaufnahmestudien von C11-AB-β-Methyl-GS441524-Diphosphat **36**

Das erfolgreich synthetisierte DiPPPro **36** besitzt eine Acyloxybenzylgruppe mit einem C11-Alkylrest. Diese lipophile Maskierungseinheit soll die Permeabilität durch Zellmembranen erhöhen, sodass die Verbindung zum Wirkort diffundieren kann. Um zu überprüfen, ob eine AB-Maske mit einem C11-Alkylrest ausreichend für eine passive Diffusion ist, sollten Zellaufnahmestudien mit Calu-3-Zellen durchgeführt werden. Hierbei wurde die Zellaufnahme des maskierten Diphosphats **36** mit dem freien Diphosphat **30** verglichen (Abbildung 73).

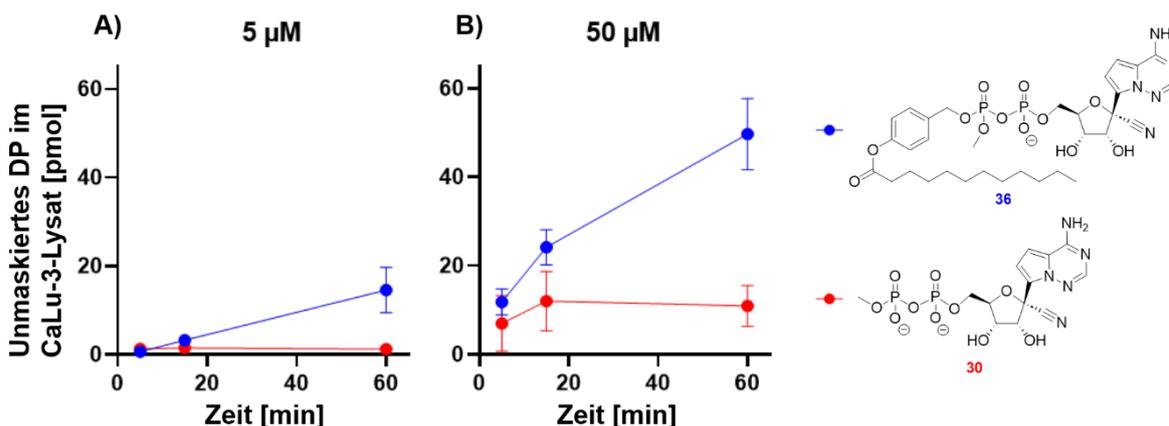


Abbildung 73: Zellaufnahmestudien mit **A)** jeweils 5 µM und mit **B)** jeweils 50 µM des AB-maskierten Diphosphats **36** (blau) und des unmaskierten Diphosphats **30** (rot) nach insgesamt 60 Minuten in Calu-3-Zellen. Die Werte wurden in Kooperation mit SANDMANN am UKE (Projekt A18, SFB 1328) vermessen.

Bei einer niedrigen Konzentration der eingesetzten Verbindungen **36** und **30** war lediglich eine Zellaufnahme des AB-maskierten Inhibitors **36** zu beobachten. Im Vergleich dazu war keine signifikante Zellaufnahme des unmaskierten Diphosphats **30** zu erkennen (Abbildung **73, A**). Bei Einsatz von 50 µM beider Verbindungen konnte für das maskierte Diphosphat **36** eine effiziente Zellaufnahme bestätigt werden, welche die des unmaskierten Diphosphats **30** stark übertraf. Das Diphosphat **30** konnte lediglich in sehr geringem Maße die Zellmembran passieren. Die Zellaufnahme des unmaskierten Diphosphats **30** kann durch unspezifische Bindungen an extrazelluläre Adenosin-Transporter erklärt werden.^[163] Daraus wurde geschlossen, dass das Prodrug mit einer C11-AB-Maskierungseinheit bereits lipophil genug für eine ausreichende Zellmembranpermeabilität ist und in weiteren Zellbasierten Untersuchungen eingesetzt werden kann. Hierbei ist weiterhin zu beachten, dass in solchen Experimenten die DiPPro-Verbindung **36** nicht nur als unmaskierte Variante **30** vorliegt, sondern auch zum entsprechenden Monophosphat **31** zerfallen kann. Das eventuell vorliegende Monophosphat **31** kann dann in Zellbasierten Tests durch Kinasen zum Triphosphat phosphoryliert werden und anschließend als aktive Triphosphat-Spezies die virale Polymerase hemmen.^[164] Diese Möglichkeit zur zweiseitigen inhibitorischen Aktivität des Prodrugs **36** könnte diese Verbindung als einen dualen Inhibitor auszeichnen. Trotz dessen sollte versucht werden, das Prodrug **36** zu stabilisieren, sodass die Phosphoranhydridbindung nicht mehr gespalten und somit der Zerfall zum Monophosphat **31** verhindert wird.

6.1.5 Darstellung von β -Ethyl-GS441524-Phosphat-Phosphonat **49**

Für eine Stabilisierung der Phosphoranhydridbindung des Prodrugs **36** sollte die β -Phosphatgruppe mit einer Phosphonatgruppe ausgetauscht werden, sodass das O-Atom der Phosphatgruppe mit einer Methylengruppe ersetzt wurde. Die entsprechend neue Verbindung **50** ist in Abbildung 74 dargestellt. Die Phosphonatgruppe ist weniger elektrophil als eine Phosphatgruppe, sodass vermutet wird, dass die Phosphoranhydridbindung dadurch weniger anfällig gegen nucleophile Angriffe ist und somit nicht so schnell gespalten werden kann. Jedoch sollte zunächst das Phosphat-Phosphonat **49** ohne Maskierungseinheit synthetisiert werden und hinsichtlich der inhibitorischen Aktivität gegen SARS-CoV-2-Mac1 getestet werden, da sich durch das fehlende O-Atom der elektronische Charakter der β -Phosphonat-Einheit verändert hat. Dadurch soll in einem ersten Schritt geprüft werden, ob die Verbindung **49** genauso wie das Diphosphat **30** ein potentieller Inhibitor ist. Sollte die inhibitorische Aktivität des Phosphat-Phosphonats **49** nicht ausreichend stark sein, ist die Darstellung der membranpermeablen Variante **50** nicht notwendig.

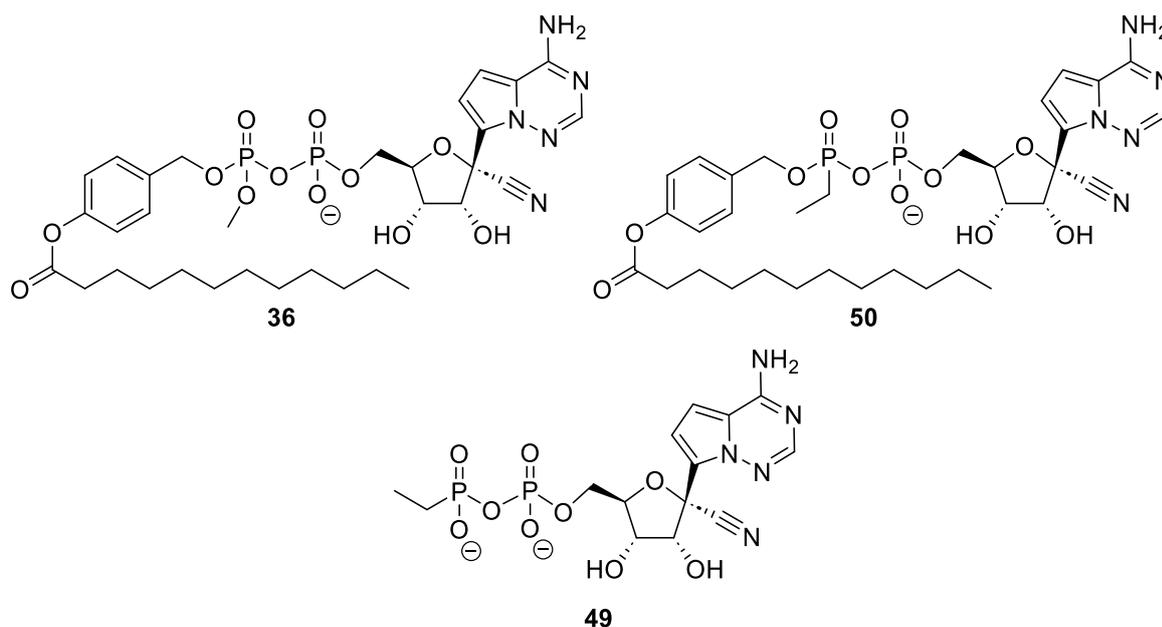


Abbildung 74: Strukturformeln des AB-maskierten Diphosphats **36**, des AB-maskierten Phosphat-Phosphonats **50** und des unmaskierten Phosphat-Phosphonats **49**.

Für die Darstellung des Phosphat-Phosphonats **49** sollte die Kupplungsreaktion analog zu der Synthese der DiPPro-Verbindung **36** erfolgen (vgl. Abbildung 66). Hierbei sollte zunächst das entsprechende *H*-Phosphonat **51** ausgehend vom kommerziell erhältlichen Natriumphosphinat **52** hergestellt werden (Abbildung 75).

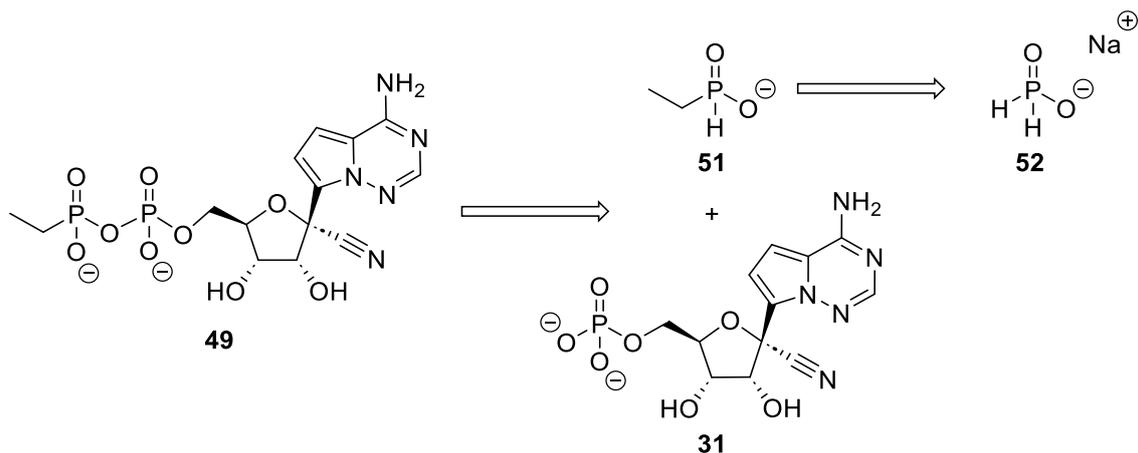


Abbildung 75: Retrosyntheseschema zur Darstellung des Phosphat-Phosphonats **49** ausgehend vom kommerziell erhältlichen Natriumphosphinat **52**.

Die Reaktionsbedingungen zur Synthese des *H*-Phosphonats **51** sind in Abbildung 76 dargestellt. Die Reaktion erfolgte nach einer Vorschrift von MARKOULIDES und REGAN.^[165]

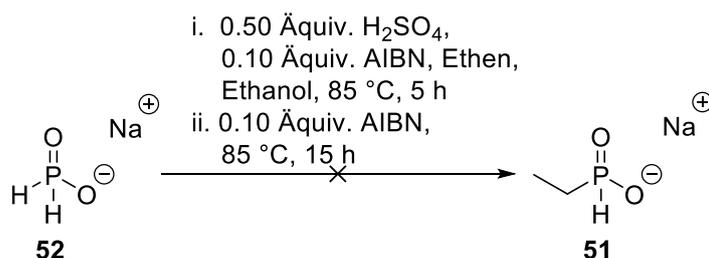


Abbildung 76: Reaktionsbedingungen des Syntheseversuches des *H*-Phosphonats **51** ausgehend vom kommerziell erhältlichen Natriumphosphinat **52**.^[165]

Zur Synthese des gewünschten *H*-Phosphonats **51** wurde zunächst das Edukt Natriumphosphinat **52** über Nacht unter vermindertem Druck getrocknet. Danach wurde das Edukt **52** in Ethanol gelöst und konzentrierte Schwefelsäure sowie Azobis(isobutyronitril) (AIBN) hinzugegeben. Anschließend wurde der Kolben dreimal mit Ethen gespült und die Reaktion für fünf Stunden bei 85 °C unter Ethengasatmosphäre gerührt. Nach Rühren für fünf Stunden konnte dünnschichtchromatographisch kein vollständiger Umsatz beobachtet werden, weshalb eine weitere Spatelspitze AIBN hinzugegeben und über Nacht bei 85 °C gerührt wurde. Zur Reinigung wurde das Reaktionsgemisch in Wasser aufgenommen, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurde ein ¹H-NMR-Spektrum aufgenommen und festgestellt, dass hauptsächlich das Edukt **52** zurückgewonnen wurde.

Im Vergleich dazu wurden in der Literatur Ausbeuten von 90 % erhalten.^[165] Dies wurde darauf zurückgeführt, dass in der Literatur mit langkettigen Alkenen gearbeitet wurde, deren

Aggregatzustand flüssig ist, während Ethen gasförmig ist. Vermutlich konnte dadurch der Einsatz der exakten stöchiometrischen Menge des Alkens nicht eingehalten werden. Außerdem könnte das Einleiten des Ethens in die Reaktionslösung nur unzulänglich erfolgt sein.

In einem neuen Versuch zur Darstellung des *H*-Phosphonats **51** sollte der Einsatz von Ethen vermieden werden, weshalb eine neue Reaktion ausgehend vom kommerziell erhältlichen Ethanphosphonsäuredichlorid **53** erprobt wurde (Abbildung 77).^[166]

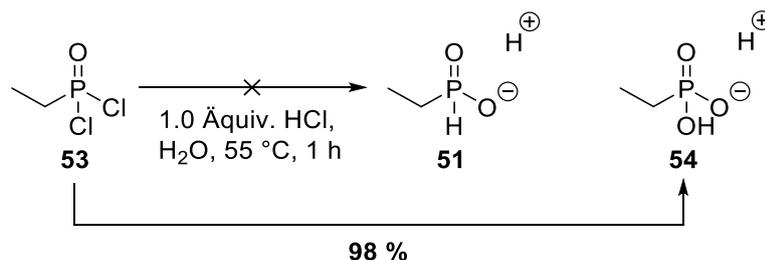


Abbildung 77: Reaktionsbedingungen des Syntheseversuches des *H*-Phosphonats **51** und der tatsächlichen Darstellung des Phosphonats **54** ausgehend vom kommerziell erhältlichen Ethanphosphonsäuredichlorid **53**.^[166]

Das Edukt **53** wurde in Wasser gelöst und konzentrierte Salzsäure wurde hinzugegeben. Nach einer Reaktionszeit von einer Stunde bei 55 °C wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde NMR-spektroskopisch untersucht und es wurde festgestellt, dass anstatt des *H*-Phosphonats **51** das Phosphonat Ethylphosphonsäure **54** in einer Ausbeute von 98 % erhalten wurde. Das ¹H-NMR-Spektrum des isolierten Produktes **54** ist in Abbildung 78 zu sehen. Außer des NMR-Lösungsmittels und der Ethylgruppe wurden keine weiteren Protonensignale detektiert. Dies spricht dafür, dass das erhaltene Produkt nicht dem *H*-Phosphonat **51** entspricht, da das charakteristische Dublettsignal fehlt. Ferner spalten die Protonensignale des Ethylrests in ein Dublett vom Triplet (blau) und ein Dublett vom Quartett (grün) auf, da die Protonen jeweils über eine ³J_{H,H}-Kopplung mit den benachbarten Protonen sowie über eine ²J_{H,P}-Kopplung mit dem Phosphoratom koppeln.

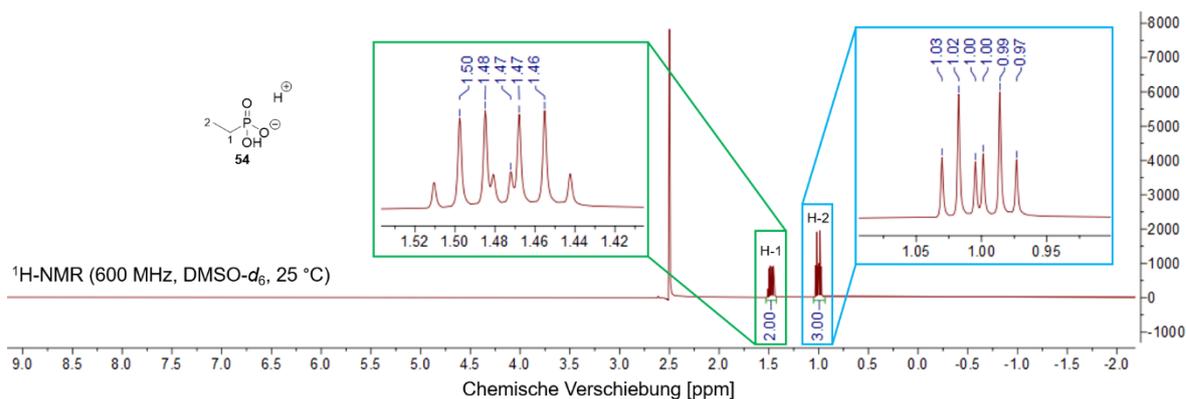


Abbildung 78: ¹H-NMR-Spektrum des isolierten Phosphonats **54**. Die entsprechenden Protonensignale der Ethylgruppe wurden farbig hervorgehoben. Das Spektrum wurde in DMSO-*d*₆ und einer Frequenz von 500 MHz aufgenommen.

Zusätzlich deutet das Massenspektrum ebenfalls auf das Phosphonat **54** hin. Mit einer berechneten Masse von 109.0060 g/mol für das einfach negativ geladene Phosphonat **54** stimmt diese Masse mit dem Basispeak in Abbildung 79 mit einer Masse von 109.0062 g/mol überein.

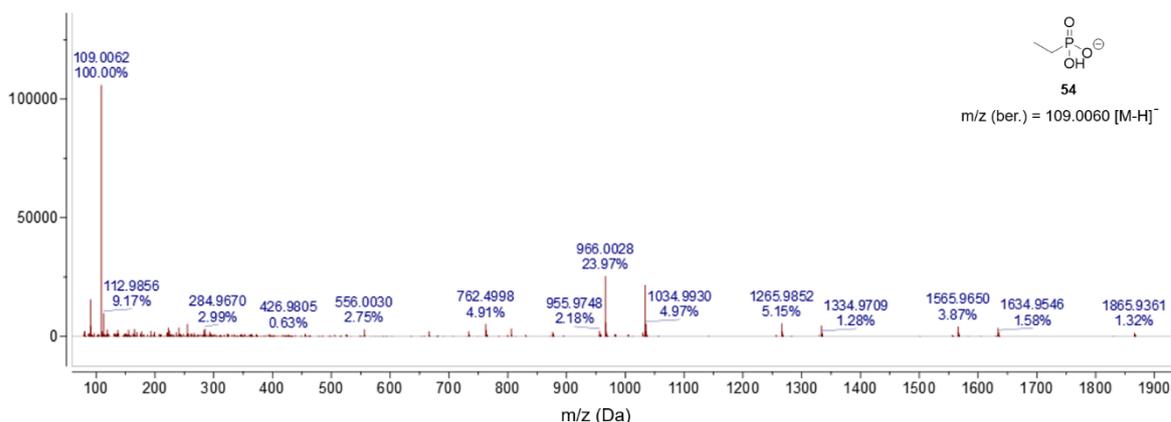


Abbildung 79: ESI-Massenspektrum des isolierten Phosphonats **54** gemessen im Negativionenmodus. Die berechnete Masse ist unter der Strukturformel aufgeführt.

Für den nachfolgenden Kupplungsschritt sollte das Phosphonat ursprünglich wie in Abbildung 66 dargestellt zunächst über eine oxidative Chlorierung aktiviert werden und dann mit dem Monophosphat **31** umgesetzt werden. Da allerdings statt des *H*-Phosphonats **51**, Ethylphosphonsäure **54** gebildet wurde, sollte auf die Reaktion nach MOHAMADY *et al.* zurückgegriffen werden. Die entsprechenden Reaktionsbedingungen sind in Abbildung 80 aufgeführt.^[131,132]

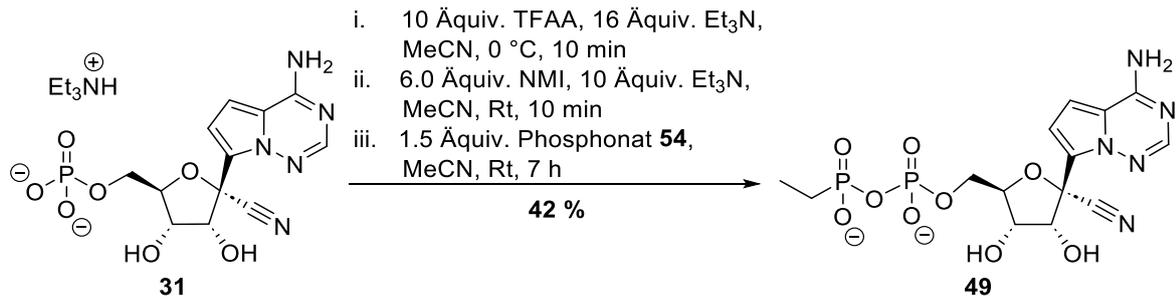


Abbildung 80: Reaktionsbedingungen zur Kupplung des Monophosphats **31** an das Phosphonat **54**.^[131,132]

Zunächst wurden die Gegenionen der Verbindung **54** mittels eines Ionenaustauscherharzes zu Triethylammonium gewechselt. Anschließend wurde das Monophosphat **31** aktiviert und mit einem Überschuss des Triethylammonium-Salzes der Ethylphosphonsäure **54** umgesetzt. Nach mehrfacher säulenchromatographischer Reinigung an RP-18-Kieselgel wurde das Produkt **49** in einer Ausbeute von 42 % isoliert.

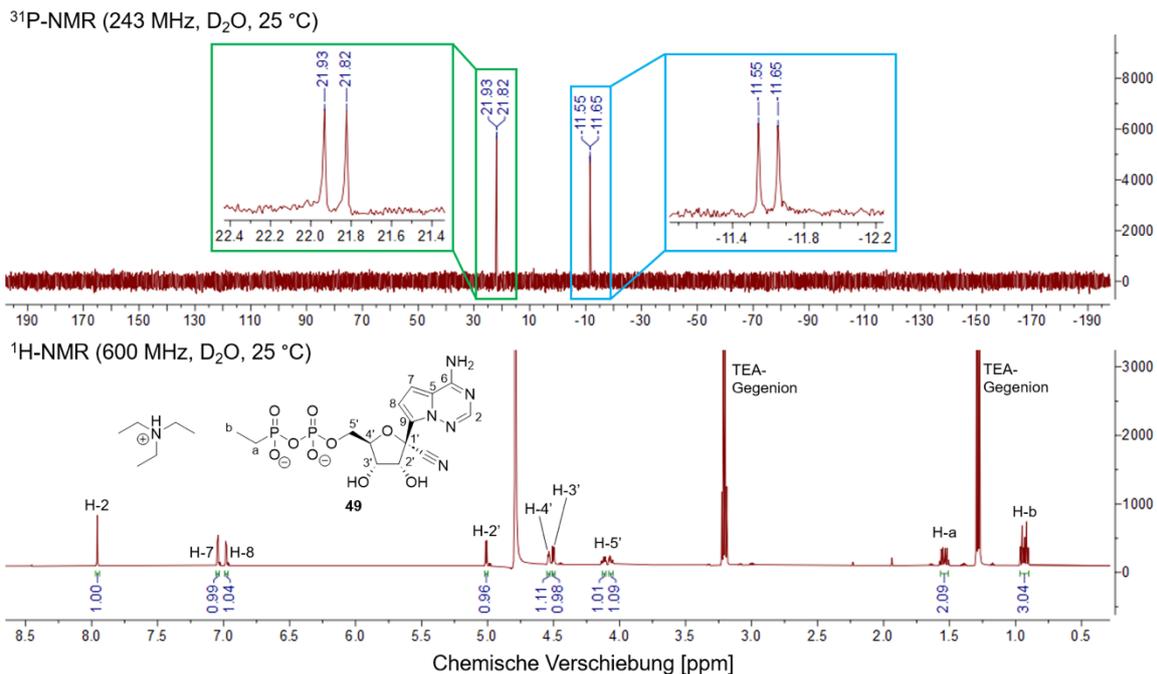


Abbildung 81: Oben: ³¹P-NMR-Spektrum des Kupplungsproduktes **49**, aufgenommen in D₂O und 243 MHz. Das Phosphorsignal der Phosphonatgruppe ist in grün und das Phosphorsignal der Phosphatgruppe ist in blau hervorgehoben. **Unten:** ¹H-NMR-Spektrum des Kupplungsproduktes **49**, aufgenommen in D₂O und 600 MHz.

Die Reinheit des Produktes wurde mittels des ³¹P- und ¹H-NMR-Spektrums bestimmt (Abbildung 81). Im ³¹P-NMR-Spektrum wurde das Dublett bei 21.88 ppm dem Phosphoratome der Phosphonatgruppe und das Dublett bei -11.60 ppm hingegen dem

Phosphoratom der Phosphatgruppe zugeordnet (Abbildung 81, oben). Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abbildung 81, unten) zeigte lediglich Signale des Phosphat-Phosphonats **49**, was die Isolation der Verbindung **49** bestätigte.

6.1.5.1 Testung der inhibitorischen Aktivität von β -Ethyl-GS441524-Phosphat-Phosphonat **49** gegen die virale Macrodomäne Mac1

Das Phosphat-Phosphonat **49** sollte genau wie die zuvor hergestellten Diphosphate hinsichtlich der inhibitorischen Aktivität gegen die virale Mac1 getestet werden (Abbildung **82**). Diese Inhibitorstruktur wurde von der im Rahmen dieser Arbeit potentesten synthetisierten Verbindung **30** abgeleitet. Hierbei wurde die β -Methylphosphatgruppe durch ein β -Ethylphosphonat ersetzt. Durch diese Modifikation soll eine erhöhte Stabilität der Phosphoranhydridbindung induziert werden, sobald eine Maskierungseinheit, analog zu Verbindung **36**, eingeführt wird. Mit einem IC_{50} -Wert von $1.6 \pm 0.3 \mu\text{M}$ ist das Phosphat-Phosphonat **49** kein so starker Inhibitor wie das entsprechende Diphosphat **30**, jedoch ist die inhibitorische Aktivität noch immer rund 10-fach höher als die von β -Methyl-ADP **26** und 15-fach stärker als die von ADPR **25**.

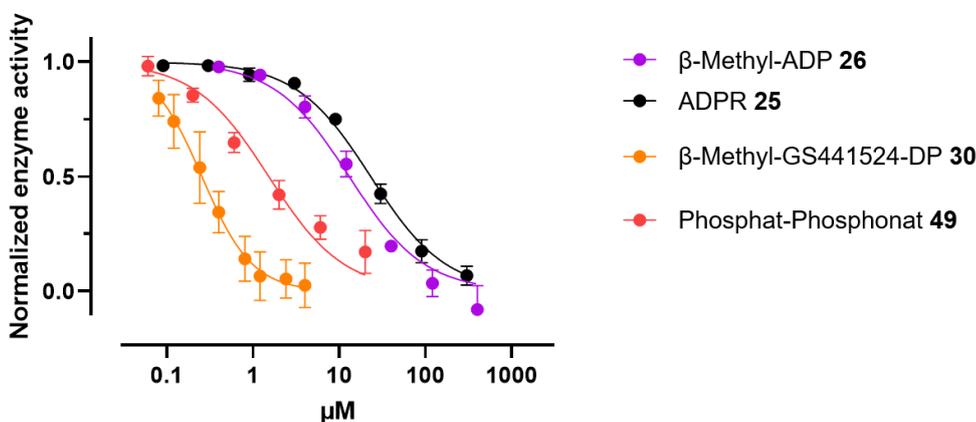


Abbildung 82: Graphen der inhibitorischen Aktivität gegen die isolierte SARS-CoV-2-Mac1 von β -Methyl-ADP **26** (lila), ADPR **25** (schwarz), β -Methyl-GS441524-DP **30** (orange) und dem Phosphat-Phosphonat **49** (pink). Die Werte wurden in Kooperation mit SANDMANN am UKE (Projekt A18, SFB 1328) vermessen.

Dies macht das Phosphat-Phosphonat **49** ebenfalls zu einem potentiellen Inhibitor, weshalb mit der Darstellung des Prodrugs **50** fortgesetzt werden sollte.

6.1.6 AB-Maskierung von β -Ethyl-GS441524-Phosphat-Phosphonat **49**

Das Phosphat-Phosphonat **49** stellt mit einem IC_{50} von $1.6 \pm 0.3 \mu M$ ebenfalls einen vielversprechenden Inhibitor gegen die virale Mac1-Domäne dar. Durch die Einführung der Phosphonatgruppe soll der elektrophile Charakter der Phosphoranhydridbindung vermindert werden, sodass bei einer späteren Einführung einer Maskierungseinheit eine höhere Stabilität gegenüber nucleophilen Angriffen gewährleistet ist. Dies soll nun im folgenden Teil der Arbeit überprüft werden. Dazu sollte zunächst gemäß dem DiPPro-Konzept das Phosphat-Phosphonat **49** in die membranpermeable Form **50** überführt werden. Hierbei wurde für eine bessere Vergleichbarkeit zum maskierten Diphosphat **36**, erneut die C11-AB-Maske **40** ausgewählt.

Das maskierte Phosphat-Phosphonat **50** sollte über eine Kupplungsreaktion zwischen dem GS-441524-MP **31** und dem entsprechenden maskierten Phosphonat **55** synthetisiert werden. Die Darstellung des Phosphonats **55** sollte über das kommerziell erhältliche Ethanphosphonsäuredichlorid **53** mit der entsprechenden AB-Maske **40** erfolgen.

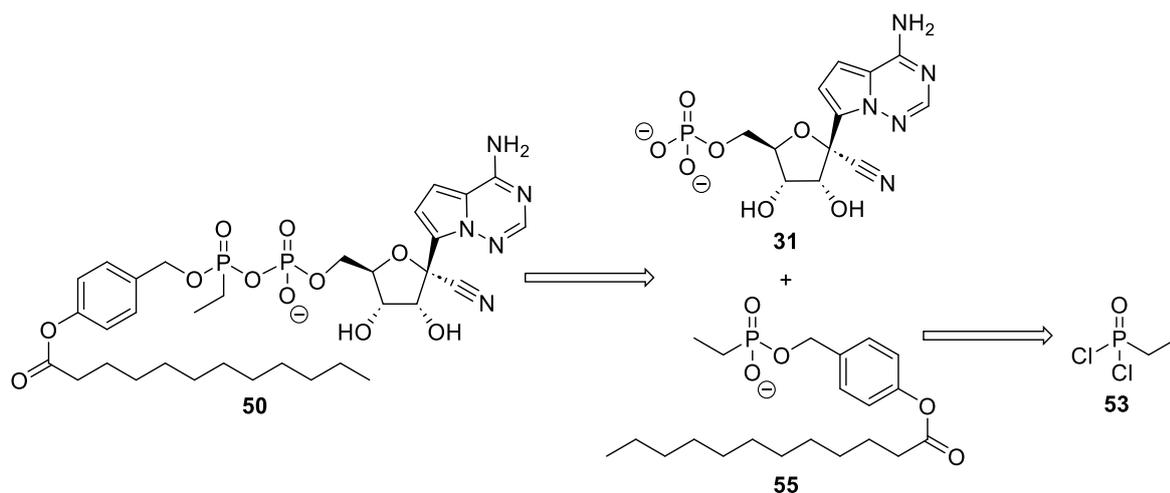


Abbildung 83: Retrosynthetisches Schema zur Darstellung des AB-maskierten Phosphat-Phosphonats **50** ausgehend vom Monophosphat **31** und dem kommerziell erhältlichen Phosphonat **53**.

Für die Synthese des AB-maskierten Phosphonats **55** wurde eine Synthesevorschrift nach JESCHIK *et al.* verwendet und auf die eigenen Ansprüche angepasst (Abbildung 84).^[167]

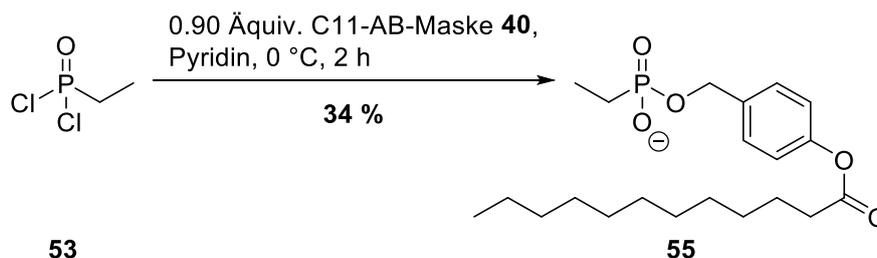


Abbildung 84: Reaktionsbedingungen zur Synthese des Phosphonats **55** mit AB-Maskierung.^[167]

Die Reaktion zur Synthese des Phosphonats **55** wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Hierbei war zu beachten, dass das Lösungsmittel der Reaktion ebenfalls UV-aktiv ist, weshalb die DC-Platte unmittelbar nach Auftragen der Probe zunächst ausreichend getrocknet werden musste, um das Pyridin zu entfernen. Nach zweifacher säulenchromatographischer Reinigung an RP-18-Kieselgel konnte das Produkt in einer Ausbeute von 34 % erhalten werden. Anhand des ³¹P-NMR-Spektrums wurde festgestellt, dass lediglich das Phosphonat **55** und keine anderen Phosphorverbindungen isoliert wurden (Abbildung 85).

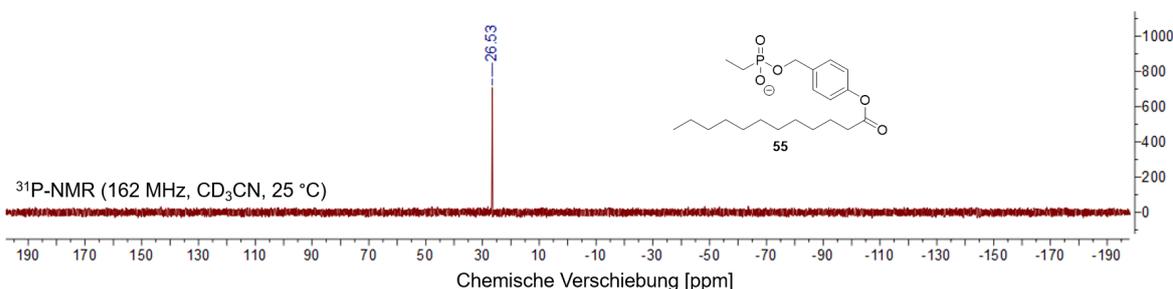


Abbildung 85: ³¹P-NMR-Spektrum des Phosphonats **55**, gemessen in Acetonitril-*d*₃ und bei 162 MHz.

Anschließend erfolgte die Kupplung nach den Reaktionsbedingungen nach MOHAMADY *et al.* (Abbildung 86).^[131,132]

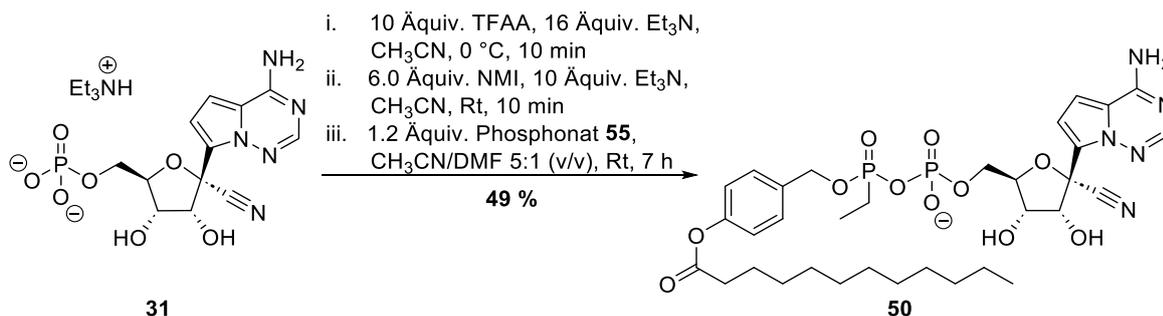


Abbildung 86: Reaktionsbedingungen zur Kupplung des Monophosphats **31** mit dem AB-maskierten Phosphonat **55**.^[131,132]

Nach mehrfacher säulenchromatographischer Reinigung an RP-18-Kieselgel konnte das AB-maskierte Produkt **50** in einer Ausbeute von 49 % isoliert werden. Vom Reinprodukt wurde ein ¹H-NMR-Spektrum aufgenommen (Abbildung 87).

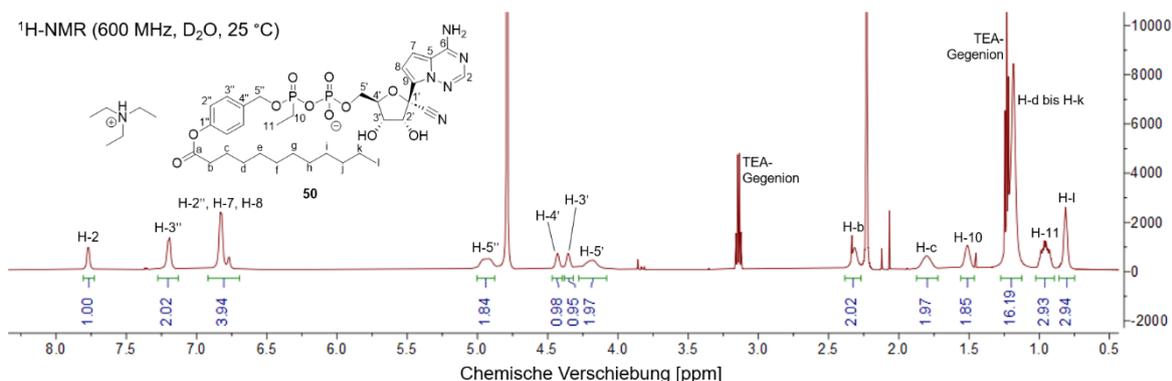


Abbildung 87: ¹H-NMR-Spektrum des C11-AB-maskierten Phosphat-Phosphonats **50**, gemessen in D₂O und bei 600 MHz.

In dem Spektrum waren ausschließlich die Produktsignale des Phosphat-Phosphonats **50** zu beobachten. Dies bestätigte die Isolation der Verbindung **50**. Zusätzlich wurden ³¹P-NMR-Spektren aufgenommen. Dabei wurde ein Spektrum unmittelbar nach der Isolation und der Probenvorbereitung des Phosphat-Phosphonats **50** aufgenommen (Abbildung 88, oben). Für die Messung des nächsten Spektrums wurde dieselbe bereits gelöste Probe für 4 Nächte bei Raumtemperatur gelagert und nach dieser Lagerungszeit nochmals vermessen (Abbildung 88, unten).

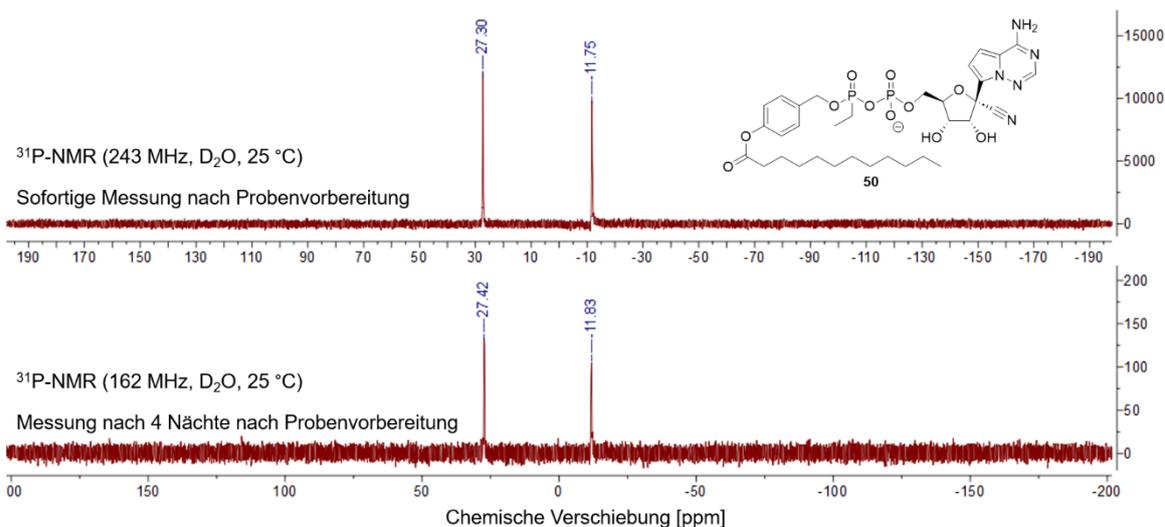


Abbildung 88: Oben: ^{31}P -NMR-Spektrum des AB-maskierten Phosphat-Phosphonats **50**. Die NMR-Probe wurde direkt nach der Probenvorbereitung vermessen. Die Messung erfolgte in D_2O und bei 243 MHz. **Unten:** ^{31}P -NMR-Spektrum des AB-maskierten Phosphat-Phosphonats **50**. Die NMR-Probe wurde vier Nächte nach der Probenvorbereitung vermessen. Die Messung erfolgte ebenfalls in D_2O und bei 162 MHz.

Selbst nach einer Lagerungszeit von 4 Nächten konnte kein Zerfall des maskierten Phosphat-Phosphonats **50** zum entsprechenden Monophosphat **31** und Phosphonat **55** beobachtet werden. Bei dem Prodrug **36** hingegen konnten bereits nach 30 Minuten die ersten Zerfallsprodukte ermittelt werden (vgl. Kapitel 6.1.4). Dies bestätigt, dass das AB-maskierte Phosphat-Phosphonat **50** stabiler ist als das AB-maskierte Diphosphat **36**. Diese Stabilität konnte selbst im gelösten Zustand beobachtet werden, was die Durchführung der Hydrolysestudien und weitere Zell-basierte Untersuchungen erleichterte.

Nachdem festgestellt wurde, dass das C11-AB-maskierte Phosphat-Phosphonat **50** eine ausreichende Stabilität vorweist und die Darstellung des Produktes **50** erfolgreich war, sollten noch weitere AB-maskierte Varianten des Phosphat-Phosphonats **49** synthetisiert werden. Hierbei sollte die Kettenlänge des Alkylrestes der Acyloxybenzylgruppe variiert werden. Es sollten zusätzlich zum C11-AB-maskierten Produkt **50** ein Phosphat-Phosphonat mit einer C8-AB-Gruppe **56** sowie mit einer C14-AB-Gruppe **57** synthetisiert werden (Abbildung 89).

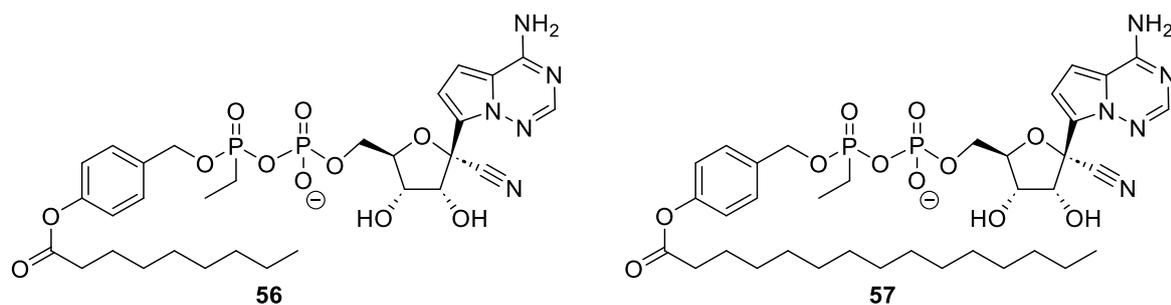


Abbildung 89: Strukturformeln des C8-AB- **56** und des C14-AB-maskierten Phosphat-Phosphonats **57**.

Durch die Darstellung der Phosphat-Phosphonate mit unterschiedlichen Kettenlängen sollte ermittelt werden, ob im Fall der kürzeren Alkylkette (Verbindung **56**) noch immer eine ausreichende Lipophilie für eine passive Diffusion durch die Zellmembran gewährleistet ist. Im Fall der längeren Alkylkette (Verbindung **57**) sollte überprüft werden, ob die chemische Stabilität vergleichbar ist mit dem C11-AB-Phosphat-Phosphonat **50**, da JESSEN *et al.* und GOLLNEST *et al.* beobachteten, dass DiPPro- bzw. TriPPPro-Verbindungen mit langen Acylketten vermehrt zu den entsprechenden Mono- und Diphosphaten zerfielen.^[126,168] Diese Beobachtung wurde damit begründet, dass die maskierten Phosphate mit langen Alkylketten in Lösung als Mizellen vorlagen, bei denen die Phosphoranhydridbindungen nach außen zeigten und somit leichter zugänglich für nucleophile Angriffe waren.^[123]

Zunächst wurden die beiden AB-maskierten Phosphat-Phosphonate **56** und **57** analog zu dem in Abbildung 83 dargestellten Schema synthetisiert. In einem ersten Syntheseschritt wurden die Phosphonate **58** und **59** über die in Abbildung 90 dargestellten Reaktionsbedingungen hergestellt.^[167]

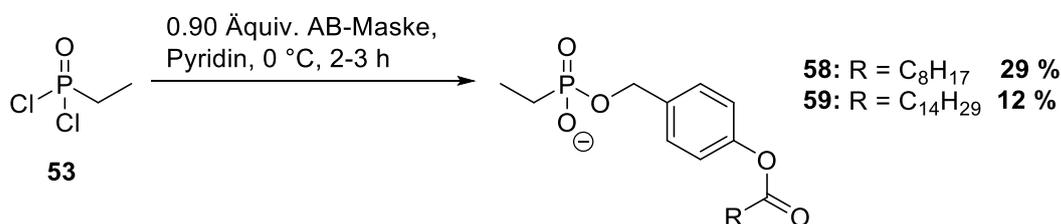


Abbildung 90: Reaktionsbedingungen zur Synthese des Phosphonats mit einer C8-AB-Maske **58** und des Phosphonats mit einer C14-AB-Maske **59** ausgehend vom kommerziell erh\u00e4ltlichen Ethanephosphons\u00e4uredichlorid **53**.^[167]

Nach s\u00e4ulenchromatographischer Reinigung an RP-18-Kieselgel wurden die Phosphonate **58** und **59** in Ausbeuten von 29 % bzw. 12 % isoliert. Im Vergleich dazu konnte das Phosphonat mit einer C11-AB-Maske **55** in einer Ausbeute von 34 % erhalten

werden. Insgesamt sind die Ausbeuten aller Phosphonate eher gering. Dies könnte daran liegen, dass neben den einfach maskierten Phosphonaten auch die zweifach-maskierten Formen detektiert wurden. Die zweifach maskierte Form wurde beispielhaft an dem Phosphonat mit der C8-AB-Gruppe **58** dargestellt. Dafür wurde ein Massenspektrum aufgenommen und ausgewertet (Abbildung 91). Das Massenspektrum deutete mit dem Basispeak von m/z 641.3028 auf das zweifach maskierte Phosphonat **60** hin. Für dieses Phosphonat wurde eine Masse von 641.3004 g/mol $[M+K]^+$ berechnet und stimmte somit mit der im Massenspektrum gefundenen Masse überein.

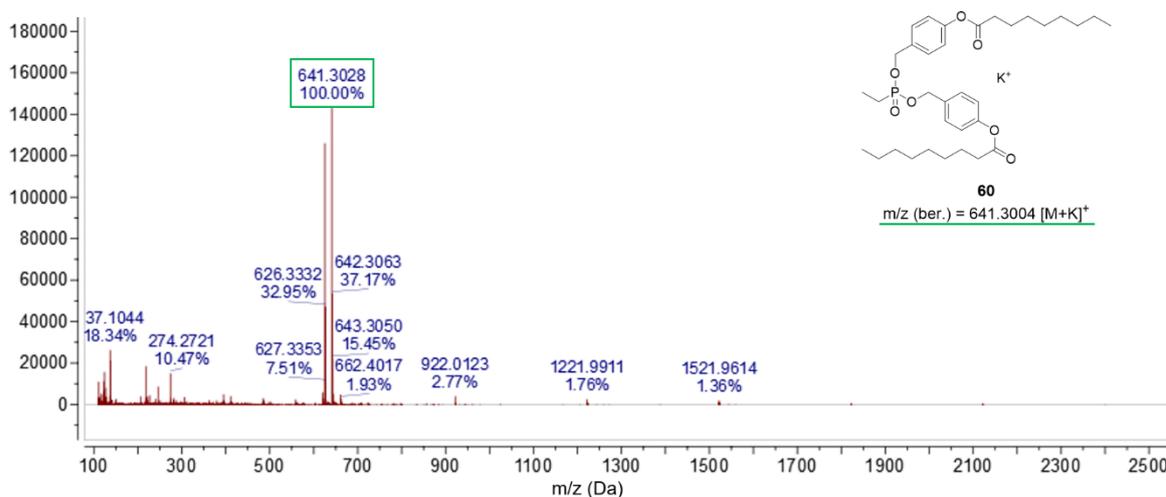


Abbildung 91: ESI-Massenspektrum gemessen im Positivionenmodus. Die berechnete exakte Masse des zweifach veresterten Phosphonats **60** ist unter der Strukturformel dargestellt. Die berechnete exakte Masse und die entsprechend gefundene Masse zum Phosphonat **60** sind in grün hervorgehoben.

Um in Zukunft eine doppelte Maskierung zu verhindern, gibt es unterschiedliche Optimierungsmöglichkeiten. Zum einen könnte eine Verringerung der Reaktionstemperatur und der Reaktionszeit zu einem positiven Ergebnis führen. Zusätzlich wäre die langsame und portionsweise Zugabe der entsprechenden AB-Maske eine weitere Option. Außerdem könnte eine Maskierung ausgehend von Ethylphosphonsäure **54** anstelle des zweifach chlorierten Phosphonats **53** erprobt werden.

Im nächsten Schritt der Synthese wurden die Phosphonate **58** und **59** in einer Kupplungsreaktion mit dem Monophosphat **31** zu den entsprechenden AB-maskierten Phosphat-Phosphonaten **56** und **57** umgesetzt (Abbildung 92).^[131,132]

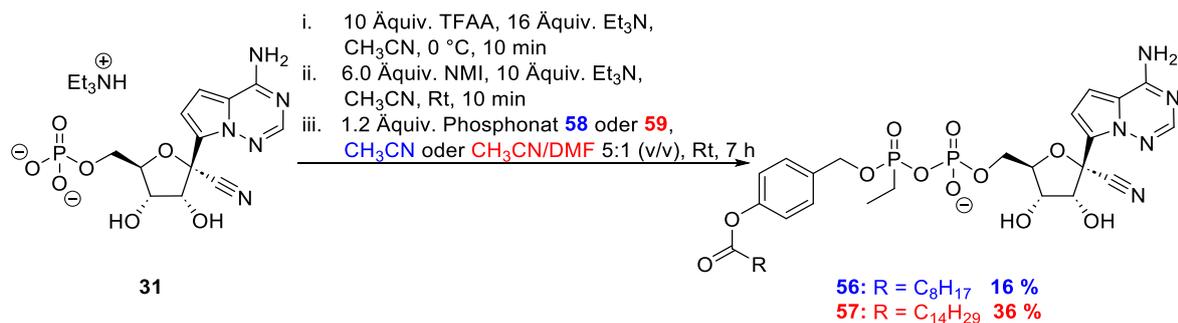


Abbildung 92: Reaktionsbedingungen zur Synthese der Phosphat-Phosphonate **56** und **57**. Reaktionsbedingungen, die nicht für beide Reaktionen identisch durchgeführt wurden, wurden farblich hervorgehoben. Dabei sind die blauen Markierungen dem C8-AB-Phosphat-Phosphonat **56** und die roten Markierungen dem C14-AB-Phosphat-Phosphonat **57** zuzuordnen.^[131,132]

Nach mehrfacher säulenchromatographischer Reinigung an RP-18-Kieselgel konnte das C8-AB-Phosphat-Phosphonat **56** in einer Ausbeute von 16 % isoliert werden und das C14-AB-Phosphat-Phosphonat **57** in einer Ausbeute von 36 %. Auch hier war im Vergleich die Ausbeute zur Synthese des C11-AB-Phosphat-Phosphonats **50** mit 49 % am höchsten (vgl. Abbildung 86). Diese Ausbeuten sind insgesamt vergleichbar mit den Ausbeuten, die JIA *et al.* für die Synthese von AB-maskierten Nucleosiddiphosphaten sowie AB-maskierten Phosphat-Phosphonaten beschrieben. Hierbei lagen die Ausbeuten zwischen 29 % und 54 %.^[169]

Im Folgenden werden die entstandenen Nebenprodukte erneut anhand der C8-AB-maskierten Verbindung **56** erläutert. Nach mehrfacher säulenchromatographischer Reinigung an RP-18-Kieselgel konnten neben dem gewünschten Produkt **56** weitere Nebenprodukte isoliert werden.

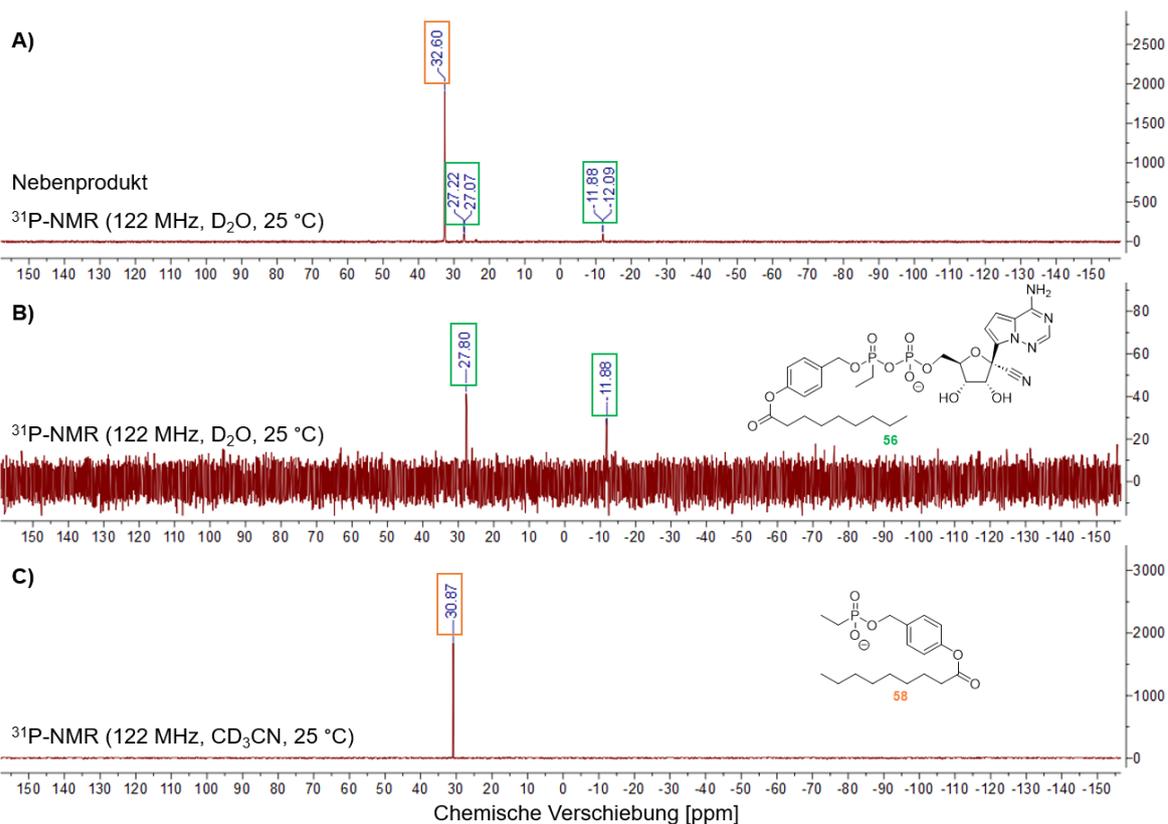


Abbildung 93: **A)** ^{31}P -NMR-Spektrum einer isolierten Nebenfraktion. Die unterschiedlichen Phosphorsignale wurden farbig hervorgehoben. Das NMR-Spektrum wurde in D_2O und bei 122 MHz aufgenommen. **B)** ^{31}P -NMR-Spektrum des sauberen Phosphat-Phosphonats **56**. Die Phosphorsignale wurden in grün hervorgehoben. Das NMR-Spektrum wurde in D_2O und bei 122 MHz aufgenommen. **C)** ^{31}P -NMR-Spektrum des Phosphonats **58**. Die Phosphorsignale wurden in orange hervorgehoben. Das NMR-Spektrum wurde in CD_3CN und bei 122 MHz aufgenommen.

Das ^{31}P -NMR-Spektrum eines der erhaltenen Nebenprodukte ist in Abbildung 93A dargestellt. Die Identifikation dieses Produktes erfolgte durch den Vergleich mit den ^{31}P -NMR-Spektren des reinen Produktes und Eduktes (Abbildung 93, B und C). Das ^{31}P -NMR-Spektrum des Nebenproduktes wies insgesamt drei Phosphorsignale auf, von denen zwei eine charakteristische chemische Verschiebung für bereits vorher identifizierte Phosphonate zeigten. Ein weiteres Signal lag im charakteristischen Bereich für Diphosphate (Abbildung 93, A). Beim Vergleich dieses Spektrums mit dem ^{31}P -NMR-Spektrum des Produktes **56** (Abbildung 93, B) und des Eduktes **58** (Abbildung 93, C) konnten signifikante Ähnlichkeiten beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass ein Gemisch aus nicht umgesetztem Edukt **58** und Produkt **56** als eine der Nebenfraktionen isoliert wurde.

Eine weitere isolierte Fraktion zeigte im aufgenommenen ^{31}P -NMR-Spektrum hauptsächlich Signale bei -8 bzw. -11 ppm (Abbildung 94, oben). Diese chemische Verschiebung war bereits ein Indiz dafür, dass ein Diphosphat vorlag.

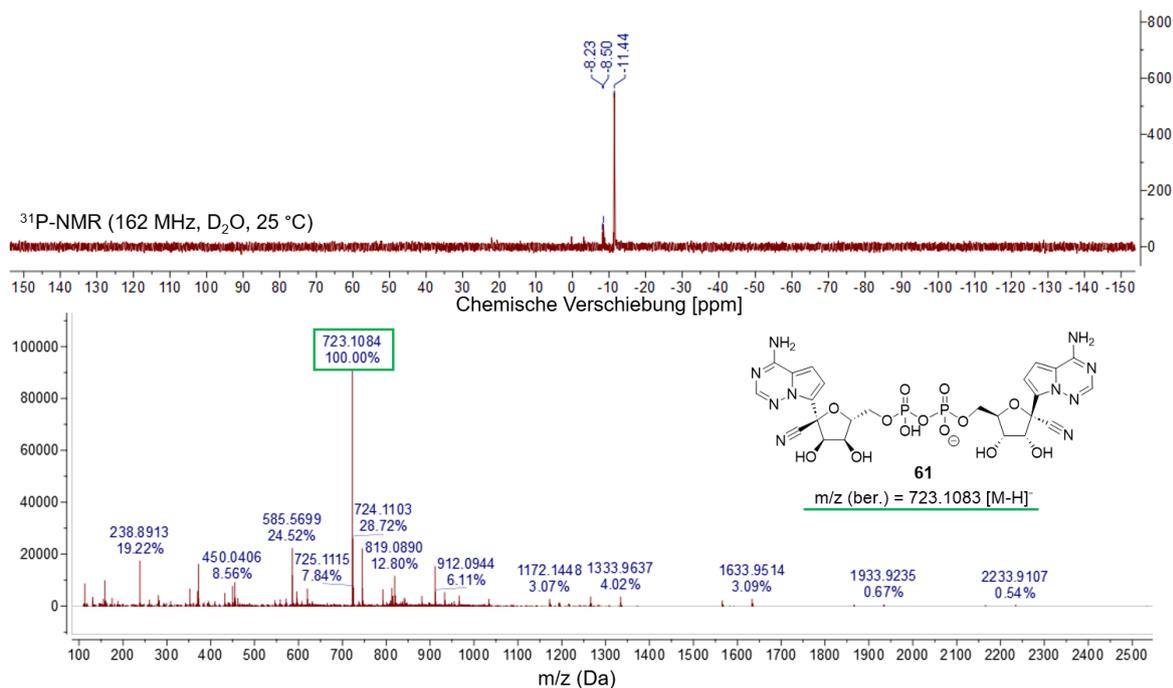


Abbildung 94: Oben: ³¹P-NMR-Spektrum der Substanz in einer isolierten Nebenfraktion gemessen in D₂O und bei 162 MHz. Unten: ESI-Massenspektrum der isolierten Fraktion gemessen im Negativionenmodus. Die berechnete exakte Masse und die entsprechende gefundene Masse des Diphosphats **61** sind in grün hervorgehoben.

Das MS-Spektrum dieser isolierten Fraktion deutete dann auf das Diphosphat **61** hin (Abbildung 94, unten). Dies bedeutete, dass bei der Kupplungsreaktion das aktivierte Remdesivir-Monophosphat **31** mit sich selbst reagierte und zum entsprechenden Diphosphat **61** umgesetzt wurde. Dieses Produkt wurde lediglich bei der Synthese des C8-AB-Phosphat-Phosphonats **56** festgestellt. Dies könnte daran liegen, dass diese Kupplungsreaktion als einzige Reaktion ohne den Zusatz von minimalen Mengen an DMF durchgeführt wurde (vgl. Abbildung 86 und Abbildung 92). Vermutlich löste sich dadurch hauptsächlich die aktivierte Imidazolidat-Form des Monophosphats in Acetonitril, sodass eine Reaktion mit sich selbst ebenfalls stattfinden konnte. Das Phosphonat **58** hingegen schien sich nur im geringen Maße gelöst zu haben. Eine Reaktion zwischen zwei aktivierten Monophosphaten konnte ebenfalls in Arbeiten von GOLLNEST beobachtet werden. Er argumentierte damit, dass dies vorkommen könne, wenn die Konzentration der Reaktionslösung zu hoch sei.^[155]

Die hier auftauchende Reaktion zwischen zwei Remdesivir-Monophosphaten **31** würde ebenfalls erklären, weshalb nicht umgesetztes Phosphonat **58** reisoliert werden konnte (vgl. Nebenprodukt in Abbildung 93)

Eine letzte isolierte Fraktion wurde erneut zunächst anhand von ³¹P-NMR-Spektren charakterisiert (Abbildung 95, **A**). Dieses Spektrum wies insgesamt drei Phosphorsignale auf, wobei ein Signal im charakteristischen Bereich für Phosphonate (ca. 22 ppm) lag, ein

weiteres Signal charakteristisch für Monophosphate (0.14 ppm) schien und ein letztes Signal eine charakteristische chemische Verschiebung für Diphosphate (ca. -11 ppm) aufwies.

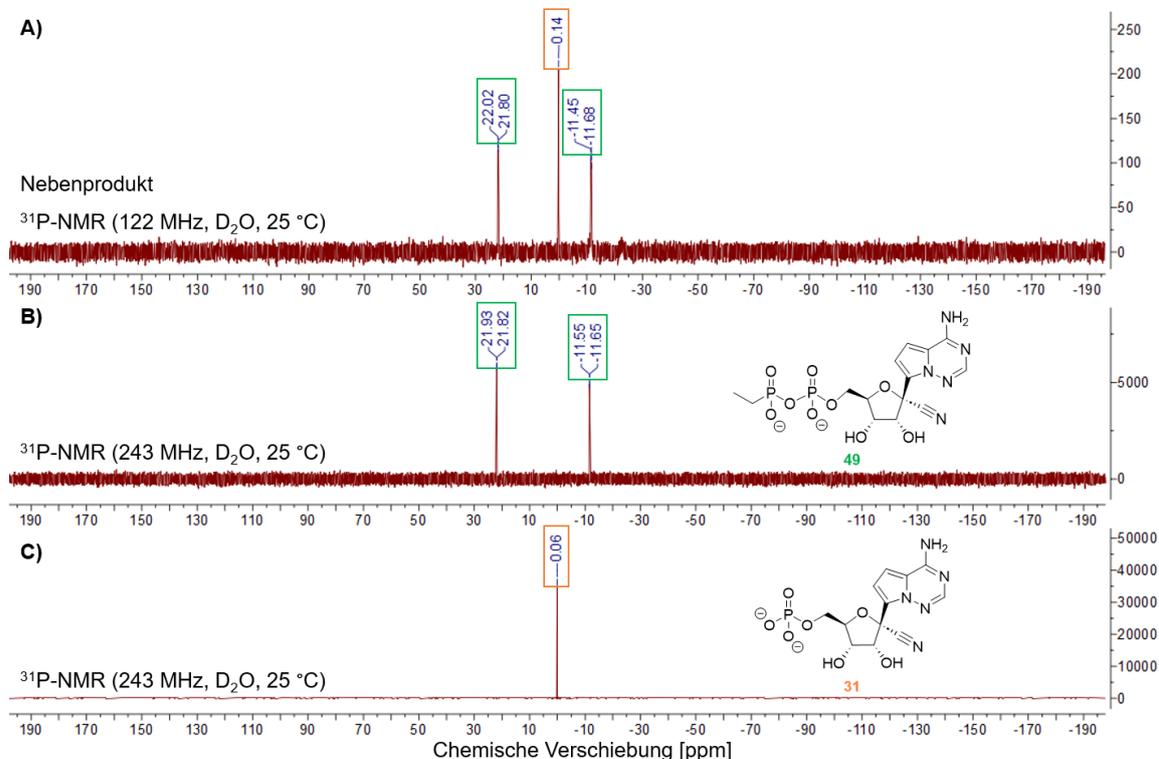


Abbildung 95: **A)** ^{31}P -NMR-Spektrum einer isolierten Nebenfraktion. Die unterschiedlichen Phosphorsignale wurden farbig hervorgehoben. Das NMR-Spektrum wurde in D_2O und bei 122 MHz aufgenommen. **B)** ^{31}P -NMR-Spektrum des sauberen Phosphat-Phosphonats **49**. Die Phosphorsignale wurden in grün hervorgehoben. Das NMR-Spektrum wurde in D_2O und bei 243 MHz aufgenommen. **C)** ^{31}P -NMR-Spektrum des Monophosphats **31**. Die Phosphorsignale wurden in orange hervorgehoben. Das NMR-Spektrum wurde in D_2O und bei 243 MHz aufgenommen.

Beim Vergleich dieses Spektrums mit dem ^{31}P -NMR-Spektrum des unmaskierten Phosphat-Phosphonats **49** (Abbildung 95, **B**) und des Monophosphats **31** (Abbildung 95, **C**) konnten signifikante Ähnlichkeiten beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass die isolierte Nebenfraktionen ein Gemisch aus dem unmaskierten Produkt **49** und dem Edukt **31** war.

Zusätzlich wurde von dieser dritten Nebenfraktion ein ^1H -NMR-Spektrum aufgenommen (Abbildung 96, oben). Es war zu erkennen, dass im charakteristischen aliphatischen Bereich lediglich die Signale für den Ethylrest des Phosphonats **49** detektiert wurden.

Resultate und Diskussion

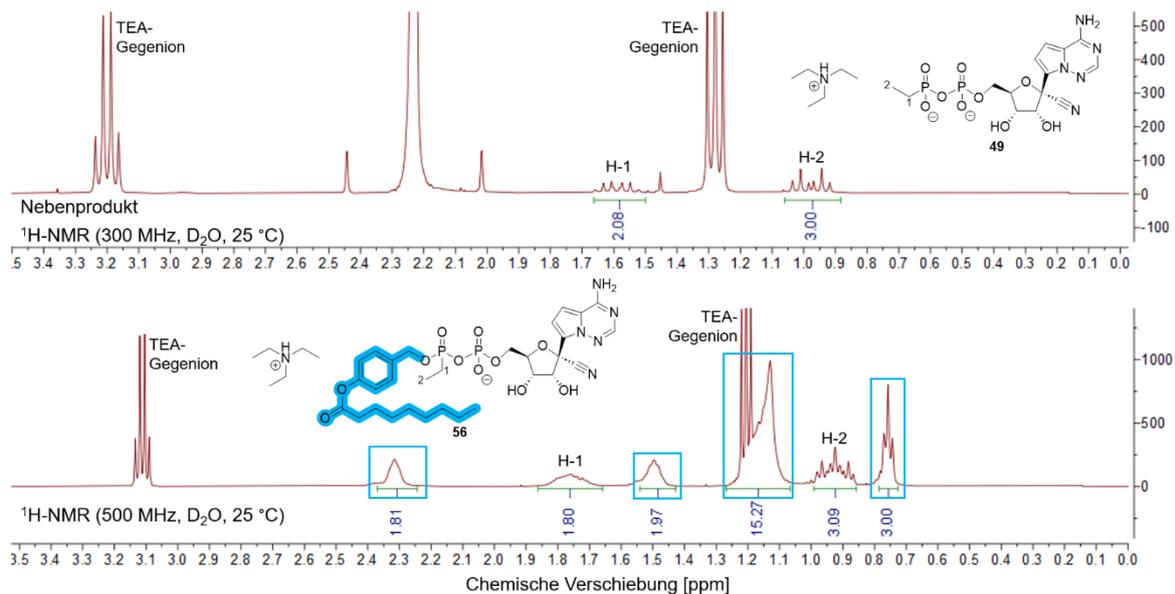


Abbildung 96: Oben: ¹H-NMR-Spektrum der isolierten Nebenfraktion gemessen in D₂O und bei 300 MHz. Unten: ¹H-NMR-Spektrum des Phosphat-Phosphonats mit C8-AB-Maske **56**. Die Protonensignale der Acyloxybenzylgruppe wurden in blau hervorgehoben.

Das ¹H-NMR-Spektrum der isolierten Nebenfraktion wurde außerdem mit dem ¹H-NMR-Spektrum des C8-AB-maskierten Phosphat-Phosphonats **56** verglichen (Abbildung 96, unten). Es war direkt zu erkennen, dass die in blau hervorgehobenen Protonensignale der Acyloxybenzylgruppe nicht in dem ¹H-NMR-Spektrum der isolierten Fraktion zu beobachten waren.

Ferner konnte in dem aufgenommenen Massenspektrum die Masse des einfach negativ geladenen Phosphat-Phosphonats **49** von 462.0405 g/mol mit einer relativen Häufigkeit von 100 % detektiert werden (Abbildung 97).

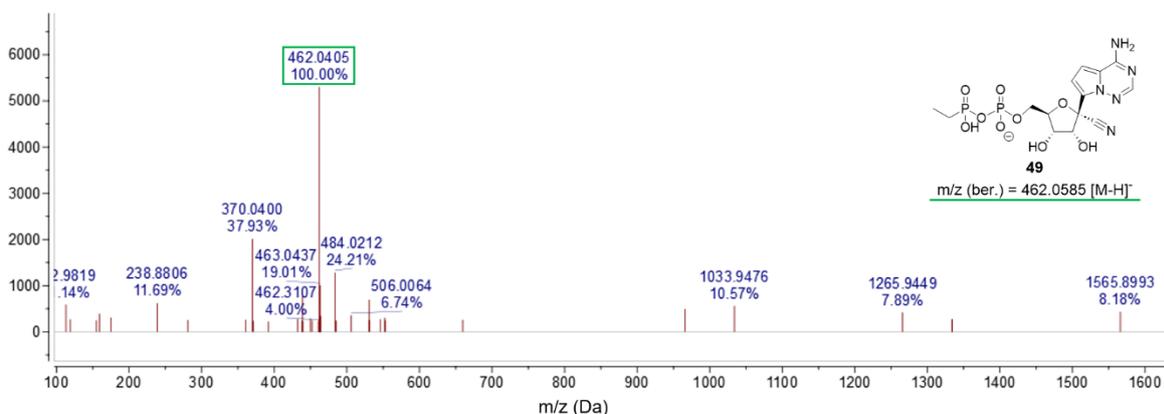


Abbildung 97: ESI-Massenspektrum der isolierten Nebenfraktion gemessen im Negativionenmodus. Die berechnete exakte Masse und die entsprechende gefundene Masse des Phosphat-Phosphonats **49** sind in grün hervorgehoben.

Anhand der gesamten analytischen Daten konnte mit Sicherheit festgestellt werden, dass es sich bei der dritten Nebenfraktion, um das ungeschützte Phosphat-Phosphonat **49** handelte. Die Entstehung dieses Produktes **49** könnte über zwei mögliche Wege erklärt werden. Eine Möglichkeit war, dass in der vorangegangenen Reaktion zur Synthese des Phosphonats **58** das nicht umgesetzte Edukt **53** hydrolysiert wurde und während der Reinigung des Phosphonats **58** nicht ausreichend entfernt werden konnte (vgl. Abbildung **90**). Dies wurde allerdings für unwahrscheinlich erachtet, da die Synthese der Phosphonate so unkontrolliert ablief, dass neben den einfach maskierten Phosphonaten auch die zweifach maskierten Phosphonate isoliert wurden (vgl. Abbildung 91). Eine zweite Möglichkeit wäre, dass es während der Reaktion zur Bildung des gewollten Produktes **56** kam und anschließend während der Reinigungsschritte zerfiel. Dies würde bedeuten, dass das C8-AB-maskierte Phosphat-Phosphonat **56** eine geringere Stabilität aufweist als die entsprechenden langkettigen Verbindungen **50** und **59**. Um diese Annahme überprüfen zu können, sollten im nächsten Schritt chemische Hydrolysestudien von allen maskierten Phosphat-Phosphonaten durchgeführt und miteinander verglichen werden.

6.1.6.1 Chemische Hydrolyse aller maskierten Phosphat-Phosphonate in PBS-Puffer

Die chemischen Hydrolysestudien der Phosphat-Phosphonate **50**, **56** und **57** in PBS-Puffer wurden analog zu Kapitel 6.1.4.1 durchgeführt und nochmals detailliert in Kapitel 7.2.1 beschrieben.

Im Folgenden sind die HPL-Chromatogramme der PBS-Hydrolyse des C14-AB-maskierten Phosphat-Phosphonats **57** dargestellt (Abbildung 98). Nach einer Inkubationszeit von acht Stunden konnte noch immer eine signifikant hohe Menge der maskierten Form **57** beobachtet werden. Das Verhältnis der maskierten Form **57** zur unmaskierten Form **49** betrug nach 72 Stunden nahezu 1:1. Erst nach zwei Wochen konnte mittels HPL-Chromatographie eine vollständige chemische Hydrolyse der C14-AB-Maske beobachtet werden (Abbildung 98).

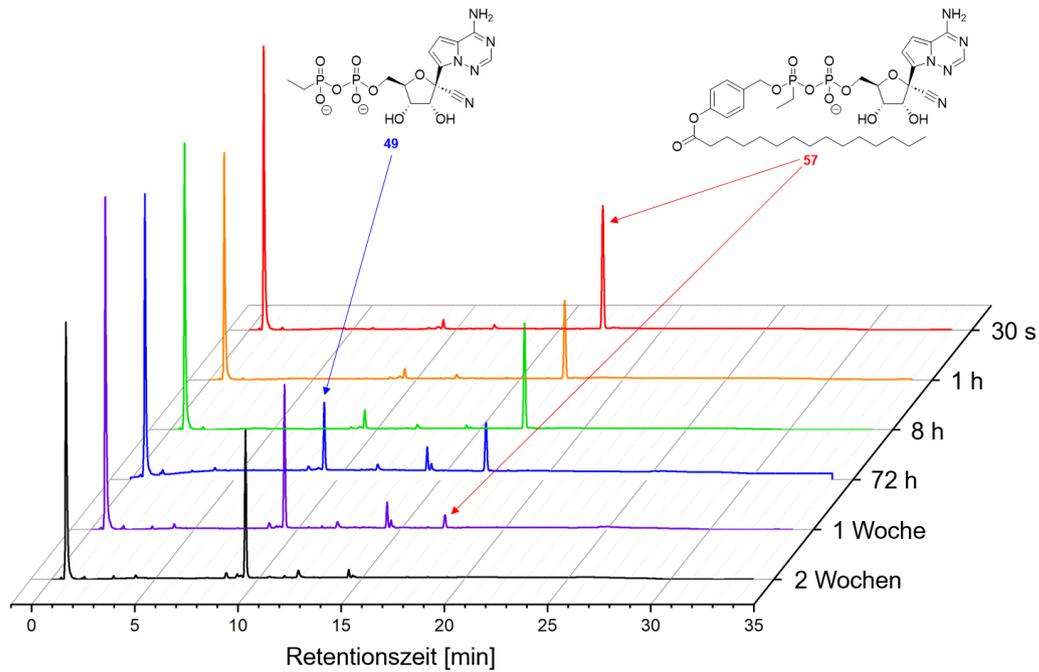


Abbildung 98: Hydrolyseverlauf des C14-AB-maskierten Phosphat-Phosphonats **57** nach zweiwöchiger Inkubation in PBS-Puffer, bei 37 °C und bei einem physiologischen pH von 7.3.

Bei der PBS-Hydrolyse des Phosphat-Phosphonats mit der C11-AB-Maskierungseinheit **50** wurde wiederum eine schnellere chemische Hydrolyse der AB-Maske beobachtet im Vergleich zur C14-AB-maskierten Verbindung **59** (Abbildung 99). Hierbei war bereits nach 72 Stunden eine nahezu vollständige Spaltung der AB-Maskierungseinheit zu beobachten.

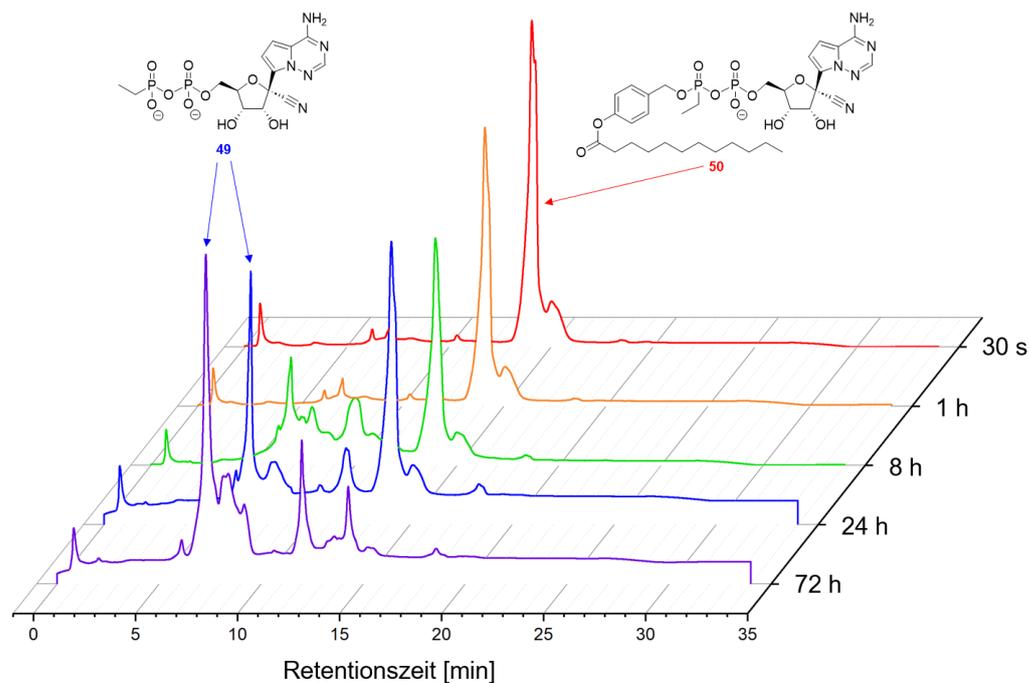


Abbildung 99: Hydrolyseverlauf des C11-AB-maskierten Phosphat-Phosphonats **50** nach dreitägiger Inkubation in PBS-Puffer, bei 37 °C und bei einem physiologischen pH von 7.3.

Die chemische Hydrolyse des C8-AB-maskierten Phosphat-Phosphonats **56** wies wiederum eine langsamere Spaltung der AB-Masken auf (Abbildung 100). Erst nach einer Inkubationszeit von 8 Stunden wurde eine minimale Menge des ungeschützten Phosphat-Phosphonats **49** gebildet.

Überdies wurde festgestellt, dass erst nach einer Woche die Menge des gebildeten unmaskierten Phosphat-Phosphonats **49** der Menge der maskierten Form **56** übertraf. Trotz dessen wurden nach einer Woche noch immer signifikante Mengen des maskierten Phosphat-Phosphonats **56** detektiert. Die Gesamtdauer der PBS-Hydrolyse des C8-AB-maskierten Phosphat-Phosphonats **56** betrug vier Wochen, wobei selbst dann noch keine vollständige chemische Hydrolyse der Maske beobachtet werden konnte. Diese Erkenntnisse sprechen wiederum gegen eine vermutete geringe Stabilität des Prodrugs **56** (vgl. Abbildung 93).

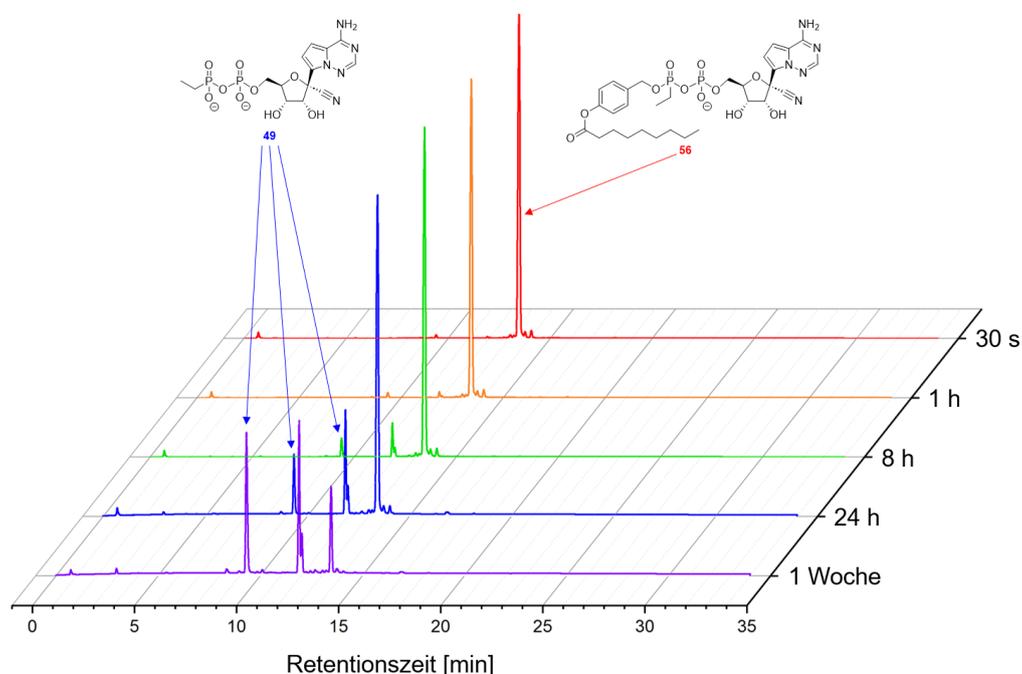


Abbildung 100: Hydrolyseverlauf des C8-AB-maskierten Phosphat-Phosphonats **56** nach einwöchiger Inkubation in PBS-Puffer, bei 37 °C und bei einem physiologischen pH von 7.3.

In einem nächsten Schritt sollten anhand der Bildungs- und Zerfallskurven die Halbwertszeiten bestimmt werden (Abbildung 101). Dabei konnten die Halbwertszeiten nur von der C11-AB-maskierten Verbindung **50** und der C14-AB-maskierten Verbindung **57** bestimmt werden, da bei dem Hydrolyseexperiment des C8-AB-maskierten Phosphat-Phosphonats **56** keine vollständige chemische Hydrolyse zum unmaskierten Molekül **49** stattfand. Dies sprach dafür, dass die Stabilität des C8-AB-maskierten Prodrugs **56** höher als die der anderen beiden Verbindungen **50** und **57** sein musste, da bei diesen bereits

nach einer bzw. zwei Wochen die vollständige Spaltung der AB-Maske beobachtet werden konnte.

Anhand der Zerfallskurve des C11-AB-Phosphat-Phosphonats **50** (Abbildung 101, **A** rot) war ersichtlich, dass es sich hier eher um einen linearen Zerfall handelte, während bei dem C14-AB-Phosphat-Phosphonat **57** (Abbildung 101, **B** rot) näherungsweise ein exponentieller Zerfall beobachtet wurde. Die ermittelte Halbwertszeit beträgt $t_{1/2} = 21$ Stunden für die Verbindung **50** und $t_{1/2} = 93$ Stunden für die Verbindung **57**. Somit scheint das Prodrug mit der C14-AB-Maske **57** eine vierfach höhere chemische Stabilität aufzuweisen als das Prodrug mit der C11-AB-Maskierungseinheit.

Die Halbwertszeit für das C11-AB-maskierte Phosphat-Phosphonat **50** ist außerdem kleiner als die Halbwertszeiten von vergleichbaren DiPPro-Verbindungen mit einer C11-AB-Maske.^[125] Auch im Vergleich zum zuvor synthetisierten Prodrug **36** besitzt das Phosphat-Phosphonat **50** eine dreimal geringere Halbwertszeit (vgl. Kapitel 6.1.4.1). Dies kann allerdings von Vorteil sein, da dadurch der Inhibitor **49** noch schneller und effizienter in der Zelle freigesetzt werden könnte.

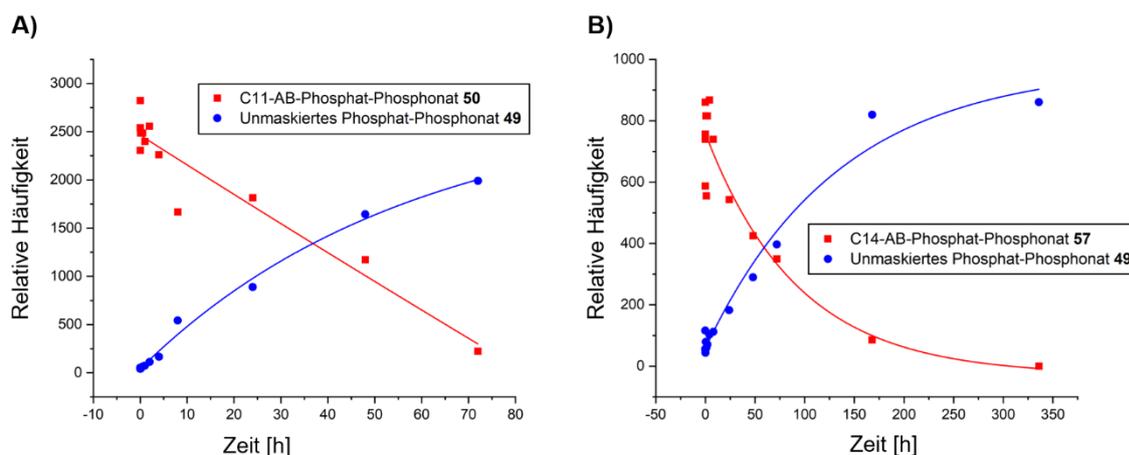


Abbildung 101: Bildungs- und Zerfallskurven der PBS-Hydrolyse des **A**) C11-AB-maskierten Prodrugs **50** und des **B**) C14-AB-maskierten Prodrugs **57**. Die Bildungskurven sind blau und die Zerfallskurven rot dargestellt.

Auch für das C14-AB-maskierte Phosphat-Phosphonat **57** wurde eine geringere Halbwertszeit bestimmt, verglichen zu DiPPro-Verbindungen mit ähnlicher Maskierung. JIA *et al.* wiederum ermittelten für ihre AB-maskierten Phosphat-Phosphonate ähnliche Halbwertszeiten. Allerdings wiesen alle von ihnen vermessenen Phosphat-Phosphonate eine AB-Maske mit einem Butylrest auf, weshalb keine direkte Vergleichbarkeit gegeben ist.^[169]

Alle synthetisierten maskierten Phosphat-Phosphonate **50**, **56** und **57** wiesen eine ausreichende chemische Stabilität auf und bedurften keiner besonderen und schnellen Handhabung sowie Lagerung.

6.1.6.2 Enzymatische Hydrolyse aller maskierten Phosphat-Phosphonate in PLE

Die enzymatischen Hydrolysestudien der Phosphat-Phosphonate **50**, **57** und **59** in PLE wurden analog zu Kapitel 6.1.4.2 durchgeführt und nochmals detailliert in Kapitel 7.2.2 beschrieben.

Im Folgenden sind die HPL-Chromatogramme der PLE-Hydrolyse des C8-AB-Phosphat-Phosphonats **56** abgebildet (Abbildung 102). Anhand des Hydrolyseverlaufes wurde festgestellt, dass nach einer Inkubationszeit von einer Minute die Menge an detektiertem maskiertem Phosphat-Phosphonat **56** genauso hoch war wie die Menge an unmaskiertem Phosphat-Phosphonat **49**. Während das Prodrug **56** eine hohe chemische Stabilität in PBS-Puffer zeigte (vgl. Abbildung 100), konnte bereits nach einer halben Stunde eine vollständige enzymatische Hydrolyse der AB-Maske beobachtet werden (Abbildung 102).

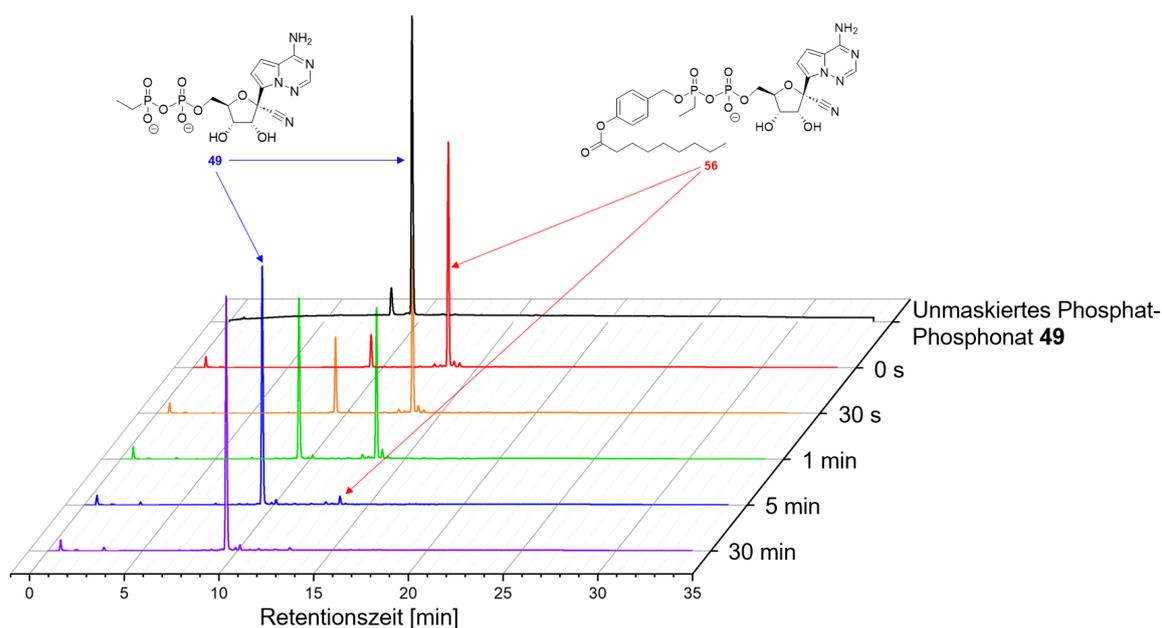


Abbildung 102: Hydrolyseverlauf des C8-AB-maskierten Phosphat-Phosphonats **56** nach Inkubation für insgesamt 30 Minuten mit PLE, bei 37 °C und bei einem physiologischen pH von 7.3.

Bei der PLE-Hydrolyse des C11-AB-maskierten Phosphat-Phosphonats **50** wurden bereits in der Probe, die unmittelbar nach Zugabe der Esterase zur Hydrolyselösung entnommen

wurde, signifikante Mengen des unmaskierten Phosphat-Phosphonats **49** detektiert (Abbildung 103).

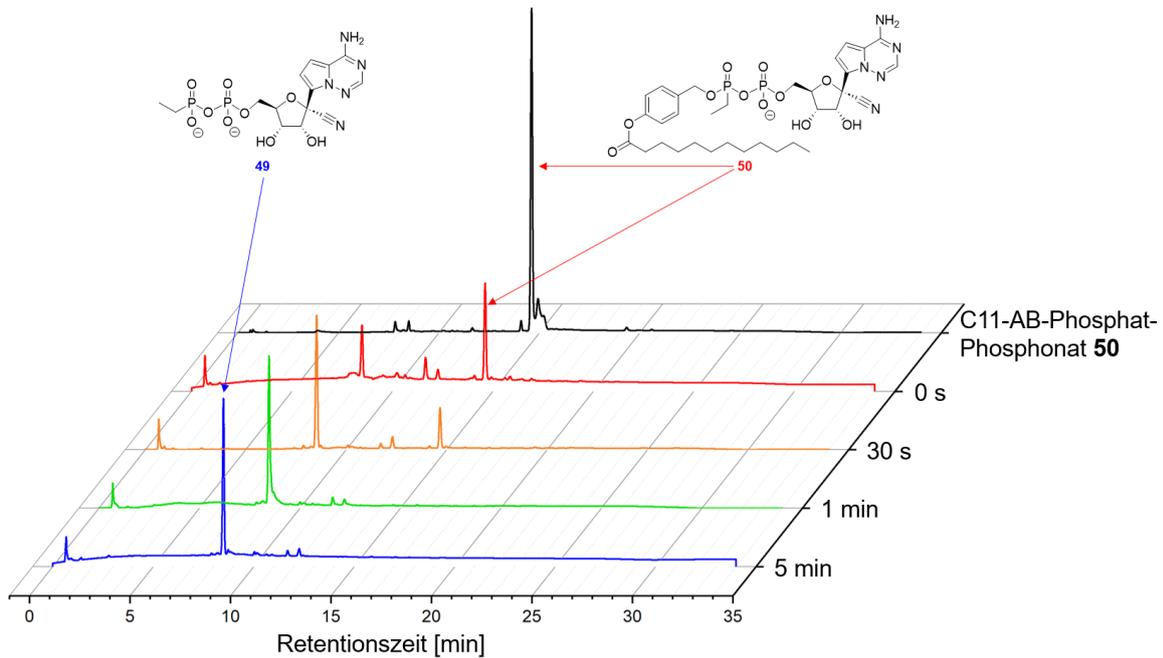


Abbildung 103: Hydrolyseverlauf des C11-AB-maskierten Phosphat-Phosphonats **50** nach Inkubation für insgesamt 5 Minuten mit PLE, bei 37 °C und bei einem physiologischen pH von 7.3.

Ferner konnte nach einer Inkubationszeit von einer Minute eine vollständige enzymatische Hydrolyse der AB-Maske festgestellt werden.

Im Vergleich dazu zeigten die HPL-Chromatogramme der PLE-Hydrolyse des C14-AB-maskierten Phosphat-Phosphonats **57** auch nach 30 Sekunden noch keine Bildung der unmaskierten Form **49** (Abbildung 104). Erst nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurde eine erhebliche Bildung des unmaskierten Phosphat-Phosphonats **49** beobachtet.

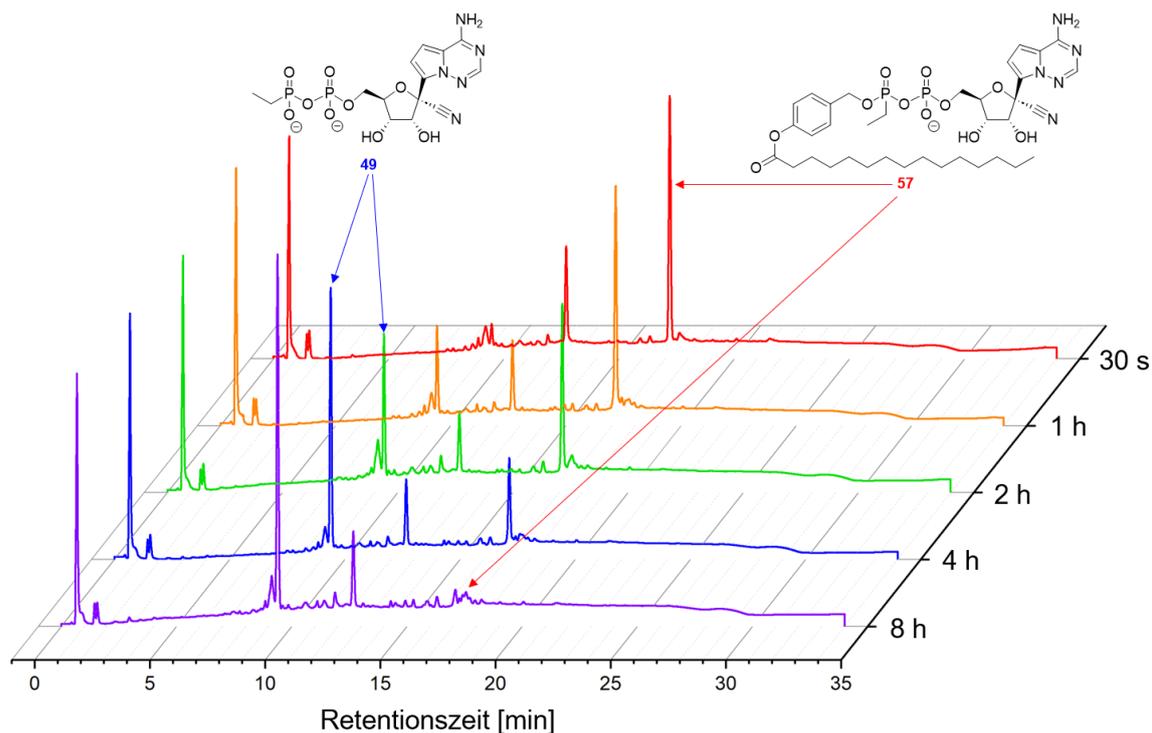


Abbildung 104: Hydrolyseverlauf des C14-AB-maskierten Phosphat-Phosphonats **57** nach achtstündiger Inkubation mit PLE, bei 37 °C und bei einem physiologischen pH von 7.3.

Die vollständige enzymatische Hydrolyse der C14-AB-Maske konnte erst nach acht Stunden festgestellt werden (Abbildung 104).

Anhand der Hydrolysestudien wurden für alle maskierten Phosphat-Phosphonate Bildungs- und Zerfallskurven erstellt sowie die Halbwertszeiten bestimmt (Abbildung 105). Für das Prodrug mit der C8-AB-Maske wurde eine Halbwertszeit von $t_{1/2} = 2.1$ min ermittelt und für das Prodrug mit der C11-AB-Maske ergab die Halbwertszeit $t_{1/2} = 29.9$ s. Diese Halbwertszeiten sind etwas geringer als die von JIA *et al.* publizierten Halbwertszeiten der C4-AB-maskierten Phosphat-Phosphonate.^[162] Jedoch waren die bestimmten Halbwertszeiten vergleichbar mit den von WEINSCHENK *et al.* und MEIER *et al.* publizierten Halbwertszeiten von DiPPro-Verbindungen mit gleichen AB-Masken und unterschiedlichen Nucleosiden.^[124,125]

Für das C14-AB-maskierte Phosphat-Phosphonat **57** wurde eine Halbwertszeit von $t_{1/2} = 4.1$ h bestimmt. Diese Halbwertszeit ist sehr viel höher als die vorher ermittelten Halbwertszeiten der Prodrugs **50** und **56**. In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits festgestellt, dass ein Acylrest mit langer Kettenlänge zu einem Anstieg der Halbwertszeit führte. Dies wurde damit begründet, dass ein erhöhter sterischer Anspruch vorliegt und somit der Zugang zur Acylfunktion für das Enzym erschwert wird. Außerdem wurde berichtet, dass ab einer Kettenlänge von C12 nicht mehr vorrangig Esterasen die enzymatische Spaltung der AB-Maske induzieren, sondern eventuell eher Lipasen aufgrund der hohen Lipophilie.^[129,131]

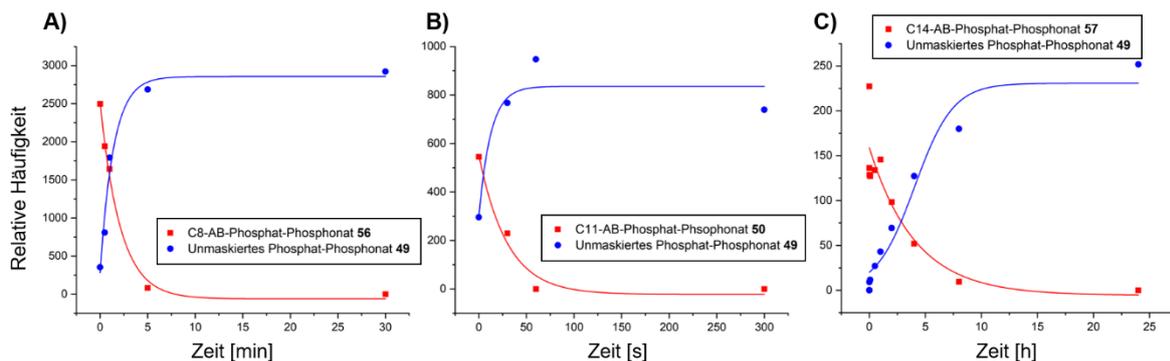


Abbildung 105: Bildungs- und Zerfallskurven der PLE-Hydrolyse des **A)** C8-AB-maskierten Prodrugs **56**, des **B)** C11-AB-maskierten Prodrugs **50** und des **C)** C14-AB-maskierten Prodrugs **57**. Die Bildungskurven sind blau und die Zerfallskurven rot dargestellt.

Insgesamt konnte bei allen AB-maskierten Phosphat-Phosphonaten eine enzymatische Spaltung durch PLE festgestellt werden. Dabei waren die Halbwertszeiten der enzymatischen Spaltung der C8-AB- und C11-AB-maskierten Verbindung **56** und **50** kurz und somit sehr schnell. Dies lässt darauf schließen, dass bei einem Einsatz der Prodrugs in zellbasierten Assays eine schnelle und effiziente Freisetzung des Inhibitors **49** in der Zelle gewährleistet ist. Allerdings sollte vor allem im Fall des Prodrugs mit der C8-AB-Maske **56** geprüft werden, ob eine ausreichende Lipophilie für eine Diffusion durch die Zellmembran vorliegt.

Für eine erste Annahme wurden die Retentionszeiten der AB-maskierten Phosphat-Phosphonate **56** (C8-AB), **50** (C11-AB) und **57** (C14-AB) mit der DiPPro-Verbindung **36** verglichen, da für das Prodrug **36** eine ausreichende Lipophilie für eine effiziente Zellaufnahme festgestellt werden konnte (vgl. Kapitel 6.1.4.3).

Die Retentionszeiten der AB-maskierten Phosphat-Phosphonate lauten 13.44 min für das C8-AB-maskierte Phosphat-Phosphonat **56**, 14.10 min für das C11-AB-maskierte Phosphat-Phosphonat **50** und 17.21 min für die C14-AB-maskierte Verbindung **57**. Das Prodrug **36** hat eine Retentionszeit von 15.56 min und ist somit kürzer als die Retentionszeit des C14-AB-maskierten Phosphat-Phosphonats **57**. Somit kann vermutet werden, dass die Lipophilie dieser Verbindung **57** ausreichend sein sollte für ein Passieren der Zellmembran. Dies wurde angenommen, da bereits eine erfolgreiche Zellaufnahme in Calu-3-Zellen für das Prodrug **36** bestätigt wurde (vgl. Kapitel 6.1.4.3, S. 74). Bei einem Vergleich der Retentionszeiten der C8-AB- **56** und der C11-AB-maskierten Verbindung **50** mit dem DiPPro **36** ist auffällig, dass sie jeweils um 2 bzw. 1.5 Minuten kürzer sind. Für diese beiden maskierten Verbindungen **56** und **50** kann daher keine Vermutung aufgestellt werden, weshalb es wichtig erscheint diese zukünftig in Zellaufnahmestudien näher zu testen.

6.1.6.3 Vergleich der antiviralen Aktivität der Prodrugs **36** und **50** in Zellkultur-Infektions-Assays

Für die Untersuchung der antiviralen Wirkung der potentiellen Inhibitoren **36** und **50** auf die virale Transkription und Replikation wurden, in Kooperation mit Dr. Susanne Pfefferle (UKE, Projekt A18, SFB 1328), Infektions-Assays in Calu-3-Zellen durchgeführt. Zunächst wurden Calu-3-Zellen mit rekombinantem SARS-CoV-2 infiziert. Diese rekombinanten Viren codierten für einen Luciferase-Reporter, der Biolumineszenz aufweist. Dieses Reporter-gen wurde in das Wildtyp-Virus (intaktes Mac1) (Abbildung 106, Wildtyp, blau) und in SARS-CoV-2 mit katalytisch inaktiver Mac1 (Abbildung 106, Mutante, rot) eingesetzt.

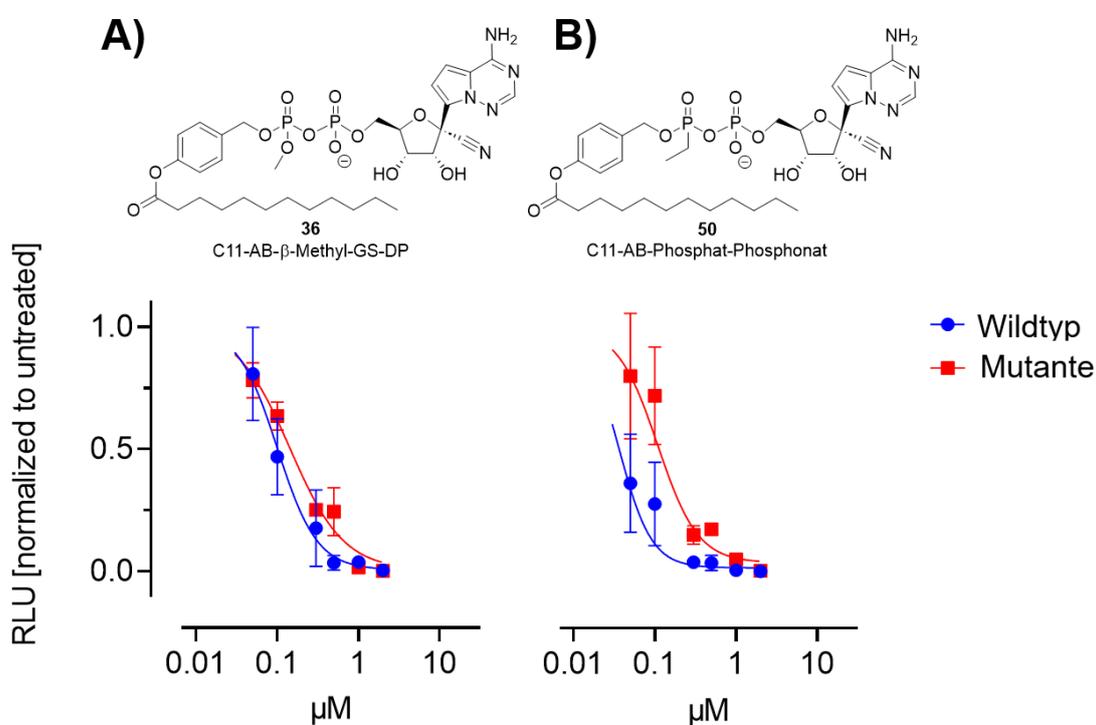


Abbildung 106: Infektions-Assay in Calu-3-Zellen mit rekombinantem SARS-CoV-2 durchgeführt durch Dr. Susanne Pfefferle (UKE, Projekt A18, SFB 1328). Es wurde ein Luciferase-Reportgen in Wildtyp-SARS-CoV-2 (intakte Mac1, blau) und in Mutante-SARS-CoV-2 (katalytisch inaktive Mac1, rot) eingesetzt. **A)** Infektions-Assay mit dem C11-AB-maskierten Diphosphat **36** als Inhibitor. **B)** Infektions-Assay mit dem C11-AB-maskierten Phosphat-Phosphonat **50** als Inhibitor.

Die Transkriptionsaktivität der beiden rekombinanten Viren (Wildtyp und Mutante) wurde mit steigender Konzentration des Inhibitors **36** und **50** untersucht. Das AB-maskierte Diphosphat **36** zeigte eine gute Hemmung beider Viren bei niedrigen Konzentrationen (Abbildung 106, **A**). Es wurde ein EC_{50} von $0.06 \mu\text{M}$ für den Wildtyp und ein EC_{50} von $0.16 \mu\text{M}$ für die Mutante bestimmt.

Auch bei vergleichbar niedrigen Konzentrationen den AB-maskierten Phosphat-Phosphonats **50** wurden beide Viren gehemmt. Es wurde ein EC₅₀ von 0.03 µM für den Wildtyp und ein EC₅₀ von 0.14 µM für die Mutante bestimmt. Zusätzlich wurde eine Mac1-spezifische Wirkung mit einer signifikant erhöhten Toleranz für den aktiven Metabolit des Prodrugs **50** beobachtet, was durch die Verschiebung der Inhibitionskurve festgestellt wurde (Abbildung **106, B**, blau).

Für beide Verbindungen konnte eine deutliche Inhibition in Infektions-Assays in Calu-3-Zellen nachgewiesen werden.

6.1.7 Darstellung von 7-Deazaadenosindiphosphatribose **62**

Die Inhibitorstrukturen **30** und **49** wurden durch eine schrittweise Modifikation der Ausgangsverbindung ADPR **25** erhalten. Dabei wurde zunächst das Strukturelement der terminalen Ribose minimiert, um so die inhibitorische Aktivität gegen die isolierte Macrodromäne 1 von SARS-CoV-2 zu steigern. In einem nächsten Schritt wurde Adenosin **33** durch das GS-441524-Nucleosid **4** ausgetauscht, welches ebenfalls ein Strukturmerkmal im Virostatikum Remdesivir darstellt. Dadurch konnte die inhibitorische Aktivität der letztendlich erhaltenen Strukturen **30** und **49** mindestens um ein 80-faches (im Fall vom Diphosphat **30**) bzw. um ein 15-faches (im Fall vom Phosphat-Phosphonat **49**) in Bezug zu ADPR **25** verbessert werden.

Wie bereits in Kapitel 4.4.1.2 beschrieben und in Vorarbeiten von SANDMANN erläutert, gibt es eine weitere Modifikation des Adenosinteils von ADPR **25**, die ebenfalls zu einem vielversprechenden Inhibitor führen könnte.^[99] Generell stellte sich aufgrund der bisherigen Kenntnisse über die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen heraus, dass die Einführung von raumgreifenden Substituenten an der Nucleobase keinen vorteilhaften Effekt hatten, allerdings wurde angenommen, dass der Austausch des Stickstoffatoms an der 7-Position von Adenin mit einem Kohlenstoffatom zu einem positiven Effekt hinsichtlich der Bindungsaffinität führen könnte. Das könnte daran liegen, dass die dadurch erhaltene 7-Deaza-Modifikation eine geringere Polarität aufweist und somit kompatibler mit der hauptsächlich hydrophoben Adenosin-Bindungsstelle im Enzym ist.

Aus diesem Grund sollte als neuer potentieller Inhibitor das Molekül 7-Deazaadenosindiphosphatribose **62** synthetisiert werden. Die entsprechende Retrosynthese ist in Abbildung **107** dargestellt.

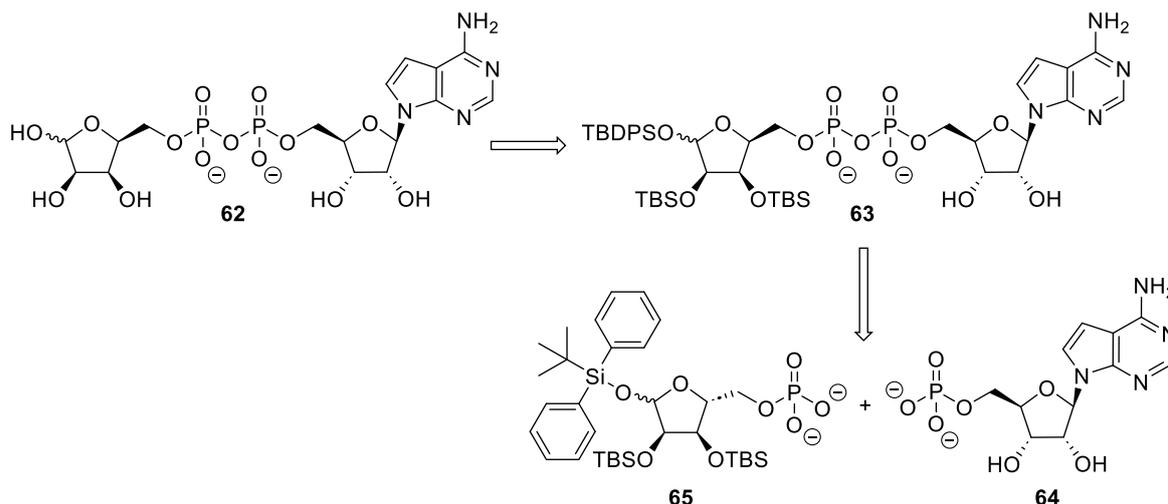


Abbildung 107: Retrosynthese zur Darstellung des Zielproduktes 7-Deazaadenosindiphosphat-ribose **62**.

Die Zielverbindung **62** sollte über die Entschützung der Silylschutzgruppen des 7-Deaza-ADPR-Derivats **63** und einer vorherigen Kupplung zwischen dem kommerziell erhältlichen 7-Deazaadenosinmonophosphat **64** und dem synthetisierten Monophosphat **65** erfolgen.

Das entsprechende vollständig mit Silylschutzgruppen versehene Ribosephosphat **65** sollte über das in Abbildung 108 dargestellte retrosynthetische Schema dargestellt werden.

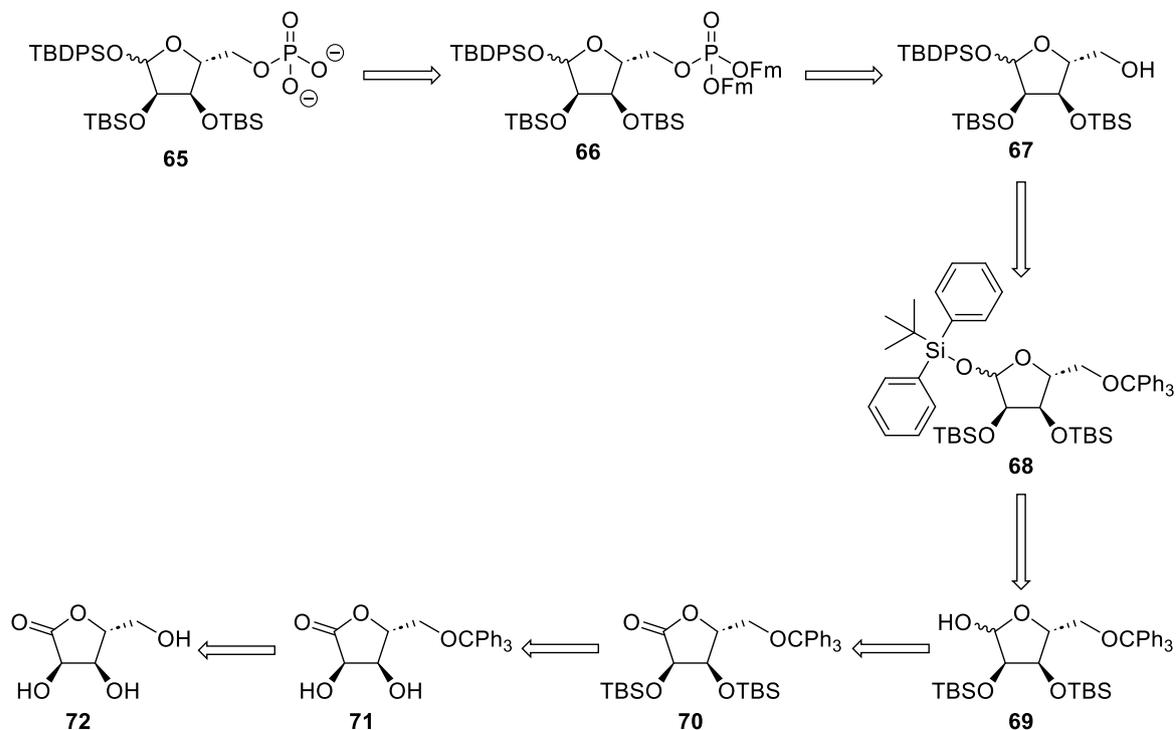


Abbildung 108: Retrosyntheschema zur Darstellung des silylierten Ribosephosphats **65** ausgehend vom kommerziell erhältlichen D-Ribonsäure-γ-lacton **72**.

In einem letzten Schritt sollte das Phosphat **65** über eine Entfernung der 9-Fluorenylmethylschutzgruppen realisiert werden. Das entsprechend vollständig geschützte Phosphat **66** sollte über die Phosphorylierung der 5'-Position der Verbindung **67** erfolgen. In einem vorherigen Schritt sollte die 5'-Position der Ribose **68** entschützt und die 1'-Position der Verbindung **69** mit einer *tert*-Butyldiphenylsilylgruppe geschützt werden. Das Halbacetal **69** sollte über eine Reduktion des vollständig geschützten Lactons **70** dargestellt werden. Dieses Lacton **70** sollte über die Schützung der sekundären Hydroxyfunktionen ausgehend von Verbindung **71** und einer Tritylschützung ausgehend vom kommerziell erhältlichen D-Ribonsäure- γ -lacton **72** synthetisiert werden.

Zunächst wurden die freien Alkoholgruppen des kommerziell erhältlichen D-Ribonsäure- γ -lactons **72** gemäß dem Orthogonalitätsprinzip mit Schutzgruppen versehen und anschließend über eine Reduktion das Halbacetal **69** gebildet (Abbildung 109).^[139]

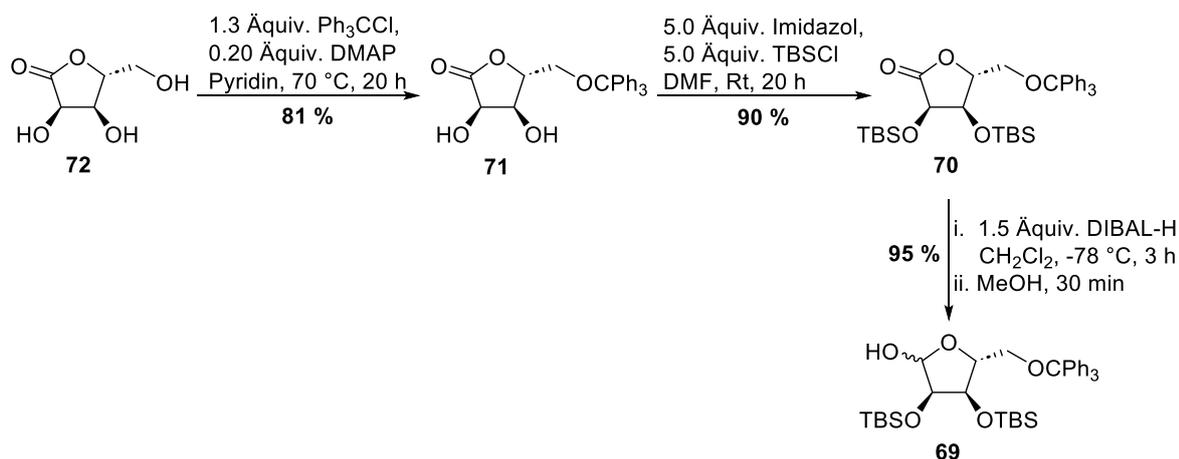


Abbildung 109: Reaktionsbedingungen zur Schützung der primären und sekundären Hydroxyfunktionen von D-Ribonsäure- γ -lacton **72** mit einer Trityl- und zwei *tert*-Butyldimethylsilylgruppen. Sowie eine anschließende Reduktion zum Halbacetal **69** unter Verwendung von Diisobutylaluminiumhydrid.^[139]

Die selektive Schützung aller freien Hydroxyfunktionen erfolgte in zwei Syntheseschritten, wobei nach jeder Reaktion wässrig aufgearbeitet und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt wurde.

Die primäre Alkoholfunktion wurde mittels Triphenylmethylchlorid und einer katalytischen Menge DMAP regioselektiv über eine S_N1 -Reaktion geschützt.^[170] Die Schützung der sekundären Hydroxyfunktionen an der 2- und 3-Position der Verbindung **71** erfolgte mittels DMF als Lösungsmittel, Imidazol als Base und *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (TBSCl) als Silylierungsreagenz. Das Reaktionsgemisch der Reduktion mittels Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL-H) wurde nach einer rund vierstündigen Reaktionszeit mit einer 0.5 M

Kalium-Natrium-Tartrat-Lösung versetzt, um das Reduktionsmittel zu komplexieren. Anschließend wurde die Reaktion dreimal mit Dichlormethan extrahiert, wobei die Aluminiumsalze in der wässrigen Phase verblieben. Abschließend wurde eine Reinigung mittels Säulenchromatographie an Kieselgel durchgeführt.

Alle Produkte der jeweiligen Reaktionen wurden in guten Ausbeuten isoliert, wobei das Halbacetal **69** als ein Anomerengemisch in einer Ausbeute von 95 % erhalten wurde.

Die erfolgreiche Reduktion konnte durch das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bestätigt werden (Abbildung 110). Bei dem Produkt **69** der Reduktionsreaktion wurde ein anomeres Zentrum generiert, welches im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum durch das Vorhandensein der anomeren Protonensignale mit einer chemischen Verschiebung von ca. 5.20 ppm beobachtet wurden (Abbildung 110, oben, grün). Bei dem Edukt **70** der Reaktion handelt es sich um ein Ribonolacton, welches kein anomeres Zentrum und somit auch keine Protonensignale mit besagter chemischer Verschiebung besitzt (Abbildung 110, unten, rot).

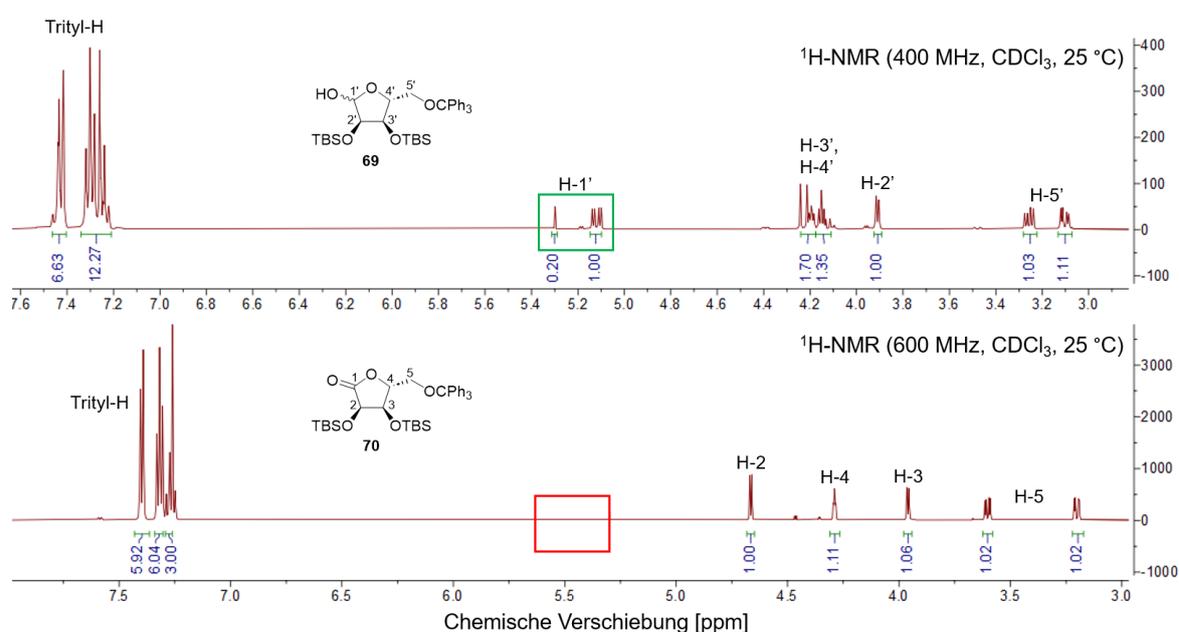


Abbildung 110: Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren des Halbacetals **69** und des Ribonolactons **70**. **Oben:** Das NMR-Spektrum wurde bei 400 MHz aufgenommen und die Probe in CDCl_3 gelöst. Die durch die Reduktion entstandenen anomeren Protonen wurden in grün hervorgehoben. **Unten:** Das NMR-Spektrum wurde bei 600 MHz aufgenommen und die Probe in CDCl_3 gelöst.

Anschließend zu der Reduktion sollte die 1'-Position, genauso wie die 2'- und 3'-Position, mit einer Silylschutzgruppe versehen werden. Hierbei wurde als Silylschutzgruppe eine *tert*-Butyldiphenylsilylgruppe (TBDPS) ausgewählt, damit die Verbindung **67** nach der folgenden 5'-Entschützung noch immer UV-aktiv ist. Die entsprechenden Reaktionsbedingungen sind in Abbildung 111 dargestellt.^[139]

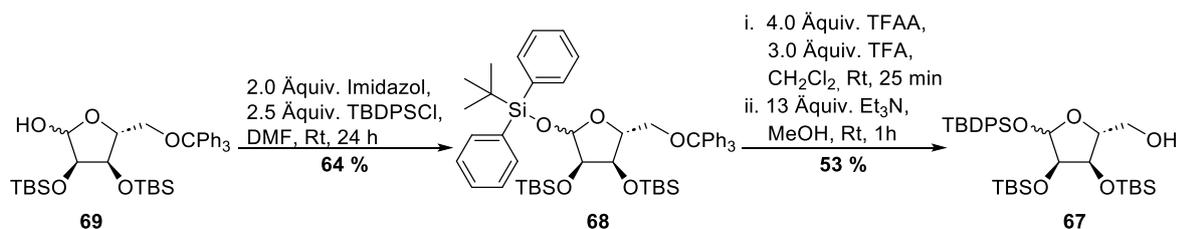


Abbildung 111: Reaktionsbedingungen zur Schützung des Halbacetals **69** mit einer Silylgruppe und zur Entfernung der 5'-Tritylgruppe von Verbindung **68**.^[139]

Die vollständig geschützte Ribose **68** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel in einer Ausbeute von 64 % isoliert. Die moderate Ausbeute könnte durch das Auftreten einer möglichen Nebenreaktion erklärt werden. Neben der Reaktion von Imidazol mit dem Silylierungsreagenz unter Bildung eines TBS-Imidazolidat-Intermediates, welches letztlich zur Silylierung der Hydroxygruppe führt, ist ebenfalls eine Reaktion zwischen DMF **73** und *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (TBDPSCI, **74**) möglich. Der entsprechende Mechanismus ist in Abbildung 112 zusammengefasst. Durch einen nucleophilen Angriff vom Lösungsmittel **73** am Silylierungsreagenz **74** kann ein DMF-TBDPS-Komplex **75** gebildet werden. Bei einem nucleophilen Angriff der Ribose **69** auf den Komplex **75** kann es zur Bildung des gewünschten Produktes **68** kommen.

Der Komplex kann allerdings, unter Entstehung eines Siloxans **76**, auch mit einem weiteren TBDPSCI-Molekül **74** reagieren. Die Bildung des *tert*-Butyldiphenylsiloxans **76** ist ein Grund für die geringere Ausbeute. Ein weiterer Grund wäre die mögliche Hydrolyse des Silylierungsreagenzes **74** zu *tert*-Butyldiphenylsilylhydroxid. Beide Spezies, das Siloxan **76** und das Hydroxid, sind während der Reaktion keine aktiven Silylierungspartner, die zur Bildung des Produktes **68** führen.^[171]

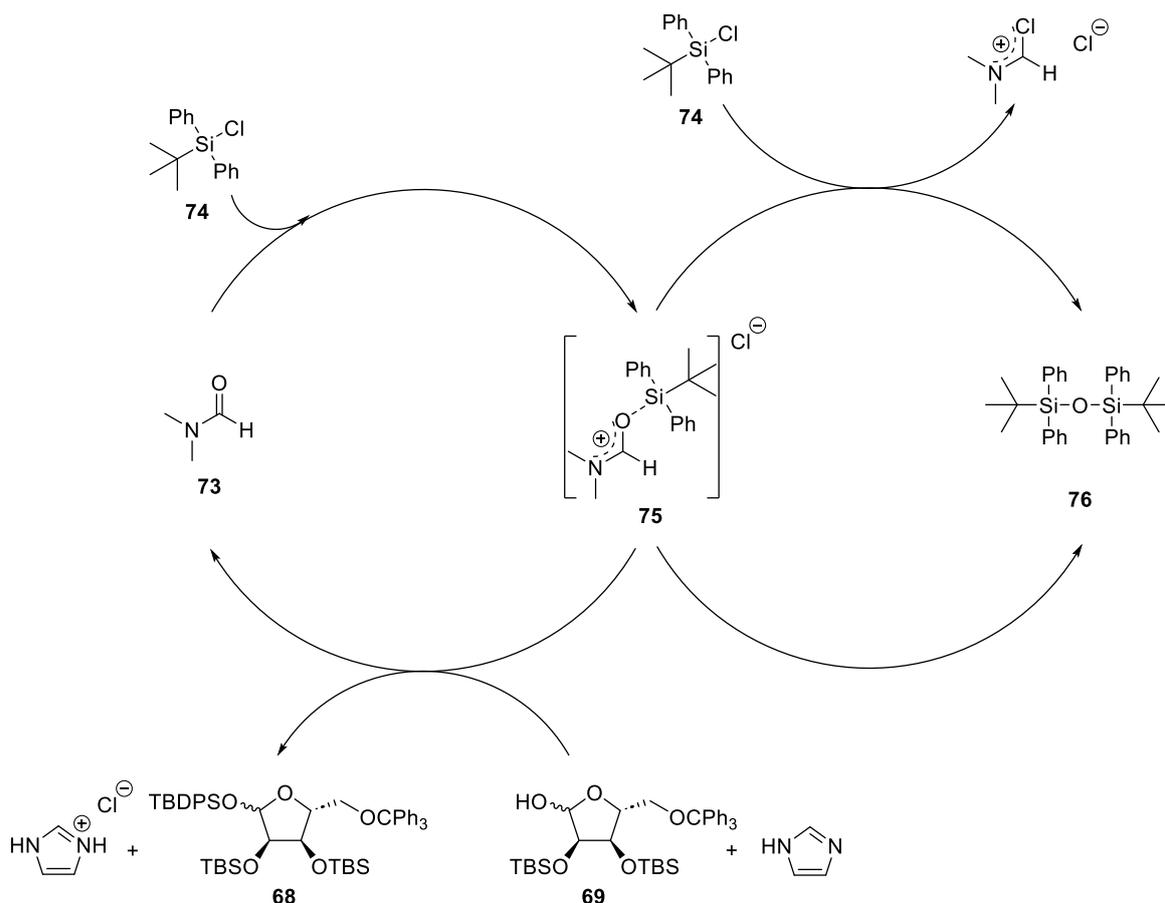


Abbildung 112: Der Mechanismus der möglichen Nebenreaktion über die Bildung eines DMF-TBDPS-Komplexes **75**.^[171]

Für ein Verbesserung der Ausbeute sollte in Zukunft eine größere Menge des Silylierungsreagenzes eingesetzt werden, sodass eine ausreichende Menge der aktiven Silylintermediate gebildet werden kann.

Für die nachfolgende 5'-Entschützung wurden mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) und Trifluoressigsäure (TFA) saure Reaktionsbedingungen ausgewählt, da die Tritylgruppe säurelabil ist. TFA ist mit einem pK_a -Wert von ungefähr -1^[149] eine sehr starke Säure und protoniert das 5'-Sauerstoffatom der Ribose **68**. Dadurch wird die Tritylgruppe als Tritylkation freigesetzt und das an der 5'-entschützte Produkt **67** gebildet. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Triethylamin und Methanol neutralisiert und beendet. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel konnte das Produkt **67** in einer Ausbeute von 53 % isoliert werden. Für eine Steigerung der Ausbeute könnte die Reaktionszeit von 25 Minuten verlängert werden.

Nach der erfolgreichen Darstellung der 5'-entschützten Ribose **67** sollte die Einführung einer Phosphatgruppe an der 5'-Position erfolgen. Hierbei sollte die Phosphorylierung mit Bis(flourenylmethyl)phosphoramidit (Fm-Amidit, **77**) durchgeführt werden, gefolgt von einer Oxidation.

Für die Phosphorylierungsreaktion sollte zunächst das entsprechende Phosphorylierungsreagenz **77** ausgehend von Phosphortrichlorid **78** über die in Abbildung 113 dargestellten Reaktionsbedingungen synthetisiert werden.^[131,142,172]

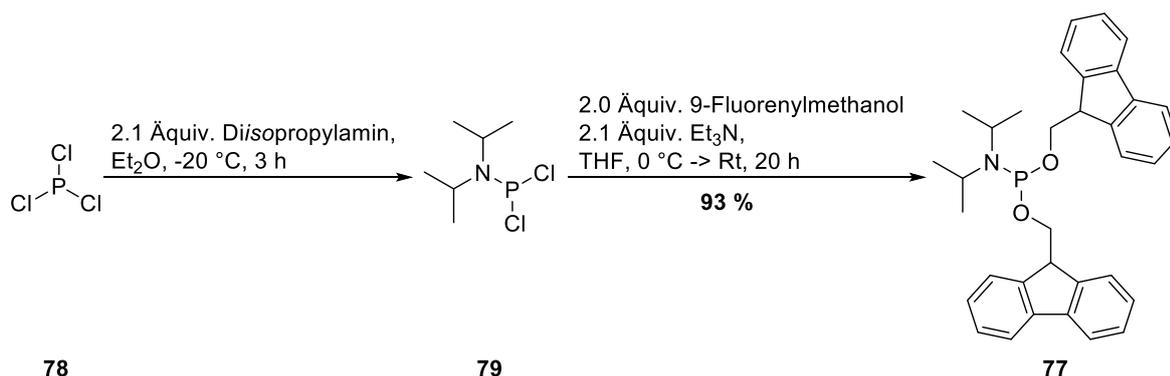


Abbildung 113: Reaktionsbedingungen zur Synthese des Bis(flourenylmethyl)phosphoramidits **77**.^[131,142,172]

Das Startmaterial **78** wurde im ersten Schritt unter starker K\u00fchlung mit Diisopropylamin umgesetzt und anschlie\u00dfend unter Sauerstoff- und Feuchtigkeitsausschluss filtriert sowie unter vermindertem Druck getrocknet. Als R\u00fcckstand wurde das fl\u00fcssige Dichlor-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **79** erhalten. Es wurde auf eine weitere Aufarbeitung sowie auf Analytik verzichtet, da das Amidit **79** nur eine geringe Stabilit\u00e4t aufweist. Ursache hierf\u00fcr ist, dass das Phosphoratom in der Oxidationsstufe +III vorliegt und somit bereits an der Luft zur stabileren, aber auch unreaktiveren P(V)-Spezies oxidiert werden kann.

Die Phosphor(III)-Verbindung **79** wurde direkt in einem n\u00e4chsten Schritt mit 9-Flourenylmethanol (Fm) umgesetzt, um das Produkt **77** zu erhalten. Das Fm-Amidit **77** konnte in einer Ausbeute von 93 % erhalten werden. Ferner ist darauf hinzuweisen, dass das Phosphor(III)-Atom des erhaltenen Amidits **77** s\u00e4urelabil ist und instabil gegen\u00fcber Oxidation. Zus\u00e4tzlich sind die Fm-Gruppen unter basischen Bedingungen labil. Des Weiteren ist darauf zu achten, dass f\u00fcr eine NMR-Messung mit CDCl_3 als L\u00f6sungsmittel, dieses vorher mit basischem Aluminiumoxid ents\u00e4uert werden muss.

Nach der erfolgreichen Darstellung des Phosphorylierungsreagenzes **77** erfolgte die Kupplung an die 5'-entsch\u00fczte Ribose **67**. Die Reaktionsbedingungen der Phosphorylierung sowie der nachfolgenden Oxidation sind in Abbildung 114 dargestellt.^[139,147]

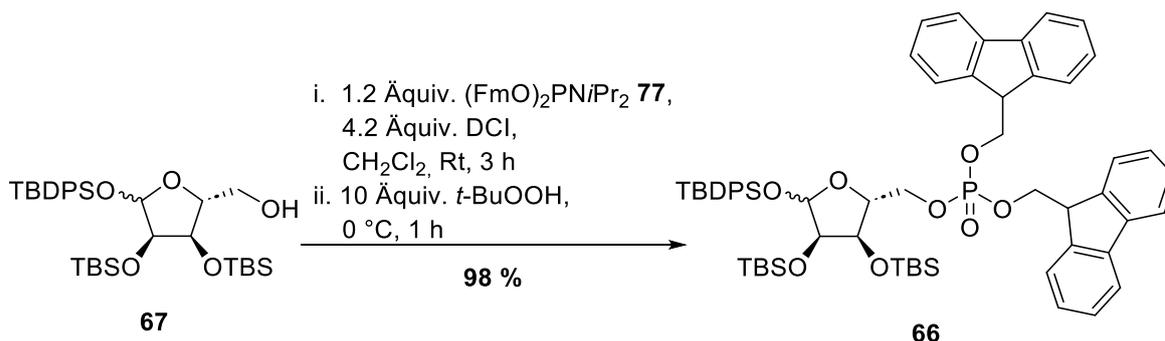


Abbildung 114: Reaktionsbedingungen der Phosphorylierung der Ribose **67** mittels DCI und der anschließenden Oxidation mittels *tert*-Butylhydroperoxid.^[139,147]

Die Kupplung des Phosphoramidits **77** an die Hydroxygruppe der Ribose **67** erfolgte Aktivator-vermittelt mit DCI. Der zugrundeliegende Mechanismus verläuft analog zu dem in Abbildung 32 dargestellten Mechanismus.

Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel konnte das gewünschte Produkt **66** in einer Ausbeute von 98 % erhalten werden. Die Darstellung des Phosphats wurde mittels ³¹P-NMR-Spektroskopie bestätigt, da lediglich ein Phosphorsignal bei -1.35 ppm für die Phosphatgruppe des Ribosephosphats **66** detektiert wurde (Abbildung 115).

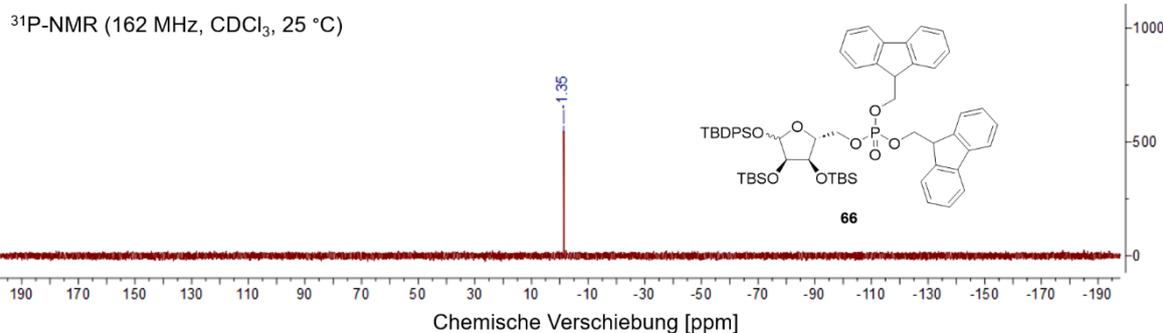


Abbildung 115: ³¹P-NMR-Spektrum des Ribosephosphats **66** aufgenommen bei 162 MHz. Die Probe wurde in CDCl₃ gelöst.

In einem nächsten Schritt sollten die Fm-Gruppen unter den in Abbildung 116 aufgeführten Reaktionsbedingungen gespalten werden, um das Phosphat **65** zu erhalten.^[139]

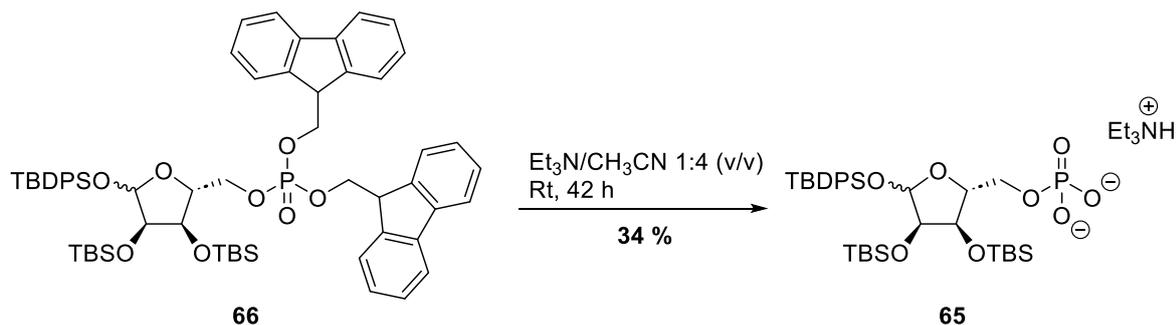


Abbildung 116: Reaktionsbedingungen der Spaltung der Fm-Gruppen im basischen Milieu.^[139]

Wie bereits erwähnt, sind die Fm-Schutzgruppen unter basischen Bedingungen labil, weshalb die Reaktion mit Triethylamin/Acetonitril (1:4 v/v) durchgeführt wurde.

Nach einer Reaktionszeit von 42 Stunden wurden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und der Rückstand mit Toluol coevaporiert. Nach säulenchromatographischer Reinigung an RP-18-Kieselgel wurde das Produkt **65** in einer moderaten Ausbeute von 34 % erhalten.

In Arbeiten von REIMER wurde beobachtet, dass die Spaltung der ersten Fm-Schutzgruppe von BCNA-Monophosphaten bereits nach zehn Minuten erfolgte, die zweite Entschützung jedoch mit mehr als 20 Stunden deutlich langsamer verlief.^[142] Die Spaltung der Fm-Gruppen erfolgt über einen E1cb-Mechanismus, bei dem die Schutzgruppen als schlecht lösliches Dibenzofulven freigesetzt werden.

Die Spaltung der Fm-Gruppen eines Monophosphats sind in der Arbeitsgruppe um MEIER bekannt und verlaufen üblicherweise mit Ausbeuten von 60-80 %.^[131,142,151]

Die Reinheit sowie die erfolgreiche Darstellung des Phosphats **65** wurde anhand des ³¹P-NMR-Spektrums und des ¹H-NMR-Spektrums bestätigt (Abbildung 117). Im ³¹P-NMR-Spektrum wurde lediglich ein Phosphorsignal bei 0.87 ppm detektiert (Abbildung 117, oben). Dies bestätigte die Darstellung eines Monophosphats. Im ¹H-NMR-Spektrum konnten lediglich die Protonensignale des gewünschten Produktes **65** beobachtet werden (Abbildung 117, oben). Im aromatischen Bereich waren nur die Protonensignale der 1'-TBDPS-Gruppe ersichtlich und keine Signale der abgespaltenen Fm-Gruppen. Dies sprach für eine saubere Isolation sowie für eine vollständige Fm-Entschützung.

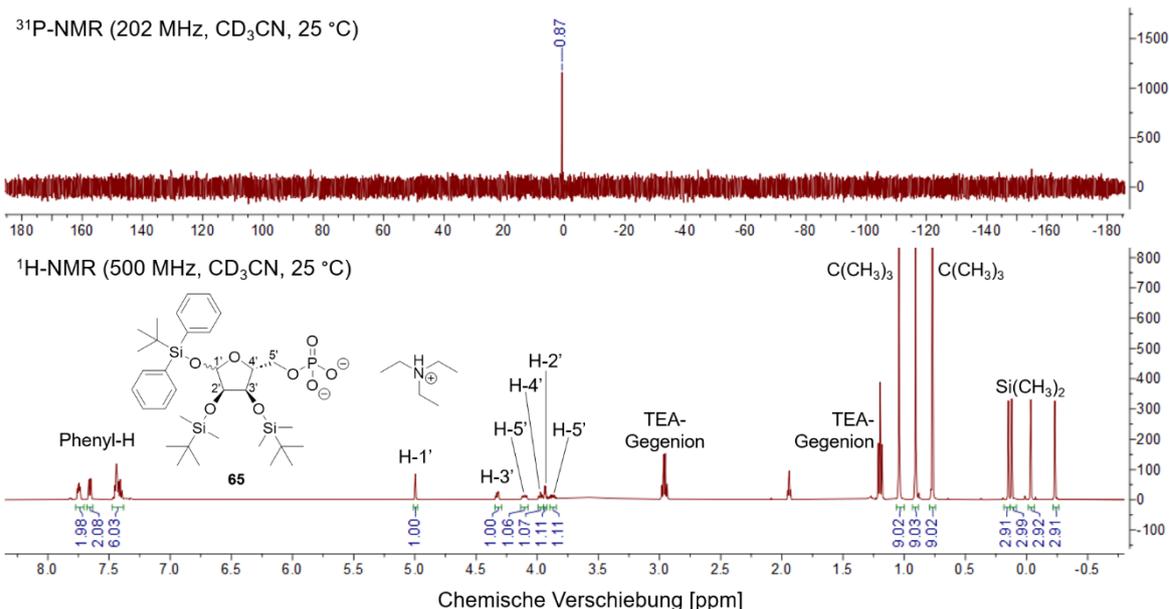


Abbildung 117: Oben: ³¹P-NMR-Spektrum des gewünschten Produktes **65**. Die Probe wurde in Acetonitril-*d*₃ gelöst und das Spektrum bei 202 MHz gemessen. Unten: ¹H-NMR-Spektrum des gewünschten Produktes **65**. Die Probe wurde in Acetonitril-*d*₃ gelöst und das Spektrum bei 500 MHz gemessen.

Nach der erfolgreichen Synthese des Monophosphats **65** sollte die Umsetzung zum entsprechenden 7-Deaza-ADPR-Derivat **62** erfolgen. Hierbei sollte die Verbindung **65** mit dem kommerziell erhältlichen 7-Deazaadenosinmonophosphat **64** gekuppelt und anschließend die Silylschutzgruppen der terminalen Ribose gespalten werden. Die Reaktionsbedingungen der Kupplung erfolgten nach MOHAMADY *et al.* (Abbildung **118**).^[130,132]

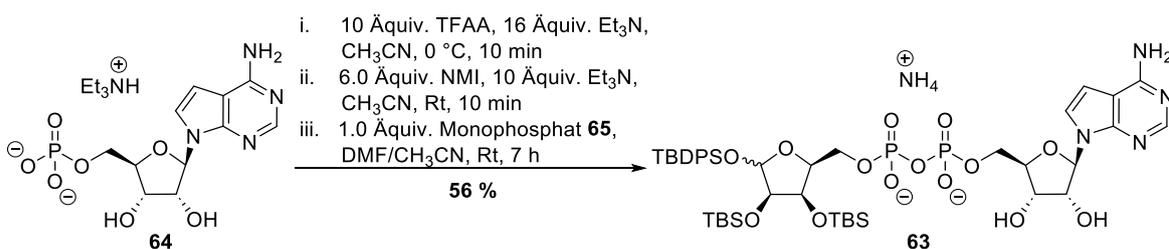


Abbildung 118: Reaktionsbedingungen zur Kupplung von 7-Deazaadenosinmonophosphat **64** mit dem silylierten Ribosephosphat **65** zur Darstellung des Diphosphats **63**.^[130,132]

In dieser Reaktion wurde 7-Deaza-AMP **64** mittels NMI aktiviert und anschließend mit dem Monophosphat **65** für sieben Stunden gerührt. Nach mehrfacher säulenchromatographischer Reinigung an RP-18-Kieselgel konnte das Produkt **63** in einer Ausbeute von 56 % erhalten werden.

Die erfolgreiche Bildung der Phosphoranhydridbindung zwischen den beiden Phosphaten wurde anhand eines ^{31}P -NMR-Spektrums bestätigt (Abbildung 119). Dies konnte anhand des Phosphorsignales mit einer chemischen Verschiebung von -10.68 ppm festgestellt werden.

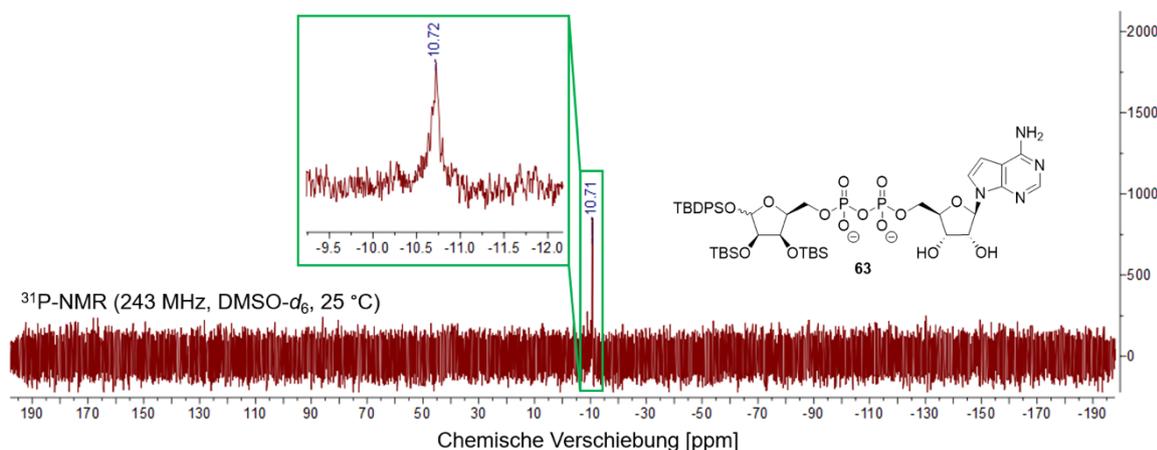


Abbildung 119: ^{31}P -NMR-Spektrum des Diphosphats **63** aufgenommen bei 243 MHz und gelöst in $\text{DMSO-}d_6$. Das Diphosphatsignal wurde in grün hervorgehoben.

In einem nächsten Reaktionsschritt wurden die Silylschutzgruppen an der 2''- und 3''-Position mittels Triethylamin-Trihydrofluorid (TREAT-HF) entfernt (Abbildung 120).^[139]

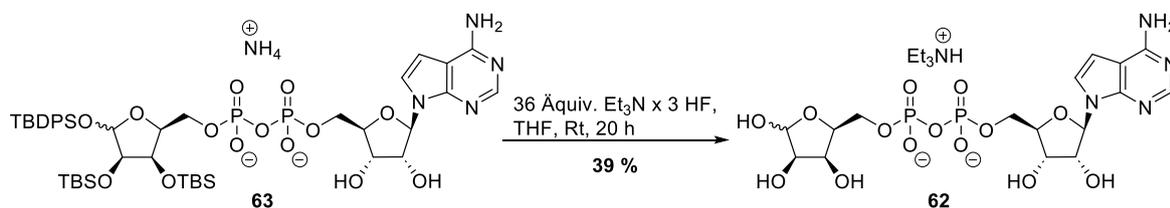


Abbildung 120: Reaktionsbedingungen der Entfernung der Silylschutzgruppen.^[139]

Bei der Entschützungsreaktion wurde zunächst mit neun Äquivalenten von Triethylamin-Trihydrofluorid gestartet. Der Reaktionsfortschritt wurde HPL-chromatographisch verfolgt und es wurde festgestellt, dass nach einer Reaktionszeit von drei Stunden noch immer signifikante Mengen des Startmaterials **63** sowie der einfach- und zweifach-entschützten Spezies vorhanden waren. Aus diesem Grund wurden weitere neun Äquivalente des Entschützungsreagenzes dazugegeben. Nach weiteren drei Stunden konnte HPL-chromatographisch der vollständige Umsatz des Startmaterials **63** beobachtet werden, allerdings waren neben dem Produkt **62** noch immer signifikante Mengen des einfach- und zweifach-entschützten Diphosphats ersichtlich. Daraufhin wurden 18 weitere Äquivalente TREAT-HF hinzugegeben, sodass insgesamt pro Silylschutzgruppe 12 Äquivalente

Entschützensreagenz eingesetzt wurden. Nach einer Gesamtreaktionszeit von 20 h wurde die Reaktion beendet und nach mehrfacher säulenchromatographischer Reinigung an RP-18-Kieselgel konnte das vollständig entschützte Produkt **62** in einer Ausbeute von 39 % synthetisiert werden.

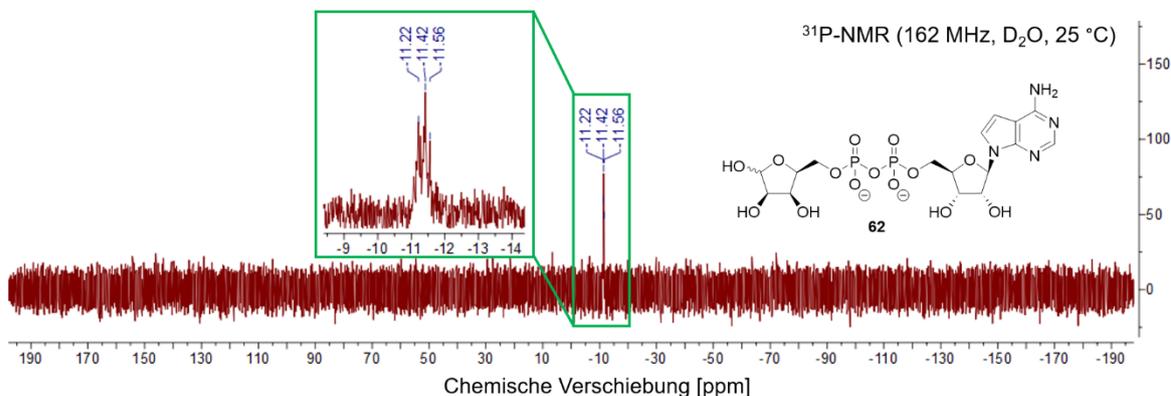


Abbildung 121: ³¹P-NMR des gewünschten Diphosphats **62** gemessen in D₂O und bei einer Frequenz von 162 MHz. Das Diphosphatsignal wurde in grün hervorgehoben.

Die Darstellung von 7-Deazaadenosindiphosphatribose wurde anhand des ³¹P-NMR-Spektrums in Abbildung 121 bestätigt. Neben dem Diphosphatsignal für das Produkt **62** bei ungefähr -11 ppm bis -12 ppm konnten keine weiteren Phosphorsignale festgestellt werden. Auffällig war, dass das Signal nicht wie erwartet in zwei Phosphorsignale der Multiplizität Dublett aufspaltete. Ein Grund hierfür war, dass das Produkt **62** als ein Gemisch aus beiden Anomeren isoliert wurde, was eine Überlagerung aller Phosphorsignale zur Folge hat.

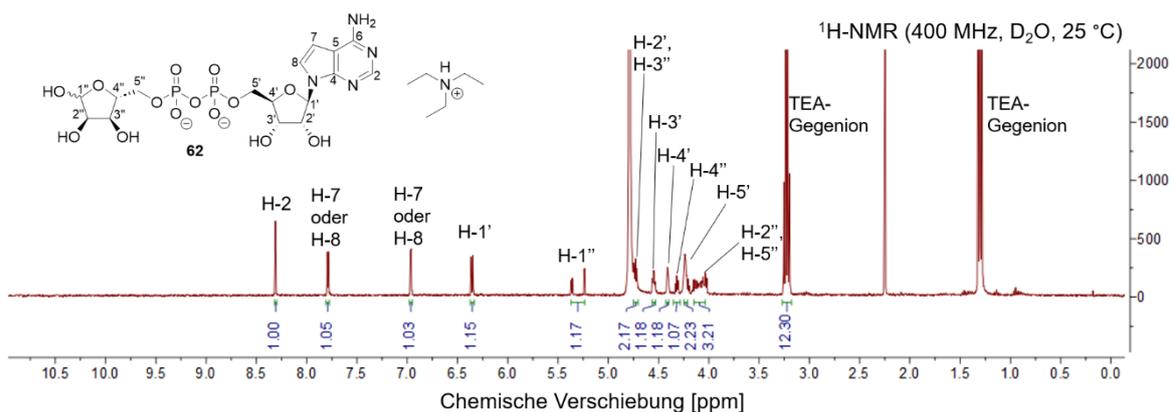


Abbildung 122: ¹H-NMR des gewünschten Diphosphats **62** gemessen in D₂O und bei einer Frequenz von 400 MHz.

Zusätzlich konnte die Reinheit des gewünschten Zielproduktes **62** anhand des ¹H-NMR-Spektrums bestätigt werden (Abbildung 122). Alle detektierten Protonensignale konnten

dem Produkt **62** zugeordnet werden und es waren keine Verunreinigungen ersichtlich. Auch die erfolgreiche Entfernung der Silylschutzgruppen konnte beobachtet werden, da keine entsprechenden Signale im aromatischen und aliphatischen Bereich detektiert wurden.

6.1.7.1 Testung der inhibitorischen Aktivität von 7-Deazaadenosindiphosphat-ribose **62** gegen die virale Macrodomäne Mac1

7-Deazaadenosindiphosphat-ribose **62** sollte wie alle vorher dargestellten Verbindungen hinsichtlich der inhibitorischen Aktivität gegen die virale Mac1 getestet werden (Abbildung **123**). Die Verbindung **62** weist im Vergleich zum Substrat **25** an der 7-Position kein Stickstoffatom auf. Mit einem IC_{50} von $14 \pm 0.9 \mu\text{M}$ ist sie ein 1.7-fach besserer Inhibitor als ADPR. Dies bestätigt, dass eine geringere Polarität an der 7-Position vorteilhaft für die Bindung in der hauptsächlich hydrophoben Bindungsstelle des Adeninteils in der Mac1 darstellt.

Zudem ist 7-Deaza-ADPR **62** ähnlich aktiv wie β -Methyl-ADP **26**, die die Leitstruktur für die bisher, im Rahmen dieser Arbeit hergestellten, potenteste Inhibitorstruktur **30** darstellte. Weitere Modifikationen dieser Struktur **62** können dementsprechend zu neuen und vielversprechenden kompetitiven Inhibitoren der Mac1 führen. Beispielsweise könnte analog zu β -Methyl-ADP **26** und β -Methyl-GS441524-DP **30** das Austauschen der terminalen Ribose mit einem Methylsubstituenten eine potentielle Modifikation sein.

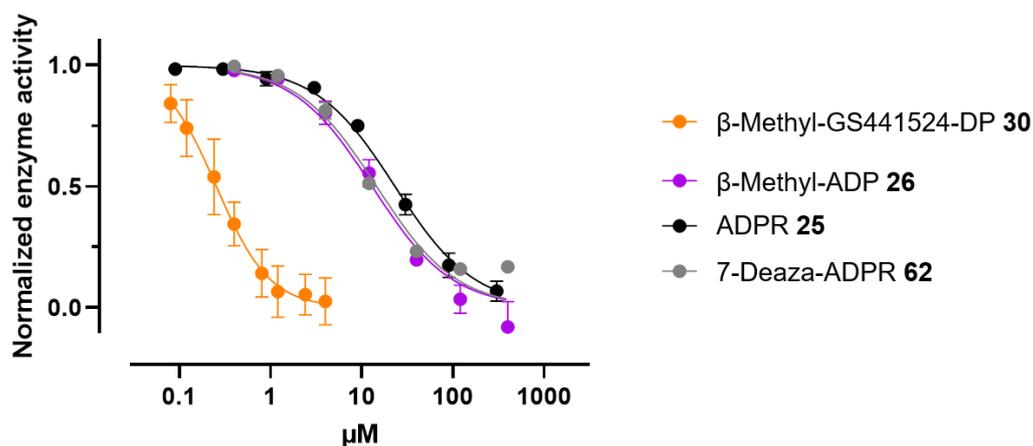


Abbildung 123: Graphen der inhibitorischen Aktivität gegen die isolierte SARS-CoV-2-Mac1 von β -Methyl-GS441524-DP **30** (orange), β -Methyl-ADP **26** (lila), ADPR **25** (schwarz) und 7-Deaza-ADPR **62** (grau). Die Werte wurden in Kooperation mit SANDMANN am UKE (Projekt A18, SFB 1328) vermessen.

6.2 Entwicklung eines kontinuierlichen Enzym-Assays

Enzym-Assays können qualitative und quantitative Fragestellungen beantworten. Beispielsweise werden sie verwendet, um die An- oder Abwesenheit eines bestimmten Proteins oder Substrats in einer Probe nachzuweisen oder um die Menge des Proteins oder Substrats in der Probe zu bestimmen.^[173]

Alle bisher in dieser Arbeit ermittelten IC₅₀-Werte wurden mittels eines diskontinuierlichen Enzym-Assays bestimmt. Bei einem diskontinuierlichen Enzym-Assay muss meist ein mehrstufiger Prozess bis zum finalen Ergebnis durchlaufen werden, wobei in bestimmten Intervallen die Enzymreaktion des Assays gestoppt und Aliquote zur Weiterverarbeitung und anschließenden Messung in einem HPLC-System entnommen werden müssen. Hierbei kann es zur Akkumulation von Pipettierfehlern kommen. Aus diesem Grund sollte ein fluorogenes Substrat synthetisiert werden, mit dem ein kontinuierlicher Enzym-Assay entwickelt werden kann. Der Vorteil von kontinuierlichen Enzym-Assays ist, dass zur Ermittlung der Ergebnisse nach unterschiedlichen Zeitintervallen keine Enzymreaktionen gestoppt und separat ausgewertet werden müssen. Dadurch fallen zeitaufwändige mehrstufige Prozesse weg und das Auftreten von Pipettierfehlern kann minimiert werden.^[174]

6.2.1 Synthese von 4-(Trifluormethyl)umbelliferon-Adenosindiphosphatribose 80

Als fluorogenes Substrat wurde 4-(Trifluormethyl)umbelliferon-Adenosindiphosphatribose (TFMU-ADPR, **80**) ausgewählt. Der Fluoreszenzfarbstoff 4-(Trifluormethyl)umbelliferon **81** ist ein Cumarinderivat und ist α -O-glycosidisch an die 1''-Position von ADPR **25** gebunden. Wird Verbindung **80** als Substrat in der Bindetasche von Mac1 umgesetzt, wird der Fluoreszenzmarker **81** freigesetzt (Abbildung 124). Die Intensität der emittierten Fluoreszenzstrahlung ist proportional zum Umsatz und ermöglicht somit die quantitative Bestimmung der Enzymaktivität.

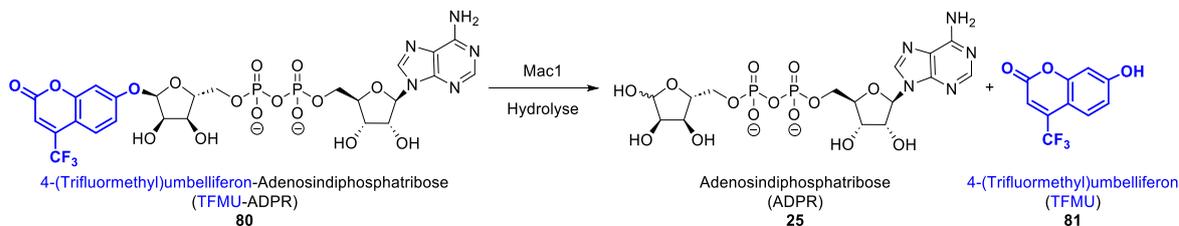


Abbildung 124: Darstellung der Zielstruktur 4-(Trifluormethyl)umbelliferon-Adenosindiphosphatribose **80** und die enzymatische Umsetzung zu ADPR **25** und dem Fluorophor 4-(Trifluormethyl)umbelliferon **81**.

Das fluoreszenzmarkierte Monophosphat **82** wurde in vorangegangenen Arbeiten mit einer Gesamtausbeute von 17 % über 7 Syntheseschritte erfolgreich hergestellt (Abbildung 125). Hierzu wurde zunächst das kommerziell erhältliche D-Ribonsäure- γ -lacton **72** gemäß des Orthogonalitätsprinzips mit Schutzgruppen versehen und anschließend zur Ribose **69** reduziert. Diese Reaktionen wurden bereits ausführlich in Kapitel 6.1.7 beschrieben. Anschließend wurde die freie 1'-Position über eine MITSUNOBU-Reaktion mit dem Umbelliferon **81** umgesetzt, welches über eine PECHMANN-Kondensation zwischen dem kommerziell erhältlichen Resorcin und 4,4,4-Trifluoracetessigsäureethylester hergestellt wurde. Nach Entschützung der 5'-Position des O-Glycosids **83** wurde das gewünschte α -Anomer **84** säulenchromatographisch isoliert und mittels Phosphoramiditchemie und anschließender Spaltung der Fm-Schutzgruppen zum Monophosphat **82** umgesetzt. Die Bestimmung der Konfiguration des Produktes erfolgte mittels NOESY-Korrelationspektrum. Das in der Phosphorylierungsreaktion eingesetzte Phosphoramidit **77** wurde über zwei Syntheseschritte ausgehend vom kommerziell erhältlichen Phosphortrichlorid **78** hergestellt.^[131,132,139,175,176]

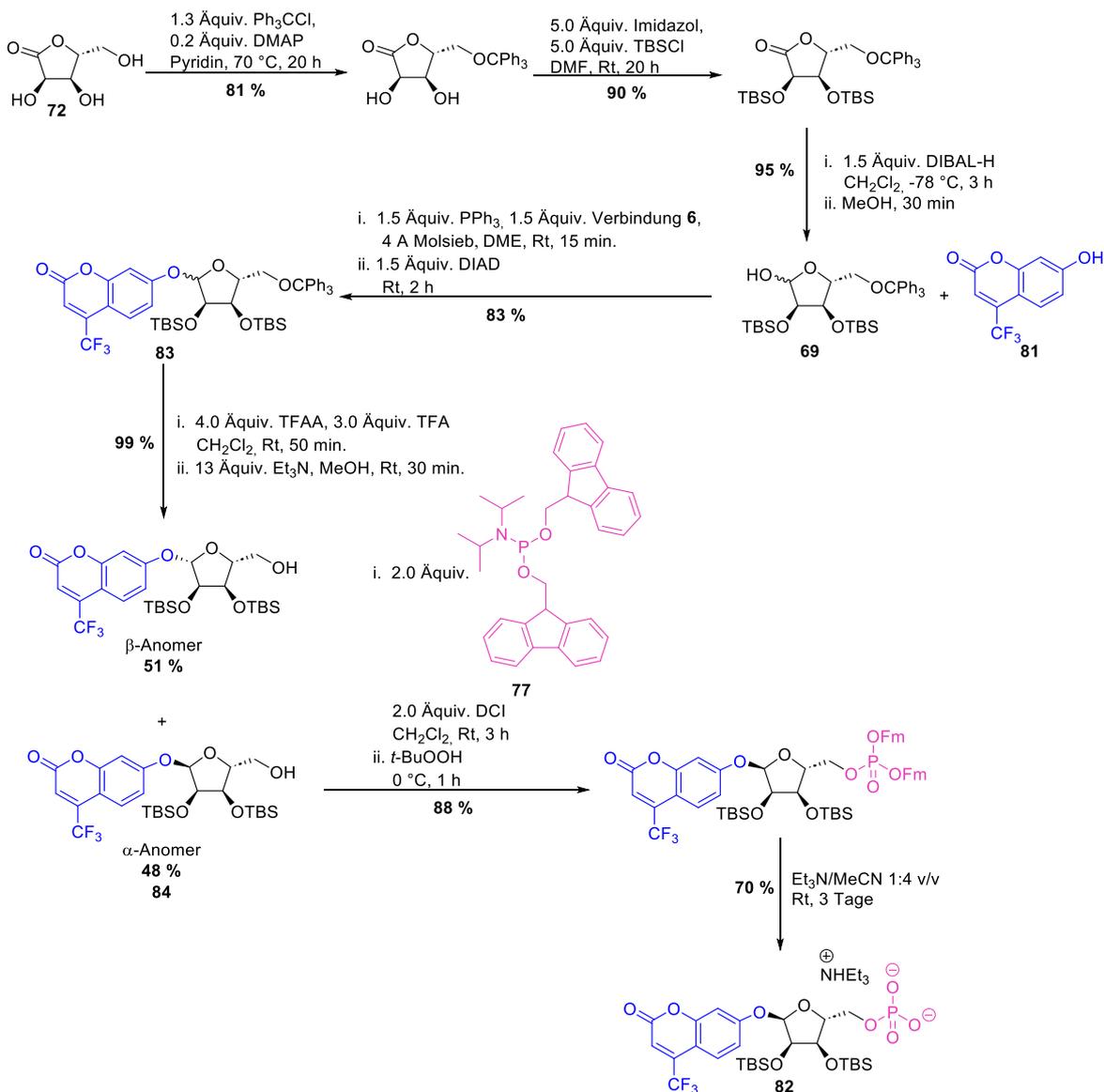


Abbildung 125: Zusammenfassung der, in Vorarbeiten bereits durchgeführten, Syntheseschritte zur Darstellung des fluoreszenzmarkierten Monophosphats **82**.^[131,132,139,175,176]

Die Zielverbindung **80** sollte über die Entschützung der Silylschutzgruppen des ADPR-Derivats **85** und einer vorherigen Kupplung zwischen dem kommerziell erhältlichen AMP **16** und dem synthetisierten Monophosphat **82** erfolgen (Abbildung 126).

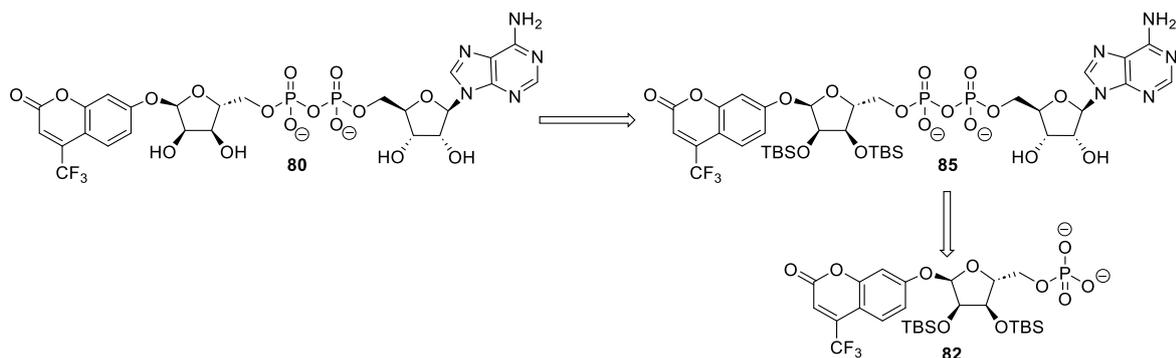


Abbildung 126: Retrosynthetisches Schema zur Darstellung des fluoreszenzmarkierten ADPR-Derivats ausgehend vom Monophosphat **82**.

Zunächst wurde nach den Reaktionsbedingungen von MOHAMADY *et al.* das fluoreszenzmarkierte Monophosphat **82** mit dem kommerziell erhältlichen AMP **16** zum ADPR-Derivat **85** umgesetzt (Abbildung 127).^[131,132]

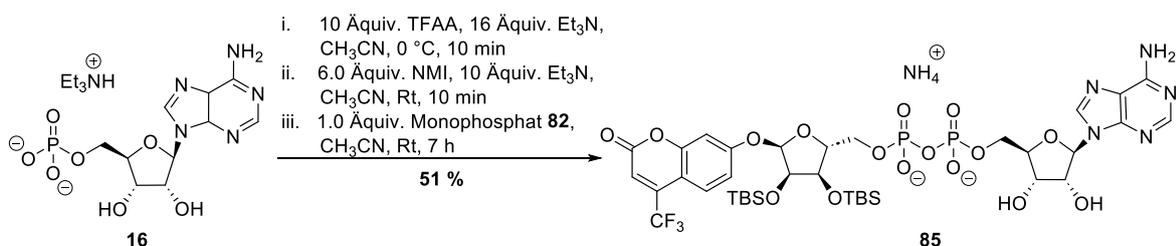


Abbildung 127: Reaktionsbedingungen zur Darstellung des Diphosphats **85** ausgehend vom kommerziell erhältlichen AMP **16**.^[131,132]

In dieser Reaktion wurde AMP **16** mittels NMI aktiviert und anschließend mit dem Monophosphat **82** für sieben Stunden gerührt. Nach mehrfacher säulenchromatographischer Reinigung an RP-18-Kieselgel konnte das Produkt **85** in einer Ausbeute von 51 % erhalten werden.

In einem nächsten Reaktionsschritt wurden die Silylschutzgruppen an der 2'- und 3'-Position mittels Triethylamin-Trihydrofluorid (TREAT-HF) entfernt (Abbildung 128).^[139]



Abbildung 128: Reaktionsbedingungen zur Spaltung der Silylschutzgruppen des Eduktes **85**.^[139]

Hierzu wurde ein Überschuss des Entschützungsreagenzes eingesetzt und das Reaktionsgemisch für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach säulenchromatographischer Reinigung an RP-18-Kieselgel konnte das gewünschte Zielprodukt in einer Ausbeute von 72 % isoliert werden.

Außerdem wurde eine weitere Syntheseroute erprobt. Hierbei wurden zunächst die Silylschutzgruppen des Monophosphats **82** entfernt und anschließend eine Kupplung zwischen dem entschützten Monophosphat **86** und AMP **16** zum gewünschten Zielprodukt **80** durchgeführt (Abbildung 129).^[131,132,139]

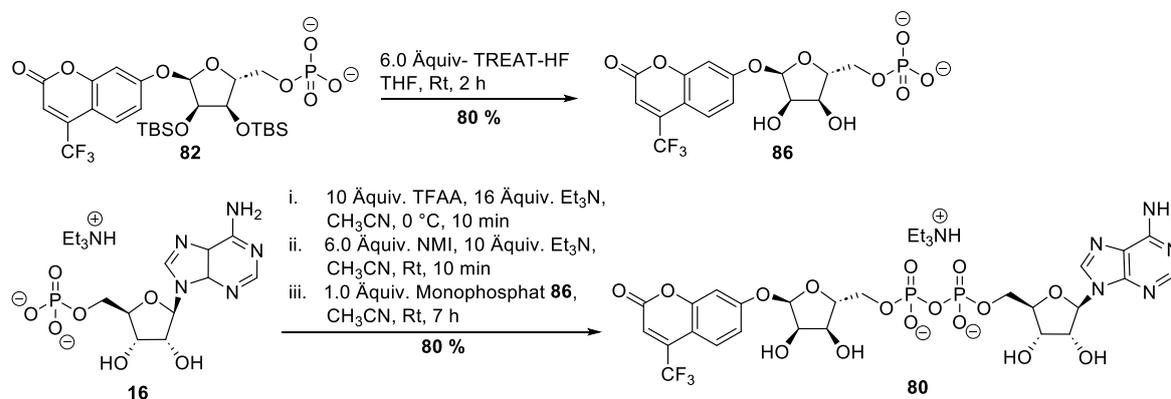


Abbildung 129: Reaktionsbedingungen zur Synthese des gewünschten ADPR-Derivats **80**. Es wurden zunächst die Silylschutzgruppen mit TREAT-HF gespalten und dann die Kupplungsreaktion nach MOHAMADY *et al.* durchgeführt.^[131,132,139]

Die Spaltung der Silylschutzgruppen wurde ebenfalls mit einem Überschuss von TREAT-HF durchgeführt. Das entschützte Monophosphat **86** konnte in einer Ausbeute von 80 % erhalten werden. Beim anschließenden Kupplungsschritt nach MOHAMADY *et al.* wurde erneut AMP **16** in die aktive Spezies überführt und anschließend mit dem Monophosphat **86** für sechs Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach mehrfacher säulenchromatographischer Reinigung an RP-18-Kieselgel wurde das Zielprodukt ebenfalls in einer Ausbeute von 80 % isoliert.

Die Reinheit des Produktes wurde mittels ³¹P-NMR, ¹⁹F-NMR- und ¹H-NMR-Spektroskopie ermittelt (Abbildung 130). Die erfolgreiche Kupplung konnte durch das ³¹P-NMR-Spektrum bestätigt werden. Es wurde lediglich ein pseudo-Quartett bei -11.71 ppm detektiert, welches die beiden Phosphatgruppen des Kupplungsproduktes **80** repräsentiert (Abbildung 130, oben). Zusätzlich konnte die Reinheit bestimmt werden, da außer dem einem Diphosphatsignal keine weiteren Phosphorsignale festgestellt wurden. Dies war ebenfalls im ¹⁹F-NMR-Spektrum zu sehen. Es konnte lediglich ein sauberes Singulett bei -63.61 ppm festgestellt werden, welches für die Trifluormethylgruppe der Verbindung **80** steht

(Abbildung 130, mitte). Des Weiteren konnten im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ausschließlich die Produktsignale identifiziert werden, was ebenfalls die Isolation sowie erfolgreiche Darstellung von TFMU-ADPR **80** bestätigte (Abbildung 130, unten).

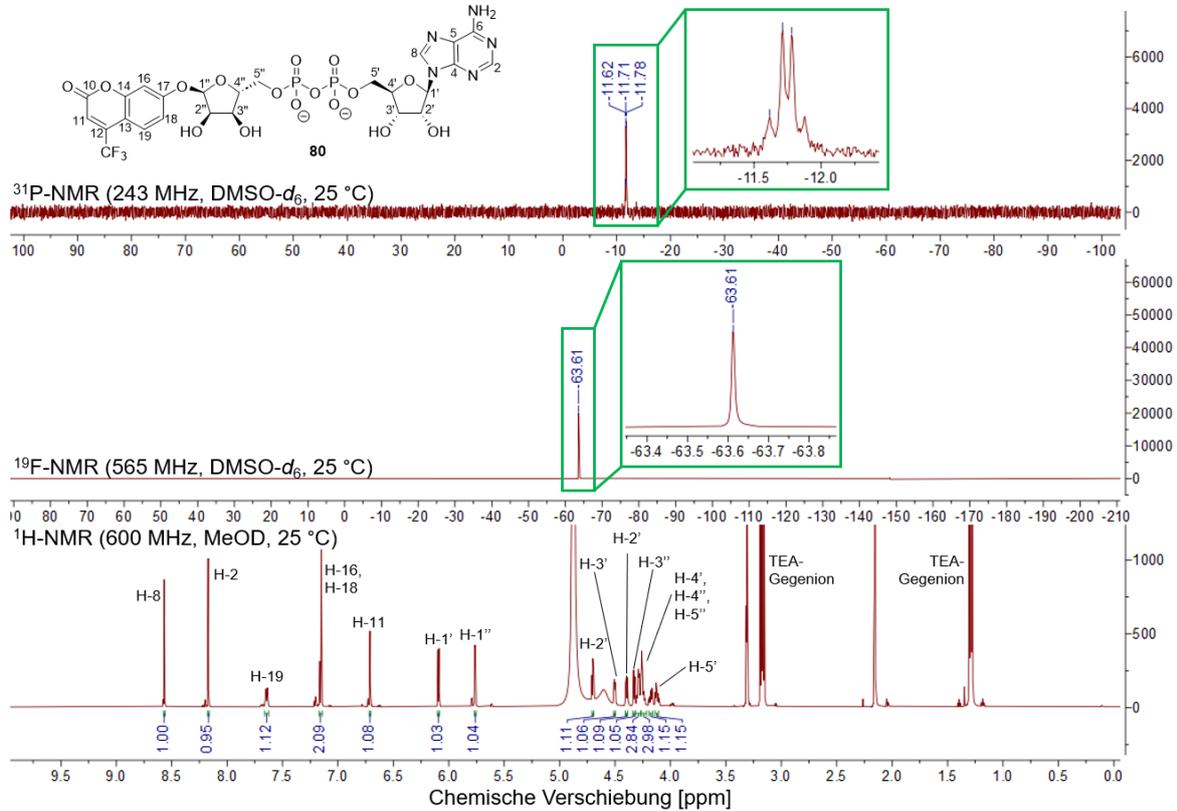


Abbildung 130: Oben: $^{31}\text{P-NMR}$ -Spektrum des Kupplungsproduktes **80**, aufgenommen in DMSO-d_6 und 243 MHz. Das Diphosphatsignal ist in grün hervorgehoben. Mitte: $^{19}\text{F-NMR}$ -Spektrum des Kupplungsproduktes **80**, aufgenommen in DMSO-d_6 und 565 MHz. Das Diphosphatsignal ist in grün hervorgehoben. Unten: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Kupplungsproduktes **80**, aufgenommen in MeOD und 600 MHz.

Zusätzlich ist in Abbildung 131 das Massenspektrum des Zielproduktes **80** dargestellt. Das Spektrum wurde im Negativionenmodus gemessen und für das einfach negativ geladene Produkt **80** wurde eine Masse von 770.0729 g/mol berechnet. Diese Masse stimmt mit der gefundenen Masse von 770. g/mol überein.

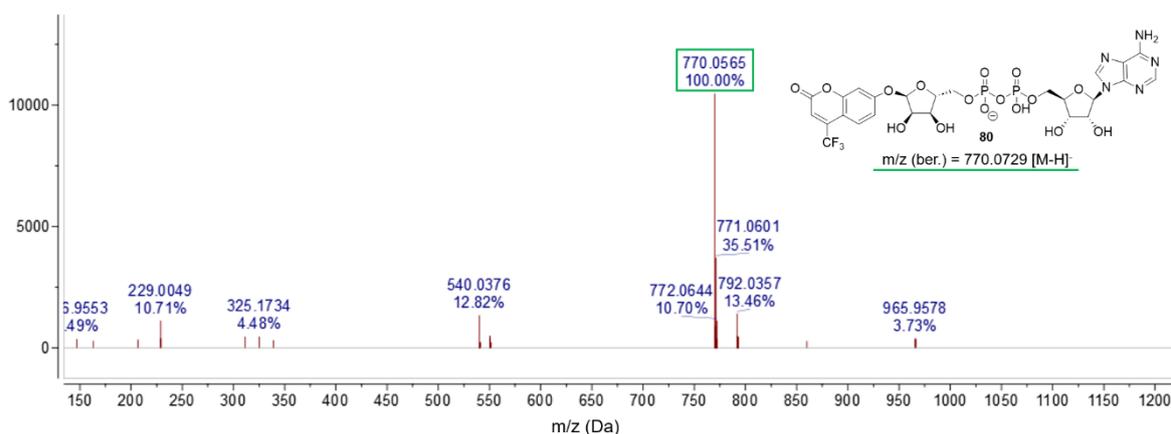


Abbildung 131: ESI-Massenspektrum des isolierten fluorogenen Zielproduktes **80** gemessen im Negativionenmodus. Die berechnete Masse und die entsprechend gefundene Masse sind in grün hervorgehoben.

Beide Syntheserouten zur Darstellung des ADPR-Derivats **80** konnten erfolgreich durchgeführt werden. Bei einer anfänglichen Kupplung und anschließenden Spaltung der Silylschutzgruppen konnte das Produkt **80** in einer Gesamtausbeute von 37 % über zwei Stufen erhalten werden. Wurde hingegen zunächst das fluoreszenzmarkierte Monophosphat **82** entschützt und danach mit AMP **16** umgesetzt, konnte das Produkt in einer Gesamtausbeute von 64 % über zwei Syntheseschritte erhalten werden.

In der Handhabung waren beide Synthesestrategien sehr ähnlich und verliefen ohne große Probleme. Hinsichtlich der Ausbeute war es von Vorteil, wenn zunächst alle Schutzgruppen entfernt wurden und die Kupplungsreaktion mit den freien Monophosphaten **16** und **86** durchgeführt wurde.

6.2.1.1 Entwicklung eines kontinuierlichen Enzym-Assays für Mac1 unter Verwendung von TFMU-ADPR **80**

Für die Entwicklung eines Enzym-Assays können mehrere Parameter variiert werden. Darunter zählen der pH-Wert, die Substratkonzentration, das Lösungsmittel und die Temperatur.^[177] Da für das bereits häufig angewendete diskontinuierliche Enzym-Assay repräsentative sowie reproduzierbare Ergebnisse erhalten wurden, sollte der kontinuierliche Enzym-Assay mit denselben Parameter durchgeführt werden.

Die virale Macrodomäne wurde bei einem pH-Wert von 7.2 und einer Temperatur von 37 °C mit unterschiedlichen Konzentrationen an TFMU-ADPR **80** inkubiert und in einem Fluorimeter vermessen. Es ist ersichtlich, dass mit steigender Substratkonzentration auch mehr Substratmoleküle **80** hydrolysiert werden und fluoreszierendes TFMU **81** freigesetzt wird, da die detektierten Fluoreszenzsignale ebenfalls steigen (Abbildung 132, **A**).

Allerdings scheint ab einer Substratkonzentration von 100 μM eine Sättigung aufzutreten, da keine weitere Steigerung der Fluoreszenzsignale festgestellt werden konnte.

Bei der Inkubation des humanen Enzyms Poly(ADP-Ribose)-Glycohydrolase (PARG) unter denselben Konditionen konnte ein rund zehnfach höherer hydrolytischer Umsatz beobachtet werden (Abbildung 132, **B**).

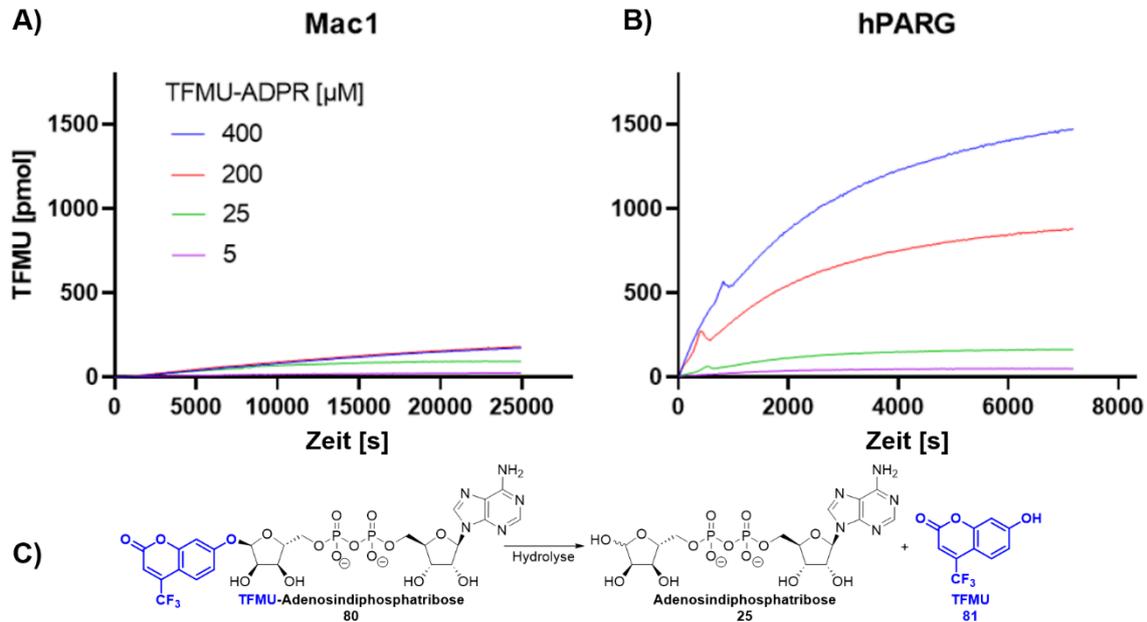


Abbildung 132: Entwicklung eines kontinuierlichen Enzym-Assay basierend auf der Fluoreszenzmarkierung von ADPR 25. **A)** Hydrolysereaktion mit Mac1. Detektion der Bildung von fluoreszierendem TFMU 63 nach unterschiedlichen Zeitpunkten und mit unterschiedlichen Konzentrationen des Substrats 80. **B)** Hydrolysereaktion mit PARG. Detektion der Bildung von fluoreszierendem TFMU 81 nach unterschiedlichen Zeitpunkten und mit unterschiedlichen Konzentrationen des Substrats 80. **C)** Edukt und Produkte der Hydrolysereaktion von TFMU-ADPR 80.

Die humane PARG ist genau wie die virale Mac1 ein Enzym mit einer ADPR-Hydrolaseeigenschaft. Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass TFMU-ADPR 80 durch Mac1 gespalten wird, jedoch ein besseres fluorogenes Substrat für die humane Hydrolase als für die virale Hydrolase darstellt.

Aus diesem Grund sollte ein neues fluorogenes ADPR-Derivat hergestellt werden, welches eine höhere Selektivität für Mac1 aufweist, um eine zuverlässige und spezifische Bestimmung der Enzymaktivität von Mac1 zu ermöglichen.

6.2.2 Syntheseversuch von 7-Amino-4-(trifluormethyl)cumarin-Adenosindiphosphatribose **87**

Da die humane PARG ausschließlich *O*-glycosidische Bindungen spalten kann,^[178] sollte ein ADPR-Derivat synthetisiert werden, das über eine α -*N*-glycosidische Bindung an die 1'-Position von ADPR **25** gebunden ist. Durch die *N*-glycosidische Bindung kann die Selektivität gegenüber der viralen Mac1 erhöht werden, da sie neben *O*-Glycoside auch *N*- und *S*-Glycoside erkennt.^[44] So ein fluorogenes Substrat stellt 7-Amino-4-(trifluormethyl)cumarin-Adenosindiphosphatribose (AMC-ADPR, **87**) dar. Hierbei ist erneut ein Cumarinderivat, genauer 7-Amino-4-(trifluormethyl)cumarin (AMC, **88**), der Fluorophor. Die Darstellung der Zielverbindung **87** sollte über die in Abbildung 133 gezeigte Syntheseroute erfolgen.

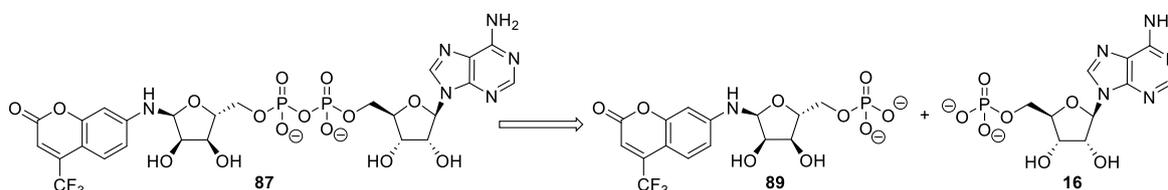


Abbildung 133: Retrosynthetisches Schema zur Darstellung des fluoreszenzmarkierten ADPR-Derivats **87** ausgehend vom Monophosphat **89** und AMP **16**.

7-Amino-4-(trifluormethyl)cumarin-Adenosindiphosphatribose **87** sollte über eine Kupplungsreaktion zwischen dem kommerziell erhältlichen AMP **16** und dem fluoreszenzmarkierten Monophosphat **89** erfolgen.

Das fluoreszenzmarkierte Monophosphat **89** sollte über eine gezielte Synthese zur ausschließlichen Darstellung des α -Anomers hergestellt werden (Abbildung 134).

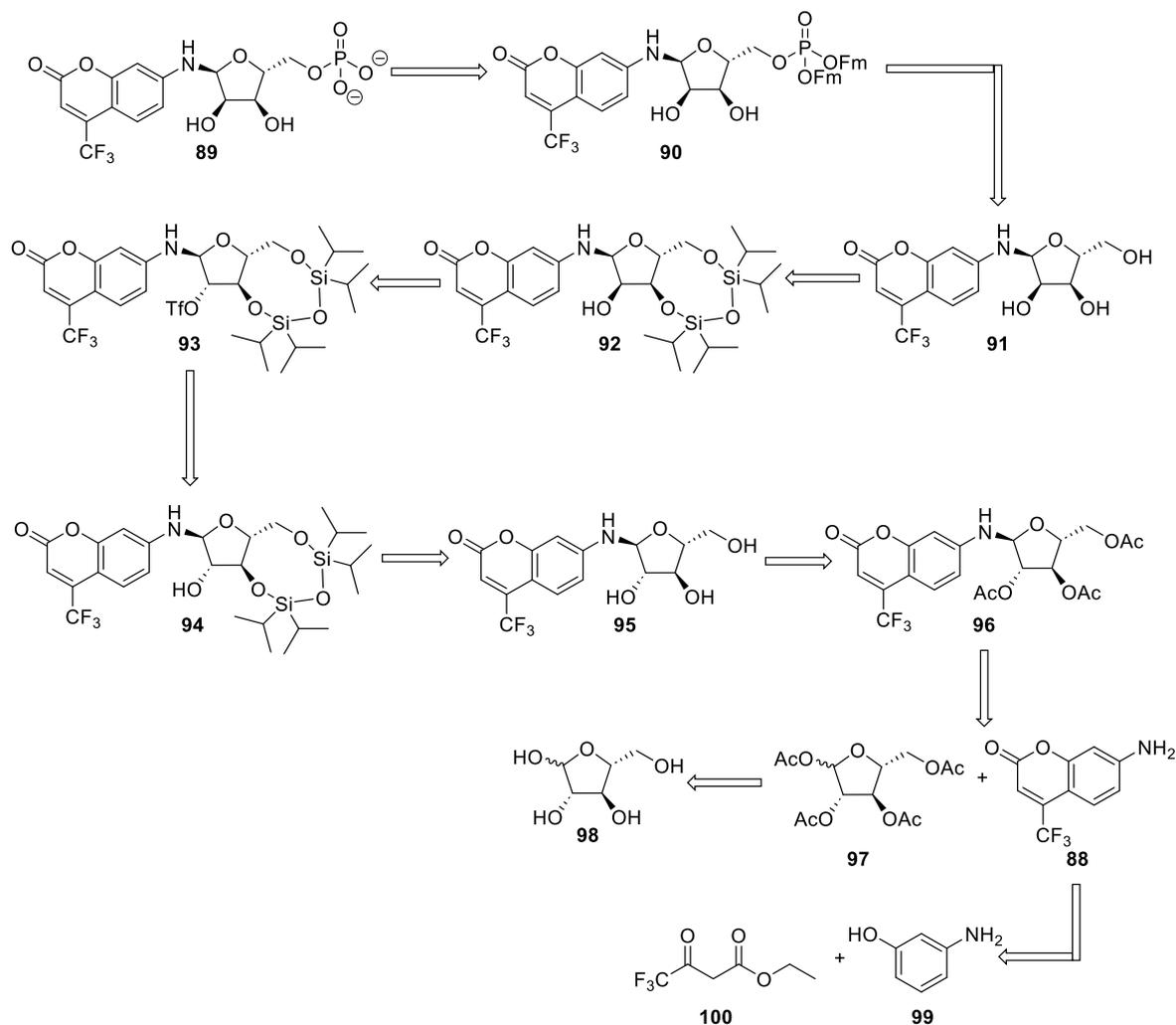


Abbildung 134: Retrosynthetisches Schema zur Darstellung des fluoreszenzmarkierten Monophosphats **89** ausgehend von den kommerziell erhältlichen Startmaterialien Arabinose **83**, *m*-Aminophenol **84** und 4,4,4-Trifluoracetessigsäureethylester **85**.

Hierzu sollte das Monophosphat **89** über die Spaltung der Fm-Schutzgruppen der Verbindung **90** und einer vorherigen 5'-Phosphorylierung der Ribose **91** dargestellt werden. Die ungeschützten Hydroxyfunktionen der Ribose **91** sollte über eine Entfernung der TIPDS-Klammer (1,1,3,3-Tetraisopropyl-disiloxan) erfolgen. In einem vorherigen Schritt sollte die Ribose **92** über eine Insertion der Arabinose **93**, einer Schützung der 2'-Hydroxyfunktion der Verbindung **94** mit einer Triflylgruppe und der Schützung der 3'- und 5'-Position der Arabinose **95** mit einer TIPDS-Klammer hergestellt werden. Der Zucker **95** sollte über eine Entschützung aller Hydroxyfunktionen der Verbindung **96** dargestellt werden. Das α -*N*-Glycosid **96** sollte über eine Glycosylierung zwischen der vollständig acetylierten Arabinose **97** und dem Fluorophor AMC **89** synthetisiert werden. Die Synthese der Verbindung **97** sollte über eine Acetylierung der kommerziell erhältlichen Arabinose **98** erfolgen. Der Fluoreszenzmarker **89** sollte über eine Kondensationsreaktion ausgehend

von dem kommerziell erhältlichen *m*-Aminophenol **99** und 4,4,4-Trifluoracetessigsäure-ethylester **100** synthetisiert werden.

In einem ersten Schritt sollte die Acetylierung aller Hydroxyfunktion der kommerziell erhältlichen Arabinose **98** durchgeführt werden. Hierzu erfolgte die Synthese nach den Reaktionsbedingungen von COOPERWOOD *et al.* (Abbildung 135).^[179]

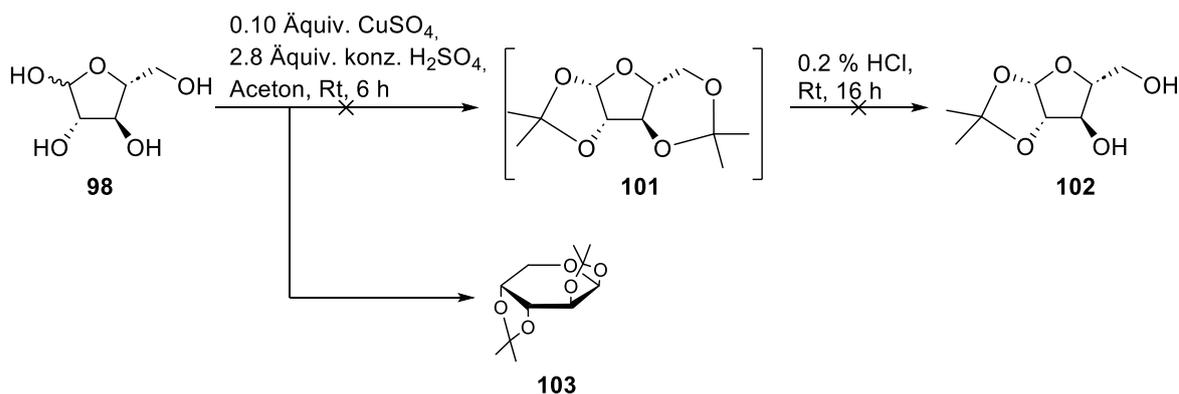


Abbildung 135: Reaktionsbedingungen zur Einführung von Isopropylidenklammern nach COOPERWOOD *et al.*^[179]

Es wurde die Acetylierung über die anfängliche Einführung von Isopropyliden-Klammern ausgewählt, da Arabinose in Lösung hauptsächlich als Pyranoseform vorliegt.^[180] Mit der Einführung der Isopropyliden-Klammern sollte ähnlich wie es bei der Xylose möglich ist, die Pentose **98** in die Furanoseform gezwungen werden und anschließend schrittweise acetyliert werden.^[179] Hierfür wurde das Edukt **98** in Aceton suspendiert und mit Kupfersulfat sowie konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Nach Rühren für sechs Stunden wurde die Reaktionslösung mit 25 %iger Ammoniaklösung neutralisiert, wobei ein farbloser Feststoff ausfiel. Anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in verdünnter Salzsäure (0.2 %ig) gelöst und über Nacht gerührt. Unter diesen leicht sauren Bedingungen sollte die 3,5-O-Isopropylidenklammer des Zwischenproduktes **101** gespalten werden, da diese Reaktionsbedingungen lediglich für eine Spaltung an einem primären Alkohol ausreichend sind. Nach Extraktion mit organischen Lösungsmitteln und Waschen mit wässrigen Lösungen sollte die 3,5-entschützte Arabinose **102** in der wässrigen Phase vorliegen. Allerdings konnte in dieser Phase kein Produkt detektiert werden, sondern hauptsächlich doppelt Isopropylidengeklammerte Arabinose **103** in der organischen Phase beobachtet werden. Dies zeigte, dass keine der Isopropylidenklammern entfernt werden konnte, was ein Indiz dafür war, dass keine Isopropylidenklammer an einem primären Alkohol vorlag. So eine primäre

Alkoholfunktion ist bei der Arabinose lediglich in der Furanoseform vorhanden, weshalb darauf geschlossen wurde, dass in der Reaktion hauptsächlich die Arabinopyranose **103** gebildet wurde. Das Vorliegen der Pyranoseform konnte außerdem anhand der Stereochemie der Halbacetale im 5- und 6-Ring erklärt werden (Abbildung 136). In der Furanoseform **104** stehen die 3- und 5-Hydroxyfunktion in entgegengesetzten Richtungen zueinander, weshalb eine 3,5-Isopropylidenklammer in dieser Form nicht gebildet werden kann. In der Pyranoseform **105** hingegen sind beide Hydroxyfunktionen auf derselben Seite und die Bindung der Isopropylidenklammer erfolgt hier bevorzugt.

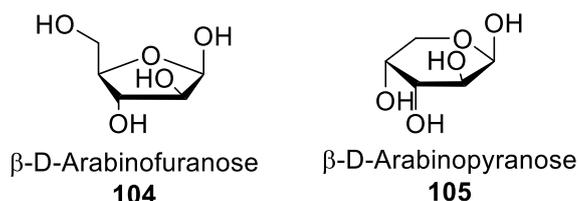


Abbildung 136: Strukturformeln der Arabinose in der Furanose- **104** und der Pyranoseform **105** gezeichnet in der HAWORTH-Schreibweise.

In einem nächsten Reaktionsansatz sollte eine etwas klassischere Methode der Acetylierung mit Essigsäureanhydrid erprobt werden (Abbildung 137).^[181]

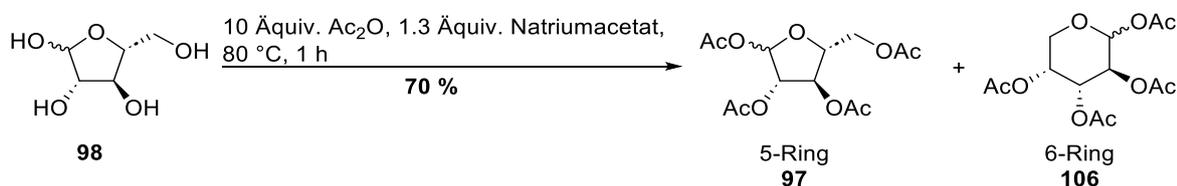


Abbildung 137: Reaktionsbedingungen zur Acetylierung von Arabinose **83** mit Essigsäureanhydrid und Natriumacetat.^[181]

Zu Arabinose **98** wurden Natriumacetat und Essigsäureanhydrid gegeben und das Reaktionsgemisch wurde für eine Stunde bei 80 °C gerührt. Nach wässriger Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung konnte das Produkt als α - und β -Arabinofuranose **97** sowie α - und β -Arabinopyranose **106** in einer Ausbeute von 70 % isoliert werden. Das Vorhandensein aller vier Stereoisomere wurde anhand des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums bestimmt. Zum einen konnten insgesamt vier H-1'-Protonen bestimmt werden (Abbildung 138, grün) und zum anderen konnten zwölf Singulets für die zwölf Acetylschutzgruppen aller vier Stereoisomere gezählt werden (Abbildung 138, blau).

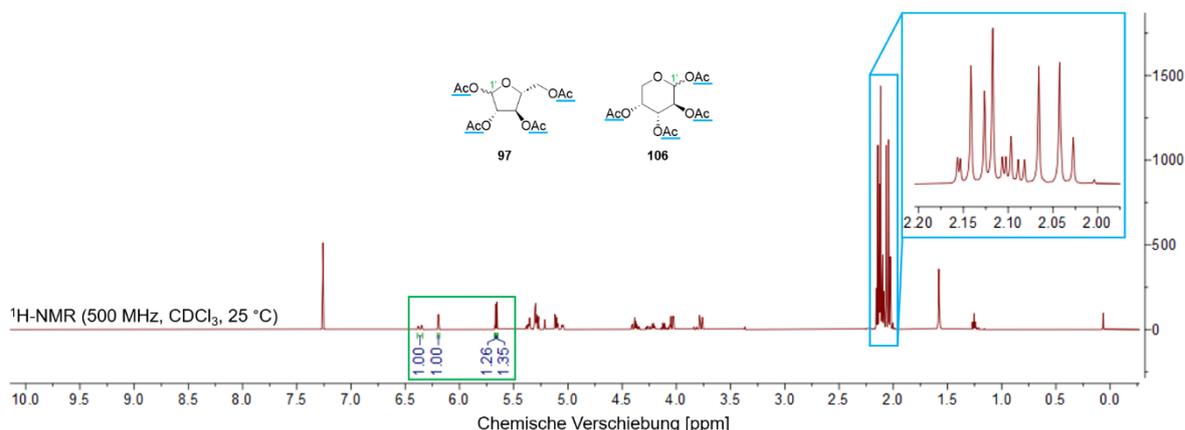


Abbildung 138: ¹H-NMR-Spektrum des Produktgemisches bestehend aus der acetylierten Furanose **97** und der Pyranose **106**. Die H-1'-Protonen sind in grün hervorgehoben und die Singulettensignale für die Acetylschutzgruppen sind in blau hervorgehoben. Das NMR-Spektrum wurde mit einer Frequenz von 500 MHz gemessen und die Probe wurde in CDCl₃ gelöst.

In einem letzten Versuch sollten die Reaktionsbedingungen nach Li *et al.* erprobt werden (Abbildung 139). Li *et al.* berichteten, dass bei einem dreistufigen Acetylierungsprozess lediglich das α- und β-Anomer der Arabinofuranose erhalten wurde.^[181]

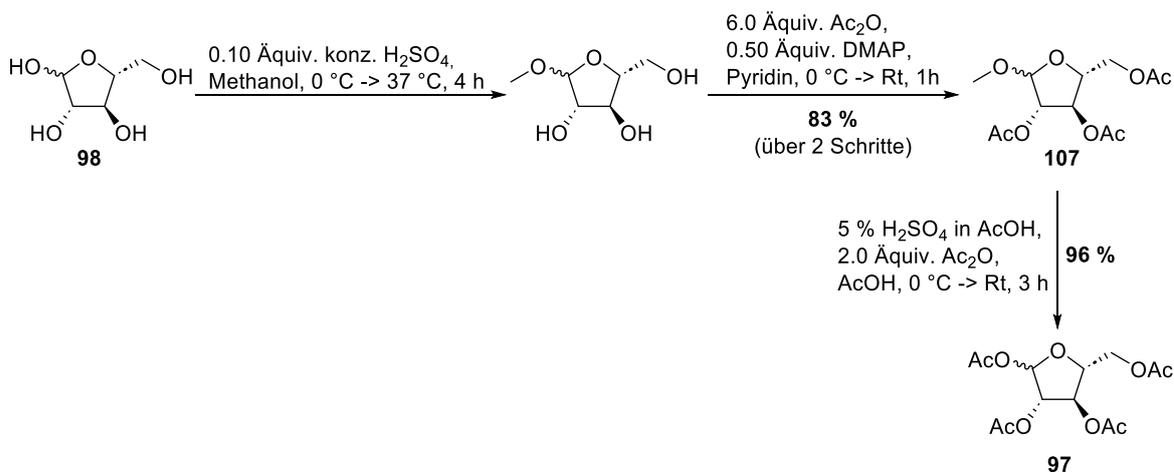


Abbildung 139: Reaktionsbedingungen der schrittweise Acetylierung von Arabinose **98** zur Darstellung der acetylierten Arabinofuranose **97**.^[181]

Zunächst wurde Arabinose **98** in Methanol gelöst und bei 0 °C mit konzentrierter Schwefelsäure tropfenweise versetzt. Anschließend wurde für vier Stunden bei 37 °C gerührt. Nach Zugabe von Natriumacetat und erneutem Rühren bei 37 °C für 30 Minuten wurden alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt, der Rückstand in Pyridin gelöst, auf 0 °C gekühlt und Essigsäureanhydrid sowie DMAP hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend säulenchromatographisch gereinigt. Das Produkt **107** konnte in einer Ausbeute von 83 % über

zwei Stufen isoliert werden. In einem letzten Schritt wurde auch die 1-Position acetyliert, indem die Arabinose **107** mit Essigsäure, Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure bei 0 °C versetzt wurde. Nach Rühren für drei Stunden und säulenchromatographischer Reinigung konnte die vollständig acetylierte Arabinose **97** in einer Ausbeute von 96 % isoliert werden. Die Bildung des Fünfrings wurde anhand eines HMBC-NMR-Spektrums bestätigt (Abbildung 140). Bei einem acetylierten Fünfring würde im HMBC-Spektrum eine Kopplung zwischen den H-5'-Protonen und dem Carbonylkohlenstoffatom der Acetylschutzgruppe, die sich ebenfalls an der 5'-Position des Zuckers befindet, beobachtet werden.

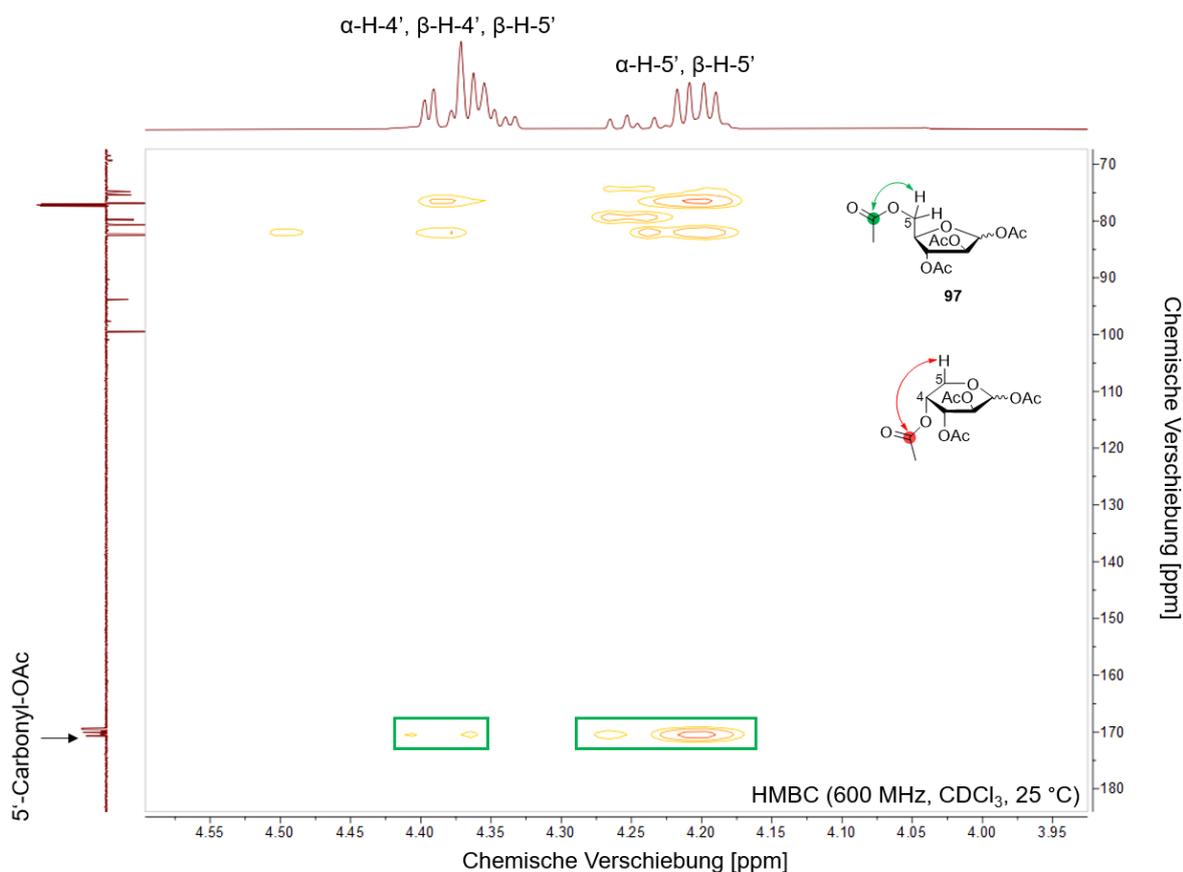


Abbildung 140: Ausschnitt des HMBC-NMR-Spektrums des Produktes **82**. Die Messung erfolgte bei einer NMR-Frequenz von 600 MHz und die Probe wurde in CDCl_3 gelöst.

In der Pyranoseform entspricht die 5-OAc-Gruppe, der Acetylgruppe, die an der 4'-Position gebunden ist und in dieser Konformation kann keine Kopplung zwischen den H-5'-Protonen und dem 4'-Carbonyl-OAc beobachtet werden (Abbildung 140, rot). Da allerdings eine Kopplung zwischen dem entsprechenden Carbonylkohlenstoffatom und den H-5'-Protonen festgestellt werden kann, wird davon ausgegangen, dass es sich bei dem isolierten Produkt um die gewünschte Furanoseform handelt (Abbildung 140, grün).

In einem nächsten Schritt sollte der Fluoreszenzmarker **89** über eine *N*-glycosidische Bindung an das anomere Kohlenstoffatom der Ribose **97** gebunden werden. Hierfür musste zunächst 7-Amino-4-(trifluormethyl)cumarin **88** über eine Kondensationsreaktion hergestellt werden. Die dafür verwendeten Reaktionsbedingungen sind in Abbildung 141 aufgeführt.^[182]

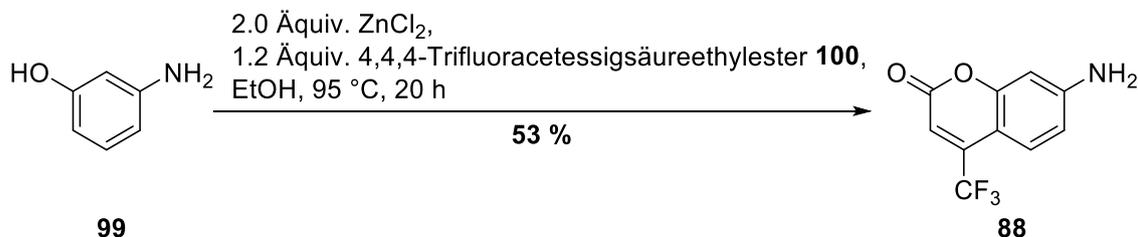


Abbildung 141: Reaktionsbedingungen zur Synthese des Fluoreszenzmarkers **73** ausgehend von *m*-Aminophenol **99**.^[182]

Es wurden *m*-Aminophenol **99** und, das vorher gemörsert und für 15 Minuten im Vakuum getrocknete, Zinkchlorid in Ethanol gelöst und 4,4,4-Trifluoracetessigsäureethylester **100** hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 95 °C gerührt. Nach mehrfacher säulenchromatographischer Reinigung konnte das Produkt **88** in einer Ausbeute von 53 % erhalten werden, welche identisch mit dem Literaturwert war (54 %).^[182] Der Fluoreszenzfarbstoff 7-Amino-4-(trifluormethyl)cumarin **88** wurde über eine PECHMANN-Kondensation dargestellt. Der mechanistische Ablauf ist in Abbildung 142 gezeigt.

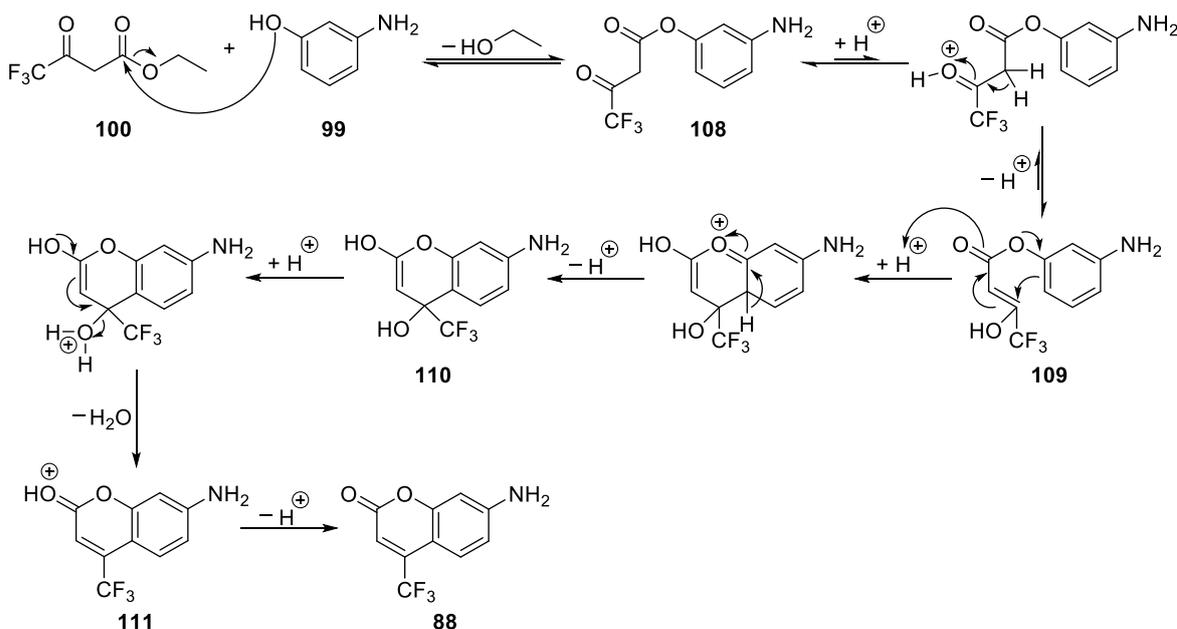


Abbildung 142: Mechanismus der PECHMANN-Kondensation.

Bei der PECHMANN-Kondensation kommt es im ersten Schritt zur Umesterung von 4,4,4-Trifluoracetessigsäureethylester **100**. Dabei wird unter Abspaltung von Ethanol das Carbonylkohlenstoffatom der Esterfunktion nucleophil von einer phenolischen Hydroxyfunktion des *m*-Aminophenols **99** angegriffen. Daraufhin tautomerisiert die Ketoform **108** unter Säurekatalyse zur Enolform **109**, wobei das Ketotautomer **108** bevorzugt vorliegt. In einer MICHAEL-Addition wird das sechsgliedrige Ringsystem gebildet und nach anschließender Deprotonierung erfolgt die Rearomatisierung unter Bildung von Verbindung **110**. Danach wird die Hydroxyfunktion, die geminal zur Trifluormethylgruppe gebunden ist, protoniert und unter Abspaltung von Wasser die Verbindung **111** gebildet. In einem letzten Schritt wird das Carbonylsauerstoffatom deprotoniert und das Cumarinderivat **88** erhalten.^[183]

Für eine anschließende *N*-Glycosylierung sollte die vollständig acetylierte Arabinose **97** mit der Cumarinverbindung **88** umgesetzt werden. In einem ersten Versuch wurden die Reaktionsbedingungen nach SHEN *et al.* erprobt (Abbildung 143).^[184]

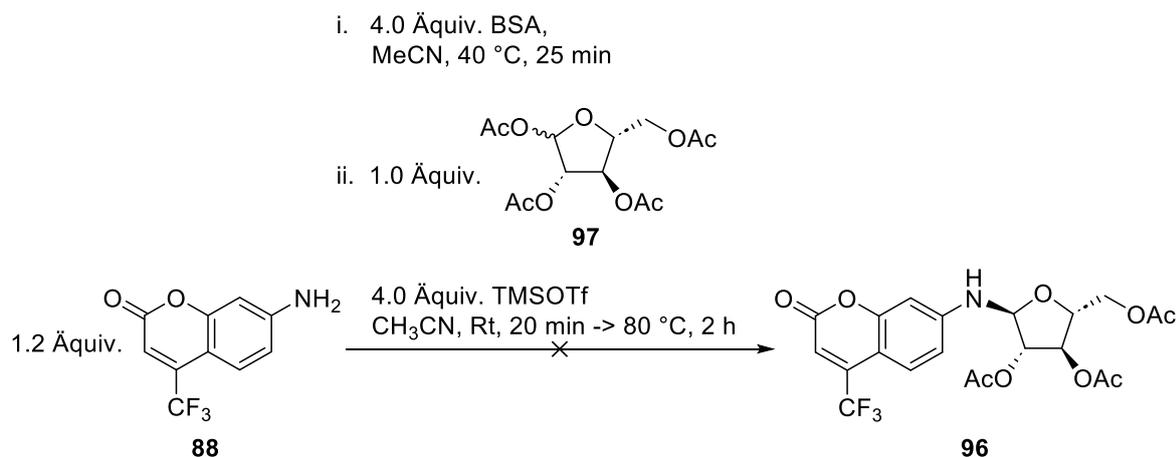


Abbildung 143: Reaktionsbedingungen zur *N*-Glycosylierung der vollständig acetylierten Arabinose **97** mit dem Fluoreszenzfarbstoff AMC **88**.^[184]

Das gewünschte Produkt sollte mit der Wahl dieser Reaktionsbedingungen über die SILYL-HILBERT-JOHNSON-Reaktion hergestellt werden. Hierbei wurde der Fluoreszenzmarker **88** zunächst mit Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA, **112**) umgesetzt, um somit das silylierte Cumarinderivat **113** zu erhalten. Nachfolgend wurde die Acetylgruppe am anomeren Zentrum des Zuckers **97** durch die Lewis-Säure Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (TMSOTf, **114**) aktiviert und unter Abspaltung des Acetals sollte es zur Bildung des mesomeriestabilisierten Oxocarbenium-Ions **115** kommen. Durch einen intramolekularen nucleophilen Angriff des Carbonylsauerstoffatoms der 2'-Acetylgruppe kann die Oxo-

carbenium-Zwischenstufe **115** über den Nachbargruppeneffekt stabilisiert und das stabilisierte Kation **116** gebildet werden. Dies hat zur Folge, dass das silylierte Cumarinderivat **113** das Kation **116** nur von der Unterseite angreifen kann, wodurch sich stereoselektiv die α -N-glycosidische Bindung ausbildet (Abbildung 144).^[185,186]

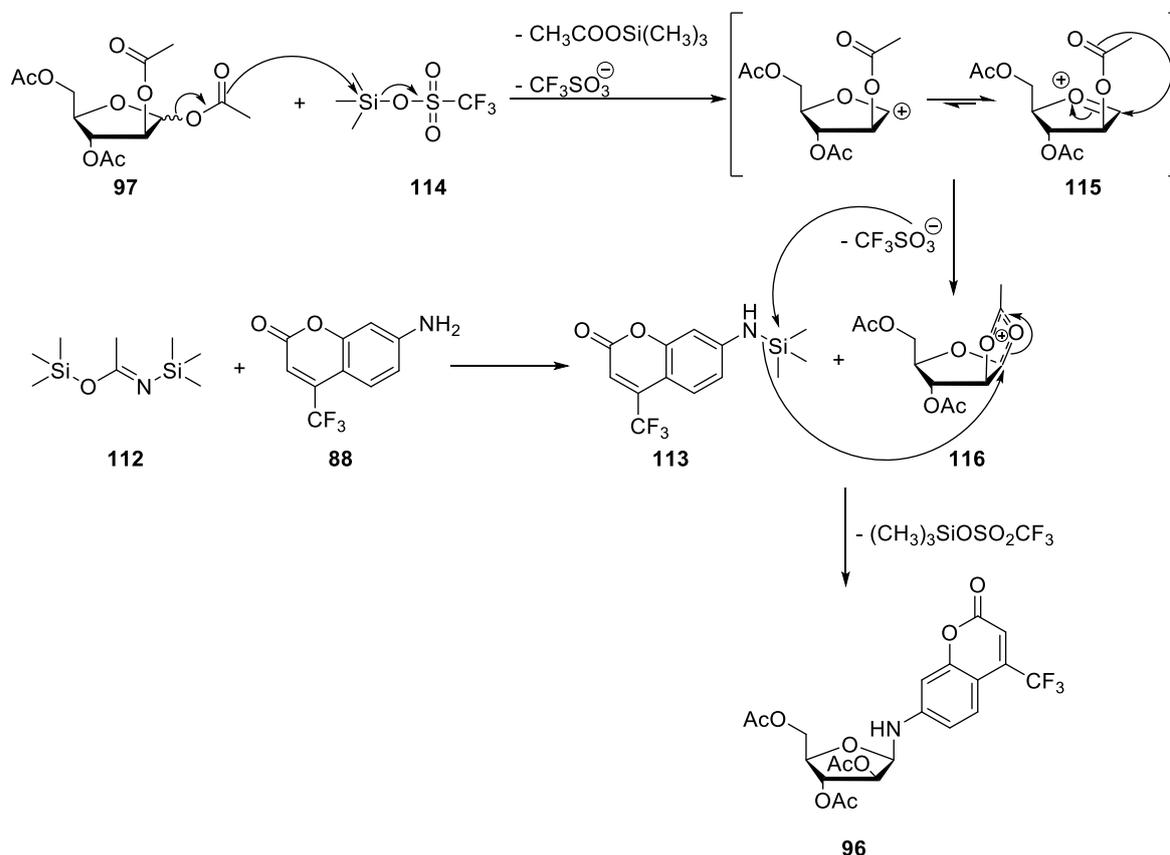


Abbildung 144: Mechanismus der Silyl-HILBERT-JOHNSON-Reaktion zur Darstellung des α -N-Glycosids **96** über das Oxocarbenium-Ion **115** als Intermediat.^[185,186]

Nach wässriger Aufarbeitung und Extraktion mit organischen Lösungsmitteln konnte dünn-schichtchromatographisch die Bildung von mindestens sechs Nebenprodukten festgestellt werden. Dies erschwerte die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel und es konnte kein Produkt isoliert werden. Zusätzlich konnte für beide Edukte **97** und **88** ein R_f -Wert von 0.4 bestimmt werden, weshalb davon ausgegangen wurde, dass auch das gewünschte Produkt **96** einen ähnlichen R_f -Wert aufweisen und somit eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel nicht möglich sein würde.

Aus diesem Grund sollte die Glycosylierung nach SHEN *et al.* ein weiteres Mal durchgeführt werden und anschließend das erhaltene Rohprodukt direkt mit einem Überschuss an Ammoniak in Methanol deacetyliert werden.^[184,187]

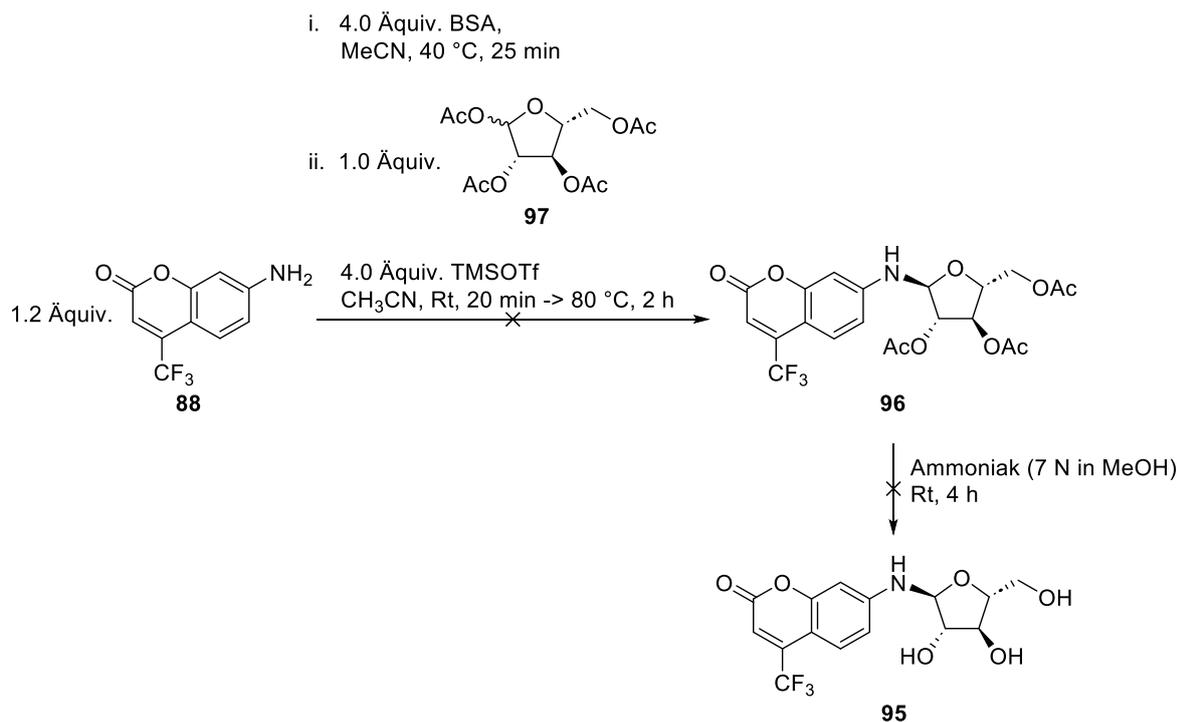


Abbildung 145: Reaktionsbedingungen zur *N*-Glycosylierung und einer anschließenden Deacetylierung mittels Ammoniak.^[184,187]

Die Glycosylierung wurde analog zu Abbildung 145 durchgeführt und für die Deacetylierung wurde das Rohprodukt der SILYL-HILBERT-JOHNSON-Reaktion in 7 N Ammoniak in Methanol suspendiert und das Reaktionsgemisch für vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Durch die freien Hydroxyfunktionen sollte das Produkt **95** einen anderen R_f -Wert als die Edukte **97** und **88** aufweisen und somit besser isoliert werden können. Trotz dessen konnte auch hier kein Produkt **95** isoliert werden.

Da eine Glycosylierung über die SILYL-HILBERT-JOHNSON-Reaktion sehr bekannt ist und in vorangegangenen Arbeiten bereits mehrfach mit unterschiedlichen Zuckern und Nucleobasen erfolgreich durchgeführt wurde,^[131,152] wurde vermutet, dass nicht die Bildung des Oxocarbeniumions **115**, sondern die Silylierung der primären Aminogruppe des Cumarinderivats **88** das Problem war. Aus diesem Grund sollten alternative Glycosylierungsreaktionen erprobt werden.

In einem nächsten Reaktionsansatz wurde die Glycosylierung mittels Mikrowellenbestrahlung getestet. Hierfür wurden die Reaktionsbedingungen nach SIDDQUI *et al.* angewendet (Abbildung 146).^[188]

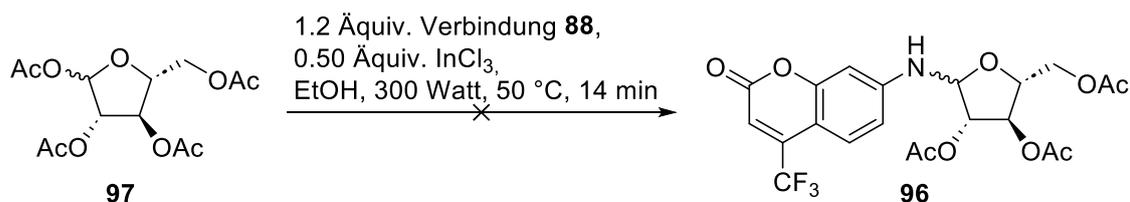


Abbildung 146: Mikrowellen-unterschützte Glycosylierungsreaktion zur Darstellung des *N*-Glycosids **96**.^[188]

Es wurde die Arabinofuranose **97**, der Fluoreszenzmarker **88** und eine alkoholische Lösung des Lewis-Säure-Katalysators Indiumtrichlorid für 14 Minuten mit 300 Watt bestrahlt. Nach vollendeter Reaktionszeit wurde der Fortschritt der Reaktion durch die Mikrowellenbestrahlung dünnschichtchromatographisch verfolgt. Hierbei konnte jedoch kein Umsatz des Startmaterials beobachtet werden. Selbst bei dreifacher Wiederholung der 14-minütigen Bestrahlung konnte keine Bildung eines Produktes **96** beobachtet werden, weshalb keine weiteren Glycosylierungsversuche unter Verwendung von Mikrowellenbestrahlung durchgeführt wurden.

SCHWÖGLER *et al.* beschrieben, dass unter Einsatz von Ammoniumchlorid die *N*-Glycosylierung zwischen einer vollständig acetylierten Ribofuranose und einem Nitroxylol erfolgreich mit einer Ausbeute von 55 % verlief. Diese Reaktionsbedingungen wurden auf das eigene Syntheseproblem mit der Arabinofuranose **97** und dem Cumarinderivat **88** übertragen (Abbildung 147).^[189]



- A)** 0.1 Äquiv. NH_4Cl , Lösungsmittel: EtOH, Reaktionszeit 4 h, **Ausbeute: 0 %**.
B) 0.5 Äquiv. NH_4Cl , Lösungsmittel: EtOH, Reaktionszeit 18 h, **Ausbeute: 0 %**.
C) 0.5 Äquiv. NH_4Cl , Lösungsmittel: EtOH/DMF (3:1 v/v), Reaktionszeit 3 Tage, **Ausbeute: 6 %**.

Abbildung 147: Reaktionsbedingungen der Glycosylierungsreaktion mit Ammoniumchlorid. Die Synthese wurde mehrfach durchgeführt, wobei die Reaktionsbedingungen jedes Mal verändert wurden (**A**, **B** und **C**).^[189]

Die Reaktion wurde dreimal wiederholt, wobei sich die unterschiedlichen Reaktionsansätze in der Menge des eingesetzten Ammoniumchlorids, der verwendeten Lösungsmittel oder der Reaktionszeit (Abbildung 147, **A**, **B** und **C**) unterscheiden. Erst nach einer Erhöhung der eingesetzten Menge an Ammoniumchlorid, der Verwendung eines Ethanol/DMF-

Gemisches als Lösungsmittel und der Verlängerung der Reaktionszeit auf drei Tage konnte das gewünschte Produkt in einer geringen Ausbeute von 6 % isoliert werden (Abbildung 147, C).

Für dieses Syntheseproblem waren diese Reaktionsbedingungen nicht geeignet, weshalb auf eine VORBRÜGGEN-Reaktion mit Zinntetrachlorid zurückgegriffen werden sollte.

Für die VORBRÜGGEN-Glycosylierung wurden die klassischen Reaktionsbedingungen, die in Abbildung 148 dargestellt sind, verwendet.^[185]

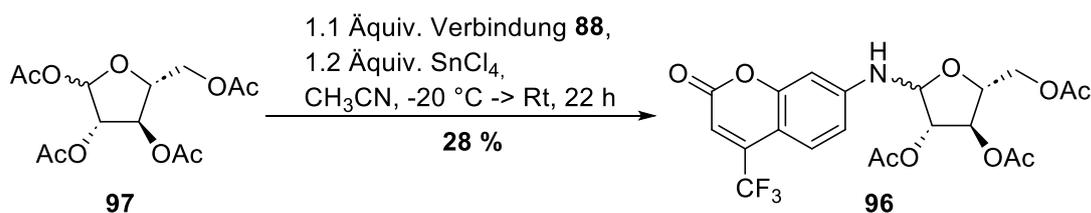


Abbildung 148: Reaktionsbedingungen zur Glycosylierungsreaktion unter Verwendung von Zinntetrachlorid.^[185]

Die Reaktion in Abbildung 148 beruht auf einem ähnlichen Mechanismus wie die SILYL-HILBERT-JOHNSON-Reaktion. Auch hier wird durch eine Lewis-Säure (Zinntetrachlorid) ein Oxocarbeniumion gebildet, welches nach einem intramolekularen nucleophilen Angriff über den Nachbargruppeneffekt als stabilisiertes Kation **116** vorliegt (vgl. Abbildung 144). Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte das Produkt in einer Ausbeute von 28 % erhalten werden. Allerdings war die Menge des isolierten Produktes so gering, dass nicht bestimmt werden konnte, ob tatsächlich lediglich das α -Anomer gebildet wurde.

Da die Ausbeuten aller durchgeführten Glycosylierungsreaktionen sehr gering waren, sollte eine andere Syntheseroute zur Darstellung des fluoreszenzmarkierten ADPR-Derivats **87** erprobt werden. Hierbei wurde auf die Syntheseroute zurückgegriffen, die bereits für die erfolgreiche Darstellung des fluoreszenzmarkierten Monophosphats **82** und von TFMU-ADPR **80** verwendet wurde. Ein Nachteil an dieser Synthesestrategie ist, dass hier keine selektive Synthese des α -Anomers gewährleistet werden kann, sondern bei einer Glycosylierung ein Gemisch aus α - und β -Ribofuranose erhalten wird. Vorteilhaft an der Synthesestrategie ist, dass nicht mit Arabinose **98** als Startmaterial gearbeitet wird und somit die Synthese um insgesamt zwei Reaktionsschritte verkürzt wird. Außerdem sind die Reaktionen in der Arbeitsgruppe um MEIER bereits bekannt und können durch das vorhandene Vorwissen besser auf eigene Synthesefragestellungen überführt werden.

Das neue Retrosyntheschema zur Darstellung des fluoreszenzmarkierten Monophosphats **117** ist in Abbildung 149 dargestellt.

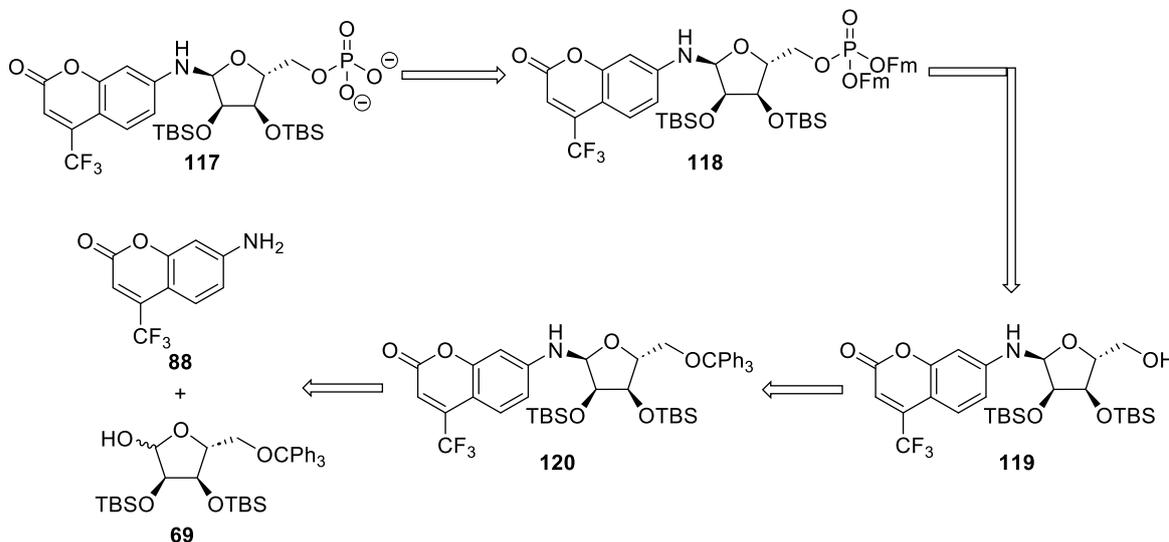


Abbildung 149: Retrosynthetisches Schema zur Darstellung des fluoreszenzmarkierten Monophosphats **117** ausgehend von der Ribose **69** und dem Cumarinderivat **88**.

Das fluoreszenzmarkierte Monophosphat **117** sollte in einem letzten Schritt über die Entschützung der 9-Fluorenylmethylschutzgruppen der Verbindung **118** und einer vorherigen Phosphorylierung ausgehend vom Ribosid **119** dargestellt werden. Die Verbindung **119** sollte über eine Entfernung der 5'-Tritylgruppe erhalten werden. Die Synthese des *N*-Glycosids **120** sollte über eine Kupplung zwischen dem Fluoreszenzmarker **88** und der geschützten Ribose **69** erfolgen.

Die Darstellung der geschützten Ribose ausgehend von *D*-Ribonsäure- γ -lacton **72** wurde bereits in Kapitel 6.1.7 beschrieben und erfolgte analog zu den Reaktionsbedingungen, die in Abbildung 109 aufgeführt sind.

Die *N*-Glycosylierung des Zuckers **69** sollte über eine Mitsunobu-Reaktion unter Verwendung von Triphenylphosphin und Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) erfolgen (Abbildung 150).^[139,190]

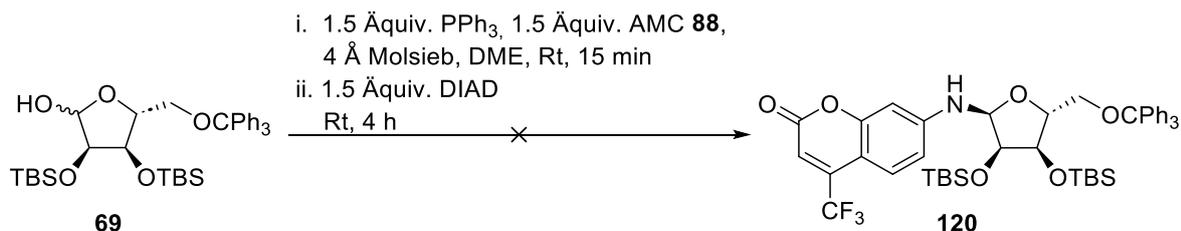


Abbildung 150: Reaktionsbedingungen der fehlgeschlagenen MITSUNOBU-Reaktion zur Darstellung des Ribosids **120**.^[139,190]

Der Fortschritt der Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt und nach einer Reaktionszeit von vier Stunden konnte der vollständige Umsatz des Eduktes **69** beobachtet werden, weshalb die Reaktion beendet wurde. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel konnte allerdings nicht das gewünschte Produkt isoliert werden. Stattdessen konnte massenspektrometrisch eine Masse von 490.1217 g/mol festgestellt werden, dass auf die Bildung eines Dimers aus zwei Fluoreszenzmarkermolekülen hindeutet (Abbildung 151). Das Dimer **121** besitzt eine berechnete exakte Masse von 480.0436 g/mol für die einfach positive Form.

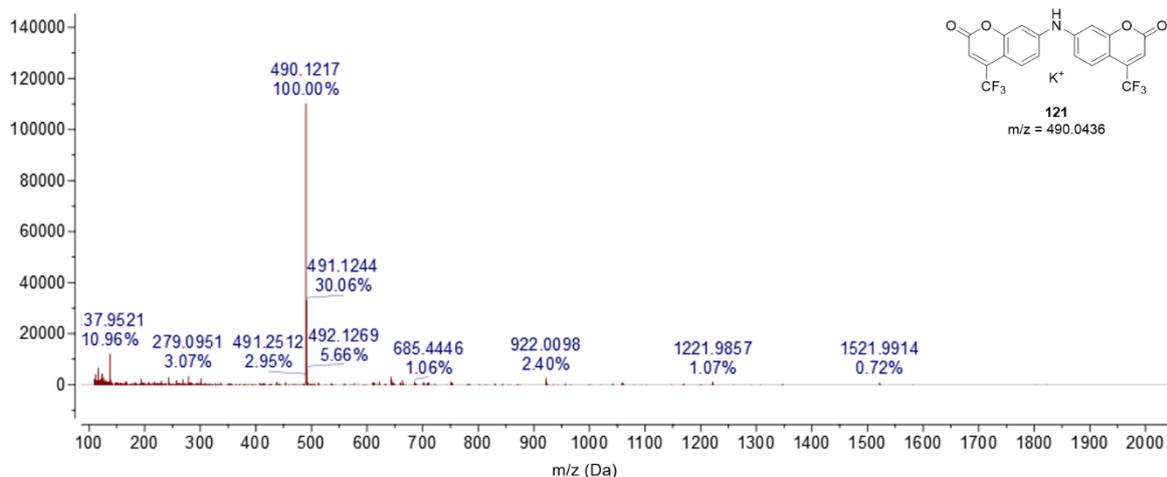


Abbildung 151: ESI-Massenspektrum gemessen im Positivionenmodus eines isolierten Nebenproduktes der MITSUNOBU-Reaktion.

Der mögliche Bildungsmechanismus dieses Dimers **121** über eine MITSUNOBU-Reaktion ist in Abbildung 152 dargestellt. Zunächst addiert sich das Phosphin an die schwache N=N- π -Bindung und es entsteht das Betain **122** als Zwischenstufe, wobei die negative Ladung durch eine Estergruppe stabilisiert wird. Anschließend wird das Cumarinderivat **88** deprotoniert und ein reaktives Nucleophil **123** erzeugt. Im nächsten Schritt greift dann dieses Nucleophil **123** das positiv geladene Phosphoratom in einer S_N2-Reaktion an, wobei die Bindung zum Stickstoffatom gespalten wird und die Verbindung **124** entsteht.^[149,191]

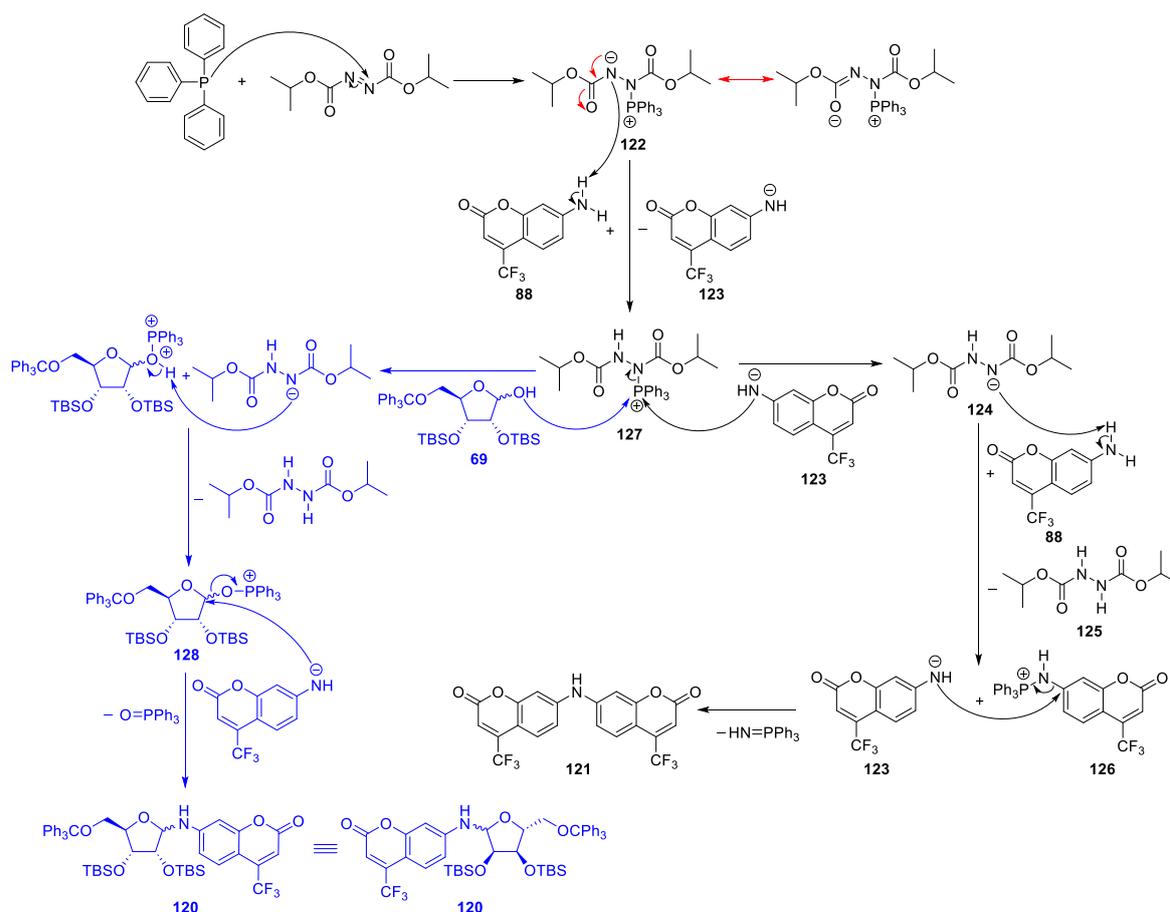


Abbildung 152: Mechanismus der MITSUNOBU-Reaktion, die möglicherweise zur Bildung des Dimers **121** geführt hat. Die Mesomeriestabilisierung des Betains **122** ist durch rote Pfeile beschrieben. Der MITSUNOBU-Mechanismus, der zur Bildung des gewünschten Produktes **120** geführt hätte, ist in blau dargestellt.

Das gebildete Stickstoff-Anion **124** deprotoniert erneut ein Coumarinderivat **88** und es entsteht die reduzierte Form **125** von DIAD. Im letzten Schritt wird in einer S_N2 -Reaktion das Kohlenstoffatom der Verbindung **126** durch das Nucleophil **123** angegriffen. Hierbei entsteht Aminophosphin und das Dimer **121**.^[149,191]

Für eine erfolgreiche Darstellung des gewünschten Produktes **120** hätte nicht das erzeugte Nucleophil **123** das positiv geladenen Phosphoratom der Verbindung **127** angreifen sollen, sondern die 1'-Hydroxyfunktion der Ribose **69**, damit sich nach einer anschließenden Deprotonierung die elektrophile Spezies **128** bilden kann (Abbildung 152, blau).^[149,191]

Eine mögliche Ursache für die Bildung des Dimers **121** anstatt des gewünschten Produktes **120** könnte die stärkere Nucleophilie des deprotonierten Fluoreszenzmarkers **123** im Vergleich zur Ribose **69** sein. Um eine erfolgreiche Kupplung zu ermöglichen, sollte dementsprechend verhindert werden, dass die nucleophile Spezies **123** während der Reaktion gebildet wird. Hierfür sollte die Reaktion wiederholt werden, wobei

anstatt von DIAD nun *N*-Bromsuccinimid (NBS) als Reagenz verwendet wurde. Die Reaktionsbedingungen dieser Reaktion sind in Abbildung 153 dargestellt.^[192]

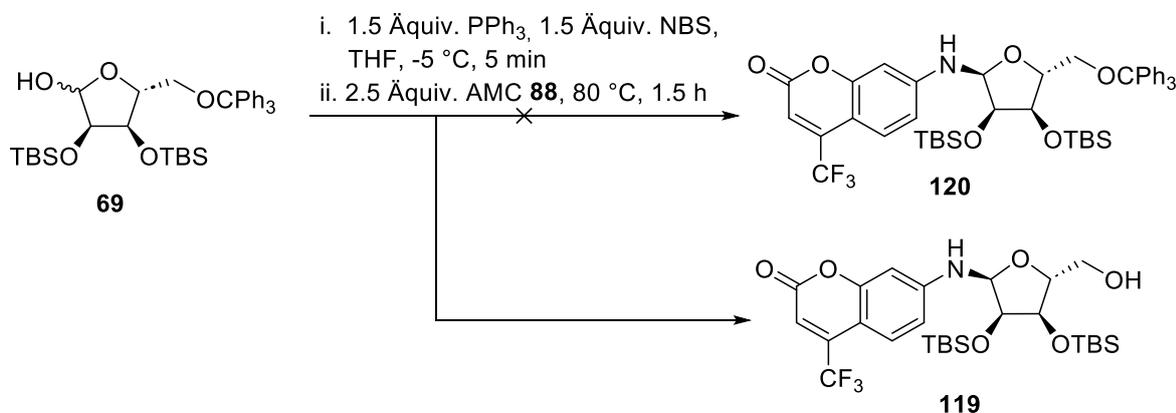


Abbildung 153: Reaktionsbedingungen der MITSUNOBU-ähnlichen Reaktion zur Darstellung des Ribosids **119**.^[192]

Es wurde erneut eine MITSUNOBU-artige Reaktion erprobt, da Glycosylierungen üblicherweise mit sterisch anspruchsvollen Schutzgruppen, die benachbart zum anomeren Kohlenstoffatom von Ribose sind, zur stereoselektiven Bildung des β -Anomers führen. Das liegt daran, dass die *tert*-Butyldimethylsilylgruppen die Unterseite des in einer klassischen Glycosylierungsreaktion gebildete Oxocarbeniumions abschirmen und somit nur der Angriff der Oberseite möglich ist. Bei einer MITSUNOBU-Reaktion kommt es jedoch nicht zur Bildung eines Oxocarbeniumions, sondern es entsteht eine elektrophile Spezies (vgl. Verbindung **128**, Abbildung 152). Bei einem nachfolgenden Angriff des anomeren Kohlenstoffatoms kommt es zu einer Inversion des Stereozentrums, was zu einer gesteigerten Bildung des α -Anomers führt. Aus diesem Grund war die MITSUNOBU-Reaktion im Hinblick zur Realisierung der α -Konfiguration sehr attraktiv.

Für die in Abbildung 153 dargestellten Reaktion wurden zunächst das Edukt **69** und Triphenylphosphin in THF gelöst auf -5 °C gekühlt und NBS portionsweise hinzugegeben. Erst nach 5 Minuten wurde der Fluoreszenzmarker **88** ebenfalls zum Reaktionsgemisch gegeben und für 1.5 Stunden bei 80 °C gerührt.

Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte nicht die Verbindung **120**, sondern der 5'-entschützte Zucker **119** in einer Ausbeute von 27 % isoliert werden. Der zugrunde liegende Mechanismus der Umsetzung über einen MITSUNOBU-artigen Mechanismus ist in Abbildung 154 dargestellt.

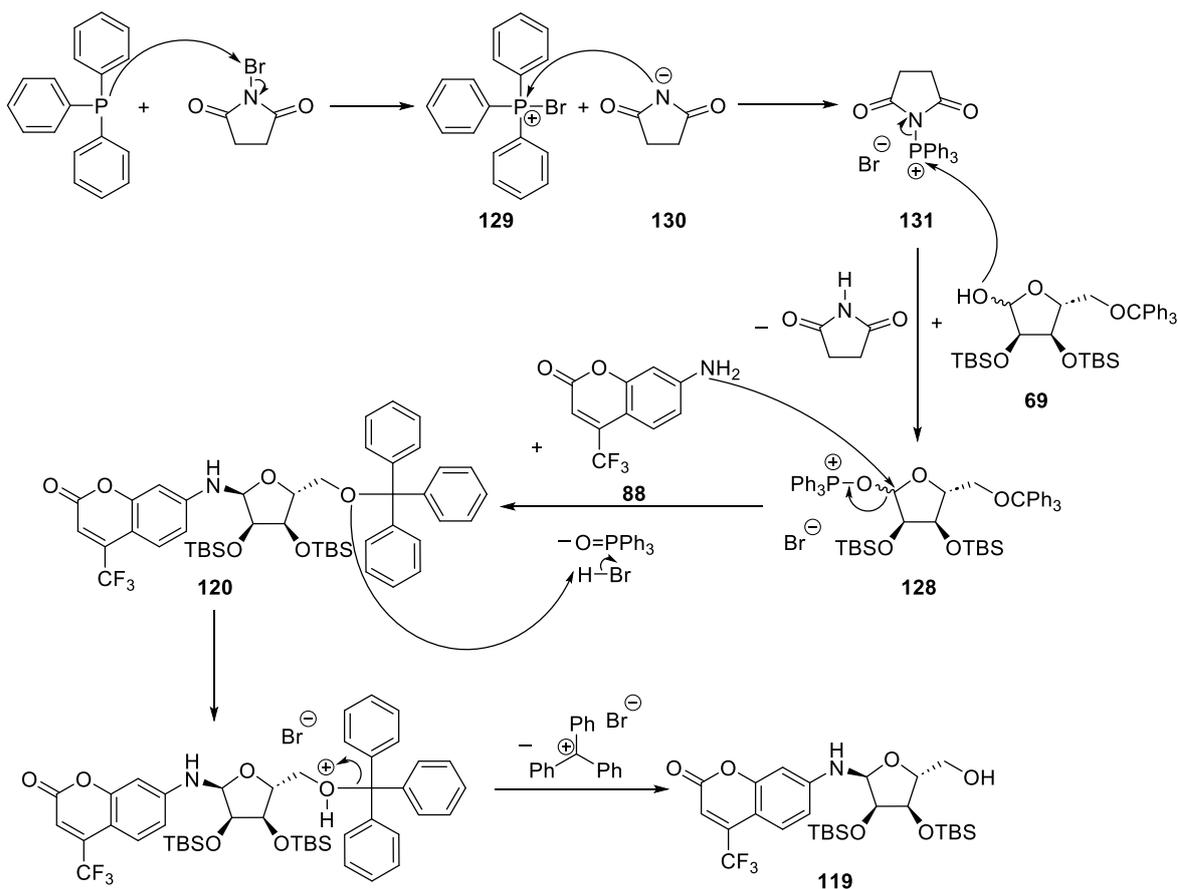


Abbildung 154: MITSUNOBU-artiger Mechanismus der Bildung des Ribosids **120** und *in situ* Detritylierung zur Darstellung der 5'-entschützten Ribose **119**.^[149,192]

Im ersten Schritt des Mechanismus kommt es zum nucleophilen Angriff des Triphenylphosphins am Bromatom von NBS unter Bildung des Phosphoniumsalzes **129**. Das Succinimidion **130** greift das Phosphoratom des Salzes **129** nucleophil an, wodurch es zur Bildung des *N*-Phosphoniumions **131** kommt. Diese Verbindung ist sehr reaktiv und reagiert sofort mit der Alkoholfunktion des anomeren Zentrums des Zuckers **69** zur elektrophilen Spezies **128**. Im folgenden Schritt greift dann die Aminofunktion des Fluoreszenzmarkers **88** die Verbindung **128** nucleophil am anomeren Zentrum an, wobei dieser Schritt deutlich langsamer stattfindet. Dies ist auf die sterische Hinderung der raumgreifenden Schutzgruppen des Zuckers sowie durch die Sterik des Fluoreszenzmarkers zurückzuführen. Nach dem nucleophilen Angriff wird Phosphinoxid sowie Bromwasserstoff freigesetzt.^[192] Die 5'-Tritylschutzgruppe der Verbindung **120** wurde dann unter den sauren Bedingungen durch das in der Reaktion gebildete HBr gespalten.^[149]

Während dieser Reaktion kam es nicht zur Bildung der nucleophilen Spezies **123** (vgl. Abbildung 152). Dadurch konnte nicht nur das erwartete Produkt **120** hergestellt werden, sondern in einer *one-pot*-Synthese ebenfalls der nächste Reaktionsschritt durch den

entstandenen Bromwasserstoff durchgeführt werden. Aus diesem Grund bezog sich die Ausbeute von 27 % auf eine Gesamtausbeute über zwei Schritte.

In Abbildung 155 ist das ^{19}F -NMR-Spektrum des Produktes **119** dargestellt. Es wurde lediglich ein Singulett bei -64.58 ppm detektiert, was dafür spricht, dass nur ein Anomer und nicht beide isoliert wurden und dass keine weiteren fluorhaltigen Nebenprodukte isoliert wurden. Bei dem isolierten Anomer handelte es sich um das α -Anomer. Ein Beleg für die Konfiguration des Zuckers wird nach der Synthese der phosphorylierten Spezies **118** mittels eines NOESY-Spektrums (vgl. Abbildung 159) gezeigt.

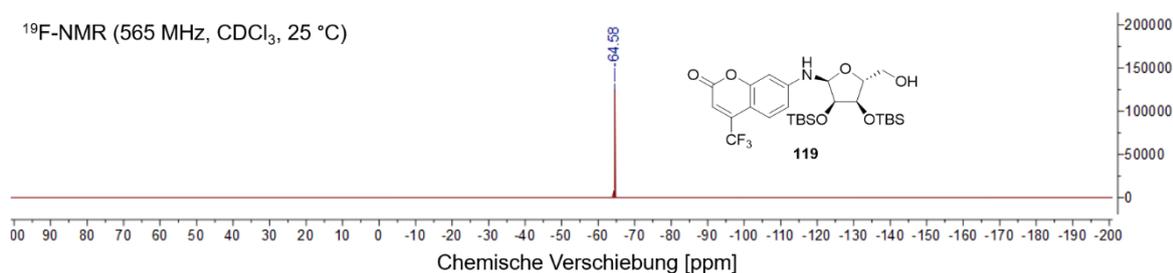


Abbildung 155: ^{19}F -NMR-Spektrum der Verbindung **119** gemessen in CDCl_3 und bei einer Frequenz von 565 MHz.

Die Phosphorylierung des 7-Amino-4-(trifluormethyl)cumarin-2',3'-bis-*O-tert*-butyldimethylsilyl-D-ribofuranosids **119** sollte mithilfe des Bis(fluorenylmethyl)phosphoramidits **77** erfolgen. Die entsprechenden Reaktionsbedingungen zur Darstellung des Phosphats **118** sind in Abbildung 156 dargestellt.^[139,147]

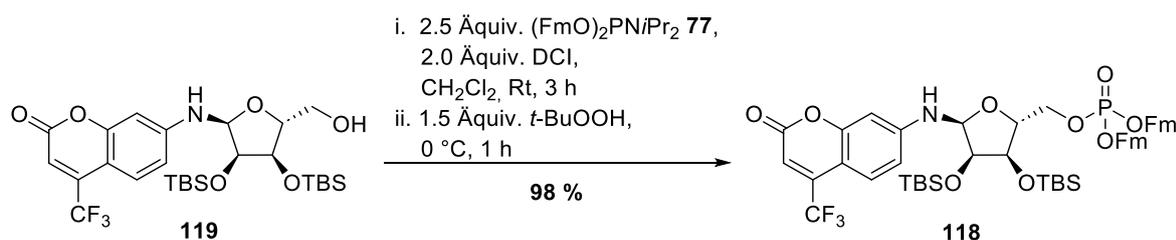


Abbildung 156: Reaktionsbedingungen der Phosphorylierung und mittels Fm-Phosphoramidit **77** und *t*-BuOOH.^[139,147]

Die Kupplung des Phosphoramidits **77** an die Hydroxygruppe des α -Anomers **119** erfolgte Aktivator-vermittelt mit DCl. Der zugrundeliegende Mechanismus verläuft analog zu dem in Abbildung 32 dargestellten Mechanismus.

Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel konnte das Produkt in einer Ausbeute von 98 % erhalten werden. Ein Indiz dafür, dass es sich bei der isolierten Fraktion

um das Produkt **118** handelte, bietet das in Abbildung 157 gezeigte Massenspektrum. Die gefundene Masse von 126.3830 g/mol für die einfach positiv geladene Spezies entspricht der berechneten Masse von 1026.3804 g/mol.

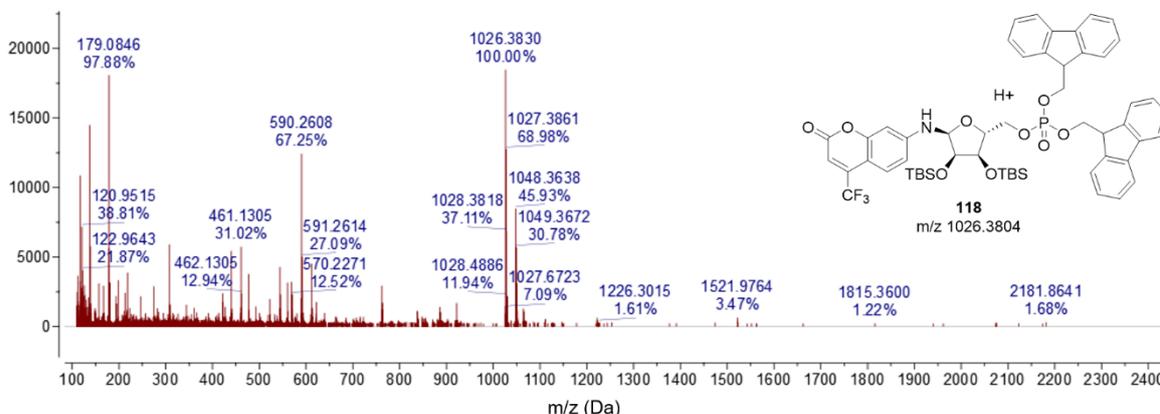


Abbildung 157: ESI-Massenspektrum der Verbindung **118**, aufgenommen im Positivionenmodus.

Anschließend konnte anhand des ^{31}P -NMR- und des ^{19}F -NMR-Spektrums die Isolation des Produktes **118** nachgewiesen werden (Abbildung 158). Beide Spektren zeigten jeweils nur ein Signal, welches im Fall des ^{31}P -NMR-Spektrums mit einer chemischen Verschiebung von -1.56 ppm die Isolation des Phosphats **118** und somit die erfolgreiche Phosphorylierung bestätigte (Abbildung 158, oben). Das Fluorsignal im ^{19}F -NMR-Spektrum mit einer chemischen Verschiebung von -63.54 ppm zeigte zudem, dass es zu keiner Spaltung des Fluoreszenzmarkers kam (Abbildung 158, unten).

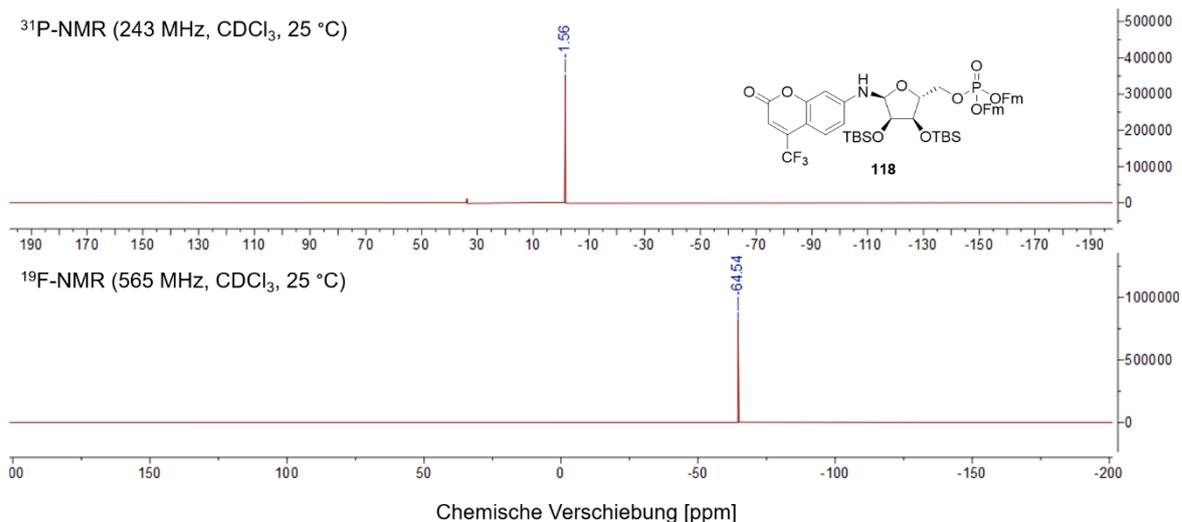


Abbildung 158: Oben: ^{31}P -NMR-Spektrum des Phosphats **118** gemessen in $\text{DMSO}-d_6$ und bei 243 MHz. Unten: ^{19}F -NMR-Spektrum des Phosphats **118** gemessen in $\text{DMSO}-d_6$ und bei 565 MHz.

Mit dem aufgenommenen NOESY-Spektrum wurde darüber hinaus die Konfiguration am anomeren Zentrum des Phosphats **118** bestimmt (Abbildung 159).

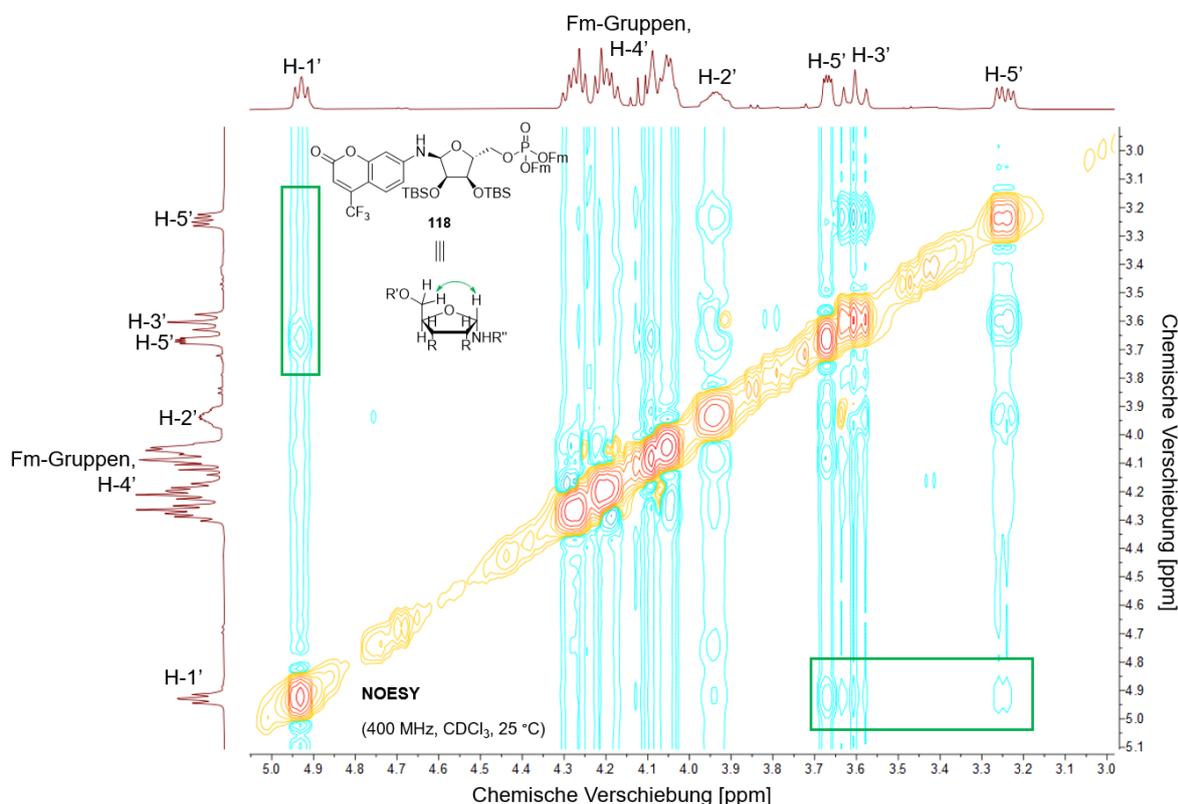


Abbildung 159: Ausschnitt des NOESY-Korrelationsspektrums des α -Anomers **118**. Die Messung erfolgte bei einer NMR-Frequenz von 400 MHz und die Verbindung **118** wurde in CDCl_3 gelöst.

In der α -Konfiguration würde das Proton $\text{H-1}'$ mit dem $\text{H-3}'$ - und dem $\text{H-5}'$ -Proton koppeln, da sie sich in dieser Konfiguration in räumlicher Nähe zueinander befinden. Die Kopplung mit dem $\text{H-3}'$ -Proton konnte nicht klar bestimmt werden, da das Signal im Spektrum im Rauschen untergeht. Allerdings bestätigte das in grün umrandete NOESY-Signale, dass das $\text{H-1}'$ -Proton und das $\text{H-5}'$ -Proton miteinander koppeln. Diese Kopplung kommt in der β -Konfiguration zwischen dem $\beta\text{-H1}'$ - und dem $\beta\text{-H-5}'$ -Proton nicht zustande, da die Protonen zu weit voneinander entfernt liegen.

Im letzten Schritt zur Darstellung des fluoreszenzmarkierten Monophosphats **117** sollten die Fm-Schutzgruppen entfernt werden. Wie bereits erwähnt, sind die Fm-Schutzgruppen unter basischen Bedingungen labil, weshalb die Reaktion erneut in Triethylamin/Acetonitril (1:4 v/v) durchgeführt wurde (Abbildung 160).

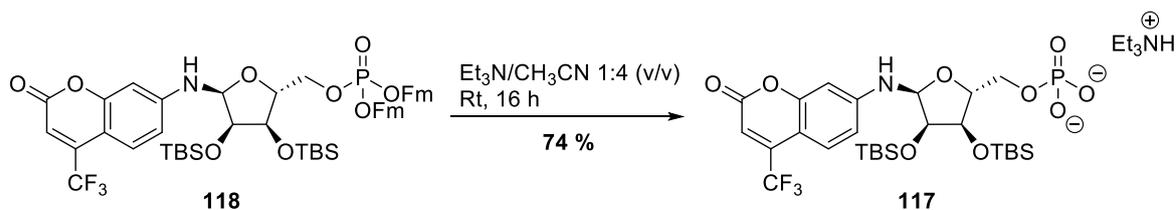


Abbildung 160: Reaktionsbedingungen der Entfernung der Fm-Schutzgruppen mittels einer Base.^[139]

Das Reaktionsgemisch wurde für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und nach säulenchromatographischer Reinigung konnte das Produkt **117** in einer Ausbeute von 74 % isoliert werden. Die erfolgreiche Darstellung wurde anhand des ^1H -NMR-, ^{31}P -NMR- und ^{19}F -NMR-Spektrums bestätigt (Abbildung 161).

Das Singulett bei -0.37 ppm repräsentierte die Phosphatgruppe der Verbindung **117** (Abbildung 161, oben). Mit diesem Spektrum wurde die Isolation des Monophosphats **117** bestätigt. Dies konnte ebenfalls mit dem Fluorsignal im ^{19}F -NMR-Spektrum festgestellt werden (Abbildung 161, mitte). Das Singulett mit einer chemischen Verschiebung von -63.54 ppm repräsentierte den Fluoreszenzmarker. Mittels des ^1H -NMR-Spektrums konnte festgestellt werden, dass das Fm-Schutzgruppen erfolgreich gespalten wurden, da im aromatischen Bereich ausschließlich die Protonensignale des Fluoreszenzmarkers zu sehen waren (Abbildung 161, unten). Zudem repräsentierte alle weiteren detektierten Protonensignale das gewünschte Produkt **117**.

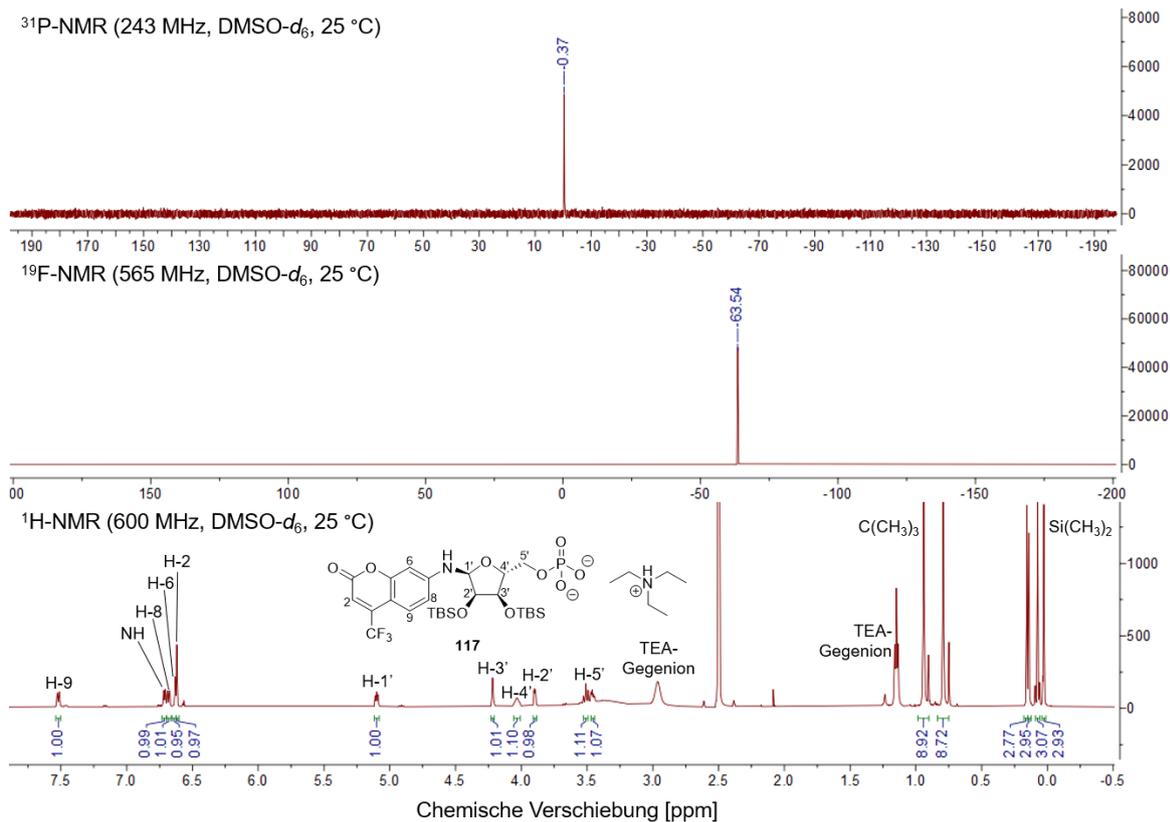


Abbildung 161: Oben: ³¹P-NMR-Spektrum des Phosphats **117**, gemessen in DMSO-*d*₆ und bei 243 MHz. Mitte: ¹⁹F-NMR-Spektrum des Phosphats **117**, gemessen in DMSO-*d*₆ und bei 565 MHz. Unten: ¹H-NMR-Spektrum des Phosphats **117**, gemessen in DMSO-*d*₆ und bei 600 MHz

In einem nächsten Syntheseschritt sollte eine Kupplungsreaktion nach MOHAMADY *et al.* mit dem fluoreszenzmarkierten Monophosphat **117** und AMP **16** durchgeführt werden (Abbildung 162).^[130,132]

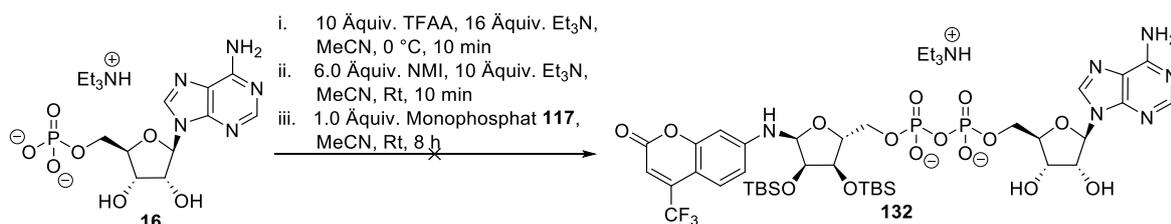


Abbildung 162: Reaktionsbedingungen der Kupplungsreaktion nach MOHAMADY *et al.* zur Synthese des Diphosphats **132**.^[130,132]

Die Reaktion wurde HPL-chromatographisch verfolgt und nach einer Reaktionszeit von acht Stunden wurde diese beendet und mehrfach säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel gereinigt. Die mehrfache Reinigung war notwendig, da nach jedem Reinigungsschritt neben dem vermeintlichen Produkt **132** signifikante Mengen an Monophosphat isoliert wurden. Dies wurde unter anderem vermutet, da nach jedem Reinigungsschritt eine Fraktion isoliert

wurde, die eine ähnliche Retentionszeit wie AMP **16** an RP-18-Kieselgel besaß. Die Vermutung wurde mit ^{31}P -NMR-Spektren unterstützt, welche nach jedem Reinigungsschritt aufgenommen wurden. In Abbildung 163 (oben) ist ein ^{31}P -NMR-Spektrum eines der isolierten Nebenfraktionen dargestellt. Es konnte ein Singulett bei 0.23 ppm festgestellt werden, welches hinsichtlich der chemischen Verschiebung und der Multiplizität ein Indiz für ein Monophosphat war. Außerdem wurde ein breites Phosphorsignal bei ca. -12 ppm beobachtet, welches im Rauschen unterging. Diese chemische Verschiebung spricht in der Regel für das Vorhandensein eines Diphosphats. Allerdings schien es sich hierbei nur um eine sehr geringe Menge des vermeintlichen Diphosphats zu handeln, da das Phosphorsignal, im Vergleich zum Monophosphatsignal, ein schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufwies (Abbildung 163, oben).

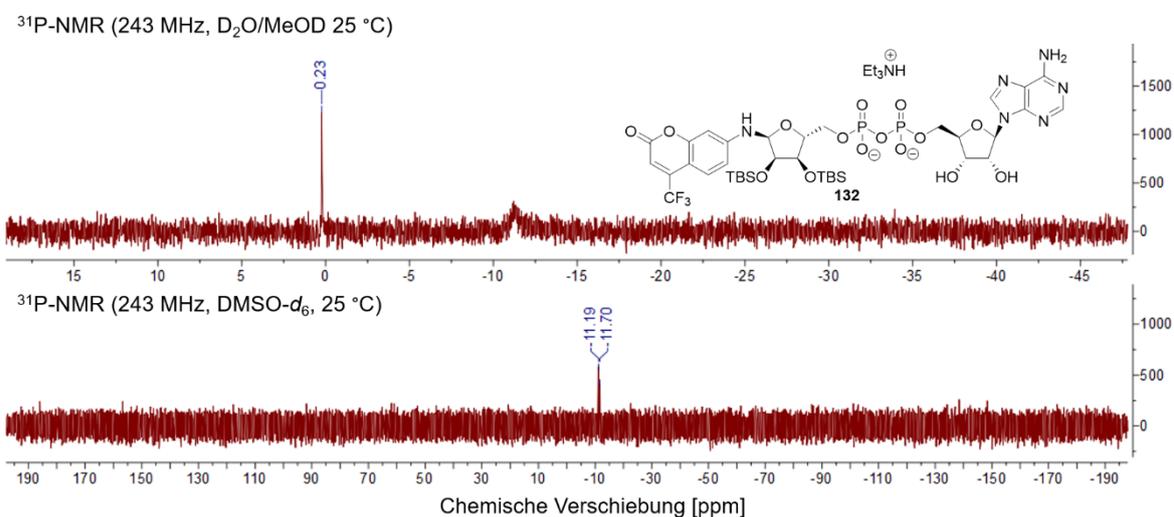


Abbildung 163: Oben: ^{31}P -NMR-Spektrum einer häufig isolierten Nebenfraktion gemessen bei einer Frequenz von 243 MHz und gelöst in einem Gemisch aus D_2O und MeOD. Unten: ^{31}P -NMR-Spektrum des vermeintlichen Diphosphats **132** gemessen bei einer Frequenz von 243 MHz und gelöst in $\text{DMSO}-d_6$.

Nach einem vierten Reinigungsschritt an RP-18-Kieselgel konnte schlussendlich eine Fraktion isoliert werden, die laut ^{31}P -NMR-Spektrum nur zwei Signale bei -11.19 ppm und -11.70 ppm aufwies, was ein Indiz für ein Diphosphat sein könnte (Abbildung 163, unten). Allerdings war die Menge der isolierten Fraktion zu gering, um eine ausführliche Identifikation mittels NMR-Spektroskopie durchzuführen. Trotz dessen wurde ein ESI-Massenspektrum im Negativionenmodus angefertigt, um zumindest feststellen zu können, ob es sich bei der geringen Menge an isoliertem Diphosphat um das gewünschte Produkt **132** handelte (Abbildung 164). Im Massenspektrum konnte eine Masse mit einem

m/z von 997.2605 beobachtet werden. Diese Masse stimmte mit der berechneten Masse des einfach negativ geladenen Diphosphats **132** mit einem m/z von 997.2619 überein.

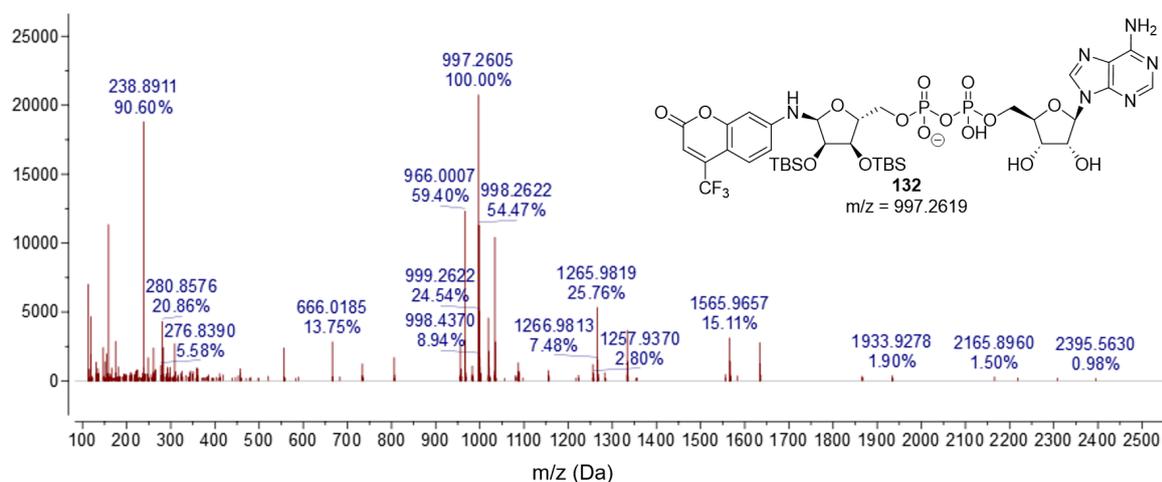


Abbildung 164: ESI-Massenspektrum des vermeintlichen Diphosphats **132**, gemessen im Negativionenmodus.

Anhand der Indizien wurde davon ausgegangen, dass tatsächlich eine geringe Menge des gewünschten Diphosphats **132** isoliert werden konnte, jedoch war die Menge nicht genug, um $^1\text{H-NMR}$ -, $^{13}\text{C-NMR}$ - oder 2D-NMR-Spektren aufzunehmen oder auch den letzten Reaktionsschritt der Silylentschützung durchzuführen. Deshalb wurde dieser Reaktionsansatz verworfen und es sollte erneut eine Kupplung mit AMP **16** erprobt werden. Im nächsten Versuch sollte allerdings nicht mit dem silylierten Monophosphat **117** gearbeitet werden, sondern zunächst das Monophosphat **117** entschützt und anschließend mit AMP **16** gekuppelt werden, da dies bereits bei der Synthese von TFMU-ADPR **80** zu guten Ausbeuten geführt hatte (vgl. Abbildung 129).

Für die Synthese des vollständig entschützten Monophosphats **89** sollten die Fm-Schutzgruppen und die Silylschutzgruppen in einer *one pot*-Synthese entfernt werden. Die entsprechenden Reaktionsbedingungen sind in Abbildung 165 aufgeführt.^[151]

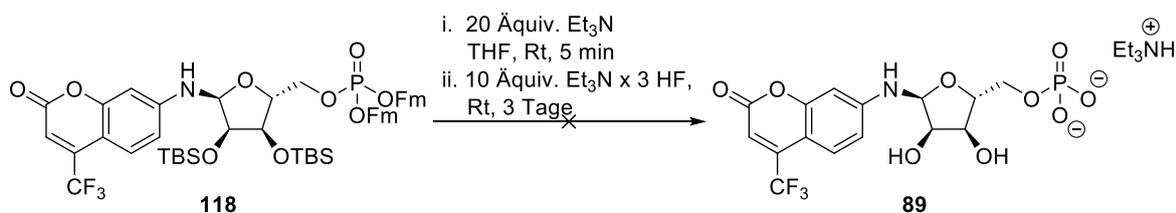


Abbildung 165: Reaktionsbedingungen Entschützung der Fm- und Silylgruppen in einer *one pot*-Synthese.^[151]

Für die Synthese wurde das Monophosphat **118** zunächst mit Triethylamin versetzt und für fünf Minuten gerührt. Hierdurch sollte die Entschützung der ersten Fm-Gruppe erfolgen. In einem nächsten Schritt wurde TREAT-HF hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für drei Tage gerührt, um die Spaltung der zweiten Fm-Schutzgruppe zu gewährleisten sowie die Entfernung der Silylgruppen zu erzielen.

Nach mehrfacher säulenchromatographischer Reinigung an RP-18-Kieselgel konnte kein Produkt isoliert werden. Es wurde von allen isolierten Fraktionen ein ^{31}P -NMR-Spektrum aufgenommen, um anhand der chemischen Verschiebung identifizieren zu können, welche Fraktion das Monophosphat enthält. Eine Auswahl der aufgenommenen ^{31}P -NMR-Spektren ist in Abbildung 166 zu sehen. Teilweise wurden Fraktionen isoliert und vermessen, die mehrere Phosphorsignale zeigten. Hierbei ist auffällig, dass die Phosphorsignale mit der höchsten Intensität eine chemische Verschiebung von 27.86 ppm und 34.33 ppm zeigten, was unüblich für Monophosphate ist (Abbildung 166, oben). Des Weiteren wurden Fraktionen isoliert die entweder nur Phosphorsignale mit einer sehr geringen Intensität aufwiesen oder es konnten keine Phosphorsignale detektiert werden, was für die Abwesenheit von Phosphaten sprach (Abbildung 166, mitte und unten).

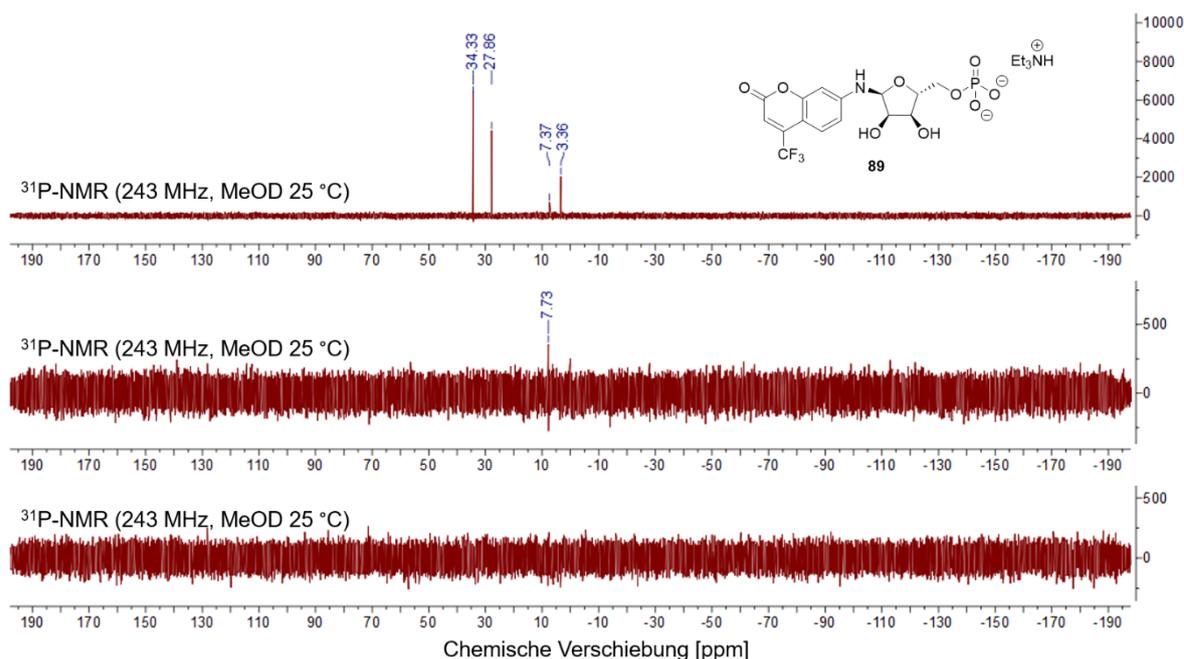


Abbildung 166: ^{31}P -NMR-Spektren der isolierten Fraktion nach säulenchromatographischer Reinigung an RP-18-Kieselgel. **Oben:** ^{31}P -NMR-Spektrum aufgenommen bei 243 MHz und mit MeOD als Lösungsmittel. **Mitte:** ^{31}P -NMR-Spektrum aufgenommen bei 243 MHz und mit MeOD als Lösungsmittel. **Unten:** ^{31}P -NMR-Spektrum aufgenommen bei 243 MHz und mit MeOD als Lösungsmittel.

Zusätzlich wurden ^{19}F -NMR-Spektren sowie ^1H -NMR-Spektren aufgenommen (Abbildung **167**). Es war ersichtlich, dass auch in den ^{19}F -NMR-Spektren mehrere Fluorsignale

detektiert wurden. Auffällig war hierbei, dass es sich bei den detektierten Fluorsignalen nicht um das Produkt handelte, da die Trifluormethylgruppe des Monophosphats **89** üblicherweise eine chemische Verschiebung von ca. 65 ppm aufwies. Im ^{19}F -NMR-Spektrum (Abbildung 167, **A**) wurde allerdings kein Signal mit besagter chemischer Verschiebung beobachtet. Aus diesem Grund wurden alle Fraktionen, die kein Fluorsignal bei ca. 65 ppm zeigten, entsorgt. Ferner konnte festgestellt werden, dass trotzdem auch Fraktionen mit der erwünschten chemischen Verschiebung im ^{19}F -NMR-Spektrum erhalten wurden (Abbildung 167, **B**). Die entsprechenden ^1H -NMR-Spektren zu den ^{19}F -NMR-Spektren zeigten allerdings hauptsächlich Signale des Fluoreszenzmarkers und keine Zuckersignale (Abbildung 167, **C**). Aufgrund dessen wurde davon ausgegangen, dass nach jedem säulenchromatographischen Reinigungsschritt eine Reisolation des Fluoreszenzmarkers erfolgte.

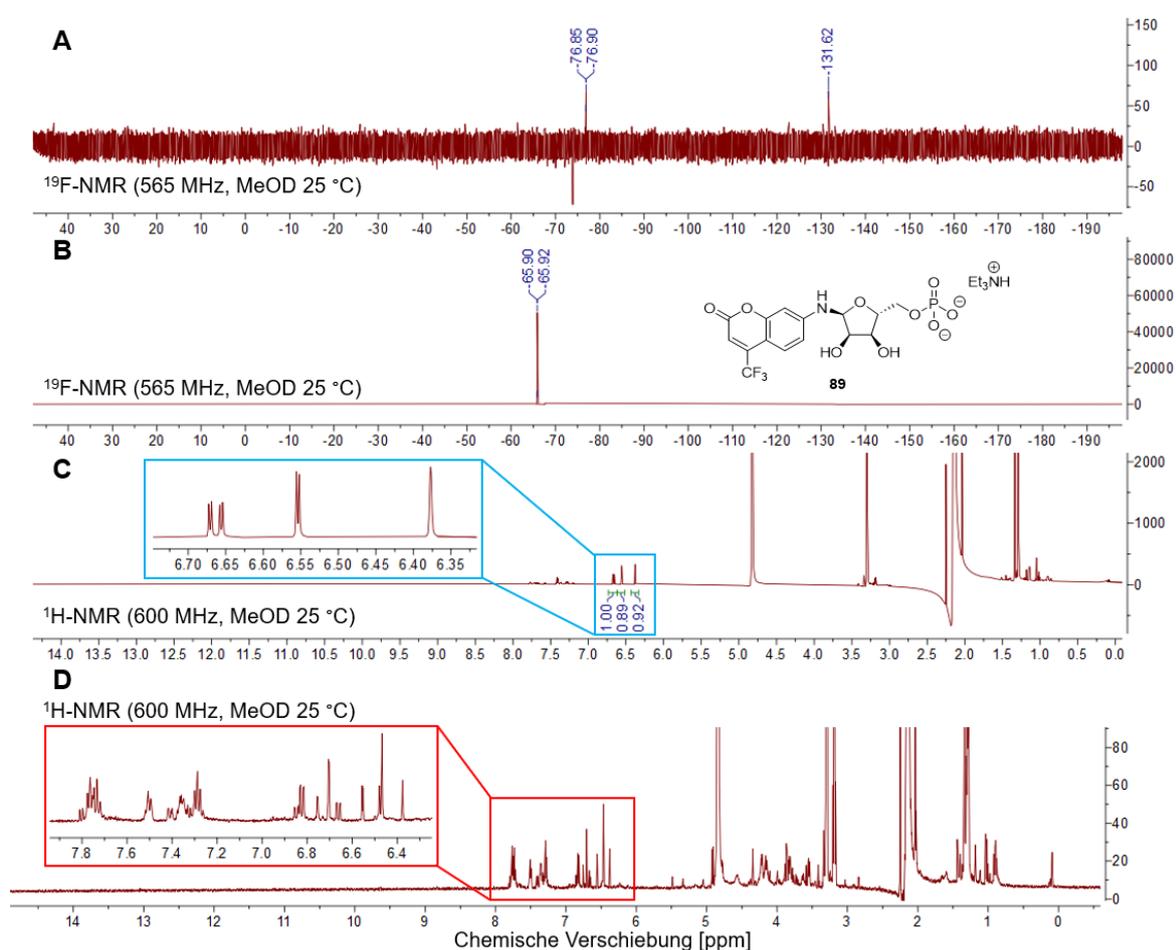


Abbildung 167: **A)** ^{19}F -NMR-Spektrum einer isolierten Fraktion gemessen bei 565 MHz und mit MeOD als Lösungsmittel. **B)** ^{19}F -NMR-Spektrum einer isolierten Fraktion gemessen bei 565 MHz und mit MeOD als Lösungsmittel. **C)** ^1H -NMR-Spektrum einer isolierten Fraktion gemessen bei 600 MHz und mit MeOD als Lösungsmittel. Die aromatischen Protonensignale wurden in blau hervorgehoben. **D)** ^1H -NMR-Spektrum einer isolierten Fraktion gemessen bei 600 MHz und mit MeOD als Lösungsmittel. Die aromatischen Protonensignale wurden in rot hervorgehoben.

Zusätzlich wurden $^1\text{H-NMR}$ -Spektren aufgenommen, bei denen die Zuordnung der Protonensignale nicht möglich war, da vermutlich ein Gemisch unterschiedlichster Verbindungen sowie Verunreinigungen vorlagen (Abbildung 167, **D**). Zusätzlich konnte anhand des roten Kastens in Abbildung 167 festgestellt werden, dass es zu keiner vollständigen Entfernung der Fm-Gruppen gekommen war, da sehr viele Signale im aromatischen Bereich detektiert wurden. Auch im aliphatischen Bereich waren mehr Protonensignale zu sehen als erwartet, weshalb angenommen wurde, dass auch die Silylgruppen nicht vollständig entfernt werden konnten.

Da nach jedem säulenchromatographischen Reinigungsschritt an RP-18-Kieselgel kein Produkt isoliert wurde und angenommen wurde, dass der Fluoreszenzmarker teilweise reisoliert werden konnte, wurde vermutet, dass sich das Produkt während der Reaktion zersetzt hatte. Somit war die Darstellung des vollständig entschützten Monophosphats **89** nicht erfolgreich.

Allgemein wird vermutet, dass die Synthese des gewünschten ADPR-Derivats **87** mit AMC **88** als Fluoreszenzmarker kritisch sein wird, da nach der Kupplung von Verbindung **117** mit AMP **16** zur Synthese des Diphosphats **132** eine Zersetzung nach jedem Reinigungsschritt beobachtet werden konnte. Dies war auch für den Syntheseversuch des Monophosphats **89** der Fall.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine weiteren Syntheseversuche zur Darstellung von AMC-ADPR **87** durchgeführt aufgrund der beobachteten Instabilität. In Zukunft wäre es von Vorteil, einen anderen Fluoreszenzmarker einzusetzen, der über eine *N*-glycosidische Bindung an die 1'-Position von ADPR **25** gebunden ist und vermutlich ein stabileres APPR-Derivat ergibt. Auch wäre ein Fluoreszenzmarker denkbar, der über eine *S*-glycosidische Bindung an ADPR **25** gebunden wird, da diese ebenfalls von Mac1 gespalten werden können, sodass mit der Etablierung eines Enzym-Assays zur Untersuchung der Hydrolaseaktivität fortgesetzt werden kann.

7 Experimenteller Teil

7.1 Allgemeines

7.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Edukte und Reagenzien wurden, soweit nicht anders angegeben, ohne weitere Reinigung verwendet.

7.1.2 Lösungsmittel

Acetonitril:	CH_3CN [41.05 g/mol]; Sdp.: 82 °C; $\rho = 0.78 \text{ g/cm}^3$ 1.) HiPerSolv CHROMANORM [®] gradient grade for HPLC (VWR83639.320-2.5L) 2.) absolut; von der Firma Fisher Scientific bezogen (Acros 3268110000)
Chloroform:	CHCl_3 [119.38 g/mol]; Sdp.: 61 °C; $\rho = 1.48 \text{ g/cm}^3$ 1.) Euroisotop (D007H 100 mL)
Dichlormethan:	CH_2Cl_2 [84.93 g/mol]; Sdp.: 40 °C; $\rho = 1.33 \text{ g/cm}^3$ 1.) technische Qualität; bei Normaldruck destilliert 2.) absolut; von der Firma Fisher Scientific bezogen (Acros 3484610000)
<i>N,N</i> -Dimethylformamid:	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$ [73.10 g/mol]; Sdp.: 153 °C; $\rho = 0.95 \text{ g/cm}^3$ 1.) absolut; von der Firma Fisher Scientific bezogen (Acros 326870010)
Dimethylsulfoxid:	$\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ [78.13 g/mol]; Sdp.: 189 °C; $\rho = 1.10 \text{ g/cm}^3$ 1.) Deutero (00905-10mL-s)
Essigsäureethylester:	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ [88.11 g/mol]; Sdp.: 77 °C; $\rho = 0.90 \text{ g/cm}^3$ 1.) technische Qualität; unter Normaldruck destilliert
Methanol:	CH_3OH [32.04 g/mol]; Sdp.: 64 °C; $\rho = 0.79 \text{ g/cm}^3$ 1.) technische Qualität; bei Normaldruck destilliert

	2.) absolut; von der Firma Fisher Scientific bezogen (Acros 00004595)
	3.) Euroisotop (D024FE)
Petrolether (50-70):	Sdp.: 50-70 °C; $\rho = 0.664 \text{ g/cm}^3$ 1.) technische Qualität; unter Normaldruck destilliert
Pyridin:	$\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ [79.10 g/mol]; Sdp.: 115 °C; $\rho = 0.98 \text{ g/cm}^3$ 1.) absolut; von der Firma Fisher Scientific bezogen (Acros 364421000)
Tetrahydrofuran:	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ [72.11 g/mol]; Sdp.: 66 °C; $\rho = 0.98 \text{ g/cm}^3$ 1.) HiPerSolv CHROMANORM® gradient grade for HPLC (VWR28559.320-2.5L) 2.) absolut; von der Firma Fisher Scientific bezogen (Acros 348451000)
Triethylamin:	$\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$ [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; von der Firma Aldrich bezogen (Al 471283)

7.1.3 Chromatographie

Dünnschichtchromatographie

Es wurden mit Kieselgel und Fluoreszenzindikator beschichtete Aluminiumfolien (Macherey-Nagel ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254 Nr. 818333; Schichtdicke 0.2 mm) verwendet. Sämtliche R_f -Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt. Die Detektion erfolgte mittels UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm. Als Färbereagenz diente ein Gemisch aus 5 g Vanillin, 900 mL Methanol, 100 mL Essigsäure und 35 mL konzentrierter Schwefelsäure.

Säulenchromatographie

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

Ionenaustauschchromatographie

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

Automatisierte reversed phase-(RP)-Chromatographie

Für die automatisierte Chromatographie wurde für die Umkehrphasenchromatographie der automatisierte puriFlash®430 der Firma Interchim mit UV-Detektor verwendet. Für die RP-18-Chromatographie wurden Säulen von Macherey-Nagel (Chromabond® Flash RD 40 C₁₈ ec) verwendet.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die analytische HPLC wurde mittels einer Agilent Technologies Anlage des Modells 1260 Infinity II durchgeführt.

Software: Agilent OpenLab CDS
Pumpe: 1260 Quat Pump VL
Autosampler: 1260 Vialsampler
Detektor: 1260 Dioden Array Detector (DAD)
Analytische Säule: EC 125/3 Nukleodur 100-5 C₁₈ ec der Firma Macherey-Nagel

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

HPLC-Methode:

Von 0 bis 20 min: TBAA-Puffer (2 mM) mit einem Acetonitrilgradienten (5-80 %)
Von 20 bis 30 min: isokratisch (20 % Laufpuffer, 80 % Acetonitril)
Von 30 bis 33 min: Laufpuffer mit einem Acetonitrilgradienten (80-5 %)
Von 33 bis 34 min: isokratisch (95 % Laufpuffer, 5 % Acetonitril)
Flussrate: 1.0 mL/min

Die UV-Detektion erfolgte bei Wellenlängen von 240, 250, 260, 270 und 330 nm

7.1.4 Ansetzen von Pufferlösungen

HPLC-Puffer

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.

0.5 M Phosphatpuffer

Natriumhydrogencarbonat (57.2 g, 477 mmol) und Dinatriumhydrogenphosphat (74.2 g, 523 mmol) wurden in 2000 mL Reinstwasser gelöst und mit 10 %iger Phosphorsäure oder 1 M Natriumhydroxidlösung auf einen pH-Wert von 7.0 eingestellt.

1 M Triethylammoniumbicarbonat-Puffer (TEAB-Puffer)

277 mL (2.00 mol) Triethylamin wurden durch die Zugabe von Reinstwasser auf 2.00 L aufgefüllt. Anschließend wurde Kohlenstoffdioxid mithilfe von Trockeneis in die Lösung eingeleitet.

7.1.5 Spektroskopie und Spektrometrie

Infrarotspektroskopie (IR)

Die Messung der aufgenommenen IR-Spektren erfolgte mittels eines Bruker Alpha-P FT-IR-Spektrometers bei Raumtemperatur in einem Messbereich von 400 – 4000 cm⁻¹.

Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte in der spektroskopischen Abteilung des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg.

¹H-NMR: Bruker AV400 (400 MHz), Bruker AV500 (500 MHz), Bruker AV3600 (600 MHz). Die Standardisierung erfolgte gegen DMSO-*d*₆ (δ = 2.50 ppm), CH₃CN-*d*₃ (δ = 1.94 ppm), D₂O (4.79 ppm) Methanol-*d*₄ (δ = 3.31 ppm) oder Chloroform-*d*₁ (δ = 7.26 ppm). Es wurden Messwerte in einem Bereich von 0 bis 14 ppm aufgenommen.

¹³C-NMR: Bruker AV400 (101 MHz), Bruker AV500 (125 MHz), Bruker AV3600 (151 MHz). Die Standardisierung erfolgte gegen DMSO-*d*₆ (δ = 39.52 ppm), CH₃CN-*d*₃ (δ = 1.32 ppm und 118.26 ppm), Methanol-*d*₄ (δ = 49.00 ppm) oder Chloroform-*d*₁ (δ = 77.16 ppm). Es wurden Messwerte in einem Bereich von 0 bis 200 ppm aufgenommen.

Von allen Verbindungen wurden zusätzlich Korrelationsspektren (*H,H*-COSY, HSQC, HMBC) aufgenommen.

³¹P-NMR: Bruker AV400 (162 MHz), Bruker AV500 (202 MHz), Bruker AV3600 (243 MHz).

Die Standardisierung erfolgte gegen einen externen Standard von 85 %iger Phosphorsäure. Die Aufnahmen erfolgten in einem Messbereich von -200 bis 200 ppm.

¹⁹F-NMR: Bruker AV3600 (565 MHz). Die Standardisierung erfolgte gegen einen externen Standard von Trifluoressigsäure. Die Aufnahmen erfolgten in einem Messbereich von -200 bis 50 ppm.

Massenspektrometrie (MS)

Die Messungen der Massenspektren wurden in der massenspektrometrischen Abteilung des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg durchgeführt.

Die ESI-Massenspektren wurden mit einem Agilent 6224 ESI-TOF Spektrometer aufgenommen.

7.1.6 Weitere Geräte

Gefriertrocknungsanlage

Die Gefriertrocknung wässriger bzw. wasserhaltiger Lösungen wurde an einer ALPHA 2-4-Gefriertrocknungsanlage, einer ALPHA 1-4 LD und einer Alpha 3-4 LSCbasic der Firma Christ durchgeführt.

Wasseraufbereitungsanlage

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

pH-Messgerät

Zum Einstellen des pH-Werts von Pufferlösungen wurde das pH-Messgerät PH-130 waterproof der Firma VWR verwendet.

Zentrifuge

Für Lösungen bis 50 mL wurde eine Heraeus Primo R Zentrifuge der Firma Thermo Scientific bei 4 °C und 8000 u/min verwendet. Zum Zentrifugieren von Volumina <1.5 mL in Eppendorftubes wurde eine Zentrifuge 5418 R der Firma Eppendorf bei 14000 u/min eingesetzt.

Thermomixer

Zur Inkubation von Hydrolyselösungen wurde ein Thermomixer TS basic der Firma CellMedia verwendet.

Vortexer

Für eine gute Durchmischung der Hydrolyselösungen und alle weiteren Lösungen, die für die Hydrolysestudien notwendig sind, wurde ein Vortexer REAX 2000 der Firma Heidolph eingesetzt.

Mikrowelle

Für mikrowellenunterstützte Reaktionen wurde eine Discover BenchMate Mikrowelle der Firma CEM eingesetzt.

7.2 Hydrolysestudien

7.2.1 Hydrolysestudien in PBS-Puffer

Für die Studien zur Bestimmung der chemischen Stabilität der AB-maskierten Diphosphate wurden die Prodrugs in PBS-Puffer (Dulbecco's *Phosphat Buffered Saline* der Firma Gibco) bei 37 °C inkubiert. Hierzu wurde zunächst eine 50.0 mM Stammlösung der Prodrugs in DMSO hergestellt. Anschließend wurde die Inkubationslösung mit einem finalen Volumen 725 µL (0.917 mM) hergestellt, indem 13.3 µL der Stammlösung mit 363 µL PBS-Puffer, 228 µL Wasser und 121 µL DMSO versetzt wurden. Die Inkubation erfolgte ohne internen Standard im Thermomixer. Zu entsprechenden Zeitpunkten wurden Aliquote von 20.0 µL entnommen und mit einem Injektionsvolumen von 15.0 µL mittels RP-HPL-Chromatographie analysiert.

7.2.2 Hydrolysestudien mit PLE

Für die Studien zur Bestimmung der enzymatischen Spaltung der AB-Masken der Prodrugs wurden diese in PBS-Puffer und mit einer Schweineleberesterase bei 37 °C inkubiert. Hierzu wurde zunächst eine 50.0 mM Stammlösung der Prodrugs in DMSO sowie eine PLE-Lösung mit 100 units/mg hergestellt. Anschließend wurde die Inkubationslösung mit einem finalen Volumen von 1.00 mL (0.453 mM) hergestellt, indem 9.10 µL der Stammlösung mit 56.6 µL PLE-Lösung, 755 µL PBS-Puffer und 180 µL DMSO versetzt wurden. Die Inkubation erfolgte ohne internen Standard im Thermomixer. Zu

entsprechenden Zeitpunkten wurden Aliquote von 60.0 μL entnommen und mit 120 μL kaltem Methanol (Fällungsverhältnis MeOH/wässr. 2:1) zur Proteinfällung versetzt und gut gevortext. Anschließend wurden die Aliquote für 5 Minuten auf Eis gelegt und anschließend für 10 Minuten bei +4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und über einen Spritzenfilter filtriert. In einem letzten Schritt wurden Aliquote von 30.0 μL entnommen und mit einem Injektionsvolumen von 20.0 μL mittels RP-HPL-Chromatographie analysiert.

7.3 Synthesen

7.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

AAV 1: Phosphorylierung über die DCI-vermittelte Kupplung eines Phosphoramidits

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.0 Äquiv. des entsprechenden Alkohols in abs. Dichlormethan gelöst, 1.5 Äquiv. des entsprechenden Phosphoramidits hinzugegeben und 2.0 Äquiv. 4,5-Dicyanoimidazol (0.25 mol/L in Acetonitril) hinzugesetzt. Die Reaktion wurde für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend erfolgte bei 0 °C die portionsweise Zugabe von 1.5 Äquiv. *meta*-Chlorperbenzoesäure oder *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan). Nach Rühren für eine Stunde bei 0 °C wurde das Reaktionsgemisch mit einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, zweimal mit Dichlormethan extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel.

AAV 2: Hydrogenolytische Spaltung von Benzylgruppen

Es wurden 1.0 Äquiv. des benzylierten Phosphats in Ethanol/Wasser (10:1 v/v) gelöst und 2.0 Äquiv. Triethylamin sowie 20 Gew.-% Palladiumhydroxid auf Aktivkohle hinzugegeben. Der Reaktionskolben wurde erst für eine Minute mit Stickstoff gespült und anschließend dreimal mit Wasserstoff. Das Reaktionsgemisch wurde unter starkem Rühren und Wasserstoffatmosphäre über Nacht gerührt. Anschließend wurde mittels Methanol über Celite[®] filtriert.

AAV 3: Imidazolidat-vermittelte Phosphodiesterbindungsbildung

Unter Stickstoff als Inertgas wurde das erste Nucleosidmonophosphat in abs. Acetonitril (1 mL pro 10 mg) suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Zu der kalten Suspension wurde ein, auf 0 °C gekühltes, Gemisch aus 16 Äquiv. abs. Triethylamin und 10 Äquiv.

Trifluoressigsäureanhydrid, gelöst in Acetonitril, zugetropft. Nach zehnminütigem Rühren bei 0 °C wurden alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde wieder in abs. Acetonitril aufgenommen. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit 10 Äquiv. abs. Triethylamin und 6.0 Äquiv. 1-Methylimidazol versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur für weitere zehn Minuten gerührt. Anschließend wurde das zweite Monophosphat, gelöst in abs. Acetonitril oder *N,N*-Dimethylformamid (1 mL pro 10 mg), hinzugetropft. Nach vollständigem Umsatz wurden alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel gereinigt. Danach erfolgte eine Überführung in die Ammoniumform über ein DOWEX-NH₄⁺-Ionenaustauscherharz mit darauffolgender automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel. Im Anschluss wurde mittels DOWEX-Et₃NH⁺-Ionenaustauscherharz in die Triethylammoniumform überführt und erneut mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel gereinigt.

AAV 4: Synthese von (4-Alkanoyloxybenzyl)-ethylphosphonaten

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.0 Äquiv Ethylphosphonsäuredichlorid in abs. Pyridin gelöst (1 mL pro 10 mg Ethylphosphonsäuredichlorid) und auf 0 °C gekühlt. Anschließend erfolgte die portionsweise Zugabe von 0.90 Äquiv. des entsprechenden Alkohols. Das Reaktionsgemisch wurde für drei Stunden gerührt bei 0°C gerührt. Daraufhin wurde ein 1 M Triethylammoniumbicarbonat-Puffer zum Gemisch hinzugegeben, alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt und jeweils dreimal mit Toluol und Dichlormethan coevaporiert. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte mittels mehrfacher automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel.

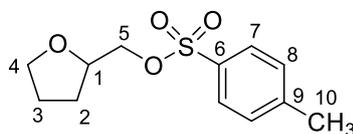
AAV 5: Entschützung von Silylethern

Das zu entschützende Nucleotid wurde in abs. Tetrahydrofuran gelöst, tropfenweise mit Triethylamin-Trihydrofluorid (6.0 Äquiv. bis 9.0 Äquiv. pro Silylether) versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurden 2 mL eines 1.0 M Triethylammoniumbicarbonat-Puffers zur Reaktionslösung gegeben und das Rohprodukt mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel gereinigt.

7.3.2 Synthesen zu Darstellung von Tetrahydrofurfuryl-Adenosindiphosphat 12

Synthese von (Tetrahydrofuran-2-yl)methyl-4-methylbenzensulfonat 15

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 0.50 g (4.9 mmol, 1.0 Äquiv.) Tetrahydrofurfurylalkohol **13** in 5 mL abs. Pyridin gelöst und 1.4 g (7.3 mmol, 1.5 Äquiv.) Tosylchlorid hinzugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht gerührt und anschließend durch die Zugabe einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung beendet. Anschließend wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 20:1 v/v) gereinigt.



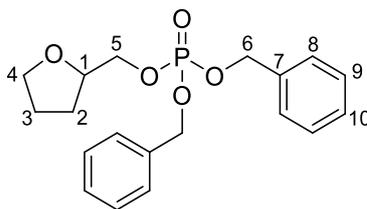
Summenformel: C₁₂H₁₆O₄S
Molekulargewicht: 256.3160 g/mol

Ausbeute: 1.2 g (4.7 mmol, 96 %) eines gelblichen Öls. – **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.83-7.75 (m, 2H, H-8), 7.37-7.30 (m, 2H, H-7), 4.12-4.05 (m, 1H, H-1), 4.04-3.95 (m, 2H, H-5), 3.82-3.68 (m, 2H, H-4), 2.45 (s, 3H, H-10), 2.03-1.92 (m, 1H, H-2), 1.91-1.82 (m, 2H, H-3), 1.71-1.61 (m, 1H, H-2). – **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 144.9 (C-9), 133.2 (C-6), 130.0 (C-7), 128.1 (C-8), 76.1 (C-1), 71.6 (C-5), 68.8 (C-4), 28.0 (C-2), 25.7 (C-3), 21.8 (C-10). – **ATR-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3092, 3070, 3035, 2981, 2955, 2873, 1598, 1496, 1456, 1397, 1353, 1310, 1292, 1256, 1212, 1188, 1174, 1094, 1046, 1021, 960, 936, 880, 850, 838, 815, 792, 772, 708, 663, 597, 552, 526, 483, 461. – **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 279.0662 [M+Na]⁺, gef.: 279.0663 [M+Na]⁺.

Synthese von Dibenzyl-(tetrahydrofuran-2-yl)methylphosphat 22

Die Reaktion wurde nach der **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 0.19 mL (2.0 mmol, 1.0 Äquiv.) Tetrahydrofurfurylalkohol **13** und 0.99 mL (2.9 mmol, 1.5 Äquiv.) Dibenzyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit in 36 mL abs. Dichlormethan gelöst und 15 mL 4,5-Dicyanoimidazol hinzugetropft. Die Reaktion wurde für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 0.59 g (2.9 mmol, 1.5 Äquiv.) *meta*-Chlorperbenzoesäure portionsweise bei 0°C hinzugegeben und es wurde für eine weitere Stunde gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, zweimal mit Dichlormethan extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel

unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde zweifach säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 100:1 → 50:1) gereinigt.



Summenformel: C₁₉H₂₃O₅P
Molekulargewicht: 362.3618 g/mol

Ausbeute: 0.59 g (1.6 mmol, 83 %) eines farblosen Öls. – **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.39-7.29 (m, 10H, H-Aryl), 5.06 (dt, ³J_{H,H} = 8.0 Hz, ²J_{H,H} = 2.3 Hz, 4H, H-6), 4.10-4.03 (m, 1H, H-1), 4.01-3.90 (m, 2H, H-4), 3.86-3.73 (m, 2H, H-5), 1.89-1.82 (m, 2H, H-3), 1.65-1.56 (m, 2H, H-2). – **¹³C-NMR** (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 128.7, 128.6, 128.1 (C-Aryl), 77.2 (C-1), 69.5, 69.5, 69.4 (C-4, c-6), 68.7, (C-5), 27.8 (C-2), 25.8 (C-3). – **³¹P-NMR** (162 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.39. – **ATR-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2953.4, 2922.0, 2868.7, 2852.3, 1493.6, 1457.5, 1377.1, 1273.3, 1211.3, 1189.9, 1158.1, 1081.9, 995.8, 969.7, 908.2, 880.8, 861.7, 822.9, 735.0, 695.5, 599.3, 495.9. – **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 385.1175 [M+Na]⁺, gef.: 385.1169 [M+Na]⁺.

Synthese von (Tetrahydrofuran-2-yl)methylphosphat 18

Synthese 1:

Es wurden 0.84 g (3.9 mmol, 2.0 Äquiv.) Protonenschwamm für eine Stunde im Vakuum getrocknet und anschließend wurde unter Inertgasatmosphäre 6 mL Trimethylphosphat hinzugegeben. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 0.19 mL (2.0 mmol, 1.0 Äquiv.) Tetrahydrofurfurylalkohol. Das Reaktionsgemisch wurde auf 0 °C gekühlt und 0.73 mL (7.8 mmol, 4.0 Äquiv.) Phosphorylchlorid hinzuge tropft. Es wurde für 30 Minuten bei 0 °C gerührt und anschließend das Gemisch auf Eiswasser gegeben und mit einem TEAB-Puffer ein pH von 8 eingestellt. Es wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert und die wässrige Phase unter vermindertem Druck vom Wasser befreit. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt.

Ausbeute: Das gewünschte Produkt konnte nicht isoliert werden.

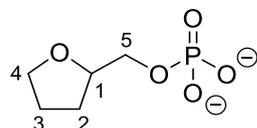
Synthese 2:

Unter Inergasatmosphäre wurden 0.19 mL (2.0 mmol, 1.0 Äquiv.) Tetrahydrofurfurylalkohol in 18 mL Tetrahydrofuran gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und 3.3 mL (24 mmol, 12 Äquiv.) Triethylamin sowie 0.73 mL (7.8 mmol, 4.0 Äquiv.) Phosphorylchlorid hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für fünf Stunden bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde ein TEAB-Puffer hinzugegeben und es wurde für zehn Minuten gerührt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt.

Ausbeute: Das gewünschte Produkt konnte nicht isoliert werden.

Synthese 3:

Die Reaktion wurde nach der **AAV 2** durchgeführt. Es wurden 0.10 g (0.28 mmol, 1.0 Äquiv.) des benzylierten Phosphats **22** in 7.5 mL Ethanol und 0.75 mL Wasser gelöst und 0.080 mL (0.55 mmol, 2.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 20 mg (20 Gew.-%) Palladiumhydroxid auf Aktivkohle hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Hilfe von Methanol über Celite[®] filtriert.



Summenformel: C₅H₁₁O₅P²⁻
Molekulargewicht: 223.9426 g/mol

Ausbeute: 50 mg (0.23 mmol, 82 %) eines farblosen Öls. – **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 4.21-4.11 (m, 1H, H-1), 4.08-3.72 (m, 4H, H-4, H-5), 2.03-1.81 (m, 3H, H-2, H-3), 1.77-1.66 (m, 1H, H-2). – **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 77.9 (C-1), 68.6, 68.3, 68.3 (C-4, C-5), 27.6 (C-2), 25.7 (C-3). – **³¹P-NMR** (243 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 0.91. – **ATR-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2953, 2922, 2869, 2852, 1713, 1493, 1459, 1377, 1187, 1158, 1081, 1041, 963, 815, 740, 496. – **HRMS** (ESI⁻, m/z): ber.: 181.0271 [M-H]⁻, gef.: 181.0205 [M-H]⁻.

Synthese von Tetrahydrofurfuryl-Adenosindiphosphat 12 als Ammoniumsalz

Synthese 1:

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 0.35 g (0.59 mmol, 1.2 Äquiv.) Adenosindiphosphat **14** in 5 mL abs. Acetonitril suspendiert und 1.1 mL

(7.8 mmol, 16 Äquiv.) abs. Triethylamin sowie 0.68 mL (4.90 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, tropfenweise bei 0 °C zugegeben. Der Rückstand wurde in 5 mL abs. Acetonitril aufgenommen und mit 0.48 mL (4.9 mmol, 10 Äquiv.) abs. Triethylamin, 0.23 mL (2.9 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol sowie 50 mg (0.49 mmol, 1.0 Äquiv.) Tetrahydrofurfurylalkohol **13**, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für sechs Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt. Anschließend erfolgte eine Überführung in die Ammoniumform mittels Ionenaustauscherharz gefolgt von einer automatisierten Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min).

Ausbeute: Das gewünschte Produkt konnte nicht isoliert werden.

Synthese 2:

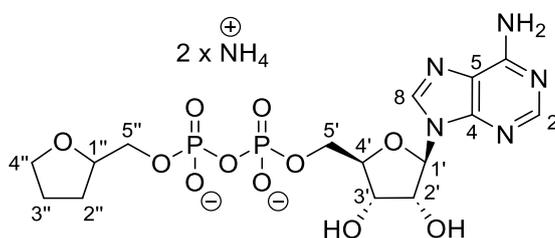
Unter Stickstoff als Inertgas wurden zu einer Suspension aus 0.21 g (0.23 mmol, 1.2 Äquiv.) Adenosindiphosphat **14** in 5 mL abs. Acetonitril 50 mg (0.20 mmol, 1.0 Äquiv.) der tosylierten Verbindung **15** gelöst in 5 mL abs. Acetonitril hinzutropft. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt. Anschließend erfolgte eine Überführung in die Ammoniumform mittels Ionenaustauscherharz gefolgt von einer automatisierten Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min).

Ausbeute: Das gewünschte Produkt konnte nicht isoliert werden.

Synthese 3:

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 0.16 g (0.33 mmol, 1.2 Äquiv.) Adenosinmonophosphat **16** in 5 mL abs. Acetonitril suspendiert und 0.61 mL (4.4 mmol, 16 Äquiv.) abs. Triethylamin sowie 0.38 mL (2.8 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, tropfenweise bei 0 °C

zugegeben. Der Rückstand wurde in 5 mL abs. Acetonitril aufgenommen und mit 0.38 mL (2.8 mmol, 10 Äquiv.) abs. Triethylamin, 0.13 mL (1.7 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol sowie 50 mg (0.28 mmol, 1.0 Äquiv.) des Monophosphats **18**, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für sechs Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt. Anschließend erfolgte eine Überführung in die Ammoniumform mittels Ionenaustauscherharz gefolgt von einer automatisierten Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min).



Summenformel: C₁₅H₂₃N₅O₁₁P₂²⁻
 Molekulargewicht: 545.3826 g/mol

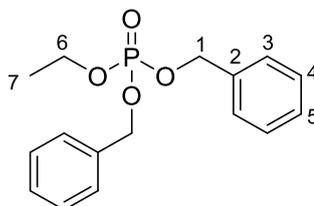
Ausbeute: 32 mg (0.058 mmol, 21 %) einer orangefarbenen Warte. – **¹H-NMR** (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 8.50-8.44 (m, 1H, H-8), 8.16-8.12 (m, 1H, H-2), 5.93-5.88 (m, 1H, H-1'), 4.48-4.40 (m, 1H, H-2'), 4.38-4.32 (m, 1H, H-3'), 4.07-3.88 (m, 6H, H-1'', H-4', H-4'', H-5''), 3.70-3.62 (m, 2H, H-5'), 1.87-1.68 (m, 3H, H-2'', H-3''), 1.61-1.53 (m, 1H, H-2''). – **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 153.1 (C-2), 149.8 (C-4), 139.6 (C-8), 87.4 (C-1'), 83.5, 78.0 (C-4', C-1'', C-4'', C-5''), 74.4 (C-2'), 69.8 (C-3'), 67.4 (C-5'), 64.6, 64.4 (C-4', C-1'', C-4'', C-5''), 27.7 (C-2''), 25.5 (C-3''). – **³¹P-NMR** (243 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = -11.66, -11.75, -12.03, -12.01, -12.46. – **ATR-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3218, 1650, 1456, 1429, 1202, 1137, 1112, 1072, 1046, 1025, 993, 950, 823, 800, 721, 637, 506, 465, 439, 423. – **HRMS** (ESI, m/z): ber.: 510.0797 [M-H]⁻, gef.: 510.0770 [M-H]⁻.

7.3.3 Synthesen zur Darstellung von β-Ethyl-Adenosindiphosphat **27**

Synthese von Dibenzylethylphosphat **28**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 0.19 mL (0.58 mmol, 1.0 Äquiv.) Dibenzyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit und 0.050 mL (0.87 mmol, 1.5 Äquiv.) Ethanol in 11 mL abs. Dichlormethan gelöst und 15 mL 4,5-Dicyanoimidazol hinzugegotropft. Die Reaktion wurde für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden

0.080 mL (0.87 mmol, 1.5 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid tropfenweise bei 0°C hinzugegeben und es wurde für eine weitere Stunde gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, zweimal mit Dichlormethan extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde zweifach säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 3:1) gereinigt.

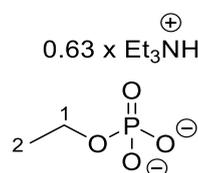


Summenformel: C₁₉H₂₃O₅P
Molekulargewicht: 362.3618 g/mol

Ausbeute: 0.10 g (0.35 mmol, 60 %) eines farblosen Öls. – **¹H-NMR** (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.38-7.30 (m, 10H, H-Aryl), 5.04-4.99 (m, 4H, H-1), 4.10-4.03 (m, 2H, H-6), 1.27 (t, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 3H, H-7). – **¹³C-NMR** (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 136.1 (C-2), 128.7, 128.6, 128.1 (C-Aryl), 69.3 (d, ²J_{C,P} = 5.5 Hz, C-1), 64.2 (d, ³J_{C,P} = 5.7 Hz, C-6), 16.2 (d, ³J_{C,P} = 7.2 Hz, C-7). – **³¹P-NMR** (243 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = -0.90. – **ATR-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3489, 3065, 3034, 2983, 2897, 1899, 1498, 1456, 1381, 1264, 1214, 1165, 996, 966, 878, 732, 695, 599, 491. – **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 329.0913 [M+Na]⁺, gef.: 329.0900 [M+Na]⁺.

Synthese von Ethylphosphat 29 als Triethylammoniumsalz

Die Reaktion wurde nach der **AAV 2** durchgeführt. Es wurden 0.10 g (0.33 mmol, 1.0 Äquiv.) des benzylierten Phosphats **28** in 7.5 mL Ethanol und 0.75 mL Wasser gelöst und 0.090 mL (0.65 mmol, 2.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 20 mg (20 Gew.-%) Palladiumhydroxid auf Aktivkohle hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 27 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Hilfe von Methanol über Celite[®] filtriert.



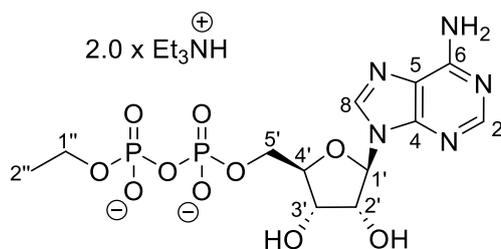
Summenformel: C₂H₇O₄P²⁻
Molekulargewicht: 189.1842 g/mol

Ausbeute: 49 mg (0.26 mmol, 80 %) eines farblosen Öls. – **¹H-NMR** (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 3.77-3.69 (m, 2H, H-1), 1.13 (t, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, 3H, H-2). – **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 59.7 (d, ²J_{C,P} = 5.2 Hz, C-1), 16.4 (d, ³J_{C,P} = 7.7 Hz, C-2). – **³¹P-NMR**

(243 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = -0.08. – **ATR-IR**: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2981, 2905, 2253, 2128, 1688, 1479, 1450, 1393, 1164, 1100, 1050, 1024, 1006, 952, 820, 757, 621, 530, 480. – **HRMS** (ESI, m/z): ber.: 125.0009 [M-H]⁻, gef.: 124.9995 [M-H]⁻.

Synthese von β -Ethyl-Adenosindiphosphat **27** als Triethylammoniumsalz

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 0.16 g (0.29 mmol, 1.2 Äquiv.) Adenosinmonophosphat **16** in 5 mL abs. Acetonitril suspendiert und 0.53 mL (3.8 mmol, 16 Äquiv.) abs. Triethylamin sowie 0.33 mL (2.4 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, tropfenweise bei 0 °C zugegeben. Der Rückstand wurde in 5 mL abs. Acetonitril aufgenommen und mit 0.33 mL (2.4 mmol, 10 Äquiv.) abs. Triethylamin, 0.11 mL (1.4 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol sowie 45 mg (0.24 mmol, 1.0 Äquiv.) des Phosphats **29**, suspendiert in 5 mL abs. Acetonitril und 2 mL abs. Dimethylfomamid, versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für acht Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt. Anschließend erfolgte jeweils eine Überführung in die Ammonium- und Triethylammoniumform mittels Ionenaustauscherharz gefolgt von einer automatisierten Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min).



Summenformel: C₁₂H₁₇N₅O₁₀P₂²⁻
Molekulargewicht: 654.0829 g/mol

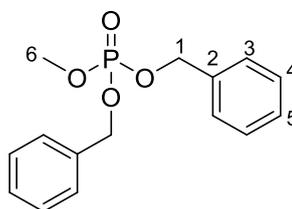
Ausbeute: 46 mg (0.070 mmol, 30 %) einer farblosen Watte. – **¹H-NMR** (600 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 8.47 (s, 1H, H-8), 8.15 (s, 1H, H-2), 5.91 (d, ³J_{H,H} = 4.9 Hz, 1H, H-1'), 4.50 (t, ³J_{H,H} = 4.9 Hz, 1H, H-2'), 4.27 (t, ³J_{H,H} = 4.6 Hz, 1H, H-3'), 4.05 (q, ³J_{H,H} = 4.0 Hz, 1H, H-4'), 4.01-3.92 (m, 2H, H-5'), 3.81-3.74 (m, 2H, H-1''), 1.10 (t, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, H-2''). – **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 156.0 (C-6), 152.7 (C-2), 149.5 (C-4), 139.4 (C-8), 118.8 (C-5), 87.3 (C-1'), 83.4 (d, ³J_{C,P} = 7.8 Hz, C-4'), 74.0 (C-2'), 70.0 (C-3'), 64.4 (d, ²J_{C,P} = 4.9 Hz, C-5'), 60.4 (d, ²J_{C,P} = 5.9 Hz, C-1''), 16.3 (d, ³J_{C,P} = 7.8 Hz, C-2''). – **³¹P-NMR** (243 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = -11.82 (d, ²J_{P,P} = 19.1 Hz, P_α), -12.23 (d, ²J_{C,P} = 19.1 Hz,

P_{β}). – **ATR-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2991, 2634, 2486, 1671, 1476, 1400, 1361, 1316, 1196, 1170, 1121, 1064, 1038, 935, 901, 826, 798, 718, 593, 554, 517, 465, 438, 427. – **HRMS** (ESI⁻, m/z): ber.: 454.0534 [M-H]⁻, gef.: 454.0451 [M-H]⁻.

7.3.4 Synthesen zur Darstellung von β -Methyl-GS441524-Diphosphat 30

Synthese von Dibenzylmethylphosphat 35

Die Reaktion wurde nach der **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 0.49 mL (1.4 mmol, 1.0 Äquiv.) Dibenzyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit und 0.090 mL (2.2 mmol, 1.5 Äquiv.) Methanol in 28 mL abs. Dichlormethan gelöst und 11 mL 4,5-Dicyanoimidazol hinzugetropft. Die Reaktion wurde für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 0.21 mL (2.2 mmol, 1.5 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid tropfenweise bei 0°C hinzugegeben und es wurde für eine weitere Stunde gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit einer ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, dreimal mit Dichlormethan extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde zweifach säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 2:1) gereinigt.



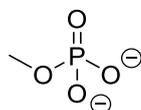
Summenformel: $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{O}_4\text{P}$
Molekulargewicht: 292,2708 g/mol

Ausbeute: 0.31 g (1.1 mmol, 74 %) eines farblosen Öls. – **$^1\text{H-NMR}$** (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.39-7.30 (m, 10H, H-Aryl), 5.09-5.00 (m, 4H, H-1), 3.70 (d, $^3J_{\text{H,P}} = 11.2$ Hz, 3H, H-6). – **$^{13}\text{C-NMR}$** (126 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 136.0 (d, $^3J_{\text{C,P}} = 6.8$ Hz, C-2), 128.7, 128.7, 128.1 (C-Aryl), 69.4 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 5.6$ Hz, C-1), 54.4 (d, $^2J_{\text{C,P}} = 6.0$ Hz, C-6). – **$^{31}\text{P-NMR}$** (202 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.51. – **ATR-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3065, 3034, 2955, 2895, 2853, 1588, 1497, 1455, 1381, 1268, 1214, 1186, 994, 919, 852, 776, 732, 695, 599, 489, 445. – **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 315.0757 [M+Na]⁺, gef.: 315.0763 [M+Na]⁺.

Synthese von Methylphosphat 34 als Triethylammoniumsalz

Die Reaktion wurde nach der **AAV 2** durchgeführt. Es wurden 0.15 g (0.51 mmol, 1.0 Äquiv.) des benzylierten Phosphats **35** in 11.25 mL Methanol und 1.125 mL Wasser gelöst und

0.14 mL (1.0 mmol, 2.0 Äquiv.) Triethylamin sowie 30 mg (20 Gew.-%) Palladiumhydroxid auf Aktivkohle hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Hilfe von Methanol über Celite® filtriert.



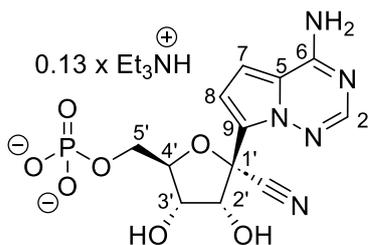
Summenformel: $\text{CH}_3\text{O}_4\text{P}^{2-}$

Molekulargewicht: 110,0059 g/mol

Ausbeute: 96 mg (0.55 mmol, quantitative Ausbeute) eines farblosen Öls. – **¹H-NMR** (600 MHz, Methanol-*d*₄): δ [ppm] = 3.55 (d, $^3J_{\text{H,P}}$ = 10.9 Hz, 3H, CH₃). – **¹³C-NMR** (126 MHz, Methanol-*d*₄): δ [ppm] = 53.10 (CH₃). – **³¹P-NMR** (243 MHz, Methanol-*d*₄): δ [ppm] = 1.66. – **ATR-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3411, 2984, 2946, 2845, 2624, 2436, 1675, 1496, 1455, 1397, 1208, 1037, 1016, 839, 816, 765, 731, 697, 597, 560, 498, 458. – **HRMS** (ESI⁻, m/z): ber.: 110.9853 [M-H]⁻, gef.: 110.9856 [M-H]⁻.

Synthese von (2*R*,3*S*,5*R*)-2-(4Aminopyrrolo[2,1-*f*][1,2,4]triazine-7-yl)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydro-2-furancarbonitril-Monophosphat 31 als Triethylammoniumsalz

Unter Inertgasatmosphäre wurden 0.10 g (0.34 mmol, 1.0 Äquiv.) GS-441524 **4** in 2.75 mL Trimethylphosphat gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 0.19 mL (2.1 mmol, 6.0 Äquiv.) Phosphorylchlorid zugetropft und das Reaktionsgemisch für drei Stunden bei 0 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 5.5 mL 1 M TEAB-Puffer gequench und für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die flüchtigen Bestandteile wurden unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt. Anschließend erfolgte jeweils eine Überführung in die Ammonium- und Triethylammoniumform mittels Ionenaustauscherharz gefolgt von einer automatisierten Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min).



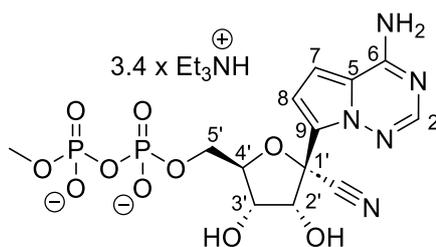
Summenformel: $C_{12}H_{12}N_5O_7P^{2-}$

Molekulargewicht: 384.5747 g/mol

Ausbeute: 0.13 g (0.33 mmol, 95 %) einer farblosen Watte. – **1H -NMR** (400 MHz, D_2O): δ [ppm] = 8.09 (s, 1H, H-2), 7.39 (d, $^3J_{H,H}$ = 4.9 Hz, 1H, H-7), 7.16 (d, $^3J_{H,H}$ = 4.8 Hz, 1H, H-8), 4.84 (d, $^3J_{H,H}$ = 5.2 Hz, 1H, H-2'), 4.52-4.48 (m, 1H, H-4'), 4.48 (t, $^3J_{H,H}$ = 4.9 Hz, H-3'), 4.10-4.04 (m, 2H, H-5'). – **^{13}C -NMR** (101 MHz, D_2O): δ [ppm] = 148.7 (C-6), 135.5 (C-2), 128.4 (C-9), 118.3 (CN), 116.6 (C-5), 113.3 (C-8), 109.9 (C-7), 84.6 (C-4'), 75.3 (C-2'), 70.2 (C-3), 63.9 (C-5'). – **^{31}P -NMR** (202 MHz, D_2O): δ [ppm] = 1.31. – **ATR-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3112, 2945, 2688, 2529, 2494, 2219, 2195, 1645, 1526, 1473, 1403, 1361, 1224, 1143, 1033, 919, 791, 719, 706, 496, 478, 434. – **HRMS** (ESI⁻, m/z): ber.: 370.0558 [M-H]⁻, gef.: 370.0549 [M-H]⁻.

Synthese von β -Methyl-(2R,3S,5R)-2-(4Aminopyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazine-7-yl)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydro-2-furancarbnitril-Diphosphat **30** als Triethylammoniumsalz

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 7.9 mg (0.014 mmol, 1.0 Äquiv.) GS-441524 Monophosphat **31** in 1 mL abs. Acetonitril suspendiert und 0.030 mL (0.23 mmol, 16 Äquiv.) abs. Triethylamin sowie 0.020 mL (0.14 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid, gelöst in 1 mL abs. Acetonitril, tropfenweise bei 0 °C zugegeben. Der Rückstand wurde in 1 mL abs. Acetonitril aufgenommen und mit 0.020 mL (0.14 mmol, 10 Äquiv.) abs. Triethylamin, 0.010 mL (0.085 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol sowie 4.5 mg (0.021 mmol, 1.5 Äquiv.) des Phosphats **34**, suspendiert in 2 mL abs. Acetonitril, versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für sieben Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel (H_2O/CH_3CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt. Anschließend erfolgte jeweils eine Überführung in die Ammonium- und Triethylammoniumform mittels Ionenaustauscherharz gefolgt von einer automatisierten Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel H_2O/CH_3CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min).



Summenformel: $C_{13}H_{15}N_5O_{10}P^{2-}$

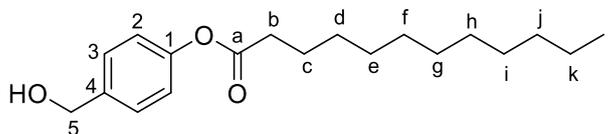
Molekulargewicht: 810.7183 g/mol

Ausbeute: 15 mg (0.018 mmol, 85 %) einer farblosen Watte. – **1H -NMR** (400 MHz, D_2O): δ [ppm] = 8.11 (s, 1H, H-2), 7.41 (d, $^3J_{H,H} = 4.9$ Hz, 1H, H-7), 7.20 (d, $^3J_{H,H} = 4.9$ Hz, 1H, H-8), 4.98 (d, $^3J_{H,H} = 5.1$ Hz, 1H, H-2'), 4.58-4.52 (m, 1H, H-4'), 4.49 (t, $^3J_{H,H} = 4.8$ Hz, 1H, H-3'), 4.22-4.15 (m, 2H, H-5'), 3.61 (d, $^3J_{H,P} = 11.4$ Hz, 3H, $-CH_3$). – **^{13}C -NMR** (101 MHz, D_2O): δ [ppm] = 149.4 (C-6), 136.3 (C-2), 129.2 (C-9), 118.5 (CN), 117.1 (C-1'), 115.6 (C-5), 114.1 (C-8), 110.7 (C-7), 85.5 (d, $^3J_{C,P} = 8.6$ Hz, C-4'), 76.0 (C-2'), 70.9 (C-3'), 65.2 (d, $^2J_{C,P} = 5.2$ Hz, C-5'), 53.9 (dd, $^3J_{C,P} = 9.1$ Hz, $^2J_{C,P} = 6.0$ Hz, $-CH_3$). **^{31}P -NMR** (162 MHz, D_2O): δ [ppm] = -9.76 (d, $^2J_{P,P} = 21.6$ Hz, P_α), -11.55 (d, $^2J_{P,P} = 21.3$ Hz, P_β). – **HRMS** (ESI⁻, m/z): ber.: 464.0378 [M-H]⁻, gef.: 464.0376 [M-H]⁻.

7.3.5 Synthesen zur Darstellung von β -(Dodecanoyloxybenzyl-methyl)-GS441524-Diphosphat 36

Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenyldodecanoat 40

Die Synthese wurde entsprechend der Literatur nach WEISING *et al.* durchgeführt.^[156]



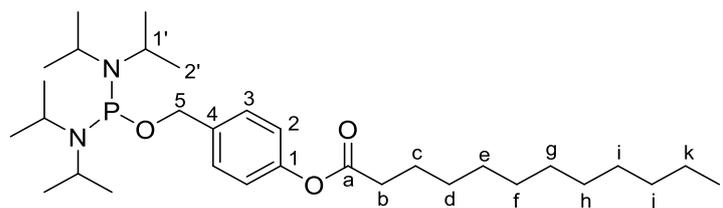
Summenformel: $C_{19}H_{30}O_3$

Molekulargewicht: 306.4460 g/mol

Ausbeute: 0.85 g (2.8 mmol, 61 %) eines farblosen Feststoffes. – Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[156] – **Weitere Analytik:** **ATR-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3330, 2955, 2915, 2848, 1751, 1509, 1463, 1428, 1411, 1384, 1353, 1328, 1298, 1267, 1236, 1216, 1166, 1147, 1123, 1083, 1037, 1014, 1002, 950, 925, 890, 846, 818, 794, 774, 760, 729, 719, 665, 642, 580, 527, 511, 417.

Synthese von Bis-(*N,N*-diisopropylamino)-4-dodecanoyloxybenzylphosphoramidit **38**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 0.50 g (1.9 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis-(*N,N*-diisopropylamino)chlorophosphoramidit **39** in 7 mL abs. Tetrahydrofuran gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dem Gemisch wurde eine auf 0 °C gekühlte Lösung aus 0.46 g (1.5 mmol, 0.80 Äquiv.) AB-Maske **40** und 7 mL abs. Tetrahydrofuran langsam zugetropft. Nach Rühren für vier Stunden bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch filtriert und der Filterkuchen mit Ethylacetat gespült. Alle flüchtigen Bestandteile wurden unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/Et₃N 9:1 v/v).



Summenformel: C₃₁H₅₇N₂O₃P
Molekulargewicht: 536,7818 g/mol

Ausbeute: 0.55 g (1.0 mmol, 68 %) eines farblosen Feststoffes. – **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.39-7.34 (m, 2H, H-3), 7.06-6.99 (m, 2H, H-2), 4.62 (d, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 2H, H-5), 3.56 (dhept, ²J_{H,P} = 10.7 Hz, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 4H, H-1'), 2.54 (t, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 2H, H-b), 1.74 (p, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 2H, H-c), 1.46-1.23 (m, 16H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k), 1.18 (dd, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, ⁴J_{H,H} = 2.7 Hz, 24 Hz, H-2'), 0.92-0.84 (m, 3H, H-l). – **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.6 (C-a), 149.7 (C-1), 138.1 (C-4), 128.8 (C-3), 121.3 (C-2), 65.9 (C-5), 44.7 (C-1'), 34.6 (C-b), 32.1 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 29.8 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 29.6 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 29.5 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 29.4 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 29.3 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 25.1 (C-c), 24.8 (d, ³J_{C,P} = 8.0 Hz, C-2'), 24.0 (d, ³J_{C,P} = 5.8 Hz, C-2'), 14.3 (C-1). – **³¹P-NMR** (202 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 123.50. – **ATR-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2962, 2923, 2853, 1759, 1607, 1508, 1463, 1417, 1390, 1362, 1296, 1267, 1196, 1163, 1133, 1116, 1025, 1015, 1008, 953, 921, 890, 866, 847, 803, 783, 749, 725, 642, 523, 473, 416. – **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 575.3728 [M+K]⁺, gef.: 575.3930 [M+K]⁺.

Synthese von 4-Dodecanoyloxybenzyl-methyl-diisopropylphosphoramidit **37**

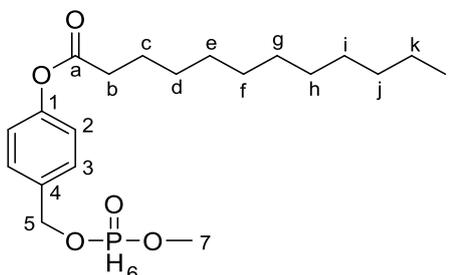
Unter Stickstoff als Inertgas wurden 0.20 g (0.37 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis-(*N,N*-diisopropylamino)-4-dodecanoyloxybenzylphosphoramidit **38** und 0.020 mL (0.45 mmol, 1.2 Äquiv.) abs. Methanol in 13 mL abs. THF gelöst. Bei 0 °C wurden 1.6 mL (0.37 mmol, 1.0 Äquiv.) einer 0.25 M DCI-Lösung zum Reaktionsgemisch portionsweise zugegeben.

Dabei wurden erst 0.5 Äquiv, dann jeweils 0.25 Äquiv. im Abstand von fünf Minuten zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/NEt₃ 9:1 v/v).

Ausbeute: Das gewünschte Produkt konnte nicht isoliert werden.

Synthese von 4-Dodecanoyloxybenzyl-methyl-*H*-phosphonat **45**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 0.050 mL (0.83 mmol, 0.83 Äquiv.) Diphenylphosphonat in 9 mL abs. Pyridin gelöst, auf 0 °C gekühlt und 0.31 g (1.0 mmol, 1.0 Äquiv.) der C11-AB-Maske **40** dazugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde nach Rühren für 1.5 Stunden bei 0 °C portionsweise mit 0.060 mL (1.5 mmol, 1.0 Äquiv.) abs. Methanol versetzt. Die Reaktion wurde für zwei weitere Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile bei vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde jeweils dreimal mit Toluol und mit Dichlormethan coevaporiert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 1:1 v/v, 0.5 % AcOH).



Summenformel: C₂₀H₃₃O₅P
Molekulargewicht: 384,4528 g/mol

Ausbeute: 0.23 g (0.61 mmol, 71 %) eines farblosen Feststoffes. – ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.44-7.39 (m, 2H, H-3), 7.12-7.08 (m, 2H, H-2), 6.85 (d, ¹J_{H,P} = 703 Hz, 1H, H-6), 5.10 (d, ³J_{H,H} = 9.7 Hz, 2H, H-5), 3.72 (d, ³J_{H,H} = 12.0 Hz, 3H, H-7), 2.55 (t, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 2H, H-b), 1.75 (p, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 2H, H-c), 1.44-1.23 (m, 16H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-i, H-j, H-k), 0.88 (t, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 3H, H-l). – ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.3 (C-a), 151.2 (C-1), 133.2 (d, ³J_{C,P} = 5.8 Hz, C-4), 129.4 (C-3), 122.1 (C-2), 66.9 (d, ²J_{C,P} = 5.6 Hz, C-5), 52.1 (d, ²J_{C,P} = 6.0 Hz, C-7), 34.5 (C-b), 32.1 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 29.7 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 29.6 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 29.5 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 29.4 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 29.3 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 25.1 (C-c), 22.8 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 14.3 (C-l). – ³¹P-NMR (243 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.10. – ATR-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2955,

2915, 2848, 1748, 1606, 1510, 1467, 1413, 1383, 1353, 1328, 1297, 1237, 1218, 1166, 1149, 1124, 1038, 975, 925, 829, 785, 721, 693, 582, 566, 522, 510, 439. – HRMS (ESI⁺, m/z): ber.: 407.1958 [M+Na]⁺, gef.: 407.1953 [M+Na]⁺.

Synthese von β -(Dodecanoyloxybenzyl-methyl)-GS441524-Diphosphat 36 als Triethylammoniumsalz

Synthese 1:

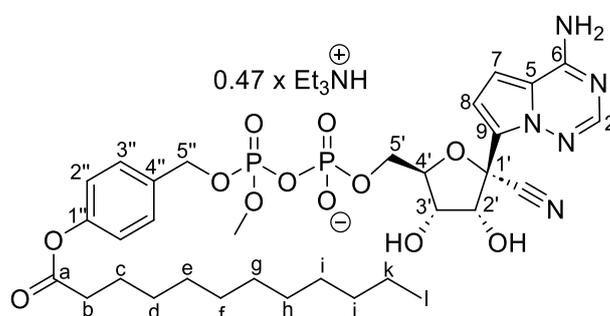
Unter Inertgasatmosphäre wurden 50 mg (0.13 mmol, 1.0 Äquiv.) des H-Phosphonats **45** in 3 mL abs. Acetonitril gelöst und 26 mg (0.20 mmol, 1.5 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in einer Portion hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für zwei Stunden bei 50 °C gerührt und anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und die organische Phase einmal mit einem 2 mM Tetrabutylammoniumacetat-Puffer und einmal mit demin. Wasser gewaschen. Die Phasentrennung wurde mittels Zentrifugation (8000 rpm, 4 °C, 4 min) beschleunigt. Daraufhin wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt ohne weitere Reinigung eingesetzt. Die nachfolgende Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 40 mg (0.10 mmol, 1.0 Äquiv.) GS-441524 Monophosphat **31** in 4 mL abs. Acetonitril suspendiert und 0.23 mL (1.6 mmol, 16 Äquiv.) abs. Triethylamin sowie 0.14 mL (1.0 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid, gelöst in 2 mL abs. Acetonitril, tropfenweise bei 0 °C zugegeben. Der Rückstand wurde in 4 mL abs. Acetonitril aufgenommen und mit 0.14 mL (1.0 mmol, 10 Äquiv.) abs. Triethylamin, 0.050 mL (0.62 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol sowie 51 mg (0.12 mmol, 1.2 Äquiv.) des Phosphats **48**, suspendiert in 4 mL abs. Acetonitril, versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für sieben Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt.

Ausbeute: Das gewünschte Produkt konnte nicht isoliert werden.

Synthese 2:

Unter Inertgasatmosphäre wurden 44 mg (0.11 mmol, 1.0 Äquiv.) des H-Phosphonats **45** in 4 mL abs. Acetonitril gelöst und 38 mg (0.28 mmol, 2.5 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid in einer Portion hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 16 Stunden bei 50 °C gerührt.

Anschließend wurden 50 mg (0.11 mmol, 1.0 Äquiv.) des GS-441524-Monophosphats **31** in 5 mL abs. Acetonitril suspendiert und 0.040 mL (0.28 mmol, 2.5 Äquiv.) abs. Triethylamin hinzugegeben, um das freiwerdende HCl zu neutralisieren. Zur Suspension wurde bei Raumtemperatur das aktivierte Phosphochloridat hinzutropft. Das Reaktionsgemisch wurde für neun Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt. Anschließend erfolgte jeweils eine Überführung in die Ammonium- und Triethylammoniumform mittels Ionenaustauscherharz gefolgt von einer automatisierten Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min).



Summenformel: C₃₂H₄₄N₅O₁₂P₂⁻
Molekulargewicht: 801.7487 g/mol

Ausbeute: 66 mg (0.082 mmol, 73 %) einer farblosen Watte. – **¹H-NMR** (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 7.92 (s, 1H, H-2), 7.35 (d, ³J_{H,H} = 8.5 Hz, 2H, H-3''), 7.05-7.00 (m, 2H, H-2''), 6.91-6.86 (m, 2H, H-7, H-8), 5.10-5.00 (m, 1H, H-2'), 4.85-4.80 (m, 2H, H-5), 4.57 (d, ³J_{H,H} = 4.8 Hz, H-4'), 4.16 (dt, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, ³J_{H,H} = 4.0 Hz, 1H, H-3'), 4.10-3.98 (m, 4H, H-5', CH₃), 2.55 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, H-b), 1.67-1.58 (m, 2H, H-c), 1.39-1.19 (m, 16H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k), 0.85 (z, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 3H, H-l). – **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 171.8 (C-a), 149.6 (C-1''), 147.8 (C-2), 136.4 (C-4''), 129.3 (C-9), 128.4 (C-3''), 124.2 (C-1'), 121.4 (C-2''), 116.8 (C-5), 110.4 (C-7 od. C-8), 100.9 (C-7 od. C-8), 82.8 (C-3'), 74.4 (C-4'), 69.5 (CH₃), 68.0 (C-2'), 66.0 (C-5''), 64.5 (C-5'), 33.5 (C-b), 31.3 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 30.7 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 29.0 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 28.9 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 28.7 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 28.7 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 28.7 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 28.7 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 28.4 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 24.3 (C-c), 22.1 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 14.0 (C-l). – **³¹P-NMR** (243 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = -11.41 (q, ²J_{P,P} = 15.7 Hz). – **HRMS** (ESI⁻, m/z): ber.: 752.2467 [M-H]⁻, gef.: 752.2457 [M-H]⁻.

7.3.6 Synthesen zur Darstellung von β -Ethyl-GS441524-phosphatphosphonat 49

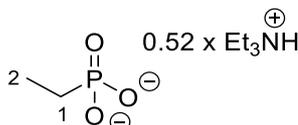
Synthese von Ethylphosphinat 51

Es wurden 0.50 g (5.7 mmol, 1.0 Äquiv.) Natriumphosphinat in 5 mL abs. Ethanol gelöst und 0.15 mL (2.8 mmol, 0.50 Äquiv.) Schwefelsäure und 93 mg (0.57 mmol, 0.10 Äquiv.) AIBN hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde dreimal mit Ethen gespült und anschließend unter Ethengasatmosphäre bei 85 °C gerührt. Nach Rühren für zwei Stunden wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: Das gewünschte Produkt konnte nicht isoliert werden.

Synthese von Ethylphosphonat 54 als Triethylammoniumsalz

Es wurden 0.21 g (1.4 mmol, 1.0 Äquiv.) Ethanphosphonsäuredichlorid in 20 mL Wasser gelöst und 0.040 mL (1.4 mmol, 1.0 Äquiv.) konzentrierte Salzsäure hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für eine Stunde bei 55 °C gerührt und anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend erfolgte eine Überführung in die Triethylammoniumform mittels Ionenaustauscherharz gefolgt von einer automatisierten Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min).



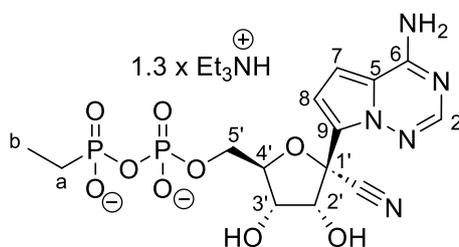
Summenformel: C₂H₆O₃P²⁻
Molekulargewicht: 162,7854 g/mol

Ausbeute: 0.19 g (1.2 mmol, 84 %) eines farblosen Öls. – **¹H-NMR** (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 1.48 (dq, ²J_{H,H} = 17.8 Hz, ³J_{H,H} = 7.7 Hz, 2H, H-1), 1.00 (dt, ²J_{H,H} = 18.9 Hz, ³J_{H,H} = 7.7 Hz, 3H, H-2). – **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 21.0 (C-1), 20.1 (C-1), 7.2 (C-2), 7.2 (C-2). – **³¹P-NMR** (202 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 27.68. – **ATR-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2981, 2888, 2304, 1644, 1460, 1411, 1285, 1241, 1107, 1013, 971, 921, 741, 715, 499, 427. – **HRMS** (ESI, m/z): ber.: 109.0060 [M-H]⁻, gef.: 109.0062 [M-H]⁻.

Synthese von β -Ethyl-GS441524-phosphatphosphonat 49 als Triethylammoniumsalz

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 50 mg (0.14 mmol, 1.0 Äquiv.) GS-441524 Monophosphat **31** in 5 mL abs. Acetonitril suspendiert und 0.30 mL

(2.2 mmol, 16 Äquiv.) abs. Triethylamin sowie 0.19 mL (1.4 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, tropfenweise bei 0 °C zugegeben. Der Rückstand wurde in 5 mL abs. Acetonitril aufgenommen und mit 0.19 mL (1.4 mmol, 10 Äquiv.) abs. Triethylamin, 0.060 mL (0.81 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol sowie 33 mg (0.20 mmol, 1.5 Äquiv.) des Phosphonats **54**, suspendiert in 3.5 mL abs. Acetonitril, versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für sieben Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt. Anschließend erfolgte jeweils eine Überführung in die Ammonium- und Triethylammoniumform mittels Ionenaustauscherharz gefolgt von einer automatisierten Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min).



Summenformel: C₁₄H₁₇N₅O₉P²⁻

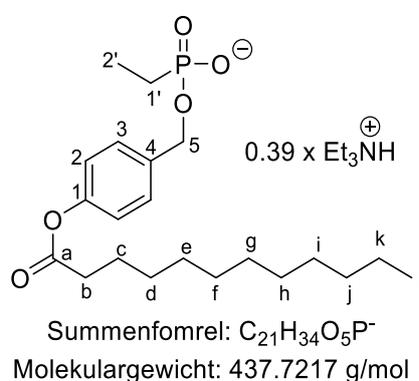
Molekulargewicht: 579.6976 g/mol

Ausbeute: 51 mg (0.085 mmol, 42 %) einer farblosen Watte. – **¹H-NMR** (500 MHz, D₂O): δ [ppm] = 7.95 (s, 1H, H-2), 7.03 (d, ³J_{H,H} = 4.8 Hz, 1H, H-7), 7.00 (d, ³J_{H,H} = 4.7 Hz, 1H, H-8), 4.96 (d, ³J_{H,H} = 5.4 Hz, 1H, H-2'), 4.53-4.50 (m, 1H, H-4'), 4.49-4.45 (m, 1H, H-3'), 4.15-4.04 (m, 2H, H-5'), 1.57 (dq, ²J_{H,P} = 17.8 Hz, ³J_{H,H} = 7.7 Hz, 2H, H-a), 0.95 (dt, ³J_{H,P} = 20.0 Hz, ³J_{H,H} = 7.7 Hz, 3H, H-b). – **¹³C-NMR** (125 MHz, D₂O): δ [ppm] = 154.2 (C-6), 144.7 (C-2), 124.8 (C-9), 117.3 (CN), 116.2 (C-5), 112.0 (C-7), 104.6 (C-8), 85.4 (d, ³J_{C,P} = 9.1 Hz, C-4'), 77.0 (C-1'), 75.3 (C-2'), 70.8 (C-3'), 64.9 (d, ²J_{C,P} = 5.5 Hz, C-5'), 21.1 (d, ¹J_{C,P} = 138.5 Hz, C-a), 7.03 (d, ²J_{C,P} = 6.6 Hz, C-b). **³¹P-NMR** (243 MHz, D₂O): δ [ppm] = 21.88 (d, ²J_{P,P} = 26.5 Hz, P_β), -11.60 (d, ²J_{P,P} = 26.9 Hz, P_α). – **HRMS** (ESI⁻, m/z): ber.: 464.0378 [M-H]⁻, gef.: 464.0376 [M-H]⁻.

7.3.7 Synthesen zur Darstellung der AB-maskierten Phosphat-Phosphonate

Synthese von (4-Dodecanoyloxybenzyl)-ethylphosphonat 55 als Triethylammoniumsalz

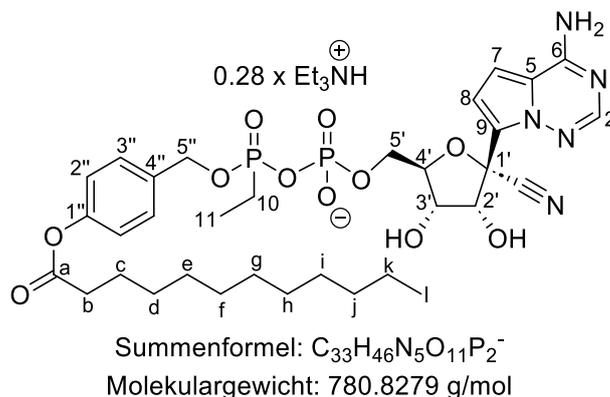
Die Reaktion wurde nach der **AAV 4** durchgeführt. Es wurden 0.20 g (1.4 mmol, 1.0 Äquiv.) Ethylphosphonsäuredichlorid in 20 mL abs. Pyridin gelöst und 0.38 g (1.2 mmol, 0.90 Äquiv.) der C11-AB-Maske **40** portionsweise hinzugegeben. Nach Rühren für drei Stunden wurden 10 mL TEAB-Puffer hinzugegeben und jeweils dreimal mit Toluol und Dichlormethan coevaporiert. Das Rohprodukt wurde zweifach mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt.



Ausbeute: 0.20 g (0.46 mmol, 34 %) eines farblosen Öls. – **¹H-NMR** (400 MHz, CD₃CN): δ [ppm] = 7.44-7.36 (m, 2H, H-3), 7.06-6.99 (m, 2H, H-2), 4.88 (d, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 2H, H-5), 2.54 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 2H, H-b), 1.69 (pseudo-p, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 2H, H-c), 1.54 (dq, $^2J_{H,P} = 17.5$ Hz, $^3J_{H,H} = 7.7$ Hz, 2H, H-1'), 1.44-1.25 (m, 16H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k), 1.04 (dt, $^3J_{H,P} = 18.4$ Hz, $^3J_{H,H} = 7.7$ Hz, 3H, H-2'), 0.92-0.84 (m, 3H, H-l). – **¹³C-NMR** (101 MHz, CD₃CN): δ [ppm] = 173.3 (C-a), 151.6 (C-1), 137.6 (C-4), 129.4 (C-3), 122.6 (C-2), 65.8 (d, $^2J_{C,P} = 5.3$ Hz, C-5), 34.7 (C-b), 32.6 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 30.3 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 30.3 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 30.2 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 30.0 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 29.9 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 29.7 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 25.6 (C-c), 23.4 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 20.9 (C-1'), 14.4 (C-l), 8.0 (d, $^2J_{C,P} = 6.7$ Hz, C-2'). – **³¹P-NMR** (162 MHz, CD₃CN): δ [ppm] = 26.53. – **ATR-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2916, 2849, 1751, 1716, 1611, 1511, 1468, 1458, 1379, 1297, 1264, 1237, 1217, 1199, 1183, 1167, 1141, 1122, 1110, 1083, 1040, 1031, 1015, 986, 939, 918, 847, 824, 812, 787, 743, 724, 711, 521, 489, 467, 449. – **HRMS** (ESI⁻, m/z): ber.: 397.2149 [M-H]⁻, gef.: 397.2152 [M-H]⁻.

Synthese von β -(Dodecanoyloxybenzyl)-(ethyl)-GS441524-phosphatphosphonat **50** als Triethylammoniumsalz

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 50 mg (0.14 mmol, 1.0 Äquiv.) GS-441524 Monophosphat **31** in 5 mL abs. Acetonitril suspendiert und 0.30 mL (2.2 mmol, 16 Äquiv.) abs. Triethylamin sowie 0.19 mL (1.4 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, tropfenweise bei 0 °C zugegeben. Der Rückstand wurde in 5 mL abs. Acetonitril aufgenommen und mit 0.19 mL (1.4 mmol, 10 Äquiv.) abs. Triethylamin, 0.060 mL (0.81 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol sowie 75 mg (0.16 mmol, 1.2 Äquiv.) des Phosphonats **55**, suspendiert in 7.5 mL abs. Acetonitril/DMF (2:1 v/v), versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für sieben Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt. Anschließend erfolgte jeweils eine Überführung in die Ammonium- und Triethylammoniumform mittels Ionenaustauscherharz gefolgt von einer automatisierten Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min).

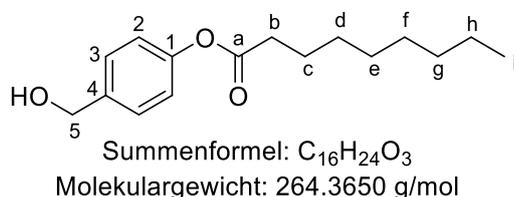


Ausbeute: 62 mg (0.079 mmol, 49 %) einer farblosen Wasse. – ¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ [ppm] = 7.77 (pseudo-d, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, 1H, H-2), 7.25-7.14 (m, 2H, H-3''), 6.90-6.71 (m, 4H, H-2'', H-7, H-8), 4.00-4.86 (m, 2H, H-5''), 4.49-4.40 (m, 1H, H-4'), 4.39-4.31 (m, 1H, H-3'), 4.28-4.09 (m, 2H, H-5'), 2.40-2.28 (m, 2H, H-b), 1.90-1.70 (m, 2H, H-c), 1.58-1.46 (m, 2H, H-10), 1.29-1.12 (m, 16H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k), 1.02-0.89 (m, 3H, H-11), 0.85-0.77 (m, 3H, H-l). – ¹³C-NMR (151 MHz, D₂O): δ [ppm] = 172.1 (C-a), 152.2 (C-2), 151.2 (C-6), 150.1 (C-1''), 133.2 (C-4''), 128.7 (C-3''), 125.3 (C-9), 121.4 (C-2''), 113.3 (C-5), 111.8 (C-7, C-8), 83.4 (C-4'), 74.8 (C-2'), 69.6 (C-3'), 66.3 (C-5''), 65.1 (C-5'), 33.9 (C-b), 31.9 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 29.7 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 29.7 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 29.4 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 29.4 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 29.1 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 24.6

(C-10), 22.6 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 18.3 (C-c), 13.8 (C-l), 8.2 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k), 5.7 (C-11). ³¹P-NMR (243 MHz, D₂O): δ [ppm] = 27.30 (P _{β}), -11.75 (P _{α}). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3413, 3348, 3331, 3320, 3309, 3291, 3221, 3175, 3136, 3080, 3037, 3013, 2924, 2853, 1758, 1649, 1604, 1510, 1467, 1420, 1361, 1250, 1218, 1167, 1140, 1104, 1049, 1015, 947, 869, 820, 733, 722, 518, 498. – **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 752.2820 [M+H]⁺, gef.: 752.2821 [M+H]⁺.

Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenylnonanoat

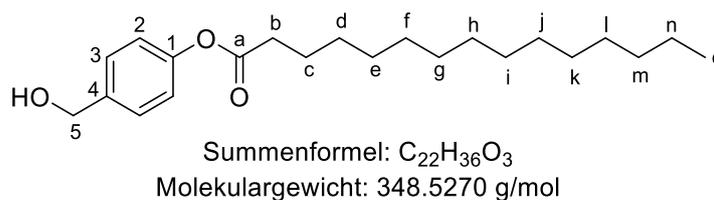
Die Synthese wurde entsprechend der Literatur nach ZHAO *et al.* durchgeführt.^[162]



Ausbeute: 0.62 g (2.4 mmol, 49 %) eines farblosen Feststoffes. – **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 7.37-7.30 (m, 2H, H-3), 7.08-6.99 (m, 2H, H-2), 5.19 (t, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, 1H, -OH), 4.48 (d, ³J_{H,H} = 5.8 Hz, 2H, H-5), 2.55 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, H-b), 1.63 (p, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 2H, H-c), 1.40-1.21 (m, 10H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h), 0.90-0.82 (H-i). – **¹³C-NMR** (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 171.9 (C-a), 149.2 (C-1), 140.0 (C-4), 127.4 (C-3), 121.3 (C-2), 62.3 (C-5), 33.5 (C-b), 31.2, 28.6, 28.5, 28.4, (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h), 24.3 (C-c), 22.1 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h), 13.9 (C-i). – **ATR-IR**: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3330, 2955, 2915, 2848, 1751, 1509, 1463, 1428, 1411, 1384, 1353, 1328, 1298, 1267, 1236, 1216, 1166, 1147, 1123, 1083, 1037, 1014, 1002, 950, 925, 890, 846, 818, 794, 774, 760, 729, 719, 664, 642, 580, 527, 511, 417.

Synthese von 4-(Hydroxymethyl)phenylpentadecanoat

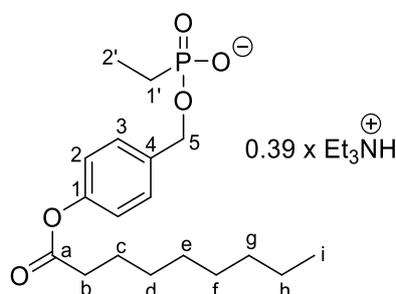
Die Synthese wurde entsprechend der Literatur nach ZHAO *et al.* durchgeführt.^[162]



Ausbeute: 0.45 g (1.3 mmol, 63 %) eines farblosen Feststoffes. – Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[162]

Synthese von (4-Nonanoyloxybenzyl)-ethylphosphonat 58 als Triethylammoniumsalz

Die Reaktion wurde nach der **AAV 4** durchgeführt. Es wurden 0.20 g (1.4 mmol, 1.0 Äquiv.) Ethylphosphonsäuredichlorid in 20 mL abs. Pyridin gelöst und 0.32 g (1.2 mmol, 0.90 Äquiv.) der C8-AB-Maske portionsweise hinzugegeben. Nach Rühren für zwei Stunden wurden 10 mL TEAB-Puffer hinzugegeben und jeweils dreimal mit Toluol und Dichlormethan coevaporiert. Das Rohprodukt wurde dreifach mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt.

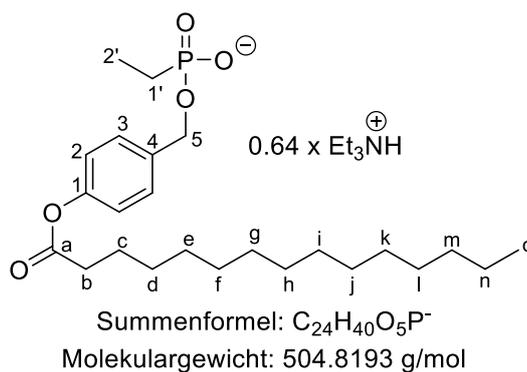


Summenformel: C₁₈H₂₈O₅P⁻
Molekulargewicht: 356.3913 g/mol

Ausbeute: 0.13 g (0.36 mmol, 29 %) eines farblosen Öls. – **¹H-NMR** (400 MHz, D₂O/CD₃CN): δ [ppm] = 7.42-7.37 (m, 2H, H-3), 7.06-7.02 (m, 2H, H-2), 4.94 (d, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, 2H, H-5), 2.54 (t, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 2H, H-b), 1.74-1.54 (m, 4H, H-c, H-1'), 1.45-1.25 (m, 10H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h), 1.07 (dt, ³J_{H,P} = 19.4 Hz, ³J_{H,H} = 7.7 Hz, 3H, H-2'), 0.93-0.86 (m, 3H, H-i). – **¹³C-NMR** (101 MHz, D₂O/CD₃CN): δ [ppm] = 174.6 (C-a), 151.3 (C-1), 135.9 (d, ³J_{C,P} = 6.6 Hz, C-4), 130.0 (C-3), 122.7 (C-2), 66.5 (d, ²J_{C,P} = 5.8 Hz, C-5), 34.7 (C-b), 32.2, 29.6, 29.4, 23.2 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h), 25.4 (C-c), 23.4 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h), 19.6 (d, ¹J_{C,P} = 139.3 Hz, C-1'), 14.4 (C-i), 7.0 (d, ²J_{C,P} = 6.6 Hz, C-2'). **³¹P-NMR** (162 MHz, D₂O/CD₃CN): δ [ppm] = 30.87. – **ATR-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2924, 2854, 1757, 1608, 1508, 1460, 1418, 1376, 1288, 1249, 1198, 1166, 1138, 1104, 1028, 994, 919, 852, 722, 559, 503, 468. – **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 397.1645 [M+Na]⁺, gef.: 397.1645 [M+Na]⁺.

Synthese von (4-Pentadecanoyloxybenzyl)-ethylphosphonat 59 als Triethylammoniumsalz

Die Reaktion wurde nach der **AAV 4** durchgeführt. Es wurden 0.10 g (0.68 mmol, 1.0 Äquiv.) Ethylphosphonsäuredichlorid in 10 mL abs. Pyridin gelöst und 0.21 g (0.61 mmol, 0.90 Äquiv.) der C14-AB-Maske portionsweise hinzugegeben. Nach Rühren für zwei Stunden wurden 5 mL TEAB-Puffer hinzugegeben und jeweils dreimal mit Toluol und Dichlormethan coevaporiert. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt.

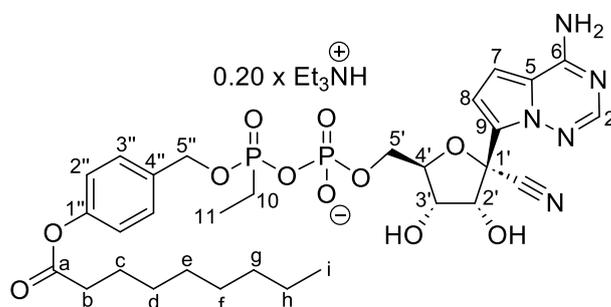


Ausbeute: 0.040 g (0.079 mmol, 12 %) eines farblosen Öls. – **¹H-NMR** (400 MHz, D₂O/CD₃CN): δ [ppm] = 7.53 (pseudo-d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$ Hz, 2H, H-3), 7.18 (m, 2H, H-2), 5.06 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, 2H, H-5), 2.66 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 2H, H-b), 1.83-1.72 (m, 4H, H-c, H-1'), 1.53-1.36 (m, 22H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k, H-l, H-m, H-n), 1.19 (dt, $^2J_{\text{P,H}} = 19.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, 3H, H-2'), 0.99 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, H-o). – **¹³C-NMR** (101 MHz, D₂O/CD₃CN): δ [ppm] = 172.4 (C-a), 148.2 (C-1), 134.7 (C-4), 129.8 (C-3), 122.9 (C-2), 64.5 (C-5), 34.8 (C-b), 32.8, 30.4, 30.3, 30.3, 30.2, 30.0 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k, C-l, C-m, C-n), 25.6 (C-c), 23.5 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k, C-l, C-m, C-n), 18.4 (C-1'), 13.3 (C-o), 6.0 (C-2'). **³¹P-NMR** (121 MHz, D₂O/CD₃CN): δ [ppm] = 30.72. – **ATR-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2953, 2916, 2849, 1753, 1607, 1509, 1465, 1413, 1379, 1294, 1270m 1246, 1221, 1197, 1166, 1150, 1062, 1033, 1015, 965, 924, 862, 827, 818, 768, 743, 719, 527, 507, 494, 467, 452, 438, 417. – **HRMS** (ESI⁻, m/z): ber.: 439.2619 [M-H]⁻, gef.: 439.2609 [M-H]⁻.

Synthese von β -(Nonanoyloxybenzyl)-(ethyl)-GS441524-phosphatphosphonat 56 als Triethylammoniumsalz

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 50 mg (0.13 mmol, 1.0 Äquiv.) GS-441524 Monophosphat **31** in 5 mL abs. Acetonitril suspendiert und 0.28 mL

(2.0 mmol, 16 Äquiv.) abs. Triethylamin sowie 0.18 mL (1.3 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid, gelöst in 5 mL abs. Acetonitril, tropfenweise zugegeben. Der Rückstand wurde in 5 mL abs. Acetonitril aufgenommen und mit 0.18 mL (1.3 mmol, 10 Äquiv.) abs. Triethylamin, 0.060 mL (0.77 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol sowie 55 mg (0.15 mmol, 1.2 Äquiv.) des Phosphonats **58**, gelöst in 5.5 mL abs. Acetonitril, versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für sieben Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt. Anschließend erfolgte jeweils eine Überführung in die Ammonium- und Triethylammoniumform mittels Ionenaustauscherharz gefolgt von einer automatisierten Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min).

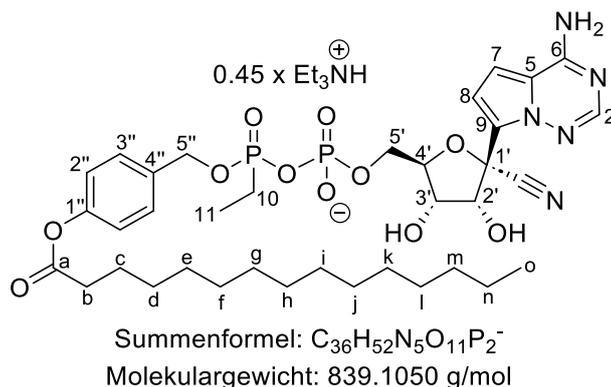


Summenformel: C₃₀H₄₀N₅O₁₁P₂⁻
 Molekulargewicht: 708.6279 g/mol

Ausbeute: 17 mg (0.024 mmol, 16 %) einer farblosen Watte. – **¹H-NMR** (500 MHz, D₂O): δ [ppm] = 7.74 (pseudo-d, ⁴J_{H,H} = 6.4 Hz, 1H, H-2), 7.22-7.12 (m, 2H, H-3''), 6.87-6.76 (m, 3H, H-2'', H-7), 6.58-6.46 (m, 1H, H-8), 4.97-4.83 (m, 2H, H-5''), 4.46-4.38 (m, 1H, H-4'), 4.37-4.30 (m, 1H, H-3'), 4.23-4.07 (m, 2H, H-5'), 2.36-2.26 (m, 2H, H-b), 1.86-1.65 (m, 2H, H-10), 1.60-1.42 (m, 2H, H-c), 1.18-1.08 (m, 10H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h), 0.92 (ddt, ³J_{P,H} = 27.8 Hz, ²J_{H,H} = 15.2 Hz, ³J_{H,H} = 7.7 Hz, 3H, H-11), 0.76 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 3H, H-i). – **¹³C-NMR** (125 MHz, D₂O): δ [ppm] = 173.3 (C-1), 152.6 (C-6), 150.6 (C-1''), 150.6 (C-2), 134.0 (C-4''), 129.3 (C-3''), 125.2 (C-9), 121.8 (C-2''), 115.1 (C-5), 112.0 (C-7), 104.3 (C-8), 84.4 (C-4'), 75.2 (C-2'), 70.3 (C-3'), 67.1 (C-5''), 65.6 (C-5'), 34.2 (C-b), 32.1 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h), 29.4 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h), 29.2 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h), 24.9 (C-c), 22.8 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h), 18.6 (C-10), 14.2 (C-i), 6.0 (C-11). – **³¹P-NMR** (202 MHz, D₂O): δ [ppm] = 27.36 (P_β), -11.76 (P_α). – **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 710.2351 [M+H]⁺, gef.: 710.2351 [M+H]⁺.

Synthese von β -(Pentadecanoyloxybenzyl)-(ethyl)-GS441524-phosphatphosphonat **57** als Triethylammoniumsalz

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 20 mg (0.051 mmol, 1.0 Äquiv.) GS-441524 Monophosphat **31** in 2 mL abs. Acetonitril suspendiert und 0.11 mL (0.82 mmol, 16 Äquiv.) abs. Triethylamin sowie 0.070 mL (5.1 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid, gelöst in 2 mL abs. Acetonitril, tropfenweise zugegeben. Der Rückstand wurde in 2 mL abs. Acetonitril aufgenommen und mit 0.070 mL (5.1 mmol, 10 Äquiv.) abs. Triethylamin, 0.020 mL (0.31 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol sowie 31 mg (0.062 mmol, 1.2 Äquiv.) des Phosphonats **59**, gelöst in 2 mL abs. Acetonitril, versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für sieben Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt. Anschließend erfolgte jeweils eine Überführung in die Ammonium- und Triethylammoniumform mittels Ionenaustauscherharz gefolgt von einer automatisierten Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min).



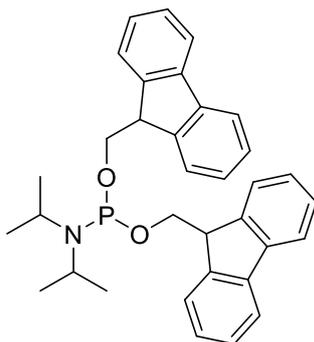
Ausbeute: 19 mg (0.022 mmol, 36 %) einer farblosen Watte. – **¹H-NMR** (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 7.92 (s, 1H, H-2), 7.44-7.40 (m, 2H, H-3''), 7.09-7.05 (m, 2H, H-2''), 6.91-6.90 (m, 1H, H-7), 6.89-6.87 (m, 1H, H-8), 5.03-5.00 (m, 2H, H-5''), 4.62-4.59 (m, 1H, H-2'), 4.17-4.13 (m, 1H, H-4'), 4.04-4.00 (m, 1H, H-5'), 3.97-3.89 (m, 2H, H-3', H-5'), 2.58-2.54 (m, 2H, H-b), 1.87-1.76 (m, 2H, H-10), 1.62 (pseudo-p, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 2H, H-c), 1.37-1.21 (m, 22H, H-d, H-e, H-f, H-g, H-h, H-i, H-j, H-k, H-l, H-m, H-n), 1.04-0.96 (m, 3H, H-11), 0.85 (t, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, 3H, H-o). – **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 171.8 (C-a), 149.9 (C-1''), 147.2 (C-2), 134.9 (C-4''), 128.5 (C-3''), 124.3 (C-9), 121.7 (C-2''), 116.6 (C-5), 110.4 (C-8), 101.0 (C-7), 82.7 (C-4'), 74.1 (C-2'), 70.0 (C-3'), 64.8 (C-5''), 64.5 (C-5'), 33.3 (C-b), 29.0, 29.0, 28.9, 28.7, 28.7, 28.4 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k, C-l, C-m, C-n), 24.2 (C-c), 22.1 (C-d, C-e, C-f, C-g, C-h, C-i, C-j, C-k, C-l, C-m, C-n), 18.1 (C-10), 14.0 (C-o), 6.5

(C-11). – $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 23.40 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 25.3$ Hz, P_β), -11.76 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 25.3$ Hz, P_α). – **HRMS** (ESI $^-$, m/z): ber.: 792.3142 [M-H] $^-$, gef.: 792.3144 [M-H] $^-$.

7.3.8 Synthesen zur Darstellung von 7-Deazaadenosindiphosphatribose 62

Synthese von Bis-O-(9H-fluoren-9-ylmethyl-N,N-diisopropylaminophosphoramidit 77

Die Synthese wurde entsprechend der Literatur nach PAHNKE UND MEIER durchgeführt.^[193]

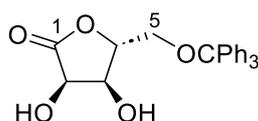


Summenformel: $\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{NO}_2\text{P}$
Molekulargewicht: 521.6408 g/mol

Ausbeute: 9.5 g (18 mmol, 83 %) eines gelblichen Harzes. – Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[193]

Synthese von 5-O-Trityl-D-ribo-1,4-lacton 71

Die Synthese wurde entsprechend der Literatur nach DROWN *et al.* durchgeführt.^[139]

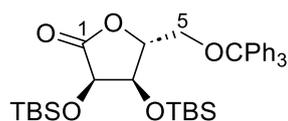


Summenformel: $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{O}_5$
Molekulargewicht: 390.4350 g/mol

Ausbeute: 4.6 g (12 mmol, 81 %) einer farblosen Wasse. – Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[139] – **Weitere Analytik: ATR-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3410, 3058, 2929, 1781, 1490, 1447, 1176, 1137, 1088, 1032, 994, 948, 927, 745, 696, 631, 566, 465.

Synthese von 2,3-bis-O-tert-Butyldimethylsilyl-5-O-trityl-D-ribo-1,4-lacton 70

Die Synthese wurde entsprechend der Literatur nach DROWN *et al.* durchgeführt.^[139]

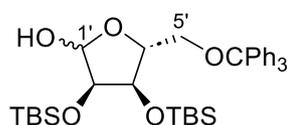


Summenformel: $C_{36}H_{50}O_5Si_2$
Molekulargewicht: 618.9610 g/mol

Ausbeute: 1.3 g (2.1 mmol, 90 %) einer farblosen Watte. – Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[139] – **Weitere Analytik:** ATR-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2929, 2856, 1794, 1491, 1471, 1449, 1389, 1251, 1168, 1105, 1032, 1001, 953, 938, 890, 833, 776, 745, 704, 671, 653, 631, 553, 534, 400.

Synthese von 2',3'-bis-O-tert-Butyldimethylsilyl-5'-O-trityl-D-ribose 69

Die Synthese wurde entsprechend der Literatur nach DROWN *et al.* durchgeführt.^[139]

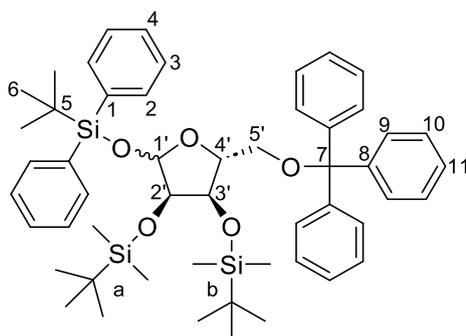


Summenformel: $C_{36}H_{52}O_5Si_2$
Molekulargewicht: 620.9770 g/mol

Ausbeute: 3.7 g (6.0 mmol, 95 %) einer farblosen Watte. – Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[139] – **Weitere Analytik:** ATR-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2928, 2856, 2471, 1448, 1252, 1159, 1080, 1004, 921, 899, 834, 774, 745, 701, 631, 567, 503, 398.

Synthese von 2',3'-bis-O-tert-Butyldimethylsilyl-1'-O-tert-butylidiphenylsilyl-5'-O-trityl-D-ribose 68

Unter Inertgasatmosphäre wurden 0.95 g (1.5 mmol, 1.0 Äquiv.) der Ribose **69**, 0.26 g (3.8 mmol, 2.5 Äquiv.) Imidazol und 1.3 g (4.7 mmol, 3.0 Äquiv.) TBDPSCI in 20 mL abs. DMF gelöst und für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit Diethylether verdünnt und eine ges. Ammoniumchloridlösung hinzugegeben. Die organische Phase wurde dreimal mit einer ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und einmal mit einer ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 50:1 → 10:1 v/v) gereinigt.



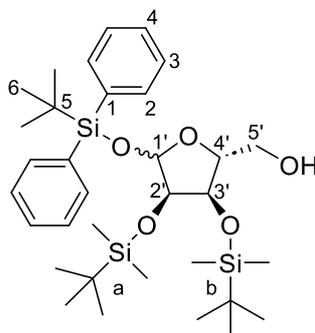
Summenformel: C₅₂H₇₀O₅Si₃
 Molekulargewicht: 859.3820 g/mol

Ausbeute: 0.84 g (0.97 mmol, 64 %) einer farblosen Watte. – **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.83-7.76 (m, 2H, H-2), 7.69-7.65 (m, 2H, H-2), 7.58-7.52 (m, 6H, H-9), 7.45-7.40 (m, 2H, H-4), 7.39-7.33 (m, 4H, H-3), 7.28-7.21 (m, 6H, H-10), 7.21-7.15 (m, 3H, H-11), 5.14 (s, 1H, H-1'), 4.36 (dd, ³J_{H,H} = 8.5 Hz, ⁴J_{H,H} = 3.6 Hz, 1H, H-3'), 4.18-4.09 (m, 1H, H-4'), 3.77 (d, ⁴J_{H,H} = 3.5 Hz, 1H, H-2'), 3.41 (dd, ²J_{H,H} = 10.1 Hz, ⁴J_{H,H} = 2.0 Hz, 1H, H-5'), 3.13 (dd, ²J_{H,H} = 10.1 Hz, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, 1H, H-5'), 1.00 (s, 9H, H-6), 0.75 (s, C(CH₃)₃-a), 0.74 (s, 9H, C(CH₃)₃-b), -0.04 (s, 3H, Si(CH₃)₂-a), -0.14 (s, 3H, Si(CH₃)₂-a), -0.16 (s, 3H, Si(CH₃)₂-b), -0.42 (s, 3H, Si(CH₃)₂-b). – **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 144.3 (C-8), 135.9, 135.7 (C-2), 134.1, 132.9 (C-1), 130.0, 129.9 (C-4), 129.0 (C-9), 128.0 (C-3), 127.8 (C-10), 126.9 (C-11), 102.1 (C-1'), 86.5 (C-7), 80.6 (C-4'), 77.8 (C-2'), 72.1 (C-3'), 65.4 (C-5'), 26.9 (C-6), 26.0 (C(CH₃)₃-a), 25.9 (C(CH₃)₃-b), 19.3 (C-5), 18.2 (C(CH₃)₃-a), 18.0 (C(CH₃)₃-b), -4.0, -4.6, -4.9, -5.0 (Si(CH₃)₂-a, Si(CH₃)₂-b). – **ATR-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2928, 2893, 2856, 1472, 1462, 1448, 1428, 1252, 1156, 1094, 1055, 1024, 996, 958, 939, 899, 872, 832, 774, 743, 699, 671, 642, 632, 612, 503, 487. – **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 881.4423 [M+Na]⁺, gef.: 881.4421 [M+Na]⁺.

Synthese von 2',3'-Bis-O-tert-Butyldimethylsilyl-1'-O-tert-butylidiphenylsilyl-D-ribose 67

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.25 g (0.29 mmol, 1.0 Äquiv. der Ribose **68** in 2.6 mL abs. CH₂Cl₂ gelöst und anschließend 0.16 mL (1.2 mmol, 4.0 Äquiv.) TFAA gelöst in 0.54 mL abs. CH₂Cl₂ bei Raumtemperatur hinzugegeben. Danach wurden 0.067 mL (0.90 mmol, 3.0 Äquiv.) TFA gelöst in 2 mL abs. CH₂Cl₂ ebenfalls zum Reaktionsgemisch zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 25 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und dann durch Zugabe von 0.52 mL (3.8 mmol, 13 Äquiv.) Triethylamin und 1.1 mL Methanol neutralisiert. Es wurde für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt und das Gemisch anschließend in eine ges. Ammoniumchloridlösung gegeben. Es wurde dreimal

mit CH₂Cl₂ extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 15:1 v/v) gereinigt.



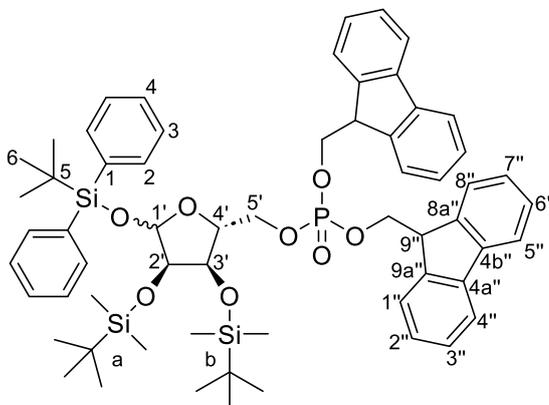
Summenformel: C₃₃H₅₆O₅Si₃
Molekulargewicht: 617.0610 g/mol

Ausbeute: 0.096 g (0.16 mmol, 53 %) einer farblosen Watte. – **¹H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.72-7.67 (m, 2H, H-2), 7.65-7.60 (m, 2H, H-2), 7.48-7.41 (m, 3H, H-3, H-4), 7.41-7.35 (m, 3H, H-3, H-4), 5.04 (s, 1H, H-1'), 4.60 (dd, ³J_{H,H} = 8.3 Hz, ⁴J_{H,H} = 3.8 Hz, 1H, H-3'), 4.03 (ddd, ³J_{H,H} = 8.3 Hz, ³J_{H,H} = 2.5 Hz, ³J_{H,H} = 2.5 Hz, 1H, H-4'), 3.86 (dd, ²J_{H,H} = 12.1 Hz, ³J_{H,H} = 2.5 Hz, 1H, H-5'), 3.78 (d, ⁴J_{H,H} = 3.6 Hz, 1H, H-2'), 3.60 (dd, ²J_{H,H} = 12.2 Hz, ³J_{H,H} = 2.5 Hz, 1H, H-5'), 1.07 (s, 9H, H-6), 0.91 (s, 9H, C(CH₃)₃-a), 0.75 (s, 9H, C(CH₃)₃-b), 0.14 (s, 3H, Si(CH₃)₂-a), 0.10 (s, 3H, Si(CH₃)₂-a), -0.11 (s, 3H, Si(CH₃)₂-b), -0.34 (s, 3H, Si(CH₃)₂-b). – **¹³C-NMR** (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 135.7 135.8 (C-2), 133.3, 132.6 (C-1), 128.1, 128.1 (C-3, C-4), 130.3, 130.2 (C-3, C-4), 101.8 (C-1'), 82.0 (C-4'), 78.2 (C-2'), 70.3 (C-3'), 60.8 (C-5'), 26.9 (C-6), 26.1 (C(CH₃)₃-a), 25.8 (C(CH₃)₃-b), 19.2 (C-5), 18.3 (C(CH₃)₃-a), 18.1 (C(CH₃)₃-b), -4.1, -4.2, -4.7, -4.8 (Si(CH₃)₂-a, Si(CH₃)₂-b). – **ATR-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2953, 2929, 2894, 2857, 1472, 1463, 1428, 1390, 1362, 1253, 1206, 1188, 1162, 1136, 1102, 1082, 1021, 993, 945, 924, 874, 829, 774, 739, 700, 672, 612, 504, 487. – **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 639.3328 [M+Na]⁺, gef.: 639.3326 [M+Na]⁺.

Synthese von Bis-O-(9H-fluoren-9-ylmethyl)-2',3'-bis-O-tert-butyl dimethylsilyl-1'-O-tert-butyl diphenylsilyl-D-ribose-5'-monophosphat **66**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 0.090 g (0.14 mmol, 1.0 Äquiv.) der Ribose **67** und 0.093 g (0.18 mmol, 1.2 Äquiv.) Bis-O-(9H-fluoren-9-ylmethyl)-N,N-diisopropylaminophosphoramidit **77** in 2.9 mL abs. Dichlormethan gelöst und 1.2 mL 4,5-Dicyanoimidazol hinzugegeben. Die Reaktion wurde für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 0.15 mL (1.4 mmol, 7.8 Äquiv.) tert-Butylhydroperoxid portionsweise bei 0°C hinzugegeben und es wurde für eine weitere

Stunde gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit demin. Wasser versetzt, dreimal mit Dichlormethan extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 20:1 v/v) gereinigt.



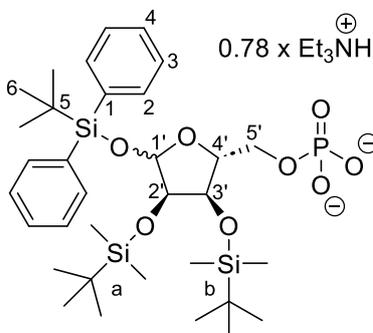
Summenformel: $C_{61}H_{77}O_8PSi_3$
 Molekulargewicht: 1053.5078 g/mol

Ausbeute: 0.15 g (0.14 mmol, 98 %) einer farblosen Watte. – **1H -NMR** (600 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.74-7.65 (m, 6H, H-4'', H-5'', H-2), 7.61-7.58 (m, 2H, H-2), 7.51-7.42 (m, 4H, H-3), 7.41-7.26 (m, 10H, H-4, H-1'', H-3'', H-6'', H-8''), 7.24-7.16 (m, 4H, H-2'', H-7''), 5.01 (s, 1H, H-1'), 4.38-4.34 (m, 1H, H-3'), 4.34-4.28 (m, 1H, H-5'), 4.28-4.17 (m, Fm- CH_2), 4.17-4.05 (m, 4H, H-4', H-5', H-9''), 3.82 (d, $^4J_{H,H} = 3.6$ Hz, 1H, H-2'), 1.01 (s, 9H, H-6), 0.89 (s, 9H, $C(CH_3)_3$ -a), 0.74 (s, 9H, $C(CH_3)_3$ -b), 0.10 (s, 3H, $Si(CH_3)_2$ -a), 0.09 (s, 3H, $Si(CH_3)_2$ -a), -0.09 (s, 3H, $Si(CH_3)_2$ -b), -0.34 (s, 3H, $Si(CH_3)_2$ -b). – **^{13}C -NMR** (151 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 143.3, 143.2 (C-4'', C-4b''), 141.9, 141.5 (C-8a'', C-9a''), 135.9, 135.7 (C-2), 133.4, 132.8 (C-1), 130.1 (C-4), 130.1, 130.0, 128.0, 127.9, 127.8 (C-1'', C-3'', C-6'', C-8''), 127.2, (C-2'' oder C-7''), 125.5, 125.4 (C-3), 120.1, 120.0 (C-4'', C-5''), 102.0 (C-1'), 79.7 (C-4'), 77.8 (C-2), 72.1 (C-3'), 69.4 (d, $^2J_{C,P} = 7.8$ Hz, Fm- CH_2), 68.9 (d, $^2J_{C,P} = 5.3$ Hz, C-5'), 48.0 (C-9''), 26.9 (C-6), 26.1 ($C(CH_3)_3$ -a), 25.8 ($C(CH_3)_3$ -b), -4.1, -4.5 ($Si(CH_3)_2$ -a), -4.6, -4.8, ($Si(CH_3)_2$ -b). – **^{31}P -NMR** (243 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = -1.35. – **ATR-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3069, 2952, 2929, 2893, 2856, 1472, 1462, 1449, 1428, 1389, 1361, 1253, 1227, 1189, 1165, 1105, 1076, 1018, 975, 939, 869, 836, 775, 756, 737, 701, 671, 646, 620, 612, 592, 551, 503, 425. – **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 1075.4556 [M+Na]⁺, gef.: 1075.4556 [M+Na]⁺.

Synthese von 2',3'-Bis-O-tert-butyl dimethylsilyl-1'-O-tert-butyl diphenylsilyl-D-ribose-5'-monophosphat **65** als Triethylammoniumsalz

Unter Inertgasatmosphäre wurden 0.15 g (0.14 mmol, 1.0 Äquiv.) des Fm-geschützten Phosphats **66** in 1 mL Acetonitril gelöst und anschließend 0.25 mL Triethylamin zugetropft

(CH₃CN/Et₃N 4:1 v/v). Das Reaktionsgemisch wurde für 42 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurden die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt und dreimal mit Toluol coevaporiert. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-40 min, Flussrate 20 mL/min).



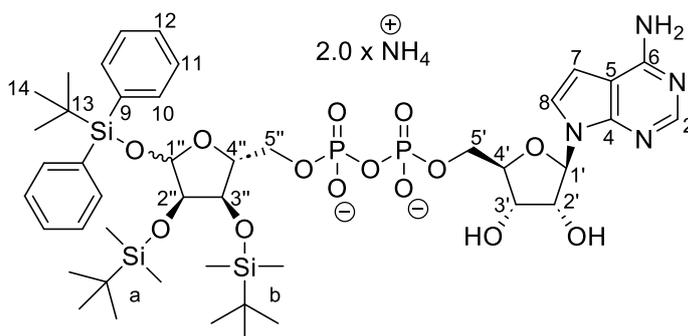
Summenformel: C₃₃H₅₅O₈PSi₃²⁻
Molekulargewicht: 774.1159 g/mol

Ausbeute: 0.038 g (0.049 mmol, 34 %) einer farblosen Watte. – **¹H-NMR** (600 MHz, CD₃CN): δ [ppm] = 7.77-7.71 (m, 2H, H-2), 7.67-7.63 (m, 2H, H-2), 7.48-7.37 (m, 6H, H-3, H-4), 5.00 (pseudo-s, 1H, H-1'), 4.33 (dd, ³J_{H,H} = 7.8 Hz, ⁴J_{H,H} = 3.8 Hz, 1H, H-3'), 4.13-4.07 (m, 1H, H-5'), 3.97 (ddd, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, ⁴J_{H,H} = 2.7 Hz, 1H, H-4'), 3.94 (d, ⁴J_{H,H} = 3.6 Hz, 1H, H-2'), 3.90-3.86 (m, 1H, H-5'), 1.04 (s, 9H, H-6), 0.91 (s, 9H, C(CH₃)₃-a), 0.77 (s, 9H, C(CH₃)₃-b), 0.15 (s, 3H, Si(CH₃)₂-a), 0.12 (s, 3H, Si(CH₃)₂-a), -0.03 (s, 3H, Si(CH₃)₂-b), -0.23 (s, 3H, Si(CH₃)₂-b). – **¹³C-NMR** (151 MHz, CD₃CN): δ [ppm] = 136.8, 136.6 (C-2), 134.3, 134.0 (C-1), 131.0, 130.8, 128.9, 128.8 (C-3, C-4), 102.8 (C-1'), 82.0 (C-4'), 78.8 (C-2'), 73.6 (C-3'), 67.8 (C-5'), 27.2 (C-6), 26.4 (C(CH₃)₃-a), 26.1 (C(CH₃)₃-b), 19.7 (C-5), 18.8 (C(CH₃)₃-a), 18.6 (C(CH₃)₃-b). – **³¹P-NMR** (202 MHz, CD₃CN): δ [ppm] = -0.86. – **ATR-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2952, 2929, 2891, 2857, 1472, 1462, 1428, 1390, 1361, 1252, 1224, 1163, 1094, 1047, 1024, 1004, 974, 939, 871, 833, 773, 738, 700, 612, 503, 487. – **HRMS** (ESI⁻, m/z): ber.: 695.3026 [M-H]⁻, gef.: 695.2806 [M-H]⁻.

Synthese von 7-Deazaadenosindiphosphat-2',3'-Bis-O-tert-butylidimethylsilyl-1'-O-tert-butylidiphenylsilyl-ribose **63** als Ammoniumsalz

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 23 mg (0.060 mmol, 1.0 Äquiv.) 7-Deazaadenosinmonophosphat **64** in 2.3 mL abs. Acetonitril suspendiert und 0.13 mL (1.0 mmol, 16 Äquiv.) abs. Triethylamin sowie 0.08 mL (0.60 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid, gelöst in 2.3 mL abs. Acetonitril, tropfenweise zugegeben. Der Rückstand wurde in 2.3 mL abs. Acetonitril aufgenommen und mit 0.080 mL (0.60 mmol,

10 Äquiv.) abs. Triethylamin, 0.030 mL (0.36 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol sowie 37 mg (0.048 mmol, 0.80 Äquiv.) des Monophosphats **65**, gelöst in 4 mL abs. Acetonitril, versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für sieben Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt. Anschließend erfolgte eine Überführung in die Ammoniumform mittels Ionenaustauscherharz gefolgt von einer automatisierten Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min).



Summenformel: C₄₄H₆₈N₄O₁₄P₂Si₃²⁻

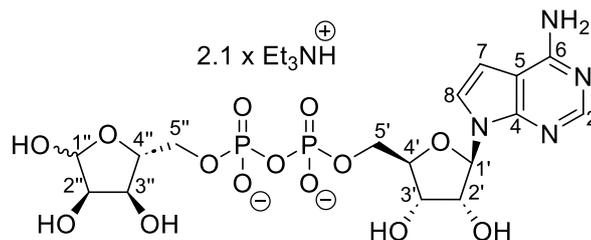
Molekulargewicht: 1077.3656 g/mol

Ausbeute: 29 mg (0.027 mmol, 56 %) einer farblosen Watte als Gemisch aus zwei Diastereomeren. Es konnten nicht alle ¹³C-Signale zugeordnet werden, aufgrund von zu geringen Signalintensitäten. Teilweise wurden die ¹³C-NMR-Signalverschiebungen aus den 2D-NMR-Spektren (HSQC, HMBC) entnommen.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 8.08-8.03 (m, 1H, H-2), 7.72-7.66 (m, 2H, H-10), 7.62-7.57 (m, 2H, H-10), 7.50-7.37 (m, 6H, H-11, H-12), 6.68-6.63 (m, 1H, H-7 od. H-8), 6.10-6.04 (m, 1H, H7 od. H-8), 5.34-5.29 (m, 1H, H-1'), 4.92 (pseudo-s, 1H, H-1''), 4.35-4.27 (m, 2H, H-2', H-3''), 4.22-4.09 (m, 2H, H-3', H-5''), 4.06-3.98 (m, 3H, H-5', H-4''), 3.93-3.84 (m, 3H, H-4', H-2'', H-5''), 1.00 (s, 9H, H-14), 0.87 (s, 9H, C(CH₃)₃-a), 0.74 (s, 9H, C(CH₃)₃-b), 0.11 (s, 3H, Si(CH₃)₂-a), 0.08 (s, 3H, Si(CH₃)₂-a), -0.07 (s, 3H, Si(CH₃)₂-b), -0.26 (s, 3H, Si(CH₃)₂-b). – **¹³C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 141.6 (C-2), 136.0, 135.2 (C-10), 128.4 (C-11, C-12), 100.7 (C-1''), 84.3 (C-4''), 79.4 (C-3'), 77.3 (C-4', C-2''), 75.9, 71.8 (C-2', C-3''), 67.2 (C-5''), 61.3 (C-5'), 26.5 (C-14), 25.8 (C(CH₃)₃-a), 25.5 (C(CH₃)₃-b), 18.5 (C-13), 18.0 (C(CH₃)₃-a), 17.8 (C(CH₃)₃-b), -4.9 (Si(CH₃)₂-a), -5.2, (Si(CH₃)₂-b) – **³¹P-NMR** (243 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = -10.70. – **HRMS** (ESI⁻, m/z): ber.: 1023.3599 [M-H]⁻, gef.: 1023.3597 [M-H]⁻.

Synthese von 7-Deazaadenosindiphosphatribose 62 als Triethylammoniumsalz

Die Reaktion wurde nach der **AAV 5** durchgeführt. Es wurden 25 mg (0.023 mmol, 1.0 Äquiv.) des geschützten ADPR-Derivats **63**, 1 mL abs. Tetrahydrofuran und 1.4 mL (0.42 mmol, 36 Äquiv.) Triethylamin-Trihydrofluorid verwendet. Das Reaktionsgemisch wurde für 22 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Zugabe von 4 mL eines 1.0 M TEAB-Puffers wurde das Rohprodukt dreimal mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel (0.050 M TEAB-Puffer/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-40 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt.



Summenformel: C₁₆H₂₂N₄O₁₄P₂²⁻
Molekulargewicht: 765.8256 g/mol

Ausbeute: 12 mg (0.010 mmol, 39 %) einer farblosen Watte als Gemisch aus zwei Diastereomeren. Es konnten nicht alle ¹³C-Signale zugeordnet werden, aufgrund von zu geringen Signalintensitäten. Teilweise wurden die ¹³C-NMR-Signalverschiebungen aus den 2D-NMR-Spektren (HSQC, HMBC) entnommen.

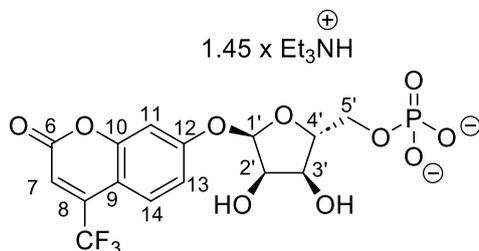
¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm] = 8.31 (s, 1H, H-2), 7.79 (d, ⁴J_{H,H} = 3.8 Hz, 1H, H-7 od. H-8), 6.96 (d, ⁴J_{H,H} = 3.8 Hz, 1H, H-7 od. H-8), 6.36 (d, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, 1H, H-1'), 5.37-5.22 (m, 1H, H-1''), 4.75-4.70 (m, 2H, H-2', H-3''), 4.57-4.53 (m, 1H, H-3'), 4.43-4.39 (m, 1H, H-4'), 4.34-4.30 (m, 1H, H-4''), 4.26-4.19 (m, 2H, H-5'), 4.17-4.02 (m, 3H, H-2'', H-5''). –
¹³C-NMR (101 MHz, D₂O): δ [ppm] = 135.1 (C-2), 124.5 (C-7 od. C-8), 103.0 (C-7 od. C-8), 86.6 (C-1'), 84.4 (C-4'), 81.1 (C-4''), 74.8 (C-2''), 74.4 (C-2', C-3''), 70.4 (C-3'), 65.2 (C-5'). –
³¹P-NMR (162 MHz, D₂O): δ [ppm] = -11.21, -11.42, -11.56. – **HRMS** (ESI⁻, m/z): ber.: 557.0691 [M-H]⁻, gef.: 557.0691 [M-H]⁻.

7.3.9 Synthesen zur Darstellung von α -1-O-(4-(Trifluormethyl)umbellifer-7-yl)-Adenosindiphosphatribose 80

Synthese von 4-(Trifluormethyl)umbellifer-7-yl- α -D-ribose-5'-monophosphat 86 als Triethylammoniumsalz

Die Reaktion wurde nach der **AAV 5** durchgeführt. Es wurden 35 mg (0.047 mmol, 1.0 Äquiv.) des geschützten Nucleotids **82**, 2 mL abs. Tetrahydrofuran und 0.48 mL

(0.28 mmol, 6.0 Äquiv.) Triethylamin-Trihydrofluorid verwendet. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Zugabe von 2 mL eines 1.0 M TEAB-Puffers wurde das Rohprodukt mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel (0.050 M TEAB-Puffer/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-40 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt.



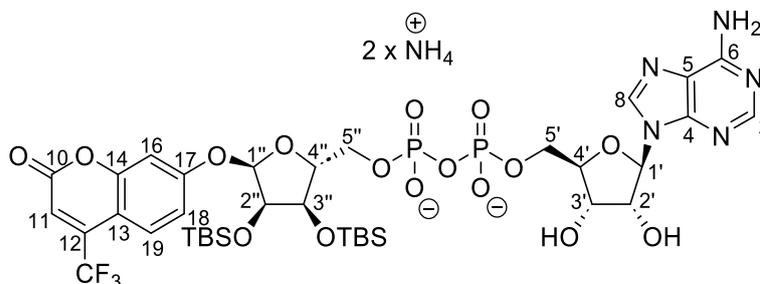
Summenformel: C₁₅H₁₄F₃O₁₀P²⁻
Molekulargewicht: 589.7130 g/mol

Ausbeute: 22 mg (0.038 mmol, 80 %) einer farblosen Watte. – **¹H-NMR** (600 MHz, Methanol-*d*₄): δ [ppm] = 7.71-7.65 (m, 1H, H-14), 7.23-7.18 (m, 2H, H-11, H-13), 6.73 (s, 1H, H-7), 5.79 (d, ⁴J_{H,H} = 4.5 ppm, 1H, H-1'), 4.37 (dd, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, ⁴J_{H,H} = 4.5 Hz, 1H, H-2'), 4.28-4.24 (m, 1H, H-4'), 4.23 (dd, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, ⁴J_{H,H} = 2.7 Hz, 1H, H-3'), 4.02-3.94 (m, 2H, H-5'). – **¹³C-NMR** (151 MHz, Methanol-*d*₄): δ [ppm] = 162.7 (C-9), 160.8 (C-6), 157.3 (C-10), 142.2 (d, ²J_{C,F} = 32.8 Hz, C-8), 127.2 (d, ⁴J_{C,F} = 2.4 Hz, C-14), 124.1 (q, ¹J_{C,F} = 247.8 Hz, CF₃), 116.1 (C-11 oder C-13), 114.1 (q, ³J_{C,F} = 6.0 Hz, C-7), 108.9 (C-12), 105.7 (C-11 oder C-13), 102.1 (C-1'), 87.0 (d, ³J_{C,P} = 8.8 Hz, C-4'), 73.2 (C-2'), 71.3 (C-3'), 66.2 (d, ²J_{C,P} = 5.1 Hz, C-5'). – **³¹P-NMR** (243 MHz, Methanol-*d*₄): δ [ppm] = 0.80. – **¹⁹F-NMR** (564 MHz, Methanol-*d*₄): δ [ppm] = -66.04. – **ATR-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2937.4, 1738.8, 1612.4, 1509.9, 1405.8, 1274.8, 1134.1, 1038.0, 1003.1, 934.1, 871.0, 806.6, 724.0, 648.5, 491.8, 401.9. – **HRMS** (ESI⁻, m/z): ber.: 441.0204 [M-H]⁻, gef.: 441.0219 [M-H]⁻.

Synthese von α -1''-O-(4-(Trifluormethyl)umbellifer-7-yl)2'',3''-O-bis(tert-butylidimethylsilyl)-Adenosindiphosphat-ribose **85** als Ammoniumsalz

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 67 mg (0.14 mmol, 1.2 Äquiv.) Adenosinmonophosphat **16** in 6.7 mL abs. Acetonitril suspendiert und 0.26 mL (1.9 mmol, 16 Äquiv.) abs. Triethylamin sowie 0.16 mL (1.2 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid, gelöst in 6.7 mL abs. Acetonitril, tropfenweise zugegeben. Der Rückstand wurde in 6.7 mL abs. Acetonitril aufgenommen und mit 0.16 mL (1.2 mmol, 10 Äquiv.) abs. Triethylamin, 0.060 mL (0.70 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol sowie 84 mg (0.12 mmol, 1.0 Äquiv.) des Monophosphats **82**, gelöst in 8.4 mL abs. Acetonitril, versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für sieben Stunden bei Raumtemperatur gerührt

und anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt. Anschließend erfolgte jeweils eine Überführung in die Ammonium- und Triethylammoniumform mittels Ionenaustauscherharz gefolgt von einer automatisierten Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min).



Summenformel: C₃₇H₅₄F₃N₅O₁₆P₂Si₂²⁻

Molekulargewicht: 1034.0328 g/mol

Ausbeute: 61 mg (0.059 mmol, 51 %) einer farblosen Watte. – **¹H-NMR** (600 MHz, Methanol-*d*₄): δ [ppm] = 8.62 (s, 1H, H-8), 8.24 (s, 1H, H-2), 7.65 (d, ³J_{H,H} = 8.9 Hz, 1H, H-19), 7.11-7.04 (m, 2H, H-16, H-18), 6.68 (s, 1H, H-11), 6.05 (d, ³J_{H,H} = 4.9 Hz, 1H, H-1'), 5.73 (d, ³J_{H,H} = 4.5 Hz, 1H, H-1''), 4.60-4.53 (m, 1H, H-2'), 4.48 (t, ³J_{H,H} = 4.6 Hz, 1H, H-3'), 4.42-4.37 (m, 1H, H-2''), 4.36-4.30 (m, 2H, H-4', H-3''), 4.29-4.26 (m, 1H, H-4''), 4.24-4.20 (m, 1H, H-5''), 4.18-4.08 (m, 3H, H-5', H-5''), 0.93 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.91 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.14 (s, 3H, Si(CH₃)₂), 0.12-0.10 (m, 6H, Si(CH₃)₂), 0.09 (s, 3H, Si(CH₃)₂). – **¹³C-NMR** (151 MHz, Methanol-*d*₄): δ [ppm] = 156.3 (C-2), 148.6 (C-4), 141.7 (C-8), 127.1 (C-19), 118.4 (C-5), 115.6 (C-16 oder C-18), 113.6 (C-11), 105.0 (C-16 oder C-18), 101.3 (C-1''), 89.3 (C-1'), 87.4 (C-5''), 85.2 (C-4''), 76.1 (C-2'), 74.3 (C-2''), 73.0 (C-4' oder C-3''), 70.9 (C-3'), 66.8, 66.8 (C-5', C-5''), 65.9 (C-4' oder C-3''), 26.5, 26.5 (C(CH₃)₃), -4.7, -4.8, -4.8 (Si(CH₃)₂). – **³¹P-NMR** (243 MHz, Methanol-*d*₄): δ [ppm] = -11.06. – **¹⁹F-NMR** (564 MHz, Methanol-*d*₄): δ [ppm] = -66.04. – **ATR-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2930.3, 2856.8, 1739.1, 1693.3, 1612.5, 1407.9, 1274.9, 1194.2, 1171.0, 1141.2, 1100.8, 1047.6, 1007.1, 934.7, 905.5, 838.8, 820.3, 777.2, 647.5, 512.1, 501.8, 457.0. – **HRMS** (ESI⁻, m/z): ber.: 998.2459 [M-H]⁻, gef.: 998.0826 [M-H]⁻.

Synthese von α -1''-O-(4-(Trifluormethyl)jumbellifer-7-yl)-Adenosindiphosphat-ribose 80 als Triethylammoniumsalz

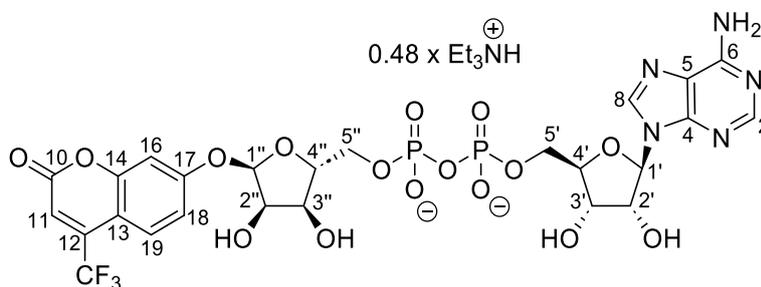
Synthese 1:

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 17 mg (0.036 mmol, 1.5 Äquiv.) Adenosinmonophosphat **16** in 1.7 mL abs. Acetonitril suspendiert und 0.060 mL (0.38 mmol, 16 Äquiv.) abs. Triethylamin sowie 0.030 mL (0.24 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid, gelöst in 1.7 mL abs. Acetonitril, tropfenweise zugegeben. Der Rückstand wurde in 1.7 mL abs. Acetonitril aufgenommen und mit 0.030 mL (0.24 mmol, 10 Äquiv.) abs. Triethylamin, 0.010 mL (0.14 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol sowie 14 mg (0.024 mmol, 1.0 Äquiv.) des Monophosphats **86**, gelöst in 1.4 mL abs. Acetonitril, versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für sechs Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt. Anschließend erfolgte jeweils eine Überführung in die Ammonium- und Triethylammoniumform mittels Ionenaustauscherharz gefolgt von einer automatisierten Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min).

Ausbeute: 15 mg (0.019 mmol, 80 %) einer farblosen Watte.

Synthese 2:

Die Reaktion wurde nach der **AAV 5** durchgeführt. Es wurden 31 mg (0.030 mmol, 1.0 Äquiv.) des geschützten Nucleotids **85**, 1 mL abs. Tetrahydrofuran und 0.29 mL (0.18 mmol, 6.0 Äquiv.) Triethylamin-Trihydrofluorid verwendet. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Zugabe von 2 mL eines 1.0 M TEAB-Puffers wurde das Rohprodukt mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel (0.050 M TEAB-Puffer/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-40 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt.



Summenformel: C₂₅H₂₆F₃N₅O₁₆P₂²⁻

Molekulargewicht: 820.0305 g/mol

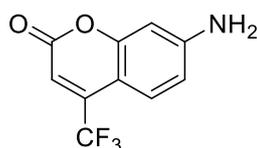
Ausbeute: 18 mg (0.022 mmol, 72 %) einer farblosen Watte. – ¹H-NMR (600 MHz, Methanol-d₄): δ [ppm] = 8.57 (s, 1H, H-8), 8.17 (s, 1H, H-2), 7.66-7.63 (m, 1H, H-19), 7.17-

7.14 (s, 2H, H-16, H-18), 6.71 (s, 1H, H-11), 6.09 (d, $^3J_{H,H} = 5.7$ Hz, 1H, H-1'), 5.76 (d, $^3J_{H,H} = 4.4$ Hz, 1H, H-1''), 4.70 (t, $^3J_{H,H} = 5.4$ Hz, 1H, H-2'), 4.50 (dd, $^3J_{H,H} = 5.1$ Hz, $^4J_{H,H} = 3.2$ Hz, 1H, H-3'), 4.40 (dd, $^3J_{H,H} = 6.4$ Hz, $^3J_{H,H} = 4.4$ Hz, 1H, H-2''), 4.33 (dd, $^3J_{H,H} = 6.4$ Hz, $^4J_{H,H} = 2.7$ Hz, 1H, H-3''), 4.30-4.24 (m, 3H, H-4', H-4'', H-5''), 4.20-4.10 (m, 3H, H-5', H-5''). – **$^{13}\text{C-NMR}$** (151 MHz, Methanol- d_4): δ [ppm] = 162.2 (C-13), 160.9 (C-10), 157.2 (C-6), 153.8 (C-2), 150.9 (C-4), 142.3 (d, $^2J_{C,F} = 32$ Hz, C-12), 141.2 (C-8), 127.2 (C-19), 120.1 (C-5), 116.0 (C-16 od. C-18), 114.1 (q, $^3J_{C,F} = 5.7$ Hz, C-11), 108.8 (C-14), 105.7 (C-16 ode. C-18), 102.1 (C-1''), 88.9 (C-1'), 86.9 (d, $^3J_{C,P} = 8.2$ Hz, C-4' od. C-4''), 85.7 (d, $^3J_{C,P} = 8.5$ Hz, C-4' od. C-4''), 76.2 (C-2'), 73.1 (C-2''), 72.0 (C-3'), 71.3 (C-3''), 66.9 (d, $^2J_{C,P} = 5.3$ Hz, C-5'), 66.5 (d, $^2J_{C,P} = 5.2$ Hz, C-5''). – **$^{31}\text{P-NMR}$** (243 MHz, Methanol- d_4): δ [ppm] = -11.25 (d, $^2J_{P,P} = 22.0$ Hz), -11.42 (d, $^2J_{P,P} = 22.3$ Hz). – **$^{19}\text{F-NMR}$** (564 MHz, Methanol- d_4): δ [ppm] = -66.02. – **ATR-IR**: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3190.4, 1738.6, 1611.4, 1228.1, 1119.9, 1000.0, 979.4, 932.4, 870.6, 799.7, 720.9, 647.9, 553.4, 503.8. – **HRMS** (ESI $^-$, m/z): ber.: 770.0729 [M-H] $^-$, gef.: 770.0569 [M-H] $^-$.

7.3.10 Synthesen zur Darstellung von 7-Amino-4-(trifluormethyl)cumarin-Adenosin-diphosphatribose 87

Synthese von 7-Amino-4-(trifluormethyl)cumarin 88

Die Synthese wurde entsprechend der Literatur nach LI *et al.* durchgeführt.^[182]



Summenformel: $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{F}_3\text{NO}_2$
Molekulargewicht: 229.1582 g/mol

Ausbeute: 2.2 g (9.8 mmol, 53 %) eines gelben Feststoffes. – Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[182]

Syntheseversuch von 1,2-O-Isopropyliden-D-arabinofuranose 102

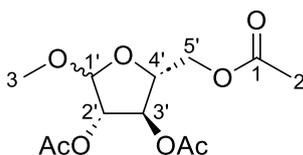
Unter Inertgasatmosphäre wurden 2.0 g (13 mmol, 1.0 Äquiv.) D-Arabinose **98** in 60 mL abs. Aceton suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 0.21 g (1.3 mmol, 0.10 Äquiv.) Kupfersulfat hinzugegeben und langsam 2.0 mL (37 mmol, 2.8 Äquiv.) konz. Schwefelsäure zum Reaktionsgemisch zugetropft. Nach Rühren für sechs Stunden bei Raumtemperatur wurde die Suspension filtriert, der Rückstand mit Aceton gewaschen, das

Filtrat mit einer 25 %igen Ammoniaklösung neutralisiert und alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 25 mL einer 0.2 %igen Salzsäurelösung gelöst und für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit einer ges. Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert und die wässrige Phase zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 20:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: Das gewünschte Produkt konnte nicht isoliert werden.

Synthese von 2',3',5'-O-Acetyl-1'-O-methyl-D-arabinofurnaose 107

Die Synthese wurde entsprechend der Literatur nach Li *et al.* durchgeführt.^[181]



Summenformel: C₁₂H₁₈O₈
Molekulargewicht: 290.2680 g/mol

Ausbeute: 1.6 g (5.6 mmol, 83 %) eines farblosen Öls des α- und β-Anomers. –

α-Anomer: ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.19 (dd, ²J_{H,H} = 10.3 Hz, ³J_{H,H} = 3.5 Hz, H-1'), 4.96 (d, ³J_{H,H} = 3.6 Hz, 1H, H-2'), 4.47-4.40 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.18 (dd, ²J_{H,H} = 11.6 Hz, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 1H, H-5'), 4.11 (ddd, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, ³J_{H,H} = 5.2 Hz, ⁴J_{H,H} = 4.2 Hz, 1H, H-5'), 3.38 (s, 3H, H-3), 2.10 (s, 9H, H-2). – ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 170.4 (C-1), 78.9 (C-2'), 75.6 (C-1'), 65.6 (C-5'), 55.6 (C-3), 20.9 (C-2). – **β-Anomer:** ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): 5.37-5.32 (m, 1H, H-1'), 5.08-5.06 (m, 1H, H-2'), 5.00-4.97 (m, 1H, H-3'), 4.47-4.40 (m, 1H, H-5'), 4.26-4.21 (m, 2H, H-4', H-5'), 3.41 (s, 3H, H-3), 2.11 (s, 9H, H-2). – ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): 170.8 (C-1), 81.5 (C-2'), 80.4 (C-4'), 77.0 (C-3'), 75.9 (C-1'), 63.5 (C-5'), 55.2 (C-3), 21.0 (C-2). – **ATR-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2940, 2098, 1738, 1436, 1369, 1213, 1138, 1110, 1041, 1009, 951, 896, 737, 701, 652, 603, 553, 507, 477, 438, 421. – **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 313.0894 [M+Na]⁺, gef.: 313.0891 [M+Na]⁺.

Synthese von 1',2',3',5'-Tetra-O-acetyl-D-arabinofuranose 97

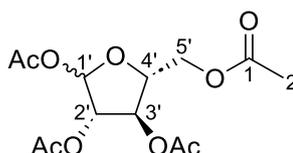
Synthese 1:

Die Synthese wurde entsprechend der Literatur nach Li *et al.* durchgeführt.^[181]

Ausbeute: 1.5 g (4.7 mmol, 70 %) als ein Gemisch aus α - und β -Arabinofuranose sowie α - und β -Arabinopyranose.

Synthese 2:

Die Synthese wurde entsprechend der Literatur nach Li *et al.* durchgeführt.^[181]



Summenformel: C₁₃H₁₈O₉
Molekulargewicht: 318.2780 g/mol

Ausbeute: 4.0 g (13 mmol, 98 %) eines farblosen Feststoffes des α - und β -Anomers. – Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[139] – **Weitere Analytik:** – **ATR-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2943, 1739, 1434, 1369, 1211, 1114, 1038, 1007, 960, 881, 603, 554, 511, 463, 408, 389. – **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 341.0843 [M+Na]⁺, gef.: 341.0840 [M+Na]⁺.

Synthese von 7-Amino-4-(trifluormethyl)cumarin-2',3',5'-tris-O-acetyl-D-arabinofuranosid 96

Synthese 1:

Unter Inertgasatmosphäre wurden 0.17 g (0.75 mmol, 1.2 Äquiv.) des Cumarinderivats **88** in 6 mL abs. CH₃CN suspendiert und 0.61 mL (2.5 mmol, 4.0 Äquiv.) BSA hinzugegeben. Die Suspension wurde auf 40 °C erwärmt und für 25 Minuten gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 0.20 g (0.63 mmol, 1.0 Äquiv.) des Zuckers **97**, gelöst in 2 mL abs. CH₃CN, hinzugegeben. Anschließend erfolgte bei 0 °C die tropfenweise Zugabe von 0.45 mL (2.5 mmol, 4.0 Äquiv.) TMSOTf. Der Reaktionsansatz wurde zunächst für 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf 80 °C erhitzt und für weitere zwei Stunden gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, in eine kalte ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gegeben, zweimal mit CH₂Cl₂ extrahiert, zweimal mit einer ges. Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 1:2 v/v → EtOAc) gereinigt.

Ausbeute: Das gewünschte Produkt konnte nicht isoliert werden.

Synthese 2:

Es wurden 0.20 g (0.63 mmol, 1.0 Äquiv.) des Zuckers **97** in 6 mL Ethanol suspendiert und 0.17 g (0.75 mmol, 1.2 Äquiv.) des Fluoreszenzmarkers **88** sowie 0.070 g (0.31 mmol, 0.5 Äquiv.) InCl_3 hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 14 Minuten in der Mikrowelle (600 Watt) durchgeführt.

Ausbeute: Das gewünschte Produkt konnte nicht isoliert werden.

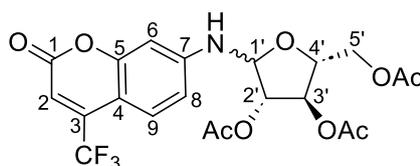
Synthese 3:

Unter Inertgasatmosphäre wurden 0.20 g (0.63 mmol, 1.0 Äquiv.) des Zuckers **97** in 4 mL EtOH/DMF (3:1 v/v) suspendiert und 0.72 g (3.1 mmol, 5.0 Äquiv.) AMC **88** und 6.7 mg (0.13 mmol, 0.20 Äquiv.) Ammoniumchlorid hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für drei Tage bei 105 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktion filtriert und das Filtrat vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 3:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 17 mg (0.036 mmol, 6 %) eines gelben Feststoffes.

Synthese 4:

Es wurden 0.20 g (0.63 mmol, 1.0 Äquiv.) des Zuckers **97** in abs. CH_3CN gelöst und 0.16 g (0.69 mmol, 1.1 Äquiv.) AMC **88** hinzugegeben. Anschließend wurden bei -20 °C 0.69 mL (0.69 mmol, 1.1 Äquiv.) SnCl_4 (1.0 M in CH_2Cl_2) zugetropft. Der Reaktionsansatz wurde für 22 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde eine ges. Natriumhydrogencarbonatlösung zugegeben und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden jeweils einmal mit einer ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und einer ges. Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 2:1 v/v) gereinigt.



Summenformel: $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{NO}_9$
 Molekulargewicht: 487.3842 g/mol

Ausbeute: 0.086 g (0.18 mmol, 28 %) eines gelben Feststoffes des α - und β -Anomers. Zur Vereinfachung wurde nur ein Anomer ausgewertet. – **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.57-7.50 (m, 1H, H-9), 6.82-6.70 (m, 2H, H-6, H-8), 6.56-6.50 (m, 1H, H-2), 5.40 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.1$ Hz, 1H, H-1'), 5.36-5.31 (m, 1H, H-3'), 5.25 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 3.1$ Hz, H-2'), 5.13 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 4.0$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.6$ Hz, 1H, H-4'), 4.39-4.24 (m, 1H, H-5'), 4.21-4.02 (m, 1H, H-5'), 2.16-2.13 (m, 9H, Acetyl-H). – **$^{13}\text{C-NMR}$** (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 170.3, 169.9, 169.4 (Carbonyl-C's), 159.9 (C-1), 156.4 (C-4), 149.4 (C-5), 141.2 (C-3), 126.6 (C-9), 121.9 (CF_3), 112.4 (C-8), 111.1 (C-2), 101.5 (C-6), 87.8 (C-1'), 80.0 (C-2'), 76.6 (C-4'), 75.7 (C-3'), 63.7 (C-5'), 21.0, 20.9, 20.9 (Acetyl- CH_3). – **$^{19}\text{F-NMR}$** (565 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = -64.64. – **ATR-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3360, 3095, 2943, 1727, 1610, 1566, 1531, 1502, 1433, 1412, 1367, 1283, 1214, 1169, 1132, 1044, 972, 955, 861, 815, 725, 670, 652, 628, 602, 552, 521, 475, 448. – **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 510.0982 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺, gef.: 510.0960 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺.

Syntheseversuch von 7-Amino-4-(trifluormethyl)cumarin-arabinofuranosid **95**

Unter Inertgasatmosphäre wurden 0.17 g (0.75 mmol, 1.2 Äquiv.) des Cumarinderivats **88** in 6 mL abs. CH_3CN suspendiert und 0.61 mL (2.5 mmol, 4.0 Äquiv.) BSA hinzugegeben. Die Suspension wurde auf 40 °C erwärmt und für 30 Minuten gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 0.20 g (0.63 mmol, 1.0 Äquiv.) des Zuckers **97**, gelöst in 2 mL abs. CH_3CN , hinzugegeben. Anschließend erfolgte bei 0 °C die tropfenweise Zugabe von 0.45 mL (2.5 mmol, 4.0 Äquiv.) TMSOTf. Der Reaktionsansatz wurde zunächst für 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf 80 °C erhitzt und für weitere vier Stunden gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, in eine kalte ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gegeben, zweimal mit CH_2Cl_2 extrahiert, jeweils zweimal mit einer ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und einer ges. Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 2.5 mL einer 7 N Ammoniaklösung in MeOH gelöst. Der Reaktionsansatz wurde für vier Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10:1 → EtOAc/MeOH 10:1) gereinigt.

Ausbeute: Das gewünschte Produkt konnte nicht isoliert werden.

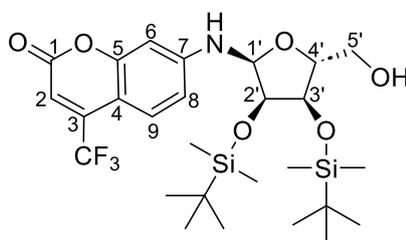
Syntheseversuch von 7-Amino-4-(trifluormethyl)cumarin-2'-3'-bis-O-tert-butylidimethylsilyl-5'-O-trityl-D-ribofuranosid **120**

Unter Inertgasatmosphäre wurden 0.10 g Molekularsieb vorgelegt und 0.50 g (0.81 mmol, 1.0 Äquiv.) der Ribose **69** in 5.8 mL Dimethoxyethan gelöst. Anschließend wurden 0.28 g (1.2 mmol, 1.5 Äquiv.) AMC **88** und 0.32 g (1.2 mmol, 1.5 Äquiv.) Triphenylphosphin dazugegeben. Nachdem der Reaktionsansatz für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt wurde, wurden 0.24 mL (1.2 mmol, 1.5 Äquiv.) DIAD hinzugegeben und für weitere vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Reaktionsgemisch in 70 mL Petrolether gegeben und filtriert. Das Filtrat wurde viermal mit einer ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 5:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: Das gewünschte Produkt konnte nicht isoliert werden.

Synthese von 7-Amino-4-(trifluormethyl)cumarin-2'-3'-bis-O-tert-butylidimethylsilyl- α -D-ribofuranosid **119**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 0.50 g (0.81 mmol, 1.0 Äquiv.) der Ribose **69** in 4 mL abs. THF gelöst und 0.32 g (1.2 mmol, 1.5 Äquiv.) Triphenylphosphin sowie 0.22 g (1.2 mmol, 1.5 Äquiv.) NBS dazugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für fünf Minuten bei -5 °C gerührt und anschließend portionsweise mit 0.47 g (2.0 mmol, 2.5 Äquiv.) AMC **88**, gelöst in 2 mL abs. THF, versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für zwei Stunden bei 80 °C gerührt und danach in 70 mL Petrolether gegeben sowie filtriert. Das Filtrat wurde viermal mit einer ges. Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EtOAc 5:1 v/v) gereinigt.



Summenformel: $C_{27}H_{42}F_3NO_6Si_2$

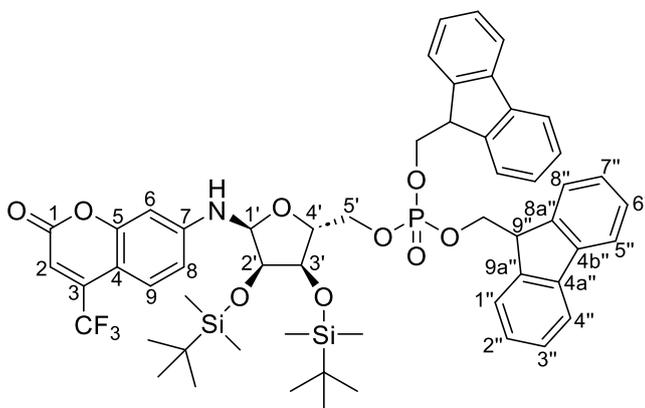
Molekulargewicht: 589.7992 g/mol

Ausbeute: 0.13 g (0.22 mmol, 27 %) eines gelblichen Feststoffes – 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 7.53-7.49 (m, 1H, H-6), 6.74-6.67 (m, 1H, H-8) 6.66-6.63 (m, 1H, H-

9), 6.61 (s, 1H, H-2), 5.14-5.06 (m, 2H, NH, H-1'), 4.11-4.09 (m, 1H, H-3'), 3.92-3.90 (m, 1H, H-2'), 3.67-3.62 (m, 1H, H-4'), 3.51-3.44 (m, 1H, H-5'), 3.27-3.23 (m, 1H, H-5'), 0.99 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.81 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.17 (s, 3H, Si(CH₃)₂), 0.14 (s, 3H, Si(CH₃)₂), 0.09 (s, 3H, Si(CH₃)₂), 0.04 (s, 3H, Si(CH₃)₂). – ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 159.1 (C-1), 156.3 (C-4 od. C-5), 150.7 (C-4 od. C5), 140.2 (C-3), 126.2 (C-6), 111.4 (C-8), 110.0 (C-2), 103.7 (C-7), 98.6 (C-9), 79.7 (C-1'), 75.3 (C-3'), 67.6 (C-2'), 66.0 (C-4'), 57.3 (C-5'), 26.0, 25.7 (C(CH₃)₃), 18.3, 17.8 (C(CH₃)₃), -4.2, -4.5, -4.8 (Si(CH₃)₂).). – ¹³C-NMR (565 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = -63.51. – ATR-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3414, 2954, 2925, 2855, 1737, 1629, 1611, 1555, 1532, 1492, 1462, 1413, 1377, 1363, 1285, 1254, 1198, 1171, 1146, 1081, 1054, 1028, 1005, 970, 941, 919, 882, 838, 780. – HRMS (ESI⁻, m/z): ber.: 588.2430 [M-H]⁻, gef.: 588.2426 [M-H]⁻.

Synthese von Bis-*O*-(9*H*-Fluoren-9-ylmethyl)-7-amino-4-(trifluormethyl)cumarin-2',3'-bis-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl- α -D-ribose-5'-monophosphat **118**

Die Reaktion wurde nach der **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 0.030 g (0.051 mmol, 1.0 Äquiv.) der Ribose **119** und 0.066 g (0.13 mmol, 2.5 Äquiv.) Bis-*O*-(9*H*-fluoren-9-ylmethyl)-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **77** in 2.3 mL abs. Dichlormethan gelöst und 0.64 mL 4,5-Dicyanoimidazol hinzugegeben. Die Reaktion wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 0.010 mL (0.076 mmol, 1.5 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid portionsweise bei 0°C hinzugegeben und es wurde für eine weitere Stunde gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit demin. Wasser versetzt, dreimal mit Dichlormethan extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde zweimal säulenchromatographisch an Kieselgel (CH₂Cl₂/MeOH 100:1 v/v; PE/EtOAc 3:2 v/v) gereinigt.

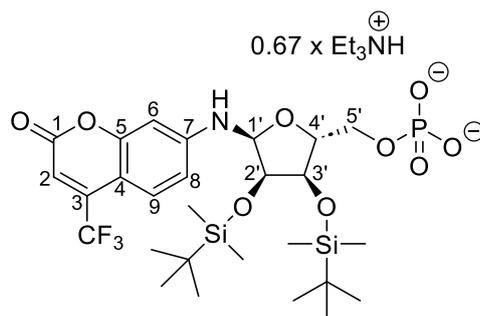


Summenformel: C₅₅H₆₃F₃NO₉PSi₂
 Molekulargewicht: 1026.2460 g/mol

Ausbeute: 0.051 g (0.050 mmol, 98 %) einer farblosen Warte. – **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.74-7.67 (m, 4H, H-4'', H-5''), 7.55-7.46 (m, 4H, H-1'', H-8''), 7.45-7.20 (m, 9H, H-9, H-2'', H-3'', H-6'', H-7''), 6.64 (s, 1H, H-8), 6.63-6.60 (m, 1H, H-6), 6.48 (s, 1H, H-8), 6.47-6.42 (m, 1H, NH), 4.97 (dd, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, ³J_{H,H} = 5.1 Hz, 1H, H-1'), 4.33-4.25 (m, 2H, Fm-CH₂), 4.25-4.17 (m, 2H, Fm-CH₂), 4.09-4.04 (m, 2H, H-9''), 4.00-3.91 (m, 1H, H-2'), 3.71-3.66 (m, 1H, H-3'), 3.62 (t, ²J_{H,H} = 10.8 Hz, 1H, H-5'), 3.26 (dd, ²J_{H,H} = 10.8 Hz, ³J_{H,H} = 5.0 Hz, 1H, H-5'), 0.94 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.85 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.12 (s, 3H, Si(CH₃)₂), 0.11 (s, 3H, Si(CH₃)₂), 0.05 (s, 3H, Si(CH₃)₂), -0.01 (s, 3H, Si(CH₃)₂). – **¹³C-NMR** (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 160.1 (C-4), 156.8 (C-1), 150.7 (C-5), 142.9 (C-8a'', C-9a''), 142.8 (C-4a'', C-4b''), 127.9 (C-3'', C-8''), 127.2 (C-2'', C-7''), 126.4 (C-9), 124.9 (C-1'', C-8''), 120.2, (C-4'', C-5''), 111.5 (C-6), 109.8 (C-2), 99.7 (C-8), 80.8 (C-1'), 73.4 (d, ³J_{C,P} = 5.9 Hz, C-4'), 72.1 (C-2'), 69.3 (d, ²J_{C,P} = 6.2 Hz, Fm-CH₂), 69.0 (d, ²J_{C,P} = 5.5 Hz, Fm-CH₂), 68.2 (C-3'), 55.3 (C-5'), 47.9 (C-9''), 26.0 (C(CH₃)₃), 25.9 (C(CH₃)₃), 18.4 (C(CH₃)₃), 18.2 (C(CH₃)₃), -4.2, -4.4 (Si(CH₃)₂), -4.7, -4.8 (Si(CH₃)₂). – **³¹P-NMR** (243 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = -1.57. – **¹⁹F-NMR** (565 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = -64.54. – **ATR-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3418, 3068, 2952, 2930, 2892, 2857, 2246, 1733, 1629, 1610, 1556, 1531, 1489, 1471, 1450, 1412, 1390, 1360, 1338, 1283, 1258, 1216, 1198, 1171, 1137, 1106, 1040, 1014, 990, 908, 861, 834, 809, 800, 757, 727, 673, 648, 621, 591, 566, 541, 506, 426. – **HRMS** (ESI⁺, m/z): ber.: 1026.3804 [M+Na]⁺, gef.: 1026.3874 [M+Na]⁺.

Synthese von 7-Amino-4-(trifluormethyl)cumarin-2',3'-bis-O-tert-butylidimethylsilyl- α -D-ribose-5'-monophosphat 117 als Triethylammoniumsalz

Unter Inertgasatmosphäre wurden 0.073 g (0.071 mmol, 1.0 Äquiv.) des Fm-geschützten Phosphats **118** in 1 mL Acetonitril gelöst und anschließend 0.25 mL Triethylamin zugetropft (CH₃CN/Et₃N 4:1 v/v). Das Reaktionsgemisch wurde für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurden die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt und dreimal mit Toluol coevaporiert. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-40 min, Flussrate 20 mL/min).



Summenformel: $C_{27}H_{41}F_3NO_9PSi_2^{2-}$

Molekulargewicht: 735.8491 g/mol

Ausbeute: 39 mg (0.053 mmol, 74 %) einer farblosen Warte. – **1H -NMR** (600 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 7.55-7.49 (m, 1H, H-9), 6.71 (d, $^3J_{H,H}$ = 7.2 Hz, 1H, NH), 6.68 (dd, $^3J_{H,H}$ = 8.9 Hz, $^4J_{H,H}$ = 2.3 Hz, 1H, H-8), 6.65-6.60 (m, 2H, H-2, H-6), 5.10 (dd, $^3J_{H,H}$ = 7.5 Hz, $^3J_{H,H}$ = 5.1 Hz, 1H, H-1'), 4.24-4.19 (m, 1H, H-3'), 4.07-4.00 (m, 1H, H-4'), 3.90 (dd, $^3J_{H,H}$ = 5.2 Hz, $^4J_{H,H}$ = 2.6 Hz, 1H, H-2'), 3.54-3.48 (m, 1H, H-5'), 3.48-3.43 (m, 1H, H-5'), 0.94 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 0.79 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 0.16 (s, 3H, $Si(CH_3)_2$), 0.14 (s, 3H, $Si(CH_3)_2$), 0.07 (s, 3H, $Si(CH_3)_2$), 0.03 (s, 3H, $Si(CH_3)_2$). – **^{13}C -NMR** (151 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 159.0 (C-4), 156.8 (C-1), 150.6 (C-5), 140.4 (C-3), 126.2 (C-9), 122.2 (CF_3), 111.6 (C-8), 110.1 (C-6), 103.7 (C-2), 79.7 (C-1'), 74.4 (C-3'), 69.3 (C-4'), 67.6 (C-2'), 56.0 (C-5'), 26.0 ($C(CH_3)_3$), 25.6 ($C(CH_3)_3$), 18.1 ($C(CH_3)_3$), 17.7 ($C(CH_3)_3$), -4.1, -4.2 ($Si(CH_3)_2$), -5.2, -5.2 ($Si(CH_3)_2$). – **^{31}P -NMR** (243 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = -0.37. – **^{19}F -NMR** (565 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = -63.54. – **ATR-IR:** $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3414, 2953, 2929, 2889, 2856, 1736, 1629, 1609, 1555, 1532, 1488, 1472, 1435, 1412, 1390, 1359, 1284, 1254, 1215, 1197, 1170, 1136, 1108, 1047, 1006, 964, 917, 857, 835, 809, 778, 728, 704, 674, 649, 629, 570, 543, 519, 507, 481, 443. – **HRMS** (ESI $^-$, m/z): ber.: 668.2093 [M-H] $^-$, gef.: 668.2118 [M-H] $^-$.

Syntheseversuch von 7-Amino-4-(trifluormethyl)cumarin- α -D-ribose-5'-monophosphat **89** als Triethylammoniumsalz

Unter Inertgasatmosphäre wurden 55 mg (0.054 mmol, 1.0 Äquiv.) des Monophosphats **117** in 2 mL abs. THF gelöst und 0.15 mL (1.1 mmol, 20 Äquiv.) Triethylamin zugegeben. Nach Rühren für fünf Minuten bei Raumtemperatur wurden 0.87 mL (0.54 mmol, 10 Äquiv.) TREAT-HF hinzugegeben und für weitere drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 4 mL eines 1 M TEAB-Puffers versetzt und alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel (H_2O/CH_3CN 0-100 % Vol., 0-40 min, Flussrate 20 mL/min).

Ausbeute: Das gewünschte Produkt konnte nicht isoliert werden.

Synthese von α -1'-O-(7-Amino-4-(trifluormethyl)cumarin)2',3'-O-bis(tert-butylidimethylsilyl)-Adenosindiphosphat-ribose 132 als Triethylammoniumsalz

Die Reaktion wurde nach der **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 18 mg (0.041 mmol, 1.2 Äquiv.) Adenosinmonophosphat **16** in 2 mL abs. Acetonitril suspendiert und 0.080 mL (0.54 mmol, 16 Äquiv.) abs. Triethylamin sowie 0.50 mL (0.34 mmol, 10 Äquiv.) Trifluoressigsäureanhydrid, gelöst in 2 mL abs. Acetonitril, tropfenweise zugegeben. Der Rückstand wurde in 2 mL abs. Acetonitril aufgenommen und mit 0.050 mL (0.34 mmol, 10 Äquiv.) abs. Triethylamin, 0.020 mL (0.20 mmol, 6.0 Äquiv.) 1-Methylimidazol sowie 24 mg (0.034 mmol, 1.0 Äquiv.) des Monophosphats **117**, gelöst in 2.5 mL abs. Acetonitril, versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für acht Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel (H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min) gereinigt. Anschließend erfolgte jeweils eine Überführung in die Ammonium- und Triethylammoniumform mittels Ionenaustauscherharz gefolgt von einer automatisierten Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel H₂O/CH₃CN 0-100 % Vol., 0-50 min, Flussrate 20 mL/min).

Ausbeute: Das gewünschte Produkt konnte nicht isoliert werden.

8 Gefahrstoffverzeichnis

8.1 Verwendete Chemikalien

Im Folgenden sind alle verwendeten Chemikalien mit zugehörigen H- und P-Sätzen, sowie Gefahrenpiktogrammen aufgeführt.^{[194][195]} Sind für Substanzen keine Gefährdungseinstufungen bekannt, so sind sie als gefährlich einzustufen.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien.

Substanz	Gefahrenpiktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Aceton	 	225, 319, 336, EUH066	210, 233, 240, 241, 242, 305+351+338
Acetonitril	 	225, 302+312+332, 319	210, 280, 301+312, 303+361+353 304+340+312, 305+351+338
Acetonitril-d ₃	 	225, 302+312+332, 319	210, 280, 301+312, 303+361+353, 304+340+312, 305+351+338
Adenosindiphosphat	Kein gefährlicher Stoff nach CLP (Verordnung (EG) 1272/2008)		
Adenosinmonophosphat	Kein gefährlicher Stoff nach CLP (Verordnung (EG) 1272/2008)		
3-Aminophenol	 	302+332, 319, 411	261, 301+312+330, 305+351+338
(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2-(4-Amino- pyrrolo[2,1- <i>f</i>][1,2,4]triazin-7- yl)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxy- methyl)tetrahydro-2-furan- carbonitril (GS-441524)	  	315, 318, 334, 317, 341, 361, 370, 335	201, 202, 260, 264, 270, 272, 280, 284, 3002+352, 304+341, 305+351+338, 310, 308+313, 321, 362+364, 333+313, 342+311, 363, 405, 501
Ammoniak 25 %	  	314, 335, 410	261, 271, 273, 280

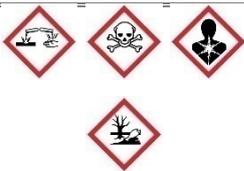
Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahrenpiktogramm	H-Sätze	P-Sätze
			303+361+353, 305+351+338
Ammoniumchlorid		302, 319	305+351+338
D-Arabinose	Kein gefährlicher Stoff nach CLP (Verordnung (EG) 1272/2008)		
Azodicarbonsäurediisopropyl- ester		315, 319, 335, 351, 373, 411	202, 260, 273, 302+352, 305+351+338, 308+313
Bis-(<i>N,N</i> -diisopropyl- amino)chlorophosphoramidit		314,	260, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338, 363
<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)acet- amid		226, 302, 314, EUH014	210, 233, 280, 301+312, 303+361+353, 305+351+338
<i>N</i> -Bromsuccinimid		272, 290, 315, 317, 319, 400	210, 280, 302+352, 333+313, 337+313, 371+380+375
<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid		228, 314, 411	210, 260, 273, 280, 303+361+353, 305+351+338, 310
<i>tert</i> -Butyldiphenylsilylchlorid		314, 335	261, 271, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
<i>tert</i> -Butylhydroperoxid		226, 242, 302, 311, 330, 314, 317, 341, 411	210, 220, 280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338, 310
Celite®		372	260, 264, 270, 314, 501
Chloroform- <i>d</i>		302, 315, 319, 331, 336, 351,	202, 301+312,

Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahrenpiktogramm	H-Sätze	P-Sätze
		361d, 372	302+352, 304+340+311, 305+351+311, 3005+351+338, 308+313
3-Chlorperbenzoesäure		242, 314, 317, 410	210, 260, 280, 303+361+353, 305+351+338, 370+378
N-Chlorsuccinimid		290, 302, 314, 335, 410	260, 273, 280, 301+312, 303+361, 305+351+338
Deuteriumoxid	Kein gefährlicher Stoff nach CLP (Verordnung (EG) 1272/2008)		
Dibenzyl- <i>N,N</i> -diisopropylphosphoramidit	Kein gefährlicher Stoff nach CLP (Verordnung (EG) 1272/2008)		
Dichlormethan		315, 319, 336, 351	201, 202+352, 305+351+338, 308+313
4,5-Dicyanoimidazol		315, 318, 335	261, 264, 271, 280, 202+352, 305+351+338
Diethylether		224, 302, 336, EUH019, EUH066	210, 233, 240, 241, 301+312, 403+233
Diisobutylaluminiumhydrid in Toluol		225, 250, 260, 304, 314, 336, 361d, 373, 412, EUH014	210, 231+232, 280, 301+330+331, 303+361, 353, 304+340, 310, 305+351+338, 370+378
1,2-Dimethoxyethan		225, 315, 332, 360FD, EUH019	202, 210, 233, 303+361+353, 304+340+312, 308+313

Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahrenpiktogramm	H-Sätze	P-Sätze
4-(Dimethylamino)-pyridin		301+331, 310, 315, 318, 370, 411	262, 273, 280, 301+310, 302+352+312, 305+351+338
2,2'-Dimethyl-2,2'-azodipropionitril		242, 302+332, 412, EUH044	210, 235, 273, 304+340+312, 370+378, 403
<i>N,N</i> -Dimethylformamid		226, 312+332, 319, 360D	201, 210, 302+352, 305+351+338, 308+313
Dimethylsulfoxid	Kein gefährlicher Stoff nach CLP (Verordnung (EG) 1272/2008)		
Dimethylsulfoxid- <i>d</i> ₆	Kein gefährlicher Stoff nach CLP (Verordnung (EG) 1272/2008)		
Dinatriumhydrogenphosphat	Kein gefährlicher Stoff nach CLP (Verordnung (EG) 1272/2008)		
Diphenylphosphonat		302, 315, 318, 335	261, 264, 280, 301+312, 302+352, 305+351+338
Dodecansäurechlorid		290, 314	280, 305+351+338, 310
Essigsäure		226, 314	210, 280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338, 310
Essigsäureanhydrid		226, 302, 331, 314, 335	210, 260, 280, 303+361+353, 305+351+338, 312
Essigsäureethylester		225, 319, 336, EUHH066	210, 233, 240 305+351+338, 403+235
Ethanol		225, 319	210, 233, 240, 241, 242, 305+351+338
Ethanphosphonsäuredichlorid		300, 311+331, 314,	261, 271, 280, 303+361+353, 304+340+310,

Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahrenpiktogramm	H-Sätze	P-Sätze
			305+351+338
Ethen		220, 280, 336	210, 260, 304+340, 315, 377, 381, 405, 403
9-Fluorenylmethanol	Kein gefährlicher Stoff nach CLP (Verordnung (EG) 1272/2008)		
4-Hydroxybenzylalkohol		319, 412	264, 273, 280, 305+351+338, 337+313, 501
Imidazol		302, 314, 360D	260, 280, 301+312, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
Indium-(III)-chlorid		314, 372, 412	260, 273, 280, 303+361+353, 305+351+338, 314
Kaliumcarbonat		315, 319, 335	261, 264, 271, 280, 302+352, 305+351+338
Kalium-Natrium-Tartrat	Kein gefährlicher Stoff nach CLP (Verordnung (EG) 1272/2008)		
Kieselgel	Kein gefährlicher Stoff nach CLP (Verordnung (EG) 1272/2008)		
Kupfersulfat		302, 315, 319, 410	264, 270, 273, 301+312, 302+352, 305+351+338
Methanol		225, 301+311+331, 370	210, 233, 280, 301+310, 303+361+353, 304+340+311
Methanol-d ₆		225, 301+311+331, 370	210, 233, 280, 301+310, 303+361+353, 304+340+311
1-Methylimidazol		302, 311, 314	270, 280, 301+312, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338
Natriumacetat	Kein gefährlicher Stoff nach CLP (Verordnung (EG) 1272/2008)		

Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahrenpiktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Natriumchlorid	Kein gefährlicher Stoff nach CLP (Verordnung (EG) 1272/2008)		
Natriumhydrogencarbonat	Kein gefährlicher Stoff nach CLP (Verordnung (EG) 1272/2008)		
Natriumhydroxid		290, 314	280,+301+330+331, 305+351+338, 308+310
Natriumphosphinat	Kein gefährlicher Stoff nach CLP (Verordnung (EG) 1272/2008)		
Natriumsulfat	Kein gefährlicher Stoff nach CLP (Verordnung (EG) 1272/2008)		
Nonansäurechlorid		314	280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338, 310
Palladiumhydroxid auf Aktivkohle		410	273, 391, 501
Pentadecansäurechlorid		314	280, 305+351+338, 310
Petrolether (50-70)	   	225, 304, 315, 336, 361f, 373, 411	210, 210, 273, 301+310, 303+361+353, 331
Phosphorsäure	 	290, 302, 314	234, 270, 280, 301+312, 303+361+353, 305+351+338
Phosphortrichlorid	  	300+330, 373, 314, EUH014, EUH029	280, 301+330+331, 305+351+338, 304+340, 310, 402+404
Phosphoryltrichlorid	  	302, 330, 314, 372, EUH014, EUH029	280, 301+330+331, 304+340, 305+351+338, 308+310
Pyridin	 	225, 302+312+332, 315, 319	210, 280, 301+312, 303+361+353, 304+340+312, 305+351+338

Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahrenpiktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Resorcin		302, 315, 317, 318, 370, 371, 410	273, 280, 301+312, 302+352, 305+351+338, 308+311
D-Ribono-1,4-lacton	Kein gefährlicher Stoff nach CLP (Verordnung (EG) 1272/2008)		
Salzsäure		290, 314, 335	280, 303+361+353, 305+351+338+310
Schwefelsäure		290, 314	280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338+310
Stickstoff		281	282, 336+315, 403
Tetrabutylammoniumhydroxid		302, 314	280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338, 310
Tetrahydrofuran		225, 302, 319, 335, 336, 351, EUHH019	210, 280, 301+312+330, 305+351+338, 370+378, 403+235
Tetrahydrofurfurylalkohol		319, 360Df	201, 305+351+338, 308+313
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-1,8-naphthalindiamin (Protonenschwamm)		302, 315, 319, 335	261, 264, 271, 301+312, 302+352, 305+351+338
Toluol		225, 315, 361d, 336, 373, 304, 412	202, 210, 273, 301+310, 303+361+353, 331
Toluol-4-sulfonylchlorid		290, 315, 317, 318	234, 261, 264, 280, 302+352,

Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahrenpiktogramm	H-Sätze	P-Sätze
			305+351+338
Trichlormethan	 	302, 331, 315, 319, 351, 361d, 336, 372, 372	201, 273, 301+312+330, 302+352, 304+340+311, 308+313
Triethylamin	  	225, 301+311+331, 314, 335	210, 280, 301+312, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338+310
Triethylamin-Trihydrofluorid	 	300+310+330, 314	260, 271, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+353+338
4,4,4-Trifluoracetessigsäure- ethylester	 	226, 302, 412	210, 372, 301+312+330
Trifluoressigsäure	 	290, 331, 314, 412, EUH071	260, 273, 280, 303+361+353, 305+351+338, 312
Trifluoressigsäureanhydrid	 	332, 314, 412, EUH014	261, 273, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
Trimethylphosphat	 	302, 315, 319, 340, 351	201, 202, 301+312, 302+352, 305+351+338, 308+313
Trimethylsilyltrifluor- methansulfonat	 	226, 314	210, 233, 240, 280, 303+361+353, 305+351+338
Triphenylphosphin	  	302, 317, 318, 372	260, 280, 301+312, 302+352, 305+351+338, 314
Tritylchlorid	 	314, 410	280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338, 310

Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahrenpiktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Trockeneis	Kein gefährlicher Stoff nach CLP (Verordnung (EG) 1272/2008)		
Vanillin		319	364, 280, 305+351+338, 337+313
Wasserstoff		220, 280	210, 377, 381, 403
Zinkchlorid		302, 314, 410	273, 280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310
Zinntetrachlorid		314, 335, 412	261, 271, 273, 280, 303+361+353, 305+351+338

8.2 Verwendete KMR-Substanzen

In **Tabelle 2** sind die verwendeten KMR-Stoffe dargestellt.

Tabelle 2: Liste der verwendeten KMR-Stoffe der Kategorien 1A und 1B.

CAS-Nummer	Stoffname	Verfahren und eingesetzte Menge	Kategorie
110-71-4	1,2-Dimethoxyethan	Lösungsmittel, 500 mL	R: 1B
68-12-2	<i>N,N</i> -Dimethylformamid	Lösungsmittel, 5 L	R: 1B
288-32-4	Imidazol	Reagenz für Synthese, 20 g	R: 1B
97-99-4	Tetrahydrofurfurylalkohol	Edukt für Synthese, 100 mL	R: 1B
512-56-1	Trimethylphosphat	Lösungsmittel, 1 L	M: 1B

9 Literatur

- [1] Robert Koch Institut, Coronavirus SARS-CoV-2, <https://www.rki.de/>, **17.09.2024**.
- [2] P. V'kovski, A. Kratzel, S. Steiner, H. Stalder, V. Thiel, Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2, *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, *19*, 155–170.
- [3] World Health Organization, Coronavirus disease (COVID-19), <https://www.who.int/>, **11.09.2024**.
- [4] I. Nesteruk, Endemic characteristics of SARS-CoV-2 infection, *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 14841.
- [5] C. E. Samuel, Interferon at the crossroads of SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease, *J. Biol. Chem.* **2023**, *299*, 104960.
- [6] C. Huang, Y. Wang, X. Li, L. Ren, J. Zhao, Y. Hu, L. Zhang, G. Fan, J. Xu, X. Gu *et al.*, Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China, *Lancet* **2020**, *395*, 497–506.
- [7] A. R. Fehr, R. Channappanavar, G. Jankevicius, C. Fett, J. Zhao, J. Athmer, D. K. Meyerholz, I. Ahel, S. Perlman, The Conserved Coronavirus Macrodomain Promotes Virulence and Suppresses the Innate Immune Response during Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection, *mBio.* **2016**, *7*, e01721-16.
- [8] A. R. Fehr, S. A. Singh, C. M. Kerr, S. Mukai, H. Higashi, M. Aikawa, The impact of PARPs and ADP-ribosylation on inflammation and host-pathogen interactions, *Genes Dev.* **2020**, *34*, 341–359.
- [9] M.-P. Egloff, H. Malet, A. Putics, M. Heinonen, H. Dutartre, A. Frangeul, A. Gruez, V. Campanacci, C. Cambillau, J. Ziebuhr *et al.*, Structural and functional basis for ADP-ribose and poly(ADP-ribose) binding by viral macro domains, *J. Virol.* **2006**, *80*, 8493–8502.
- [10] J. G. M. Rack, D. Perina, I. Ahel, Macrodomains: Structure, Function, Evolution, and Catalytic Activities, *Annu. Rev. Biochem.* **2016**, *85*, 431–454.
- [11] L. Eckeï, S. Krieg, M. Bütepage, A. Lehmann, A. Gross, B. Lippok, A. R. Grimm, B. M. Kümmerer, G. Rossetti, B. Lüscher *et al.*, The conserved macrodomains of the non-structural proteins of Chikungunya virus and other pathogenic positive strand RNA viruses function as mono-ADP-ribosylhydrolases, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 41746.
- [12] D. N. Frick, R. S. Viridi, N. Vuksanovic, N. Dahal, N. R. Silvaggi, Molecular Basis for ADP-Ribose Binding to the Mac1 Domain of SARS-CoV-2 nsp3, *Biochemistry* **2020**, *59*, 2608–2615.
- [13] M. Sa Ribero, N. Jouvenet, M. Dreux, S. Nisole, Interplay between SARS-CoV-2 and the type I interferon response, *PLoS Pathog.* **2020**, *16*, e1008737.

-
- [14] Y. M. Alhammad, S. Parthasarathy, R. Ghimire, C. M. Kerr, J. J. O'Connor, J. J. Pfannenstiel, D. Chanda, C. A. Miller, N. Baumlin, M. Salathe *et al.*, SARS-CoV-2 Mac1 is required for IFN antagonism and efficient virus replication in cell culture and in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2023**, *120*, e2302083120.
- [15] A. Roy, Y. M. Alhammad, P. McDonald, D. K. Johnson, J. Zhuo, S. Wazir, D. Ferraris, L. Lehtiö, A. K. L. Leung, A. R. Fehr, Discovery of compounds that inhibit SARS-CoV-2 Mac1-ADP-ribose binding by high-throughput screening, *Antiviral Res.* **2022**, *203*, 105344.
- [16] M. Schuller, T. Zarganes-Tzitzikas, J. Bennett, S. de Cesco, D. Fearon, F. von Delft, O. Fedorov, P. E. Brennan, I. Ahel, Discovery and Development Strategies for SARS-CoV-2 NSP3 Macrodomein Inhibitors, *Pathogens* **2023**, *12*.
- [17] A. R. Fehr, J. Athmer, R. Channappanavar, J. M. Phillips, D. K. Meyerholz, S. Perlman, The nsp3 macrodomain promotes virulence in mice with coronavirus-induced encephalitis, *J. Virol.* **2015**, *89*, 1523–1536.
- [18] G. I. Makrynitsa, D. Ntonti, K. D. Marousis, M. Birkou, M.-T. Matsoukas, S. Asami, D. Bentrop, N. Papageorgiou, B. Canard, B. Coutard *et al.*, Conformational plasticity of the VEEV macro domain is important for binding of ADP-ribose, *J. Struct. Biol.* **2019**, *206*, 119–127.
- [19] M. K. Parvez, The hepatitis E virus ORF1 'X-domain' residues form a putative macrodomain protein/Appr-1"-pase catalytic-site, critical for viral RNA replication, *Gene* **2015**, *566*, 47–53.
- [20] G. A. Stoll, N. Nikolopoulos, H. Zhai, L. Zhang, C. H. Douse, Y. Modis, Crystal structure and biochemical activity of the macrodomain from rubella virus p150, *J. Virol.* **2024**, *98*, e0177723.
- [21] A. R. Fehr, S. Perlman, Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis, *Methods Mol. Biol.* **2015**, *1282*, 1–23.
- [22] M. M. Lamers, B. L. Haagmans, SARS-CoV-2 pathogenesis, *Nat. Rev. Microbiol.* **2022**, *20*, 270–284.
- [23] J. Cui, F. Li, Z.-L. Shi, Origin and evolution of pathogenic coronaviruses, *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 181–192.
- [24] A. C. Brant, W. Tian, V. Majerciak, W. Yang, Z.-M. Zheng, SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication, *Cell Biosci.* **2021**, *11*, 136.
- [25] M.-Y. Wang, R. Zhao, L.-J. Gao, X.-F. Gao, D.-P. Wang, J.-M. Cao, SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 587269.
-

- [26] Y. Chen, Q. Liu, D. Guo, Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis, *J. Med. Virol.* **2020**, *92*, 418–423.
- [27] L. W. Barrett, S. Fletcher, S. D. Wilton, Untranslated gene regions and other non-coding elements. *Regulation of eukaryotic gene expression*, Springer, Basel, New York, **2013**, S. 1 - 56.
- [28] C. Bai, Q. Zhong, G. F. Gao, Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins, *Sci. China Life Sci.* **2022**, *65*, 280–294.
- [29] Susanne Modrow, Dietrich Falke, Uwe Truyen, Hermann Schätzl, *Molekulare Virologie*, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, **2010**, 53ff., 107ff., 145, 246ff.
- [30] X. Li, M. Geng, Y. Peng, L. Meng, S. Lu, Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19, *J. Pharm. Anal.* **2020**, *10*, 102–108.
- [31] J. Ziebuhr, *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Springer, Heidelberg, **2020**.
- [32] M. de Andrea, R. Ravera, D. Gioia, M. Gariglio, S. Landolfo, The interferon system: an overview, *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **2002**, *6 Suppl A*, A41-6; discussion A55-8.
- [33] C. E. Samuel, Antiviral actions of interferons, *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**, *14*, 778-809, table of contents.
- [34] M. Hoskins, A protective action of neurotropic against viscerotropic yellow fever virus in *Macacus rhesus*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1935**, *15*, 675–680.
- [35] A. Isaacs, Lindemann J., Virus interference. I. The interferon, *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **1957**, *147*, 258–267.
- [36] J. M. Minkoff, B. tenOever, Innate immune evasion strategies of SARS-CoV-2, *Nat. Rev. Microbiol.* **2023**, *21*, 178–194.
- [37] Q. Du, Y. Miao, W. He, H. Zheng, ADP-Ribosylation in Antiviral Innate Immune Response, *Pathogens* **2023**, *12*.
- [38] T. Nelemans, M. Kikkert, Viral Innate Immune Evasion and the Pathogenesis of Emerging RNA Virus Infections, *Viruses* **2019**, *11*.
- [39] R. Savan, M. Gale, Innate immunity and interferon in SARS-CoV-2 infection outcome, *Immunity* **2023**, *56*, 1443–1450.
- [40] J. Liu, C. Qian, X. Cao, Post-Translational Modification Control if Innate Immunity, *Immunity* **2016**, *45*, 15–30.
- [41] Rebecca Gupte, Ziyang Liu, W. Lee Kraus, PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes, *Genes Dev.* **2017**, *31*, 101–126.
- [42] P. Chambon, J. D. Weill, P. Mandel, Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme, *BioChem. Biophys Res. Commun.* **1963**, *11*, 39–43.

- [43] J. G. M. Rack, L. Palazzo, I. Ahel, (ADP-ribosyl)hydrolases: structure, function, and biology, *Genes Dev.* **2020**, *34*, 263–284.
- [44] M. J. Suskiewicz, E. Prokhorova, J. G. M. Rack, I. Ahel, ADP-ribosylation from molecular mechanisms to therapeutic implications, *Cell* **2023**, *186*, 4475–4495.
- [45] B. A. Gibson, W. L. Kraus, New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 411–424.
- [46] Z. Tao, P. Gao, H. Liu, Identification of the ADP-Ribosylation Sites in the PARP-1 Automodification Domain: Analysis and Implications, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14258–14260.
- [47] Y. Zhang, J. Wang, M. Ding, Y. Yu, Site-specific characterization of the Asp- and Glu-ADP-ribosylated proteome, *Nat. Methods* **2013**, *10*, 981–984.
- [48] Orsolya Leidecker, Juan José Bonfiglio, Thomas Colby, Qi Zhang, Ilian Atanassov, Roko Zaja, Luca Palazzo, Anna Stockum, Ivan Ahel, Ivan Matic, Serine is a new target residue for endogenous ADP-ribosylation on histones, *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 998–1000.
- [49] Simon Messner, Matthias Altmeyer, Hongtao Zhao, Andrea Pozivil, Bernd Roschitzki, Peter Gehrig, Dorothea Ruitshauser, Danzhi Huang, Amedeo Caflisch, Michael O. Hottiger, PARP1 ADP-ribosylates lysine residues of the core histone tails, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 6350–6362.
- [50] S. Vyas, I. Matic, L. Uchima, J. Rood, R. Zaja, R. T. Hay, I. Ahel, P. Chang, Family-wide analysis of poly(ADP-ribose) polymerase activity, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4426.
- [51] C. M. Daniels, S.-E. Ong, A. K. Leung, The Promise of Proteomics for the Study of ADP-Ribosylation, *Mol. Cell* **2015**, *58*, 911–924.
- [52] T. Nakano, Y. Matsushima-Hibiya, M. Yamamoto, A. Takahashi-Nakaguchi, H. Fukuda, M. Ono, T. Takamura-Enya, H. Kinashi, Y. Totsuka, ADP-ribosylation of guanosine by SCO5461 protein secreted from *Streptomyces coelicolor*, *Toxicon* **2013**, *63*, 55–63.
- [53] K. Crawford, J. J. Bonfiglio, A. Mikoč, I. Matic, I. Ahel, Specificity of reversible ADP-ribosylation and regulation of cellular processes, *Crit Rev Biochem Mol Biol* **2018**, *53*, 64–82.
- [54] M.-F. Langelier, J. L. Planck, S. Roy, J. M. Pascal, Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosylation) by human PARP-1, *Science* **2012**, *336*, 728–732.
- [55] Y. Ji, A. V. Tulin, The roles of PARP1 in gene control and cell differentiation, *Curr Opin Genet Dev* **2010**, *20*, 512–518.
- [56] X. Luo, W. L. Kraus, On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1, *Genes Dev.* **2012**, *26*, 417–432.

- [57] M. E. Grunewald, Y. Chen, C. Kuny, T. Maejima, R. Lease, D. Ferraris, M. Aikawa, C. S. Sullivan, S. Perlman, A. R. Fehr, The coronavirus macrodomain is required to prevent PARP-mediated inhibition of virus replication and enhancement of IFN expression, *PLoS Pathog.* **2019**, *15*, e1007756.
- [58] G. Caprara, E. Prosperini, V. Piccolo, G. Sigismondo, A. Melacarne, A. Cuomo, M. Boothby, M. Rescigno, T. Bonaldi, G. Natoli, PARP14 Controls the Nuclear Accumulation of a Subset of Type I IFN-Inducible Proteins, *J. Immunol.* **2018**, *200*, 2439–2454.
- [59] L. Li, H. Zhao, P. Liu, C. Li, N. Quanquin, X. Ji, N. Sun, P. Du, C.-F. Qin, N. Lu *et al.*, PARP12 suppresses Zika virus infection through PARP-dependent degradation of NS1 and NS3 viral proteins, *Sci. Signal* **2018**, *11*.
- [60] S. Parthasarathy, A. R. Fehr, PARP14: A key ADP-ribosylating protein in host-virus interactions?, *PLoS Pathog.* **2022**, *18*, e1010535.
- [61] S. Atasheva, E. I. Frolova, I. Frolov, Interferon-stimulated poly(ADP-Ribose) polymerases are potent inhibitors of cellular translation and virus replication, *J. Virol.* **2014**, *88*, 2116–2130.
- [62] T. Guo, Y. Zuo, L. Qian, J. Liu, Y. Yuan, K. Xu, Y. Miao, Q. Feng, X. Chen, L. Jin *et al.*, ADP-ribosyltransferase PARP11 modulates the interferon antiviral response by mono-ADP-ribosylating the ubiquitin E3 ligase β -TrCP, *Nat Microbiol* **2019**, *4*, 1872–1884.
- [63] S. Hayakawa, S. Shiratori, H. Yamato, T. Kameyama, C. Kitatsuji, F. Kashigi, S. Goto, S. Kameoka, D. Fujikura, T. Yamada *et al.*, ZAPS is a potent stimulator of signaling mediated by the RNA helicase RIG-I during antiviral responses, *Nat Immunol* **2011**, *12*, 37–44.
- [64] Nina Đukić, Øyvind Strømmand, Jonas Damgaard Elsborg, Deeksha Munnur, Kang Zhu, Marion Schuller, Chatrin Chatrin, Pulak Kar, Lena Duma, Osamu Suyari *et al.*, PARP14 is a PARP with both ADP-ribosyl transferase and hydrolase activities, *Sci. Adv.* **2023**, *9*, eadi2687.
- [65] T. Carvalho, F. Krammer, A. Iwasaki, The first 12 months of COVID-19: a timeline of immunological insights, *Nat. Rev. Immunol.* **2021**, *21*, 245–256.
- [66] M. D. Cooper, M. N. Alder, The evolution of adaptive immune systems, *Cell* **2006**, *124*, 815–822.
- [67] A. Mizoguchi, A. K. Bhan, A case for regulatory B cells, *J. Immunol.* **2006**, *176*, 705–710.
- [68] J. S. Lee, J.-Y. Koh, K. Yi, Y.-I. Kim, S.-J. Park, E.-H. Kim, S.-M. Kim, S. H. Park, Y. S. Ju, Y. K. Choi *et al.*, Single-cell transcriptome of bronchoalveolar lavage fluid reveals

- sequential change of macrophages during SARS-CoV-2 infection in ferrets, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 4567.
- [69] P. Bost, A. Giladi, Y. Liu, Y. Bendjelal, G. Xu, E. David, R. Blecher-Gonen, M. Cohen, C. Medaglia, H. Li *et al.*, Host-Viral Infection Maps Reveal Signatures of Severe COVID-19 Patients, *Cell* **2020**, *181*, 1475-1488.e12.
- [70] R. L. Chua, S. Lukassen, S. Trump, B. P. Hennig, D. Wendisch, F. Pott, O. Debnath, L. Thürmann, F. Kurth, M. T. Völker *et al.*, COVID-19 severity correlates with airway epithelium-immune cell interactions identified by single-cell analysis, *Nat. Biotechnol.* **2020**, *38*, 970–979.
- [71] D. Mathew, J. R. Giles, A. E. Baxter, D. A. Oldridge, A. R. Greenplate, J. E. Wu, C. Alanio, L. Kuri-Cervantes, M. B. Pampena, K. D'Andrea *et al.*, Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications, *Science* **2020**, 369.
- [72] N. Mangalmurti, C. A. Hunter, Cytokine Storms: Understanding COVID-19, *Immunity* **2020**, *53*, 19–25.
- [73] C. Zanza, T. Romenskaya, A. C. Manetti, F. Franceschi, R. La Russa, G. Bertozzi, A. Maiese, G. Savioli, G. Volonnino, Y. Longhitano, Cytokine Storm in COVID-19: Immunopathogenesis and Therapy, *Medicina (Kaunas)* **2022**, 58.
- [74] R. H. Manjili, M. Zarei, M. Habibi, M. H. Manjili, COVID-19 as an Acute Inflammatory Disease, *J. Immunol.* **2020**, *205*, 12–19.
- [75] J. Lei, Y. Kusov, R. Hilgenfeld, Nsp3 of coronaviruses: Structures and functions of a large multi-domain protein, *Antiviral Res.* **2018**, *149*, 58–74.
- [76] B. W. Neuman, Bioinformatics and functional analyses of coronavirus nonstructural proteins involved in the formation of replicative organelles, *Antiviral Res.* **2016**, *135*, 97–107.
- [77] E. Hartenian, D. Nandakumar, A. Lari, M. Ly, J. M. Tucker, B. A. Glaunsinger, The molecular virology of coronaviruses, *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 12910–12934.
- [78] Y. M. O. Alhammad, M. M. Kashipathy, A. Roy, J.-P. Gagné, P. McDonald, P. Gao, L. Nonfoux, K. P. Battaile, D. K. Johnson, E. D. Holmstrom *et al.*, The SARS-CoV-2 Conserved Macrodomein Is a Mono-ADP-Ribosylhydrolase, *J. Virol.* **2021**, 95.
- [79] A. K. L. Leung, D. E. Griffin, J. Bosch, A. R. Fehr, The Conserved Macrodomein Is a Potential Therapeutic Target for Coronaviruses and Alphaviruses, *Pathogens* **2022**, 11.
- [80] H. Malet, B. Coutard, S. Jamal, H. Dutartre, N. Papageorgiou, M. Neuvonen, T. Ahola, N. Forrester, E. A. Gould, D. Lafitte *et al.*, The crystal structures of Chikungunya and

- Venezuelan equine encephalitis virus nsP3 macro domains define a conserved adenosine binding pocket, *J. Virol.* **2009**, *83*, 6534–6545.
- [81] H.-J. Lee, C.-K. Shieh, A. E. Gorbalenya, E. V. Koonin, N. La Monica, J. Tuler, A. Bagdzhadzhyan, M. M. C. Lai, The Complete Sequence (22 Kilobases) of Murine Coronavirus Gene 1 Encoding the Putative Proteases and RNA Polymerase, *Viol.* **1991**, *180*, 567–582.
- [82] K. Michalska, Y. Kim, R. Jedrzejczak, N. I. Maltseva, L. Stols, M. Endres, A. Joachimiak, Crystal structures of SARS-CoV-2 ADP-ribose phosphatase: from the apo form to ligand complexes, *IUCrJ.* **2020**, *7*, 814–824.
- [83] A. Putics, W. Filipowicz, J. Hall, A. E. Gorbalenya, J. Ziebuhr, ADP-ribose-1"-monophosphatase: a conserved coronavirus enzyme that is dispensable for viral replication in tissue culture, *J. Virol.* **2005**, *79*, 12721–12731.
- [84] M. Neuvonen, T. Ahola, Differential activities of cellular and viral macro domain proteins in binding of ADP-ribose metabolites, *J Mol Biol* **2009**, *385*, 212–225.
- [85] G. I. Karras, G. Kustatscher, H. R. Buhecha, M. D. Allen, C. Pugieux, F. Sait, M. Bycroft, A. G. Ladurner, The macro domain is an ADP-ribose binding module, *EMBO J.* **2005**, *24*.
- [86] C. Li, Y. Debing, G. Jankevicius, J. Neyts, I. Ahel, B. Coutard, B. Canard, Viral Macro Domains Reverse Protein ADP-Ribosylation, *J. Virol.* **2016**, *90*, 8478–8486.
- [87] X. Li, Y. Song, Targeting SARS-CoV-2 nonstructural protein 3: Function, structure, inhibition, and perspective in drug discovery, *Drug Discov Today* **2024**, *29*, 103832.
- [88] G. Jankevicius, M. Hassler, B. Golia, V. Rybin, M. Zacharias, G. Timinszky, A. G. Ladurner, A family of macrodomain proteins reverses cellular mono-ADP-ribosylation, *Nat Struct Mol Biol* **2013**, *20*, 508–514.
- [89] G. J. Correy, D. W. Kneller, G. Phillips, S. Pant, S. Russi, A. E. Cohen, G. Meigs, J. M. Holton, Gahbauer, Stefan, Thompson, Michael C., A. Ashworth *et al.*, The mechanisms of catalysis and ligand binding for the SARS-CoV-2 NSP3 macrodomain from neutron and x-ray diffraction at room temperature, *Sci. Adv.* **2022**, *8*, eabo5083.
- [90] K. K. Eriksson, L. Cervantes-Barragán, B. Ludewig, V. Thiel, Mouse hepatitis virus liver pathology is dependent on ADP-ribose-1"-phosphatase, a viral function conserved in the alpha-like supergroup, *J. Virol.* **2008**, *82*, 12325–12334.
- [91] J. J. O'Connor, D. Ferraris, A. R. Fehr, An Update on the Current State of SARS-CoV-2 Mac1 Inhibitors, *Pathogens* **2023**, *12*.
- [92] M. Dasovich, J. Zhuo, J. A. Goodman, A. Thomas, R. L. McPherson, A. K. Jayabalan, V. F. Busa, S.-J. Cheng, B. A. Murphy, K. R. Redinger *et al.*, High-Throughput Activity

- Assay for Screening Inhibitors of the SARS-CoV-2 Mac1 Macrodomein, *ACS Chem Biol* **2022**, *17*, 17–23.
- [93] A. Hochhaus, H. M. Kantarjian, M. Bacarani, J. H. Lipton, J. F. Apperley, B. J. Druker, T. Facon, S. L. Goldberg, F. Cervantes, D. Niederwieser *et al.*, Dasatinib induces notable hematologic and cytogenetic responses in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of imatinib therapy, *Blood* **2007**, *109*, 2303–2309.
- [94] X. Ni, M. Schröder, V. Olieric, M. E. Sharpe, V. Hernandez-Olmos, E. Proschak, D. Merk, S. Knapp, A. Chaikuad, Structural Insights into Plasticity and Discovery of Remdesivir Metabolite GS-441524 Binding in SARS-CoV-2 Macrodomein, *ACS Med Chem Lett* **2021**, *12*, 603–609.
- [95] K. J. Rijpkema, M. Schuller, M. S. van der Veer, S. Rieken, D. L. R. Chang, P. Balić, A. Todorov, H. Minnee, S. Wijngaarden, I. A. Matos *et al.*, Synthesis of Structural ADP-Ribose Analogues as Inhibitors for SARS-CoV-2 Macrodomein 1, *Org Lett* **2024**, *26*, 5700–5704.
- [96] M. Schuller, G. J. Correy, S. Gahbauer, D. Fearon, T. Wu, R. Efraín Díaz, I. D. Young, L. C. Martins, D. H. Smith, U. Schulze-Gahmen *et al.*, Fragment binding to the Nsp3 macrodomein of SARS-CoV-2 identified through crystallographic screening and computational docking, *Sci. Adv.* **2021**, *7*, eabf8711.
- [97] S. T. Sowa, A. Galera-Prat, S. Wazir, H. I. Alanen, M. M. Maksimainen, L. Lehtiö, A molecular toolbox for ADP-ribosyl binding proteins, *Cell Rep. Methods* **2021**, *1*, 100121.
- [98] S. Gahbauer, G. J. Correy, M. Schuller, M. P. Ferla, Y. U. Doruk, M. Rachman, T. Wu, M. Diolaiti, S. Wang, R. J. Neitz *et al.*, Iterative computational design and crystallographic screening identifies potent inhibitors targeting the Nsp3 macrodomein of SARS-CoV-2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2023**, *120*, e2212931120.
- [99] M. Sandmann, Development of inhibitors against the ADPR-binding macrodomein of the non-structural protein 3 of SARS-CoV-2. Dissertation, Universität Hamburg, **2024**.
- [100] R. Fliegert, J. M. Watt, A. Schöbel, M. D. Rozewitz, C. Moreau, T. Kirchberger, M. P. Thomas, W. Sick, A. C. Araujo, A. Harneit *et al.*, Ligand-induced activation of human TRPM2 requires the terminal ribose of ADPR and involves Arg1433 and Tyr1349, *Biochem. J.* **2017**, *474*, 2159–2175.
- [101] F. J. P. Kühn, J. M. Watt, B. V. L. Potter, A. Lückhoff, Different substrate specificities of the two ADPR binding sites in TRPM2 channels of *Nematostella vectensis* and the role of IDPR, *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 4985.
- [102] Paul-Ehrlich-Institut, COVID-19-Impfstoffe, <https://www.pei.de/>, **27.09.2024**.

-
- [103] European Medicines Agency, Spikevax (previously COVID-19 Vaccine Moderna), <https://www.ema.europa.eu/>, **27.09.2024**.
- [104] R. Patel, M. Kaki, V. S. Potluri, P. Kahar, D. Khanna, A comprehensive review of SARS-CoV-2 vaccines: Pfizer, Moderna & Johnson & Johnson, *Hum Vaccin Immunother* **2022**, *18*, 2002083.
- [105] S. M. R. Hashemian, A. Sheida, M. Taghizadieh, M. Y. Memar, M. R. Hamblin, H. Bannazadeh Baghi, J. Sadri Nahand, Z. Asemi, H. Mirzaei, Paxlovid (Nirmatrelvir/Ritonavir): A new approach to Covid-19 therapy?, *Biomed Pharmacother* **2023**, *162*, 114367.
- [106] A. Simonis, S. J. Theobald, G. Fätkenheuer, J. Rybniker, J. J. Malin, A comparative analysis of remdesivir and other repurposed antivirals against SARS-CoV-2, *EMBO Mol. Med.* **2021**, *13*, e13105.
- [107] S. Mulangu, L. E. Dodd, R. T. Davey, O. Tshiani Mbaya, M. Proschan, D. Mukadi, M. Lusakibanza Manzo, D. Nzolo, A. Tshomba Oloma, A. Ibanda *et al.*, A Randomized, Controlled Trial of Ebola Virus Disease Therapeutics, *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 2293–2303.
- [108] European Medicines Agency, Coronavirus disease (COVID-19), https://www.ema.europa.eu, **27.09.2024**.
- [109] European Medicines Agency, EMA endorses use of dexamethasone in COVID-19 patients on oxygen or mechanical ventilation, https://www.ema.europa.eu, **27.09.2024**.
- [110] World Health Organization, Corticosteroids, including dexamethasone, <https://www.who.int/>, **27.09.2024**.
- [111] N. M. Sarhan, A. E. A. Warda, H. S. G. Ibrahim, M. F. Schaalán, S. M. Fathy, Evaluation of infliximab/tocilizumab versus tocilizumab among COVID-19 patients with cytokine storm syndrome, *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 6456.
- [112] J. Rautio, H. Kumpulainen, T. Heimbach, R. Oliyai, D. Oh, T. Järvinen, J. Savolainen, Prodrugs: design and clinical applications, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 255–270.
- [113] L. P. Jordheim, D. Durantel, F. Zoulim, C. Dumontet, Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 447–464.
- [114] P. Ettmayer, G. L. Amidon, B. Clement, B. Testa, Lessons learned from marketed and investigational prodrugs, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2393–2404.
- [115] C. Meier, Nucleoside diphosphate and triphosphate prodrugs - An unsolvable task?, *Antivir. Chem. Chemother.* **2017**, *25*, 69–82.
-

- [116] D. N. Srivastva, D. Farquhar, Bioreversible Phosphate Protective Groups: Synthesis and Stability of Model Acyloxymethyl Phosphates, *Bioorg. Chem.* **1984**, *12*, 118–129.
- [117] C. McGuigan, R. N. Pathirana, N. Mahmood, K. G. Devine, A. J. Hay, Aryl phosphate derivatives of AZT retain activity against HIV1 in cell lines which are resistant to the action of AZT, *Antiviral Res.* **1992**, *17*, 311–321.
- [118] G. M. Keating, A. Vaidya, Sofosbuvir: first global approval, *Drugs* **2014**, *74*, 273–282.
- [119] C. Meier, J. Balzarini, Application of the cycloSal-prodrug approach for improving the biological potential of phosphorylated biomolecules, *Antiviral Res.* **2006**, *71*, 282–292.
- [120] C. Meier, A. Meerbach, J. Balzarini, CycloSal-pronucleotides - Development of first and second generation chemical trojan horses for antiviral chemotherapy, *Frontiers in Bioscience* **2004**, *9*, 873–890.
- [121] 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**, 1239–1245.
- [122] C. Meier, H. J. Jessen, J. Balzarini, Nucleoside diphosphate prodrugs, *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf.)* **2008**, 83–84.
- [123] 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.
- [124] L. Weinschenk, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier, Nucleoside Diphosphate Prodrugs: Nonsymmetric DiPPro-Nucleotides, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 6114–6130.
- [125] C. Meier, T. Schulz, L. Weinschenk, F. Pertenbreiter, J. Balzarini, Rational Development of Nucleoside Diphosphate Prodrugs: DiPPro-Compounds, *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 3933–3950.
- [126] T. Gollnest, T. Dinis de Oliveira, A. Rath, I. Hauber, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier, Membrane-permeable Triphosphate Prodrugs of Nucleoside Analogues, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2016**, *55*, 5255–5258.
- [127] T. Schulz, J. Balzarini, C. Meier, The DiPPro approach: synthesis, hydrolysis, and antiviral activity of lipophilic d4T diphosphate prodrugs, *ChemMedChem.* **2014**, *9*, 762–775.
- [128] H. J. Jessen, Untersuchung zur intrazellulären Freisetzung von Nucleosidphosphaten. Dissertation, Universität Hamburg, **2008**.

-
- [129] T. Gollnest, Das TriPPPPro-Konzept: Entwicklung und Charakterisierung von antiviralen Nukleosidtriphosphat-Prodrugs. Dissertation, Universität Hamburg, **2015**.
- [130] S. Mohamady, S. D. Taylor, General procedure for the synthesis of dinucleoside polyphosphates, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 6344–6349.
- [131] J. Witt, Synthese fluoreszenzmarkierter TriPPPPro-Verbindungen für Zellaufnahmestudien und Synthese antitumoraler TriPPPPro-Prodrugs. Dissertation, Universität Hamburg, **2022**.
- [132] S. Mohamady, D. L. Jakeman, An improved method for the synthesis of nucleoside triphosphate analogues, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10588–10591.
- [133] X. Luo, M. Li, K. Zhan, W. Yang, L. Zhang, K. Wang, P. Yu, L. Zhang, Selective inhibition of TRPM2 channel by two novel synthesized ADPR analogues, *Chem. Biol. Drug Des.* **2018**, *91*, 552–566.
- [134] V. Roy, R. Zerrouki, P. Krausz, G. Laumond, A. M. Aubertin, Synthesis and antiviral evaluation of AZT analogues with A spacer arm between glucidic and base moieties. Part II, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, *26*, 413–421.
- [135] M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi, A novel method for phosphorylation of nucleosides to 5'-nucleotides, *Tetrahedron Lett.* **1967**, *50*, 5065–5068.
- [136] M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi, Studies of Phosphorylation. III. Selective Phosphorylation of Unprotected Nucleosides, *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1969**, *42*, 3505–3508.
- [137] A. Collier, G. Wagner, A facile two-step synthesis of 8-arylated guanosine mono- and triphosphates (8-aryl GXP), *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 4526.
- [138] T. Kovás, L. Ötvös, Simple Synthesis of 5-Vinyl- and 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine-5'-triphosphates, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4525–4528.
- [139] B. S. Drown, T. Shirai, J. G. M. Rack, I. Ahel, P. J. Hergenrother, Monitoring Poly(ADP-ribosyl)glycohydrolase Activity with a Continuous Fluorescent Substrate, *Cell Chemical Biology* **2018**, *25*, 1562-1570.e19.
- [140] J. Huchting, Cyclo-Sal-Glycopyranosylphosphate - Ihre Darstellung sowie Anwendung als aktivierte Synthesebausteine. Dissertation, Universität Hamburg, **2014**.
- [141] M. A. Russell, A. P. Laws, J. H. Atherton, M. I. Page, The mechanism of the phosphoramidite synthesis of polynucleotides, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3270.
- [142] I. S. Reimer, 3'-S-Phosphorthiolatverbrückte Oligonucleotide und Fluoreszierende Nucleotid-Prodrugs für Zellaufnahmestudien. Dissertation, Universität Hamburg, **2017**.
- [143] V. T. Sterrenberg, Novel Pronucleotide Reporters for bioorthogonal Labeling of Nucleic Acids. Dissertation, Universität Hamburg, **2023**.
-

-
- [144] F. Pertenbreiter, Fluoreszenzmarkierte cycloSal- und DiPPPro-Nucleotide. Dissertation, Universität Hamburg, **2013**.
- [145] W. R. Birmingham, C. A. Starbird, T. D. Panosian, D. P. Nannemann, T. M. Iverson, B. O. Bachmann, Bioretrosynthetic construction of a didanosine biosynthetic pathway, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 392–399.
- [146] B. H. Dahl, J. Nielsen, O. Dahl, Mechanistic studies on the phosphoramidite coupling reaction in oligonucleotide synthesis. I. Evidence for nucleophilic catalysis by tetrazole and rate variations with phosphorus substituents., *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 1729–1743.
- [147] G. S. Cremosnik, A. Hofer, H. J. Jessen, Iterative Synthesis of Nucleoside Oligophosphates with Phosphoramidites, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 286–289.
- [148] G. J. Miller, S. U. Hansen, M. Baráth, C. Johannessen, E. W. Blanch, G. C. Jayson, J. M. Gardiner, Synthesis of a heparin-related GlcN-IdoA sulfation-site variable disaccharide library and analysis by Raman and ROA spectroscopy, *Carbohydr. Res.* **2014**, *400*, 44–53.
- [149] J. Clayden, N. Greeves, S. G. Warren, Organic chemistry, Oxford University Press, Oxford, **2012**, S. 1250.
- [150] B. Y. Kara, B. Kılbaş, H. Göksu, Selectivity and activity in catalytic hydrogenation of azido groups over Pd nanoparticles on aluminum oxy-hydroxide, *New J. Chem.* **2016**, *40*, 9550–9555.
- [151] T. Schneider, Synthese und Untersuchungen von maskierten ADPR-Derivaten. Dissertation, Universität Hamburg, **2022**.
- [152] A. Ruthenbeck, Functionalized Prodrugs of a bacterial RNAP-Inhibitor & Bio-reversibly masked purinergic 2nd Messenger derivatives associated with Ca²⁺ Signaling. Dissertation, Universität Hamburg, **2018**.
- [153] X. Jia, Membrane-Permeable Nucleoside Triphosphate Prodrugs of Anti-HIV Active Nucleoside Analogues: γ -(Phosphate or Phosphonate)-Modified Nucleotide Analogues. Dissertation, Universität Hamburg, **2020**.
- [154] H. J. Jessen, Untersuchung zur intrazellulären Freisetzung von Nucleosidphosphaten. Dissertation, Universität Hamburg, **2008**.
- [155] T. Gollnest, Das TriPPPro-Konzept: Entwicklung und Charakterisierung von antiviralen Nucleosidtriphosphat-Prodrugs. Dissertation, Universität Hamburg, **2015**.
- [156] S. Weising, V. Sterrenberg, D. Schols, C. Meier, Synthesis and Antiviral Evaluation of TriPPPro-AbacavirTP, TriPPPro-CarbovirTP, and Their 1',2'-cis-Disubstituted Analogues, *ChemMedChem.* **2018**, *13*, 1771–1778.
-

-
- [157] N. Jeschik, Synthese und Untersuchung diverser photocaged Adenosinverbindungen. Dissertation, Universität Hamburg, **2020**.
- [158] E. Nurminen, H. Lönnberg, Mechanisms of the substitution reactions of phosphoramidites and their congeners, *J. of Physical Organic Chem.* **2004**, *17*, 1–17.
- [159] A. Kraszewski, J. Stawinski, H-Phosphonates: Versatile synthetic precursors to biologically active phosphorus compounds, *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79*, 2217–2227.
- [160] X. Jia, D. Schols, C. Meier, Anti-HIV-Active Nucleoside Triphosphate Prodrugs, *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 6003–6027.
- [161] X. Jia, D. Schols, C. Meier, Lipophilic Nucleoside Triphosphate Prodrugs of Anti-HIV Active Nucleoside Analogs as Potential Antiviral Compounds, *Adv Sci (Weinh)* **2023**, *10*, e2306021.
- [162] C. Zhao, X. Jia, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier, γ -Non-Symmetrically Dimasked TriPPP Prodrugs as Potential Antiviral Agents against HIV, *ChemMedChem.* **2021**, *16*, 499–512.
- [163] H. B. Rasmussen, G. Jürgens, R. Thomsen, O. Taboureau, K. Zeth, P. E. Hansen, P. R. Hansen, Cellular Uptake and Intracellular Phosphorylation of GS-441524: Implications for Its Effectiveness against COVID-19, *Viruses* **2021**, *13*.
- [164] Z. Wang, L. Yang, X.-Q. Song, Oral GS-441524 derivatives: Next-generation inhibitors of SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase, *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 1015355.
- [165] M. S. Markoulides, A. C. Regan, Synthesis of phosphinate analogues of the phospholipid anti-tumour agent hexadecylphosphocholine (miltefosine), *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 2954–2956.
- [166] M. Qi, D. Wang, Y. Kong, B. Wang, X. Jiang, F. Yang, Synthesis method of monoalkyl phosphinate. Patent: CN102351900 A 2012-02-15, Anmelder: Jiangsu Youth Chemical Co., Ltd., Jiangsu Yangnong Chemical Co., Ltd., **2012**.
- [167] N. Jeschik, T. Schneider, C. Meier, Photocaged and Mixed Photocaged Bioreversible-Protected ATP Derivatives as Tools for the Controlled Release of ATP, *Eur. J. Org. Chem.* **2020**, *2020*, 6776–6789.
- [168] H. J. Jessen, T. Schulz, J. Balzarini, C. Meier, Bioreversible protection of nucleoside diphosphates, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 8719–8722.
- [169] X. Jia, D. Schols, C. Meier, Potent Anti-HIV Activity of Alkyl-Modified Di PP ro-Nucleotides, *Small Structures* **2024**, *5*.
- [170] O. Hernandez, S. K. Chaudhary, R. H. Cox, J. Porter, Synthesis and characterization of 4-dimethylamino--triphenylmethylpyridinium chloride, a postulated intermediate in the tritylation of alcohols, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1491–1494.
-

-
- [171] J. Lv, T. Luo, D. Zou, H. Dong, Using DMF as Both a Catalyst and Cosolvent for the Regioselective Silylation of Polyols and Diols, *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, 2019, 6383–6395.
- [172] S. Weising, Stereoselective synthesis of carbocyclic nucleoside analogues and their triphosphate prodrugs - Synthesis of γ -alkyl-modified nucleoside triphosphates. Dissertation, Universität Hamburg, **2018**.
- [173] I. Sarfraz, A. Rasul, I. Ucak, N. S. Lai, M. Asrar, Ş. Adem, Enzyme assay techniques and protocols, *Analytical Techniques in Biosciences* **2022**, 191–199.
- [174] H. Bisswanger, Enzyme assays, *Perspectives in Science* **2014**, 1, 41–55.
- [175] L. Qiao, S. Hao, Novel Trifluoromethylcoumarinyl Urea Derivatives: Synthesis, Characterization, Fluorescence, and Bioactivity, *Molecules* **2018**, 23.
- [176] S. J. Tajdar, Beiträge zur Synthese einer fluoreszenzmarkierten ADP-Ribose. Masterarbeit, Universität Hamburg, **2021**.
- [177] R. K. Scopes in *Encyclopedia of Life Sciences*, Wiley, **2005**.
- [178] C. N. Patel, D. W. Koh, M. K. Jacobson, M. A. Oliveira, Identification of three critical acidic residues of poly(ADP-ribose) glycohydrolase involved in catalysis: determining the PARG catalytic domain, *Biochem. J.* **2005**, 388, 493–500.
- [179] J. S. Cooperwood, V. Boyd, G. Gumina, C. K. Chu, Synthesis of L-3'-hydroxymethylribonucleosides, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2000**, 19, 219–236.
- [180] C. Fehér, Novel approaches for biotechnological production and application of L-arabinose, *J. Carbohydr. Chem.* **2018**, 37, 251–284.
- [181] Z. Li, C. Zheng, M. Terreni, T. Bavaro, M. Sollogoub, Y. Zhang, A Concise Synthesis of Oligosaccharides Derived From Lipoarabinomannan (LAM) with Glycosyl Donors Having a Nonparticipating Group at C2, *Eur. J. Org. Chem.* **2020**, 2020, 2033–2044.
- [182] Q. Qiu, X. Deng, L. Jiao, T. Zhao, F. Meng, W. Huang, H. Qian, A High-Sensitivity Coumarin-Based Fluorescent Probe for Monitoring Hydrogen Sulfide in Living Cells, *Chem. Biol. Drug Des.* **2015**, 86, 173–179.
- [183] P. Y. Bruice, Organische Chemie, Pearson Studium, **2007**.
- [184] C. Shen, J. Liu, W. Ouyang, H. Ding, J. Bai, Q. Xiao, Practical Synthesis of Fludarabine and Nelarabine, *Synthesis* **2020**, 52, 417–423.
- [185] H. Vorbrüggen, G. Höfle, Nucleoside Syntheses, XXIII 1) On the Mechanism of Nucleoside Synthesis, *Chem. Ber.* **1981**, 114, 1256–1268.
-

-
- [186] T. Nukada, A. Berces, M. Z. Zgierski, D. M. Whitfield, Exploring the Mechanism of Neighboring Group Assisted Glycosylation Reactions, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13291–13295.
- [187] S. De, S. de Jonghe, P. Herdewijn, Synthesis of a 3'-Fluoro-3'-deoxytetrose Adenine Phosphonate, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 9464–9478.
- [188] I. Siddiqui, A. Singh, S. Shamim, V. Srivastava, P. Singh, S. Yadav, R. Singh, Recyclable Indium(III) Chloride Catalyzed Site-Selective Double Substitution in One Pot for the Synthesis of Isatin N-Ribonucleosides under Microwave Irradiation, *Synthesis* **2010**, *2010*, 1613–1616.
- [189] A. Schwögler, V. Gramlich, T. Carell, Synthesis and Properties of Flavin Ribofuranosides and Flavin Ribopyranosides, *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 2452–2463.
- [190] O. Mitsunobu, M. Eguchi, Preparation of Carboxylic Esters and Phosphoric Esters by the Activation of Alcohols, *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1971**, *44*, 3427–3430.
- [191] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2004**.
- [192] P. Frøyen, P. Juvvik, One-pot synthesis of secondary or tertiary amines from alcohols and amines via alkoxyphosphonium salts, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 9555–9558.
- [193] K. Pahnke, C. Meier, Synthesis of a Bioreversibly Masked Lipophilic Adenosine Diphosphate Ribose Derivative, *Chembiochem* **2017**, *18*, 1616–1626.
- [194] GESTIS, GESTIS-Stoffdatenbank, <http://gestis.itrust.de/>, **05.08.2024**.
- [195] Sigma-Aldrich, Sicherheitsdatenblatt, <https://sigmaaldrich.com/>, **05.08.2024**.

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Chris Meier danke ich für die Bereitstellung des äußerst interessanten und vielseitigen Themas, den wissenschaftlichen Freiraum, die exzellenten Arbeitsbedingungen und die fachlichen Anregungen, die diese Promotion erst möglich gemacht haben. Herrn Prof. Dr. Ralph Holl danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Maximilian Sandmann, Dr. Ralf Fliegert und Dr. Susanne Pfefferle danke ich für die konstruktive, hervorragende und lockere Zusammenarbeit während unseres Projektes. Hierbei möchte ich mich vor allem bei Max für die langen und aufschlussreichen Gespräche sowie die Durchführung zahlreicher Assays und Studien bedanken.

Weiterhin danke ich dem technischen Personal der NMR-Abteilung unter der Leitung von Dr. Hackl und dem technischen Personal der MS-Abteilung unter der Leitung von Dr. Jennifer Menzel für die Messung zahlreicher NMR- und MS-Proben.

Dem gesamten AK Meier danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre, den fachlichen Austausch und die leckersten sowie häufigen Kuchenpausen. Mein großer Dank gilt meinen Laborpartnern Sarah, Melanie und Dominik. Ohne euch wäre die Zeit im Labor nicht so toll, laut, lustig und kunterbunt gewesen. Eure Ratschläge, Ideen und zahlreichen Fachgespräche habe ich immer sehr geschätzt. Auch Streiche spielen hat mit euch immer am meisten Spaß gebracht. Ebenfalls sehr dankbar bin ich für Michelle, Celine und Iven die ebenfalls für jeden Spaß zu haben waren und immer ein offenes Ohr für mich hatten. Letzterem danke ich darüber hinaus für das sorgfältige Korrigieren meiner Dissertation.

Für das gesamte Studium möchte ich mich bei Adu, Jenny, Marie, Sina und Wladi bedanken, die mich seit meinem ersten Bachelorsemester begleitet haben und mit denen ich gelacht, geweint und gefeiert habe sowie mich immer unterstützt haben, sodass ich über mich hinausgewachsen bin.

Ebenfalls danke ich meinen Praktikanten und Bacheloranden Giada, Heddy, Patricia, Jakob und Jenny, die meine Promotion durch ihre synthetischen Arbeiten sehr bereichert haben. Von Herzen danke ich meinen Eltern und meinen Geschwistern Laila und Raffael für die grenzenlose Unterstützung während meines Studiums und darüber hinaus. Und dafür, dass sie immer gespannt zugehört haben, wenn ich über meine Promotion gesprochen habe, auch wenn sie nichts verstanden haben. Außerdem danke ich euch dafür, dass ihr immer für mich da seid und dass ich mich auf euch verlassen kann.

Zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank Daniel, der mein Fels in der Brandung ist. Ich danke Ihm für seine außerordentliche Strapazierfähigkeit, seine unermüdliche Unterstützung in allen Lebenslagen, seine liebevolle Art mir Stress zu machen und dafür, dass er mich so glücklich macht.

11 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.

Datum, Unterschrift