Neue Synthese phosphorylierter Biokonjugate aus *cyclo*Sal-aktivierten Nucleotiden

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

von

Svenja Warnecke

aus Hamburg

vorgelegt dem Department Chemie

der Universität Hamburg

Hamburg 2010

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Chris Meier in der Zeit von März 2006 bis Oktober 2009 angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Chris Meier
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Wittko Francke

Datum der Disputation: 09.04.2010

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Chris Meier danke ich für die interessante Themenstellung, die intensive fachliche Betreuung und die hervorragenden experimentellen Bedingungen zur Durchführung dieser Arbeit sowie für zahlreiche Diskussionen und Anregungen.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Wittko Francke danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens, Frau Dr. Brita Werner und Herrn Prof. Dr. Markus Fischer danke ich für die Teilnahme am Dissertationskolloquium.

Mein Dank gilt allen Studenten, die mich im Rahmen von Praktika unterstützt haben, sowie allen Mitarbeitern des Fachbereiches Chemie, die mir bei der Durchführung meiner Arbeit hilfreich zur Seite standen. Dr. V. Sinnwell, Dr. E. T. K. Haupt und ihren Teams danke ich für die Messung zahlreicher NMR-Spektren. Für die Messung der Massenspektren bedanke ich mich bei Frau C. Christ, Frau A. Meiners, Frau G. Graack und Herrn M. Preuße.

Allen aktiven und ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises danke ich für die gute Zusammenarbeit, die stete Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima.

Mein spezieller Dank gilt der gesamten Laborbesetzung von U 515: Jens O. (Steiner) Thomann, Ulf. F. Görbig, Henning J. Jessen, Tilmann Schulz, Viktoria Tonn und Saskia Wolf für die hervorragende Arbeitsatmosphäre, die ständige Hilfsbereitschaft und den exklusiven Musikgeschmack. Meinen Kollegen Maike Jacobsen, Viktoria Tonn und Sönke Jessel danke ich für ihre motivierende Diskussionsbereitschaft in aktuellen Lebensfragen. Bei Johanna Huchting und Lina Richter bedanke ich mich für die aufmunternde Gesellschaft in direkter Nachbarschaft während der Erstellung dieses Manuskriptes.

Ein ganz herzlicher Dank geht erneut an Viktoria Tonn und Saskia Wolf für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und Großeltern sowie meinem Freund Samir Chawki für ihr Interesse, ihren Zuspruch und ihre Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion.

ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

A	Adenosin
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
abs.	Absolut
Ac	Acetyl
Acc	Acceptor
3'-*O*AcdT	3'-*O*-Acetyl-2'-desoxythymidin
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Ap_4A	Diadenosintetraphosphat
Ap_3A	Diadenosintriphosphat
Äquiv.	Moläquivalente
ATP	Adenosintriphosphat
AZT	3'-Azido-2',3'-didesoxythymidin
ber.	berechnet
Bn	Benzyl
Bu	Butyl
BvdU	(*E*)-5-(2-Bromvinyl)-2'-desoxyuridin
C	Cytidin
$CDCl_3$	Deuterochloroform
COSY	Korrelations-Spektroskopie (correlation spectroscopy)
CRL	Candida rugosa Lipase
δ	chemische Verschiebung
*cyclo*Sal	*cyclo*-Saligenyl
d	Dublett (NMR)
d	2'-Desoxy (Nucleoside / Nucleotide)
d4	2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydro (Nucleoside / Nucleotide)
DBU	Diazabicycloundecan
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett von Dublett (NMR)
dd	2',3'-Didesoxy (Nucleoside / Nucleotide)

ddd	Dreifachdublett (NMR)
dest.	destilliert
DIAD	Di*iso*propylazodicarboxylat
DIPEA	Di*iso*propylethylamin
DMF	*N*,*N*-Dimethylformamid
DMSO-d_6	Dimethylsulfoxid (sechsfach deuteriert)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
D_2O	Deuteriumoxid
DP	Diphosphat
d4T	2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydrothymidin
dT	2'-Desoxythymidin
dt	Doppeltriplett
EBV	Ebstein-Barr Virus
EE	Ethylacetat
EI	Elektronenstossionisation
ESI	Elektronensprayionisation
Et	Ethyl
EtOH	Ethanol
FAB	Fast Atom Bombardment
G	Guanosin
Gal	Galactose
gef.	gefunden
Glu	Glucose
h	Stende
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HOAc	Essigsäure
HR	High Resolution
Hz	Hertz
i	iso
IR	Infrarot
J	skalare Kern-Kern-Kopplungskonstante
kat.	katalytisch
konz.	Konzentriert
M	Molar (mol/L)

m	Multiplett (NMR)
Man	Mannose
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
min	Minute
MP	Monophosphat
MS	Massenspektrometrie
N	Normal
NAD	Nicotinamidadenosindiucleotid
NAR	Nicotinamidribonucleosid
neg.	negativ
β-NMN	Nicotinamid-β-ribonucleotid
NDP	Nucleosiddiphosphat
Neu5Ac	*N*-Acetylneuraminsäure
NMP	Nucleosidmonophosphat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Np_nN	Dinucleosidpolyphosphate (n= 2-7)
NTP	Nucleosidtriphosphat
Nu	Nucleophil
o	ortho
p	para
PE	Petrolether
Ph	Phenyl
*i*Pr	*iso*-Propanol
Py	Pyridin
ppm	parts per million
q	Quadruplett (NMR)
quant.	quantitativ
R_f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleinsäure

RP	Reversed Phase
rt	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR)
SalOH	Salicylalkohol
t	Triplett (NMR)
t	Zeit
$t_{1/2}$	Hydrolysehalbwertszeit
tert	tertiär
T	2'-Desoxythymidin
TBDMS	*tert*-Butyldimethylsilyl
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
TK	Thymidin-Kinase
TMS	Trimethylsilyl
TP	Triphosphat
U	Uridin
v/v	Volumenanteile
w/w	Gewichtsanteile

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG 1

2. KENNTNISSTAND 5

2.1 Synthese phosphorylierter Biokonjugate 5
2.1.1 Darstellung von Nucleosid-5'-triphosphaten 5
2.1.2 Darstellung von Dinucleosid-5',5'-oligophosphaten 9
2.1.3 Darstellung von Nucleosidmonophosphatpyranosen 11
2.2 Das *cyclo*Sal-Konzept 14
2.3 Synthetisches Potential von *cyclo*Sal-Nucleotiden 18

3. AUFGABENSTELLUNG 23

4. RESULTATE UND DISKUSSION 24

4.1 Synthesestrategie 24
4.2 Darstellung von *cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphaten 26
4.2.1 Darstellung von 5-NO_2-*cyclo*Sal-NMPs aus NMP-Dichloridaten 26
4.2.2 Synthese von *cyclo*Sal-NMPs aus *cyclo*Saligenylphosphorchloridaten 31
4.2.3 Optimierung der P(III)-Route für 5-Nitro-*cyclo*Sal-NMPs 34
4.2.4 Darstellung der Salicylalkohole 41
4.2.5 Darstellung der Saligenylchlorphosphite 42
4.2.6 Darstellung der modifizierten Nucleoside 43
4.2.7 Darstellung der *cyclo*Sal-Nucleotide 45
4.3 Darstellung der Zielverbindungen 47
4.4 Darstellung von Nucleosid-5'-di- und –triphosphaten 49
4.4.1 Optimierung der N(D)TP-Synthese 50
4.4.2 Synthese der N(D)TPs ausgehend von 5-NO_2-*cyclo*Sal-NMPs 55
4.4.3 Analytik und Charakterisierung der dargestellten NT(D)Ps 58
4.5 Darstellung von Dinucleosidoligophosphaten 61
4.5.1 Synthese der Dinucleosiddiphosphate 61
4.5.2 Versuch der Synthese von NAD 67
4.5.3 Synthese der Dinucleosidtetraphosphate 81
4.5.4 Synthese von Diadenosintriphosphat 88
4.5.5 Analytik und Charakterisierung der Dinucleosid-5',5'-oligophosphate 89
4.6 Darstellung von Nucleosidmonophosphatpyranosen 94
4.6.1 Synthese der 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-glycoside 96
4.6.2 Synthese der Nucleosidmonophosphatpyranosen 97
4.6.3 Analytik und Charakterisierung der dargestellten NMP-Pyranosen 104
4.6.4 Synthese von *N*-Acetylneuraminsäure-Nucleotiden 106
4.7 Fazit 119

5. ZUSAMMENFASSUNG 120

6. SUMMARY 126

7. AUSBLICK 130

8. EXPERIMENTELLER TEIL 134

8.1 Allgemeines 134
8.1.1 Edukte und Reagenzien 134
8.1.2 Lösungsmittel 134
8.1.3 Absolute Lösungsmittel 134
8.1.4 Chromatographie 135
8.1.5 Spektroskopie 136
8.1.6 Geräte 137
8.2 Synthesen 137
8.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV) 137
8.2.2 Synthese der modifizierten Nucleoside 142
8.2.3 Synthese der Salicylalkohole 149
8.2.4 Synthese der *cyclo*Saligenylchlorphosphite 151
8.2.5 Synthese der *cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphate 152
8.2.6 Synthese der Nucleophile 160
8.2.7 Synthese der Nucleosid-5'-di und –triphosphate 169
8.2.8 Synthese der Dinucleosid-5',5'-oligophosphate 177
8.2.9 Versuch der Synthese von Nicotinamidadenosindinucleotid 184
8.2.10 Synthese der Nucleosidmonophosphatpyranosen 192

9. GEFAHRSTOFFVERZEICHNIS 201

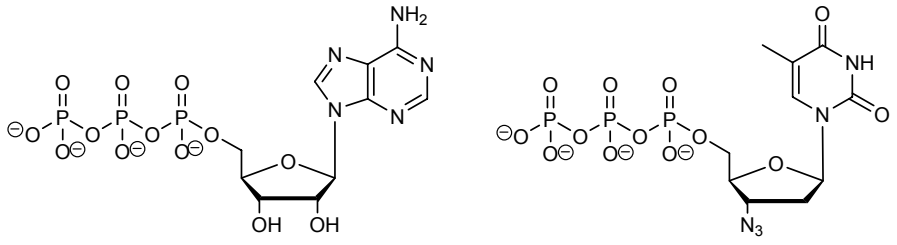
10. LITERATURVERZEICHNIS 204

1. EINLEITUNG

Phosphorylierte Naturstoffe übernehmen in biologischen Systemen eine Vielzahl verschiedenster Aufgaben, die für nahezu alle lebenden Organismen von enormer Bedeutung sind. Dies zeigt sich neben ihrer maßgeblichen Beteiligung an der Energetik des Stoffwechsels, besonders an dem Vorliegen vieler Metabolite in der phosphorylierten Form bei nahezu allen Biosynthesen.

Dieser Umstand gewinnt aus medizinischer Sicht zusätzlich an Bedeutung, da therapeutische Ansätze zum Teil direkt in bestimmte Stoffwechselprozesse eingreifen, weshalb phosphorylierten Substanzen oft ein großes pharmakologisches Potential zukommt. Die immense Relevanz von Phosphatgruppen in Naturstoffen soll anhand der folgenden Beispiele näher erläutert werden.

Während alle natürlich vorkommenden Ribo- und Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate (NTPs, dNTPs) die elementaren Bausteine der enzymkatalysierten RNA- beziehungsweise DNA-Synthese sind, nimmt Adenosintriphosphat **1** (ATP) zusätzlich eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel als wichtigster Überträger freier Enthalpie ein (Abbildung 1, links).[1] Modifizierte NTP-Analoga, wie z.B. 3'-Azido-2',3'-didesoxythymidintriphosphat **2** (AZT, Abbildung 1, rechts), besitzen ein großes therapeutisches Potential bei der Bekämpfung verschiedener viraler Erkrankungen und werden beispielsweise seit langem erfolgreich als Reverse-Transkriptase Inhibitoren in der HIV-Therapie eingesetzt. Durch das Fehlen der 3'-OH-Gruppe kommt es nach ihrem Einbau in den viralen DNA-Strang zum Kettenabbruch. Die genetische Information des Virus bleibt somit unvollständig.[2]



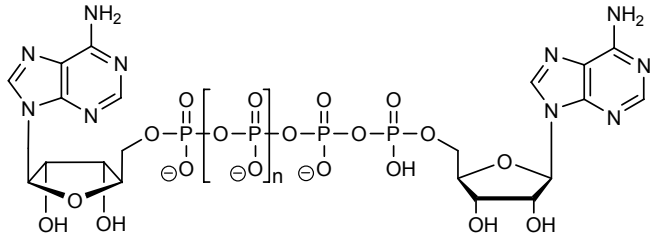
Adenosin-5'-triphosphat **1** 3'-Azido-2'-3'-didesoxythymidin-5'-triphosphat **2**

Abbildung 1: ATP **1** und AZTTP **2**

Darüber hinaus spielen Nucleosidtriphosphate heutzutage bei einer Vielzahl weiterer biologischer und pharmakologischer Prozesse eine wichtige Rolle. So finden sie unter anderem als Substrate in Polymerasekettenreakionen, zur DNA-Sequenzierung

sowie zur Synthese von Aptameren durch *in vitro* Transkription Anwendung,[3] weshalb ein genereller chemischer Zugang, insbesondere zu modifizierten NTPs, unabdingbar ist.

Ein weiteres Beispiel, das die Relevanz von phosphorylierten Naturstoffen belegt, stellt die Klasse der Dinucleosid-5',5'-oligophosphate (Np_nN, n = 2-7) dar.
Obgleich die biologischen Funktionen von Np_nNs, sieht man einmal von NAD als bedeutendem Coenzym ab, bisher nicht vollständig erforscht sind, lässt ihre Beteiligung an zahlreichen zellulären Prozessen sowie ihre extrazelluläre Signalfunktion als Transmittersubstanzen die Bedeutung dieser Verbindungsklasse bereits erkennen.[4-6] Diadenosinoligophosphate (Ap_3A **3**, Ap_4A **4**, Ap_5A **5**, Abbildung 2) spielen beispielsweise bei einer ganze Reihe von biologischen Effekten in unterschiedlichsten Geweben und Zellen eine Rolle. So beeinflussen sie neben zellulären Funktionen, wie der Stimulation der DNA-Synthese und der Aktivierung der Gentranskription, auch Membranfunktionen (Calciumoszillation und –freisetzung, Blockade von K_{ATP}-Kanälen) sowie Zellen und Gewebe als Ganzes (Vasokonstriktion, Vasodilatation, Hemmung der ADP-induzierten Thrombozytenaggreation).[7-12]



n=0: Ap_3A **3**, n=1: Ap_4A **4**, n=2: Ap_5A **5**

Abbildung 2: Diadenosin-5',5'-oligophosphate **3**-**5**

Therapeutisches Potential besitzt diese Substanzklasse z.B. bei der Inhibition der Blutplättchenaggregation,[13] bei Studien zur Regulation der Gluconeogenese und der Glucoseaufnahme sowie bei der Regulation der Gefäßaktivität (Blutdruckregulation),[14] weshalb auch in diesem Fall das Interesse an einer generellen Methode zur Synthese dieser Verbindungen und ihrer Analoga enorm ist.

Als abschließendes Beispiel soll die Substanzklasse der Zuckernucleotide dienen. Zuckernucleotide stellen als aktivierte Monosaccharide die Schlüsselsubstanzen in

der Biosynthese von Oligo- und Polysacchariden dar. Als Substrate verschiedener Glycosyltransferasen spielen sie zudem eine fundamentale Rolle als Glycosyldonatoren bei der Synthese von Glycoproteinen und Glycolipiden.[15] Generell handelt es sich bei dieser Substanzklasse um Nucleosiddiphosphatpyranosen (NDP-Pyranosen, Abbildung 3, links), lediglich bei 3-Desoxy-2-glyculosonaten, wie beispielsweise *N*-Acetylneuraminsäure **6**, erfolgt die Aktivierung durch entsprechende Nucleosidmonophosphatpyranosen (NMP-Pyranosen, Abbildung 3, rechts).[16] Die anomere Phosphatester-Gruppe der Zuckernucleotide aktiviert den Glycosylrest für enzymatische Übertragungsreaktionen, während der Nucleosid-Rest Glycosyl-Transferasen oder Isomerasen als zusätzliches Erkennungsmerkmal für spezifische Umsetzungen dient.

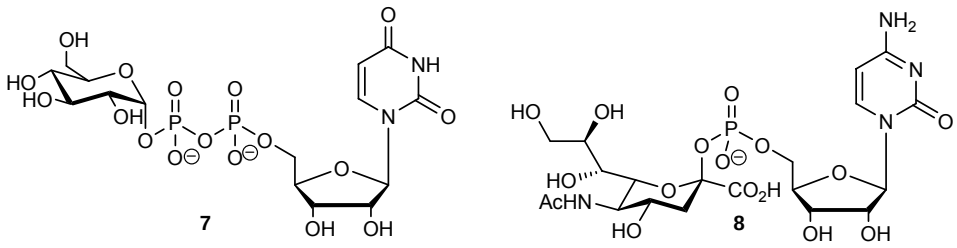


Abbildung 3: UDP-α-D-Glucose **7** und CMP-*N*-Acetylneuraminsäure **8** als Beispiele für aktivierte Monosaccharide

CMP-*N*-Acetylneuraminsäure **8** stellt als aktivierter Sialinsäuredonor ein besonders interessantes Zielmolekül für pharmakologische Studien dar, da z.B. in Säugetieren kaum biologische Vorgänge existieren, an deren Verlauf Sialinsäuren nicht beteiligt sind. Unter dem Begriff Sialinsäuren werden die mittlerweile mehr als 40 bekannten Derivate der Neuraminsäure zusammengefasst. Sie stellen allesamt acide Aminozucker mit einem Grundgerüst bestehend aus neun Kohlenstoffatomen dar.[17] Sialinsäurehaltige Glycokonjugate spielen bei einer Reihe fundamentaler physiologischer und pathologischer Vorgänge, wie beispielsweise der Zell-Zell-Erkennung, der Embryogenese, der Organbildung, der Immunabwehr, bei Entzündungsprozessen, aber auch beim Eindringen von Pathogenen eine entscheidende Rolle.[18] Die Influenzainfektion ist das bislang bedeutendste Beispiel einer sialinsäurevermittelten Zell-Virus-Interaktion, bei der sowohl das Eindringen des Virus in die Zelle als auch das Freisetzen neuer Viruspartikel über sialinsäurehaltige Verbindungen verläuft.[19] Diesbezüglich existieren bereits erste Therapieansätze. Um jedoch das gesamte pharmakologische Potential der

Sialinsäuren ausschöpfen zu können, ist ein effektiver, synthetischer Zugang, insbesondere zur aktivierten Form der Neuraminsäuren und ihrer Analoga, von entscheidender Bedeutung.

Diese Arbeit befasst sich mit der Entwicklung eines möglichst breit anwendbaren und effizienten Verfahrens zur chemischen Synthese unterschiedlicher phosphorylierter Biokonjugate auf Basis von *cyclo*Sal-aktivierten Nucleotiden.

2. KENNTNISSTAND

2.1 Synthese phosphorylierter Biokonjugate

Aufgrund der enormen Relevanz phosphorylierter Naturstoffe in biologischen Systemen ist der synthetische Zugang zu derartigen Verbindungen von großem pharmakologischem Interesse. Allerdings stellt neben der eigentlichen Synthese besonders häufig die Isolierung dieser mehrfach geladenen Verbindungen ein großes Problem dar. Durch die Umsetzung von hoch geladenen, polaren Reagenzien, wie z.B. Pyrophosphaten oder Nucleosidtriphosphaten, mit lipophilen geschützten Nucleosiden wird zum einen die Darstellung dieser Verbindungen erheblich erschwert, zum anderen ist die Isolierung eines geladenen, wasserlöslichen Produktes aus einer Mischung von hydrophilen und hydrophoben Bestandteilen sehr problematisch.

2.1.1 Darstellung von Nucleosid-5'-triphosphaten

Nucleosid-5'-triphosphate stellen eine Klasse von außerordentlich wichtigen Verbindungen in biologischen Systemen dar. Mit der Entdeckung ihres großen biologischen und pharmakologischen Potentials wurden NTPs verstärkt *in vitro* synthetisiert. In der Fachliteratur findet sich eine Reihe von Methoden zur Darstellung dieser Verbindungen. Nachfolgend werden die wichtigsten chemischen und enzymatischen Synthesen kurz vorgestellt.

Die am meisten genutzte Synthesestrategie zur chemischen Darstellung von Nucleosidtriphosphaten basiert auf dem nucleophilen Angriff eines Pyrophosphat-Salzes **9** auf ein aktiviertes Nucleotid **10**.

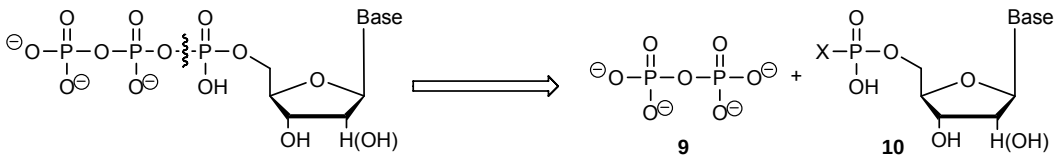


Abbildung 4: Synthesestrategie zur chemischen Darstellung von NTPs

Die Aktivierung des Nucleotids kann durch verschiedene Austrittsgruppen X erfolgen. In den vergangenen Jahren wurde die chemische Synthese von NTPs ausgehend

von Nucleosidphosphormorpholidaten,[20,21] –amidaten[22,23] oder –imidazolidaten[24,25] intensiv genutzt. In den meisten Fällen verlief die Umsetzung zum Triphosphat allerdings nur sehr langsam und mit moderaten Ausbeuten.

Eine in der Vergangenheit in diesem Zusammenhang sehr häufig genutzte Methode zur Synthese von Nucleosidtriphosphaten geht auf *J. Ludwig*[26] und andere[27] zurück. Die sogenannte „one-pot, three-step"-Methode umfasst die Generierung eines Dichlornucleosidmonophosphates nach *Yoshikawa*,[28] gefolgt von der direkten Umsetzung mit Bis-(tri-*n*-butylammonium)-pyrophosphat (Abbildung 5).

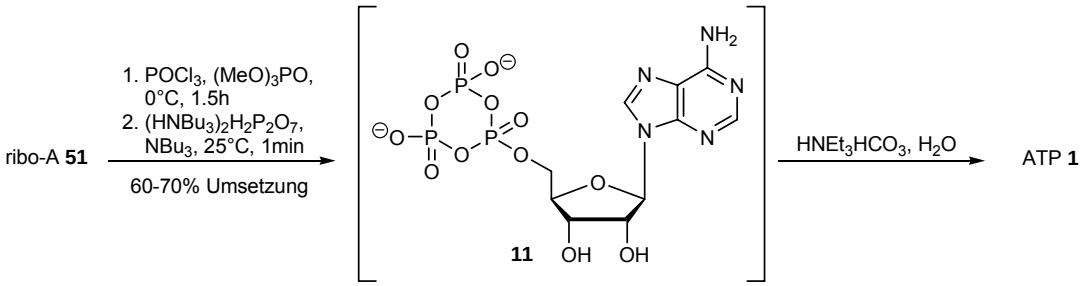


Abbildung 5: „One-pot, three-step"-Triphosphatsynthese nach J. Ludwig

Der für diese Umsetzung postulierte Mechanismus beinhaltet die Bildung eines cyclischen Trimetaphosphatalkyl-Intermediats **11**,[29-31] das im nachfolgenden Hydrolyseschritt das gewünschte Nucleosidtriphosphat liefert. Untersuchungen haben gezeigt, dass sowohl der Phosphorylierungsschritt nicht vollständig regioselektiv verläuft, sondern auch die weitere Umsetzung des Nucleosiddichlorophosphats zum entsprechenden NTP nicht quantitativ ist, sodass auf diesem Wege maximal 60-70% des Rohproduktes erhalten werden. Zudem beschränkt sich diese Methode auf Nucleosid-Derivate, die unempfindlich gegenüber den Bedingungen der Monophosphorylierung nach *Yoshikawa* sind. Dies macht den Einsatz von modifizierten Nucleosiden nur sehr eingeschränkt möglich.[32] Alken-funktionalisierte Nucleoside, können auf diesem Wege beispielsweise nicht phosphoryliert werden, da das bei der Reaktion aus $P(O)Cl_3$ entstehende HCl an die Alkenfunktion addiert.[33]

Ein anderer Weg zur Synthese von Nucleosid-5'-triphosphaten basiert auf dem Einsatz von aktivierten Nucleosid-5'-phosphiten oder –phosphoramiditen.

Frühzeitig wurden dazu Arbeiten von *J. Ludwig* und *F. Eckstein* veröffentlicht,[34] in denen Nucleoside mit einem Salicylsäurephosphorchloridit **12** zu reaktiven Nucleosid-5'-phosphiten **13** umgesetzt wurden. Diese wurden anschließend *in situ* mit Bis-(tri-*n*-butylammonium)-pyrophosphat in zwei aufeinander folgenden nucleophilen Substitutionsreaktionen zunächst zu einem cyclischen Intermediat **14** umgesetzt, das nach Oxidation und Hydrolyse das entsprechende Triphosphat **15** liefert. Eine Modifikation der Oxidationsbedingungen macht außerdem den Zugang zu diastereomeren Nucleosyl-5'-*O*-(1-thio)triphosphaten **16** möglich (Abbildung 6).

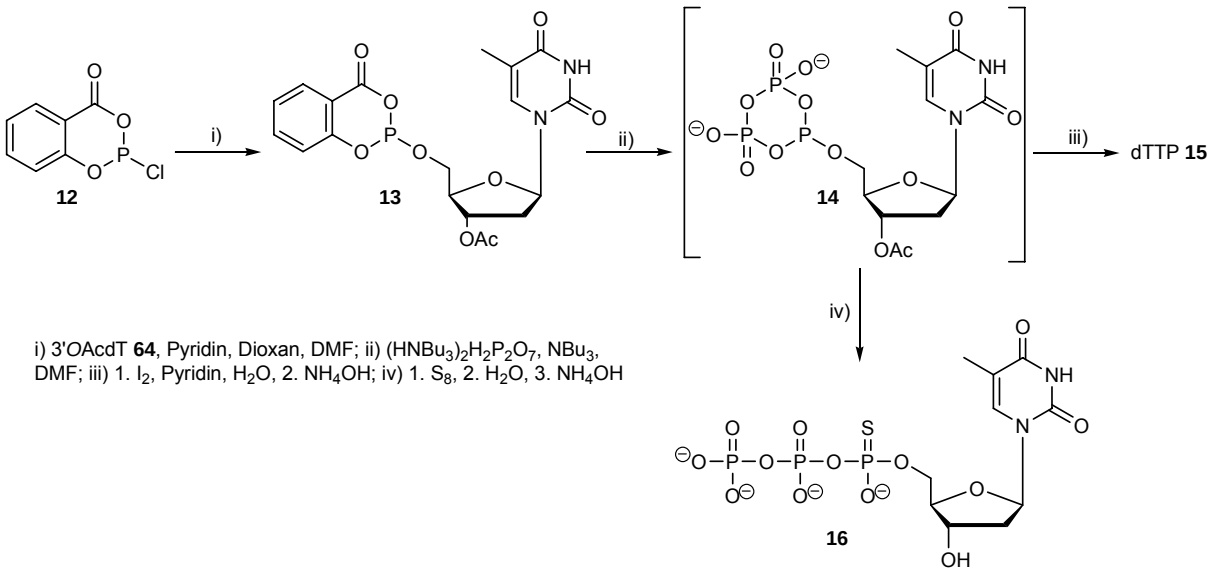


Abbildung 6: Synthese von Nucleosid-5'-triphosphaten und 5'-*O*-(1-thio)NTPs nach Ludwig/Eckstein

2'-Desoxythymidintriphosphat **15** wurde auf diesem Weg in einer Gesamtausbeute von 72% erhalten. Dieses Ergebnis konnte allerdings im Rahmen dieser Arbeit unter analogen Reaktionsbedingungen nicht reproduziert werden (s. S. 53, 54).

Ein verhältnismäßig neuer Ansatz zur chemischen Synthese von NTPs wurde von *V. S. Bogachev et al.* entwickelt und einige Jahre später von *D. L. Jakeman* auf die Synthese verschiedener 5'-β,γ-modifizierter Nucleosidtriphosphate übertragen.[35,36] Hierbei wird das Nucleosid zunächst mit Trifluoressigsäureanhydrid in Gegenwart von Triethylamin umgesetzt und im Anschluss mit *N*-Methylimidazol für die Phosphorylierungsreaktion aktiviert. Auf diesem Weg wurden Ausbeuten für die Triphosphate der Nucleoside A, T, G und C zwischen 89% und 92% erhalten. Allerdings erschien diese Arbeit nur in der russischen Literatur und wurde bisher

lediglich von *Jakeman* aufgegriffen und für die Synthese hydrolysestabiler NTP-Analoga verwendet (Abbildung 7).

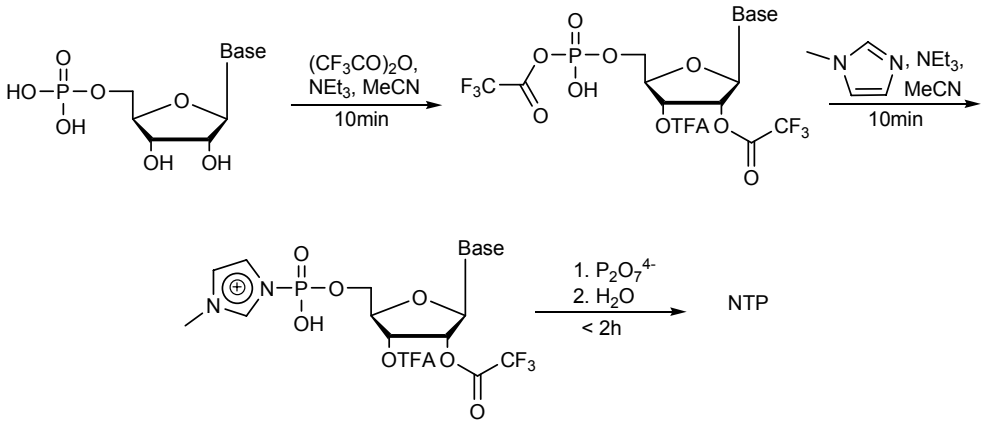


Abbildung 7: Synthese von Nucleosidtriphosphaten ausgehend von NMP-*N*-methylimidazolidaten

Als Vorteile dieser Methode sind die kurzen Reaktionszeiten sowie der direkte Einsatz der kommerziell erhältlichen Nucleotide (freie Säure, Mononatrium- oder Dinatriumsalz) zu sehen, da durch die Verwendung eines großen Überschusses an Trifluoressigsäureanhydrid sowohl die Löslichkeit der NMPs in Acetonitril als auch die Abwesenheit restlicher Wasserspuren gewährleistet ist. Andererseits könnte sich ein großer Überschuss an Trifluoressigsäureanhydrid bei empfindlicheren Nucleosiden auch nachteilig auf die Ausbeute auswirken.

Die Vorteile einer enzymatischen Synthese von Nucleosidtriphosphaten bestehen zum einen in der hohen Regioselektivität der Reaktion sowie in dem Verzicht auf Schutzgruppen.
G. M Whitesides et al. publizierten frühzeitig einen hocheffizienten, enzymatischen Zugang zu ATP,[37] das auf diese Weise zu 98% aus Adenosin **51** und Acetylphosphat erhalten wurde. Enzymkatalysierte Reaktionen setzen allerdings die Etablierung einer ganzen Kette von enzymatischen Reaktionen voraus. Im Fall der Umwandlung von Adenosin **51** in ATP **1** sind drei Enzyme beteiligt (Abbildung 8). Zunächst erfolgt eine Kinase-katalysierte Phosphorylierung des Nucleosids zum AMP, das anschließend durch die Adenylatkinase zum Adenosyldiphosphat (ADP) weiter umgesetzt wird. Für beide Schritte werden katalytische Mengen des ATPs selbst benötigt. Den letzten Schritt stellt die Acetatkinase-katalysierte Reaktion von ADP mit Acetylphosphat zu ATP **1** dar.

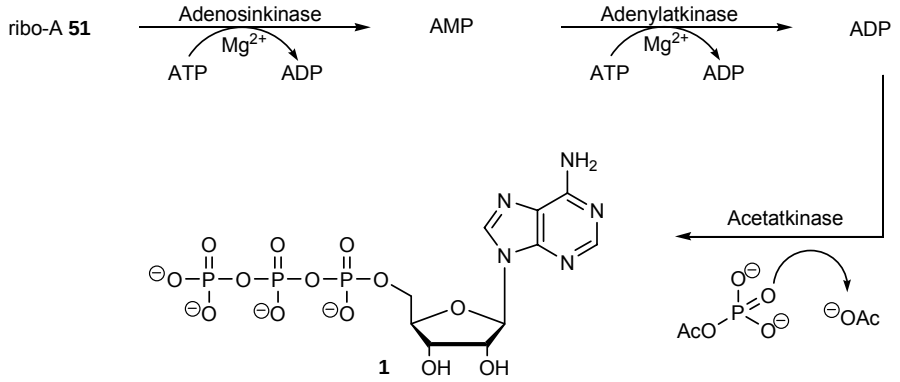


Abbildung 8: Enzymkatalysierte Synthese von ATP **1**

Auch wenn mittlerweile, aufgrund der kommerziellen Verfügbarkeit der verschiedenen phosphorylierenden Enzyme, die natürlichen NTPs und dNTPs auf diesem Weg im Grammmaßstab zugänglich sind, ist der Fortschritt dieser Methode in Bezug auf nicht natürliche Donorsubstrate durch die oftmals hohe Substratspezifität der meisten Enzyme momentan noch stark eingeschränkt.

2.1.2 Darstellung von Dinucleosid-5',5'-oligophosphaten

Auf die große Bedeutung von Dinucleosidoligophosphaten wie z.B. Ap_4A **4** als Signal- und als Regulationsmoleküle für viele biologische Funktionen[4,6] wurde einleitend bereits eingegangen. Eine Syntheseroute, die auf einer chemischen Methode basiert, ist also sehr wünschenswert, da enzymatische Verfahren erstens in ihrer Ansatzgröße beschränkt sind und zweitens nur zur Synthese von Derivaten mit natürlichen Nucleosiden geeignet sind.[38] Nachfolgend werden einige literaturbekannte Methoden zur Synthese von Dinucleosidtetraphosphaten beschrieben.
Die in der Vergangenheit vorwiegend genutzte Synthesestrategie zur chemischen Darstellung von Np_4Ns besteht, vergleichbar mit der Synthese der NTPs, in der Umsetzung eines Nucleosidtriphosphates mit einem aktivierten Nucleotid **10** (Abbildung 9).

Die Aktivierung des Nucleotids erfolgte dabei durch Morpholidate, Diphenylphosphorchloridate oder Imidazolidate,[25,39,40] jedoch verliefen die Kupplungsreaktionen in allen Fällen nur mit moderaten Ausbeuten.

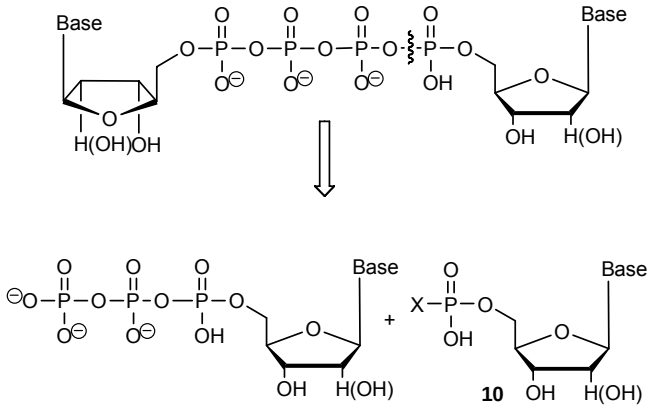


Abbildung 9: Synthesestrategie zur chemischen Darstellung von Np_4Ns

Auch Carbodiimde wurden in der Vergangenheit zur Aktivierung verwendet.[41-43] *G. M. Blackburn et al.* nutzten diese Methode bereits frühzeitig zur Synthese von Np_4N-Analoga. Allerdings waren auch in diesem Fall die Ausbeuten lediglich moderat, da oftmals ein Gemisch aus verschiedenen Produkten erhalten wurde.

Ein neuerer Ansatz zur Synthese dieser Verbindungsklasse wurde 2006 von *R. A. Jones et al.* publiziert.[44] In Analogie zu der Methode von *Ludwig* und *Eckstein*[34] erfolgt hier zunächst die Generierung eines cyclischen Trimetaphosphat-Intermediates **11**, welches im Folgenden jedoch nicht zum NTP hydrolysiert wird, sondern durch Nucleotide in Gegenwart von $ZnCl_2$ zu den entsprechenden Dinucleosidtetraphosphaten geöffnet wird (Abbildung 10).

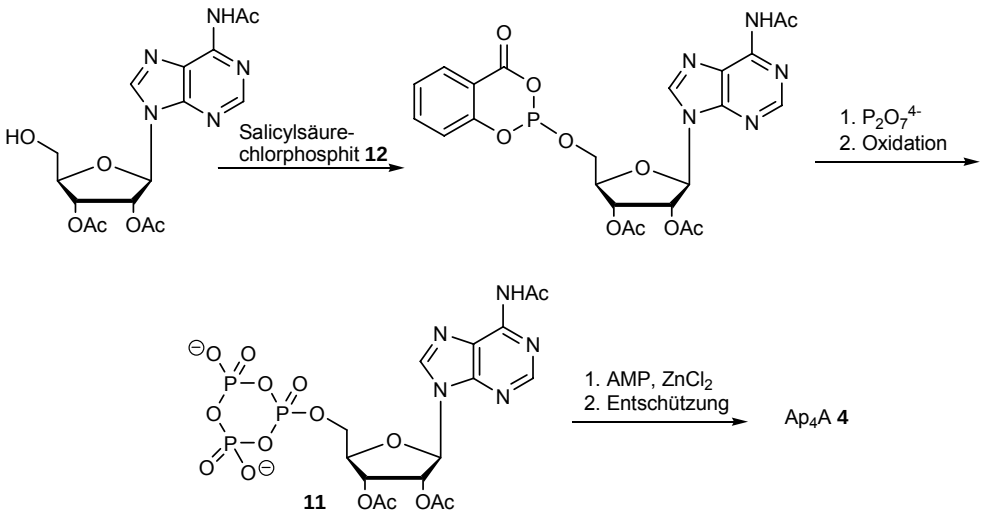


Abbildung 10: Synthese von Np_4Ns nach R. A. Jones

Diese Eintopfreaktion ergab beispielsweise Diadenosintetraphosphat **4** nach basischer Entschützung der Acetylschutzgruppen in einer beachtlichen Ausbeute von 85%.
Nachteilig ist jedoch auch in diesem Fall der nötige Oxidationsschritt auf der Stufe des cyclischen NTPs, der erfahrungsgemäß problematisch ist, als auch die Abtrennung des im Überschuss eingesetzten Zinksalzes.
Theoretisch sollten sich auf diesem Weg bequem Dinucleosidpenta- sowie -hexaphosphate synthetisieren lassen, was als Vorteil dieser Methode zu sehen ist.

Für eine enzymatische Synthese von Dinucleosidoligophosphaten kommen verschiedene Enzyme in Frage. Mit Hilfe der Lysyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli* konnte beispielsweise ATP **1** in Gegenwart von Mg^{2+}-Ionen und Lysin zu Ap_4A **4** umgesetzt werden.[45] Auch die zunächst nur als abbauende Enzyme charakterisierten Ap_4A-Phosphorylasen sind in der Lage, Ap_4A **4** zu synthetisieren.[46,47] Ferner katalysieren verschiedene Luziferasen in Gegenwart von Mg^{2+}-Ionen die Umsetzung von ATP **1** mit verschiedenen Nucleotiden.[48,49] Doch auch in diesem Fall ist der Einsatz von Enzymen auf natürliche Donorsubstrate beschränkt.

2.1.3 Darstellung von Nucleosidmonophosphatpyranosen

Den populärsten Vertreter dieser Verbindungsklasse stellt CMP-*N*-Acetylneuraminsäure **8** in ihrer Funktion als aktivierter Sialinsäuredonor dar. Als Substrat der Sialintransferasen erfolgt die Übertragung der Neuraminsäure in dieser Form auf einen wachsenden Oligosaccharidstrang verschiedener Glycokonjugate.[50,51] Durch ihre Position in der äußeren Zellmembran nehmen Sialinsäuren eine tragende Rolle bei der Molekularbiologie der Zelle ein. Ein effizienter Synthesezugang zu dieser interessanten Substanzklasse (allg. NMP-Sialinsäuren) ermöglicht daher Studien zu potentiellen medizinischen Anwendungen.

Die erste präparative Synthese von CMP-*N*-Acetylneuraminsäure **8** geht auf *L. Kean et al.* zurück und erfolgte enzymatisch durch die CMP-Neu5Ac-Synthetase, welche den nucleophilen Angriff der anomeren Hydroxygruppe von β-Neu5Ac **6** auf das α-Phosphat von CTP in Gegenwart von Mg^{2+} oder Mn^{2+}-Ionen katalysiert.[52,53] Die Triebkraft der Reaktion liegt in der irreversiblen Spaltung des freigesetzten Pyrophosphates durch die Pyrophosphorylase (Abbildung 11).

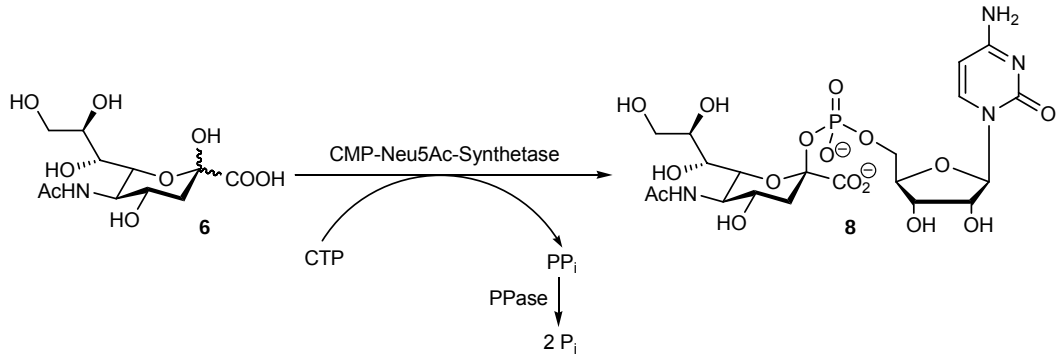


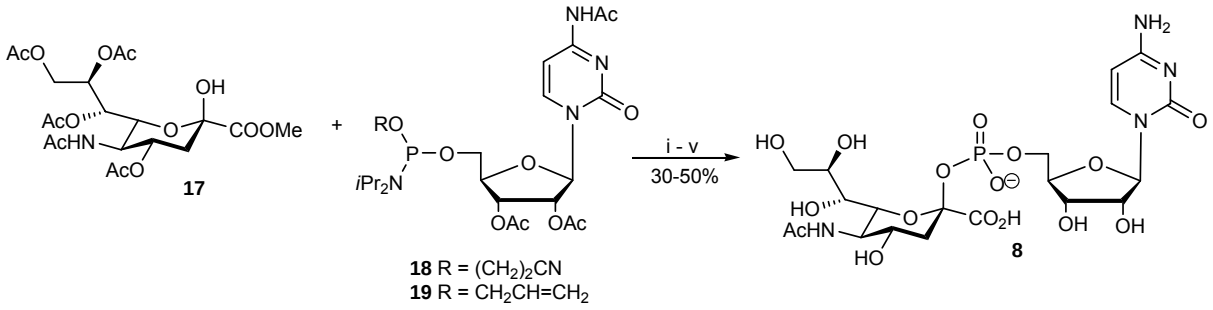
Abbildung 11: Enzymatische Synthese von CMP-Neu5Ac **8**

Die Reaktion wurde in den vergangenen Jahren intensiv studiert und weiter verbessert, wodurch CMP-*N*-Acetylneuraminsäure **8** auf diesem Weg in guten Ausbeuten und im Grammaßstab zugänglich ist.[54-57]

Die Nachteile einer enzymatischen Synthese bestehen jedoch auch hier, neben der begrenzten Bioverfügbarkeit der Enzyme, in ihrer hohen Substratspezifität, wodurch eine Übertragung dieser Synthese auf Sialinsäurederivate oder Strukturanaloga in den meisten Fällen versagte.[58,59]

Nachfolgend werden die wichtigsten Ansätze zur chemischen Synthese von CMP-*N*-Acetylneuraminsäure **8** vorgestellt, die auch bereits erfolgreich zur Darstellung verschiedener Derivate und Analoga verwendet wurden.

Y. Kajihara et al. entwickelten 1995 die sogenannte 2-Cyanoethylphosphit-Methode,[60] zwei Jahre später publizierten *R. L. Halcomb et al.* eine nahezu analoge Synthesestrategie ausgehend von allylgeschützten Nucleosidphosphoramiditen[61] (Abbildung 12).

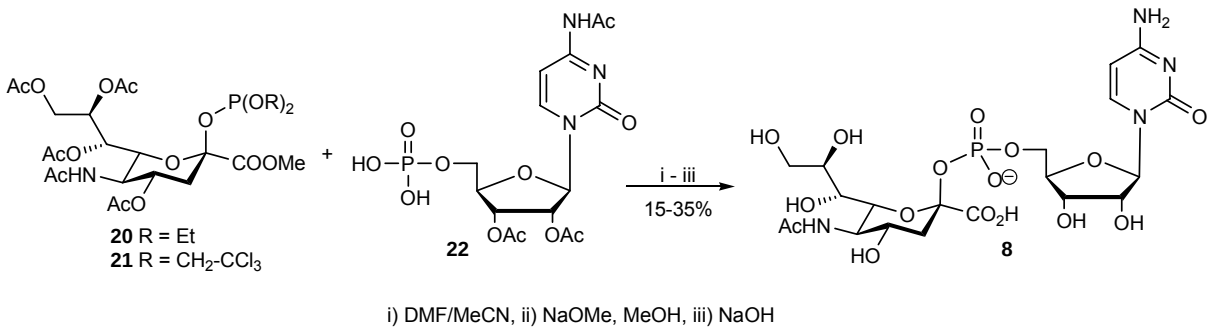


i) 1*H*-Tetrazol/MeCN, ii) *t*BuOOH/MeCN oder DMD/DCM, iii) DBU/THF oder $(Ph_3P)_4Pd/iPr_2NH$/MeCN, iv) NaOMe, MeOH, v) NaOH.

Abbildung 12: Synthese von CMP-Neu5Ac **8** aus Nucleosidphosphoramiditen

Beide Synthesen verwenden als Ausgangsverbindung das vollständig geschützte Halbacetal der Neuraminsäure **17** und unterscheiden sich lediglich in der Schutzgruppe am Phosphoratom des für die Kupplung eingesetzten Nucleosid-5'-phosphoramidits (**18**: Cyanoethyl, **19**: Allyl). Die Gesamtausbeute beider Umsetzungen beträgt nach Oxidation und Entschützung zwischen 30% und 50% für das reine β-Anomer. Die Nachteile beider Methoden bestehen zum einen in der erhöhten Eliminierungstendenz des vor der Entschützung vorliegenden Phosphattriesters im Vergleich zu einer Phosphatdiestergruppierung,[62] zum anderen geht der auf Stufe des Zuckernucleotids nötige Oxidationsschritt mit zusätzlichen Produktverlusten einher.

Ein anderer Ansatz, der von der Gruppe um *R. R. Schmidt* entwickelt wurde, nutzt aktivierte Sialinsäuredonoren in Form von Dialkylphosphiten **20**, **21** und kuppelt diese mit peracetyliertem CMP **22** (Abbildung 13).[16]



i) DMF/MeCN, ii) NaOMe, MeOH, iii) NaOH

Abbildung 13: Synthese von CMP-Neu5Ac **8** nach R. R. Schmidt

Nach basischer Abspaltung der Acetylschutzgruppen und Verseifung des Methylesters werden bei dieser Methode, je nach Substitutionsmuster des Phosphits, Gesamtausbeuten zwischen 15% und 35% erzielt. Das Produkt wird hierbei ebenfalls als reines β-Anomer erhalten. Auch wenn auf diesem Weg bereits die Neu5Ac-Nucleotide von Uridin, Guanosin und Adenosin erfolgreich dargestellt werden konnten, sind die erhaltenen Ausbeuten nur moderat.

Jeder dieser Abschnitte zeigt, dass aufgrund der großen biologischen und pharmakologischen Bedeutung von phosphorylierten Biokonjugaten eine Vielzahl verschiedener Ansätze zur Synthese der verschiedenen Verbindungsklassen publiziert wurden. Auch wenn hier nur die wichtigsten Methoden kurz vorgestellt

wurden, wird deutlich, dass bislang keine universelle Methode zur Darstellung dieser verschiedenen Substanzklassen existiert.
Eine Syntheseroute, die einen effizienten und zuverlässigen Zugang zu verschiedensten phosphorylierten Biokonjugaten ermöglicht, wäre daher wünschenswert. Die in unserer Arbeitgruppe entwickelten *cyclo*Sal-Nucleotide stellen als reaktive Phosphatdonatoren sehr aussichtsreiche Schlüsselverbindungen für eine breit anwendbare Methode zur Synthese derartiger Verbindungen dar.

2.2 Das cycloSal-Konzept

Nucleosidanaloga besitzen ein großes therapeutisches Potential bei verschiedenen viralen Erkrankungen und spielen daher als Wirkstoffe zu deren Bekämpfung eine entscheidende Rolle. Als Reverse-Transkriptase Inhibitoren werden Nucleosidanaloga beispielsweise seit langem als Medikamente in der HIV-Therapie eingesetzt. Auch gegen die Familie der Herpes-Viren existieren therapeutisch wirksame Nucleosidanaloga. Den eigentlich aktiven Wirkstoff stellen jedoch nicht die Nucleosidanaloga selbst, sondern die entsprechenden Nucleosid-5'-triphosphate dar. Aus diesem Grund müssen antiviral aktive Nucleosidanaloga, genau wie ihre natürlichen Vertreter, zunächst durch bestimmte, mehr oder weniger spezifische Enzyme zu den jeweiligen NTPs metabolisiert werden, damit sie zur Kettenverlängerung in den DNA-Strang eingebaut werden können. In vielen Fällen ist jedoch ein Schritt dieser, zur Aktivierung des Wirkstoffes nötigen, Phosphorylierungskaskade aufgrund der Substratspezifität der beteiligten Enzyme gehemmt.[2]
Bei 2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydrothymidin (d4T) **23** beispielsweise wurde festgestellt, dass insbesondere die erste Phosphorylierung durch die Thymidin-Kinase nur sehr langsam verläuft, wohingegen die nachfolgenden Umsetzungen nahezu ungehemmt erfolgen. Es wäre demnach von Vorteil, das d4T-Monophosphat direkt als Medikament zu verabreichen, da somit der limitierende Schritt umgangen werden würde (TK-Bypass, Abbildung 14). Allerdings sind Nucleotide therapeutisch nicht applizierbar, da sie als geladene Verbindungen nicht ausreichend lipophil für einen passiven Transport durch die Zellmembran sind. Weiterhin existieren im Blut unspezifische Phosphatasen, die eine Dephosphorylierungsreaktion katalysieren. Daher erscheint die Freisetzung der Nucleosidmonophosphate innerhalb der Zelle

aus Wirkstoffvorläufern, sogenannten Prodrugs, sinnvoll, in denen die negativen Ladungen maskiert sind.

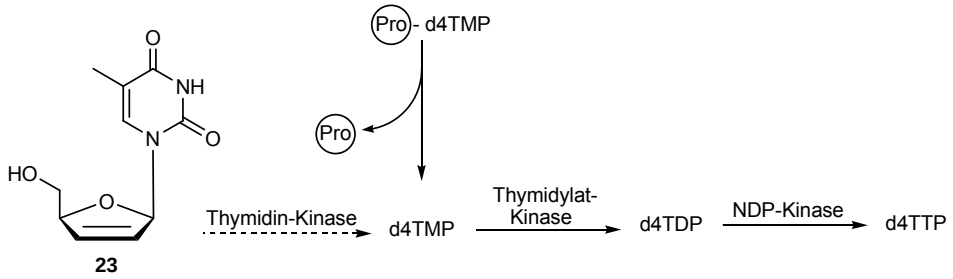


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Pronucleotid-Konzeptes am Beispiel von d4T

Das *cyclo*Sal-Konzept stellt ein solches Prodrug-Konzept (hier: Pronucleotid-Konzept) dar, das im Gegensatz zu anderen Pronucleotid-Systemen ohne eine enzymatisch katalysierte Aktivierung und ohne einen zweiten Aktivierungsschritt auskommt. Es handelt sich hierbei um cyclische Phosphattriester-Derivate, in denen ein Salicylalkohol als Maske mit einem Nucleosidmonophosphat zweifach cyclisch verestert ist. Der aromatische Ring dieser Verbindungen sorgt für eine ausreichende Lipophilie, so dass ein passiver Zellmembrantransport möglich ist.[63]
Abbildung 15 zeigt das Grundgerüst eines ***cyclo*Sal**igenyl-**N**ucleosid-**m**ono**p**hosphates (*cyclo*Sal-NMP).

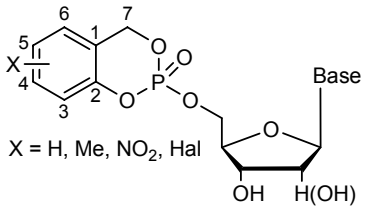


Abbildung 15: Grundstruktur eines *cyclo*Sal-NMPs

Es sei darauf hingewiesen, dass die Nomenklatur der *cyclo*Sal-NMPs, nachfolgend auch als *cyclo*Sal-Nucleotide oder *cyclo*Sal-Phosphattriester bezeichnet, nicht nach den IUPAC-Regeln erfolgt, sondern der Einfachheit halber willkürlich festgelegt wurde.
Die Besonderheit der *cyclo*Sal-Grundstruktur besteht in der chemischen Differenzierbarkeit der einzelnen Phosphatesterbindungen. Dies ermöglicht eine hochselektive Freisetzung des Nucleotids, der ein pH-abhängiger

Kaskadenmechanismus zugrunde liegt.[64] Den Hydrolyseweg der *cyclo*Sal-Phosphattriester zeigt Abbildung 16.

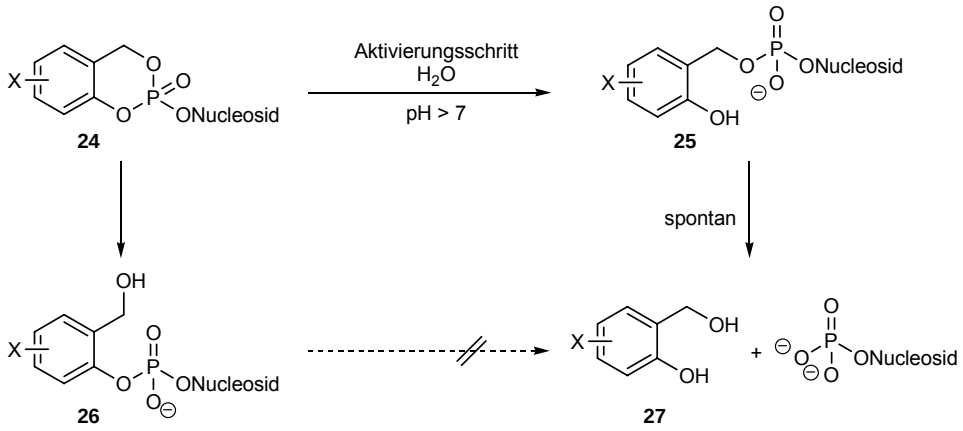


Abbildung 16: Hydrolyseweg von *cyclo*Sal-Phosphattriestern

Die Freisetzung des Nucleotids aus dem Phosphattriester **24** wird durch eine selektive hydrolytische Spaltung der phenylischen Phosphatesterbindung eingeleitet. Diese Bindung stellt die labilste der drei Phosphatesterbindungen dar, da aus ihrer Spaltung ein mesomeriestabilisierter 2-Hydroxybenzylphosphatdiester **25** resultiert und daher hier die beste Austrittsgruppe vorliegt. Der alternative Bruch der Benzylesterbindung von **24** würde hingegen zu einem 2-Hydroxymethylphenylphosphatdiester **26** führen. Da jedoch die Phosphatestergruppe als äußerst schwacher Donor-Substituent in *ortho*-Position zum Benzylester dessen Hydrolyse stark verlangsamt, ist diese Spaltung sehr unwahrscheinlich. Durch den ersten Hydrolyseschritt wird der schwache Donor-Substituent (Phosphatestergruppe) in **24** in einen starken Donor-Substituenten (Hydroxylgruppe) überführt. Diese Umpolung im Aromaten induziert schließlich die spontane Spaltung der C-Benzyl-O-Bindung, die das Nucleotid sowie, nach Reaktion mit Wasser, den Salicylalkohol **27** liefert. Der exakte Hydrolysemechanismus konnte mit Hilfe von NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie aufgeklärt werden.[65]

Die Hydrolysehalbwertszeiten der *cyclo*Sal-Nucleotide sind abhängig vom Substitutionsmuster am aromatischen Ring und können gezielt beeinflusst werden. Auf diesen Aspekt wird im nächsten Abschnitt genauer eingegangen.

Es sei angemerkt, dass der Phenylphosphatdiester **26** aufgrund der negativen Ladung an der Phosphatgruppe gegen einen erneuten Angriff eines Hydroxid-Ions auf das Phosphoratom inert ist, so dass es auf diesem Weg nicht zur Freisetzung des Nucleotids und **27** kommt.

Das *cyclo*Sal-Konzept wurde unter anderem bereits erfolgreich bei folgenden Nucleosidanaloga angewendet:

- d4T **23** (TK-Bypass)[66,67]
- ddA, d4A, 2'-F-*ara*-ddA und 2'-F-ribo-ddA (Adenosindeaminase-Bypass)[68-71]
- acyclische Nucleosidanaloga[72-75]
- Abacavir, Carbovir[76]
- BVdU **55** (erstmalige Darstellung anti-EBV-aktiver BVdU-Derivate)[77-79]

Um eine optimale Wirksamkeit zu erreichen, wurde das *cyclo*Sal-Konzept über die Jahre laufend weiterentwickelt, mit dem Ziel, eine mögliche Diffusion des intrazellulär freigesetzten NMPs über die Zellmembran in den extrazellulären Raum zu stören und zugunsten einer intrazellulären Akkumulation des Wirkstoffes zu verschieben.[80-87]
Außerdem wurden sogenannte Bis-*cyclo*Sal-Nucleotide **28** entwickelt, die ein Maske-Wirkstoff-Verhältnis von 1:2 aufweisen, was auf dem Gebiet der Pronucleotid-Konzepte einmalig ist.[88-90]

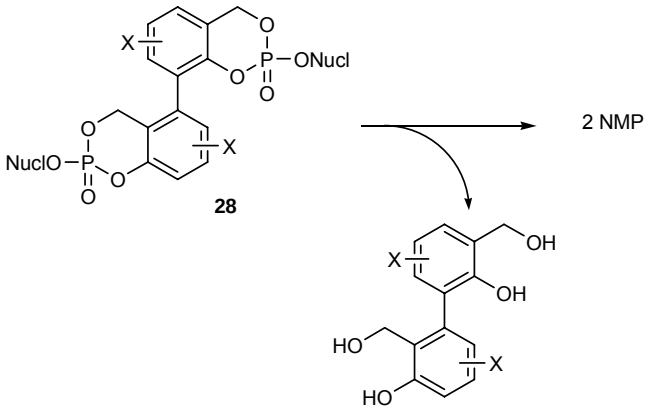


Abbildung 17: Hydrolyse von Bis-*cyclo*Sal-Nucleotiden mit einem Maske-Wirkstoff-Verhältnis von 1:2

Inzwischen konnte gezeigt werden, dass *cyclo*Sal-Verbindungen nicht nur als Pronucleotide für therapeutische Zwecke eingesetzt werden können, sondern sich außerdem als Synthesebausteine eignen, wenn reaktive Phosphatdonatoren benötigt werden.

2.3 Synthetisches Potential von cycloSal-Nucleotiden

Da das *cyclo*Sal-Konzept zur Freisetzung der Nucleotide nicht auf eine enzymatische Aktivierung angewiesen ist, sondern lediglich den Anstieg des pH-Wertes beim Übergang ins Cytosol ausnutzt, kann es neben der Darstellung von Nucleosidmonophosphaten im Labormaßstab[91-93] auch, je nach eingesetztem Nucleophil, zur Synthese anderer Nucleosidphosphatester herangezogen werden.

Im Hinblick auf eine synthetische Nutzung von *cyclo*Sal-Nucleotiden als Phosphorsäureaktivester werden andere Anforderungen an die Verbindungen gestellt, als im Fall von Pronucleotiden. Für eine schnelle und effektive Reaktion mit dem jeweiligen Nucleophil müssen die Hydrolysehalbwertszeiten der *cyclo*Sal-Phosphattriester weitestgehend minimiert werden. Die Elektrophilie des Phosphoratoms und damit das Hydrolyseverhalten des *cyclo*Sal-Nucleotids kann über den Substituenten X am Aromaten gesteuert werden. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 18 dargestellt.
Bei Pronucleotiden ist eine langsame Hydrolyse erstrebenswert, damit der Wirkstoff nach der Applikation an seinen spezifischen Wirkort im Körper gelangen kann. Dies wird durch Donor-Substituenten am aromatischen Ring in *ortho*- und *para*-Stellung zur Phenylphosphatester-Bindung realisiert. Sie vermögen diese Bindung zu stabilisieren und verlangsamen folglich die Reaktionsgeschwindigkeit der Initialreaktion, das heißt der *cyclo*Sal-Ringöffnung. Die Hydrolysehalbwertszeit von 3-Methyl-*cyclo*Sal-d4TMP ist im Vergleich zur unsubstituierten Verbindung in einem wässrigen Phosphatpuffergemisch bei physiologischem pH-Wert von 7.3 beispielsweise verdoppelt.

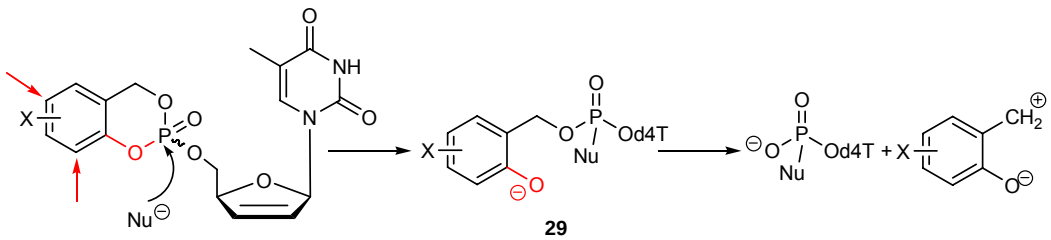


Abbildung 18: Struktur-Aktivitätsbeziehung von *cyclo*Sal-d4TMPs

Im Acceptor-substituierten Fall verringern sich die Halbwertszeiten in diesem Puffersystem auf deutlich weniger als sechzig Minuten. Durch einen Acceptor-Substituenten wie zum Beispiel einer Nitro-Gruppe im *cyclo*Sal-Fragment in *para*- oder *ortho*-Stellung zur phenylischen Phosphatesterbindung wird das nach dem Bruch dieser Bindung entstehende Phenolatanion **29** stabilisiert, wodurch sich die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht.

Die Hydrolysedaten unterschiedlich substituierter *cyclo*Saligenyl-d4TMP-Derivate in verschiedenen wässrigen Puffersystemen sind in Tabelle 1 zusammengestellt.[65]

Tabelle 1: Hydrolyseverhalten verschieden substituierter *cyclo*Sal-d4TMPs in unterschiedlichen wässrigen Puffergemischen bei 37°C

*cyclo*Sal-Substituent X	TRIS-Puffer pH 6.9, 30 mM $t_{1/2}$ [h]	Phosphat-Puffer pH 7.3, 30 mM $t_{1/2}$ [h]	Borat-Puffer pH 8.9, 30 mM $t_{1/2}$ [h]
5-NO_2	4.1	0.15	0.06
5-Cl	6.4	0.7	0.3
H	24.5	4.5	1.1
3-Me	68.5	10.2	1.5

In allen untersuchten Puffersystemen zeigte sich eine Abnahme der Halbwertszeit mit steigender Elektronenacceptorstärke in *ortho*- und *para*-Position zur phenylischen Phosphatester-Bindung. Im Fall der Acceptor-substituierten Verbindungen konnte neben dem gewünschten d4TMP ein weiteres Hydrolyseprodukt detektiert werden, welches aufgrund der Retentionszeit und seinem zeitabhängigen Abbau dem intermediär gebildeten Benzyl-d4T-Diester **29** (s. S. 18, Abb. 18) zugeordnet wird. Bei den Donor-substituierten Verbindungen konnte ausschließlich die Bildung von d4TMP beobachtet werden. Folglich sollte hier der erste Hydrolyseschritt vom Phosphattriester zum 2-Hydroxybenzylphosphatdiester **29** geschwindigkeits-bestimmend sein, während für die Acceptor-substituierten *cyclo*Sal-d4TMP-Derivate der zweite Schritt vom 2-Hydroxybenzylphosphatdiester **29** zum Monophosphat geschwindigkeitsbestimmend ist, wodurch der Anteil an nicht erwünschtem Phenylphosphatdiester weiter minimiert wird.

Vorangegangene Arbeiten haben gezeigt, dass bei den Hydrolysestudien im Phosphatpuffer unter bestimmten Bedingungen neben dem Nucleotid auch ein geringer Anteil des entsprechenden Nucleosiddiphosphates entsteht. Die Menge an gebildetem NDP hängt dabei sowohl von der Konzentration als auch vom pH-Wert der eingesetzten Phosphatpuffer-Lösung ab. Der Anteil an Nucleosiddiphosphat nimmt mit steigendem pH-Wert und steigender Phosphatpufferkonzentration zu. Während in einer schwach sauren 25 mM Phosphatpufferlösung mit pH 5.5 noch kein Diphosphat entsteht, steigt der Anteil in einem schwach alkalischen 50 mM Phosphatpuffer-System mit einem pH-Wert von 8.3 auf bis zu zehn Prozent. Diese Ergebnisse spiegeln die bestehende Korrelation zwischen den pK-Werten der Phosphate und dem prozentualen Anteil an gebildetem Diphosphat wider.

Die Erkenntnis, dass neben Hydroxid-Ionen auch Phosphat-Anionen zur *cyclo*Sal-Ringöffnung befähigt sind, lässt den Schluss zu, dass diese Verbindungen prinzipiell als aktivierte Phosphat-Donatoren fungieren könnten.
In eigenen Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass ausgehend von *cyclo*Sal-Nucleotiden verschiedene Nucleosid-5'-di- und –triphosphate in kurzer Zeit und mit reproduzierbaren Ausbeuten im Labormaßstab synthetisiert werden können.[94]
Abbildung 19 zeigt am Beispiel der Umsetzung von Tris-(tetra-*n*-butylammonium)-hydrogenpyrophosphat mit unterschiedlich Acceptor-substituierten *cyclo*Sal-Phosphattriestern, dass die resultierenden Triphosphate unabhängig von der Art der elektronenziehenden Gruppe X in guten Ausbeuten erhalten wurden.

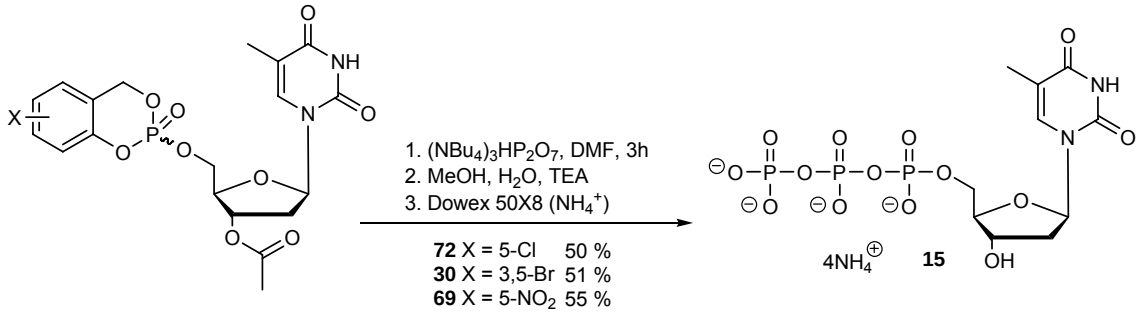


Abbildung 19: Synthese von TTP **15** ausgehend von unterschiedlich Acceptor-substituierten Phosphattriestern

Diese Methode wurde zudem bereits für die Synthese eines carbocyclischen Nucleosidanalogons verwendet. D-*Carba*-2'-desoxythymidin-5'-triphosphat **31** wurde für Mechanismusstudien mit der viralen DNA Polymerase (Reverse Transkriptase) benötigt, da *carba*-dT **32** sehr vielversprechende antivirale Eigenschaften gegen HIV-1 and HIV-2 zeigte.[95] Diese Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von *V. E. Marquez*, NCI Frederik, USA, und ergaben einen neuartigen Wirkmechanismus, der auf einem „verzögerten" Kettenabbruch basiert.[96]

Des Weiteren wurde die Synthese von Nucleosiddiphosphatpyranosen ausgehend von *cyclo*Sal-Phosphattriestern in unserer Arbeitsgruppe etabliert.[97,98] Während sich erste Ansätze mit Chlor- beziehungsweise Brom-substituierten *cyclo*Sal-Nucleotiden durch sehr lange Reaktionszeiten (mehrere Tage), eine unvollständige Umsetzung und die Bildung einer Vielzahl von Nebenprodukten auszeichneten, konnte durch den Einsatz der stark elektronenziehenden Nitrogruppe in der 5-Position des *cyclo*Sal-Fragments die Reaktionszeiten auf wenige Stunden reduziert und die Ausbeuten auf über 80% gesteigert werden (Abbildung 20). Durch Verwendung anomerenreiner Glycopyranosyl-1-phosphate werden die resultierenden NDP-Pyranosen ebenfalls als reine Anomere erhalten, da die Reaktion mit dem *cyclo*Sal-Nucleotid nicht am anomeren Zentrum erfolgt und unter den gegebenen Reaktionsbedingungen keine Anomerisierung stattfindet.

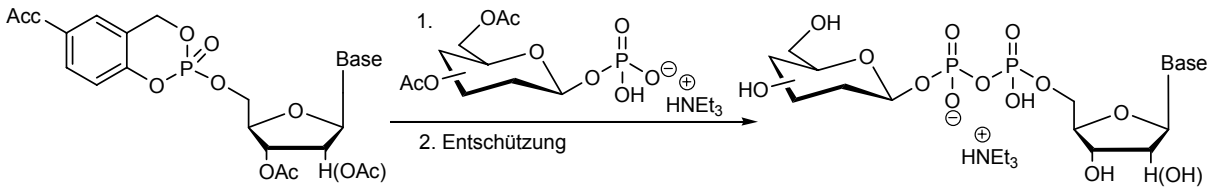


Abbildung 20: Synthese von NDP-Pyranosen ausgehend von *cyclo*Sal-Nucleotiden

Außerdem werden sowohl Modifikationen in der Pyranoseeinheit als auch auf Seiten des Nucleosids toleriert, weshalb die Methode bereits zur Synthese verschiedener Analoga verwendet wurde. CDP-6-desoxy-α-D-Gulose wurde auf diesem Weg beispielsweise in einer Ausbeute von 66% und d4TDP-α-D-Glucose in einer Ausbeute von 78% erhalten. Im Vergleich zu den in der Fachliteratur publizierten chemischen und enzymatischen Methoden zur Synthese von Nucleosiddiphosphatzuckern sind diese Ergebnisse herausragend.[21,99-103]

Gegenwärtig wird in unserer Arbeitsgruppe an einer Übertragung der Methodik auf heterogene Phasenreaktionen, durch Immobilisierung der *cyclo*Sal-Nucleotide an einen festen Träger, gearbeitet. Ein entscheidender Vorteil dieser Vorgehensweise besteht in einer enormen Vereinfachung der ansonsten schwierigen und aufwendigen Reinigung der polaren Reaktionsprodukte. Erste Ergebnisse bezüglich der Synthese von Nucleosid-di- und -triphosphaten sind sehr vielversprechend, da die gewünschten Produkte aufgrund des nahezu quantitativen Reaktionsumsatzes nach Abspaltung vom Trägermaterial eine sehr hohe Reinheit aufweisen.[104]

3. AUFGABENSTELLUNG

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass *cyclo*Sal-Nucleotide nicht ausschließlich als maskierte Wirkstoffvorläufer mit bestimmten biologischen Aktivitäten Verwendung finden, sondern sich ebenfalls als Synthesebausteine eignen, wenn reaktive Phosphatdonatoren benötigt werden, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit das Anwendungsspektrum von *cyclo*Sal-Phosphataktivestern auf die Synthese verschiedenster phosphatverbrückter Nucleosid-Biokonjugate ausgeweitet werden.
Um diese Aufgabe zu realisieren, bestand ein erstes Ziel darin, einen effizienten Zugang zu den hoch reaktiven 5-Nitro-substituierten *cyclo*Sal-Verbindungen, die als Schlüsselverbindungen für diese Arbeit von großer Relevanz sind, zu etablieren.
Im Folgenden galt es, durch Umsetzung dieser Verbindungen mit verschiedenen Nucleophilen die Synthese unterschiedlicher Nucleosid-5'-phosphatester voranzutreiben (Abbildung 21).

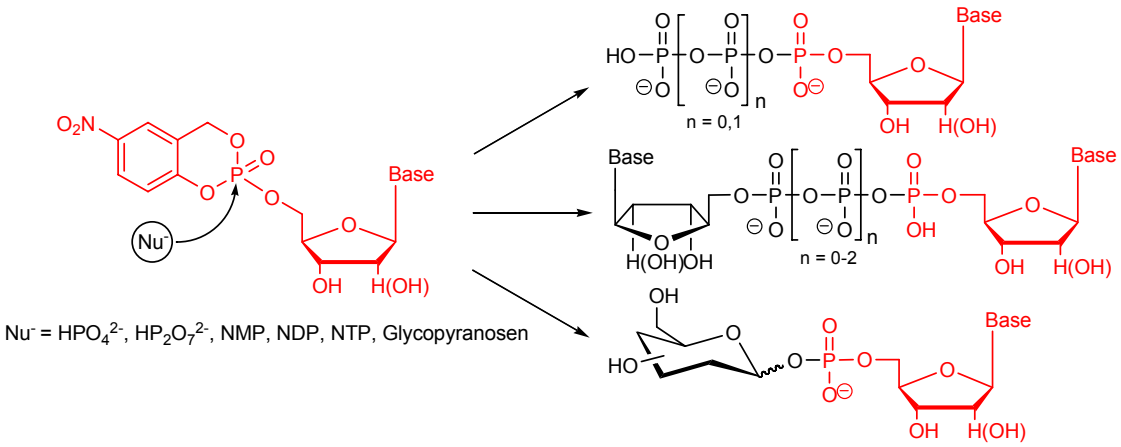


Abbildung 21: Synthese unterschiedlicher phosphatverbrückter Nucleosid-Biokonjugate ausgehend von *cyclo*Sal-Phosphataktivestern

Neben einer Ausweitung der Methode auf die Synthese weiterer Nucleosid-5'-di- und triphosphate, sollten erstmalig Nucleotide, NDPs und NTPs als Nucleophile zur Synthese von Dinucleosidoligophosphaten zum Einsatz kommen. Außerdem sollten, in Anlehnung an die erfolgreiche Synthese von NDP-Pyranosen, zum ersten Mal verschiedene Nucleosidmonophosphat-Pyranosen dargestellt werden. Zum Teil sollten die Umsetzungen zunächst an Modellverbindungen erprobt werden, um die Methode im Anschluss für die Synthese biologisch relevanter Moleküle wie zum Beispiel Diadenosintetraphosphat oder CMP-*N*-Acetylneuraminsäure zu verwenden.

4. RESULTATE UND DISKUSSION

4.1 Synthesestrategie

Die Darstellung der Zielverbindungen erfolgte konvergent durch Umsetzung verschiedener Acceptor-substituierter *cyclo*Sal-Nucleotide mit den jeweiligen Nucleophilen.

Die eingeschlagene Synthesestrategie lässt sich vereinfacht in drei Reaktionssequenzen zerlegen: Ausgehend von 5-Nitrosalicylalkohol **44** erfolgte zunächst die Synthese des cyclischen Chlorphosphits **50**, welches durch Umsetzung mit verschiedenen Nucleosiden und nachfolgender Oxidation die jeweiligen *cyclo*Sal-Nucleotide **66**-**71** ergab. Die anschließende Kupplung mit den entsprechenden Nucleophilen lieferte letztlich die gewünschten Zielverbindungen (Abbildung 22).

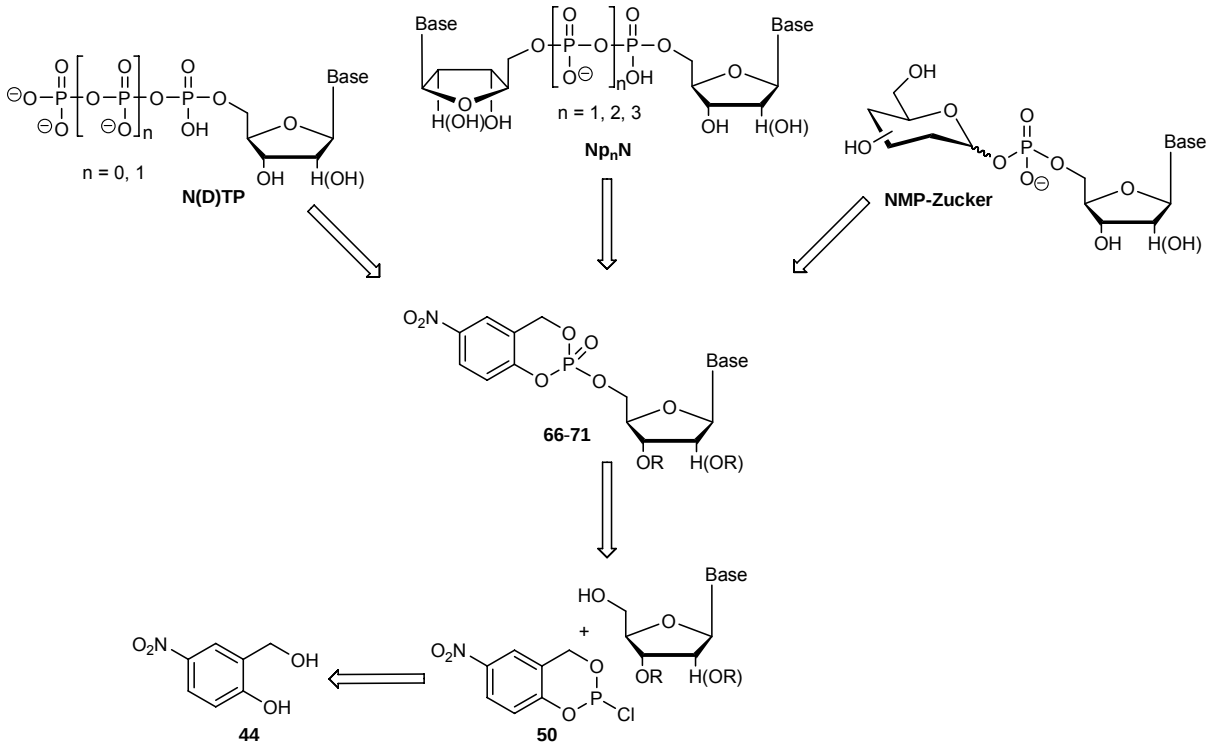


Abbildung 22: Konvergente Synthesestrategie zur Darstellung der Zielverbindungen

Wie zuvor im Kenntnisstand geschildert, wurde diese Methodik bereits zur Darstellung von Nucleosid-5'-di und –triphosphaten als auch zur Synthese von Nucleosiddiphosphat-Pyranosen erfolgreich genutzt (vgl. S. 20, 21). Es stellte sich heraus, dass die erzielten Ausbeuten im Fall der N(D)TPs unabhängig von der Natur

der elektronenziehenden Gruppe X im *cyclo*Sal-Fragment waren (Abbildung 23, oben), während die Umsetzungen der Pyranose-1-phosphate mit *cyclo*Sal-Nucleotiden eine starke Abhängigkeit vom *cyclo*Sal-Substituenten X zeigten. Erste Ansätze mit Chlor- beziehungsweise Brom-substituierten *cyclo*Sal-Phosphattriestern zeichneten sich durch sehr lange Reaktionszeiten (mehrere Tage), eine unvollständige Umsetzung und die Bildung einer Vielzahl von Nebenprodukten aus. Erst durch den Einsatz von stark Acceptor-substituierten 5-Nitro-*cyclo*Sal-Nucleotiden konnten die Reaktionszeiten auf wenige Stunden reduziert und die Ausbeuten auf über 50% gesteigert werden (Abbildung 23, unten).

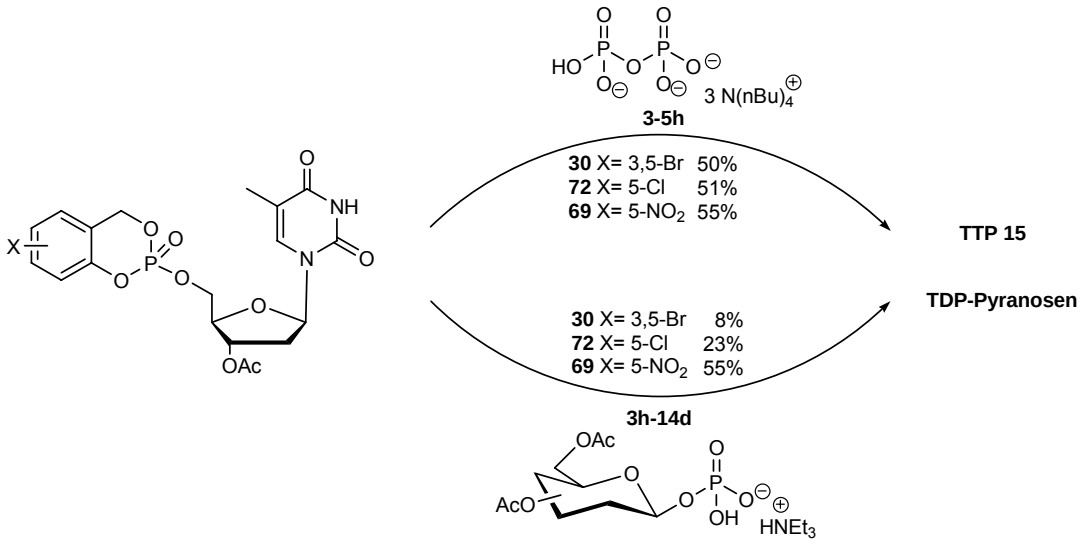


Abbildung 23: Synthese von TTP **15** und verschiedenen TDP-Pyranosen ausgehend von unterschiedlich Acceptor-substituierten *cyclo*Sal-NMPs

Die beobachtete Abhängigkeit der Reaktionszeiten und der Ausbeuten können auf die vergleichsweise geringere Nucleophilie der Zuckermonophosphate im Gegensatz zu dem bei der Darstellung der NTPs eingesetzten Pyrophosphat zurückgeführt werden.

Eine Vielzahl der für diese Arbeit relevanten Nucleophile weisen eine den Glycosyl-1-phosphaten vergleichbare Nucleophilie auf. Für eine effiziente Synthese der Zielverbindungen sollen daher alle Umsetzungen mit stark Acceptor-substituierten *cyclo*Sal-Nucleotiden erfolgen, die sowohl einen (-)I- als auch einen (-)M-Effekt aufweisen. Neben der Nitrogruppe kommen diesbezüglich auch Cyano- und Methylsulfonyl-Substituenten in Frage.

Derartige *cyclo*Sal-Verbindungen stellen folglich die Schlüsselverbindungen der vorliegenden Arbeit dar, weshalb zunächst eine wichtige Herausforderung darin bestand, einen effizienten Zugang zu diesen Verbindungen zu etablieren.

4.2 Darstellung von cycloSal-Nucleosidmonophosphaten

Das in der Arbeitsgruppe erprobte und etablierte Syntheseprotokoll zur Darstellung von *cyclo*Saligenyl-Nucleosidmonophosphaten nutzt die hohe Reaktivität von P(III)-Reagenzien und gliedert sich in zwei direkt aufeinander folgende Schritte: die Kupplung des cyclischen Saligenylchlorphosphits mit dem Nucleosid und die Oxidation zum Phosphattriester.

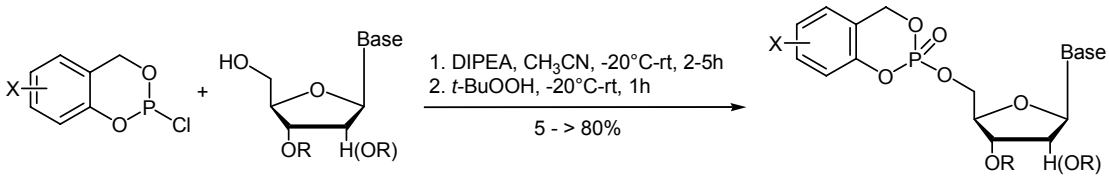


Abbildung 24: Phosphor(III)-Route zur Darstellung von *cyclo*Sal-Nucleotiden

Auf diesem Weg werden die Donor-substituierten Verbindungen in Ausbeuten von teilweise über 80% erhalten. Im Fall von schwächeren Acceptorsubstituenten, wie Chlor oder Brom, werden immerhin noch Ausbeuten von 50% erreicht. Für die sehr reaktiven Nitrophosphattriester beispielsweise erlaubt das Protokoll hingegen keinen zuverlässigen, reproduzierbaren Zugang; die Ausbeuten liegen hier zwischen 5% und 20%. Wie zuvor erwähnt, ist die Syntheseplanung dieser Arbeit jedoch genau auf diese stark (–)I- und (–)M-substituierten *cyclo*Sal-Verbindungen ausgelegt worden. Aus diesem Grund musste zunächst der bekannte Syntheseweg entweder überarbeitet oder ein alternativer Zugang zu diesen Verbindungen gefunden werden.

4.2.1 Darstellung von 5-NO_2-*cyclo*Sal-NMPs aus NMP-dichloridaten

Eine mögliche Alternative zur Synthese von Nitro-substituierten *cyclo*Sal-Verbindungen stellt der von *M. Yoshikawa* publizierte Ansatz zur Darstellung von Nucleosidmonophosphaten dar.[28] Durch die Umsetzung eines Nucleosids mit Phosphorylchlorid wird zunächst intermediär ein Nucleosid-5'-phosphordichloridat **34** generiert, welches durch nachfolgende Hydrolyse das entsprechende Nucleotid liefert. Frühere Arbeiten, die sich mit der Phosphorylierung von Nucleosiden durch

$P(O)Cl_3$ beschäftigten, zeichneten sich weitestgehend durch Probleme aufgrund der mangelnden Regioselektivität des Phosphorylchlorids aus. *Yoshikawa et al.* konnten dieses Problem jedoch nahezu vollständig durch den Einsatz von Trimethyl- oder Triethylphosphat als Lösungsmittel umgehen. Trialkylphosphate besitzen zwei hauptsächliche Eigenschaften, die sich positiv auf die Selektivität der Phosphorylierung auswirken: Zum einen vermögen sie die beteiligten Reaktanden, im Gegensatz zu den vorher verwendeten Reaktionsmedien, in Lösung zu bringen. Zum anderen bilden sie mit dem Phosphorylchlorid ein reaktiveres Intermediat, welches vergleichbar mit dem Vilsmeier-Haack-Komplex aus DMF und $P(O)Cl_3$ ist.[105] Frühere Arbeiten von *A. Holy* beispielweise stuften die auf diesem Wege erhaltenen Selektivitäten für die 5'-Phosphorylierung von Nucleosiden als sehr hoch ein.[106] Aufgrund der damaligen analytischen Möglichkeiten sind diese Ergebnisse allerdings heutzutage nicht mehr vollends aussagekräftig.[107]

Dennoch schien es sinnvoll, diesen Ansatz alternativ für die Synthese von NO_2-*cyclo*Sal-Nucleotiden zu testen. Im Gegensatz zu dem in der Arbeitsgruppe verbreiteten Syntheseweg, würde hier im ersten Schritt die Generierung des Phosphordichloridates **34** aus dem Nucleosid und $P(O)Cl_3$ erfolgen und anschließend *in situ* die Kupplung mit dem Salicylalkohol.

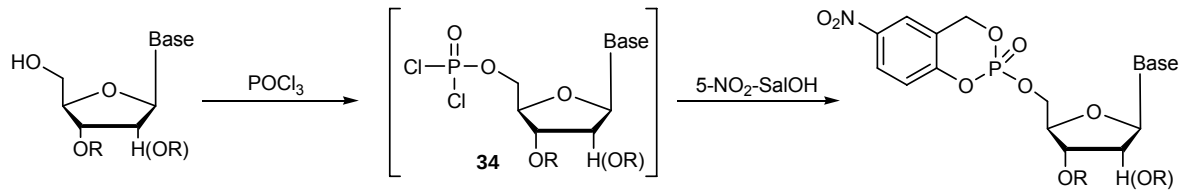


Abbildung 25: Synthesestrategie zur Darstellung von *cyclo*Sal-NMPs nach Yoshikawa

Ein Vorteil dieser Vorgehensweise besteht darin, dass durch den Einsatz von Phosphorylchlorid keine Oxidation des Triesters mehr nötig wäre. Als nachteilig könnte sich allerdings Trimethylphosphat als Lösungsmittel erweisen, da es aufgrund seines hohen Siedepunktes von ca. 200 °C nur schwierig aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen ist.

Es soll hier lediglich kurz erwähnt werden, dass der Versuch, die angegebenen Reaktionsbedingungen auf die Synthese von 5-Nitro-*cyclo*Sal-3'*O*-Acetyl-dTMP **69** zu übertragen, an einem ungenügenden Umsatz während des Phosphorylierungsschrittes und an der problematischen Entfernung des Lösungsmittels scheiterte. Aus diesem Grund wurde versucht die Phosphorylierung

in anderen, leichter flüchtigen Lösungsmitteln wie THF oder Dichlormethan durchzuführen.

Diese Strategie wurde frühzeitig bereits einmal von *M. Lorey* zur Darstellung einiger Donor- und schwach Acceptor-substituierter *cyclo*Sal-Nucleotide untersucht.[108] Hierzu wurden das Nucleosid und die Base (DIPEA) in wasserfreiem THF vorgelegt, bei -10 °C mit 2.0 Äquivalenten $P(O)Cl_3$ versetzt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des Salicylalkohols in Gegenwart von DIPEA. Für Donor-substituierte Verbindungen wurden auf diesem Weg Ausbeuten bis maximal 39% erhalten, für die 5-Chlor-substituierten Triester hingegen nur noch etwa 25%. Da die auf diesem Weg erzielten Ausbeuten nicht mit denen auf der P(III)-Route erhaltenen Ausbeuten konkurrieren konnten, wurde dieser Ansatz für die damaligen Zwecke wieder verworfen.

Für die Synthese der sonst nur schwierig bis gar nicht zugänglichen Nitro-*cyclo*Sal-Triester sollte diese Alternative jedoch wieder aufgegriffen werden. Das Hauptproblem dieser Umsetzung besteht, wie bereits erwähnt, in der mangelnden Selektivität von $P(O)Cl_3$ als Phosphorylierungsreagenz, so dass neben dem gewünschten Nucleosid-5'-phosphordichloridat **34** zusätzlich ein nicht erwünschtes Produkt **35** durch Angriff eines zweiten Äquivalents Nucleosid auf das Dichlorphosphat entsteht (Abbildung 26).

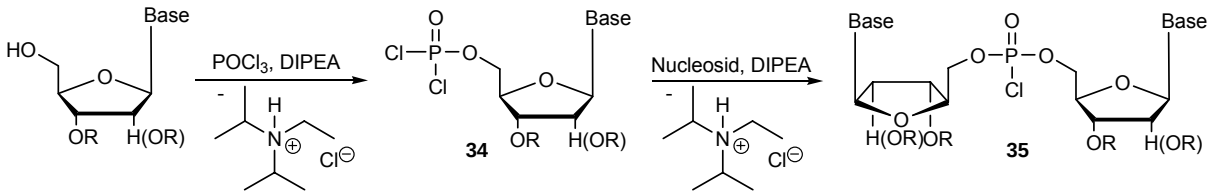


Abbildung 26: Postulierte Bildung des Homodimers **35**

Dadurch war es sehr wichtig, die Reaktionsbedingungen während des ersten Schrittes so zu wählen, dass der Anteil an **35** möglichst gering ausfällt. Es stellte sich heraus, dass vor allem die Reihenfolge der Zusammengabe der Reaktanden einen entscheidenden Einfluss auf die Selektivität des ersten Reaktionsschrittes, die Generierung des Nucleosid-5'-phosphordichloridats **34**, hatten. Als optimal hat sich die langsame Zugabe einer äquimolaren Mischung des Nucleosids und Triethylamin in absolutem THF bei tiefen Temperaturen (-70 °C) zu einem Überschuss an $P(O)Cl_3$ (2.0 Äquivalente) herausgestellt. Auf diesem Weg lässt sich die Bildung des Nebenproduktes **35** nahezu vollständig zurückdrängen. Abbildung 27 zeigt das

Protonenbreitband-entkoppelte ^{31}P-NMR-Spektrum des Nucleosid-5'-phosphordichloridats **34**, das nach Entfernen des Lösungsmittels (THF) und des überschüssigen Phosphorylchlorids in wasserfreiem $CDCl_3$ erhalten wurde.

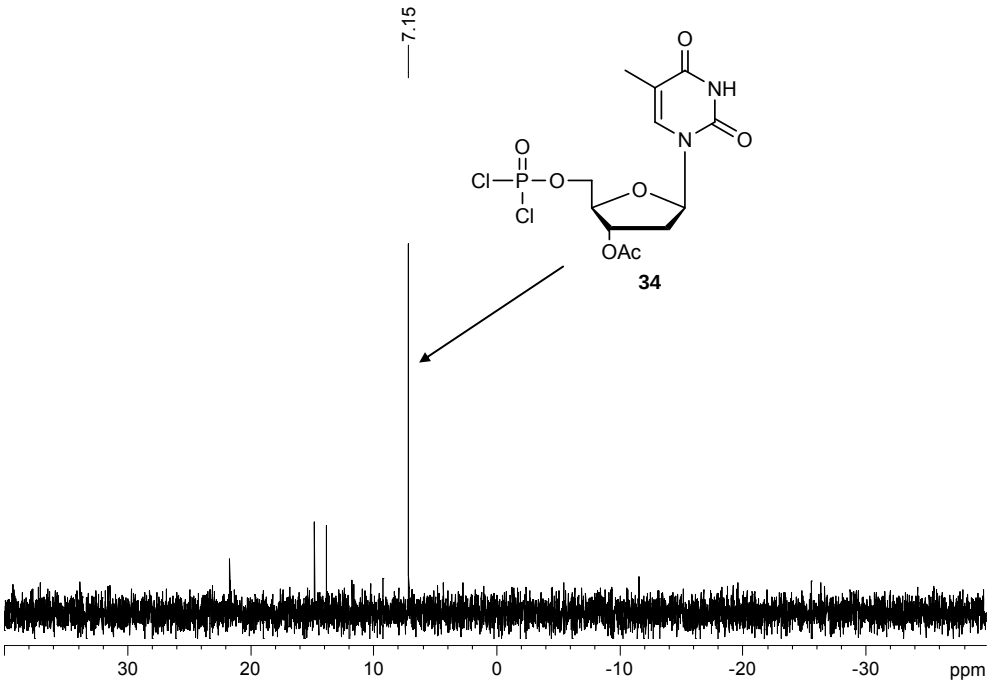


Abbildung 27: ^{31}P-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 400 MHz) des Dichlorophosphates **34**

Es belegt eindeutig die Entstehung von einem phosphorhaltigen Hauptprodukt bei +7 ppm, einem für Dichlorophosphate charakteristischen Bereich.

Für die zweite Stufe wurde **34** in absolutem THF bei –70 °C vorgelegt und eine Mischung von 5-Nitrosalicylalkohol **44** und Triethylamin, ebenfalls gelöst in wasserfreiem THF, langsam zugetropft. Nachdem sich die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur erwärmt hatte, ließ die dünnschichtchromatographische Kontrolle (DCM/MeOH: 9:1) die ausschließliche Bildung der gewünschten *cyclo*Sal-Verbindung erkennen. Dennoch konnte 5-NO_2-*cyclo*Sal-3'-*O*-acetylthymidinmonophosphat **69** auf diesem Weg zwar reproduzierbar, allerdings nur in mäßiger Ausbeute von bis zu 30% nach chromatographischer Reinigung isoliert werden. Eine weitere Steigerung der Ausbeute ist auf diesem Weg nicht gelungen. Allerdings stellte sich erst im weiteren Verlauf dieser Arbeit heraus, dass für eine erfolgreiche Chromatographie von 5-Nitro-substituierten *cyclo*Sal-Phosphattriestern dem eluierenden Lösungsmittel eine weit aus größere Menge Essigsäure zugesetzt werden muss, als bei den weniger reaktiven *cyclo*Sal-Nucleotiden. Daher könnte die geringe Ausbeute zu einem großen Teil auf ein Zerfallen des Produktes während der Reinigung am

Chromatotron zurückzuführen sein. Im nachfolgenden Kapitel 4.2.2 wird diese Problematik nochmals aufgegriffen und ausführlich diskutiert.

Es wurde in diesem Zusammenhang ein letzter Versuch unternommen, einen quantitativen Umsatz des Nucleosids und damit einhergehend eine Steigerung der Ausbeute zu erreichen. Hierzu wurde 3'-*O*-Acetylthymidin **64** zunächst mit einem Äquivalent *tert*-Butylmagnesiumchlorid deprotoniert und die erhaltene Suspension dann tropfenweise bei –20 °C zu einer Lösung von $P(O)Cl_3$ in THF gegeben. Nach vollständiger Reaktion (DC-Kontrolle: DCM/MeOH 9:1 v/v) wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der erhaltene farblose Schaum ^{31}P-NMR-spektroskopisch in wasserfreiem $CDCl_3$ untersucht. Auch in diesem Fall wurde eindeutig ein phosphorhaltiges Hauptprodukt gebildet. Die weitere Umsetzung mit 5-Nitrosalicylalkohol **44** erfolgte analog der oben beschriebenen Vorgehensweise mit Triethylamin als Base und THF als Lösungsmittel bei tiefen Temperaturen. In diesem Fall ließ die dünnschichtchromatographische Kontrolle die Bildung eines Hauptproduktes erkennen, welches unpolarer als das eingesetzte Nucleosid **64** war. Das ^{31}P-NMR-Spektrum des erhaltenen Rohproduktes zeigte klar die Diastereomere des gewünschten *cyclo*Sal-Phosphattriesters **69** bei ca. –11 ppm als phosphorhaltiges Hauptprodukt. Nach chromatographischer Reinigung am Chromatotron wurde allerdings nur eine geringe Menge des gewünschten *cyclo*Sal-Nucleotids **69** isoliert. Als Hauptprodukt wurde stattdessen eine nicht phosphorhaltige nucleosidische Verbindung erhalten, bei der es sich nicht um das ursprünglich eingesetzte 3'-*O*-Acetylthymidin **64** handelte, sondern, wie sich nach genauerer NMR-spektroskopischer sowie massenspektrometrischer Analyse herausstellte, um das an der 5'-Position chlorierte Nucleosid **36** (Abbildung 28). Die Ausbeute dieses unerwünschten Produktes lag bei etwa 60%.

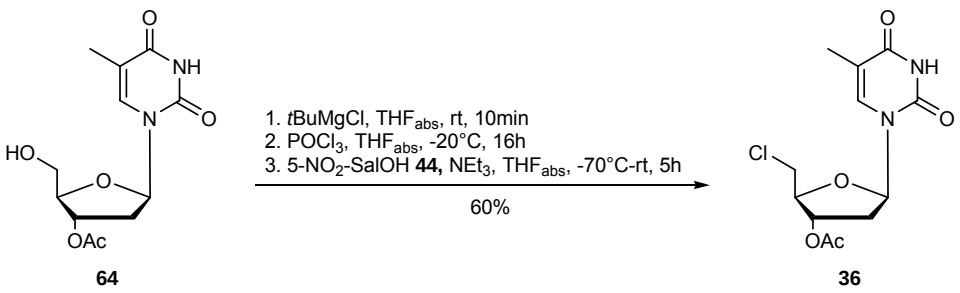


Abbildung 28: Erhalt von 5'-Chlor-5'-desoxy-3'-*O*-acetylthymidin **36** beim Versuch der Synthese von 5-NO_2-*cyclo*Sal-3'-*O*Ac-TMP **69** mit *t*BuMgCl als Base

Der Austausch der primären Hydroxygruppe von Nucleosiden gegen Halogenatome ist hinreichend literaturbekannt.[109-112] Die Chlorierung der 5'-Position mit gängigen Chlorierungsmitteln, wie beispielsweise Thionylchlorid, verläuft mit guten Ausbeuten von über 80%.

Die Bildung von 5'-Chlor-5'-desoxy-3'-*O*-acetylthymidin **36** resultiert in diesem Fall vermutlich aus der Anwesenheit des während der Umsetzung entstehenden Magnesiumchlorids, da bei den Reaktionen, in denen keine Aktivierung durch *tert*-Butylmagnesiumchlorid erfolgte, die Entstehung von **36** nicht beobachtet wurde. Um die primäre Hydroxyfunktion des Nucleosids **64** in eine gute Abgangsgruppe zu überführen, muss es nach der Aktivierung durch die Grignardverbindung zunächst zur Phosphorylierung der 5'-Position gekommen sein, da Phosphate als gute Abgangsgruppen bekannt sind. *M. Yoshikawa et al.* postulierten in diesem Zusammenhang eine intramolekulare Umlagerung[113] von Nucleosid-5'-phosphordichloridaten zu 5'-Chloro-5'-desoxynucleosiden unter Abspaltung von PO_2Cl in Abwesenheit von Wasser. Aus diesem Grund stellte sich eine Aktivierung der Nucleoside durch Organometallverbindungen für die Synthese von *cyclo*Sal-NMPs als nicht praktikabel heraus.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass der Einsatz von NMP-Dichloridaten für die Synthese von *cyclo*Sal-Phosphattriestern nicht den gewünschten Erfolg brachte, da die erzielten Ausbeuten unter dem Aspekt einer synthetischen Nutzung der 5-NO_2-*cyclo*Sal-NMPs mit maximal 30% nicht zufriedenstellend waren. Daher wurde im Folgenden versucht, das in der Arbeitsgruppe etablierte Protokoll zu modifizieren und zu optimieren.

4.2.2 Synthese von *cyclo*Sal-NMPs aus *cyclo*Saligenylphosphorchloridaten

Eine mögliche Modifikation des Standardprotokolls stellt die Umsetzung des Nucleosids mit einem bereits oxidierten *cyclo*Saligenylphosphorchloridat **37** dar.

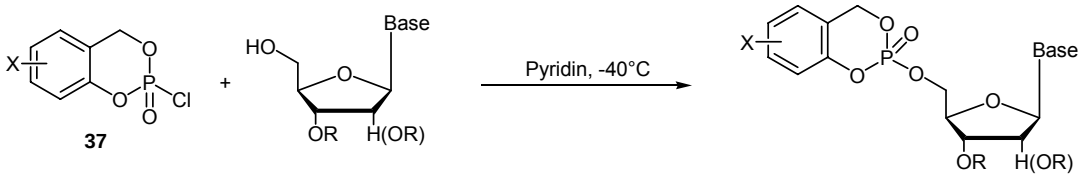
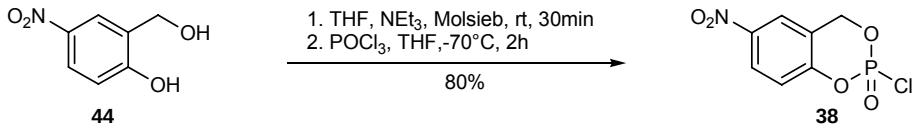


Abbildung 29: Synthese von *cyclo*Sal-NMPs nach der Phosphorchloridatmethode

Vorangegangene Arbeiten haben gezeigt, dass Phosphorchloridate zur Synthese verschiedener *cyclo*Sal-NMPs in guten bis sehr guten Ausbeuten herangezogen werden können.[93,114] Erste Arbeiten zur erfolgreichen Darstellung von *cyclo*Saligenylchlorphosphaten gehen auf *O. Ludek* zurück und erfolgten durch Oxidation des entsprechenden Chlorphosphits mit getrocknetem Sauerstoff in Toluol.[93] Die resultierenden Phosphor(V)-Verbindungen wurden auf diesem Wege als Stammlösungen erhalten und konnten über mehrere Monate im Kühlschrank gelagert werden. Ein Problem dieser Methodik ist jedoch, dass die Chlorphosphite für die Oxidation in hoher Reinheit vorliegen müssen, was durch eine vorherige Kugelrohrdestillation erreicht wird. Dieser Vorgang geht allerdings mit großen Ausbeuteverlusten einher und ist gerade für komplexere *cyclo*Saligenylphosphorchloridite, die über mehrere Stufen synthetisiert wurden, nicht erstrebenswert.

Aus diesem Grund wurde die Synthese von *H. Jessen* überarbeitet und generalisiert.[114] Durch direkte Cyclisierung des Salicylalkohols mit $P(O)Cl_3$ in Gegenwart von Triethylamin als Base wurden verschiedenste Phosphorchloridate erfolgreich synthetisiert. Nach Schlenkfiltration und chromatographischer Reinigung konnten sie als luftstabile Feststoffe in hohen Ausbeuten isoliert werden, was sowohl die Handhabung als auch die Dosierbarkeit im Gegensatz zu den empfindlicheren Chlorphosphiten stark vereinfacht. Auch 5-Nitro-*cyclo*Sal-Phosphorchloridat **38** konnte auf diesem Weg problemlos in 80%-iger Ausbeute synthetisiert werden (Abbildung 30). Hierzu wurde $P(O)Cl_3$ in absolutem THF im Reaktionskolben vorgelegt und bei -70 °C mit einer Mischung aus einem Äquivalent 5-NO_2-Salicylalkohol sowie 2.1 Äquivalenten Triethylamin langsam versetzt.



44 **38**

Abbildung 30: Synthese von 5-Nitro-*cyclo*SalPhosphorchloridat **38**

Der Versuch, die Verbindung **38** nach dem bekannten Syntheseprotokoll mit der 5'-OH-Gruppe von 3'-O-Acetylthymidin **64** zu verestern, scheiterte jedoch. Hierzu wurde das Nucleosid **64** in wasserfreiem Pyridin gelöst und bei –40 °C mit dem in absolutem THF gelösten Phosphorchloridat **38** tropfenweise versetzt (Abbildung 31).

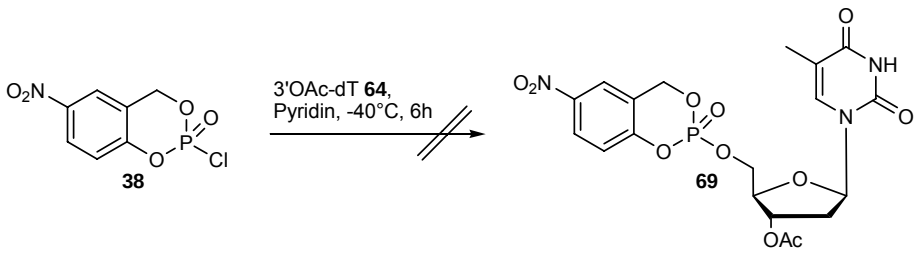


Abbildung 31: Versuch der Synthese von 5-NO_2-*cyclo*Sal-3'*O*Ac-dTMP **69** aus Phosphorchloridat **38**

Für das Gelingen dieser Reaktion ist es sehr wichtig, dass die Zugabe von **38** sehr langsam (ca. 150 µL/h), stark verdünnt und bei einer konstanten Temperatur von -40 °C erfolgt, da ansonsten ein spontaner C-O-Bindungsbruch an der Benzylposition des Phosphorchloridates **38** als Nebenreaktion auftreten kann (Abbildung 32).[115,116] Der Bindungsbruch resultiert aus dem nucleophilen Angriff von Pyridin auf das Phosphorsäurechlorid **38** unter Bildung des Pyridiniumsalzes **39**, das durch Reaktion mit dem Nucleosid entweder das gewünschte Produkt **40** liefert oder sich unter Spaltung des Benzylesters in das thermodynamisch stabilere Zwitterion **41** umwandelt. Dieses kann ebenfalls mit dem Nucleosid reagieren, jedoch unter Bildung des unerwünschten Phosphatdiesters **42**. Ein entsprechend dealkyliertes Produkt **42** wurde bereits in einer analogen Reaktion von *J. W. Perich et al.* beschrieben.[117] Sie konnten jedoch auch zeigen, dass sich diese Nebenreaktion durch Kühlen der Reaktionsmischung auf –40 °C weitgehend unterdrücken lässt.

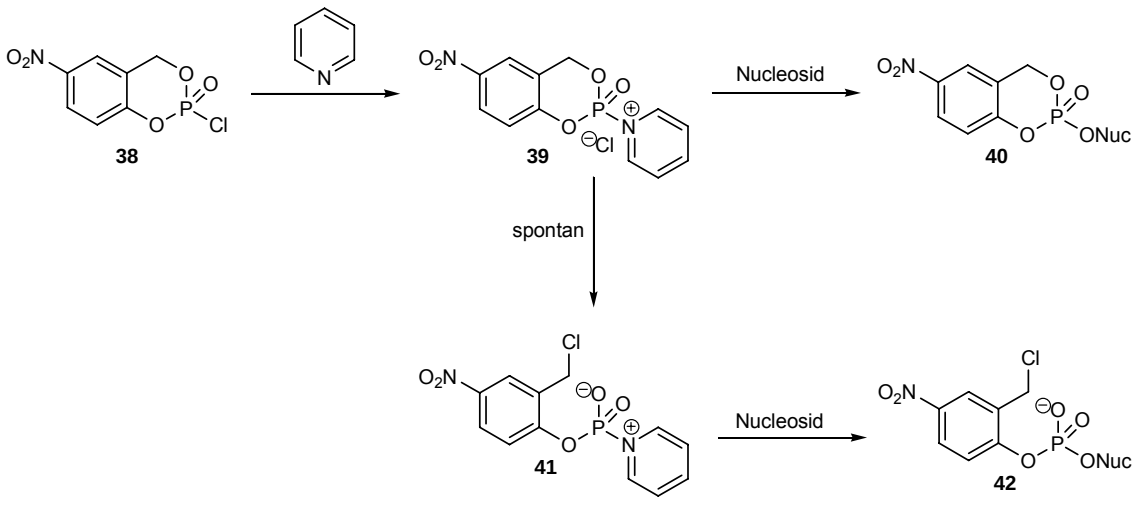


Abbildung 32: Mögliche Reaktionsprodukte bei der Veresterung eines Nucleosids mit *cyclo*Sal-Phosphorchloridaten in Pyridin

Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH: 9:1) verfolgt. Doch auch nach längerer Reaktionszeit konnte keine Umsetzung des Nucleosids beobachtet werden. Nach chromatographischer Reinigung wurde lediglich die eingesetzte Menge an Nucleosid reisoliert. Auch eine vorherige Deprotonierung der 5'-OH-Gruppe von **64** durch starke Basen, wie *tert*-Butylmagnesiumchlorid oder *n*-Butyllithium führte, zu keiner Steigerung des Umsatzes. Es konnte wieder lediglich das eingesetzte Edukt zurück gewonnen werden.
Diese Tatsache verwundert, da sich auf diese Weise bereits andere Acceptor-substituierte *cyclo*Sal-NMPs, wie beispielsweise die 5-Chlor- oder die 5-Formyl-Verbindung, in zufriedenstellenden Ausbeuten zwischen 50% und 60% darstellen ließen.[118] Donor-substituierte *cyclo*Sal-Triester werden mit dieser Methode sogar in Ausbeuten von über 80% erhalten. Warum es jedoch im Fall des Nitro-substituierten *cyclo*Sal-Phosphorchloridats **38** zu keiner Reaktion mit dem Nucleosid kommt, konnte während dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden.

Da dieser Ansatz zur Synthese NO_2-substituierter Triester gänzlich scheiterte, sollten im Folgenden die Reaktionsbedingungen der Phosphor(III)-Route genauer untersucht werden, um herauszufinden, welcher der beiden Schritte die Ausbeute limitiert.

4.2.3 Optimierung der P(III)-Route für die Synthese von 5-NO_2-*cyclo*Sal-NMPs

Es wurde unter 4.2 bereits erwähnt, dass die in der Arbeitsgruppe etablierte Standardmethodik zur Synthese von *cyclo*Sal-NMPs die höhere Reaktivität von Phosphor(III)-Reagenzien ausnutzt und aus einer zweistufigen Reaktionssequenz besteht: Die Umsetzung eines cyclischen Chlorphosphites mit dem Nucleosid zum Phosphittriester und der direkten Oxidation zur entsprechenden Phosphor(V)-Verbindung.
Hierfür wird das jeweilige Nucleosid, in den meisten Fällen, in Acetonitril gelöst und bei tiefen Temperaturen (–20 °C) langsam in Gegenwart von DIPEA mit dem cyclischen Chlorphosphit versetzt. Nach vollständiger Umsetzung des Nucleosids erfolgt die Oxidation des P(III)-Triesters in einer Eintopfreaktion mit einer Lösung von *tert*-Butylhydroperoxid in *n*-Decan. Die resultierenden Phosphattriester wurden auf diese Weise nach chromatographischer Reinigung, je nach Substitutionsmuster am aromatischen Ring, in Ausbeuten zwischen 50% und 80% erhalten. Lediglich für die

reaktiveren Nitro-Verbindungen erlaubt dieses Protokoll keinen reproduzierbaren Zugang, was gerade im Hinblick auf eine synthetische Nutzung dieser Verbindungen ein großes Problem darstellt.

Aus diesem Grund sollte exemplarisch die Umsetzung von 5-Nitrosaligenylchlorphosphit **50** mit 3'-*O*-Acetylthymidin **64** unter den bekannten Reaktionsbedingungen genauer untersucht werden. Hierfür bot sich eine Verfolgung der Reaktion mittels ^{31}P-NMR-Spektroskopie an. Aufgrund der natürlichen Isotopenhäufigkeit von annähernd 100% des ^{31}P-Kerns lassen sich die erhaltenen Produkte leicht quantifizieren.

Es stellte sich heraus, dass die Bildung des Phosphittriesters **43** nahezu quantitativ verläuft (Abbildung 33), jedoch nach Zugabe des Oxidationsmittels, *tert*-Butylhydroperoxid, eine Vielzahl von Zersetzungs- und Nebenprodukten gebildet werden. Der gewünschte Nitro-Phosphattriester **69** war danach lediglich zu ca. 20% im Reaktionsgemisch vorhanden (Abbildung 34).

Abbildung 33: ^{31}P-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 400 MHz) der Reaktionsmischung vor der Oxidation

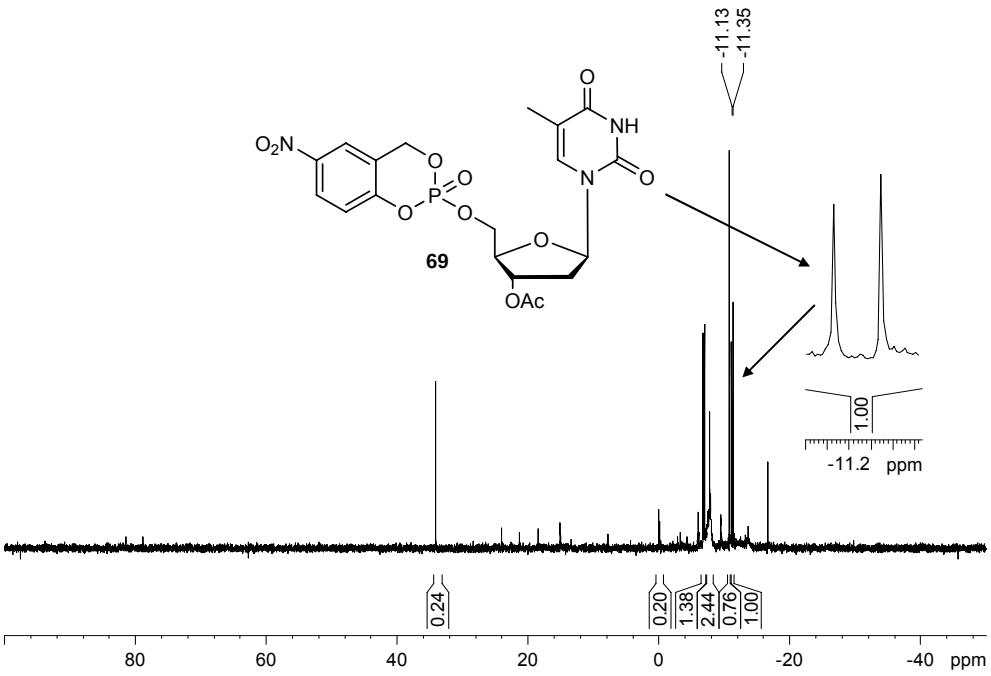


Abbildung 34: ^{31}P-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 400 MHz) der Reaktionsmischung nach der Oxidation mit *t*-BuOOH

Dieses Ergebnis bestätigt die niedrigen isolierten Ausbeuten, die auf dieser Route bisher für die NO_2-substituierten Verbindungen erzielt wurden. *Tert*-Butylhydroperoxid scheint für diese stark aktivierten und damit sehr labilen Phosphittriester zu aggressiv und nicht praktikabel zu sein. Es wurde daher im Folgenden versucht, die Oxidation mit anderen, milderen Oxidationsmitteln durchzuführen.

Eine sehr milde Variante schien vor diesem Hintergrund die Oxidation des Phosphittriesters **43** mit molekularem Sauerstoff zu sein. Hierfür wurde die Reaktion zunächst wie gewohnt durchgeführt, jedoch wurde nach quantitativer Umsetzung des Nucleosids versucht, das Reaktionsgemisch durch Einleiten von getrocknetem Sauerstoff über Nacht zu oxidieren. Das ^{31}P-NMR-Spektrum des Rohgemisches zeichnete sich jedoch durch eine Vielzahl verschiedener Produkte aus. Die gewünschte P(V)-Verbindung wurde auf diesem Weg nur in Spuren erhalten. Vermutlich stellt dieser Ansatz in diesem Zusammenhang keine brauchbare Alternative dar, da sich bereits bei der vergleichbaren Oxidation der Chlorphosphite nach *O. Ludek* herausstellte, dass für ein Gelingen der Reaktion die zu oxidierenden Verbindungen eine hohe Reinheit aufweisen müssen. Da eine Reinigung der Phosphittriester, aufgrund der enormen Reaktivität und der damit verbundenen

Labilität, ausgeschlossen ist, wurde diese Variante zur Oxidation von **43** nicht weiter verfolgt.

Ein weiteres mildes Oxidationsmittel stellt die bei der automatisierten Festphasensynthese von Oligonucleotiden eingesetzte Oxidationslösung dar. Dabei handelt es sich um ein Iod-THF-Pyridin-Gemisch, das Spuren von Wasser enthält. Da die für den Oligonucleotidsynthesizer kommerziell erhältlichen Oxidationslösungen nur sehr gering konzentriert sind, wurde das Gemisch für eine präparative Anwendung in höherer Konzentration (0.1 M) angesetzt.

Die Reaktionsmischung wurde bei –20 °C langsam mit der frischen Iod-Lösung (einem Äquivalent pro zu oxidierendem Phosphoratom) versetzt und für eine kurze Zeit bei dieser Temperatur gerührt. Auch in diesem Fall wurde der Verlauf der Oxidationsreaktion ^{31}P-NMR-spektroskopisch verfolgt. Überraschenderweise waren in diesem Fall ausschließlich die Signale der Diastereomere des gewünschten Nitro-Phosphattriesters **69** bei ca. -11 ppm zu erkennen (Abbildung 35).

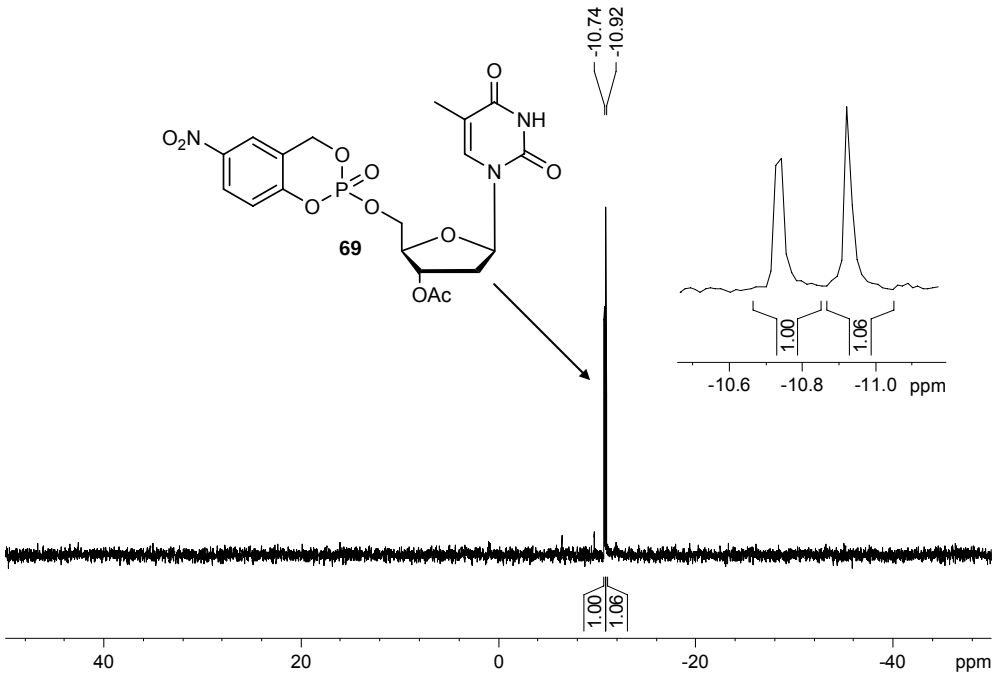


Abbildung 35: ^{31}P-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 400 MHz) der Reaktionsmischung nach der Oxidation mit Iod/Pyridin/THF/Wasser

Dieses sehr erfreuliche Ergebnis zeigt, dass nicht nur die Reaktion zum Phosphittriester **43**, sondern auch die Oxidation zur P(V)-Verbindung **69** mit einem milderen Oxidationsmittel nahezu quantitativ verläuft.

Nach chromatographischer Reinigung am Chromatotron konnte das gewünschte Produkt jedoch nur in 40%-iger Ausbeute isoliert werden, dies allerdings reproduzierbar. Die vorhandenen Iodsalze erschwerten sowohl die wässrige Aufarbeitung als auch eine vollständige Reinigung des Produktes, so dass dieses Ergebnis zwar zunächst sehr erfreulich, jedoch nicht restlos zufriedenstellend war.

Ein relativ neues, in der Literatur inzwischen vielfach verwendetes, Oxidationsmittel ist Oxone®. Es stellt ein gemischtes Salz aus $2KHSO_5{\cdot}KHSO_4{\cdot}K_2SO_4$ dar, wobei $KHSO_5$ die aktive Komponente ist. Oxone® hat aufgrund seiner Stabilität, seiner einfachen Handhabung und niedriger Kosten schnell an Gebrauch zugenommen.[119,120] Es wird beispielsweise zur Oxidation von bor-, stickstoff-, phosphor- und schwefelhaltigen Verbindungen verwendet.[121-130] Daher lag es nahe, dieses Salzgemisch für die Oxidation von **43** zu testen.
Die Oxidation der Phosphor(III)-Verbindung **43** erfolgte durch Zugabe einer wässrigen Lösung von Oxone® (ca. 0.2 M) bei tiefen Temperaturen (-10 °C). Trotz sofortigem Ausfallen des Salzes aus Acetonitril war die Oxidation zum Phosphattriester laut dünnschichtchromatographischer Kontrolle (DCM/MeOH: 9:1) nach wenigen Minuten quantitativ. Auch das Protonenbreitband-entkoppelte ^{31}P-NMR-Spektrum des Rohgemisches zeigte ausschließlich die Signale der Diastereomere von **69**. Die Befürchtung, der hoch hydrolyseempfindliche Phosphittriester **43** würde durch die erhebliche Menge Wasser umgehend zersetzt werden, bestätigte sich nicht, da wässrige Lösungen dieses Salzgemisches aufgrund der vorhandenen Sulfationen einen pH-Wert von etwa 2 besitzen. Durch die kurze Reaktionszeit und die tiefen Temperaturen waren alle synthetisierten *cyclo*Sal-NMPs **66**-**72** (vgl. Kap. 4.2.7) unter diesen stark sauren Bedingungen stabil. Außerdem führten die gegebenen Reaktionsparameter ausnahmslos zu einer selektiven Oxidation des Phosphoratoms; die vorhandenen C-C-Doppelbindungen der verschiedenen Nucleoside wurden nicht angegriffen. Erst bei längeren Reaktionszeiten (>45 min) und einer Erwärmung auf Raumtemperatur kam es zu einer zusätzlichen Epoxidierung der Doppelbindung des Heterocyclus von d4T **23**, da nach wässriger Aufarbeitung die 5 und 6 Position des Thymins hydroxyliert waren. Die Doppelbindung der Furanoseeinheit blieb hingegen unangetastet.[131]

Die Aufarbeitung der Reaktion stellte sich als sehr einfach heraus, da sich sowohl die anorganischen Salze als auch die im Überschuss eingesetzten Reagenzien durch Extraktion mit Wasser vollständig entfernen ließen. Als optimal erwies sich in diesem Zusammenhang die Beibehaltung von DIPEA als Base. Der Einsatz von Pyridin oder Triethylamin führte zur Bildung von Nebenprodukten.

Die auf diese Weise erhaltenen Rohprodukte fallen dabei in einer so hohen Reinheit an, dass sie ohne einen weiteren Reinigungsschritt direkt für die folgenden Umsetzungen eingesetzt werden können. Als Beispiele hierfür sind das ^{1}H- sowie das Protonenbreitband-entkoppelte ^{31}P-NMR-Spektrum des Rohprodukts von 5-Nitro-*cyclo*Sal-*N*^{6},2',3'-triacetyladenosinmonophosphat **66** aufgeführt (Abbildung 36, 37).

Die erzielten Ausbeuten sind mit über 80% hervorragend. Eine genaue Übersicht der durchgeführten Reaktionen und der dabei erhaltenen Ausbeuten findet sich in Kapitel 4.2.7.

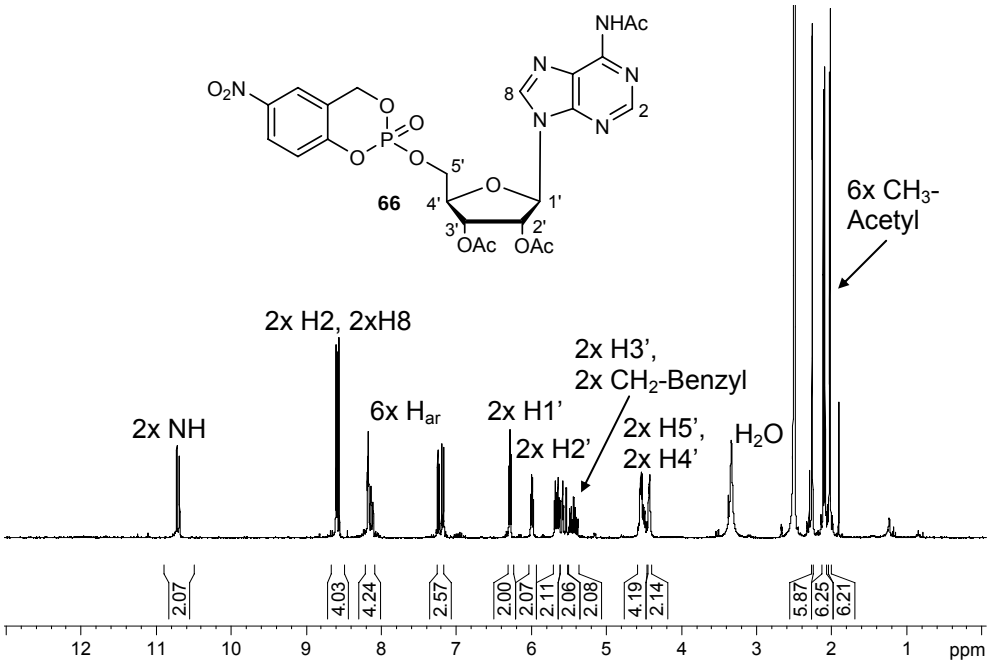


Abbildung 36: ^{1}H-NMR-Spektrum (DMSO-d$_6$, 400 MHz) des Rohprodukts von 5-Nitro-*cyclo*Sal-*N*^{6},2',3'-triacetyladenosinmonophosphat **66**

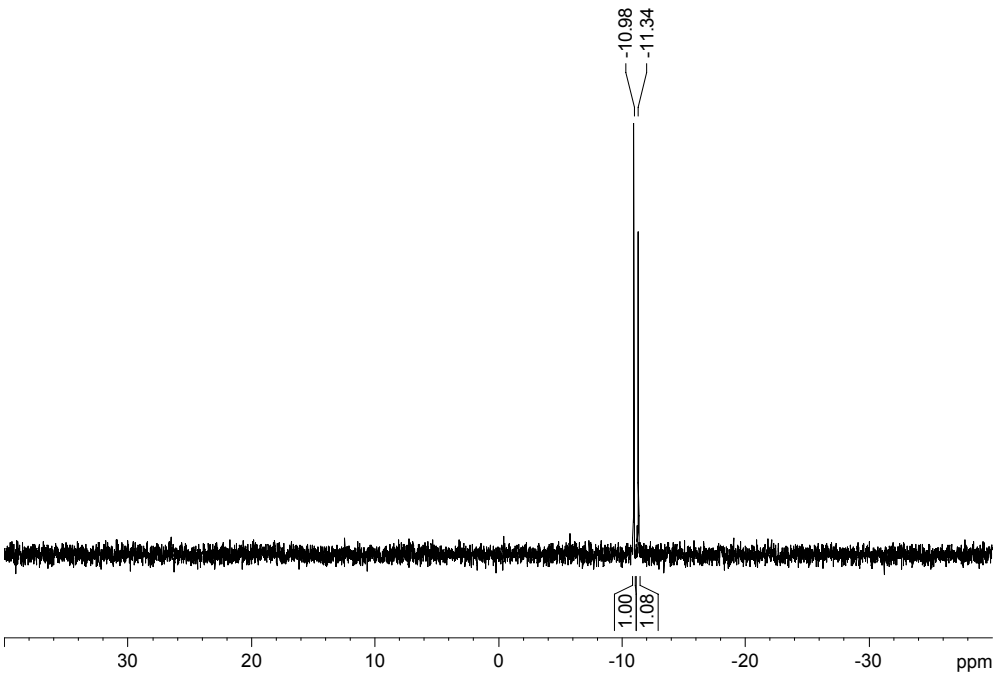


Abbildung 37: ^{31}P-NMR-Spektrum (DMSO-d_6, 162 MHz) des Rohprodukts von 5-Nitro-*cyclo*Sal-N^6,2',3'-triacetyladenosinmonophosphat **66**

Eine letzte Herausforderung stellte in diesem Zusammenhang allerdings noch die chromatographische Reinigung dieser empfindlichen Verbindungen dar. Auch wenn die erhaltenen Rohprodukte in der Regel bereits eine sehr hohe Reinheit aufwiesen, war es für eine exakte Ausbeutebestimmung der Folgestufen von großem Interesse, reine Edukte einzusetzen.

Generell erfolgt die chromatographische Reinigung von *cyclo*Sal-Phosphattriestern am Chromatotron mit Dichlormethan-Methanol-Gemischen als Laufmittel, wobei das Methanol mit 0.1% Essigsäure versetzt wird, um eine Zersetzung des Produktes während der Trennung zu verhindern. Erneut konnten diese Bedingungen nicht auf die feuchtigkeitsempfindlicheren Nitro-substituierten Verbindungen übertragen werden, da es in den meisten Fällen zu einer vollständigen Zersetzung der Produkte führte.

Setzt man beiden Eluenten jedoch eine größere Menge Essigsäure (0.5–1%) zu, gelingt auch eine Reinigung der labilen NO_2-Verbindungen am Chromatotron. Die reinen Verbindungen werden dann zwar nur noch in Ausbeuten von 50% erhalten, da eine Zersetzung der Produkte auch unter diesen Bedingungen nicht vollständig verhindert werden kann. Im Hinblick auf eine exakte Ausbeutebestimmung der Folgestufen ist dieses Ergebnis allerdings äußerst zufriedenstellend.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass durch den Wechsel des Oxidationsmittels ein effizienter und reproduzierbarer Zugang zu den sehr reaktiven Nitro-substituierten *cyclo*Sal-NMPs etabliert werden konnte. Dieses Ergebnis ist unter dem Aspekt einer synthetischen Nutzung von 5-Nitro-substituierten *cyclo*Sal-NMPs äußerst zufriedenstellend, da es jetzt erstmals möglich ist größere Mengen der gewünschten Schlüsselverbindungen zuverlässig herzustellen. Selbstverständlich lassen sich die neuen Reaktionsbedingungen auch auf andere Substituenten, wie zum Beispiel 5-Chlor-substituierte *cyclo*Sal-Nucleotide, übertragen.
Nachfolgend wird die Synthese der Einzelkomponenten der *cyclo*Sal-Nucleotide näher erläutert. Den Grundbaustein stellen substituierte Salicylalkohole dar, deren Darstellung im nächsten Abschnitt beschrieben wird.

4.2.4 Darstellung der Salicylalkohole

Neben der bereits erwähnten 5-Nitro-substituierten Verbindung **44** wurde außerdem 5-Chlorsalcylalkohol **45** synthetisiert, da sich die entsprechenden 5-Chlor-substituierten *cyclo*Sal-NMPs als sehr zuverlässig bei der Darstellung von Nucleosid-5'-di- und -triphosphaten erwiesen haben.[94]
Die einfachste Möglichkeit zur Synthese von Salicylalkoholen besteht in der Reduktion der entsprechenden kommerziell erhältlichen Salicylaldehyd- und Salicylsäure-Derivate mit gängigen Reduktionsmitteln (Abbildung 38).

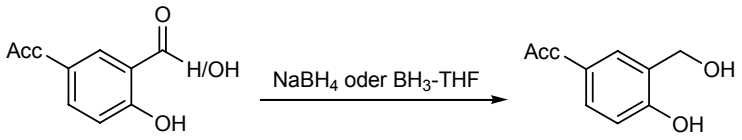


Abbildung 38: Synthese von Salicylalkoholen durch Reduktion der Carbonylverbindungen

Die Darstellung von 5-Chlorsalicylalkohol **45** erfolgte durch Reduktion der entsprechenden Salicylsäure **46** nach *H. C. Brown et al.* mit einer Boran-Tetrahydrofuran-Komplex-Lösung in THF.[132] Die Umsetzung verlief problemlos bei Raumtemperatur über Nacht mit einer Ausbeute von 85% (Abbildung 39).
Die Reduktion der entsprechenden Nitro-substituierten Salicylsäure **47** gestaltete sich unter diesen Bedingungen jedoch problematisch und ergab sehr viel schlechtere Ausbeuten. Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur (Rückfluss) führte zu einer Steigerung der Ausbeute auf bis zu 70% (Abbildung 39).

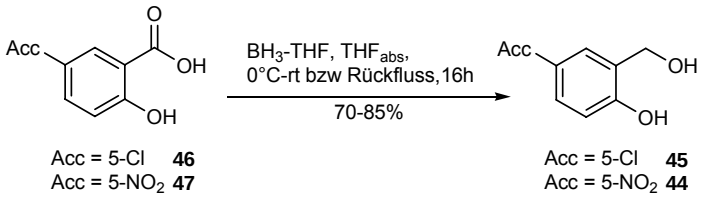


Abbildung 39: Synthese der Salicylalkohole **44** und **45** durch Reduktion mit BH_3-THF

Die Reinigung erfolgte in beiden Fällen chromatographisch am Chromatotron (Dichlormethan mit Methanol-Gradient) und stellte sich bei der stark gefärbten Nitroverbindung **44** als recht aufwendig heraus.

Alternativ und zudem sehr bequem gelingt die Darstellung von **44** durch Reduktion von 5-Nitrosalicylaldehyd **48** mit Natriumborhydrid in Ethanol.[133] Die Reaktion erfolgt in diesem Fall bei Raumtemperatur über Nacht und liefert das gewünschte, sehr reine Produkt nach Umkristallisieren aus Wasser in hohen Ausbeuten von bis zu 86%.

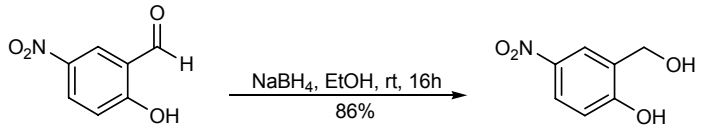


Abbildung 40: Synthese von **44** durch Reduktion des Aldehyds **48** mit $NaBH_4$

Der Salicylaldehyd **48** ist im Gegensatz zur Carbonsäure **47** zwar vergleichsweise teuer, allerdings stellt Natriumborhydrid ein weitaus günstigeres Reduktionsmittel als die zur Reduktion der Säure eingesetzte Boran-THF-Komplex-Lösung dar, so dass die Umsetzung des Aldehyds insgesamt preiswerter ausfällt und somit im Folgenden standardmäßig zur Synthese von **44** herangezogen wurde.

4.2.5 Darstellung der Saligenylchlorphosphite

Die Synthese der cyclischen Saligenylchlorphosphite erfolgte nach einer etablierten Methode,[63] bei der die in absolutem Diethylether gelösten Salicylalkohole bei -20 °C mit 1.2 Äquivalenten Phosphortrichlorid versetzt werden. Zum Abfangen des entstehenden Chlorwasserstoffes werden 2.3 Äquivalente Pyridin, ebenfalls gelöst in wasserfreiem Diethylether, langsam zugetropft (Abbildung 41).

Durch die tiefe Temperatur und eine ausreichende Verdünnung wird die intramolekulare Ringschlussreaktion gewährleistet. Die resultierenden cyclischen

Chlorphosphite, die nach Schlenkfiltration und Entfernen des Lösungsmittels erhalten werden, sind außerordentlich feuchtigkeitsempfindlich, weshalb sie in der Regel nicht weiter gereinigt, sondern direkt in Rohform für die Synthesen der entsprechenden *cyclo*Sal-Nucleotide eingesetzt werden. Grundlage für die Qualität der Rohsubstanzen stellen die ^{31}P-NMR-Spektren dar. Die Absorptionen dieser cyclischen Phosphor(III)-Verbindungen liegen in einem dafür typischen Bereich zwischen 130 und 140 ppm. Aus den ^{1}H-NMR-Spektren kann der Anteil an noch vorhandenem Pyridiniumchlorid bestimmt und zur Beurteilung der Reinheit der Produkte herangezogen werden.
Die Saligenylchlorphosphite **49** und **50** konnten auf diesem Weg in zufriedenstellenden Ausbeuten zwischen 70 und 80% erhalten werden.

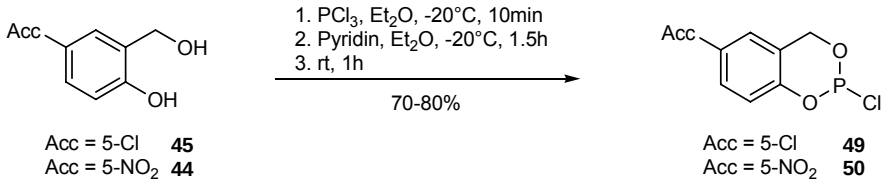
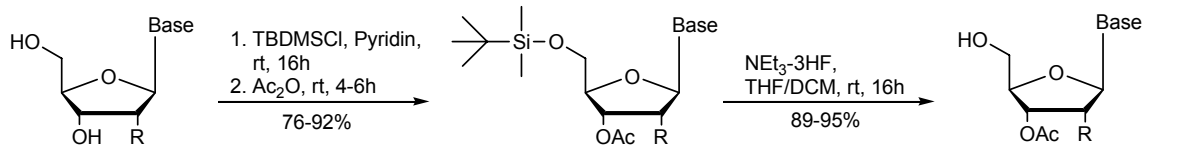


Abbildung 41: Synthese der Saligenylchlorphosphite **49** und **50**

4.2.6 Darstellung der modifizierten Nucleoside 61-65

Da es bei der Darstellung der *cyclo*Sal-Nucleotide infolge der hohen Reaktivität der phosphitylierenden Reagenzien **49** und **50** zu unselektiven Mehrfachphosphitylierungen der freien Hydroxyfunktionen des Nucleosides kommen kann,[108] wurden die entsprechenden reaktiven Positionen vor der Umsetzung zum *cyclo*Sal-Triester blockiert.

Die Darstellung der geschützten Nucleoside **61**-**65** erfolgte nach einer bereits erprobten, drei Stufen umfassenden Syntheseroute[134] ausgehend von Adenosin **51**, Uridin **52**, Cytidin **53**, 2'-Desoxythymidin **54** sowie (*E*)-5-(2-Bromvinyl)-2'-desoxyuridin (BvdU) **55** (Abbildung 42). Auf die Verwendung des unnatürlichen Nucleosids **55** wird in Kapitel 4.4.3 noch genauer eingegangen.



51 Base = A, R = OH
52 Base = U, R = OH
53 Base = C, R = OH
54 Base = T, R = H
55 Base = BVU, R = H

56 Base = A^{NHAc}, R = OAc
57 Base = U, R = OAc
58 Base = C^{NHAc}, R = OAc
59 Base = T, R = H
60 Base = BVU, R = H

61 Base = A^{NHAc}, R = OAc
62 Base = U, R = OAc
63 Base = C^{NHAc}, R = OAc
64 Base = T, R = H
65 Base = BVU, R = H

Abbildung 42: Synthese der geschützten Nucleoside **61-65**

Im ersten Schritt wurden die 5'-Hydroxyfunktion der Nucleoside **51**-**55** selektiv als *tert*-Butyldimethylsilylether geschützt. Da besonders im Fall der Ribonucleoside **51**-**53** die resultierenden Produkte nach wie vor eine hohe Polarität aufweisen, gestaltet sich die wässrige Aufarbeitung dieser verhältnismäßig problemlosen Reaktion als schwierig und führt in der Regel zu Ausbeuteverlusten. Aus diesem Grund erfolgte die anschließende Veresterung der verbleibenden reaktiven Positionen mit Essigsäureanhydrid in einer Eintopfreaktion. Die vollgeschützten Produkte **56**-**60** wurden nach chromatographischer Reinigung an Kieselgel (Petrolether/ Ethylacetat 3:2) ausnahmslos in sehr guten Ausbeuten (76-92%) erhalten. Der Grund für die Verwendung von Acetylschutzgruppen besteht zum einen in ihrer ausreichenden Stabilität während den Folgereaktionen und zum anderen in der einfachen Abspaltung auf Stufe der gewünschten Zielverbindung unter mild basischen Bedingungen.

Die Abspaltung der Silylschutzgruppe erfolgte mit Triethylamintrihydrofluorid in einem THF-Dichlormethan-Gemisch bei Raumtemperatur. Eine zusätzliche Spaltung der Acetylschutzgruppen wurde unter den gewählten Bedingungen in keinem Fall beobachtet. Die eigentliche Herausforderung dieser Reaktion bestand in der Abtrennung der während der Reaktion entstandenen Triethylammoniumsalze. Dies gelang durch eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (Etyhlacetat/Methanol 4:1) und lieferte die gewünschten 5'-OH-freien Verbindungen **61**-**65** in ebenfalls hohen Ausbeuten von 89-95%.

Da die zur Schützung der Nucleoside durchgeführten Reaktionen allesamt bereits etablierte Standardsynthesen darstellen, soll an dieser Stelle nicht detaillierter darauf eingegangen werden, sondern mit ihrer Umsetzung zu den entsprechenden *cyclo*Sal-Verbindungen fortgefahren werden.

4.2.7 Darstellung der *cyclo*Sal-Nucleotide 66-72

Das überarbeitete Syntheseprotokoll zur erfolgreichen Darstellung von Acceptor-substituierten *cyclo*Sal-Nucleotiden wurde bereits in Abschnitt 4.2.3 vorgestellt. An dieser Stelle sollen die durchgeführten Reaktionen zur Darstellung der *cyclo*Sal-NMPs **66**-**72** nochmals zusammengefasst und genauer beschrieben werden. Abbildung 43 gibt eine Übersicht der synthetisierten Verbindungen **66**-**72**. Insgesamt wurden die 5-Nitro-*cyclo*saligenyl-Phosphattriester von N^6,2',3'-Triacetyladenosin **61**, 2',3'-*O*-Acetyluridin **62**, N^4,2',3'-Triacetylcytidin **63**, 3'-*O*-Acetyl-2'-desoxythymidin **64**, (*E*)-5-(2-Bromvinyl)-3'-*O*-acetyl-2'-desoxyuridin **65** und N^2-Formamidin-2',3'-*O*-acetylguanosin **73**, welches von T. Zismann freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde, sowie der 5-Chlor-*cyclo*saligenyl-Phosphattriester von **64** in durchweg guten bis sehr guten Ausbeuten synthetisiert.

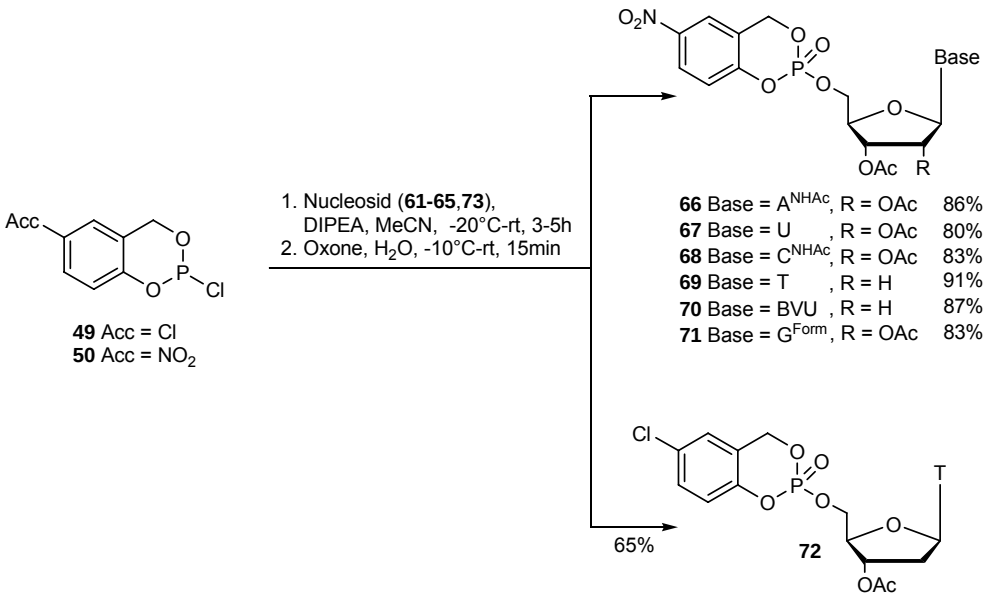


Abbildung 43: Synthese der 5-Acceptor-substituierten *cyclo*Sal-NMPs **66-72**

Anhand der Erkenntnisse aus Kapitel 4.2.3 stellte sich folgende Vorgehensweise zur Synthese der *cyclo*Sal-Verbindungen **66**-**72** als optimal heraus: Das jeweilige geschützte Nucleosid wurde in Acetonitril vorgelegt und bei –20 °C mit je 2.0 Äquivalenten DIPEA sowie 2.0 Äquivalenten des entsprechenden Saligenylchlorphosphits, ebenfalls gelöst in wasserfreiem Acetonitril, langsam versetzt. Hiernach wurde das Reaktionsgemisch bis zur vollständigen Umsetzung des Nucleosids (DC-Kontrolle: DCM/MeOH 9:1) bei Raumtemperatur gerührt und im Anschluss *in situ* bei –10 °C durch Zugabe von 4.0 Äquivalenten Oxone®, gelöst in

Wasser, oxidiert. Die Oxidation zum Phosphattriester wurde ebenfalls dünnschichtchromatographisch verfolgt und stellte sich bereits nach wenigen Minuten als quantitativ heraus. Die Reaktionslösung wurde daraufhin direkt mit Ethylacetat und kaltem Wasser extrahiert. Die erhaltenen Rohprodukte wurden nochmals in Dichlormethan aufgenommen und von unlöslichen Bestandteilen durch Filtration befreit, woraufhin nahezu farblose Schäume erhalten wurden, die nach Gefriertrocknung als farblose Watten vorlagen. Die Qualität dieser Rohprodukte war, wie bereits erwähnt, außerordentlich hoch, so dass die Verbindungen **66-71** in den meisten Fällen ohne einen weiteren Reinigungsschritt in den nachfolgenden Reaktionen eingesetzt wurden. Ein weiterer Grund für dieses Vorgehen bestand darin, dass es erst in einem sehr weit fortgeschrittenen Stadium dieser Arbeit gelungen ist, die stark labilen und feuchtigkeitsempfindlichen Nitro-substituierten Phosphattriester chromatographisch zu reinigen. Für eine genaue Ausbeutebestimmung einiger Folgereaktionen wurden die *cyclo*Sal-NMPs **66**, **68**, und **69** am Chromatotron durch Ansäuern der Eluenten (Dichlormathan/Methanol (0-5%)) mit etwa 1% Essigsäure erfolgreich gereinigt. Die angegebenen Ausbeuten der Nitrotriester **66**-**71** (Abbildung 43) beziehen sich jedoch ausschließlich auf die nicht chromatographierten Produkte. Die Ausbeuten der gereinigten Verbindungen liegen im Durchschnitt bei circa 50%, was für die weitere Arbeit ein immer noch sehr zufriedenstellendes Ergebnis darstellte. Die Ausbeute des 5-Chlor-substituierten Triesters **72** bezieht sich hingegen auf die gereinigte Verbindung (Abbildung 43), da diese aufgrund ihrer höheren Stabilität ein vergleichsweise unproblematisches chromatographisches Verhalten aufweist.

Nachdem nun eine zuverlässige Methode vorlag, die gewünschten 5-Nitro-substituierten *cyclo*Sal-Nucleotide in hohen Ausbeuten und größeren Mengen herzustellen, konnte im Folgenden mit der Synthese der eigentlichen Zielverbindungen dieser Arbeit begonnen werden.

4.3 Darstellung der Zielverbindungen

Einen Überblick der eingesetzten Nucleophile und der daraus resultierenden Reaktionsprodukte vermittelt das abgebildete Sterndiagramm (Abbildung 44).

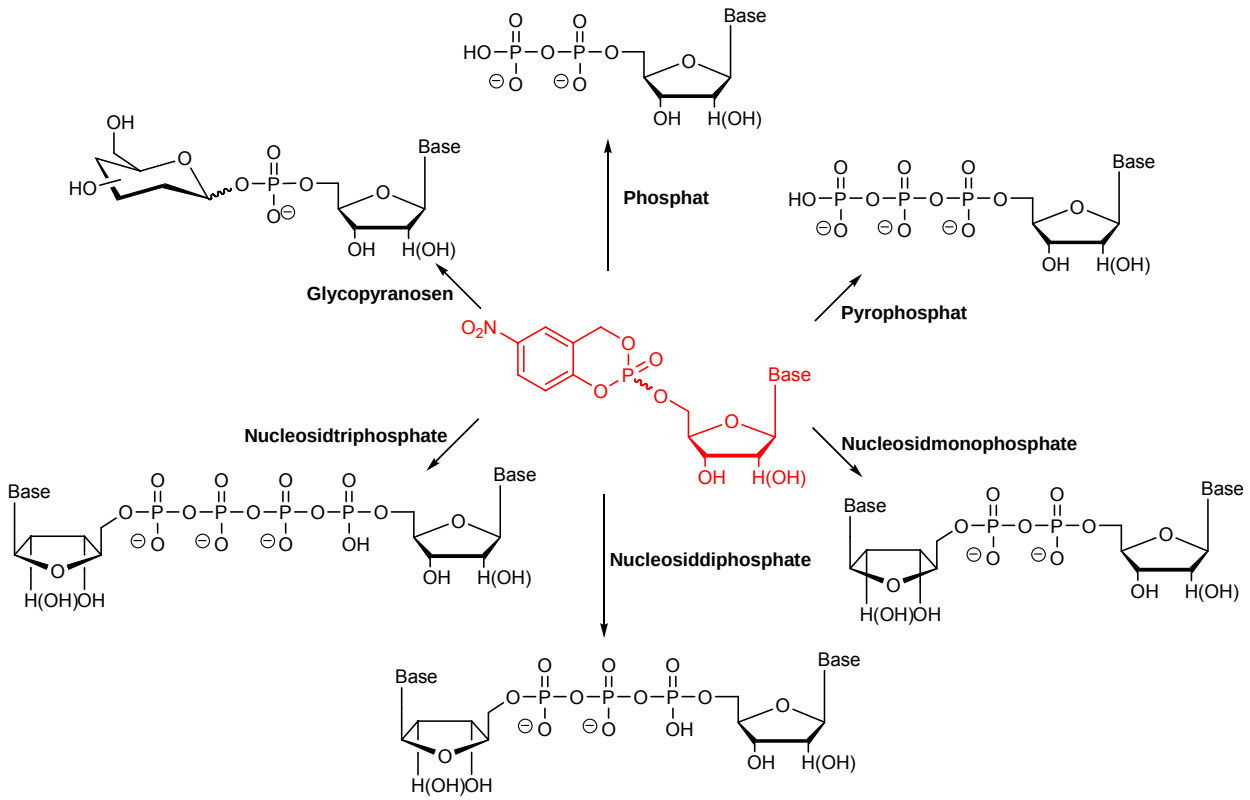


Abbildung 44: Übersicht der dargestellten Zielverbindungen aus 5-NO_2-*cyclo*Sal-NMPs

Neben einer Ausweitung der Synthese auf weitere Nucleosid-5'-di- und triphosphate (Kapitel 4.4) sollten erstmalig Nucleotide sowie NDPs und NTPs als Nucleophile zur Synthese von Dinucleosidoligophosphaten (Kapitel 4.5) zum Einsatz kommen. Außerdem wurden in Anlehnung an die erfolgreiche Synthese von NDP-Pyranosen im Arbeitskreis zum ersten Mal verschiedene Nucleosidmonophosphat-Pyranosen durch Reaktion der entsprechenden Glycoside mit *cyclo*Sal-Phosphattriestern dargestellt (Kapitel 4.6). Zum Teil wurden die Umsetzungen zunächst an einfacheren Modellverbindungen erprobt, um die Methode im Anschluss für die Synthese biologisch relevanter Moleküle wie zum Beispiel Diadenosintetraphosphat (Ap_4A) **4** oder Cytidinmonophosphat-*N*-Acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac) **8** zu verwenden. Zudem erfolgte die Synthese einiger Analoga, wie beispielsweise BVdU-di- und

-triphosphat **83**, **85** sowie Adenosin-5'-β,γ-methylentriphosphat **86**, die die Allgemeingültigkeit der Methodik unterstreichen.

Der diesen Umsetzungen zugrunde liegende Reaktionsmechanismus wurde im Kenntnisstand bereits vor dem Hintergrund des Prodrugkonzeptes vorgestellt und soll an dieser Stelle nochmals für die synthetische Anwendung von *cyclo*Sal-NMPs aufgegriffen werden.

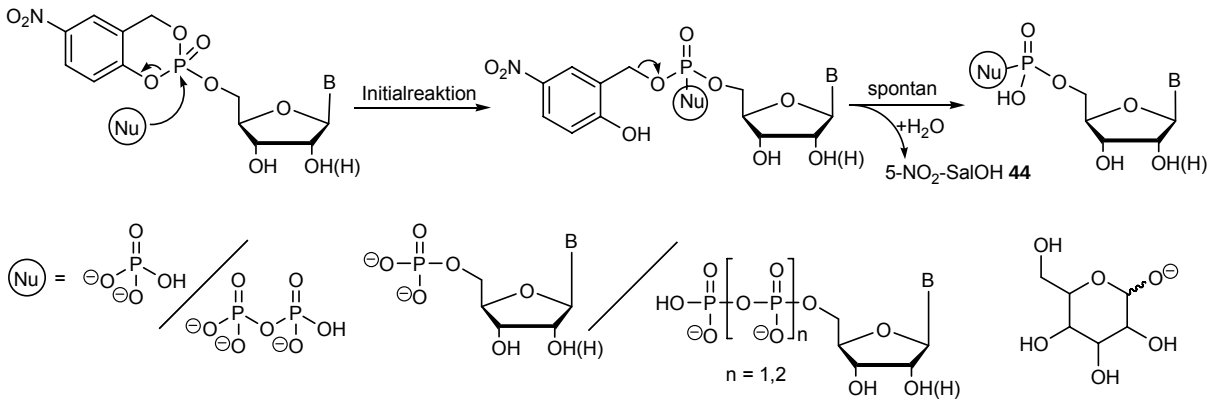


Abbildung 45: Spaltung von *cyclo*Sal-NMPs durch verschiedene Nucleophile

Aufgrund der chemischen Differenzierbarkeit der drei Phosphatesterbindungen im *cyclo*Sal-Fragment erfolgt nach Angriff des Nucleophils als Initialreaktion zunächst selektiv die Spaltung der phenolischen Phosphatesterbindung zum mesomeriestabilisierten Benzylphosphatdiester, der in einer spontanen Reaktion den gewünschten Nucleosidphosphatester freisetzt.

Wie bereits in Kapitel 2.2 erläutert, wurde das *cyclo*Sal-Konzept ursprünglich als Pro-Nucleotidsystem zur selektiven intrazellulären Freisetzung von Nucleosidmonophosphaten entwickelt.[135] Da dieses System im Gegensatz zu anderen literaturbekannten Pro-Nucleotid-Konzepten nicht auf eine enzymatische Aktivierung angewiesen ist, können *cyclo*Sal-Nucleotide alternativ auch als Phosphataktivester zur Synthese unterschiedlicher phosphorylierter Biomoleküle im Labormaßstab herangezogen werden.

Die Eignung von *cyclo*Sal-Verbindungen als genereller Synthesebaustein wird in den folgenden Abschnitten an verschiedenen Beispielen demonstriert.

4.4 Darstellung von Nucleosid-5'-di- und –triphosphaten

In eigenen Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass, ausgehend von *cyclo*Sal-Nucleotiden, verschiedene Nucleosid-5'-di- und –triphosphate in kurzer Zeit und mit reproduzierbaren Ausbeuten im Labormaßstab synthetisiert werden können.[94]

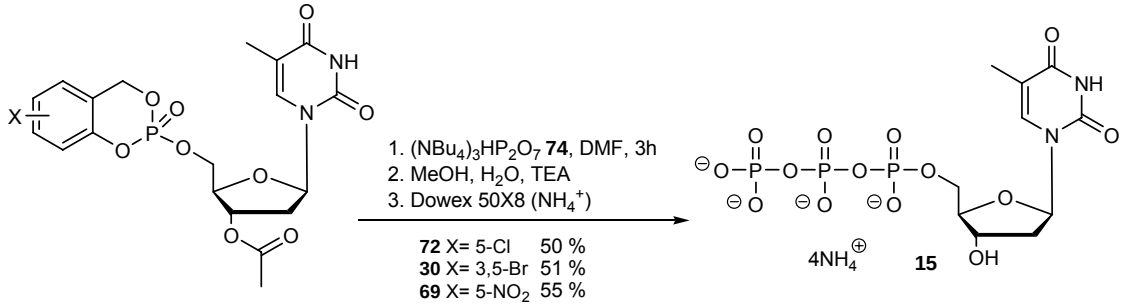


Abbildung 46: Synthese von TTP **15** ausgehend von unterschiedlich Acceptor-substituierten *cyclo*Sal-Phosphattriestern

Für eine effiziente Umsetzung der *cyclo*Sal-Triester musste das kommerziell verfügbare Dinatriumdihydrogenpyrophosphat zunächst in eine lipophilere und damit nucleophilere Form überführt werden. Gute Ergebnisse wurden hierbei durch Verwendung des Tetra-*n*-butylammonium-Gegenions erzielt. Das resultierende N(nBu$_4$)$_3$-Pyrophosphat **74** zeichnete sich durch eine hohe Nucleophilie, dementsprechend kurze Reaktionszeiten und eine geringe Anzahl von Nebenreaktionen aus. Allerdings wirkten sich die stark lipophilen Ionen nachteilig auf das Elutionsverhalten des gewünschten Produktes aus, so dass eine Reinigung des entschützten Triphosphates **15** durch Umkehrphasenchromatographie erst nach Überführung der Verbindungen in ihre Ammonium-Salze erfolgreich war.

Des Weiteren konnten die Triphosphate von Uridin **80** und *carba*-dT **31** sowie 2'-Desoxythymidindiphosphat **84** auf diesem Weg erfolgreich dargestellt werden (Abbildung 47). Das carbocyclische Triphosphat **31** wurde für Mechanismusstudien mit der viralen DNA Polymerase benötigt, da *carba*-dT **32** sehr vielversprechende antivirale Eigenschaften gegen HIV-1 and HIV-2 zeigte.[95] Diese Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. V. Marquez, NCI-Frederik, USA und ergaben einen neuartigen Wirkmechanismus, der auf einem „verzögertem" Kettenabbruch basiert.[96]

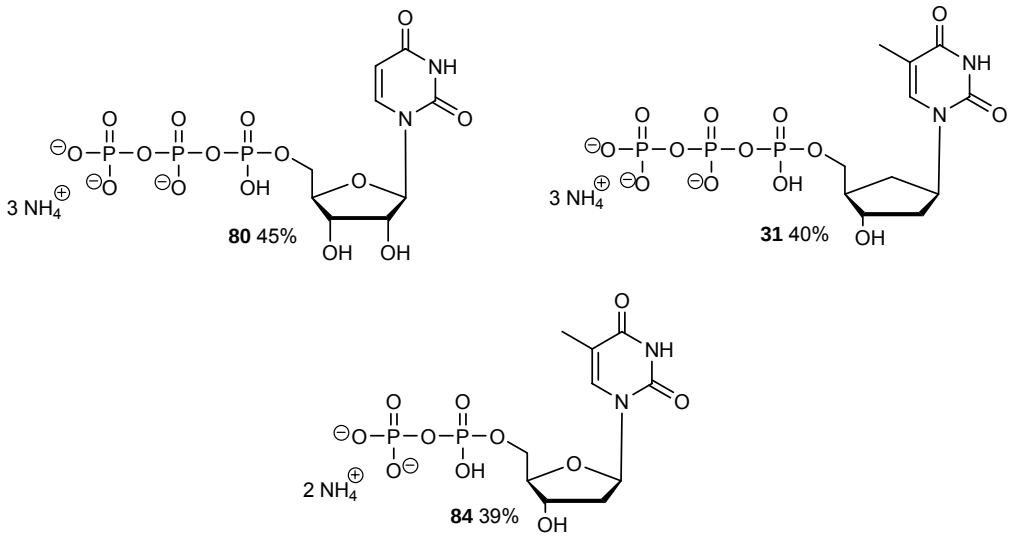


Abbildung 47: In Vorarbeiten aus *cyclo*Sal-NMPs synthetisierte N(D)TPs

In dieser Arbeit sollte eine Optimierung der Syntheseroute hinsichtlich der chemischen Ausbeuten, sowie eine Ausweitung der Methode auf alle natürlichen NTPs und einiger Analoga erfolgen.

4.4.1 Optimierung der N(D)TP-Synthese

Für eine ertragreichere Umsetzung wurde das ursprüngliche Syntheseprotokoll nochmals überarbeitet und wie folgt abgeändert: Die Ausgangsverbindungen wurden zum Entfernen sämtlicher Feuchtigkeitsreste einer mehrstündigen Trocknung im Ölpumpenvakuum unterzogen. Da die als Nucleophile eingesetzten $N(n\text{Bu}_4)_x$-Phosphatsalze **74**, **75** stark hygroskopisch sind, wurden diese zusätzlich vor Zugabe des Triesters circa zwei Stunden über Molsieb in DMF getrocknet und nach dieser Zeit tropfenweise mit dem ebenfalls in DMF gelösten *cyclo*Sal-Nucleotid versetzt, so dass zu jedem Zeitpunkt ein Überschuss des Nucleophils vorlag und eine schnelle Umsetzung gewährleistet ist.

Die Umsetzung von 5-NO_2-*cyclo*Sal-3'*O*-acetyl-dTMP **69** und $N(n\text{Bu}_4)_3$-Pyrophosphat **74** (2.5 Äquivalente) wurde unter diesen abgeänderten Bedingungen ^{31}P-NMR-spektroskopisch verfolgt und stellte sich bereits nach einstündiger Reaktionszeit als quantitativ heraus (Abbildung 48).

Neben überschüssigem Pyrophosphat (grün markiert) sind die Signale des gewünschten NTP durch die charakteristischen Absorptionen bei –22, -13 und -9 ppm (blau markiert) sowie an dem speziellen Kopplungsmuster eindeutig zu

erkennen. Zusätzlich sind zwei weitere Dupletts bei -8.5 und –9.5 ppm (rot markiert) mit demselben Integral, in einem Verhältnis von 0.8:1 zum Produkt, entstanden. Zunächst wurde vermutet, dass diese zu dem entsprechenden NDP gehören, dessen Bildung allerdings nur aus einem Angriff von Phosphat auf den Triester resultieren könnte. Eine Hydrolyse des Pyrophosphats in diesem Ausmaß ist jedoch eher unwahrscheinlich.

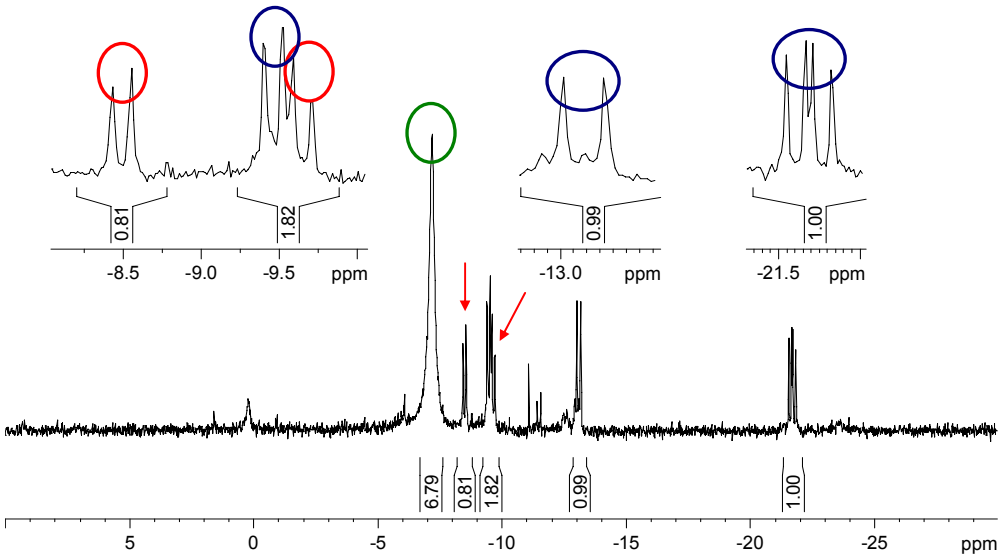


Abbildung 48: ^{31}P-NMR-Spektrum (CD_3CN, 162 MHz) des Rohgemisches der Reaktion von 5-NO_2-*cyclo*Sal-3'*O*-acetyl-dTMP **69** und N(nBu$_4$)$_3$-Pyrophosphat **74**

Bedenkt man jedoch, dass neben dem gewünschten Nucleosidtriphosphat unter wasserfreien Bedingungen auch ein reaktives Chinonmethid **76** entsteht, könnten die zusätzlichen Dupletts vielmehr aus der Reaktion von **76** mit überschüssigem Pyrophosphat resultieren (Abbildung 49).

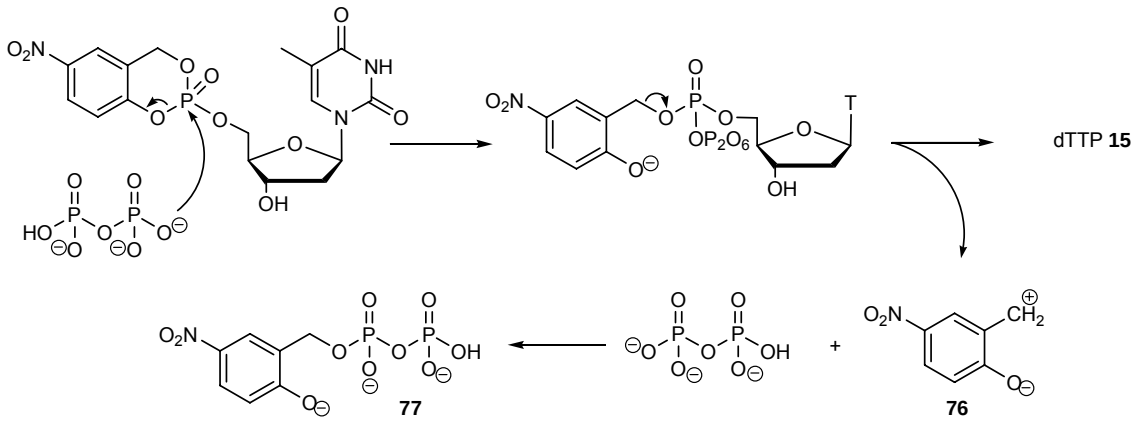


Abbildung 49: Postulierte Bildung des benzylierten Pyrophosphats **77**

Die mit der Benzylierung des Pyrophosphats einhergehende Desymmetrierung führt zu einer Differenzierung der beiden Phosphoratome, weshalb im Protonenbreitband-entkoppelten ^{31}P-NMR-Spektrum für Verbindung **77** durch geminale $^{2}J_{PP}$-Kopplung zwei Dupletts mit einer Kopplungskonstante von 19.4 Hz entstehen. Eine massenspektrometrische Analyse des Rohgemisches bestätigte die Bildung des benzylierten Pyrophosphats **77**, das zu einem späteren Zeitpunkt dieser Arbeit sogar isoliert werden konnte.
Insgesamt bleibt festzuhalten, dass die Bildung des gewünschten NTP unter den veränderten Reaktionsbedingungen scheinbar nahezu quantitativ verläuft, da alle weiteren phosphorhaltigen Absorptionen nicht auf Kosten des gewünschten Produktes entstanden sind. Des Weiteren sollten für eine schnelle und effiziente Reaktion mindestens 2.0 Äquivalente des entsprechenden Nucleophils eingesetzt werden, da die Abfangreaktion mit dem während der Umsetzung freiwerdenden Chinonmethids berücksichtigt werden muss.

In weiteren Experimenten wurde sichergestellt, dass das Nucleosidtriphosphat unter den gegebenen Reaktions- und Entschützungsbedingungen ausreichend stabil ist. Hierbei diente N(*n*Bu$_4$)$_4$-Adenosintriphosphat **1a** als Testsubstanz, da es in größeren Mengen in der Arbeitsgruppe zur Verfügung stand. Es stellte sich heraus, dass **1a** bei Raumtemperatur sowohl in denen für die Kupplung verwendeten Lösungsmitteln DMF beziehungsweise Acetonitril als auch unter den basischen Entschüzungsbedingungen (MeOH/H_2O/TEA = 7:3:1) über mehrere Tage stabil war. Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 45 °C leitete allerdings nach wenigen Stunden eine Zersetzung des Triphosphates **1a** ein.
Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse blieb die isolierte Ausbeute der Reaktion von 5-NO_2-*cyclo*Sal-3'*O*-acetyl-dTMP **69** und N(*n*Bu$_4$)$_3$-Pyrophosphat **74** (2.5 Äquivalente) dennoch mit 50% hinter den Erwartungen zurück. Hauptverantwortlich hierfür ist vermutlich ein unzureichender Austausch der tetra-*n*-Butylammoniumionen bei einem einmaligen Durchlauf einer mit Dowex (W50X8, NH_4^+) gefüllten Glassäule gegen Ammonium als Gegenion. Für einen quantitativen Austausch der lipophilen N(*n*Bu$_4$)-Kationen waren mehrere Durchläufe nötig, die jedoch stets mit einer minimalen Zersetzung des Produktes einhergingen. Auf Grund dessen wurde versucht, durch Veränderung der Vorhergehensweise die Effizienz dieses Schrittes zu erhöhen.

Hierzu wurde zunächst wieder N(*n*Bu$_4$)-ATP **1a** als Testsubstanz in Wasser gelöst und mit 20 Äquivalenten Ionenaustauscherharz (Dowex W50X8) in der Ammoniumform versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 30 Minuten zeigte das Dünnschichtchromatogramm (RP-18-DC-Folie, H_2O) einen vollständigen Austausch der Kationen an, woraufhin das Harz abfiltriert und das wässrige Filtrat gefriergetrocknet wurde. Das ^{1}H-NMR-Spektrum bestätigte die Quantität des Ionenaustausches im Fall des Kontrollexperimentes, jedoch waren bei der Übertragung dieser Vorhergehensweise auf die tatsächliche Umsetzung bis zu vier Ansätze für einen vollständigen Austausch der N(*n*Bu$_4$)-Kationen nötig, was wiederum zu Ausbeuteverlusten führte.
Ein anderer, sehr eleganter Ansatz stellt die Verwendung einer ammoniumhaltigen Pufferlösung als Eluent auf Stufe des Reinigungsschrittes dar, da in diesem Fall der Ionenaustausch und die Chromatographie des NTPs direkt miteinander verbunden werden. In diesem Zusammenhang bietet sich ein wässriger Ammoniumformiat-Puffer an, da dieser im Zuge einer anschließenden Gefriertrocknung in Form von Ammoniak und Ameisensäure wieder vollständig entfernbar sein sollte, wenn die Konzentration nicht zu hoch gewählt wird.
Als optimal stellte sich im Testexperiment eine Pufferkonzentration von 0.5 M heraus, da unter diesen Bedingungen sowohl ein quantitativer Ionenaustausch als auch ein vollständiges Entfernen des überschüssigen Puffers nach der zweiten Gefriertrocknung gewährleistet war.
Der Versuch, dieses Prinzip auf die Umsetzung von 5-NO$_2$-*cyclo*Sal-3'*O*-acetyl-dTMP **69** mit N(*n*Bu$_4$)$_3$-Pyrophosphat **74** zu übertragen, scheiterte, da in diesem Fall auch nach der sechsten Gefriertrocknung noch Pufferreste im ^{1}H-NMR-Spektrum erkennbar waren und die Ausbeute lediglich 30% betrug.
Aus diesem Grund wurde wieder dazu übergegangen, den Ionenaustausch über eine mit Dowex (W50X8) gefüllte Glassäule vorzunehmen und diesen Vorgang, wenn nötig, zu wiederholen, bis ein quantitativer Austausch der Kationen erreicht wurde.

Um die Effizienz unserer Methode im Vergleich zu anderen in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Darstellung von NTPs abschätzen zu können, wurde TTP **15** nach dem Protokoll von Ludwig und Eckstein synthetisiert (Abbildung 50).[34]
Hierzu wurde, nach gründlicher Trocknung aller an der Reaktion beteiligten Reagenzien, 3'-*O*-Acetyl-2'-desoxythymidin **64** in einer Mischung aus Pyridin und

Dioxan (1:3) gelöst und mit einem Äquivalent einer 0.1 M Lösung von 2-Chloro-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on **12** in Dioxan versetzt. Die erhaltene Suspension wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und dann mit 1.5 Äquivalenten Tris-(tetra-*n*-butylammonium)-Pyrophosphat **74**, gelöst in DMF, versetzt, wobei der vorhandene Niederschlag wieder in Lösung ging. Nach kurzer Zeit wurde das Reaktionsgemisch durch Zugabe von 1.5 Äquivalenten einer 1%-igen Iod-Lösung oxidiert. Überschüssiges Iod wurde nach erfolgter Oxidation durch Zugabe einer wässrigen Natriumhydrogensulfit-Lösung zerstört. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das erhaltene Rohprodukt zunächst entschützt und anschließend chromatographiert (RP-18, H_2O). Allerdings wurde das gewünschte Triphosphat auf diesem Weg nur in einer enttäuschenden Ausbeute von 20% erhalten. Das Hauptprodukt dieser Umsetzung stellte das H-Phosphonat von 2'-Desoxythymidin **79** dar.

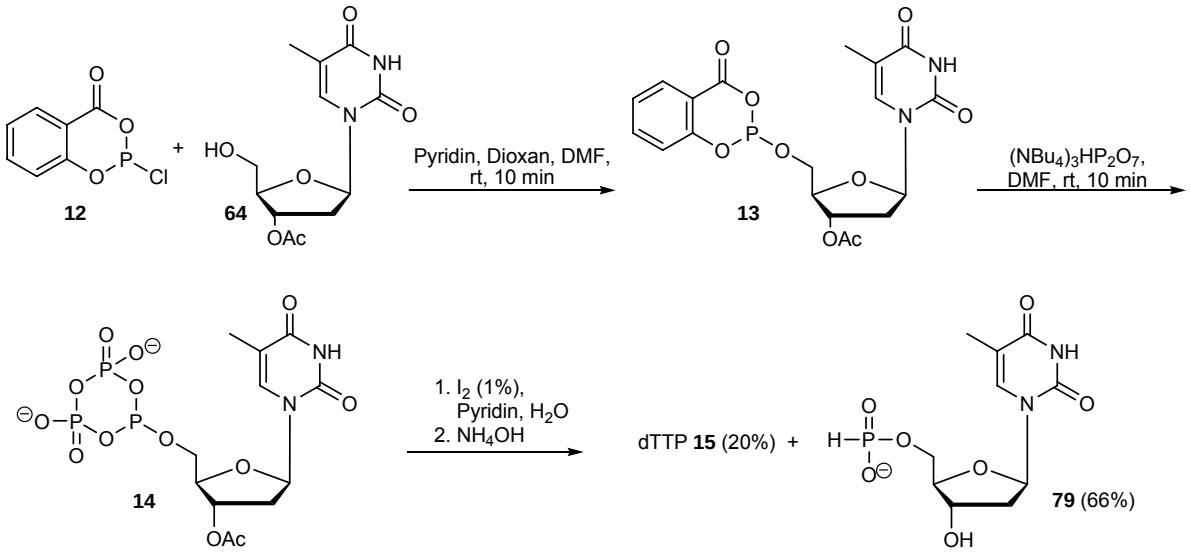


Abbildung 50: Synthese von dTTP **15** nach Ludwig und Eckstein

Vermutlich wirkt sich der bei dieser Methode nötige Oxidationsschritt auf Stufe des cyclischen Phosphittriesters **14** nachteilig auf die Produktbildung aus. Sicherlich stellt ein einmaliger Syntheseversuch kein allgemein repräsentatives Ergebnis dar, trotzdem wurde die in der Literatur für diese Verbindung angegebene Ausbeute von über 70% nicht annähernd erreicht. Zudem spricht die große Menge an erhaltenem H-Phosphonat **79** nicht gerade für die Zuverlässigkeit dieser Methode.

4.4.2 Synthese der N(D)TPs 1, 15, 80-85 ausgehend von 5-NO_2-*cyclo*Sal-NMPs

Aufgrund der veränderten Reaktionsführung und einem dreimaligen Ionenaustausch konnte dTTP **15** durch Reaktion des entsprechenden 5-NO_2-substituierten *cyclo*Sal-Triesters **69** mit N(*n*Bu_4)$_3$-Pyrophosphat **74** nach Entschützung und Umkehrphasenchromatographie mit reinem Wasser in einer sehr guten Ausbeute von 80% synthetisiert werden.

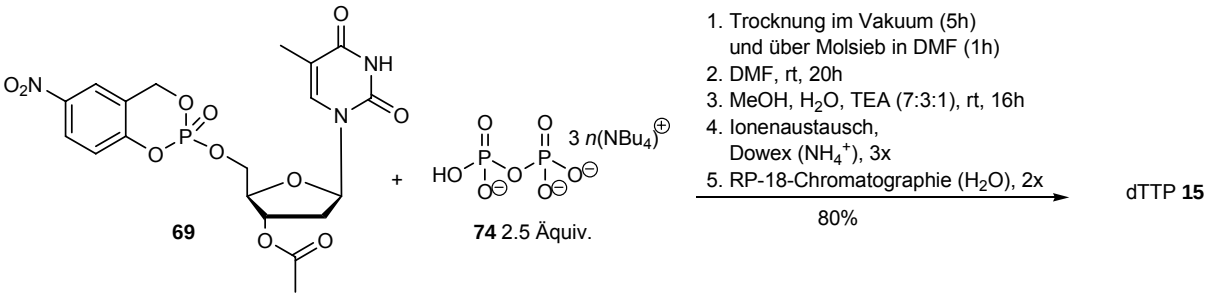


Abbildung 51: Synthese von dTTP **15**

Der Einfachheit halber wurde zur Berechnung der Ausbeute von drei Ammonium-Gegenionen pro NTP ausgegangen. Da das Produkt durch Gefriertrocknung erhalten wurde, muss jedoch von einem teilweisen Ausgasen von Ammoniak unter Protonierung der Phosphatgruppe ausgegangen werden, so dass die Anzahl der Gegenionen schwankt. Dies sollte allerdings rechnerisch keinen großen Einfluss auf die Ausbeuten haben.

Um die generelle Anwendbarkeit dieser Methode zu belegen, wurden auf demselben Weg die Nucleosidtriphosphate **1**, **80**-**83** sowie die NDPs **84**, **85** synthetisiert. Die erzielten Ausbeuten liegen zwischen 40% für beispielsweise CTP **81** und 83% für dTDP **84**.

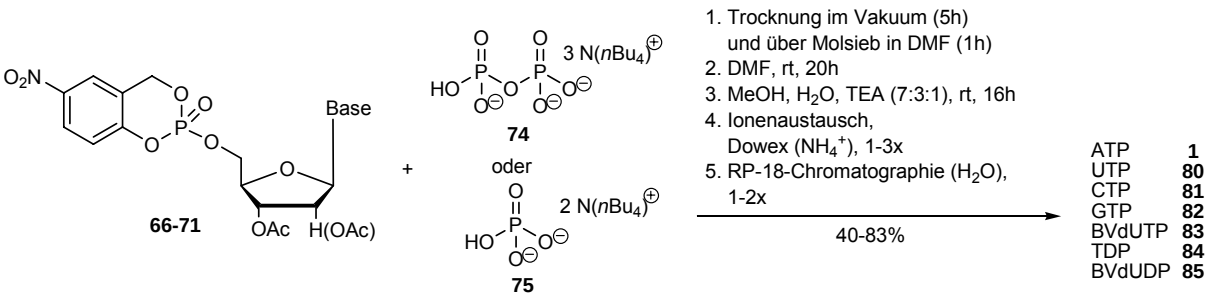


Abbildung 52: Synthese der NTPs **1**, **80**-**83** und der NDPs **84**, **85**

Die sehr guten Ausbeuten für TDP **84** beziehungsweise TTP **15** können zum einen durch die allgemein unkomplizierte synthetische Handhabbarkeit von 2'-Desoxythymidinderivaten erklärt werden, weshalb 5-NO_2-*cyclo*Sal-3'OAc-dTMP **69** in dieser Arbeit stets für erste Testreaktionen eingesetzt wurde. Zum anderen lassen sie sich leicht mittels Färbereagenzien visualisieren, wodurch selbst Kleinstmengen der gewünschten Produkte **15** und **84** noch detektierbar waren.
Die Ausbeuteverluste im Fall von CTP **81** und GTP **82** können durch ein Trennproblem während der Chromatographie erklärt werden. In beiden Fällen konnten die entschützten Triphosphate nur schwer von dem benzylierten Pyrophosphat **77** getrennt werden. Erst nach wiederholter Chromatographie konnten reine Fraktionen der NTPs erhalten werden, ein Großteil der Produkte **81** und **82** verblieb allerdings in Mischfraktionen mit dem benzylierten Pyrophosphat **77**.

Zu einem späteren Zeitpunkt konnte in weiteren NMR-Experimenten nachgewiesen werden, dass dieses zusätzliche Produkt **77** bei einer Temperatur von 45 °C in Wasser langsam hydrolysiert. Das gewünschte NTP ist unter diesen Bedingungen hingegen stabil und konnte im Folgenden problemlos von den Hydrolyseprodukten (Pyrophosphat und Salicylalkohol) durch eine erneute Reinigung an RP-Kieselgel getrennt werden. Abbildung 53 zeigt den Verlauf der Hydrolyse des benzylierten Pyrophosphats **77** zum entsprechenden Salicylalkohol **44** mittels ^{1}H-NMR-Spektroskopie.

Die unerwünschte Verbindung **77** kann im ^{1}H-NMR-Spektrum eindeutig durch das Duplett der benzylischen Protonen bei 4.9 ppm (rot markiert) identifiziert werden, welches durch die Kopplung mit dem Phosphoratom hervorgerufen wird (Abb. 53, t = 0h). Mit fortschreitender Hydrolyse nimmt dieses Signal zugunsten eines Singuletts bei 4.5 ppm (blau markiert) ab, das den benzylischen Protonen im resultierenden Salicylalkohol zugeordnet werden kann. Außerdem ist eine Verdopplung des aromatischen Signalsatzes zu beobachten (Abb 53, t = 3h, t = 6h). Nach drei Tagen bei 45 °C ist die Hydrolyse von **77** zum Salicylalkohol **44** und Pyrophosphat abgeschlossen (Abb. 53, t = 3d).

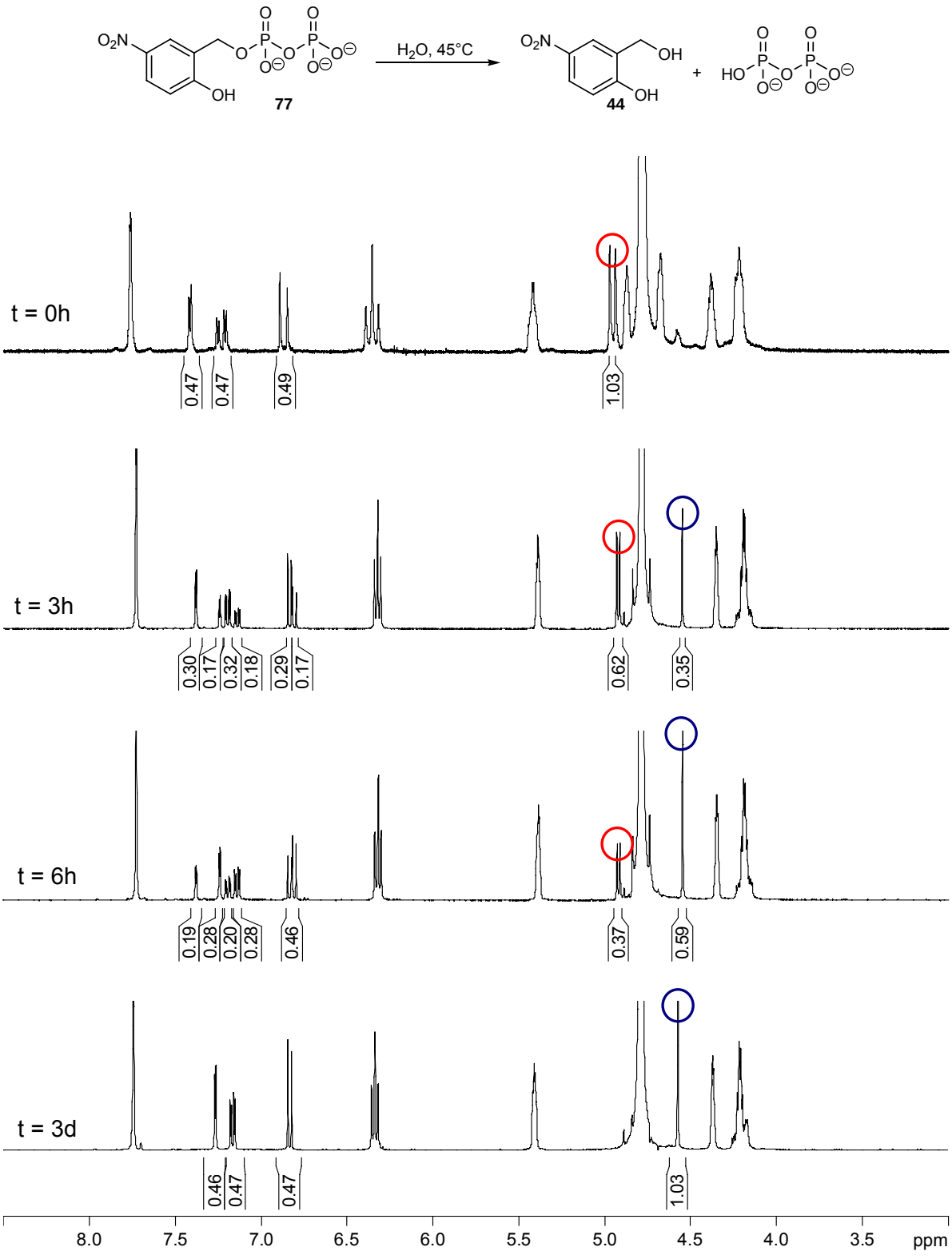


Abbildung 53: ^{1}H-NMR-spektroskopische Verfolgung (D_2O, 200/400 MHz) der Hydrolyse des benzylierten Pyrophosphats **77**

Generell sollte **77** jedoch bereits im Zuge der basischen Spaltung der Acetester hydrolysiert werden, zumal die geschilderten Probleme bei der Chromatographie der anderen Ansätze nicht aufgetreten sind.
Alles in allem konnte jedoch insbesondere durch die erfolgreiche Synthese von (*E*)-5-(2-Bromvinyl)-2'-desoxyuridin-di- **85** und -triphosphat **83**, die für Metabolismusstudien in der Arbeitsgruppe von *P. Wutzler* benötigt wurden, die generelle Anwendbarkeit der Methode belegt werden. Die erzielten Ausbeuten sind unter Berücksichtigung der erschwerten Reaktionsbedingungen, d.h die Umsetzung von hochgeladenen polaren Reagenzien, wie beispielsweise Pyrophosphat, mit lipophilen geschützten Nucleosiden und der anspruchsvollen Isolierung eines geladenen wasserlöslichen Produktes aus einer Mischung von hydrophilen und hydrophoben Bestandteilen insgesamt als sehr erfreulich einzuschätzen.
Zudem konnte mit dieser Methode ein weiteres NTP-Analogon **86** (β-γ-Methylen-ATP) erfolgreich synthetisiert werden, dessen Darstellung allerdings erst im Folgenden Kapitel genauer besprochen werden soll, da **86** zur Darstellung des entsprechenden methylenverbrückten Diadenosintetraphosphats **87** benötigt wurde.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass sich eine sorgfältige Trocknung der Ausgangsverbindungen vor der Reaktion als ausgesprochen wichtig für die anschließende Produktbildung herausstellte. Weiterhin wirkte sich die langsame Zugabe des *cyclo*Sal-Nucleotides zu einem Überschuss des jeweiligen Phosphatsalzes (2.0 Äquivalente) positiv auf die Ausbeute der gewünschten N(D)TPs aus. Außerdem war in den meisten Fällen für einen quantitativen Austausch der lipophilen N(*n*Bu_4)-Kationen gegen die kleineren Ammoniumionen eine wiederholte Ionenaustauschchromatographie über Dowex nötig.
Nachfolgend sollen die in diesem Abschnitt gewonnen Erkenntnisse erstmals auf die Synthese von Dinucleosid-5',5'-oligophosphaten übertragen werden (Kap. 4.5).

4.4.3 Analytik und Charakterisierung der dargestellten NT(D)Ps

Neben der Synthese ist vor allem eine sorgfältige Analytik und Charakterisierung der dargestellten Verbindungen nötig. ^{1}H-NMR-spektroskopische Untersuchungen reichen für gewöhnlich nicht aus, um die polaren Produkte vollständig zu charakterisieren, da unter anderem durch Linienverbreiterungen in D_2O nicht alle Signale restlos ausgewertet werden können.

Um nachzuweisen, dass es sich bei den synthetisierten Verbindungen **1**, **15**, **80**-**85** tatsächlich um Di- beziehungsweise Triphosphate handelt, bietet sich die Massenspektrometrie an. Diese hochpolaren Verbindungen benötigen jedoch sehr schonende Ionisierungsmethoden, so dass nur die Matrix-unterstützte Laserdesorptionsionisation (MALDI) oder die Elektronenspray-Ionisation (ESI) im Negativionenmodus in Frage kommen. Da letztere ohne weitere Probenpräparation durchgeführt werden kann, wurde diese Methode gewählt. Sie lieferte durchweg gut auswertbare Spektren, die neben den charakteristischen einfach geladenen Molekülpeaks keine oder nur solche Signale zeigten, die dem Verlust der terminalen Phosphatgruppe im Massenspektrometer entsprachen.

Ein Hauptproblem bei der Reinigung der N(D)TPs stellte die vollständige Abtrennung der Phosphatsalze dar, da diese dünnschichtchromatographisch nicht gut nachweisbar sind. Hierzu bietet sich hingegen die ^{31}P-NMR-Spektroskopie an. Im Protonenbreitband-entkoppelten ^{31}P-NMR-Spektrum zeigen Nucleosidtriphosphate ein charakteristisches Signalmuster, bestehend aus drei Signalen (Abbildung 54). Die Atome P_α und P_γ erzeugen dabei durch $^2J_{PP}$-Kopplungen Dubletts im Bereich von -10 und -11 ppm, das P_β-Atom liefert in D_2O ein Pseudotriplett bei etwa -21 ppm. In CD_3CN ist die korrekte Struktur dieses Signals als doppeltes Dublett hingegen gut aufgelöst (vgl. Abbildung 48, S. 51).

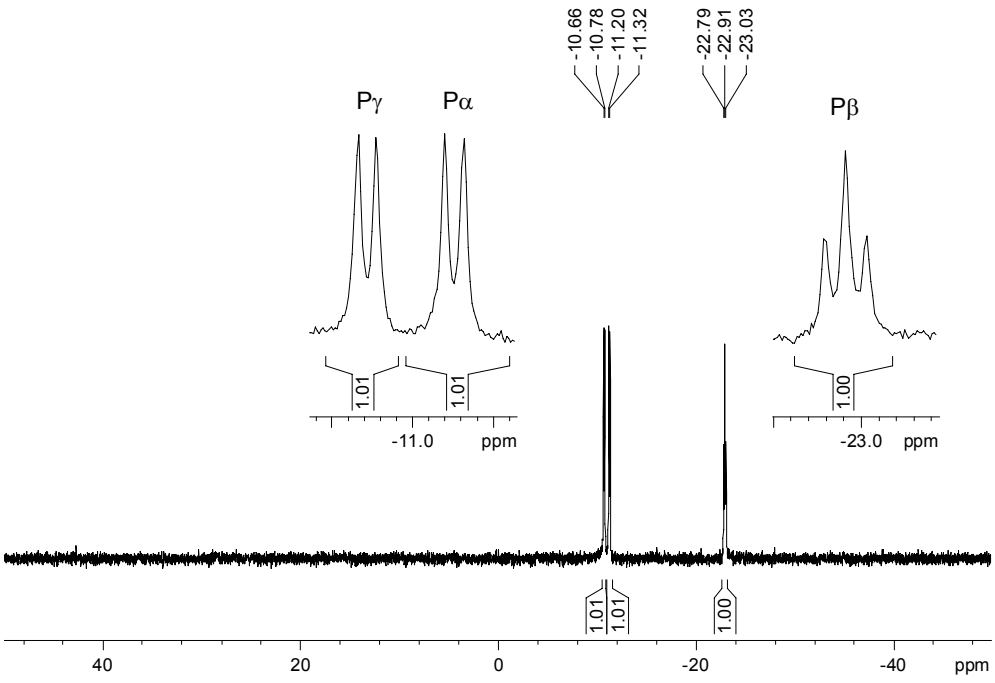


Abbildung 54: ^{31}P-NMR-Spektrum (D_2O, 162 MHz) von CTP **81**

Die beiden Dubletts konnten durch Anfertigung eines protonengekoppelten Spektrums genau zugeordnet werden, da für P_α die zusätzlichen $^3J_{PH}$-Kopplungen mit den 5'-Protonen sichtbar werden. Da die Triphosphatgruppe durch Rotation um die P-O Bindungen sehr flexibel ist, können die Signale manchmal nur eingeschränkt aufgelöst werden. Dabei liefert P_α fast immer das zu erwartende Dublett, für die anderen P-Atome sind dann nur breite Singuletts messbar.

Der Nachweis der Abwesenheit organischer Verunreinigungen erfolgte über ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektroskopie. Die Abbildungen 55 und 56 zeigen beispielhaft die aufgenommenen ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektren von CTP **81**. Die charakteristischen Protonenabsorptionen liegen in D_2O oft als Multipletts vor (Abbildung 55).

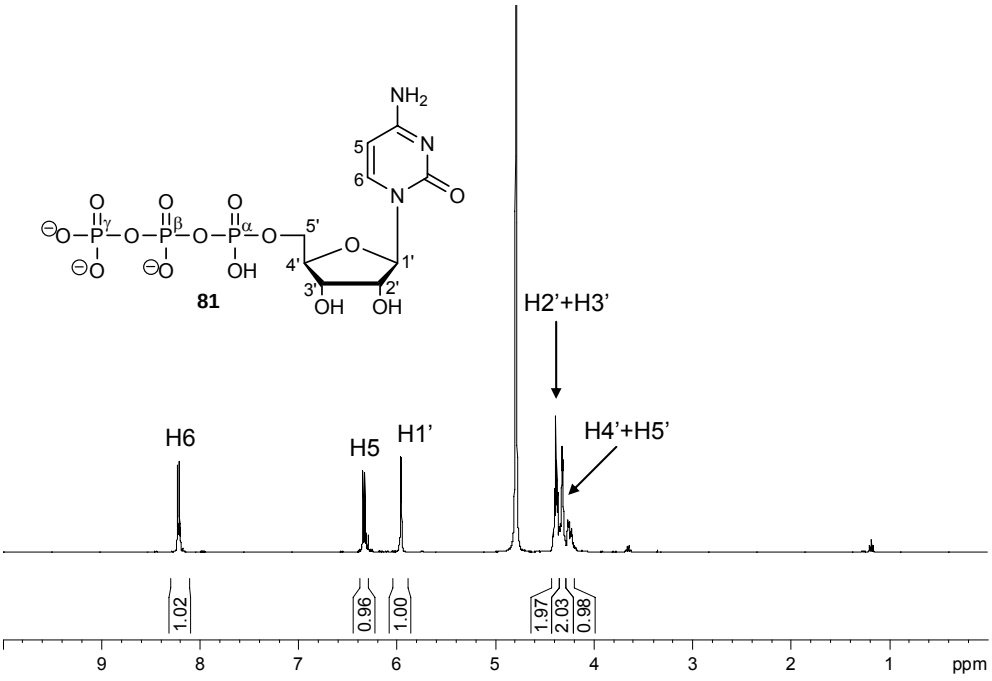


Abbildung 55: ^{1}H-NMR-Spektrum (D_2O, 400 MHz) von CTP **81**

Zur genauen Analyse könnte die Signalschärfe durch Gaußmultiplikation des FIDs gesteigert und damit die Linienbreite gesenkt werden.

Das ^{13}C-NMR-Spektrum der Verbindung zeigt die typischen Dubletts für die 4' und 5' Kohlenstoff-Atome des Zuckers, die aus der Kopplung zum Phosphor resultieren (Abbildung 56).

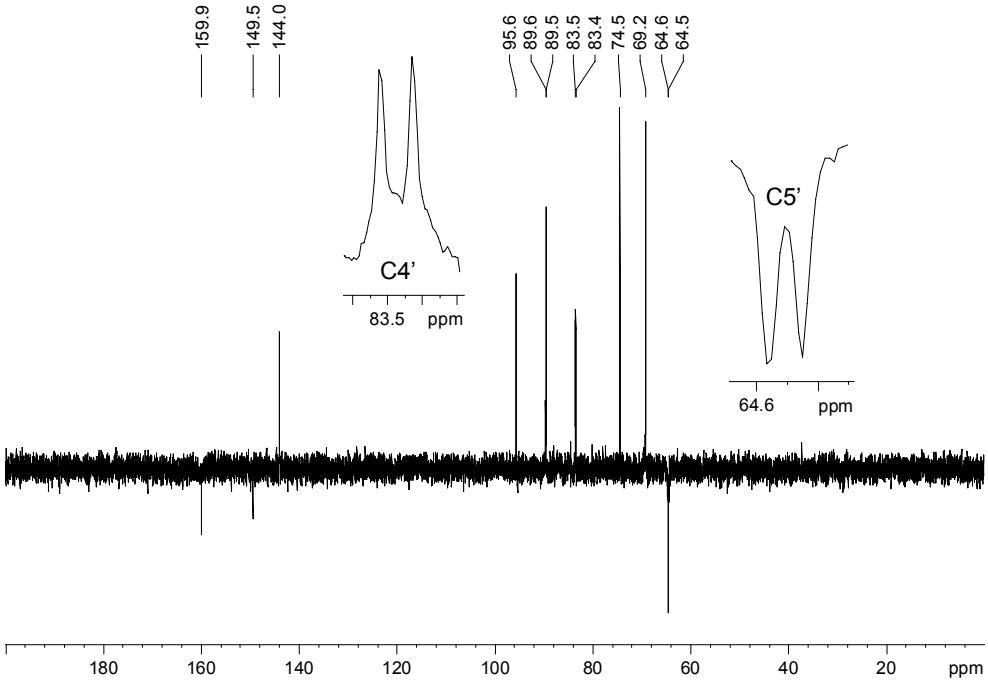


Abbildung 56: ^{13}C-NMR-Spektrum (D_2O, 101 MHz) von CTP **81**

4.5 Darstellung von Dinucleosidoligophosphaten

4.5.1 Synthese der Dinucleosiddiphosphate 88, 89

Der Einfachheit halber wurden erste Ansätze dieser Art mit dem 5-Nitro-substituierten *cyclo*Sal-NMP von 3'-*O*-Acetylthymidin **69** durchgeführt, als Nucleophil diente Uridinmonophosphat **90**, da dies in größeren Mengen in Form des Natriumsalzes in der Arbeitsgruppe vorhanden war.

Zur Erhöhung der Löslichkeit von kommerziell verfügbarem Dinatrium-UMP in organischen Lösungsmitteln, sowie zur Steigerung der Nucleophilie wurde das Natriumsalz durch Ionenaustauschchromatographie (Dowex W50X8, H^+) zunächst in die freie Säure überführt, um dann durch Neutralisation mit NBu_4OH das gewünschte tetra-*n*-Butylammonium-UMP **90a** zu generieren. Die Anzahl der Gegenionen konnte hier im Gegensatz zu N(*n*Bu_4)-Phosphat bzw. Pyrophosphat aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum genau bestimmt werden. Durchschnittlich waren bei einem neutralen pH-Wert zwei tetra-*n*-Butylammonium-Gegenionen pro UMP vorhanden.

Die Umsetzung von N(nBu$_4$)$_2$-UMP **90a** mit 5-NO$_2$-*cyclo*Sal-3'-*O*-acetyl-dTMP **69** richtete sich im Wesentlichen nach den Erfahrungen, die bei den Synthesen der N(D)TPs in Abschnitt 4.4.1 gemacht wurden.

So wurde das hygroskopische tetra-*n*-Butylammonium-UMP **90a** (2.0 Äquivalente) zunächst mehrere Stunden im Vakuum und im Anschluss nochmals über Molsieb in wasserfreiem DMF getrocknet. Die Zugabe des *cyclo*Sal-Nucleotides **69** (1.0 Äquivalente) erfolgte tropfenweise als Lösung in DMF bei Raumtemperatur, wobei ebenfalls eine sofortige Gelbfärbung der Reaktionslösung auftrat, was auch in diesem Fall für eine schnelle Initialreaktion des Triesters mit dem Nucleophil spricht. Dennoch wurde das Reaktionsgemisch weiter über Nacht gerührt und erst danach dünnschichtchromatographisch (DCM/MeOH 9:1) die vollständige Umsetzung des Triesters **69** festgestellt. Die Aufarbeitung erfolgte nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wie zuvor beschrieben durch Extraktion mit Ethylacetat und Wasser, basischer Abspaltung der Acetylschutzgruppe sowie Ionenaustausch an Dowex (NH_4^+). Nach chromatographischer Reinigung (RP-18, H_2O) wurde das gewünschte Produkt **88a** erstmals auf diesem Weg erhalten.

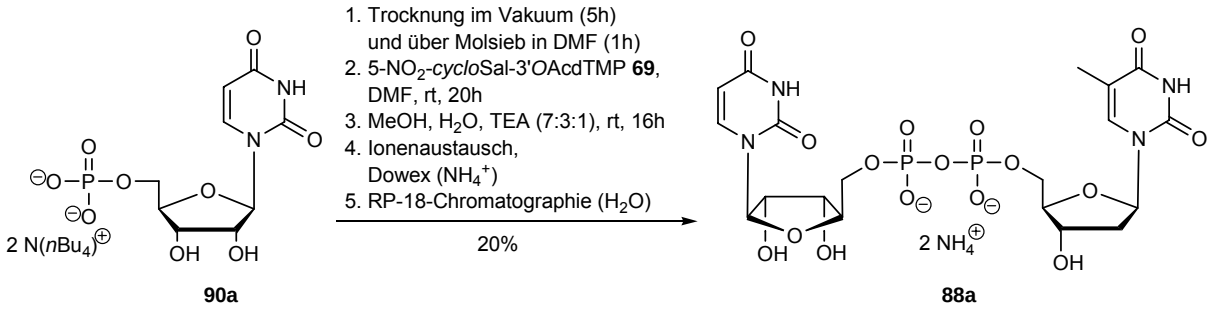


Abbildung 57: Möglicher Ansatz zur Synthese von $(NH_4)_2Up_2T$ **88a**

Die Ausbeute ist mit 20% sicherlich steigerbar, zumal bei diesem ersten Versuch lediglich ein Ionenaustausch durchgeführt wurde. Die damit einhergehenden Ausbeuteverluste wurden im vorherigen Abschnitt ausführlich diskutiert. Ferner muss in weiteren Experimenten sichergestellt werden, dass durch den Einsatz eines ungeschützten Nucleotids keine Nebenreaktionen aufgrund der freien Hydroxygruppen erfolgen.

In Analogie zu den Pyranosyl-1-monophosphaten verläuft die gleiche Umsetzung mit dem entsprechenden 5-Chlor-substituierten *cyclo*Sal-Nucleotid **72** und UMP auch nach mehrwöchiger Reaktionszeit nicht vollständig ab, so dass der Einsatz von

Nitro-substituierten *cyclo*Sal-Verbindungen für eine schnelle und effiziente Reaktion hier unabdingbar ist.

Da im Fall der eben erwähnten Pyranosyl-1-monophosphate gute Erfahrungen mit Triethylammonium als Gegenionen sowohl in Bezug auf die eigentliche Reaktion als auch auf die nachfolgende Reinigung gemacht wurden, sollte die Verwendung von $HNEt_3$-UMP **90b** als Nucleophil in der vorliegenden Umsetzung untersucht werden. Triethylammoniumionen wirken sich positiv auf das Elutionsverhalten der jeweiligen polaren Verbindungen aus, so dass ein zusätzlicher Ionenaustausch in diesem Fall entfallen würde.

Wieder wurde Na_2UMP **90** hierfür zunächst in Wasser gelöst und mittels Dowex (W50X8, H^+) in die freie Säure überführt. Die Neutralisation erfolgte mit Triethylamin in Gegenwart von wenigen Millilitern THF, um eine homogene Phasenreaktion zu gewährleisten. Die anschließende Gefriertrocknung lieferte das gewünschte Nucleophil **90b** mit durchschnittlich 1.3 Gegenionen pro UMP.

Die Umsetzung von **90b** mit 5-NO_2-*cyclo*Sal-3'-*O*-acetyl-dTMP **69** erfolgte wieder in DMF bei Raumtemperatur über Nacht. Die Befürchtung, das ungeschützte Nucleotid **90b** würde sich aufgrund der vergleichsweise weniger lipophilen $HNEt_3$-Kationen schlechter oder gar nicht mehr in DMF lösen, bestätigte sich nicht. Auch in diesem Fall war die Umsetzung des Triesters **69** laut Dünnschichtchromatogramm (DCM/MeOH 9:1) am nächsten Tag quantitativ. Die Aufarbeitung beschränkte sich, aufgrund des in diesem Fall unnötigen Ionenaustausches, auf die Extraktion des Rohproduktes und dessen Entschützung.

Die anschließende Reinigung (RP-18-Chromatographie, H_2O) verlief problemlos. Es wurde nahezu keine Mischfraktionen erhalten, so dass das reine Produkt **88b** auf diesem Weg nach einmaliger Chromatographie in einer Ausbeute von 60% isoliert werden konnte.

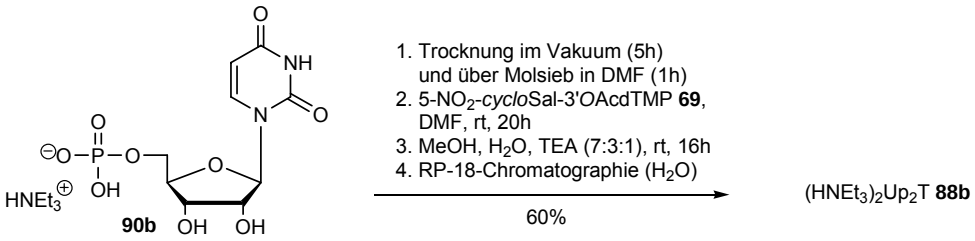
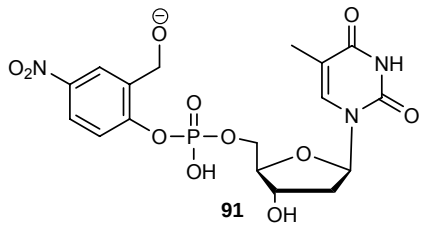


Abbildung 58: Synthese von bis-Triethylammonium Up_2T **88b**

Die nitrohaltigen Bestandteile des Rohgemisches eluierten in diesem Fall erst nach Zugabe von größeren Mengen Methanol zum Laufmittel, was die Chromatographie zusätzlich erleichterte. Bei der entsprechenden Reinigung der N(D)TPs (Kapitel 4.4.2) mit den kleineren Ammoniumgegenionen beispielsweise eluieren die stark gefärbten nitrohaltigen Verbindungen oftmals direkt nach dem eigentlichen Produkt, was in den meisten Fällen eine zweite und dritte Trennung erforderte.
Aus diesem Grund war dieses Ergebnis fürs Erste sehr erfreulich, da das gewünschte Dinucleosiddiphosphat **88b** so in kurzer Zeit und mit wenig Aufwand in reiner Form und in einer größeren Menge erhalten wurde. Versuche, die Ausbeute zu erhöhen waren nicht erfolgreich, seltsamerweise wurden jedes Mal durchschnittlich 60% des gewünschte Produktes **88b** und etwa 30% eines nucleosidischen, gelblich gefärbten Nebenproduktes erhalten, das im Protonenbreitband-entkoppelten ^{31}P-NMR-Spektrum eine Verschiebung von etwa –6 ppm besitzt und im ^{1}H-NMR-Spektrum eindeutig Protonen im aromatischen Bereich aufweist. In Übereinstimmung mit dem Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchung (ESI-neg) wurde das unerwünschte Nebenprodukt **91** als der sogenannte „falsche Phosphatdiester“ identifiziert (Abbildung 59).

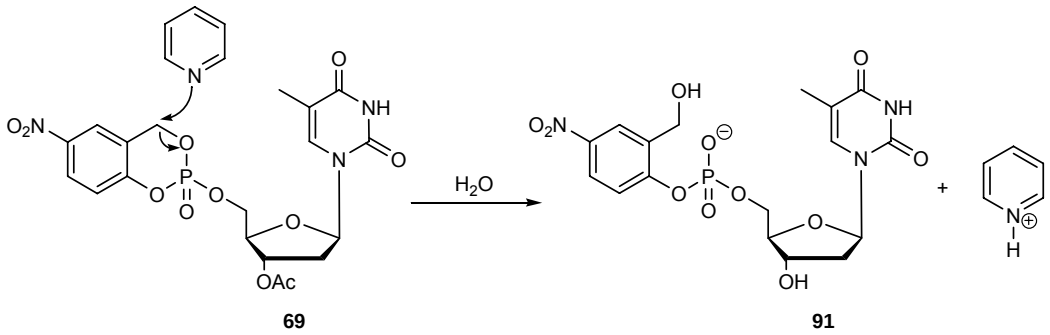


91

Abbildung 59: 5-NO_2-*cyclo*Sal-3'-*O*AcdT-phenylphosphatdiester **91** als postuliertes Nebenprodukt

Formal resultiert die Bildung von **91** aus einem Bruch der benzylischen Phosphatesterbindung. Dies wurde in Kapitel 2.2 im Zusammenhang des Pronucleotid-Konzepts bereits beschrieben, jedoch auch eingeräumt, dass diese Spaltung des *cyclo*Sal-Triesters sehr unwahrscheinlich ist, da die Phosphatestergruppe als äußerst schwacher Donor-Substituent in *ortho*-Position zum Benzylester dessen Hydrolyse stark verlangsamt.
Da in diesem Fall der Phenylphosphatdiester **91** jedoch unter wasserfreien Bedingungen entstanden ist, muss dessen Bildung ein anderer Mechanismus zugrunde liegen.

In Gegenwart von Pyridin oder Triethylamin im Reaktionsansatz wurde die Bildung des unerwünschten Nebenproduktes ebenfalls beobachtet.[94,118] In diesem Fall konnte dessen Entstehung durch einen nucleophilen Angriff des freien Elektronenpaares der stickstoffhaltigen Base auf die C7-Position der Benzyl-Phosphatesterbindung des Triesters erklärt werden, wodurch es nach Spaltung der benzylischen Phosphatesterbindung zunächst zur Bildung eines alkylierten Phenylphosphatdiesters kommt, der im Zuge der wässrigen Aufarbeitung den hydrolysestabilen Phenylphosphatdiester **91** liefert.



69 **91**

Abbildung 60: Entstehung des hydrolysestabilen Phenylphosphatdiesters **91** in Gegenwart von Pyridin

Da in diesem Fall jedoch kein anderes Nucleophil als UMP im Reaktionsgemisch zugegen war, kommt auch dieser Erklärungsansatz zur Entstehung von **91** nicht in Betracht.

Eine weitere Überlegung zur Entstehung des Phenylphosphatdiesters **91** ist in Abbildung 61 formuliert.

Prinzipiell könnte auch das freigesetzte Chinonmethid **76** den *cyclo*Sal-Triester nucleophil öffnen, wobei nach wässriger Aufarbeitung des Reaktionsgemisches ebenfalls der „falsche Diester“ **91** generiert werden würde.

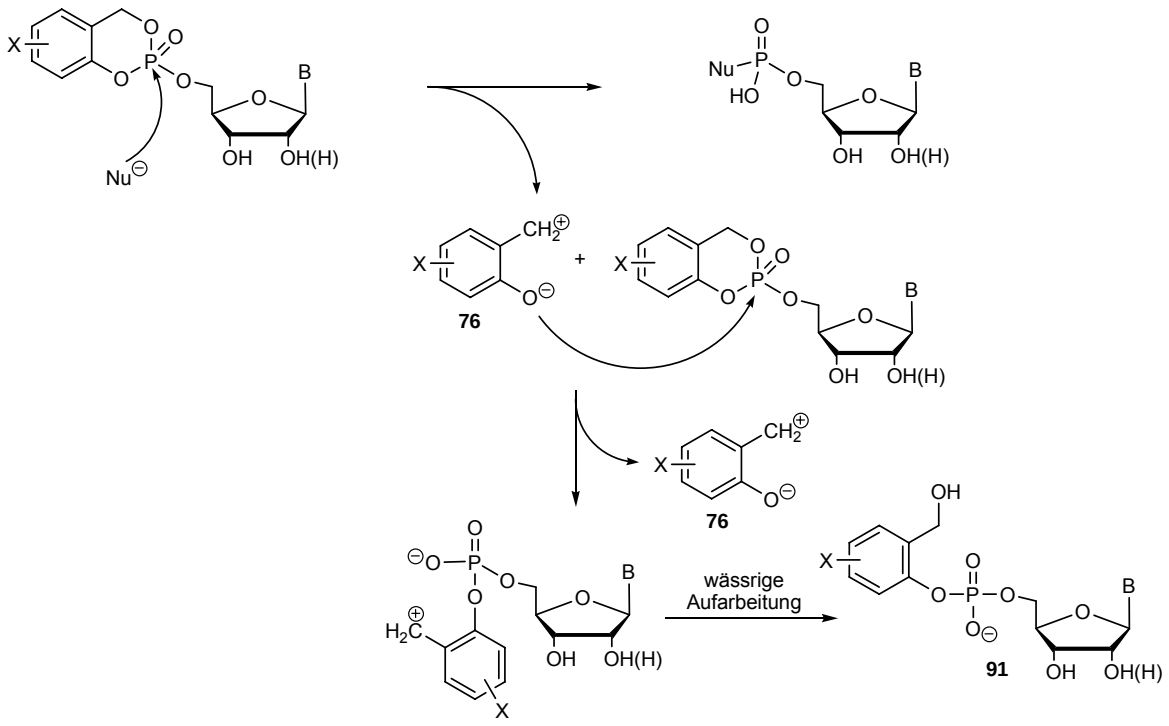


Abbildung 61: Postulierte Bildung des Phenylphosphatdiesters **91** durch Reaktion des *cyclo*Sal-Triesters mit dem reaktiven Chinonmethid **76**

Diese Hypothese sollte in einem Kontrollexperiment überprüft werden. Hierfür wurden 0.5 Äquivalente Triethylammonium-UMP **90b** mit einem Äquivalent 5-NO_2-*cyclo*Sal-3'-*O*-acetyl-dTMP **69** in absolutem DMF über Nacht umgesetzt und anschließend ^{31}P-NMR-spektroskopisch untersucht. Das erhaltene Spektrum wies seltsamerweise gar kein Signal bei -6 ppm auf. Es waren lediglich die Absorptionen der Diastereomere des überschüssigen Triesters **69** bei -11 ppm, restliches UMP **90b** bei +2 ppm sowie das Produkt bei –9 ppm zu erkennen. Somit kann ein nucleophiler Angriff des Chinonmethids **76** auf den Triester ausgeschlossen, allerdings die Entstehung des ungewünschten Nebenproduktes dadurch nicht abschließend aufgeklärt werden.

Neben der Synthese von Up_2T **88** sollte außerdem die Darstellung eines symmetrischen Dinucleosiddiphosphates erfolgen. Hierzu wurde 5-NO_2-*cyclo*Sal-2',3'-*O*-acetyl-UMP **67** mit 2.0 Äquivalenten $HNEt_3$-UMP **90b** wie zuvor beschrieben über Nacht umgesetzt und entsprechend aufgearbeitet.

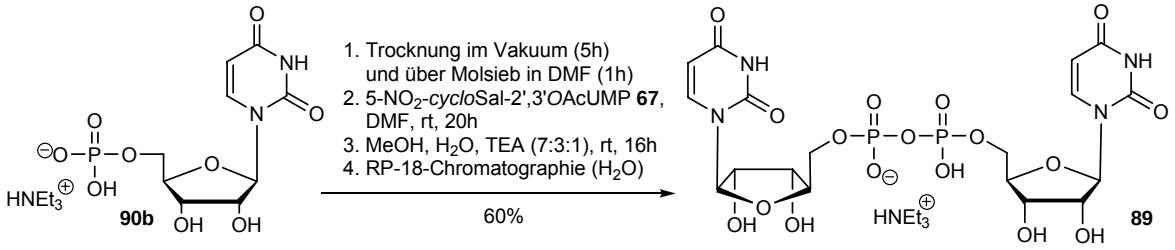


Abbildung 62: Synthese des symmetrischen Dinucleosiddiphosphates Up_2U **89**

Auch in diesem Fall wurde der beschriebene Phenylphosphatdiester als Nebenprodukt gefunden, dennoch konnte das gewünschte symmetrische Diuridindiphosphat **89** in einer guten Ausbeute von 60% nach einmaliger Umkehrphasenchromatographie isoliert werden.

Insgesamt war die Verwendung von NMP-Triethylammonium-Salzen zur Synthese der Dinucleosid-5',5'-diphosphate vorteilhaft, da sich die $HNEt_3$-Kationen positiv auf das Elutionsverhalten der erhaltenen Produkte auswirkten und so ein zusätzlicher Ionenaustausch entfiel. Die erzielten Ausbeuten waren mit durchschnittlich 60% zufriedenstellend. Die Ausbeuteverluste entstanden durch die Bildung eines Nebenproduktes, dessen Ursprung jedoch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte.
Im Folgenden sollte diese Methode auf die Synthese des biologisch relevanten Dinucleosiddiphosphates, Nicotinamidadenosindinucleotid **92**, übertragen werden.

4.5.2 Versuch der Synthese von NAD 92

Die Darstellung von NAD **92** kann theoretisch durch Reaktion des Nitro-substituierten *cyclo*Sal-Nucleotids von N^6,2',3'-Triacetyladenosin **66** mit Nicotinamid-β-ribonucleotid **93** (Weg a, Abb. 63) oder durch Umsetzung von AMP **94** mit der entsprechenden *cyclo*Sal-Verbindung **95** erfolgen (Weg b, Abb. 63).

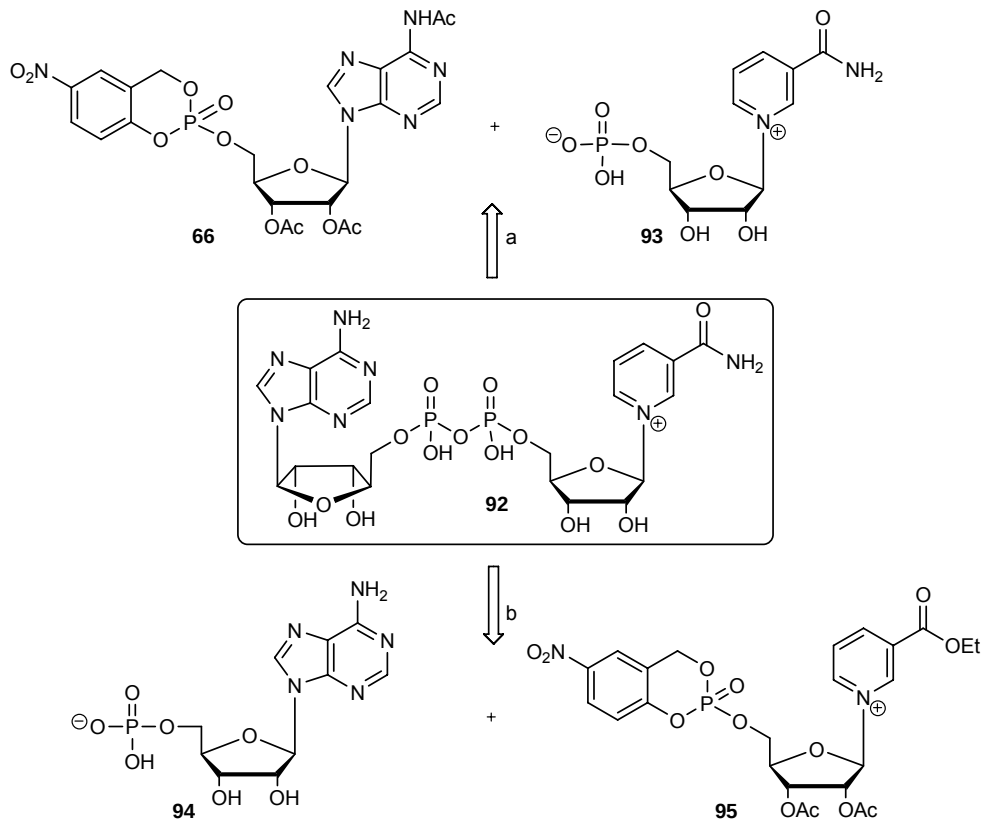


Abbildung 63: Retrosynthetische Analyse von NAD **92**

Da die Synthese von 5-NO_2-*cyclo*Sal-N^6-acetyl-2',3'-*O*-AcAMP **66** durch die Darstellung von ATP **1** bereits erfolgt war, wurde zunächst versucht, NAD **92** durch Reaktion des *cyclo*Sal-Triesters **66** und Nicotinamid-β-ribonucleotid (β-NMN) **93** darzustellen. Das Monophosphat des β-Nicotinamidribonucleosids (NAR) ist zwar kommerziell erhältlich, allerdings aufgrund des anspruchsvollen chemischen und enzymatischen Zugangs sehr teuer. Zudem weist das ungeschützte Nucleotid **93** eine äußerst hohe Polarität aufgrund der zusätzlichen positiven Ladung im Heterocyclus auf, weshalb die Löslichkeit von **93** in DMF fraglich ist. Folglich lag es nahe, das Nuclesidmonophosphat **93** eigenständig und mit entsprechenden Schutzgruppen versehen aus dem entsprechenden Nucleosid **96** zu synthetisieren.

In der Literatur finden sich diesbezüglich vier verschiedene Ansätze (Abbildung 64):

- (a) durch enzymatischen Abbau von NAD **92**[136]
- (b) durch Kondensation von 1-Aminozuckern **97** mit N^1-(2,4,-Dinitrophenyl)-3-aminocarbonylpyridinium Halogeniden **98**[137,138]
- (c) durch Kondensation peracetylierter Glycosylhalogenide **99** mit Nicotinamid **100**[139,140]

- (d) durch TMS-Triflat vermittelte Kupplung von Ribosetetraacetat **101** und Nicotinamid **100**[141,142]

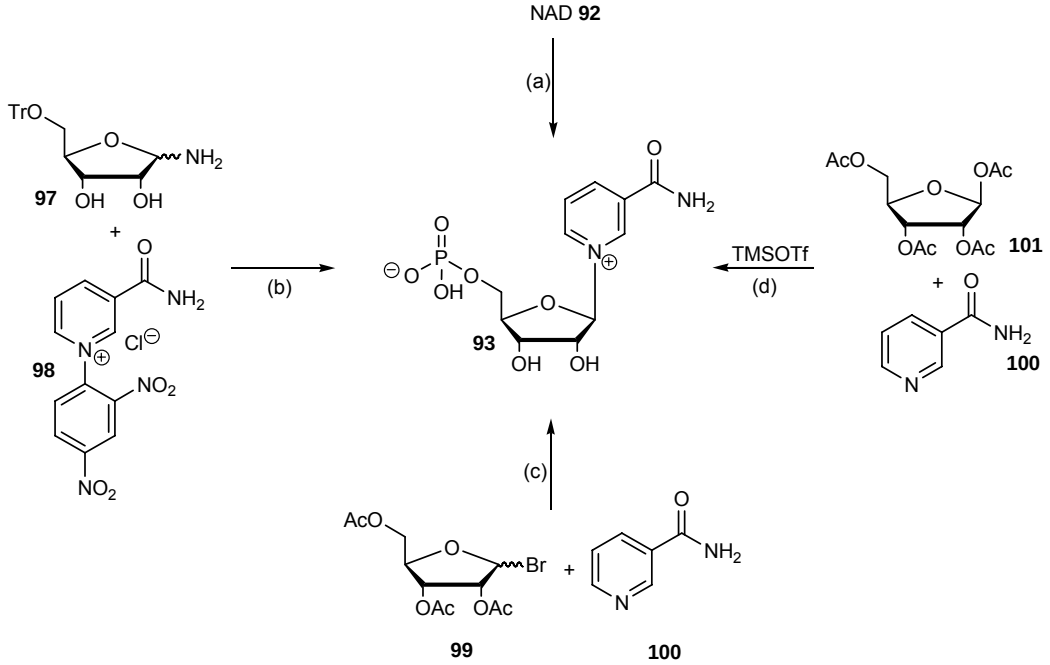


Abbildung 64: Verschiedene Ansätze zur Darstellung von β-NMN **93** beziehungsweise NAR **96**

Obgleich NAD **92** wesentlich günstiger und besser verfügbar ist als das gewünschte β-NMN **93**, bleibt fraglich, ob dasselbe für die benötigten Enzyme gilt. Außerdem besteht bei einer enzymatischen Methode stets der Nachteil, dass diese nicht für die Synthese von Derivaten oder Analoga herangezogen werden kann.

Die früheren Ansätze zur chemischen Synthese von NAR **96** beziehungsweise β-NMN **93** zeichneten sich aufgrund der geringen Stabilität der eingesetzten Aminozucker **97** und/oder Glycosylhalogenide **99** durch eine niedrige Effizienz aus.

Einzig die neueren Arbeiten zur Trimethylsilyltriflat-vermittelten *N*-Glycosylierung von Ribosetetraacetat **101** mit Nicotinamid **100** ergeben das gewünschte β-Nucleosid **96** in zufriedenstellenden Ausbeuten von circa 60%. Dieses Ergebnis konnte von *A. Sauve et al.* durch Verwendung des Nicotinsäureethylesters **102** noch verbessert werden.[143]

In einer Eintopfreaktion erfolgt hierbei zunächst die Synthese von vollständig geschütztem 2',3',5'-Tri-*O*-Acetyl-β-nicotinsäureethylesterribonucleosid **103** durch Umsetzung von einem Äquivalent der Tetraacetylribose **101** mit 1.5 Äquivalenten Nicotinsäureethylesters **102** in Gegenwart von einem Äquivalent TMS-Triflat in

Dichlormethan. Nach vollständiger Reaktion und nach Entfernen des Lösungsmittels wird das Rohgemisch in Methanol aufgenommen und mit Hexan extrahiert, wodurch das Kupplungsprodukt **103** in sehr reiner Form, allerdings als Gemisch mit 0.5 Äquivalenten des Heterocyclus **102**, erhalten wird. Die Behandlung dieses Gemisches mit 4N ammoniakalischem Methanol und abschließender Umkehrphasenchromatographie (RP-18, H_2O) liefert das vollständig entschützte β-Nicotinamidribonucleosid **96** in einer Ausbeute von 85% (Abbildung 65). Die β-Selektivität der Reaktion resultiert vermutlich aus der intermediären Bildung eines *cis*-1,2-Acyloxonium-Glycosids in Gegenwart von TMS-Triflat, welches nur noch von der Oberseite nucleophil angegriffen werden kann.[144]

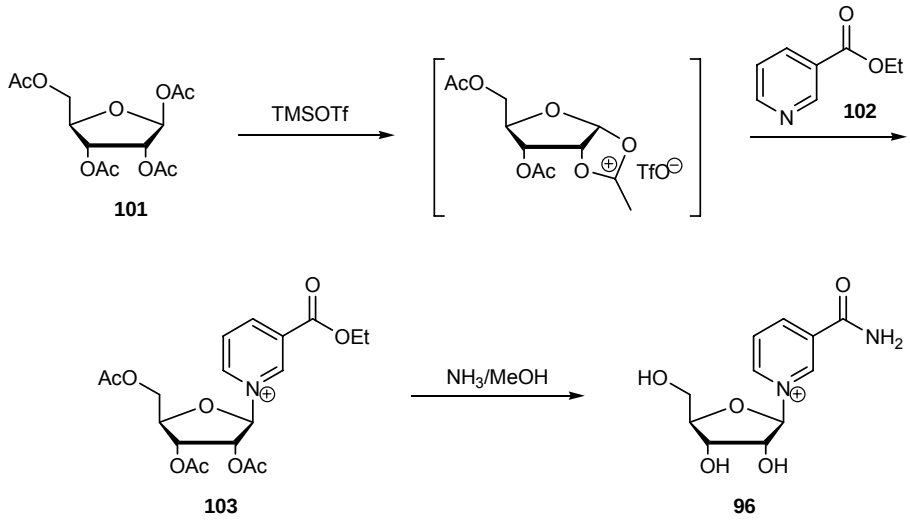


Abbildung 65: Synthese von β-Nicotinamidribonucleosid **96**

Das Produkt **96** wurde auf diesem Weg in einer Ausbeute von 70% erhalten, was die Effizienz dieser Kupplungsreaktion bestätigte. Den kritischen Schritt dieser zweistufigen Synthese stellt die Entschützung des β-Nicotinamidribonucleosids **103** dar, da hier für ein gutes Ergebnis die angegebene Konzentration der NH_3/MeOH-Lösung streng eingehalten werden muss.

Die Phosphorylierung der polaren Verbindung **96** erfolgte chemisch bisher ausschließlich nach der Methode von *M. Yoshikawa* mit $P(O)Cl_3$ in Trimethylphosphat.[140] Da sich diese Reaktionsbedingungen jedoch bereits bei der Synthese des Dichlorophosphates **34** als problematisch erwiesen haben (vgl. Kapitel 4.2.1), sollte eine Phosphorylierung auf diesem Weg und an dieser Stelle nicht durchgeführt werden.

Vielmehr sollte zunächst ein synthetischer Zugang zu geschütztem β-Nicotinamidribonucleosid **105** gefunden werden, da diese Verbindung dann auch durch ihre geringere Polarität anderen Phosphorylierungsmethoden zugänglich sein sollte.

Eine in diesem Zusammenhang sehr elegante Möglichkeit bestünde in der regioselektiven Spaltung des primären Acetylesters des vollgeschützten Kupplungsproduktes **103**.

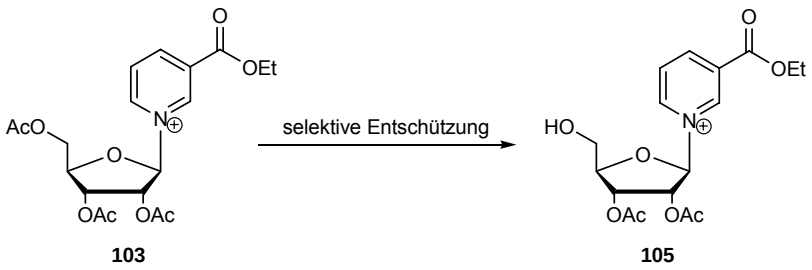


Abbildung 66: Selektive Spaltung des primären Acetesters zur Synthese von 2',3'-Di-*O*-acetyl-nicotinsäureethylesterribonucleosid **105**

Dies kann durch geeignete Enzyme erreicht werden. Die kommerziell erhältliche Lipase aus *Candida rugosa* (CRL, Typ VII) wurde unter anderem bereits erfolgreich zur regioselektiven Deacetylierung der primären Hydroxygruppe peracetylierter Hexapyranosen eingesetzt.[145,146] *J.-W. Chern et al.* gelang die Übertragung auf die regioselektive Deacetylierung von Ribofuranosen durch CRL.[147] Die Darstellung von 1,2,3-Tri-*O*-acetyl-β-D-ribofuranose **106** aus dem entsprechenden Tetraacetat **101** verlief unter sehr milden Bedingungen über Nacht bei Raumtemperatur mit einer Ausbeute von 80%.

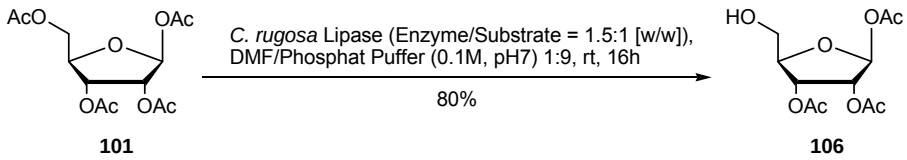


Abbildung 67: Enzymatische Deacetylierung der primären Hydroxygruppe von Ribosetetraacetat **101**

Diese Reaktionsbedingungen wurden in einem ersten Versuch auf 2',3',5'-Tri-*O*-acetyl-β-nicotinsäureethylesterribonucleosid **103** als Substrat übertragen. Hierzu wurde das vollgeschützte Kupplungsprodukt **103** nach dem

ersten Reaktionsschritt wie gewohnt in Methanol aufgenommen und mit Hexan extrahiert und als Gemisch mit dem überschüssigen Heterocyclus **102** (0.5 Äquivalente) für die enzymatische Deacetylierung eingesetzt.
Allerdings konnte auch nach 48 Stunden keinerlei Umsatz detektiert werden (DC-Kontrolle: EE/MeOH/TEA 5:0.3:0.05), weshalb der Ansatz verworfen wurde. Vermutlich wird **103** aufgrund des strukturellen Unterschieds zur tetraacetylierten Ribose **101** und durch die vorhandene Ladung am Stickstoff als Substrat nicht akzeptiert.
Aus diesem Grund wurde in Analogie zu der in der Literatur publizierten Umsetzung zunächst Ribosetetraacetat **101** selektiv durch CRL zu 1,2,3-Tri-*O*-acetyl-β-D-ribofuranose **106** umgesetzt. Die Reaktion verlief laut dünnschichtchromatographischer Kontrolle (PE/EE 2:3 v/v) quantitativ über Nacht, dennoch betrug die isolierte Ausbeute lediglich 50%, da sich die Abtrennung des Enzyms vom gewünschten Produkt relativ problematisch gestaltete und daher mit Ausbeuteverlusten einherging.
Die anschließende Kupplung von **106** mit dem Heterocyclus **102** wurde aufgrund der freien 5'-OH-Gruppe in diesem Fall mit 2.0 Äquivalenten TMS-Triflat durchgeführt. Die Umsetzung verlief wie zuvor bei der peracetylierten Verbindung innerhalb weniger Stunden nahezu quantitativ (DC-Kontrolle: EE/MeOH/TEA 5:0.3:0.05 v/v). Nach Entfernen des Lösungsmittels und Extraktion konnte das gewünschte 2',3'-Di-*O*-acetyl-β-nicotinsäureethylesterribonucleosid **105** nach anfänglichen Schwierigkeiten bezüglich der Reinigung in einer Ausbeute von 66% erhalten werden.

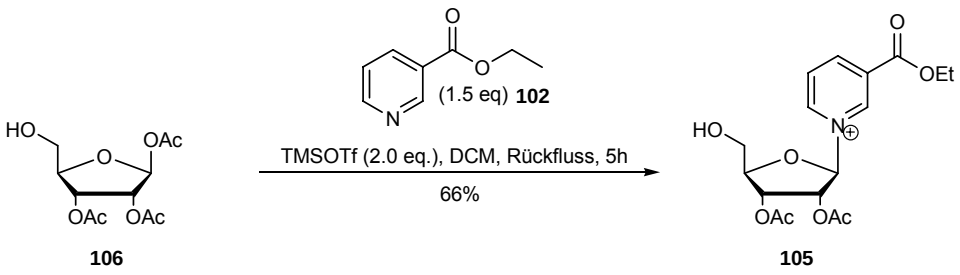


Abbildung 68: Synthese von 2',3'-Di-*O*-acetylnicotinsäureethylesterribonucleosid **105**

Als optimal stellte sich schließlich die Reinigung des Produktes am Chromatotron (DCM/MeOH-Gradient) heraus, da auf diesem Weg eine vollständige Abtrennung des überschüssigen Nicotinsäureethylesters **102** gelang. Die TMS-Gruppe der

primären Hydroxygruppe scheint im Zuge der Aufarbeitung wieder vollständig abgespalten zu werden, da keine Fraktionen des entsprechenden Silylethers gefunden wurden.

Die Ausbeute ist für diese empfindliche Verbindung vollends zufriedenstellend, allerdings konnte nicht abschließend geklärt werden, welches Gegenion das Produkt **105** besitzt. Das Triflat-Anion sollte im ^{13}C-NMR-Spektrum durch ein Signal bei ca. 120 ppm erkennbar sein. Da in diesem Bereich allerdings keine Absorption vorhanden ist, bezieht sich die angegebene Ausbeute der Einfachheit halber auf das positiv geladene Produkt.

Die anschließende Phosphorylierung der 5'-OH-Gruppe von **105** sollte zunächst nach der Methode von *T. Sowa und S. Ouchi* mit Phosphorylchlorid, Pyridin und Wasser in Acetonitril erfolgen,[148] da sich diese Synthese in der Arbeitsgruppe bereits als ausgesprochen geeignet zur Darstellung größerer Mengen verschiedener Nucleotide erwiesen hat.[114]

In einer Testreaktion wurde zunächst 3'-*O*-Acetylthymidin **64** nach diesem Protokoll zum entsprechenden Nucleotid **109** umgesetzt. Hierzu wurde Acetonitril als Lösungsmittel vorgelegt und bei 0 °C mit $P(O)Cl_3$, Wasser und Pyridin (2:1:2 v/v) unter Bildung von Tetrachlorpyrophosphat **107** versetzt. Nach Zugabe des Nucleosids wird zunächst das Pyrophosphat-Addukt **108** gebildet, welches aufgrund seiner hoch hydrolyseempfindlichen Anhydridbindung nachfolgend durch Zugabe von Eis und abschließender Neutralisation mit Ammoniumhydrogencarbonat das gewünschte Nucleosidmonophosphat **109** liefert (Abbildung 69).

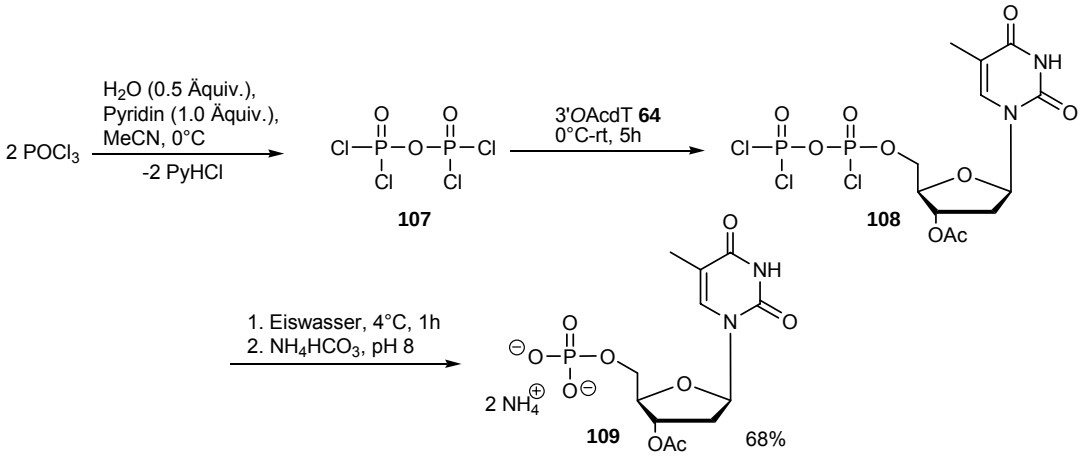


Abbildung 69: Synthese von 3'-*O*-Acetylthymidinmonophosphat **109** nach Sowa und Ouchi

Die abschließende Reinigung des Produktes erfolgte mittels Umkehrphasenchromatographie (RP-18, H_2O). Die eigentliche Herausforderung hierbei bestand, wie schon zuvor bei den ND(T)Ps, in der Abtrennung des überschüssigen Phosphates aufgrund der schwierigen Detektierbarkeit mittels DC. Die Acetylschutzgruppe im Produkt **109** bewirkte jedoch bereits den nötigen Polaritätsunterschied, so dass 3'-O-Acetylthymidinmonophosphat **109** vollständig von den Phosphatsalzen getrennt werden konnte und daher in einer guten Ausbeute von nahezu 70% erhalten wurde.

Der Versuch, das gewünschte geschützte β-NMN **104** auf diesem Weg darzustellen, misslang. Die Reaktion verlief zwar analog zu der Testreaktion, die nachfolgende Chromatographie jedoch brachte keinerlei Produkt hervor. Es wurden lediglich Fraktionen von Ammoniumphosphat erhalten, sowie eine relativ unpolare Verbindung, die erst durch Zugabe einer größeren Menge Methanol zum Laufmittel eluierte. Die unbekannte Verbindung stellte sich nach NMR-spektroskopischer und massenspektrometrischer Analyse als 5'-Chlor-2',3'-di-*O*-acetyl-β-nicotinsäure-ethylesterribonucleosid **110** heraus (Abbildung 70). Die Ausbeute dieser nicht erwünschten Verbindung betrug 35%.

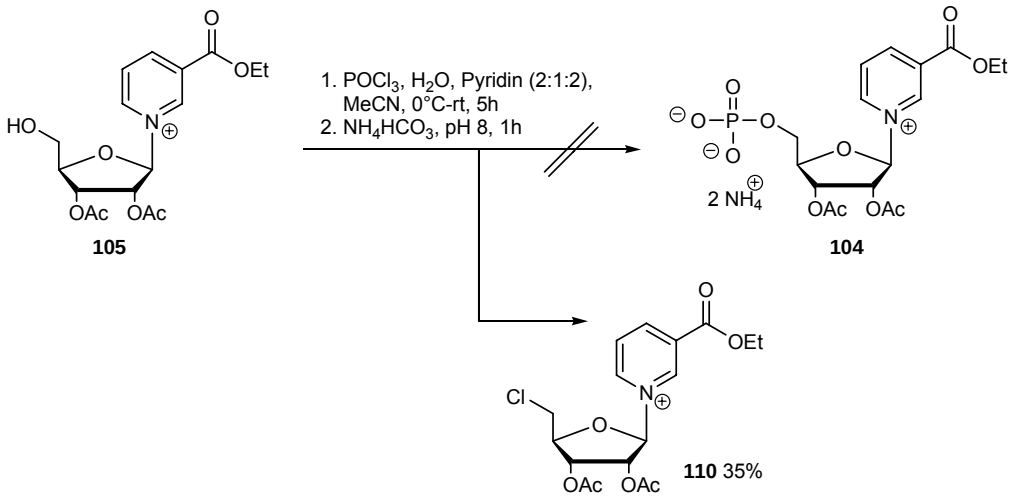


Abbildung 70: Versuch der Synthese von 2',3'-Di-*O*-acetylnicotinsäureethylester-ribonucleotid **104** nach Sowa und Ouchi

Zur Entstehung dieses Produktes muss, wie bereits in Kapitel 4.2.1 vermutet, die Phosphatgruppe als Abgangsgruppe in einer nucleophilen Substitutionsreaktion mit Chlorid fungieren. Warum diese Nebenreaktion hier in diesem doch beträchtlichen

Anteil abläuft, bleibt fraglich. Eventuell ist der während der Hydrolyse des Pyrophosphat-Adduktes herrschende stark saure pH-Wert von 2 für diese Verbindung ungeeignet.

Auch der anschließende Versuch, das gewünschte Nucleotid **104** nach der Methode von *M. Yoshikawa* zu generieren, gelang aus den zuvor geschilderten Problemen nicht.

Vor diesem Hintergrund bot sich die Synthese des entsprechenden 5-Nitro-substituierten *cyclo*Sal-Phosphattriesters **95** an, der dann, wie zuvor erwähnt, durch Umsetzung mit AMP **94** ebenfalls die gewünschte Zielverbindung NAD **92** liefern sollte. Die Darstellung von 5-NO_2-*cyclo*Sal-2',3'-di-*O*-acetyl-β-nicotinsäureethylester-ribonucleosidmonophosphat **95** erfolgte nach der in Abschnitt 4.2.7 angegebenen allgemeinen Synthesevorschrift.

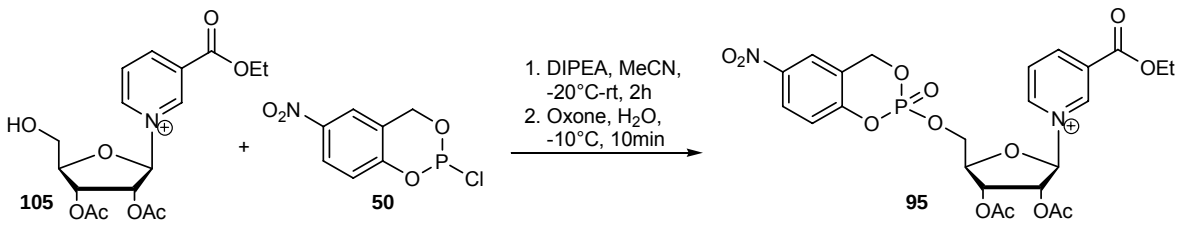


Abbildung 71: Synthese von 5-Nitro-*cyclo*Sal-2',3'-di-*O*-acetylnicotinsäureethylester-ribonucleosidmonophosphat **95**

Die Umsetzung des Nucleosids **105** dem Chlorphosphit **50** schien nach zweistündiger Reaktionszeit bereits abgeschlossen (DC-Kontrolle: DCM/MeOH 9:1). Der Reaktionsansatz wurde oxidiert und extrahiert. Aus dem erhaltenen Protonenbreitband-entkoppelten ^{31}P-NMR-Spektrum lässt sich die Bildung des gewünschten Triesters **95** neben einigen Nebenprodukten durch die charakteristischen Absorptionen der Diastereomere von **95** bei –11 ppm erkennen. Das zugehörige ^{1}H-NMR-Spektrum des Rohproduktes ist hingegen nicht ausreichend aussagekräftig.

Dennoch wurde der Versuch unternommen, dieses Rohprodukt in einer Testreaktion mit dem bereits vorhandenen $HNEt_3$-UMP **90b** umzusetzen (Abbildung 72). Der vermeintliche Triester **95** wurde laut Dünnschichtchromatogramm (DCM/MeOH 9:1) zwar vollständig umgesetzt, jedoch konnte nach Extraktion und Umkehrphasenchromatographie (RP-18, H_2O) lediglich ein Teil des im Überschuss als Nucleophil eingesetzten $HNEt_3$-UMP **90b** zurückgewonnen werden. Auf eine

Entschützung wurde bei diesem Testansatz zunächst verzichtet, um zu vermeiden, dass eventuell vorhandenes Produkt durch die basischen Bedingungen zersetzt werden würde. Die Stabilität von NAD **92** unter bestimmten Reaktionsbedingungen wurde erst in späteren Kontrollexperimenten genauer untersucht (s. S 79, 80).
Es wurde eine weitere Fraktion erhalten, die erst nach Zugabe von Methanol zum Laufmittel eluierte, bei der es sich jedoch laut Protonenbreitband-entkoppelten ^{31}P-NMR-Spektrum um eine Mischfraktion aus ungefähr drei Verbindungen handelte. Das gewünschte Produkt **111** müsste eine chemische Verschiebung zwischen –10 und –11 ppm im ^{31}P-NMR-Spektrum aufweisen. In diesem Bereich ist jedoch kein signifikantes Signal erkennbar, was nicht bedeuten muss, dass diese Reaktion generell misslingt, da in diesem speziellen Fall der eingesetzte *cyclo*Sal-Triester **95** wie zuvor beschrieben stark verunreinigt war.

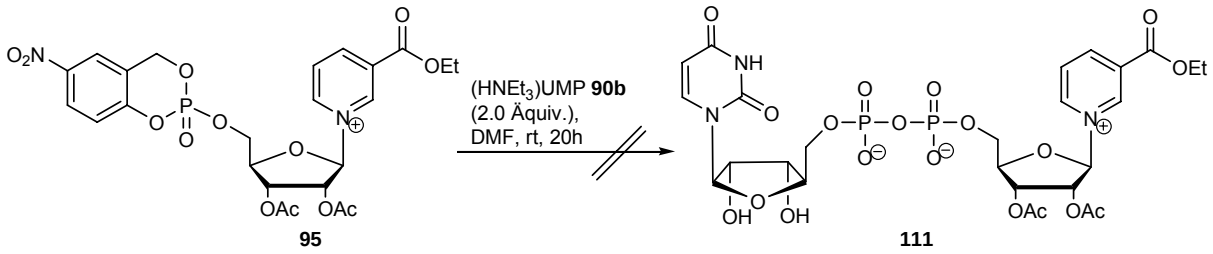


Abbildung 72: Versuch der Synthese von UDP-2',3'-Di-*O*-acetylnicotinsäureethylester-ribonucleosid **111**

Da auch die Synthese des *cyclo*Sal-Triesters von 2',3'-Di-*O*-acetyl-β-nicotinsäure-ethylesterribonucleosid **95** nicht trivial erschien, wurde ein letzter Versuch unternommen, das entsprechende Nucleosidmonophosphat **104** zu synthetisieren.
Eine sehr milde Variante zur Einführung einer Phosphatgruppe an der 5'-Position im Nucleosid gelingt unter Mitsunobu-Bedingungen,[149-151] wenn alle anderen reaktiven Positionen im Nucleosid durch Schutzgruppen blockiert sind, da es ansonsten zu Nebenreaktionen kommt. Auch die als Nucleophil dienende Phosphorsäure liegt in diesem Fall als geschützter Diester vor.
Die Mitsunobu-Reaktion kann allgemein als Kondensationsreaktion eines Alkohols mit einem Nucleophil beschrieben werden, bei der die Additive Triphenylphosphin **112** und Di*iso*propylazodicarboxylat **113** (DIAD) einer Redoxreaktion unterliegen (Abbildung 73), vorausgesetzt das Nucleophil kann während der Umsetzung ein acides Proton (pks < 12) abspalten.

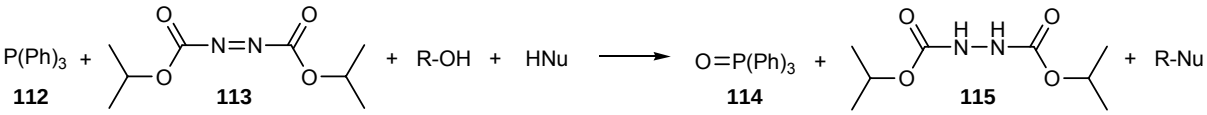


Abbildung 73: Allgemeines Reaktionsschema der Mitsunobu-Reaktion

Oft wird diese Reaktion aufgrund des S_N2-artigen Mechanismus zur gezielten Inversion bestimmter Hydroxyfunktionen im Molekül verwendet.[152]

Für die Phosphorylierungsreaktion wurden zunächst Triphenylphosphin **112** und DIAD **113** in Acetonitril gelöst und bei -40 °C zu einer Lösung des Nucleosids **105** und Bisbenzylphosphat **116** getropft. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum am Chromatotron (DCM/MeOH-Gradient) gereinigt. Das vollständig geschützte Nucleotid **117** wurde auf diesem Weg tatsächlich in einer Ausbeute von 45% erhalten.

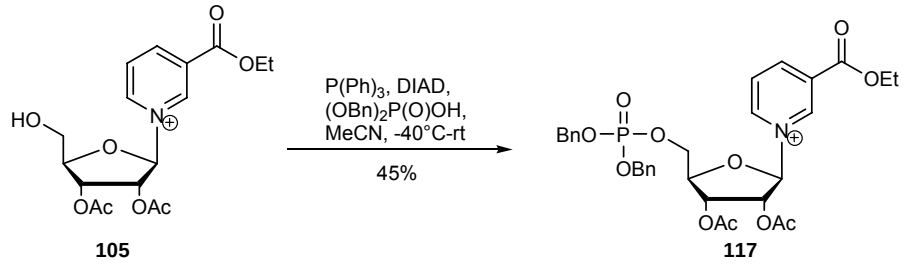


Abbildung 74: Synthese von Bis-(benzyl)-2',3'-di-*O*-acetylnicotinsäureethylester-ribonucleotid **117** nach Mitsunobu

Diese Ausbeute stellt für einen ersten Versuch ein sehr zufriedenstellendes Ergebnis dar, vor allem unter Berücksichtigung der problematischen Abtrennung der zwangsläufig anfallenden Nebenprodukte Triphenylphosphinoxid **114** und Di*iso*propylhydrazin-1,2-dicarboxylat **115**.

Die Generierung des freien und nucleophilen Phosphates sollte schonend durch hydrogenolytische Abspaltung der Benzylschutzgruppen mit Palladium an Aktivkohle in Gegenwart von Triethylamin als Base erfolgen. In diesem Zusammenhang kamen verschiedene Lösungsmittel und unterschiedlich aktive Katalysatoren zum Einsatz, leider alle mit demselben Ergebnis: Neben der gewünschten Debenzylierung wurde außerdem eine Hydrierung der Heterobase beobachtet.

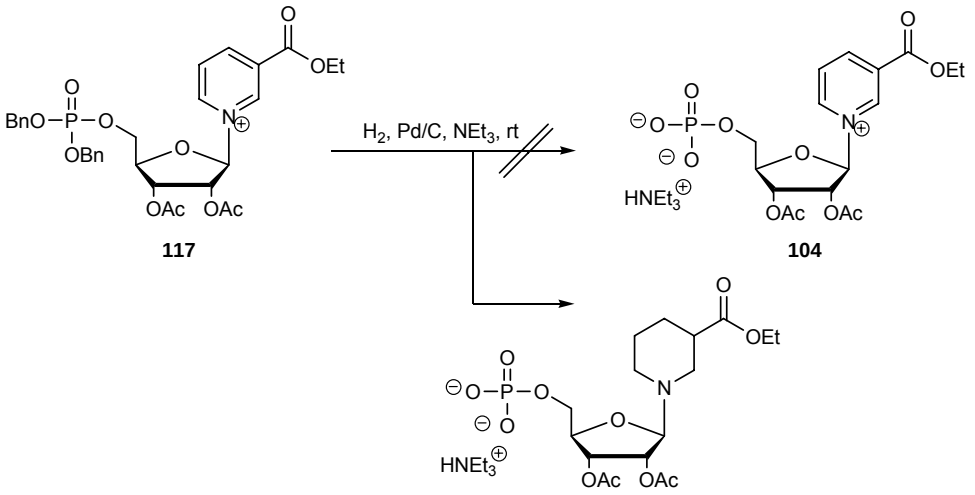


Abbildung 75: Versuch der reduktiven Debenzylierung mit Palladium an Aktivkohle

Dieses Ergebnis wurde in einem Kontrollexperiment nochmals verifiziert. Hierzu wurde Nicotinsäureethylester **102** in Ethanol mit Palladium an Aktivkohle (5%) versetzt und über Nacht in einer Wasserstoffatmosphäre gerührt (Abbildung 76). Wie bereits vermutet, war der charakteristische Geruch des Eduktes danach verschwunden und auch das ^{1}H-NMR- sowie das ^{13}C-NMR-Spektrum bestätigten die quantitative Bildung von 3,4,5,6-Tetrahydronicotinsäureetylester **118**. Die abschließende massenspektrometrische Analyse erbrachte dann den endgültigen Beweis.

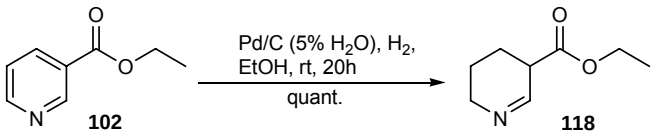


Abbildung 76: Synthese von 3,4,5,6-Tetrahydronicotinsäureethylester **118** durch Hydrogenolyse

Da die Hydrogenolyse der Benzylester in diesem speziellen Fall leider nicht das gewünschte Produkt lieferte, wurde versucht, die Debenzylierung alternativ durch Lewis-Säuren zu erreichen.

Dafür wurde das benzylgeschützte Nucleotid **117** in Dichlormethan gelöst und bei -78 °C mit einer 1M Bortrichlorid-Lösung (2.5 Äquivalente) versetzt. Die dünnschichtchromatographische Analyse des Reaktionsgemisches zeigte jedoch eine breite Produktvielfalt, aus der das gewünschte freie Phosphat **104** nicht isoliert

werden konnte. Vermutlich sind auch diese Reaktionsbedingungen für die empfindliche Verbindung **117** zu harsch.

Aus zeitlichen Gründen konnte die Synthese des gewünschten 2',3'-Di-*O*-acetyl-β-nicotinsäureethylesterribonucleotides **104** an dieser Stelle nicht weiter verfolgt werden.

Prinzipiell sollte es jedoch möglich sein, die Mitsunobu-Phosphorylierung beispielweise mit einem Bis-(β-cyanoethyl)-geschützten Phosphat **119** als Nucleophil durchzuführen. In diesem Fall sollte die Generierung des gewünschten freien Phosphates relativ schonend durch β-Eliminierung mit einer starken, nicht nucleophilen Base wie DBU, gelingen (Abbildung 77).[153]

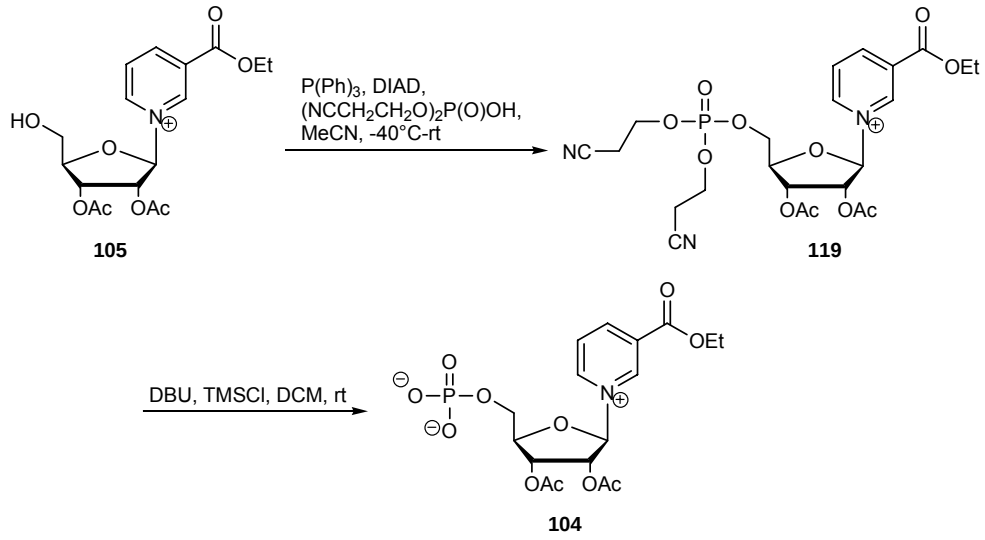


Abbildung 77: Mögliche alternative Synthese von 2',3'-Di-*O*-acetylnicotinsäureethylester-ribonucleotid **104**

Da NAD **92** selbst relativ kostengünstig und zudem gut verfügbar ist, wurden in diesem Zusammenhang abschließend einige Stabilitätsuntersuchungen mit der eigentlichen Zielverbindung **92** durchgeführt, um die Aufarbeitung sowie die weitere Handhabung von **92** und eventueller Analoga besser kennen zu lernen.

Hierzu wurde kommerziell erhältliches Natrium-NAD über Nacht bei Raumtemperatur in DMF gerührt und nach Evaporation des Lösungsmittels im Vakuum mit Wasser und Ethylacetat extrahiert. Diese simulierten Reaktionsbedingungen führten zu keinerlei Zersetzung des Produktes **92**. Des Weiteren wurde **92** in der zur Entschützung des Produktes verwendeten NH_3/MeOH-Lösung über Nacht bei einer Temperatur von 4 °C gerührt und anschließend erneut spektroskopiert. Auch unter

diesen Bedingungen wurde keine Zersetzung von **92** beobachtet. Ferner wurde die Stabilität der Verbindung **92** in Wasser untersucht, um auszuschließen, dass das Produkt bei der abschließenden Umkehrphasenchromatographie zersetzt wird. NAD **92** zeigte sich jedoch auch nach zwei Wochen in der wässrigen Lösung noch stabil, weshalb diese Befürchtung vollkommen unbegründet sein sollte.
Korrekterweise hätten diese Untersuchungen mit dem Triethylammoniumsalz von **92** durchgeführt werden müssen, da zuvor jedoch keine Unterschiede hinsichtlich der Stabilität der Produkte in Abhängigkeit des Gegenions (Na^+ oder $HNEt_3^+$) beobachtet wurden, können die gewonnenen Erkenntnisse der durchgeführten Kontrollexperimente bestimmt größtenteils auf den tatsächlichen Reaktionsansatz übertragen werden.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die Synthese des geschützten Nicotinamidribonucleosids **105** durch eine selektive enzymatische Deacetylierung von Ribosetetraacetat **101** gefolgt von der TMS-Triflat vermittelten Kupplung mit dem Heterocyclus **102** in zufriedenstellenden Ausbeuten von über 65% gelingt. Die anschließende Einführung der Phosphatgruppe an der 5'-Postion von **105** erwies sich aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Verbindung zunächst als schwierig, wurde jedoch letztlich unter Mitsunobu-Bedingungen mit Bisbenzylphosphat in einer guten Ausbeute von 45% erreicht. Die abschließende hydrogenolytische Abspaltung der Benzylgruppen führte jedoch zu einer unerwünschten Hydrierung des Heterocylus. Daher wurde alternativ versucht, die Generierung des freien Phosphates **104** mit Lewis-Säuren zu erreichen, was aufgrund der harschen Reaktionsbedingungen jedoch ebenfalls misslang. Die Synthese des gewünschten β-Nicotinamidribonucleotids **104** könnte möglicherweise durch einen Wechsel der Schutzgruppen am Phosphat auf diesem Weg gelingen.
Nachfolgend wird mit der Synthese der Dinucleosidtetraphosphate fortgefahren.

4.5.3 Synthese der Dinucleosidtetraphosphate 4, 87, 121

Wie schon bei den entsprechenden Np_2Ns wurde ein erster Versuch an einem Modellsystem bestehend aus 2.0 Äquivalenten N(*n*Bu_4)$_4$-ATP **1a** und 1.0 Äquivalenten 5-NO_2-*cyclo*Sal-3'-*O*AcdTMP **69** durchgeführt (Abbildung 78). N(*n*Bu_4)$_4$-ATP **1a** wurde einer gründlichen Trocknung im Vakuum unterzogen, gefolgt von einer weiteren Trocknung über Molsieb in DMF. Nach Zugabe des ebenfalls in DMF gelösten *cyclo*Sal-Nucleotids **69** wurde der Reaktionsansatz über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Dünnschichtchromatogramm (DCM/MeOH 9:1) zeigte nach dieser Zeit die vollständige Umsetzung des Triesters an, woraufhin nach Entfernen des Lösungsmittels und Extraktion das erhaltene Rohprodukt mittels Ionenaustauschchromatographie an Dowex (W50X8, NH_4^+) in das entsprechende Ammoniumsalz überführt wurde. Auf eine Entschützung wurde zunächst verzichtet, um eine eventuelle Zersetzung des gewünschten Produktes unter den basischen Bedingungen zu vermeiden. Die anschließende Umkehrphasenchromatographie (RP-18, H_2O) führte zwar zu einer Abtrennung des im Überschuss eingesetzten ATPs **1**, lieferte das gewünschte Produkt jedoch als Gemisch mit dem benzylierten ATP, welches aus der Reaktion des freigesetzten Chinonmethids **76** mit ATP resultiert. Erst eine zweite Reinigung ergab das reine Tetraphosphat **120**, allerdings lediglich in einer Ausbeute von 20%. Eine merkliche Menge des Produkts lag auch nach einer weiteren Trennung als Mischfraktion vor.

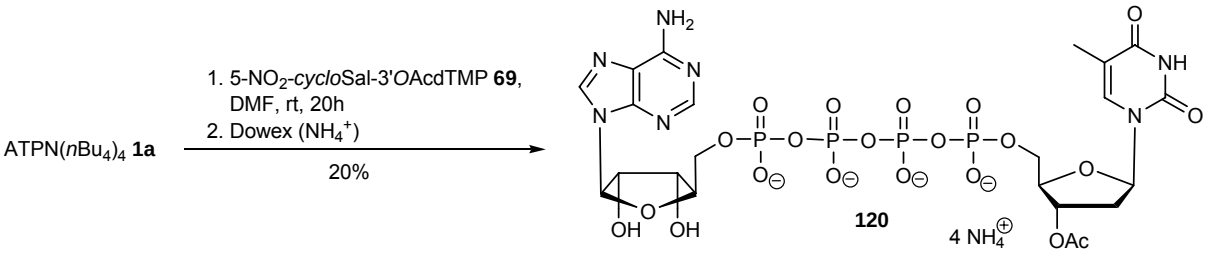


Abbildung 78: Synthese von Ap_4(3'*O*Ac)T **120**

Ein kleiner Teil des erhaltenen Tetraphosphates **120** wurde nachfolgend über Nacht bei Raumtemperatur basisch entschützt (MeOH/H_2O/TEA 7:3:1). Auch in diesem Fall verlief die Abspaltung der Acetylgruppe glatt und ohne Hydrolyse der Phosphatanhydridbindungen des Produktes **121**.

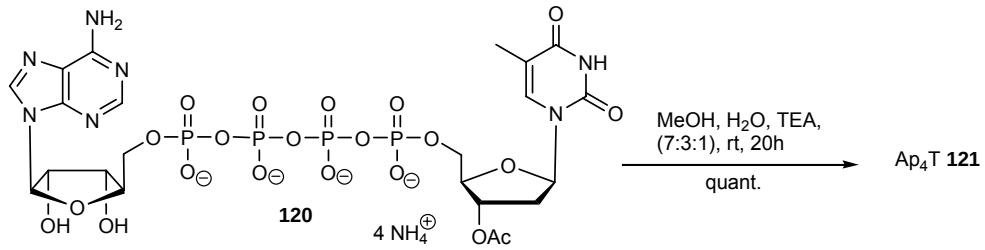


Abbildung 79: Basische Entschützung des Tetraphosphats **120**

Vor diesem Hintergrund wurde die Reaktion wiederholt, dieses Mal erfolgte die Entschützung allerdings direkt auf Stufe des Rohproduktes im Zuge der Aufarbeitung. Das gewünschte Tetraphosphat wurde auf diesem Weg in einer Ausbeute von immerhin 50% isoliert. In diesem Fall jedoch bereitete die Abtrennung des überschüssigen ATPs erhebliche Probleme, da sich durch die Abspaltung der Schutzgruppe die Retentionszeiten von Nucleophil und Produkt angeglichen haben. Auch dieses Mal wurde eine Fraktion des vermeintlich „falschen Diesters“ **91** isoliert, was sich nachteilig auf die Ausbeute des Produktes auswirkte. Nach wie vor ist rätselhaft, auf welchem Weg dieses Nebenprodukt entsteht, jedoch ist die erzielte Ausbeute für diese hochgeladene Verbindung schon recht gut.

Auf demselben Weg wurde außerdem Ap_4A **4** als Beispiel eines symmetrischen und zudem biologisch relevanten Dinucleosidtetraphosphates synthetisiert. Das gewünschte Produkt wurde in einer Ausbeute von 40% isoliert.

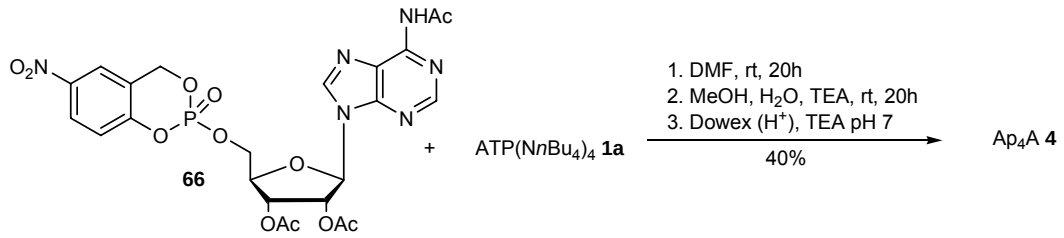


Abbildung 80: Synthese von Diadenosintetraphosphat **4**

Wie zuvor erläutert, gelingt eine Isolierung dieser polaren Produkte im allgemeinen leichter, wenn diese in Form ihrer Triethylammonium-Salze vorliegen. Da $(HNEt_3)_3$-ATP **1b** in DMF jedoch vollkommen unlöslich ist, muss die Umsetzung des Triesters mit dem entsprechenden N(*n*Bu_4)-ATP **1a** erfolgen. Daher wurde das erhaltene Rohprodukt in diesem Fall nachträglich zur Reinigung mittels Dowex (W50X8, H^+) zunächst in die freie Säure überführt und anschließend durch Zugabe

von Triethylamin neutralisiert. Die Abtrennung des überschüssigen ATPs gelang auf diesem Weg bereits vollständig im Zuge der ersten chromatographischen Reinigung, weshalb die Ausbeute von 40% zunächst etwas verwunderte. Produktverluste könnten in diesem Fall während des Ionenaustausches aufgetreten sein, da nicht auszuschließen ist, dass durch die kurzzeitig stark sauren Bedingungen eine partielle Zersetzung des Produktes statt gefunden hat.

Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob das Triethylammoniumsalz von peracetyliertem ATP eine ausreichende Löslichkeit in DMF besitzt, womit ein Ionenaustausch auf Stufe des Tetraphosphates entfallen würde. Der Versuch, ATP **1** in Analogie zu Nucleosidmonophosphaten[154] mit Essigsäureanhydrid in die entsprechende *N*^{6},2',3'-Triacetyl-geschützte-Verbindung zu überführen, misslang, da es unter diesen Bedingungen lediglich zu einer Zersetzung des Triphosphates kam. Nachträglich wurde festgestellt, dass in der Literatur keine Methode zur direkten Acetylierung von NTPs existiert. Auf eine Synthese von peracetyliertem ATP, ausgehend von der entsprechenden *cyclo*Sal-Verbindung **66**, wurde aus zeitlichen Gründen verzichtet.

In einem abschließenden Experiment sollte diese Methodik auf die Synthese eines hydrolysestabilen Ap_4A-Analogons **87** übertragen werden. Derartige Verbindungen spielen als Inhibitoren zur Aufklärung von enzymatisch katalysierten Phosphorylgruppenübertragungsreaktionen sowie bei der Untersuchung von Rezeptorspezifitäten eine wichtige Rolle.[155-160] In diesem Fall soll die Synthese von **87** jedoch nur als ein weiteres Anwendungsbeispiel für unsere Methode dienen.
Zur Darstellung von Diadenosin-β,γ-methylentetraphosphat **87** musste zunächst das entsprechende NTP-Analogon **86** hergestellt werden. Hierzu wurde kommerziell verfügbare Methylenpyrophosphorsäure **122** durch Neutralisation mit Tetra-*n*-butylammoniumhydroxid in das entsprechend nucleophilere und lipophilere $N(nBu_4)_2$-Salz **122a** überführt. Aufgrund der Methylengruppe konnte in diesem Fall die Anzahl der Gegenionen aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum und damit das Molgewicht von **122a** genau bestimmt werden. Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-dihydrogen-methylenpyrophosphat **122a** wurde nach gründlicher Trocknung im Vakuum und über Molsieb in DMF mit 5-NO_2-*cyclo*Sal-*N*^{6},2',3'-tri-acetyl-AMP **66** versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständiger Umsetzung des Triesters **66**

(DC-Kontrolle DCM/MeOH 9:1) wurde der Reaktionsansatz wie gewohnt zunächst vom Lösungsmittel befreit und im Anschluss extrahiert. Allerdings wurde in diesem Fall im Hinblick auf eine weitere Umsetzung des Produktes **86** auf eine Entschützung verzichtet. Des Weiteren wurde versucht, das erhaltene Rohprodukt direkt als Tetra-*n*-butylammonium-Salz **86a** zu reinigen, da die für die Chromatographie vorteilhaften Ammoniumionen für die anschließende Umsetzung zum Tetraphosphat **87** erneut gegen die lipophilen N(nBu$_4$)-Ionen ausgetauscht werden müssten. Um diesen zweifachen Ionenaustausch zu umgehen, erfolgte die Reinigung an RP-18-Silicagel mit einem Wasser/Acetonitril-Gemisch im Verhältnis von 2:1. Auf diesem Weg wurden 41% des gewünschten Produktes in reiner Form erhalten.

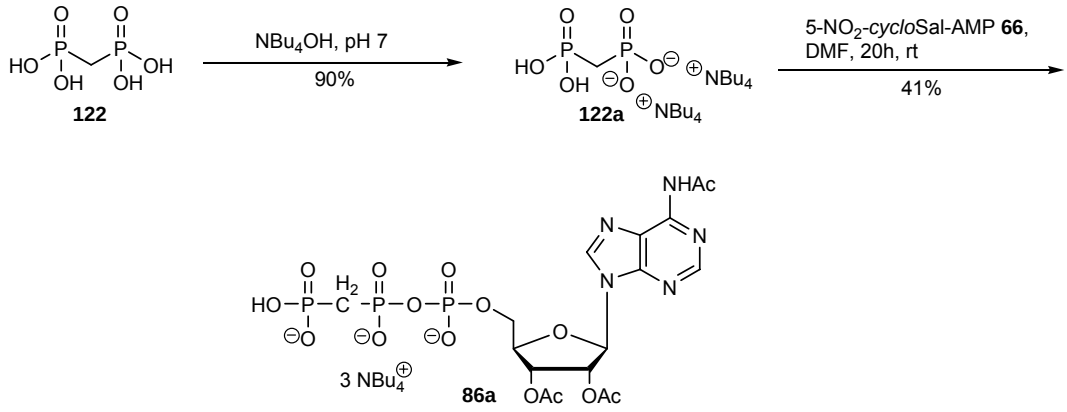


Abbildung 81: Synthese von Adenosin-5'-β,γ-methylentriphosphat **86a**

Zudem wurde eine Mischfraktion bestehend aus dem Produkt **86a**, überschüssigem Methylenpyrophosphat **122a** sowie benzylierten Methylenpyrophosphat isoliert. In diesem Fall wurde kaum „falscher Diester" erhalten, so dass die Ausbeute deutlich höher sein sollte. Insgesamt ist dieses Ergebnis aufgrund der doch recht schwierigen chromatographischen Bedingungen als zufriedenstellend einzuschätzen, da bereits nach dem ersten Versuch eine ausreichende Menge des gewünschten N(nBu$_4$)-ATP-Analogons **86a** zur Synthese des entsprechenden Tetraphosphates **87** zur Verfügung stand.

An dieser Stelle soll kurz angemerkt werden, dass das Triphosphat **86** aufgrund der methylenverbrückten β- und γ-Phosphoratome einen interessanten Signalsatz im Protonenbreitband-entkoppelten ^{31}P-NMR-Spektrum aufweist (Abbildung 82). Lediglich das α-P-Atom liefert das bereits bekannte Dublett bei –11 ppm durch $^2J_{PP}$-Kopplung (vgl. Kapitel 4.4.3), die anderen Phosphoratome erzeugen Signale bei

+7 ppm (Pβ) und +15 ppm (Pγ). Das β-P-Atom spaltet durch die Kopplung mit den beiden benachbarten Phosphoratomen zu einem doppeltem Dublett auf, Pγ zu einem Dublett.

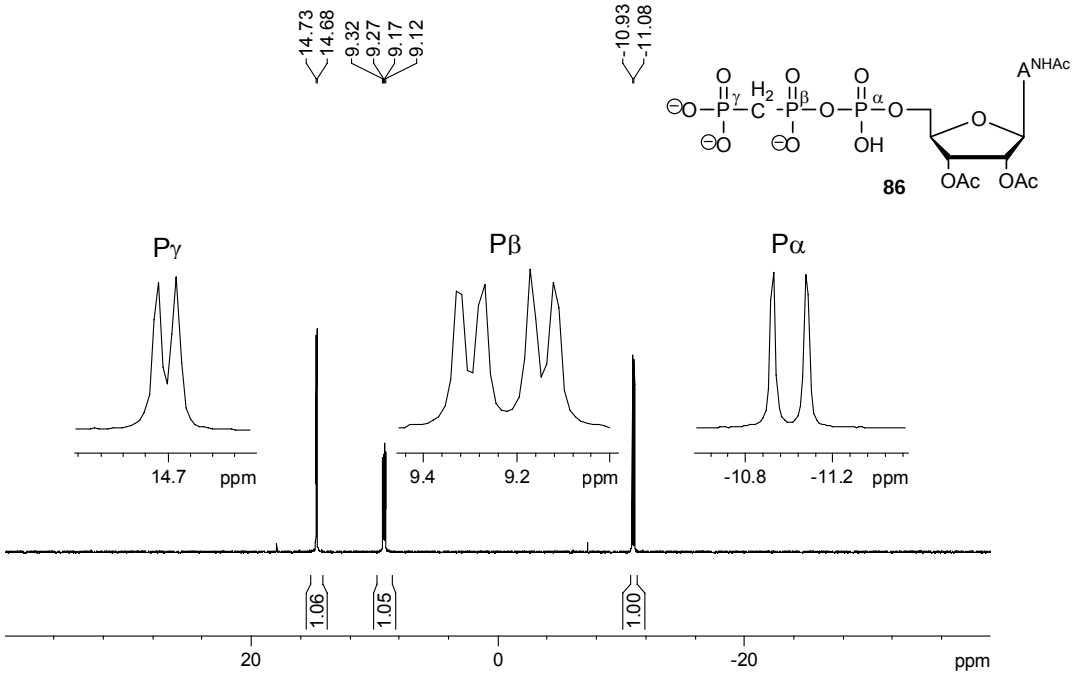


Abbildung 82: ^{31}P-NMR-Spektrum (D_2O, 162 MHz) von Adenosin-5'-β,γ-methylentriphosphat **86**

Die Umsetzung des Triphosphats **86a** mit 5-NO_2-*cyclo*Sal-N^6,2',3'-triacetyl-AMP **66** wurde wie gewohnt in wasserfreiem DMF durchgeführt, allerdings wurde nach Aufarbeitung, Entschützung sowie Umkehrphasenchromatographie lediglich das eingesetzte Triphosphat **86** zurückgewonnen.

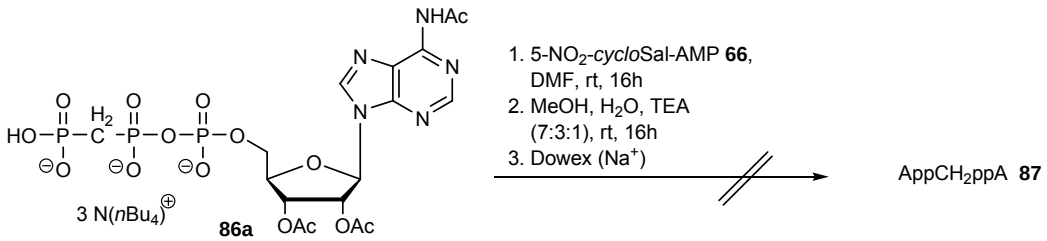


Abbildung 83: Versuch der Synthese von Diadenosin-β,γ-methylentetraphosphat **87**

Daraufhin wurde die Synthese des benötigten Triphosphates **86** wiederholt. In diesem Fall wurde allerdings der zuvor vermiedene zweifache Ionenaustausch zur Verbesserung des Elutionsverhaltens von **86** und einer damit eventuell verbundenen

Ausbeutesteigerung in Kauf genommen. Das gewünschte Triphosphat **86** wurde auf diesem Weg in einer Ausbeute von 50% als Natriumsalz isoliert. Auch in diesem Fall wurde kaum „falscher Diester“ erhalten.

Aufgrund eines unvollständigen Ionentausches verblieb ein Teil des Produktes als N(*n*Bu$_4$)-Salz und eluierte erst durch Zugabe von Methanol zum Laufmittel, jedoch im Gemisch mit dem während der Reaktion freigesetzten Salicylalkohol, weshalb die tatsächliche Ausbeute auch hier höher hätte sein sollen.

Da die erhaltene Menge an reinem Triphosphat jedoch für die Synthese des Tetraphosphates **87** ausreichte, wurde aus Zeitgründen auf eine Reinigung des restlichen Produktes verzichtet.

In diesem Fall wurde das NTP **86** aus zuvor genannten Gründen in das entsprechende Triethylammoniumsalz **86b** überführt, in der Hoffnung, dass sich die Löslichkeit des HNEt$_3$-Salzes durch die Acetylschutzgruppen in DMF verbessert.

In der Tat war sämtliches Ausgangsmaterial nach wenigen Stunden gelöst und die Umsetzung des Triesters wie gewohnt nach 16 Stunden abgeschlossen (DC-Kontrolle). Allerdings wurde das gewünschte Produkt **87** auch in diesem Fall nicht erhalten, sondern lediglich das eingesetzte Triphosphat sowie AMP **94** zurückgewonnen.

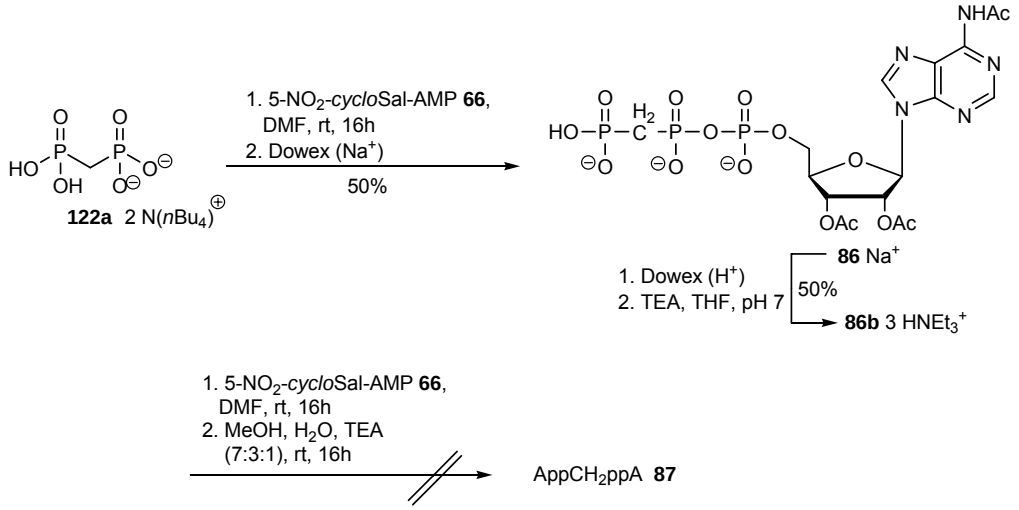


Abbildung 84: Versuch der Synthese von Diadenosin-β,γ-methylentetraphosphat **87**

Da im Vorfeld bereits sichergestellt worden war, dass die unmodifizierten Dinucleosidtetraphosphate unter den basischen Entschützungsbedingungen stabil sind, und das gewählte Analogon **87** prinzipiell eine noch höhere Hydrolysestabilität

aufweisen sollte, legt dieses Ergebnis die Vermutung nahe, dass der *cyclo*Sal-Triester **66** durch anwesendes Wasser im Reaktionsansatz hydrolysiert wurde.

In einem letzten Versuch sollte das gewünschte Produkt **87** *in situ* aus dem entsprechenden Triphosphat **86** generiert werden (Abbildung 85). Hierzu wurde 5-NO_2-*cyclo*Sal-*N*^{6},2',3'-triacetyl-AMP **66** mit lediglich einem Äquivalent Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-dihydrogenmethylenpyrophosphat **122a** zum gewünschten NTP **86a** umgesetzt und nach beendeter Reaktion des Triesters **66** (DC-Kontrolle) erneut mit einem Äquivalent **66** versetzt. Es wurde wieder bis zur quantitativen Umsetzung des Triesters über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, anschließend wurde der Reaktionsansatz wie gewohnt aufgearbeitet, entschützt, umgesalzt und chromatographiert (RP-18, H_2O). In diesem Fall konnte tatsächlich eine Fraktion isoliert werden, die das gewünschte Tetraphosphat **87** enthielt, welches allerdings noch leichte Verunreinigungen aufwies. Des Weiteren wurde eine geringe Menge des Triphosphates **86** und eine größere Menge des „falschen Diesters" erhalten.

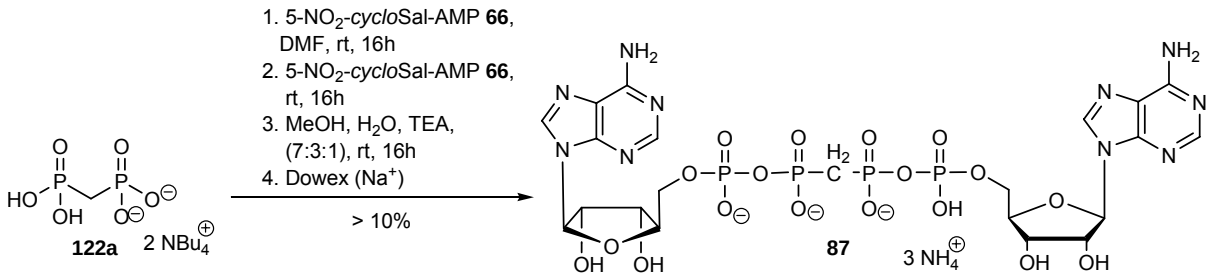


Abbildung 85: *In situ* Synthese von Diadenosin-β,γ-methylentetraphosphat **87**

Dass es sich bei dem erhaltenen Produkt tatsächlich um das gewünschte symmetrische, methylenverbrückte Tetraphosphat **87** handelt, kann den zugehörigen ^{31}P- sowie ^{1}H-NMR-Spektren entnommen werden.

Das Protonenbreitband-entkoppelte ^{31}P-NMR-Spektrum weist zwei Signale bei +7 ppm und -11 ppm im Verhältnis von 1:1 auf, die aufgrund der Symmetrie des Moleküls zu je einem Dublett mit einer Kopplungskonstante von 24.9 Hz aufspalten. Das tieffeldverschobene Signal bei +7 ppm wird von den methylenverbrückten β-Phosphoratomen erzeugt und das Dublett bei –11 ppm von den Pα-Atomen.

Das ^{1}H-NMR-Spektrum liefert aufgrund der Symmetrie der Verbindung in D_2O einen übersichtlichen Signalsatz bestehend aus zweimal acht nucleosidischen Protonen sowie dem Triplett der Methylengruppe bei ca. 2.4 ppm in einem Verhältnis von 1:1.

Diese „*in situ*“-Strategie sollte generell nicht so hohe Ausbeuten liefern, da zum einen lediglich ein Äquivalent des jeweiligen Nucleophils eingesetzt werden kann und zum anderen die unter wasserfreien Bedingungen auftretende Nebenreaktion mit dem freigesetzten Chinonmethid berücksichtigt werden muss.
Aus den genannten Gründen sollte in zukünftigen Arbeiten wieder eine zweistufige Synthesestrategie zur Darstellung von **87** verfolgt werden. Am vielversprechendsten erscheint in diesem Zusammenhang ein erneuter Versuch mit dem peracetylierten $HNEt_3$-β,γ-MeATP **86b**, da in diesem Fall auf Stufe des Tetraphosphates kein weiterer Ionenaustausch nötig ist und sich das peracetylierte Triphosphat **86b** als Triethylammoniumsalz relativ problemlos in ausreichenden Mengen herstellen lässt.

Bei einem Erfolg dieser Vorhergehensweise sollte die Darstellung von Np_4Ns aus *cyclo*Sal-NMPs generell mit peracetylierten NTPs in Form ihrer Triethylammoniumsalze erfolgen, da sich in diesem Fall die Reinigung der Produkte ernorm vereinfacht und höhere Ausbeuten erreicht werden.

4.5.4 Synthese von Diadenosintriphosphat 3

Die Synthese von Ap_3A **3** erfolgte der Vollständigkeit halber als Beispiel für ein symmetrisches Np_3N. Die Synthese von **3** richtete sich im wesentlichen nach den Erkenntnissen und Erfahrungen, die in Kapitel 4.5.1 und 4.5.3 gemacht wurden.
Da sich durch Verwendung von Triethylammoniumionen als Gegenionen sowohl die Aufarbeitung als auch die anschließende Chromatographie wesentlich vereinfacht, wurde kommerziell erhältliches Kalium-ADP **123** mittels Ionenaustauschchromatographie an Dowex (50WX8, H^+) zunächst in die freie Säure überführt und anschließend durch Zugabe von Triethylamin neutralisiert. Das erhaltene Di-(triethylammonium)-ADP **123a** wurde ebenfalls zunächst gründlich im Vakuum und anschließend in DMF über Molsieb getrocknet. Die Löslichkeit von **123a** in DMF ist im Vergleich zu Nucleosidmonophosphaten deutlich vermindert. Nach Zugabe von 5-NO_2-*cyclo*Sal-N^6-acetyl-2',3'-*O*AcAMP **66**, ebenfalls gelöst in DMF, wurde das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wurde wie gewohnt aufgearbeitet und entschützt. Die chromatographische Reinigung (RP-18, H_2O) lieferte das gewünschte Diadenosintriphosphat **3** in einer Ausbeute von 58%.

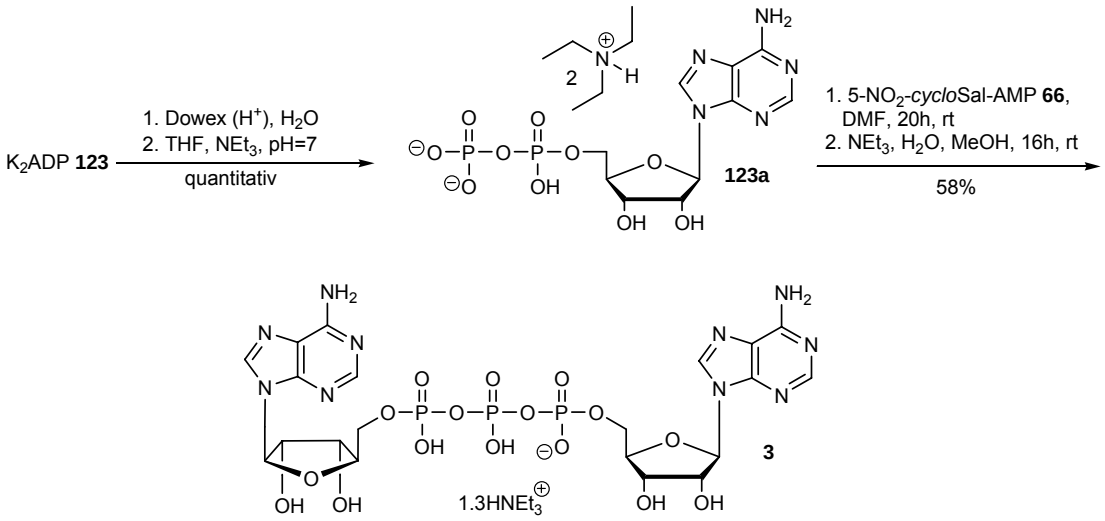


Abbildung 86: Synthese von Ap_3A **3**

Eventuell muss in diesem Fall zur Steigerung der Ausbeute die Reaktionszeit aufgrund der mäßigen Löslichkeit des Nucleophils auf 48 Stunden verlängert werden, da trotz scheinbar vollständiger Reaktion (DC-Kontrolle: DCM/MeOH 9:1) nicht umgesetzter Triester **66** im Zuge der Extraktion zurückgewonnen wurde. Zusätzlich wurde auch hier wieder das unerwünschte Nebenprodukt in Form des „falschen Diesters“ gefunden.
Dennoch ist dieses Ergebnis als sehr erfreulich einzustufen, da es nochmals die breite Anwendbarkeit von *cyclo*Sal-Nucleotiden als aktivierte Phosphatdonatoren zur schnellen und effizienten Synthese unterschiedlicher Biomoleküle unterstreicht.

4.5.5 Analytik und Charakterisierung der dargestellten Dinucleosid-5’,5’-oligophosphate

Natürlich erfolgte auch in diesem Fall eine sorgfältige Analytik und Charakterisierung der dargestellten Dinucleosidoligophosphate. Auch hier wurde der Nachweis über die Reinheit der synthetisierten Dinucleosidoligophosphate und ihren tatsächlichen Erhalt durch eine vollständige NMR-spektroskopische Untersuchung, sowie durch ESI-Massenspektrometrie im Negativmodus erbracht.

Die NMR-spektroskopische Analyse dieser Verbindungsklasse soll exemplarisch für das unsymmetrische Dinucleosiddiphosphat Up_2T **88** sowie für das symmetrische Ap_3A **3** anhand der Abbildungen 87-92 diskutiert werden.

Das Protonenbreitband-entkoppelte ^{31}P-NMR-Spektrum von Uridin-2'-Desoxythymidin-5',5'-dinucleotid **88** weist im charakteristischen Bereich von –11 ppm zwei Dubletts mit einer Kopplungskonstante von je 20 Hz durch vicinale $^{2}J_{PP}$-Kopplung der beiden Phosphoratome auf (Abbildung 87). Eine genaue Zuordnung der P-Atome sollte theoretisch durch Aufnahme eines ^{31}P-^{1}H-Korrelationsspektrums möglich sein. Praktisch würde die Auswertung dieses Experimentes jedoch durch den geringen Unterschied der chemischen Verschiebungen der jeweiligen 5'-Protonen von Uridin beziehungsweise 2'-Desoxythymidin erheblich erschwert, weshalb auf eine genaue Zuordnung der beiden Dubletts verzichtet wurde.

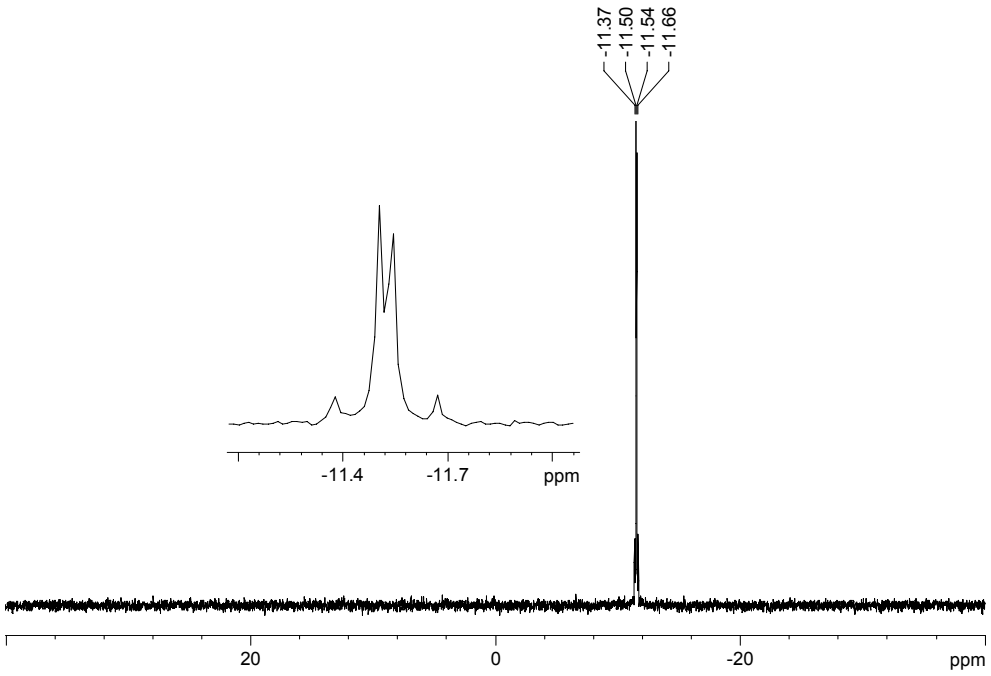


Abbildung 87: ^{31}P-NMR-Spektrum (D_2O, 162 MHz) von Up_2T **88**

Das ^{1}H-NMR-Spektrum dieser Verbindung besteht in D_2O aus einem Signalsatz mit acht Protonen, die Uridin zugeordnet werden können, sowie einem Signalsatz mit 11 Protonen des 2'-Desoxythymidins, im Verhältnis von 1:1 (Abbildung 88).

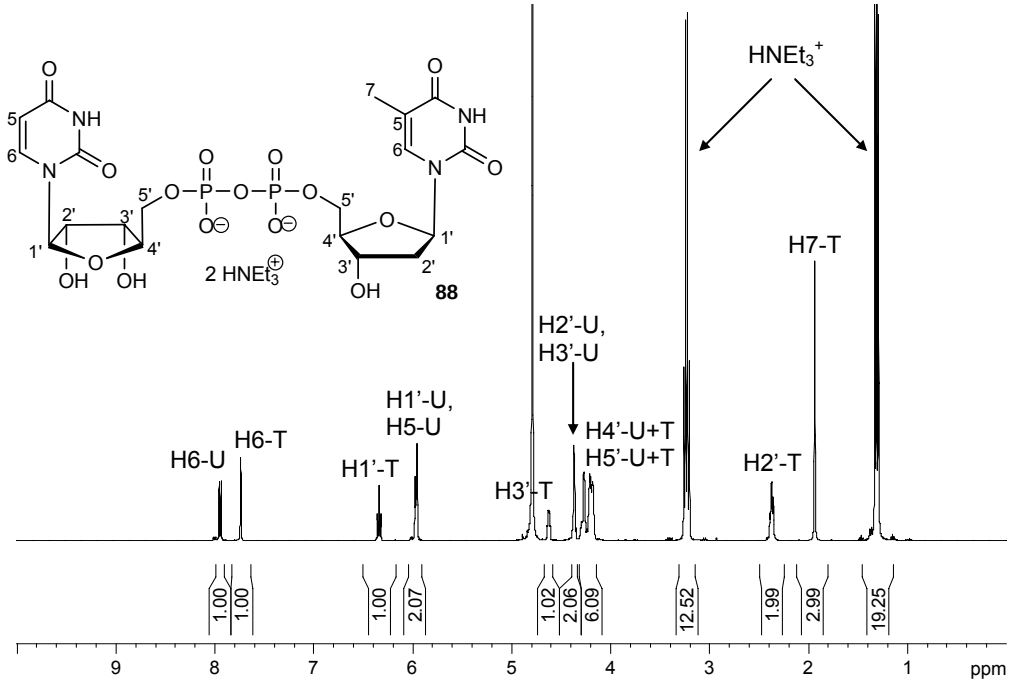


Abbildung 88: ^{1}H-NMR-Spektrum (D_2O, 400 MHz) von Up_2T **88**

Das ^{13}C-NMR-Spektrum weist ebenfalls die typischen Dubletts für die Kohlenstoffatome 4' und 5' beider flankierender Nucleoside durch die $^{3}J_{CP}$ (C4') bzw. $^{2}J_{CP}$-Kopplungen (C5') mit den Phosphoratomen auf (Abbildung 89).

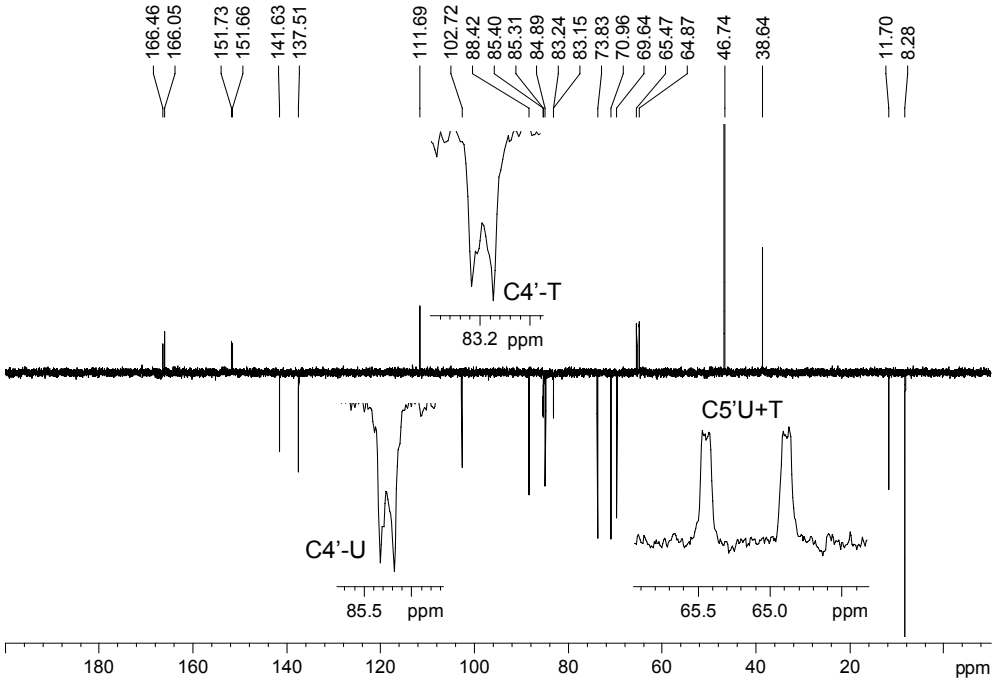


Abbildung 89: ^{13}C-NMR-Spektrum (D_2O, 101 MHz) von Up_2T **88**

Das Protonenbreitband-entkoppelte ^{31}P-NMR-Spektrum von Ap_3A **3** besteht aufgrund der Symmetrie des Moleküls lediglich aus zwei Signalen, die in einem Verhältnis von 2:1 zueinander stehen (Abbildung 90). Die beiden α-Phosphoratome erzeugen durch $^2J_{PP}$-Kopplung ein Dublett bei -11 ppm mit einem Integral von zwei, das P_β-Atom erzeugt ein Triplett bei -23 ppm und besitzt ein Integral von eins.

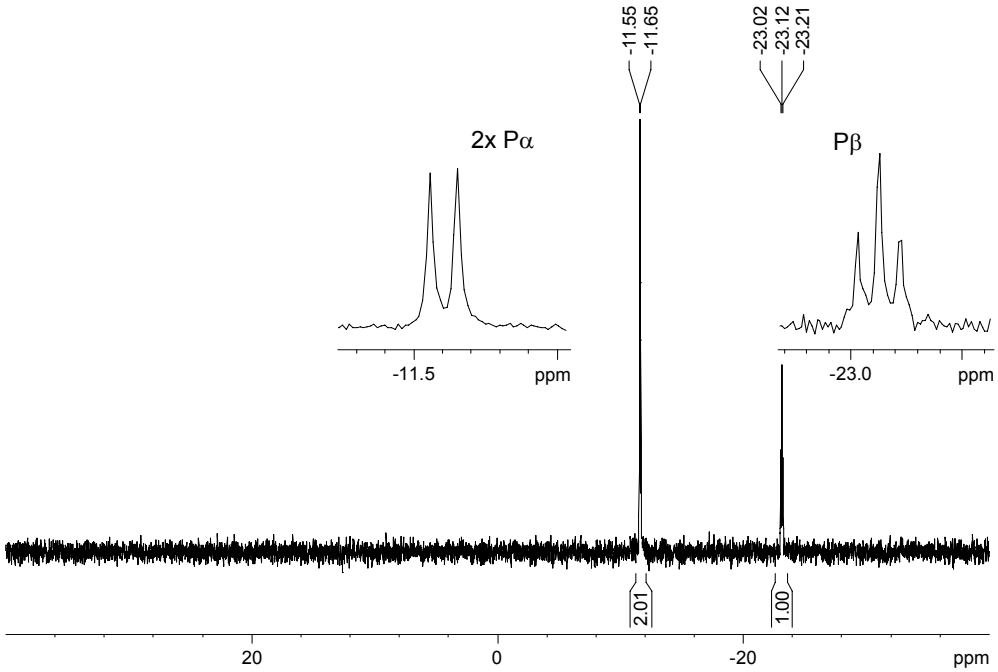


Abbildung 90: ^{31}P-NMR-Spektrum (D_2O, 162 MHz) von Ap_3A **3**

Das ^{1}H-NMR liefert ebenfalls aufgrund der Symmetrie der Verbindung **3** in D_2O einen übersichtlichen Signalsatz bestehend aus zweimal acht nucleosidischen Protonen sowie den Absorptionen der Triethylammoniumionen.

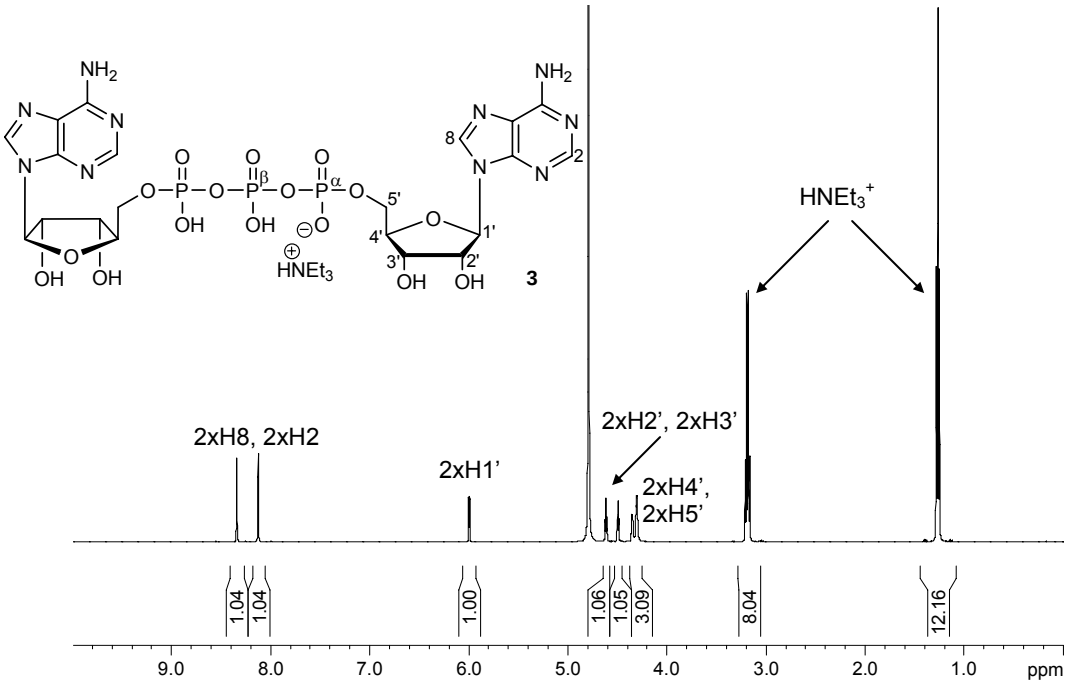


Abbildung 91: ^{1}H-NMR-Spektrum (D_2O, 400 MHz) von Ap_3A **3**

Im ^{13}C-NMR-Spektrum von Verbindung **3** sind die typischen Dubletts für die 4'- und 5'-Kohlenstoffatome der Ribose, die aus der Kopplung zum Phosphoratom resultieren, ebenfalls deutlich erkennbar.

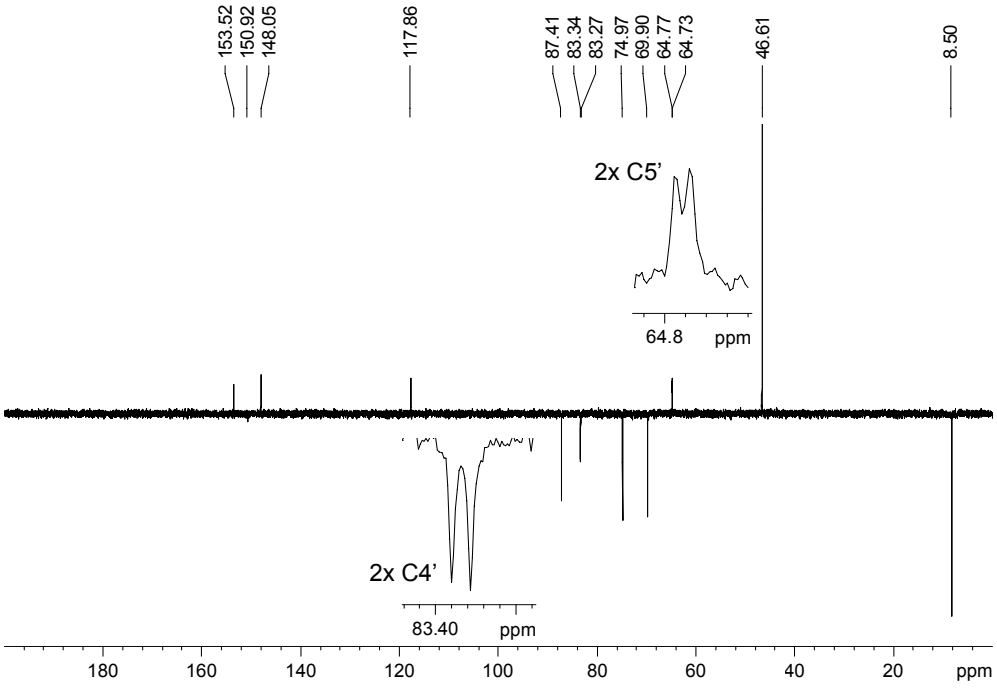


Abbildung 92: ^{13}C-NMR-Spektrum (D_2O, 101 MHz) von Ap_3A **3**

Die massenspektrometrische Analyse der synthetisierten Verbindungen lieferte auch in diesem Fall durchweg gut auswertbare Spektren, die neben den charakteristischen einfach geladenen Molekülpeaks keine oder nur solche Signale zeigten, die einem Bruch der Phosphatverbrückung im ESI-Massenspektrometer entsprachen.

4.6 Darstellung von Nucleosidmonophosphatpyranosen

Nachdem es in der Arbeitsgruppe gelungen ist, eine hoch effiziente Syntheseroute zur Darstellung unterschiedlichster Nucleosiddiphosphatpyranosen zu etablieren,[97,98] war es von großem Interesse, unsere Methode auch auf die Synthese von Nucleosidmonophosphat-Glycosiden zu übertragen.

Das den *cyclo*Sal-Phosphattriester angreifende Nucleophil stellt in diesem Fall ein Glycopyranosyl-1-oxid dar (Weg b, Abb. 93); zur Synthese der entsprechenden NDP-Pyranosen werden, wie bereits erwähnt, Glycopyranosyl-1-phosphate eingesetzt (Weg a, Abb. 93).

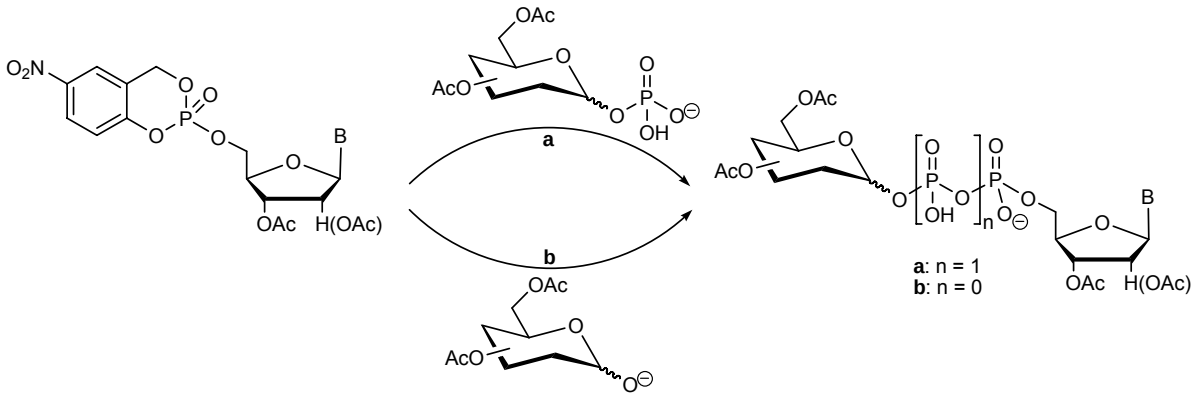


Abbildung 93: Synthese von NMP- und NDP-Pyranosen aus *cyclo*Sal-NMPs

Damit einhergehend schließt sich ein zweiter Unterschied an, der die Kontrolle der Stereochemie der Produkte am anomeren Zentrum betrifft: Durch den Einsatz anomerenreiner Glycopyranosyl-1-phosphate werden die resultierenden NDP-Pyranosen ebenfalls gezielt als reine Anomere erhalten, da die Reaktion mit dem *cyclo*Sal-Nucleotid nicht am anomeren Zentrum erfolgt und unter den gegebenen Reaktionsbedingungen keine Anomerisierung der Zuckerphosphate auftritt.

Im Fall der NMP-Pyranosen ist eine Kontrolle der Stereochemie am anomeren Zentrum erheblich schwieriger, da die zur Aktivierung der anomeren Hydroxygruppe notwendige Deprotonierung eine Anomerisierung zur Folge hat.

Diesbezüglich existieren intensive Arbeiten von *R. R. Schmidt et al.*, in denen die Addition von Glycosylanionen an elektronenarme Nitrile untersucht wurde. (Trichloracetimidatmethode).[161] Eine detaillierte Analyse zeigte, dass die nach der Deprotonierung generierten α– und β-konfigurierten Oxide **124** und **125** im Fall von Gluco-, Galacto- und Mannopyranosen erhebliche Reaktivitätsunterschiede aufweisen. Das β-Oxid besitzt eine deutlich höhere Nucleophilie, die, wenn man von einer überwiegenden $^4C_1$-Konformation ausgeht, durch einen sterischen Effekt in Verbindung mit einem stereoelektronischen Effekt erklärt werden kann, welcher auf der Abstoßung freier Elektronenpaare oder auf Dipoleffekten beruht (Abbildung 94).[162-164] Da dieser Effekt die gleiche Ursache hat wie der thermodynamisch wirksame anomere Effekt, soll er im Folgenden als „kinetischer anomerer Effekt“ bezeichnet werden.

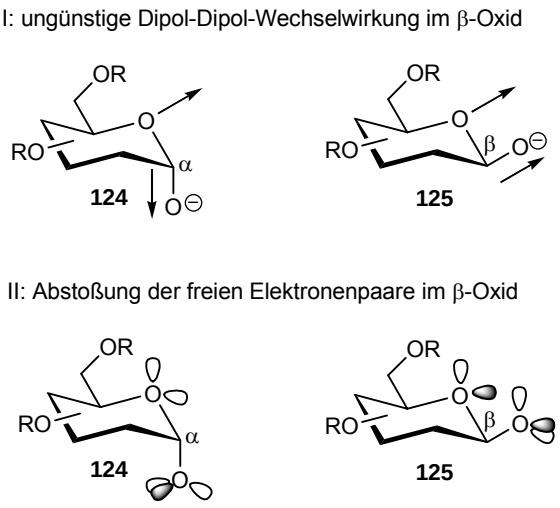


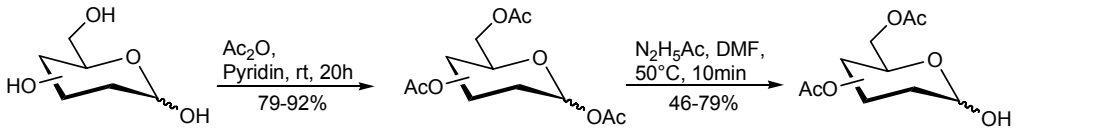
Abbildung 94: Begründung für die erhöhte Nucleophilie des β-Oxids **125**

Dieser kinetische anomere Effekt wird ebenfalls einen maßgeblichen Einfluss auf das α/β-Verhältnis der resultierenden Nucleosidmonophosphatpyranosen haben. Die Problematik der Stereokontrolle wird in Abschnitt 4.6.2 erneut aufgegriffen und diskutiert. An dieser Stelle soll jedoch zunächst mit der Synthese der geschützten Glycosylpyranosen **132**-**134** fortgefahren werden, die als Nucleophile in ersten Modelreaktionen fungieren. Im Folgenden sollen die gewonnenen Erkenntnisse auf die Synthese von CMP-Neu5Ac **8** übertragen werden.

4.6.1 Synthese der 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-glycoside 132-134

Da bei Verwendung eines multifunktionalen Nucleophils, wie beispielsweise D-Glucose, der nucleophile Angriff auf das Phosphoratom eines *cyclo*Sal-Triesters von verschiedenen Hydroxygruppen erfolgen kann, wurden für eine regioselektive Umsetzung alle nicht an der Reaktion beteiligten OH-Gruppen blockiert. Für diese Arbeit sollte die Bindung des Zuckers an das Nucleotid lediglich über die anomere OH-Gruppe erfolgen, da die in diesem Zusammenhang erzielten Ergebnisse Vorarbeiten für die Synthese des bedeutenden Glycosyldonors CMP-Neu5Ac darstellen, bei dem die Phosphatverbrückung von der anomeren Hydroxygruppe des Zuckers ausgeht. Aufgrund der hohen Kosten von *N*-Acetyl-Neuraminsäure sollten erste Umsetzungen dieser Art an verschiedenen Modellsystemen erprobt werden. Als Zuckerkomponenten wurden zu diesem Zweck D-Glucose **126**, D-Mannose **127** sowie D-Galactose **128** ausgewählt.

Um auf der Stufe der NMP-Pyranosen alle Schutzgruppen in einem Schritt abspalten zu können, wurden die entsprechenden OH-Gruppen der Zucker **126**-**128** ebenfalls als Acetester blockiert. Hierzu wurden D-Glucose **126**, D-Mannose **127** sowie D-Galactose **128** mit Essigsäureanhydrid in Pyridin zunächst peracetyliert[165] und im Anschluss selektiv am anomeren Zentrum durch Aminolyse mit Hydraziniumacetat wieder entschützt.[166]



126: D-Glucose
127: D-Mannose
128: D-Galactose

129: D-Glucose α/β= 2:1
130: D-Mannose α/β= 3:1
131: D-Galactose α/β= 5:1

132: D-Glucose α/β= 3:1
133: D-Mannose α-anomerenrein
134: D-Galactose α/β= 3:1

Abbildung 95: Synthese der 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetylierten Zucker **132-134**

Da die durchgeführten Reaktionen zur Synthese der tetraacetylierten Pyranosen **132**-**134** bereits erprobt waren, verliefen die Umsetzungen alle problemlos und mit zufriedenstellenden Ausbeuten, so dass mit der Darstellung der NMP-Glycosylpyranosen begonnen werden konnte.

4.6.2 Synthese der Nucleosidmonophosphatpyranosen 135-138

Auch in diesem Fall wurden erste Ansätze zunächst mit 5-NO_2-*cyclo*Sal-3'-*O*-acetyl-dTMP **69** als Phosphataktivester durchgeführt, da sich 2'-Desoxythymidin **54** als Nucleosidkomponente bereits für die Synthese anderer Modelverbindungen bewährt hatte. Als Nucleophil diente 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-glucose **132** (4.0 Äquivalente), Kaliumcarbonat (4.0 Äquivalente) wurde als Base verwendet. Die Reaktion erfolgte in wasserfreiem Dichlormethan bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 48 Stunden (Abbildung 96). Zuvor wurden sämtliche Feuchtigkeitsreste durch gründliches Trocknen der an der Reaktion beteiligten Ausgangsverbindungen und Reagenzien im Vakuum entfernt.

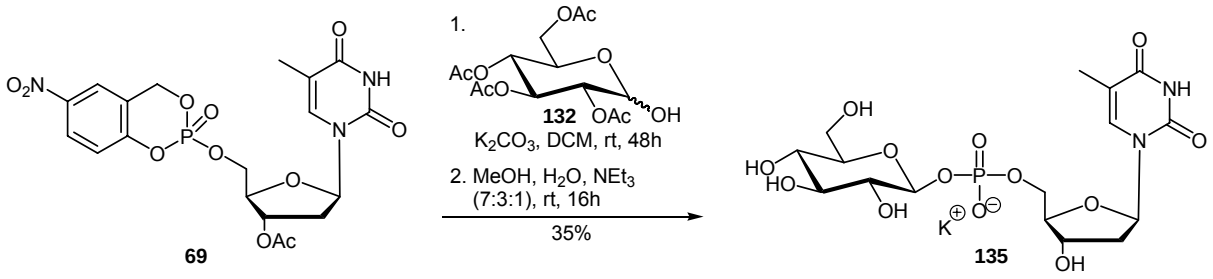


Abbildung 96: Synthese von β-D-Glucose-2'-desoxythymidinmonophosphat **135**

Nach vollständiger Umsetzung des Triesters **69** (DC-Kontrolle DCM/MeOH 19:1) konnte der im Überschuss eingesetzte Zucker **132** durch Extraktion des Reaktionsgemisches mit Dichlormethan und Wasser problemlos entfernt und größtenteils reisoliert werden. Die wässrige Phase wurde gefriergetrocknet und das erhaltene Rohprodukt direkt mit einem Gemisch aus Methanol, Wasser und Triethylamin (7:3:1 v/v) entschützt,[167] da die peracetylierten Rohprodukte erfahrungsgemäß ein schwieriges chromatographisches Verhalten aufweisen.[118] Im Fall der NDP-Pyranosen waren die geschützten Rohprodukte zu unpolar für eine Reinigung an einer RP-18-Phase, jedoch noch zu polar für eine Chromatographie an herkömmlichem Silicagel. Die Abspaltung der Acetylschutzgruppen verlief bei Raumtemperatur über Nacht.

Nach erneuter Gefriertrocknung erfolgte die Reinigung in einer Glassäule unter Normaldruck (RP-18, H_2O). Erfreulicherweise konnte das gewünschte Produkt **135** tatsächlich auf diesem Weg in reiner Form isoliert werden. Die Ausbeute war mit 35% für einen ersten Versuch zunächst einmal zufriedenstellend.

Aufgrund der langen Reaktionszeit von zwei Tagen wurde die Umsetzung mit Natriumhydrid, einer deutlich stärkeren Base, wiederholt. Erneut wurden alle an der Reaktion beteiligten Edukte und Reagenzien in absolutem Dichlormethan gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. In diesem Fall war der eingesetzte Triester **69** laut dünnschichtchromatographischer Kontrolle (DCM/MeOH 19:1) bereits nach einer Stunde vollständig umgesetzt. Die Reaktion wurde wie zuvor beschrieben aufgearbeitet und das gewünschte Zuckernucleotid **135** nach Chromatographie (RP-18, H_2O) nun in einer Ausbeute von 55% erhalten.

Daraufhin wurde die Konfiguration der glycosidischen Bindung im Produkt **135** für beide Ansätze anhand des ^{1}H-NMR-Spektrums bestimmt. Gemäß der Karplus-Beziehung ergibt sich für das α-Anomer mit einem Diederwinkel von 60°, d.h. einer *cis-trans*-Stellung von H-1 und H-2, eine Kopplungskonstante von $^3J_{1,2}$ ~ 3.5 Hz. β-Glycoside hingegen zeigen bei einem Diederwinkel von 180°, der einer trans-trans-Stellung von H-1 und H-2 entspricht, eine Kopplungskonstante von $^3J_{1,2}$ ~ 8.0 Hz.
Zudem muss noch die vicinale ^3J-Kopplung von H-1 mit dem Phosphorkern berücksichtigt werden. Diese liegt im Allgemeinem in einer Größenordnung von $^3J_{H1,P}$ ~ 6.5 – 8.0 Hz, weshalb man für das anomere Proton im Fall eines β-konfigurierten Zuckernucleotides im ^{1}H-NMR-Spektrum ein Triplett erwartet und im Fall des entsprechenden α-Anomers ein dd-Signal.
Unabhängig von der Stärke der eingesetzten Base wurde in beiden durchgeführten Reaktionen das Produkt **135** als reines β-Anomer erhalten. Dieses Ergebnis hängt, wie in Abschnitt 4.6.1 bereits beschrieben, mit den erheblichen Reaktivitätsunterschieden der initial gebildeten Glycopyranosyl-1-oxide **124**, **125** zusammen.
Scheinbar reagiert tatsächlich ausnahmslos das nucleophilere β-Oxid **125** mit dem *cyclo*Sal-Triester zum kinetisch kontrollierten Produkt. Da die vorliegende Umsetzung keine Gleichgewichtsreaktion darstellt, findet auch nachträglich keine Anomerisierung zum thermodynamisch stabileren α-konfigurierten Zuckernucleotid statt. In Abbildung 97 ist dieser Zusammenhang noch einmal dargestellt.

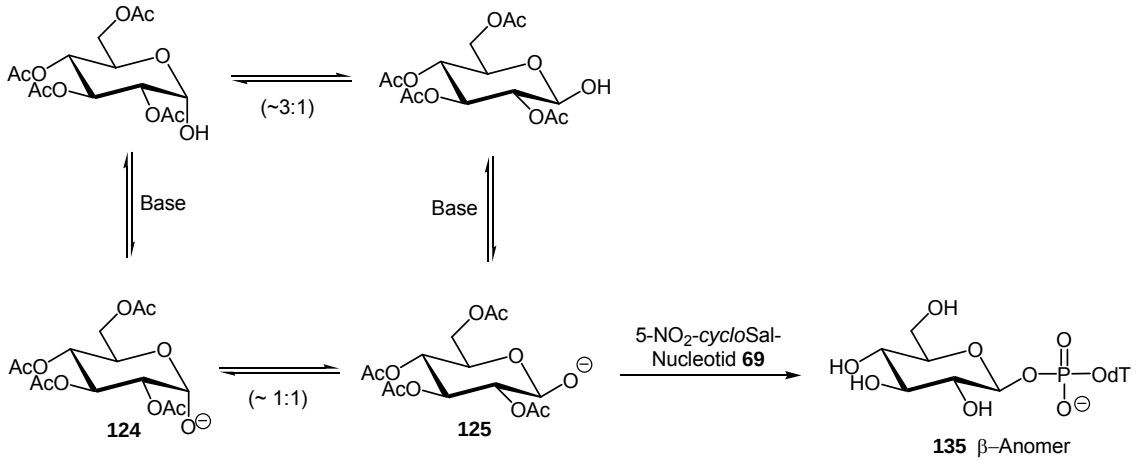
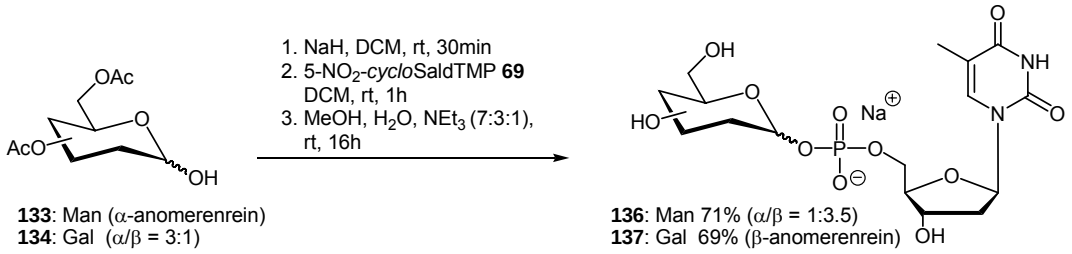


Abbildung 97: Begründung für die β-Präferenz im resultierenden NMP-Zucker

Die entsprechende Umsetzung der Oxide **124**, **125** mit Trichloracetonitril stellt im Gegensatz dazu eine Gleichgewichtsreaktion dar, weshalb sich in diesem Fall, je nach eingesetzter Base, die Stereochemie am anomeren Zentrum der Additionsprodukte kontrollieren lässt.[161] Auch hier unterliegt das reaktivere β-Oxid einer schnelleren Addition an das Nitrilsystem, wodurch zunächst ebenfalls primär das entsprechende β-konfigurierte Produkt (Glycosyl-Trichloracetimidat) erhalten wird, welches dann jedoch in einer langsamen basenkatalysierten Reaktion zum thermodynamisch stabileren α-Produkt anomerisiert. Durch den Einsatz einer schwächeren Base, wie beispielsweise Kaliumcarbonat, wird hingegen nur die Bildung des β-Glycosyl-Trichloracetimidates erreicht, ohne die Rückreaktion und damit die Anomerisierungsreaktion zu ermöglichen. Man erhält folglich das β-Produkt in einer kinetisch kontrollierten Reaktion.
Die sogenannte Trichloracetimidat-Methode nutzt das hohe Glycosylierungspotential dieser stabilen, stereokontrolliert zugänglichen *O*-Glycosyl-Trichloracetimidate und stellt eine der bedeutsamsten Glycosylierungsmethoden zur Oligosaccharidsynthese dar.

Aufgrund der bei *cyclo*Sal-Nucleotiden vorliegenden Irreversibilität der Reaktion und dem damit nicht vorhandenen Einfluss der Basenstärke auf die Stereochemie des Produkts, sowie einer deutlich kürzeren Reaktionszeit und einer höheren Ausbeute wurden zukünftige Umsetzungen dieser Art ausschließlich mit Natriumhydrid als Base durchgeführt.

Eine Steigerung der Ausbeute gelang im Folgenden durch eine Änderung der Reaktionsführung: Dafür wurde der Zucker **132** zunächst mit Natriumhydrid (je 5.0 Äquivalente) in Dichlormethan vorgelegt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Erst daraufhin erfolgte eine langsame Zugabe des in Dichlormethan gelösten *cyclo*Sal-Triesters **69**, der wiederum innerhalb einer Stunde vollständig umgesetzt wurde (DC-Kontrolle). Nach wässriger Aufarbeitung, basischer Abspaltung der Acetylgruppen sowie chromatographischer Reinigung des Rohgemisches (RP-18, H_2O) wurde β-D-Glucose-2'-desoxythymidinmonophosphat **135** diesmal in einer sehr guten Ausbeute von 80% erhalten. Dieses erfreuliche Ergebnis kann unter anderem dadurch erklärt werden, dass die vorliegende Umsetzung im Vergleich zu den unter 4.4 und 4.5 durchgeführten Reaktionen zwei wesentliche Vorteile aufweist: Zum einen lässt sich das hier verwendete Nucleophil (tetraacetylierte Pyranose) problemlos und nahezu quantitativ durch einfache Extraktion von dem gewünschten Zuckernucleotid abtrennen. Dies erleichtert die anschließende Reinigung der Produkte ungemein, so dass in den meisten Fällen eine einzige Chromatographie zur Isolierung der sauberen Produkte ausreichte. Zum anderen entfällt eine zusätzliche Ionenaustauschchromatographie aufgrund der Verwendung von Natriumhydrid als Base während der Reaktion, wodurch die erhaltenen Rohprodukte bereits als Natriumsalze anfallen und direkt chromatographiert werden können.
Im Folgenden wurden die Tetraacetate von D-Mannose **133** und D-Galactose **134** unter analogen Reaktionsbedingungen mit dem 5-Nitro-*cyclo*Sal-Triester von 2'-Desoxythymidin **69** umgesetzt (Abbildung 98).



133: Man (α-anomerenrein)
134: Gal (α/β = 3:1)

136: Man 71% (α/β = 1:3.5)
137: Gal 69% (β-anomerenrein)

Abbildung 98: Synthese der TMP-Pyranosen **136** und **137**

In beiden Fällen war die Umsetzung des Triesters **69** ebenfalls innerhalb einer Stunde abgeschlossen. Die Ansätze wurden wie zuvor beschrieben aufgearbeitet, entschützt und chromatographiert. Auch hier reichte jeweils eine Trennung aus, um die reinen Produkte **136** und **137** zu isolieren. Das Galactosederivat **137** wurde in

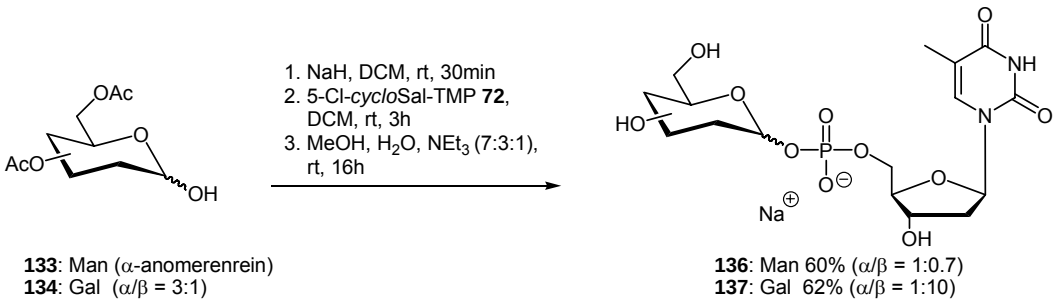
einer zufriedenstellenden Ausbeute von 69% erhalten, ebenfalls aufgrund des beschriebenen Effekts als reines β-Anomer. Die Ausbeute von D-Mannose-2'-desoxythymidinmonophosphat **136** lag mit 71% in derselben Größenordnung, allerdings wurde das Produkt **136** in diesem Fall als Gemisch beider Anomere im Verhältnis von α/β = 1:3.5 erhalten. Aufgrund der axialen Stellung der OH-Gruppe an C-2 bei Mannose wird hier der thermodynamische anomere Effekt, der für die Stabilisierung des α-Anomers verantwortlich ist, noch verstärkt. Dennoch überwiegt in den Mannopyranosyl-1-oxiden der beschriebene kinetische anomere Effekt, so dass trotz sterischer Hinderungen zwar nicht mehr ausschließlich, aber bevorzugt β-Mannopyransyl-Nucleosidmonophosphate gebildet werden.

Dieses Ergebnis ist sehr interessant, da aus den oben genannten Gründen die chemische Synthese von β-D-mannosidischen Bindungen bis heute eine fordernde Aufgabe der organischen Synthesechemie darstellt. Lange Zeit bestand der einzige Weg zur Darstellung von β-D-Mannopyranosiden in der Aktivierung von α-D-Mannopyranosylhalogeniden mit unlöslichen Silberkatalysatoren, wie Silbersilicat.[168-172] Nachteilig bei dieser Variante der klassischen „Königs-Knorr-Reaktion" ist jedoch die schwankende Stereoselektivität beim Einsatz von unlöslichen Silberkatalysatoren.

Durch die Schwierigkeiten einer direkten Synthese von β-D-Mannopyranosiden wurden eine Reihe von indirekten Methoden entwickelt, wie die „Oxidation-Reduktion" an C2,[173-179] die Inversion an C2,[180-182] die anomere Alkylierung[183,184] und das „Intramolecular-Aglycon-Delivery"-Konzept.[185-189] Bei letzterem wird der Acceptor über eine labile Brücke (Siloxan oder Acetal) an die C2-Position des α-D-Mannopyranosyl-Donors vorverbrückt und anschließend selektiv von „oben" glycosyliert.

Die erhaltenen Anomere von TMP-Mannose **136** konnten nicht vollständig durch Umkehrphasenchromatographie von einander getrennt werden. Eine Anreicherung der einzelnen Anomere gelang jedoch teilweise durch eine zweite Trennung. In diesem Zusammenhang erscheint es wichtig zu erwähnen, dass beispielweise Glycosyltransferasen als Substrat lediglich das richtige Anomer akzeptieren und durch die Anwesenheit des anderen Anomers nicht merklich inhibiert werden.[190]

Weitere Erkenntnisse über den stereochemischen Verlauf dieser Reaktion wurden durch Umsetzung der Glycopyranosyltetraacetate von Mannose **133** und Galactose **134** mit 5-Chlor-*cyclo*Sal-3'-*O*-acetyl-2'-desoxythymidinmonophosphat **72** gewonnen.



133: Man (α-anomerenrein)
134: Gal (α/β = 3:1)

136: Man 60% (α/β = 1:0.7)
137: Gal 62% (α/β = 1:10)

Abbildung 99: Synthese der TMP-Pyranosen **136** und **137** ausgehend von 5-Chlor-*cyclo*Sal-3'-*O*AcdTMP **72**

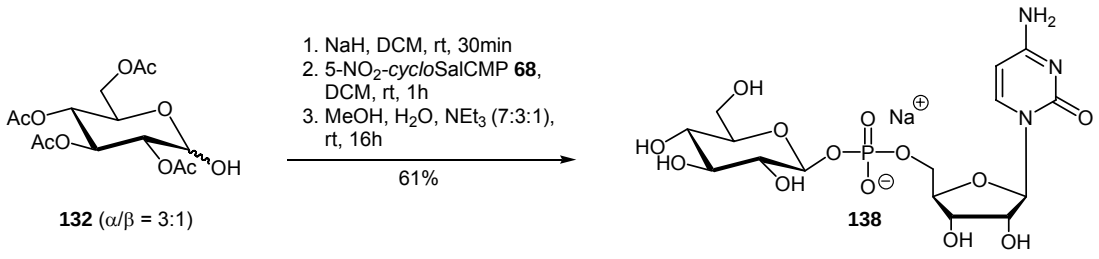
Aufgrund des schwächeren Acceptors in der 5-Position des aromatischen Ringes weist dieser Triester eine im Vergleich zur entsprechenden Nitroverbindung höhere Stabilität und damit eine verminderte Reaktivität auf. Die Durchführung der Reaktionen mit dem Chlor-substituierten Triester **72** erfolgte analog zu denen mit der entsprechenden Nitro-Verbindung, jedoch war die Dauer bis zur vollständigen Umsetzung des 5-Chlor-*cyclo*Sal-Nucleotids **72** in beiden Fällen mit drei Stunden geringfügig länger. Die erzielten Ausbeuten waren mit durchschnittlich 60% nach wie vor gut, allerdings wurde TMP-Mannose **136** dieses Mal in einem Anomerenverhältnis von α/β = 1 : 0.7 erhalten und auch das entsprechende Galactose-Derivat **137** wurde als ein Gemisch beider Anomere in einem Verhältnis von α/β = 1 : 10 isoliert.

Dieses Ergebnis lässt folgenden Schluss zu: Verläuft die Reaktion der Pyranosyl-1-oxide mit dem *cyclo*Sal-Triester, in Folge einer herabgesetzten Elektrophilie des Phosphoratoms, etwas langsamer, scheint der Einfluss des thermodynamischen anomeren Effektes wieder zuzunehmen und somit auch der Anteil des thermodynamisch stabileren α-Anomers. Im Fall von Mannose stellt das α-Anomer dadurch bereits wieder das Hauptdiastereomer dar.

Die gleiche Tendenz wurde bei der Verwendung einer sterisch anspruchsvolleren Base, wie DBU, anstelle von Natriumhydrid beobachtet. So führte die Reaktion von Tetraacetylglucose **132** mit dem reaktiven 5-NO_2-*cyclo*Sal-2'-desoxythymidin-

monophosphat **69** und DBU als Base unter ansonsten analogen Reaktionsbedingungen ebenfalls zur Entstehung eines Anomerengemisches im resultierenden Produkt **135** von α/β = 1 : 2.5. Trotz schnellem Ablauf der Reaktion (1h) scheint das ohnehin schon stärker sterisch gehinderte β-Pyranosyloxid durch das sperrige Kation erheblich an Reaktivität einzubüßen, so dass der Angriff auf den Triester unter diesen Bedingungen auch vom stabileren α-Oxid erfolgen kann. Die Ausbeute dieser Umsetzung war im Vergleich zu den Ansätzen, in denen NaH als Base diente, geringer, da sich die Reinigung des Produktes aufgrund der lipophileren Gegenionen als vergleichsweise schwierig heraus stellte. Dieses Problem könnte jedoch mit einem vorherigen Ionenaustausch umgangen werden.
Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass die gewünschten Glycopyranosyl-Nucleosidmonophosphate auf diesem Weg in beiden anomeren Konfigurationen zugänglich sind. Ein Verschieben des Gleichgewichtes zugunsten des kinetisch benachteiligten α-Anomers kann sowohl durch eine Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit, durch Verwendung eines schwächer aktivierten *cyclo*Sal-Triesters, als auch durch den Einsatz einer sterisch anspruchsvolleren, starken Base, erfolgen.

Da die durchgeführten Umsetzungen, wie bereits erwähnt, Testreaktionen zur Darstellung von CMP-*N*-acetylneuraminsäure **8** darstellen, sollte außerdem als letzte Modellverbindung Cytidinmonophosphat-D-glucose **138** synthetisiert werden. Hierzu wurde 5-NO_2-*cyclo*Sal-N^4,2',3'-triacetylcytidinmonophosphat **68** mit jeweils 5.0 Äquivalenten Tetraacetylglucose **132** und Natriumhydrid in wasserfreiem Dichlormethan unter den optimierten Reaktionsbedingungen umgesetzt.



132 (α/β = 3:1) **138**

Abbildung 100: Synthese von β-D-Glucose-cytidinmonophosphat **138**

Die gewünschte CMP-Glucopyranose **138** wurde nach wässriger Aufarbeitung, basischer Abspaltung der Schutzgruppen und Chromatographie an RP-18-Silicagel

ebenfalls in einer zufriedenstellenden Ausbeute von 61%, wie bereits erwartet, als reines β-Anomer erhalten.

4.6.3 Analytik und Charakterisierung der dargestellten NMP-Pyranosen

Wieder wurde die Abwesenheit von Verunreinigungen durch eine sorgfältige Analytik der synthetisierten Verbindungen belegt. Um nachzuweisen, dass es sich tatsächlich um Nucleosidmonophosphatpyranosen handelt, wurden auch hier ESI-MS-Experimente im Negativmodus durchgeführt, die in allen Fällen lediglich die charakteristischen einfach geladenen Molekülpeaks aufwiesen.
Die Abbildungen 101-103 zeigen exemplarisch den vollständigen NMR-Spektrensatz von β-D-Galactosyl-2'-desoxythymidinmonophosphat **137**.
Im Protonenbreitband-entkoppelten ^{31}P-NMR-Spektrum zeigen NMP-Pyranosen ein Signal in Form eines Singuletts im charakteristischen Bereich von –2 ppm.

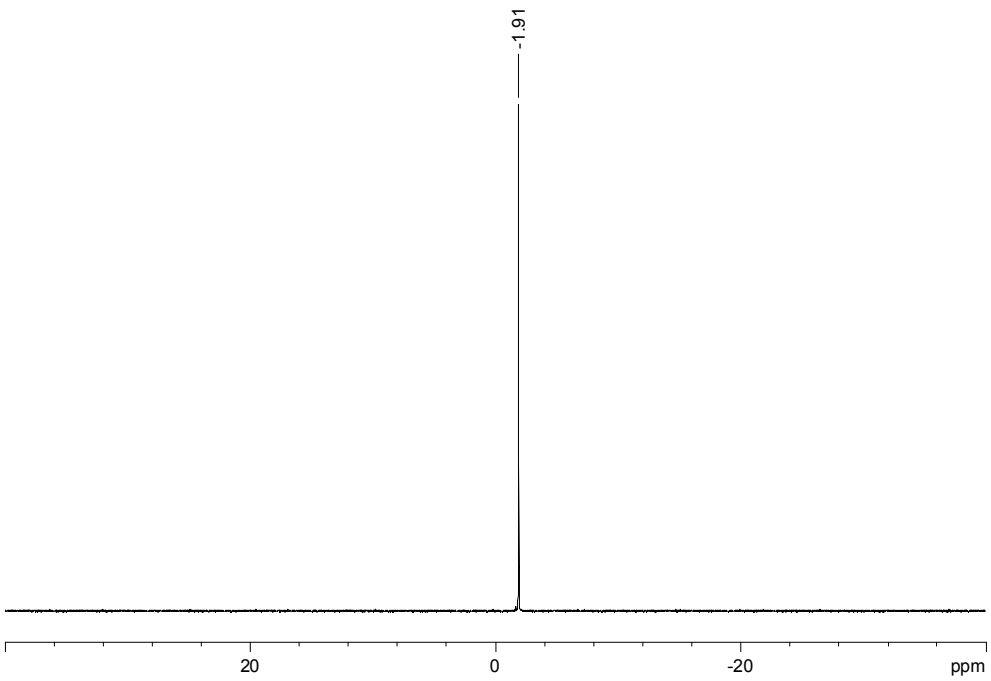


Abbildung 101: ^{31}P-NMR-Spektrum (D_2O, 162 MHz) von TMP-β-D-Galactose **137**

Das ^{1}H-NMR-Spektrum dieser Verbindung liefert in D_2O einen Signalsatz mit sieben Protonen, die zur β-D-Galactose gehören sowie einem Signalsatz aus 11 Protonen des 2'-Desoxythymidins (Abbildung 102). Die nicht zu beobachtende Signalsatzverdoppelung bestätigt die Anomerenreinheit der Verbindung. Zudem wird

die β-Konfiguration der D-Galactose durch eine Kopplungskonstante von $^3J_{HP}$ = 7.8 Hz belegt.

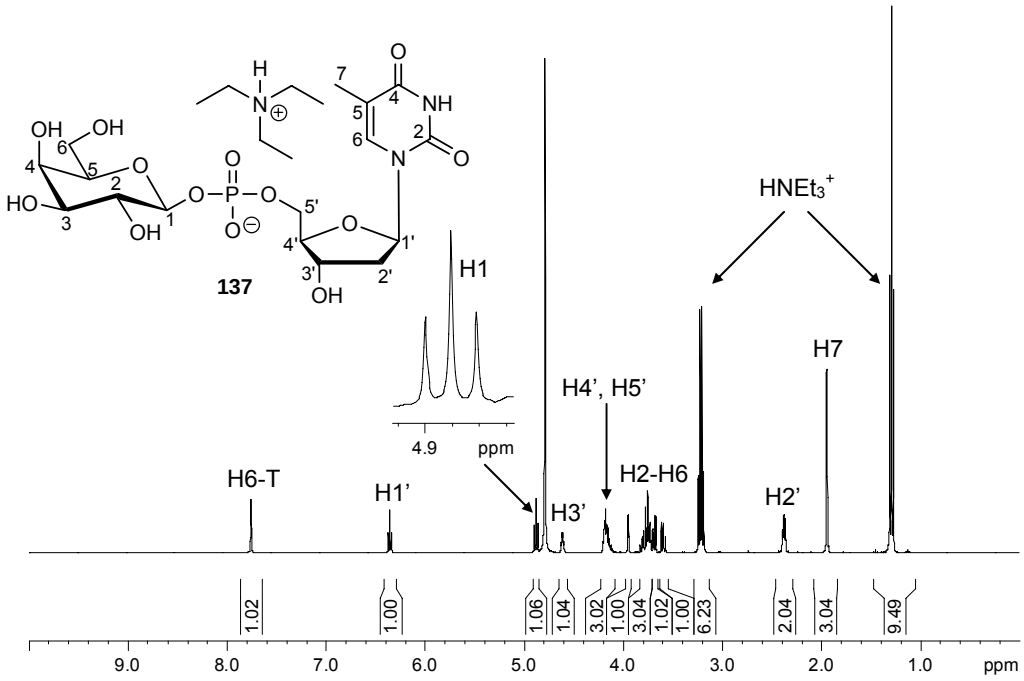


Abbildung 102: ^{1}H-NMR-Spektrum (D_2O, 400 MHz) von TMP-β-D-Galactose **137**

Im ^{13}C-NMR-Spektrum sind die typischen Dubletts zu erkennen, die sich aus den jeweiligen geminalen und vicinalen Kopplungen der Kohlenstoffatome des Zuckers (C1 und C2) sowie des Nucleosids (C4' und C5') mit dem Phosphoratom ergeben.

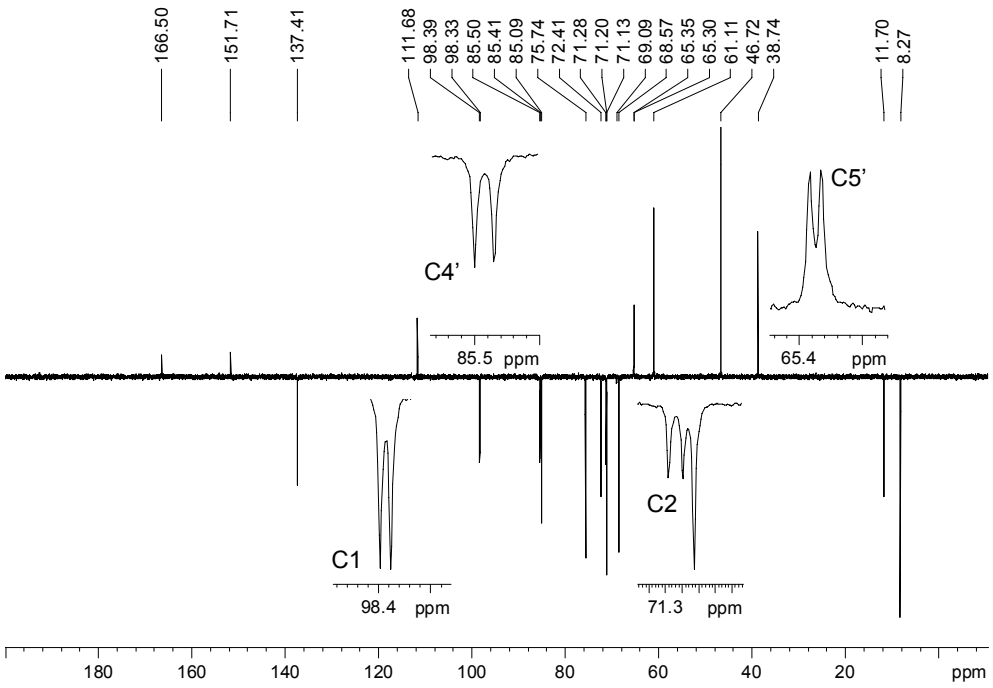


Abbildung 103: ^{13}C-NMR-Spektrum (D_2O, 101 MHz) von TMP-β-D-Galactose **137**

Damit bestand ausreichend Erfahrung in Bezug auf Synthese, Aufarbeitung und Reinigung von Nucleosidmonophosphatglycopyranosen, um sich der Darstellung von CMP-*N*-acetylneuraminsäure zu zuwenden.

4.6.4 Synthese von *N*-Acetylneuraminsäure-Nucleotiden

N-Acetyl-neuraminsäure **6** und ihre Derivate weisen aufgrund der strukturellen Besonderheit im Vergleich zu einfacheren Zuckern auch ein abweichendes chemisches Verhalten sowie Unterschiede bezüglich ihrer Stabilität auf.
Die Abwesenheit jeglicher dirigierender Gruppen am benachbarten Kohlenstoffatom des anomeren Zentrums beispielsweise erschwert eine stereoselektive Glycosylierung.[191,192] Zum anderen setzt die benachbarte, elektronenziehende und voluminöse Carboxylgruppe die Reaktivität der anomeren OH-Gruppe herab.

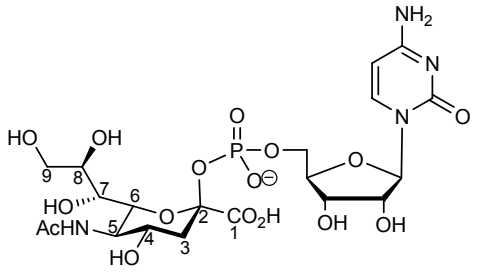


Abbildung 104: CMP-Neu5Ac **8**

Für eine regioselektive Reaktion der Hydroxygruppe an C2 mit dem *cyclo*Sal-Nucleotid und zur Verbesserung der Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln wurden alle nicht an der Umsetzung beteiligten reaktiven Positionen von *N*-Acetylneuraminsäure **6** ebenfalls zunächst blockiert.

Alle in diesem Zusammenhang durchgeführten Reaktionen sind literaturbekannt und verliefen daher ohne nennenswerte Probleme und mit zufriedenstellenden Ausbeuten.

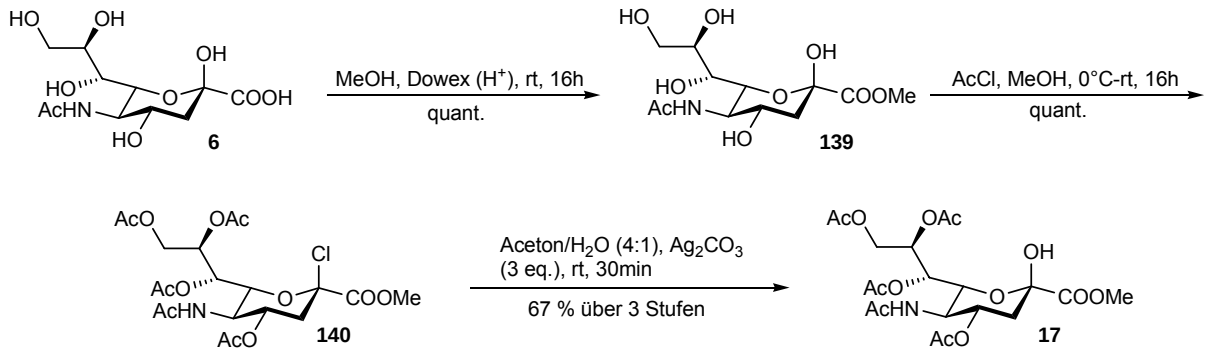


Abbildung 105: Synthese von Methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-didesoxy-β-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat **17**

In einem ersten Schritt erfolgte die Veresterung der Säuregruppe nach *R. Kuhn et al.* in Methanol mit saurem Ionentauscher [Dowex 50W-X8 (H^+)] als Katalysator.[193] Der resultierende Methylester **139** entsteht laut dünnschichtchromatographischer Kontrolle (EtOH/AcOH/H_2O = 4/1/1) quantitativ und wird ohne weitere Reinigung direkt für die nächste Reaktion, die Synthese des peracetylierten Glycosylchlorids **140** nach *J. Rothermel et al.*, eingesetzt.[194]

Hierzu wird der Methylester **139** bei 0 °C in Acetylchlorid und einer geringen Menge wasserfreiem Methanol suspendiert und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Auch diese Reaktion verläuft quantitativ und liefert das vollgeschützte Chlorid **140** selektiv als β-Anomer. Hierbei wird die C2-OH-Gruppe zunächst auch acetyliert, dann jedoch infolge des freiwerdenden Chlorwasserstoffs *in situ* nach einem S_N1-artigen Mechanismus durch Chlorid substituiert.[195]

Die Wiedereinführung der Hydroxygruppe an C2 gelingt in einem Aceton/Wasser-Gemisch (4:1) in Gegenwart von Silbercarbonat bei Raumtemperatur.[196] Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde das gewünschte Produkt **17**, wiederum als reines β-Anomer, in einer guten Ausbeute von 67% über die drei beschrieben Stufen erhalten.

Mechanistisch handelt es sich auch hier um eine S_N1-Reaktion, deren Triebkraft aus der Bildung von Silberchlorid resultiert und aufgrund des anomeren Effektes das vollständig geschützte Halbacetal der Neuraminsäure **17** als β-Anomer liefert.
Die Ausbeuteverluste auf dieser Stufe resultieren aus der Bildung des Glycals der Neuraminsäure **141** als Nebenprodukt, das bei basisch katalysierten Reaktionen von Neuraminsäurehalogeniden infolge einer Eliminierung des axialen Protons an C3 und konzertierter Eliminierung des Chlorids an C2 stets zu finden ist.
Dennoch stellt diese dreistufige Synthese einen vergleichsweise sehr effizienten Zugang zu dem gewünschten, vollständig geschützten Halbacetal **17** dar.

Wiederum erfolgte der Einfachheit halber ein erster Versuch mit 5-NO_2-*cyclo*Sal-3'-*O*-acetylthymidinmonophosphat **69** als Phosphataktivester. Die geschützte Neuraminsäure **17** wurde in Analogie zu den Testreaktionen aus Kapitel 4.6.2 zunächst mit Natriumhydrid in wasserfreiem Dichlormethan für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und im Anschluss mit einer Lösung des *cyclo*Sal-Nucleotids in Dichlormethan versetzt (Abbildung 106).
Auch in diesem Fall zeigte das Dünnschichtchromatogramm nach einer Stunde eine vollständige Umsetzung des Triesters an. Allerdings war zudem eine deutliche Zersetzung des überschüssigen Zuckers **17** erkennbar. Die Aufarbeitung erfolgte analog zu den Testreaktionen durch Extraktion des Reaktionsgemisches mit Wasser, anschließender basischer Entschützung des Rohproduktes und chromatographischer Reinigung (RP-18, H_2O). Es wurden zwei Fraktionen erhalten, von denen jedoch keine das gewünschte Zuckernucleotid **142** enthielt.

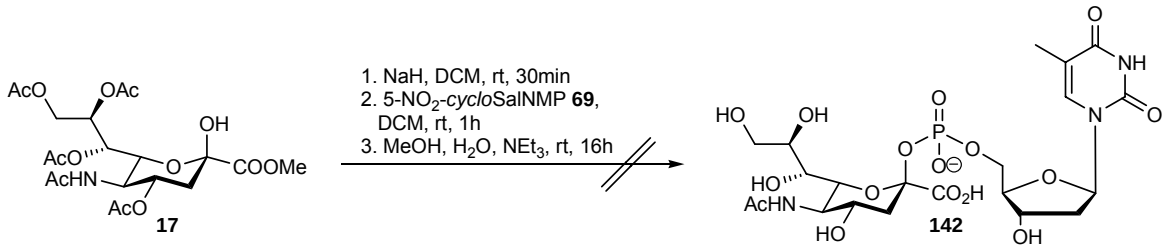


Abbildung 106: Versuch der Synthese von TMP-*N*-Acetylneuraminsäure **142**

Die erste Fraktion enthielt die entschützte Neuraminsäure, und bei der zweiten Fraktion handelte es sich um Thymidinmonophosphat.
Um sicherzugehen, dass das TMP nicht durch Hydrolyse des Triesters aufgrund eventueller Wasserspuren im Reaktionsansatz entstanden ist, wurde die gleiche

Umsetzung unter enormer Sorgfalt wiederholt, allerdings mit demselben Ergebnis. Dies lässt darauf schließen, dass das gewünschte Produkt vermutlich während der Umsetzung zunächst tatsächlich gebildet, dann allerdings im Zuge der Aufarbeitung wieder zersetzt wird.

Das chemische Verhalten von CMP-*N*-acetylneuraminsäure unter neutralen und basischen Bedingungen wurde von *R. Schauer et al.* intensiv untersucht (Abbildung 107).[197] Durch die nicht vorhandene funktionelle Gruppe an C3 des Zuckers kann es, wie im Fall der Neuraminsäurehalogenide unter basischen Bedingungen, auch bei den entsprechenden Zuckernucleotiden zu der bereits beschriebenen Eliminierungsreaktion kommen, da die den Zucker und das Nucleosid verbrückende Phosphateinheit eine ähnlich gute Abgangsgruppe wie beispielsweise Chlorid darstellt. Neben der Spaltung zum Glycal **141** und CMP **144** (Weg a, Abb. 107) wurde auch der direkte Angriff eines Nucleophils am Phosphoratom beobachtet. Dies hat dann einen Zerfall des Zuckernucleotids zur Neuraminsäure **6** und dem Nucleosidmonophosphat **144** zur Folge (Weg b, Abb 107).

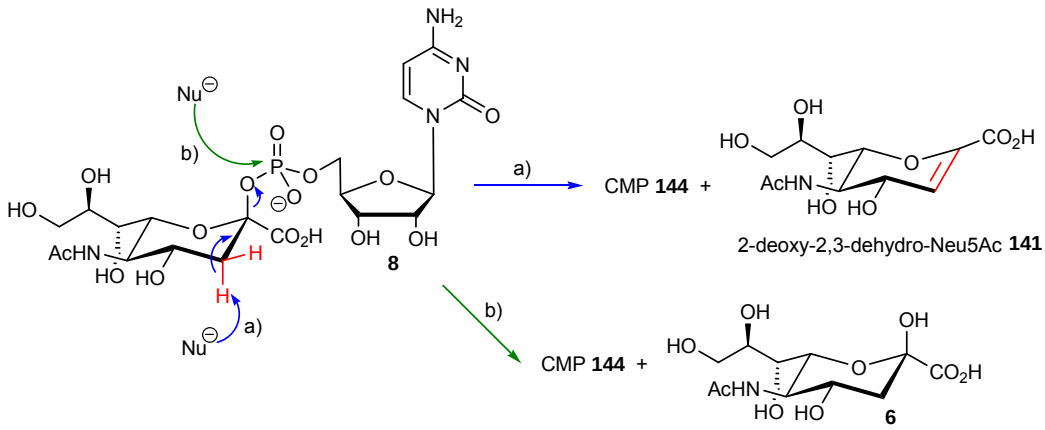


Abbildung 107: Mögliche Zerfallsmechanismen von CMP-Neu5Ac **8** unter basischen und neutralen Bedingungen

Aufgrund der Doppelbindung zwischen C2 und C3 lässt sich das Glycal **141** im ^{1}H-NMR-Spektrum leicht durch ein Dublett bei ~ 6 ppm identifizieren, welches von dem Proton an C3 erzeugt wird.

Da bei der erhaltenen zuckerhaltigen Fraktion dieses Signal im zugehörigen ^{1}H-NMR-Spektrum nicht vorhanden war, muss der Zerfall von TMP-Neu5Ac **142** vermutlich während der Entschützung des Rohproduktes durch einen Angriff des Nucleophils auf das Phosphoratom induziert worden sein.

Daraufhin wurde in der Literatur nach geeigneten Entschützungsbedingungen gesucht. Es stellte sich heraus, dass zur Entschützung von acetylierten Neuraminsäuremethylester-Derivaten im Allgemeinem zunächst die Abspaltung der Acetester nach *G. Zemplén et al.* basisch durch Natriummethanolat in Methanol erfolgt[198] und im Anschluss die Verseifung des Methylesters mit verdünnter Natronlauge.
Zudem wurde der eigentliche Kupplungsschritt meistens bei kälteren Temperaturen durchgeführt und das erhaltene Rohprodukt vor dem Entschützungsschritt zunächst an einer Normalphase säulenchromatographisch gereinigt.[16,60,61]

Vor diesem Hintergrund wurden die Reaktionsbedingungen angepasst und die Umsetzung dieses Mal bei einer Temperatur von –40 °C durchgeführt. Unter diesen Bedingungen war jedoch auch nach mehreren Stunden nur ein geringer Umsatz des Triesters zu beobachten, was auf die geringe Löslichkeit des Natriumhydrids in Dichlormethan bei tieferen Temperaturen zurückzuführen ist.
Aus diesem Grund wurden dem Reaktionsgemisch wenige Milliliter DMF zugesetzt und der Reaktionsfortschritt weiter dünnschichtchromatographisch überprüft (DCM/MeOH = 19:1). Nach zwei Stunden war die Umsetzung des *cyclo*Sal-Nucleotids vollständig. Außerdem kam es bei den tieferen Temperaturen zu keiner merklichen Zersetzung der überschüssigen Neuraminsäure **17**.
Daraufhin wurde analog der in der Literatur beschriebenen Aufarbeitung das Lösungsmittel zunächst im Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem Gemisch aus Dichlormethan und Methanol im Verhältnis 3:1 gereinigt. Der im Überschuss verwendete Zucker konnte auf diesem Weg reisoliert und das vollgeschützte Produkt **145** tatsächlich isoliert werden, wenn auch nur in einer Ausbeute von 20%.

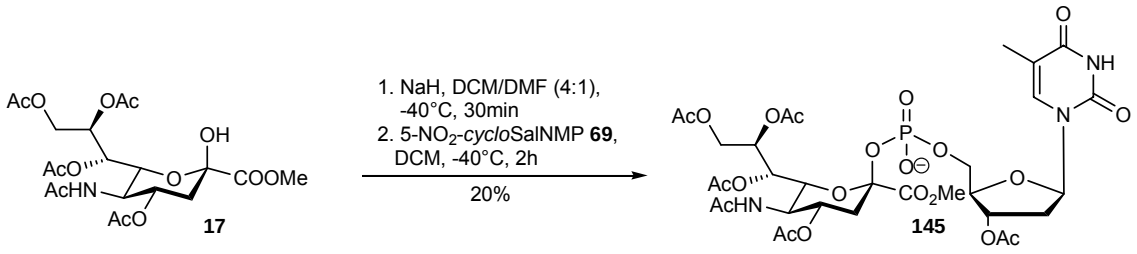


Abbildung 108: Synthese des peracetylierten Methylesters von TMP-Neu5Ac **145**

Eine genaue Identifizierung des Produktes erfolgte neben der Aufnahme von ^{1}H- und ^{31}P-NMR-Spektren zusätzlich durch ESI-Massenspektrometrie und bestätigte eindeutig den Erhalt des gewünschten Zuckernucleotids **145**. Aufgrund der geringen Ansatzgröße (20 mg Triester) wurde in diesem Fall auf eine Entschützung von **145** verzichtet und der Ansatz mit 100 mg 5-NO_2-*cyclo*Sal-3'-*O*-acetylthymidinmonophosphat **69** wiederholt.

Aber auch dieses Mal wurde das geschützte Produkt **145** lediglich in einer 22%-igen Ausbeute isoliert. Vermutlich ist **145** für eine Chromatographie an normalem Kieselgel trotz Schutzgruppen zu polar und eluiert daher nur zum Teil, oder es zersetzt sich aufgrund seiner hohen Empfindlichkeit bereits während der Trennung. Aus diesem Grund erfolgte die Abtrennung der im Überschuss eingesetzten Neuraminsäure **17** in späteren Versuchen analog zu den Modellverbindungen **135**-**138** durch Extraktion (s. S. 115). Die Abspaltung der Acetylgruppen erfolgte, wie bereits erwähnt, basisch durch Natriummethanolat in Methanol, da unter diesen Bedingungen ein Erhalt der Amidbindungung gewährleistet ist.

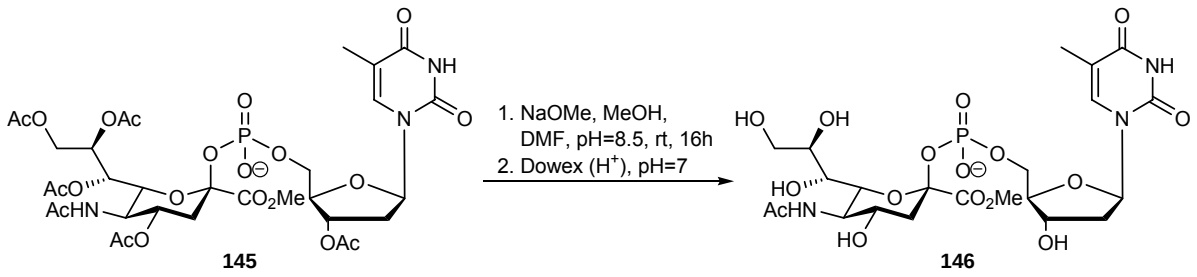


Abbildung 109: Abspaltung der Acetylschutzgruppen nach Zemplén

Laut Literaturangaben benötigt die vollständige Spaltung der Acetester etwa drei bis vier Stunden bei Raumtemperatur. In diesem Fall konnte jedoch auch am nächsten Tag noch peracetyliertes Produkt mittels Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden (DCM/MeOH 3:1).

Der Grund hierfür liegt vermutlich an der schlechten Löslichkeit des vollgeschützten Zuckernucleotids **145** in Methanol. Die Hoffnung, mit fortschreitender Reaktion würde eine klare Lösung entstehen, erfüllte sich nicht. Erst nach Zugabe größerer Mengen DMF wurde eine homogene Lösung und ein einheitliches Produkt erhalten. Zum Abbruch der Reaktion wurde mit saurem Ionentauscher [Dowex 50W-X8 (H^+)] neutralisiert und im Anschluss der Methylester mit 0.5 M NaOH basisch hydrolysiert.

Laut dünnschichtchromatographischer Kontrolle (*i*Pr/NH_4OAc 2:1) war die Reaktion nach einer Stunde bereits quantitativ.

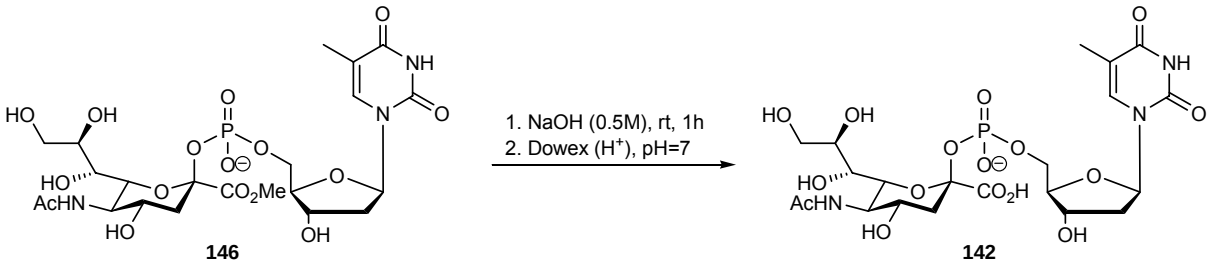


Abbildung 110: Basische Hydrolyse des Methylesters **146**

Es wurde ebenfalls mit Dowex neutralisiert und das gefriergetrocknete Rohprodukt an einer RP-18-Phase mit reinem Wasser chromatographiert.

Auf diesem Weg konnte die gewünschte entschützte TMP-Neu5Ac **142** erstmals isoliert werden. Zusätzlich wurde eine Mischfraktion aus dem Zuckernucleotid **142** und Thymidinmonophosphat und eine weitere Fraktion, die nur TMP enthielt, isoliert. Die Abbildungen 111 und 112 zeigen das erhaltene ^{31}P- und ^{1}H-NMR-Spektrum des Produktes **142**.

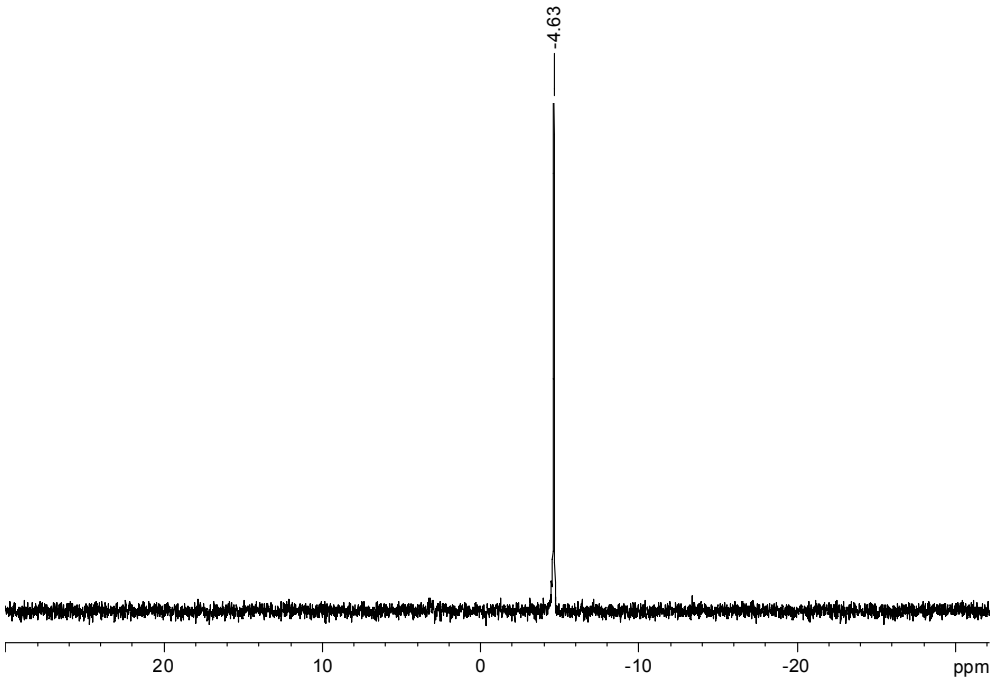


Abbildung 111: ^{31}P-NMR-Spektrum (D_2O, 162 MHz) von TMP-*N*-acetylneuraminsäure **142**

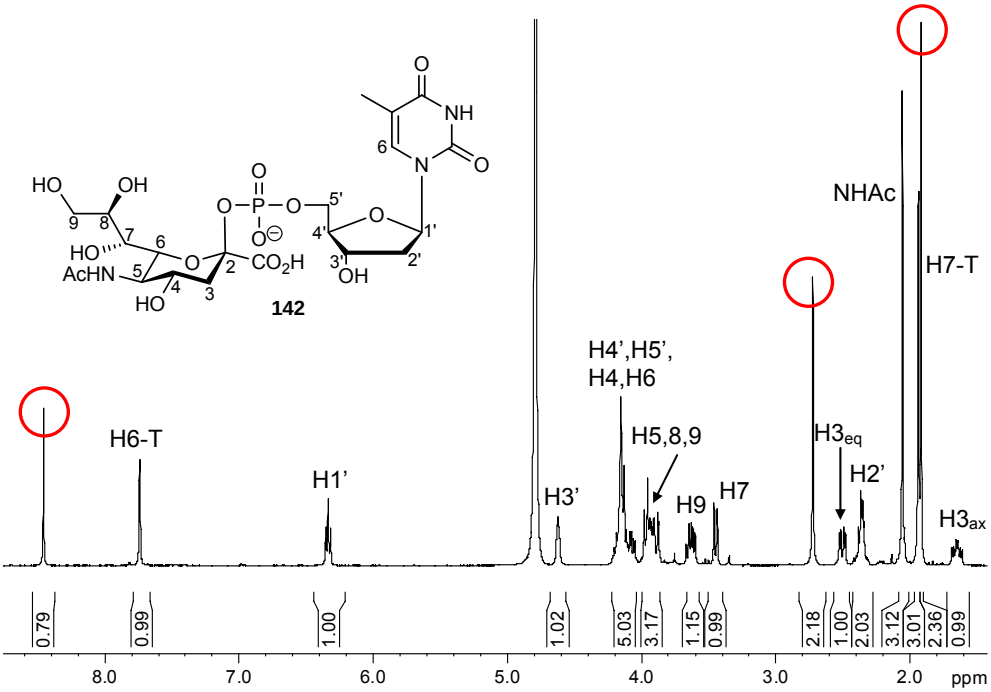


Abbildung 112: ^{1}H-NMR-Spektrum (D_2O, 400 MHz) von TMP-*N*-Acetylneuraminsäure **142**

Das ^{31}P-NMR-Spektrum zeigt lediglich ein Signal bei -4.63 ppm, was darauf schließen lässt, dass die Verbindung **142** anomerenrein erhalten wurde. Aufgrund des fehlenden Protons am anomeren Kohlenstoff der Neuraminsäure stellt das Bestimmen der Konfiguration an C2 mit Hilfe des ^{1}H-NMRs ein Problem dar. Man ist hier entweder auf Erfahrungswerte oder auf aufwendige 2D-Experimente angewiesen.[199,200] Durch Vergleiche mit der Literatur müsste es sich jedoch um das biologisch aktive β-Anomer handeln.[201]

Das ^{1}H-NMR-Spektrum des Zuckernucleotids **142** zeigt ebenfalls lediglich einen Signalsatz mit 9 Protonen, die der Neuraminsäure zugeordnet werden können und einen Signalsatz mit 11 Protonen des 2'-Desoxythymidins. Die nicht zu beobachtende Signalsatzverdoppelung bestätigt auch in diesem Fall die Anomerenreinheit des Produktes **142**. Allerdings sind zusätzlich 3 weitere Signale erkennbar, die nicht zu dem Produkt gehören und vermutlich anhaftende Salze darstellen. Dies verwundert, da theoretisch alle bei der Entschützung anfallenden Natriumsalze, wie beispielsweise Natriumacetat oder Natriummethanolat, nach Neutralisation mit Dowex (50W-X8, H^+) in entsprechend flüchtige Verbindungen überführt werden und während der Gefriertrocknung ausgasen sollten. Das Signal bei +8 ppm stellte sich in einem späteren Kontrollexperiment als Formiat-Salz heraus, dass durch Reaktion von Natriummethanolat mit DMF während der

Acetylgruppenabspaltung gebildet wird. Aus diesem Grund sollte im Folgenden auf die Zugabe von DMF zur Entschützungslösung verzichtet werden.
Das Produkt wurde zum Entsalzen einer Gelpermeationschromatographie, die auch als Größenausschlusschromatographie bezeichnet wird, unterzogen. Als Trägermaterial wurde Sephadex-G15, ein Dextrangel, mit einem relativ hohen Vernetzungsgrad, verwendet, als mobile Phase diente Wasser. Die Trennung beruht auf einem umgekehrten Siebeffekt, d.h. Substanzen mit einem höheren Molekulargewicht eluieren schneller als niedermolekulare Verbindungen, da diese in die Zwischenräume diffundieren und dadurch zurückgehalten werden. Aus diesem Grund bietet sich diese Methode besonders gut zum Entsalzen größerer Moleküle an und wurde auch bereits zur Reinigung von CMP-Neu5Ac **8** verwendet.[60]
Mit diesem Verfahren gelang tatsächlich eine vollständige Abtrennung der Salze, bedauerlicherweise zerfiel ein Teil des Produktes dabei jedoch zu Neuraminsäure **6** und TMP **143**. Der Versuch, das entstandene Nucleotid **143** durch eine erneute Chromatographie (RP-18, H_2O) von dem Produkt abzutrennen, war aufgrund des geringen Polaritätsunterschieds nicht möglich.
Diese Zersetzung wurde außerdem nach wenigen Tagen im NMR-Röhrchen in D_2O beobachtet. Eine massenspektrometrische Untersuchung bestätigte eine Hydrolyse zu Thymidinmonophosphat **143** und *N*-Acetylneuraminsäure **6**.

Da die Literaturangaben zur Molarität der Natronlauge, die für die Hydrolyse des Methylesters verwendet wurde, zwischen 0.1 M und 1.0 M variieren, wurde für die bisherigen Versuche stets eine mittlere Konzentration von 0.5 M gewählt.
Da im Zuge der durchgeführten Entschützung neben dem gewünschten Produkt jedoch fast immer auch das entsprechende Nucleosidmonophosphat entstanden ist, wurde in einem nächsten Versuch die Konzentration der Natronlauge auf 0.1 M vermindert. Zusätzlich wurde das Produkt **142** dieses Mal vor der eigentlichen Chromatographie an RP-18-Silicagel durch Größenausschlusschromatographie an Sephadex G15 entsalzt. Es wurden erneut zwei Fraktionen erhalten, von denen die erste wenige Milligramm des vollständig entschützten, jedoch nach wie vor salzhaltigen Produktes **142** enthielt, die zweite Fraktion bestand aus reinem Methylester **146**. Die Ausbeute von **146** betrug 10%.
Scheinbar war die Reaktionszeit von einer Stunde für eine vollständige Verseifung des Methylesters **146** unter den milderen basischen Bedingungen zu kurz, obgleich

das Dünnschichtchromatogramm (*i*Pr/NH_4OAc 2:1) so interpretiert wurde, dass die Hydrolyse abgeschlossen gewesen sein sollte.

Da eine Abtrennung der Salze auf Stufe des Methylesters **146** zu gelingen scheint, sollte im Folgenden eine erste Chromatographie (RP-18, H_2O) bereits zu diesem Zeitpunkt erfolgen. Es wurden zwei weitere Änderungen bezüglich der Aufarbeitung vorgenommen, da die Ausbeute der geschützten TMP-Neuraminsäure **145** nach der Chromatographie an Kieselgel mit durchschnittlich 20% viel zu gering ist.
Zum einen erfolgte das Entfernen des DMFs, welches während der Reaktion als Co-Solvens dient, nicht mehr im Ölpumpenvakuum bei einer Temperatur von 40 °C, da diese Erwärmung eventuell bereits zu einer teilweisen Zersetzung des Produktes führt. Vielmehr wurde nach Entfernen des Dichlormethans bei kalten Temperaturen im Vakuum dem Reaktionsgemisch eine größere Menge Wasser zugesetzt und sofort lyophilisiert. Auf diesem Weg geling eine sehr schonende Abtrennung kleinerer Mengen DMF (bis zu 5 mL). Das auf diesem Weg erhaltene Rohprodukt wurde dann zur Abtrennung des überschüssigen Zuckers nicht chromatographiert, sondern, wie zuvor in den Testreaktionen, mit Wasser extrahiert. Für eine schnellere Phasentrennung wurde als organisches Lösungsmittel in diesem Fall Ethylacetat verwendet, so dass das neue Protokoll wie folgt zusammengefasst werden kann:

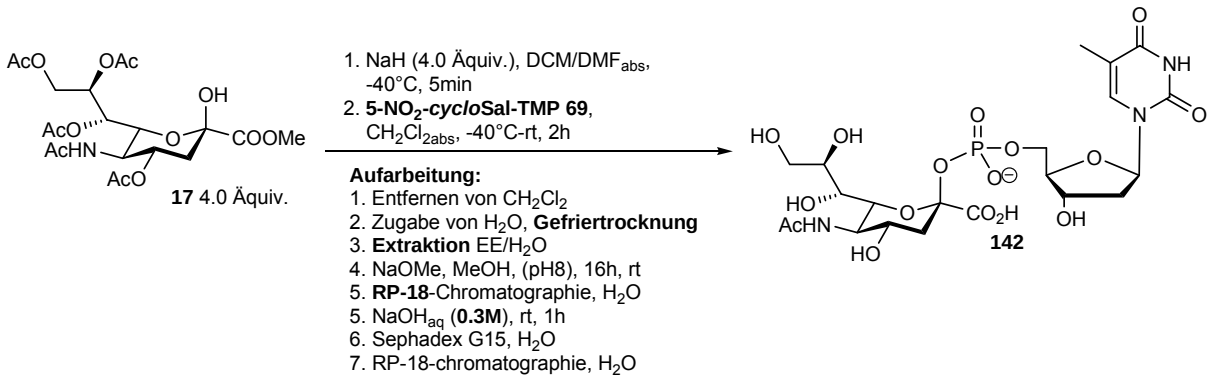


Abbildung 113: Überarbeitetes Protokoll zur Synthese von *N*-Acetylneuraminsäure-NMPs

Die Extraktion des Reaktionsgemisches verlief wie im Fall der Testreaktionen problemlos, die überschüssige Neuraminsäure **17** konnte auch auf diesem Weg zurückgewonnen werden. Das auf diesem Weg erhaltene Rohprodukt löste sich zur Abspaltung der Acetylgruppen vollständig in Methanol, so dass die Zugabe von DMF für eine effiziente Entschützungsreaktion nun nicht mehr nötig war. Trotzdem ist die

gesamte Aufarbeitung, insbesondere durch die zahlreichen Gefriertrocknungsprozesse sehr umfangreich und benötigte etwa zwei Wochen.
Das gewünschte Produkt wurde auf diesem überarbeiteten Weg zwar salzfrei erhalten, allerdings erneut in einem Gemisch mit Thymidinmonophosphat **143** im Verhältnis von 3:2. Wieder war dessen Abtrennung durch RP-Chromatographie nicht möglich.
Aufgrund dieses enttäuschenden Ergebnisses und der nach wie vor nicht überzeugenden Ausbeute (~ 20%), wurde in der Literatur nach alternativen Entschützungsbedingungen gesucht, da die eigentliche Bildung des Produktes nicht den ausbeutebegrenzte Schritt darzustellen schien.

H. Matsushita et al. haben eine Methode zur einstufigen Entschützung von CMP-*N*-acetylneuraminsäure durch Behandlung des vollgeschützten Rohproduktes mit wässriger Ammoniaklösung (25%) in guten Ausbeuten beschrieben.[202]
Ein erneuter Testansatz mit 5-NO_2-*cyclo*Sal-3'-*O*-acetylthymidinmonophosphat **69** wurde wie zuvor beschrieben aufgearbeitet. Nach Extraktion mit Ethylacetat und Wasser wurde das gefriergetrocknete Rohprodukt jedoch in etwa 20 mL einer 25%-igen Ammoniaklösung und einem Milliliter Methanol aufgenommen und bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde wiederum dünnschichtchromatographisch überprüft (*i*Pr/NH_4OH = 2:1), wobei nach sieben Stunden die Bildung eines einheitlichen Produktes erkennbar war. Das Reaktionsgemisch wurde mit Wasser verdünnt und lyophillisiert. Aufgrund der geringen Ansatzgröße wurde das erhaltene Rohprodukt nicht chromatographiert, sondern direkt ^{1}H-NMR-spektroskopisch analysiert, um zu überprüfen, ob der Methylester unter den gegebenen Bedingungen bereits vollständig verseift worden war. Dies konnte durch die Abwesenheit der charakteristischen Absorption der Methoxygruppe bei ~ 3.5 ppm im ^{1}H-NMR-Spektrum bestätigt werden.

Da diese Syntheseroute wesentlich einfacher und kürzer erscheint als die vorherige, sollte ein nächster Versuch direkt mit 5-NO_2-*cyclo*Sal-N^4,2',3'-triacetyl-CMP **68** als Phosphataktivester durchgeführt werden.
Die Umsetzung des *cyclo*Sal-Triesters **68** war nach drei Stunden quantitativ, woraufhin zunächst das Dichlormethan und anschließend das DMF wie beschrieben entfernt wurden. Nach Abtrennung des Zuckers durch Extraktion erfolgte die

Abspaltung der Schutzgruppen mit wässriger Ammoniak-Lösung ebenfalls innerhalb von sieben Stunden bei Raumtemperatur. Die anschließende chromatographische Reinigung (RP-18, H_2O) lieferte lediglich ein einheitliches Produkt mit einem R_f-Wert von 0.57 (*i*Pr/NH_4OH = 2:1).

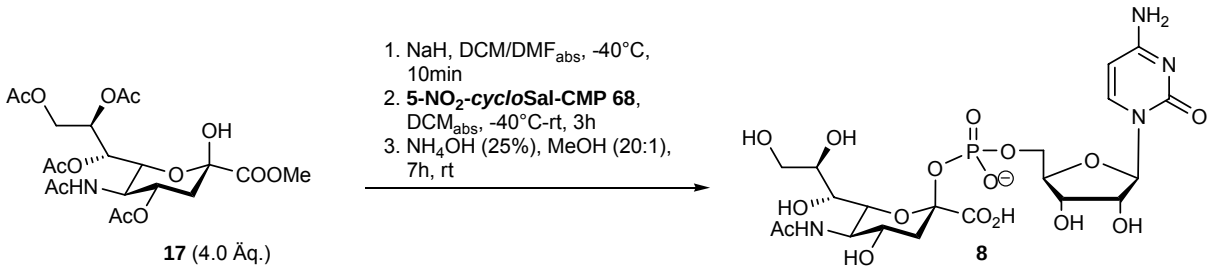


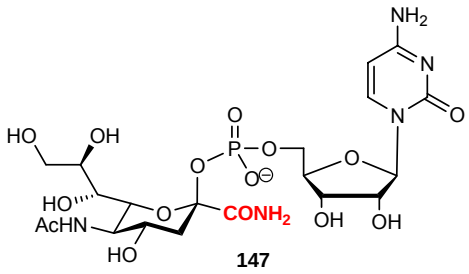
Abbildung 114: Versuch der Synthese von CMP-*N*-Acetylneuraminsäure **8**

Mit Hilfe des ^{1}H-NMR-Spektrums konnte die erhaltene Verbindung als das gewünschte, vollständig entschützte Zuckernucleotid identifiziert werden. Doch auch in diesem Fall waren bedauerlicher Weise salzhaltige Verunreinigungen vorhanden. Zur Abtrennung wurde wieder eine Größenausschlusschromatographie an einer Sephadex-G15-Phase durchgeführt, die jedoch nur eine sehr geringe Menge des reinen Produktes lieferte. Auch nach wiederholtem Auftragen konnte der Großteil des Produktes nicht von den Salzen befreit werden.

Aus diesem Grund wurde eine alternative Form der Größenausschlusschromatographie an Biogel-P2 durchgeführt. Dieses aus Polyacrylamid bestehende Gel weist einen sehr hohen Vernetzungsgrad auf und sollte aus diesem Grund ebenfalls zum Entsalzen des Zuckernucleotids geeignet sein. Normalerweise verwendet man Biogelsäulen von ein bis zwei Metern Länge, jedoch wurde in diesem Fall, aufgrund der unzureichenden Stabilität von CMP-Neu5Ac **8**, eine kürzere Trennstrecke gewählt. Ein Entsalzen des Produktes war nach diesem Verfahren nicht erfolgreich, allerdings gelang auf diesem Weg zum ersten Mal eine Trennung des Produktes vom entsprechenden Nucleosidmonophosphat, das auch hier in geringen Mengen entstanden war. Die salzhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und erneut an Sephadex-G15 gereinigt, da auf diese Weise zumindest ein Teil des Produktes von den Salzen befreit werden konnte.

Abschließend wurden die salzfreien Fraktionen ein letztes Mal chromatographiert (RP-18, H_2O) und auf diesem Wege das reine Produkt erhalten. Eine exakte

Ausbeutebestimmung ist in diesem Fall leider nicht möglich, da noch Produktfraktionen vorliegen, die nicht von den Salzen separiert werden konnten. Die Ausbeute des gereinigten Anteils beträgt 20%.
Zur vollständigen Charakterisierung des Produktes wurde außerdem ein hochaufgelöstes ESI-Massenspektrum angefertigt. CMP-*N*-acetylneuraminsäure **8** besitzt, einfach negativ geladen, eine exakte Masse von 613.1400, der gemessene Wert jedoch betrug lediglich 612.1562. Dieser Wert entspricht genau der exakten Masse des entsprechenden Säureamids **147** (Abbildung 115), welches aus einem nucleophilen Angriff von NH_3 auf den Methylester resultieren würde.



147

Abbildung 115: CMP-*N*-Acetylneuraminsäureamid **147**

In Anbetracht der publizierten Ergebnisse von *H. Matsushita et al.* und durch Verwendung einer verdünnten, wässrigen ammoniakalischen Lösung wurde davon ausgegangen, dass in erster Linie die vorhandenen OH^--Ionen als Nucleophile zur Spaltung der Ester fungieren, was jedoch nicht der Fall zu sein scheint.
Aus diesem Ergebnis kann weiterhin geschlossen werden, dass durch die Spaltung der Acetesterfunktionen im Molekül das entsprechende Acetamid generiert wird. Somit handelt es sich bei der nur schwierig abtrennbaren Verunreinigung, die im ^{1}H-NMR-Spektrum in D_2O ein Signal bei 2.0 ppm aufwies, um Acetamid.

Alles in allem kann dieses Resultat trotzdem als Erfolg gewertet werden, da es belegt, dass *cyclo*Sal-Nucleotide auch für die Synthese komplizierter Glycopyranosyl-Nucleotide, wie CMP-*N*-acetylneuraminsäure, verwendet werden können. Auch wenn die zur Entschützung dieses Molekül publizierten Reaktionsbedingungen bisher nicht vollständig reproduziert werden konnten, legen die gewonnenen Erkenntnisse einen wichtigen Grundstein für weiterführende Arbeiten. Eine abschließende Optimierung der Entschützungsbedingungen wird Teil dieser zukünftigen Arbeiten sein.

4.7 Fazit

Durch einen Wechsel des Oxidationsmittels konnte im ersten Teil dieser Arbeit ein effizienter Zugang zu den als Aktivester eingesetzten 5-Nitro-substituierten *cyclo*Sal-Phosphattriestern etabliert werden. Die Verwendung von Oxone® liefert die gewünschten *cyclo*Sal-Nucleotide in sehr guten Ausbeuten von durchschnittlich 80%. Die hohe Reaktivität der Nitro-substituierten *cyclo*Sal-Phosphattriester macht diese Verbindungen zu vielseitig verwendbaren Synthesebausteinen, die mit einer Reihe unterschiedlicher Nucleophile sehr schnell und effizient die jeweiligen Produkte liefern. Aufgrund der allgemein milden Reaktionsbedingungen eignen sich *cyclo*Sal-Nucleotide besonders zur Darstellung pharmakologisch relevanter Analoga.
Das breite Anwendungsspektrum dieser Phosphataktivester konnte im zweiten Teil dieser Arbeit durch die erfolgreiche Synthese verschiedener Nucleosiddi- und -triphosphate, einiger Dinucleosid-5',5'-oligophosphate, sowie unterschiedlicher Nucleosidmonophosphatpyranosen belegt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Phosphorylierte Naturstoffe übernehmen in biologischen Systemen eine Vielzahl verschiedenster Aufgaben, die für nahezu alle lebenden Organismen von enormer Relevanz sind. Während alle natürlich vorkommenden Ribo- und Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate die elementaren Bausteine der enzymkatalysierten RNA- beziehungsweise DNA-Synthese sind, nimmt Adenosintriphosphat zusätzlich als wichtigster Überträger freier Enthalpie eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel ein. Dinucleosid-5',5'-oligophosphate erfüllen ebenfalls bei einer ganzen Reihe von biologischen Effekten in unterschiedlichsten Geweben und Zellen essentielle Funktionen. So stellen Verbindungen wie das Nicotinamidadenosindinucleotid (NAD) oder das Flavinadenosindinucleotid (FAD) wichtige Coenzyme dar, die als Wasserstoffüberträger entscheidend an der Zellatmung beteiligt sind. Zuckernucleotide, wie CMP-*N*-Acetyl-neuraminsäure, stellen aktivierte Monosaccharide dar und sind als Glycosyldonatoren maßgeblich an der Biosynthese von Glycoproteinen und Glycolipiden beteiligt.

Aufgrund der enormen Relevanz phosphorylierter Biokonjugate in der Natur ist der synthetische Zugang zu derartigen Verbindungen von großem pharmakologischen Interesse. Folglich wurde bereits eine Vielzahl verschiedener Ansätze zur Synthese derartiger Verbindungen publiziert. Allerdings stellt neben der eigentlichen Synthese besonders häufig die Isolierung dieser mehrfach geladenen Verbindungen ein großes Problem dar, weshalb bisher keine allgemein gültige Methode zur Darstellung verschiedenster phosphorylierter Biokonjugate existiert. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Synthese unterschiedlicher Nucleosid-5'-polyphosphate sowie phosphatverbrückter Biokonjugate ausgehend von 5-Nitro-*cyclo*Sal-aktivierten Nucleotiden.

*Cyclo*Sal-Nucleotide wurden ursprünglich als lipophil maskierte Wirkstoffvorläufer, sogenannte Pronucleotide, entwickelt. Das *cyclo*Sal-Konzept stellt ein etabliertes Prodrug-Konzept dar, dass im Gegensatz zu anderen Pronucleotid-Systemen ohne eine enzymatische Aktivierung auskommt, da es lediglich den Anstieg des pH-Wertes beim Eintritt in die Zelle ausnutzt. Aus diesem Grund können *cyclo*Sal-Nucleotide durch Umsetzung mit anderen Nucleophilen als Hydroxid auch als

Synthesebausteine zur Darstellung von unterschiedlichen Nucleosid-5'-phosphatdiestern herangezogen werden (Abbildung 116). Diese Tatsache wurde bereits durch die Synthese von UTP bzw. dTTP belegt. Außerdem wurden *cyclo*Sal-Nucleotide ebenfalls erfolgreich zur Darstellung verschiedener NDP-Pyranosen eingesetzt. Um *cyclo*Sal-Nucleotide jedoch synthetisch als Phosphorsäureaktivester nutzen zu können, müssen die Umsetzungen der verschiedenen Nucleophile mit stark Acceptor-substituierten *cyclo*Sal-Verbindungen (z.B. 5-Nitro) erfolgen.

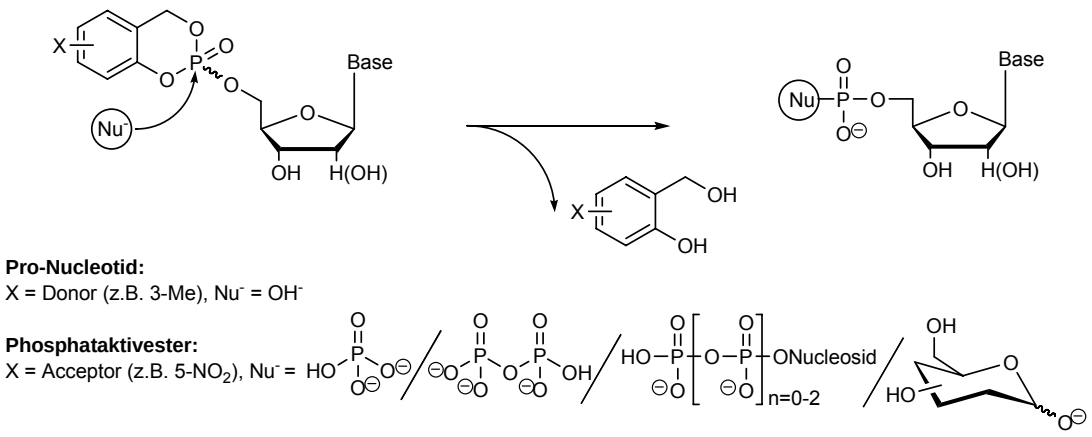


Abbildung 116: *Cyclo*Sal-Verbindungen als Pronucleotide und als Phosphataktivester

Das in der Arbeitsgruppe etablierte Syntheseprotokoll zur Darstellung von *cyclo*Saligenyl-Nucleosidmonophosphaten liefert die Donor-substituierten Verbindungen in sehr guten Ausbeuten (> 80%), bei schwächer Acceptor-substituierten Verbindungen (5-Chlor oder 5-Brom) werden immerhin noch Ausbeuten von ca. 50% erreicht. Für die sehr reaktiven Nitrophosphattriester, als entscheidendes Syntheseintermediat, hingegen erlaubt das Protokoll keinen zuverlässigen Zugang (5-20%), weshalb ein erstes Ziel zunächst darin bestand, einen effizienten und reproduzierbaren Ansatz zur Synthese dieser stark Acceptor-substituierten *cyclo*Sal-Nucleotide zu etablieren.

Zunächst wurde versucht, die Synthese der Nitro-substituierten *cyclo*Sal-Verbindungen ausgehend von Nucleosid-5'-phosphordichloridaten zu erreichen (s. S. 26-31). Aufgrund der mangelnden Selektivität von $P(O)Cl_3$ als Phosphorylierungsreagenz wurde das gewünschte 5-NO_2-*cyclo*Sal-Nucleotid **69** auf diesem Weg allerdings nur in einer mäßigen, nicht steigerbaren Ausbeute von 30%

erhalten. Daher wurde im Folgenden versucht, das in der Arbeitsgruppe etablierte Protokoll auf die Synthese der Nitro-substituierten *cyclo*Sal-Nucleotide zu optimieren.

Diese Syntheseroute nutzt die höhere Reaktivität von P(III)-Reagenzien und gliedert sich in zwei direkt aufeinander folgende Schritte: die Kupplung des cyclischen Saligenylchlorphosphits mit dem Nucleosid und die Oxidation zum Phosphattriester. ^{31}P-NMR-spektroskopische Untersuchungen ergaben, dass der Oxidationsschritt für die starken Ausbeuteverluste verantwortlich ist. Das verwendete *tert*-Butylhydroperoxid scheint für die sehr labilen 5-Nitro-Phosphittriester zu aggressiv und nicht praktikabel zu sein (s. S. 35, 36). Aus diesem Grund wurde zunächst versucht, die Darstellung der 5-NO_2-substituierten Phosphattriester ausgehend von dem entsprechenden, bereits oxidierten *cyclo*Saligenyl-phosphorchloridat **38** zu erreichen (s. S. 31-34). Da dieser Ansatz aufgrund der mangelnden Reaktivität des P(V)-Reagenzes jedoch gänzlich scheiterte, wurde im Folgenden nach einem milderen Oxidationsmittel für die P(III)-Route gesucht.

Die Verwendung von Oxone®, einem gemischten Salz aus $2KHSO_5 \cdot KHSO_4 \cdot K_2SO_4$, als Oxidationsmittel brachte schließlich den gewünschten Erfolg (s. S. 38-41). Die Oxidation des 5-NO_2-*cyclo*Sal-Phosphittriesters mit Oxone® lieferte die gewünschte P(V)-Verbindnung laut ^{31}P-NMR-Spektrum quantitativ, sodass nach Abtrennung der anorganischen Salze durch Extraktion mit Wasser auf diesem Weg Ausbeuten von über 80% erreicht wurden. Die Verbindungen fallen dabei bereits in einer so hohen Reinheit an, dass sie ohne einen weiteren Reinigungsschritt direkt für die folgenden Umsetzungen eingesetzt werden konnten.

Die eingeschlagene Synthesestrategie zur Darstellung der unterschiedlichen Nucleosid-5'-Phosphatdiester gliederte sich vereinfacht in drei separate Reaktionssequenzen. Ausgehend von 5-Nitrosalicylalkohol **44** erfolgte zunächst die Synthese des cyclischen Chlorphosphites **50**, welches durch Umsetzung mit verschiedenen Nucleosiden die jeweiligen *cyclo*Sal-Nucleotide ergab. Die anschließende Kupplung mit den entsprechenden Nucleophilen lieferte letztlich die gewünschten Zielverbindungen.

5-Nitrosalicylalkohol **44** wurde durch Reduktion des entsprechenden Aldehyds in einer Ausbeute von 86% erhalten. Die Synthese des cyclischen Saligenylchlorphosphites **50** erfolgte nach einer etablierten Methode durch Reaktion des Salicylalkohols **44** mit Phosphortrichlorid bei tiefen Temperaturen (s. S. 42, 43). Um Nebenreaktionen bei der nachfolgenden Synthese der *cyclo*Sal-Nucleotide zu vermeiden, wurden die jeweiligen funktionellen Gruppen der eingesetzten Nucleoside durch Acetylschutzgruppen blockiert. Die Darstellung der modifizierten Nucleoside **61**-**65** erfolgte nach einer bereits erprobten, drei Stufen umfassenden Syntheseroute mit Gesamtausbeuten zwischen 68-87% (s. S. 43, 44). Die anschließende Synthese der 5-Nitro-substituierten *cyclo*Sal-Nucleotide **66**-**71** wurde, wie zuvor geschildert, durch Umsetzung der geschützten Nucleoside mit dem Saligenylchlorphosphit **50** und nachfolgender Oxidation durch Oxone® in sehr zufriedenstellenden Ausbeuten zwischen 65-91% erreicht (s. S. 45, 46). Somit lagen erstmals ausreichende Mengen der verschiedenen Schlüsselverbindungen **66**-**71** vor, sodass im Folgenden mit der Darstellung der eigentlichen Zielverbindungen begonnen werden konnte.

Zur Darstellung der Zielverbindungen wurden die entsprechenden 5-Nitro-*cyclo*Sal-Phosphataktivester **66**-**71** mit den jeweiligen Nucleophilen zur Reaktion gebracht. Aufgrund der chemischen Differenzierbarkeit der drei Phosphatesterbindungen im *cyclo*Sal-Fragment erfolgt nach Angriff des Nucleophils zunächst selektiv die Spaltung der phenolischen Phosphatesterbindung zum mesomeriestabilisierten Benzylphosphatdiester, der in einer spontanen Reaktion das gewünschte Produkt freisetzt.

In diesem Zusammenhang erfolgte zunächst eine Ausweitung der Methode auf die Synthese verschiedener natürlicher Nucleosid-5'-di- und -triphosphate sowie einiger Analoga. Für eine ertragreichere Umsetzung wurde das ursprüngliche Syntheseprotokoll nochmals überarbeitet. Nach gründlicher Trocknung der Ausgangsverbindungen wurden die als Nucleophile eingesetzten $N(n\mathrm{Bu}_4)_x$-Phosphatsalze **74**, **75** in DMF vorgelegt und bei Raumtemperatur tropfenweise mit dem ebenfalls in DMF gelösten *cyclo*Sal-Nucleotid versetzt, sodass zu jedem Zeitpunkt ein Überschuss des Nucleophils vorlag. Mit Hilfe des überarbeiteten Protokolls konnten die verschiedenen N(D)TPs **1**, **15**, **80**-**86** nach Überführung in ihre Ammonium-Salze und Umkehrphasenchromatographie (RP-18, H_2O) in Ausbeuten

zwischen 40% und 83% isoliert werden (s. S. 55, 56). Die Allgemeingültigkeit der Methode wurde insbesondere durch die erfolgreiche Synthese der N(D)TP-Analoga **83**, **85** und **86** unterstrichen.

Des Weiteren wurden erstmals ausgehend von *cyclo*Sal-Phosphataktivestern verschiedene Dinucleosid-5',5'-di- -tri- und –tetraphosphate synthetisiert. Die Umsetzung der entsprechenden Nucleosidmono- -di- und -triphosphate mit den 5-Nitro-*cyclo*Sal-Phosphattriestern richtete sich im Wesentlichen nach den Erfahrungen, die bei den Synthesen der N(D)TPs gemacht wurden. Allerdings wurden UMP und ADP in Form ihrer Triethylammonium-Salze als Nucleophile eingesetzt, da sich diese Gegenionen positiv auf das Elutionsverhalten der jeweiligen Produkte auswirken, sodass ein zusätzlicher Ionenaustausch entfällt. ATP musste wie die Phosphatsalze **74**, **75** aus Gründen der Löslichkeit als Tetra-*n*-butylammonium-Salz in den Reaktionen mit den *cyclo*Sal-Nucleotiden eingesetzt werden. Die gewünschten Dinucleosidoligophosphate **3**, **4**, **88**, **89** und **121** wurden erstmals erfolgreich auf diesem Weg in Ausbeuten zwischen 40% und 60% erhalten (s. Kapitel 4.5.1, 4.5.3, 4.5.4). In den meisten Fällen konnten die Ausbeuteverluste mit der Bildung eines unerwünschten phosphorhaltigen Nebenproduktes erklärt werden, dessen Ursprung jedoch abschließend nicht aufgeklärt werden konnte.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurden in Anlehnung an die erfolgreiche Synthese von Nucleosiddiphosphatpyranosen, im Arbeitskreis zum ersten Mal verschiedene Nucleosidmonophosphat-Pyranosen durch Reaktion der entsprechenden Glycoside mit *cyclo*Sal-Phosphattriestern dargestellt. In ersten Modellreaktionen wurde 5-Nitro-*cyclo*Sal-3'-*O*-acetyl-dTMP **69** mit den deprotonierten, tetraacetylierten Glycosyl-1-oxiden von Glucose, Mannose und Galaktose umgesetzt. Beste Ergebnisse wurden in diesem Zusammenhang durch Verwendung von Natriumhydrid als Base erzielt. Die entsprechenden TMP-Glycopyranosen **135**-**138** wurden nach Optimierung der Reaktionsbedingungen in sehr zufriedenstellenden Ausbeuten bis zu 80% erhalten (s. S. 100-103). Aufgrund der höheren Nucleophile der jeweiligen β-Glycosyl-1-oxide wurden TMP-Glucose **135** und TMP-Galaktose **137** in einer kinetisch kontrollierten Reaktion als reine β-Anomere erhalten, das entsprechende Mannonucleotid **136** fiel als Gemisch beider Anomere an. In weiteren Experimenten stellte sich heraus, dass das Gleichgewicht der Deprotonierungsreaktion sowohl durch eine Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Verwendung eines schwächer aktivierten *cyclo*Sal-

Triesters als auch durch den Einsatz einer sterisch anspruchsvolleren starken Base in Richtung des kinetisch benachteiligten α-Anomers verschoben werden kann, sodass mit dieser Methode generell beide Anomere zugänglich sein sollten.
Abschließend sollten die gewonnenen Erkenntnisse auf die Synthese des biologisch relevanten Sialinsäuredonors, CMP-*N*-Acetylneuraminsäure **8**, übertragen werden. Da *N*-Acetyl-Neuraminsäure **6** und ihre Derivate jedoch aufgrund der strukturellen Besonderheit im Vergleich zu einfacheren Zuckern ein abweichendes chemisches Verhalten sowie Unterschiede bezüglich ihrer Stabilität aufweisen, mussten die Reaktionsbedingungen zur erfolgreichen Synthese dieses Zuckernucleotids zunächst angepasst werden (s. S. 109-115). Aufgrund von Schwierigkeiten bezüglich der Entschützung des gewünschten Produktes wurde auf diesem Weg letztlich lediglich CMP-*N*-Acetylneuraminsäureamid **147** in einer Ausbeute von 20% isoliert (s. S. 116-118). Dieses Resultat kann dennoch als Erfolg gewertet werden, da es belegt, dass *cyclo*Sal-Nucleotide prinzipiell auch für die Synthese komplizierter Glycopyranosyl-Nucleotide, wie CMP-*N*-Acetylneuraminsäure **8**, verwendet werden können. Einzig die für die Entschützung dieses Molekül publizierten Reaktionsbedingungen konnten bisher nicht vollständig reproduziert werden. Eine abschließende Optimierung der Entschützungsbedingungen wird Teil zukünftiger Arbeiten sein.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit anhand von verschiedenen Beispielen demonstriert werden, dass mit 5-Nitro-substituierten *cyclo*Sal-Nucleotiden ein vielseitig verwendbarer Synthesebaustein existiert, der aufgrund seiner hohen Reaktivität mit einer Reihe unterschiedlicher Nucleophile sehr schnell und effizient die jeweiligen Produkte liefert.

6. SUMMARY

Phosphate groups assume several different functions in biological systems that are of great importance for almost all forms of life. In addition to the well-known function of adenosine triphosphate as the primary energy source in many systems, naturally occurring deoxyribo- and ribonucleoside triphosphates are fundamental building blocks for enzymatic DNA and RNA synthesis *in vivo* and *in vitro*. Dinucleoside polyphosphates have been proposed as signaling and regulatory molecules for various biological functions. Compounds like NAD and FAD for example are important coenzymes which participate in the cellular respiration. Sugar nucleotides, e.g. CMP-*N*-acetylneuramic acid, play as glycosyl donors, key roles in the biosynthesis of oligo- and polysaccharides.

For these reasons, a chemical access to such compounds is of great pharmacological interest. As a result, a number of different methods have been developed for their preparation. However, there is no general method for the synthesis of various nucleotide conjugates yet. The thesis in hand describes the preparation of several nucleoside-5'-phosphate esters as well as phosphate bridged bioconjugates starting from 5-nitro-*cyclo*Sal-activated nucleosides.

The *cyclo*Sal-technique had been developed earlier as a prodrug concept to deliver biologically active nucleotides into cells. The purely pH-dependent cleavage is initiated by nucleophilic attack of water/hydroxide at the neutral phosphate triester. A subsequent selective hydrolysis pathway yields the nucleotide and the masking unit, a salicylalcohol. This is why *cyclo*Sal-phosphate triesters can be also used as chemical synthons of active esters of nucleotides, when other nucleophiles apart from hydroxide are utilized. This fact was already proven by the successful synthesis of UTP and TTP as well as by the preparation of some NDP-pyranoses. For a fast and efficient reaction it is important to apply strong acceptor substituted *cyclo*Sal-nucleotides (5-NO_2) in order to increase the electrophilic properties of the phosphorous atom.

The thus approved synthetic strategy for the preparation of *cyclo*Sal nucleoside monophosphates afforded donor-substituted compounds, e.g. X = methyl, in yields of up to 80%. Chloro- and bromo-substituted triesters were yielded in about 50%. However, the highly reactive and moisture sensitive 5-nitro-compounds could not be reliably synthesized using the standard procedure reported and always used before

(5-20% yield). Therefore an initial aim was to find an efficient route to these strong acceptor substituted *cyclo*Sal-nucleotides.

As an alternative strategy for the preparation of nitro substituted *cyclo*Sal-nucleotides nucleoside-5'-phosphorodichloridates were synthesized according to the Yoshikawa method. Here, in contrast to our method the nucleoside was phosphorylated first and then reacted with a salicyl alcohol (p. 26-31). Indeed the 5-nitro-substituted triester was obtained by this pathway. However yields were only moderate (30%). This result can be explained by the lack of selectivity of $P(O)Cl_3$ as phosphorylating agent.

Next, it was tried to modify and optimize the standard protocol of the synthesis of 5-nitro substituted *cyclo*Sal-nucleotides. First, the conditions were changed by converting the protected nucleoside with the already oxidized 5-nitro-*cyclo*Saligenylphosphorochloridate (p. 31-34). Unfortunately, the conversion and therefore also the yields were very poor due to the decreased reactivity of the P(V)-compound.

The original protocol uses the advantage of the high reactivity of P(III)-reagents. It is a two-step procedure including the coupling of the cyclic 5-nitro-saligenyl chlorophosphite to the nucleoside and the oxidation to the phosphate triester in the second step. Employing ^{31}P-NMR spectroscopy, it was investigated which of both steps was the yield-limiting step. The formation of the phosphite triester proceeded nearly quantitatively, but after addition of *tert*-butylhydroperoxide, the originally used oxidizing agent in all our syntheses of *cyclo*Sal-nucleotides, a great number of byproducts were formed (p. 35, 36). Consequently, *t*-BuOOH was not an appropriate oxidizing agent for this purpose. As a result, the use other milder oxidizing agents was investigated.

The application of oxone®, which is a mixed salt composed of $2KHSO_5{\cdot}KHSO_4{\cdot}K_2SO_4$, as an oxidizing agent was finally successful (p. 38-41). Oxidation of the P(III)-triester with oxone® proceeded quantitatively according to the ^{31}P-NMR spectrum. The inorganic salts could be removed by extraction with water. Thus, the purity of the crude material of 5-nitro-triesters obtained on this way was found to be sufficiently high to be used in the following reactions with the corresponding nucleophiles.

Previously, 5-nitrosalicylalcolhol **44** was synthesized by reduction of the corresponding aldehyde in 86% yield. The preparation of the cyclic chlorophosphite **50** was achieved by a standard procedure using phosphorus trichloride at low temperature (p. 42, 43). To avoid site reactions during the *cyclo*Sal-

triester synthesis, the corresponding nucleosides were protected with acetyl groups (p. 43, 44). The different *cyclo*Sal-nucleotides **66**-**71** were synthesized as described before in very good yields between 65-91% (p. 45, 46).

For the preparation of the target molecules the *cyclo*Sal-nucleotides **66**-**71** were reacted with the different nucleophiles in DMF at room temperature. In this context the method was first expanded to the synthesis of various natural nucleoside di- and triphosphates as well as of some analogues. After reworking the primary protocol yields between 40% and 83% were obtained. Therefore the highly hygroscopic N(*n*Bu$_4$)$_x$-phosphate salts **74**, **75** were exhaustively dried in vacuum and then dissolved in DMF. To this solution the *cyclo*Sal-triester, also dissolved in DMF, was slowly added. After ion exchange to ammonia the nucleoside di- and triphosphates were purified by reversed-phase chromatography using water as the eluting solvent (p. 55, 56). The general validity of our method was particularly emphasized by the successful synthesis of the N(D)TP analogues.

Additionally, the *cyclo*Sal-approach was successfully used for the synthesis of different dinucleoside-5',5'-di-, -tri- and –tetraphosphates for the first time. The reactions of the corresponding nucleoside mono-, di- and triphosphates with the *cyclo*Sal-nucleotides were basically complied with the experiences made during the N(D)TP syntheses. The desired dinucleoside oligophosphates **3**, **4**, **88**, **89**, **121** were successfully obtained on this way with yields between 40% and 60% (chapter 4.5.1, 4.5.3, 4.5.4). In most cases losses of yield could be explained by the formation of an unknown phosphate-containing byproduct.

The last part of this thesis deals with the successful preparation of nucleoside monophosphate sugars based on *cyclo*Sal-phosphate active esters. First attempts in this context were carried out using tetra-acetylated glycosyl-1-oxides of glucose, mannose and galactose as nucleophiles and the 5-nitro triester of 3'-acetylated thymidine **69**. Best results were obtained using sodium hydride as a base. The corresponding TMP-glycopyranoses **135**-**138** were obtained in very good yields up to 80% after optimization (p. 100-103). Due to the greater nucleophilicity of the respective β-glycosyl-1-oxides the products **135**-**138** were also predominately obtained as β-anomers under these conditions.

Ultimately, the gained insights should be transferred to the synthesis of CMP-Neu5Ac **8**. Since *N*-acetyl neuramic acid and its derivatives show different chemical behavior and stabilities compared to simpler sugars, the reaction conditions had to be

adjusted first (p. 109-115). Since problems occurred concerning the final deprotection of **8** only the acid amide of CMP-Neu5Ac was obtained in about 20% yield. Nevertheless this result can be seen as a success, because it proves that *cyclo*Sal-nucleotides can be in principle used for the synthesis of more complex sugar nucleotides, too.

In conclusion, the thesis in hand demonstrates that 5-nitro-substituated *cyclo*Sal-nucleotides are widely applicable chemical synthons that undergo effective, fast and reliable coupling with various nucleophiles yielding the corresponding phosphorylated biomolecules.

7. AUSBLICK

Das breite Anwendungsspektrum von Nitro-substituierten *cyclo*Sal-Nucleotiden konnte in dieser Arbeit bereits erfolgreich durch die Synthese verschiedener Nucleosiddi- und -triphosphate, einiger Dinucleosid-5',5'-oligophosphate, sowie unterschiedlicher Nucleosidmonophosphatpyranosen belegt werden. Die Vielseitigkeit dieser Phosphataktivester als Synthesebausteine wurde außerdem durch die Darstellung einiger Analoga unterstrichen.
Darüber hinaus existieren natürlich zahlreiche weitere Klassen phosphorylierter Naturstoffe, die das in Abbildung 117 allgemeine Strukturschema erfüllen und prinzipiell mit Hilfe von *cyclo*Sal-aktivierten Phosphatestern zugänglich sein sollten. Dabei muss die *cyclo*Saligenyl-Gruppierung nicht zwingend mit einem Nucleotid verestert sein.

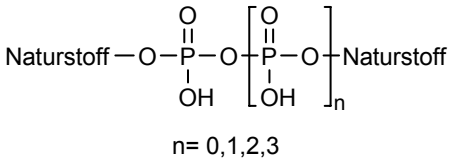


Abbildung 117: Allgemeines Strukturschema phosphorylierter Naturstoffe

In Abbildung 118 sind einige Vorschläge für potentielle neue Zielverbindungen ausgehend von *cyclo*Sal-aktivierten Phosphatestern in einem Sterndiagramm zusammengefasst (s. S. 131).

Gegenwärtig wird in unserer Forschungsgruppe bereits an der Synthese von Nucleosiddiphosphat-Oligosacchariden gearbeitet. Verbindungen dieses Typs wurden erstmals 1960 in humaner Milch (UDP-LacNAc) sowie in der Kolostralmilch der Ziege (UDP-Neu5AcLacNAc) gefunden.[203,204] Aufgrund der geringen Verfügbarkeit ist jedoch sowohl die genaue Funktion als auch die Biosynthese dieser Substanzen bisher nicht vollständig aufgeklärt. Die Vermutung liegt nahe, dass diese NDP-Oligosaccharide Substrate neuartiger Oligosaccharidtransferasen sind, die eine Übertragung des gesamten Oligosaccharids auf einen passenden Glycosylacceptor in einem Schritt zu katalysieren vermögen. Zur weiteren Erforschung dieser Verbindungsklasse sowie zur Verifizierung dieser Vermutung wäre ein effizienter synthetischer Zugang, insbesondere zu Derivaten und Analoga, sehr hilfreich. In

diesem Fall würde zunächst die Darstellung des Oligosaccharid-1-phosphates erfolgen und anschließend dessen Umsetzung mit dem aktivierten *cyclo*Sal-Nucleotid zum gewünschten NDP-Oligosaccharid.

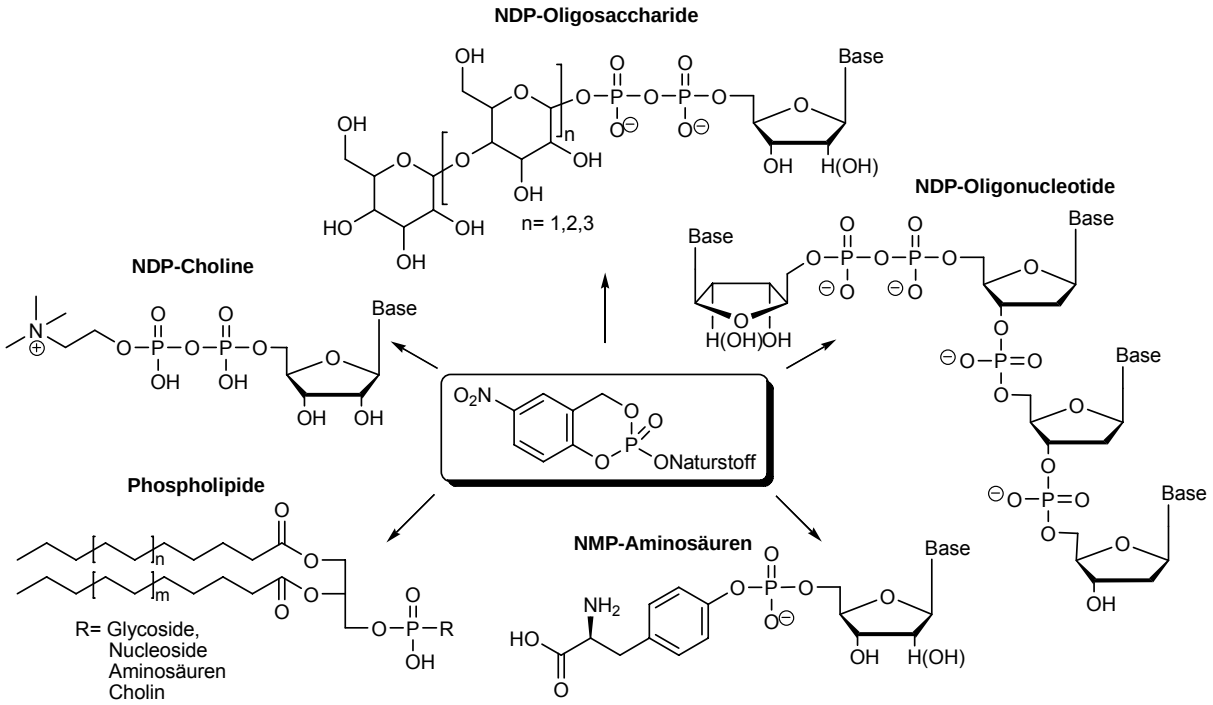


Abbildung 118: Vorschläge für potentielle neue Zielverbindungen

Eine weitere interessante Substanzklasse stellen NDP-Oligonucleotide dar. Diese Biokonjugate können als Primersequenzen für eine Peptidnucleinsäure-gestützte DNA-Synthese eingesetzt werden. Darüber hinaus bieten modifizierte Oligonucleotide die Möglichkeit der direkten Kontrolle von zellulärer oder viraler Genexpression auf Ebene der Transkription oder der Translation.[205,206] Eine weitere Form der Modifikation stellen DNA-Protein-Konjugate dar. Durch die Anknüpfung von Peptiden an den Oligonucleotidstrang werden die Eigenschaften des Oligonucleotids entscheidend verändert; derartige Konjugate finden bereits Anwendung als nicht-radioaktive Marker,[207] als PCR-Primer[208] sowie in der kombinatorischen Chemie.[209] Ferner könnten diese Verbindungen auch als therapeutische Oligonucleotide eingesetzt werden, da durch die Anknüpfung der Peptide die zelluläre Aufnahme dieser Konjugate erleichtert werden kann. DNA-Protein-Konjugate wurden bereits aus verschiedensten Quellen isoliert, unter anderem aus menschlicher Plazenta und Ehrlich-Ascites-Tumorzellen.[210]

Im Fall von 5'-Nucleotid-α-aminosäuren kann die Anknüpfung des Nucleotids prinzipiell über die Aminogruppe oder über eine Hydroxyfunktion in den Seitenketten erfolgen, sodass man zwischen N- und O-Konjugaten differenzieren kann.

Phospholipide weisen als wichtige Lipidklasse eine Vielzahl biologischer Funktionen auf. So sind sie neben ihrer Rolle als Signalmoleküle und Energiereservoirs die zentralen Bestandteile biologischer Membranen bei allen Organismen. Daher besitzen Phospholipide sowohl für pharmazeutische als auch für kosmetische Anwendungen eine große Bedeutung. So werden Liposomen beispielsweise als Wirkstoffschleusen zur besseren Aufnahme von Medikamenten verwendet.[211,212] Dies erfolgt entweder durch Einschließen des Wirkstoffes innerhalb des Liposoms oder durch Anknüpfen des Wirkstoffes als Kopfgruppe im Phospholipid.[213] Liposomen aus AZT-haltigen Phospholipiden zeigen beispielsweise *in vitro* eine deutlich verstärkte Unterdrückung der HI-Virusreplikation.[214,215] Außerdem gibt es eine Reihe von Phosphoglycolipid Antibiotika, die eine hohe Wirksamkeit bei Infektionen durch Gram-positive Bakterien aufweisen.[216]

Eine hoch interessante Verbindung mit zahlreichen pharmakologischen Eigenschaften ist das CDP-Cholin. Es stellt ein essentielles Zwischenprodukt des Zellmembranstoffwechsels dar und wird als wichtigster Baustein bei der Biosynthese von Phosphatidylcholinen zum Aufbau und zur Reparatur von Zellmembranen benötigt. CDP-Cholin weist anti-oxidative, membran-stabilisierende und regenerative Wirkungen auf und wird daher seit über 30 Jahren weltweit erfolgreich zur Schlaganfallbehandlung eingesetzt.[217] Als weitere Einsatzgebiete werden unter anderem Demenz, Parkinson, Alkoholismus sowie der Schutz der Endothelzell-Membranen nach infektiösen Erkrankungen wie Sepsis oder Malaria diskutiert. Eine chemische Synthese von Derivaten oder Analoga dieser Verbindung wäre unter pharmakologischen Aspekten demnach eine interessante Herausforderung.

Die aufgeführten Beispiele zeigen deutlich, dass das Anwendungsspektrum von *cyclo*Sal-aktivierten Phosphatestern zur Synthese biologisch relevanter Biokonjugate aufgrund der enormen Vielfalt von phosphorylierten Naturstoffen deutlich ausgeweitet werden kann. Ihre maßgebliche Beteiligung an nahezu allen biologischen Vorgängen und dem damit verbundenen großen pharmakologischen

Potential macht diese Verbindungen nach wie vor zu interessanten Zielstrukturen der organisch-präparativen Chemie.

8. EXPERIMENTELLER TEIL

8.1 Allgemeines

8.1.1 Edukte und Reagenzien

Acetanhydrid:	unter Inertgas destilliert
Acetylchlorid:	unter Inertgas destilliert
Di-*iso*-propylethylamin:	mehrere Tage unter Rückfluss über Calciumhydrid getrocknet und destilliert
Phosphor(III)-chlorid:	unter Inertgas destilliert
Phosphor(V)-chlorid:	unter Inertgas destilliert
Triethylamin:	mehrere Tage unter Rückfluss über Calciumhydrid getrocknet und destilliert

8.1.2 Lösungsmittel

Die folgenden Lösungsmittel wurden in technischer Qualität bezogen und vor ihrer Verwendung gereinigt. Alle anderen Lösungsmittel wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Dichlormethan:	über Calciumchlorid getrocknet und destilliert
Ethylacetat:	über Calciumchlorid getrocknet und destilliert
Methanol:	destilliert
Petrolether 50/70:	destilliert

8.1.3 Absolute Lösungsmittel

Acetonitril:	mehrere Tage unter Rückfluss über Calciumhydrid getrocknet, destilliert und über Molekularsieb 3Å aufbewahrt
$CDCl_3$:	über Molekularsieb 4Å getrocknet
Dichlormethan:	mehrere Tage unter Rückfluss über Calciumhydrid getrocknet, destilliert und über Molekularsieb 4Å aufbewahrt

Diethylether:	mehrere Tage unter Rückfluss über Kalium/Benzophenon getrocknet, destilliert und über Molekularsieb 4Å aufbewahrt
N,*N*-Dimethylformamid:	Fluka Nr. 40248, absolut über Molekularsieb
DMSO-d_6:	über Molekularsieb 4Å getrocknet
Methanol:	Fluka Nr. 65542, absolut über Molekularsieb
Pyridin:	mehrere Tage unter Rückfluss über Calciumhydrid getrocknet, destilliert und über Molekularsieb 4Å aufbewahrt
Tetrahydrofuran:	mehrere Tage unter Rückfluss über Kalium/Benzophenon getrocknet, destilliert und über Molekularsieb 4Å aufbewahrt
Trimethylphosphat:	destilliert und über Molsieb 3Å getrocknet

8.1.4 Chromatographie

Dünnschichtchromatographie:

Es wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator (Merck Nr. 5554, Schichtdicke 0.2 mm) verwendet. Alle R_f-Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt. Die Detektion der UV-aktiven Verbindungen erfolgte mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm und 366 nm. Als Färbereagenz wurde ein Gemisch aus *p*-Methoxybenzaldehyd (0.7 mL), Ethanol (99.8%, 27 mL), konz. Schwefelsäure (1.0 mL) und Essigsäure (0.3 mL) verwendet.

Präparative Dünnschichtchromatographie:

Mit einem Chromatotron der Firma Harrison Research, Modell 7924 T, wurden Substanzgemische mit Rohausbeuten von maximal 4 g getrennt. Als Trennmittel diente gipshaltiges Kieselgel 60 PF254 (Merck Nr. 7749) in Schichtdicken von 1, 2 und 4 mm auf Glasplatten (Durchmesser: 20 cm). Die Detektion der UV-aktiven Verbindungen erfolgte mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm.

Säulenchromatographie:

Für säulenchromatographische Trennungen wurde VWR-Kieselgel 60 (0.040-0.063 mm, 230-400 mesh ASTM) verwendet.

Umkehrphasenchromatographie:

Für Dünnschichtchromatogramme wurde RP-18 $F_{254\,s}$ DC-Folie der Firma Merck verwendet. Für die Säulenchromatographie wurde LiChroprep RP-18 (40-63 µm, Merck) eingesetzt.

Größenausschlusschromatographie:

Es wurden G-15 Sephadex- sowie Biogel P2-Phasen verwendet.

8.1.5 Spektroskopie

Kernresonanzspektroskopie (NMR):

Die NMR-Spektren wurden in der spektroskopischen Abteilung des Instituts für organische Chemie sowie des Instituts für anorganische Chemie der Universität Hamburg auf Geräten der Firma Bruker aufgenommen.

Auf dem Modell AMX 400 wurden 400 MHz-^{1}H-NMR-, 101 MHz-^{13}C-NMR- und 162 MHz-^{31}P-NMR-Spektren gemessen.

Auf dem Modell DRX 500 wurden HH-COSY-, HMQC- und HMBC-Korrelationsspektren aufgenommen.

Die chemische Verschiebung δ [ppm] wurde auf die Lösungsmittelsignale kalibriert, wobei DMSO-d_6 auf 2.50 (^{1}H) bzw. 39.52 (^{13}C) ppm, $CDCl_3$ auf 7.26 (^{1}H) bzw. 77.16 (^{13}C) ppm, MeOD auf 3.31 (^{1}H) bzw. 49.05 (^{13}C) ppm und D_2O auf 4.79 (^{1}H) ppm gesetzt wurde. Die in D_2O gemessenen ^{13}C-NMR-Spektren wurden nicht kalibriert. Die Verschiebungen der ^{31}P-NMR-Signale wurden gegen einen externen Standard von 85%-iger Phosphorsäure angegeben.

Massenspektrometrie (MS):

Die EI-Massenspektren wurden an einem VG Analytical VG/70-250S-Spektrometer (doppelt fokussiert) aufgenommen.

Die HR-ESI-Massenspektren wurden an einem ThermoQuest MAT 95XL Massenspektrometer der Firma Finnigan aufgenommen sowie an einem Agilent Technologies ESI-TOF 6224 Massenspektrometer (Negativ oder Positiv-Modus).

Die HR-FAB-Massenspektren wurden an einem VG Analytical VG/70-250S-Spektrometer mit einer MCA Methode und einer *meta*-Nitrobenzylalkohol–Matrix gemessen.

Infrarotspektroskopie (IR):
Die IR-Spektren wurden an einem ALPHA-P FT-IR Spektrometer der Firma Bruker aufgenommen.

8.1.6 Geräte

Gefriertrocknung:
Wässrige Lösungen wurden an einer Christ-Alpha 2-4 Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert.

Zentrifuge:
Suspensionen wurden an einer Heraeus Biofuge Primo R zentrifugiert.

8.2 Synthesen

8.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

AAV 1: Synthese der vollgeschützten Nucleoside

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Das zu schützende Nucleosid wurde zunächst dreimal mit absolutem Pyridin coevaporiert und anschließend in abs. Pyridin gelöst beziehungsweise suspendiert (4.5 mL pro mmol Nucleosid). Es wurden 1.2 Äquivalente *tert*-Butyldimethylsilylchlorid portionsweise zugegeben und das Reaktionsgemisch 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständiger Umsetzung (DC-Kontrolle DCM/MeOH 7:4 v/v) wurde die Reaktionslösung bei Raumtemperatur mit Essigsäureanhydrid (4.5 Äquivalente pro Hydroxy- bzw. Aminogruppe) versetzt und 4-5 h bei dieser Temperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle DCM/MeOH 19:1 v/v) wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert und das erhaltene Rohprodukt mehrmals mit Toluol codestilliert, bis kein Pyridingeruch mehr wahrnehmbar war. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat

getrocknet, filtriert und nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum säulenchromatographisch (PE/EE 3:2) gereinigt.

AAV 2: Spaltung von tert-Butyldimethylsilylethern

Der zu spaltende Silylether wurde in einem Gemisch aus Dichlormethan und Tetrahydrofuran (1:1 v/v) gelöst, mit 6.0 Äquivalenten Triethylamintrihydrofluorid versetzt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle DCM/MeOH 9:1 v/v) wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (EE/MeOH 4:1 v/v) gereinigt.

AAV 3: Synthese von cycloSaligenylchlorphosphiten

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 1.0 Äquivalente des entsprechenden Salicylalkohols in absolutem Diethylether gelöst und auf -20 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 1.2 Äquivalente frisch destilliertes Phosphor(III)-chlorid zugegeben und circa 10 min gerührt. Anschließend wurden ebenfalls bei -20 °C über einen Zeitraum von 2 h 2.3 Äquivalente abs. Pyridin, gelöst in abs. Diethylether, zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch noch 1-2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Ansätze wurden über Nacht bei -20 °C gelagert, um ein möglichst vollständiges Ausfallen des entstandenen Pyridiniumchlorids herbeizuführen, welches nachfolgend unter Schutzgas abfiltriert wurde. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert. Die erhaltenen Rohprodukte der Saligenylchlorphosphite wurden ohne weitere Reinigung zu den *cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphaten umgesetzt.

AAV 4: Synthese von cycloSal-Nucleotiden

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Das zu veresternde Nucleosid wurde in absolutem Acetonitril gelöst und bei –20 °C mit je 2.0 Äquivalenten DIPEA sowie 2.0 Äquivalenten des entsprechenden Saligenylchlorphosphits, ebenfalls gelöst in wasserfreiem Acetonitril, langsam versetzt. Nach beendeter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch bis zur vollständigen Umsetzung des Nucleosids (DC-Kontrolle: DCM/MeOH 9:1) bei Raumtemperatur gerührt (2-5 h). Anschließend wurden bei –10 °C 4.0 Äquivalente Oxone® (2.0 Äquivalente pro zu oxidierendem Phosphoratom), gelöst in Wasser, zugegeben.

Nach beendeter Zugabe wurde das Kältebad entfernt und die erhaltene Suspension 10-15 min gerührt. Nach vollendeter Oxidation (DC-Kontrolle DCM/MeOH 9:1 v/v) wurde das Reaktionsgemisch direkt je zweimal mit Ethylacetat und kaltem Wasser extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde nochmals in Dichlormethan aufgenommen und von unlöslichen Bestandteilen durch Filtration befreit. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurden die erhaltenen nahezu farblosen Schäume erhalten.
Die 5-Chlor-substituierten Rohprodukte wurden am Chromatotron (DCM/MeOH-Gradient (angesäuert mit 0.1% Essigsäure)) gereinigt und anschließend gefriergetrocknet (Acetonitril und Wasser (1:2 v/v)).
Die 5-Nitro-substituierten Rohprodukte wurden in der Regel ohne einen weiteren Reinigungsschritt lyophilisiert, da sie bereits in einer hohen Reinheit vorliegen und somit direkt für die nachfolgenden Reaktionen eingesetzt werden können. In seltenen Fällen erfolgte auch hier die Reinigung am Chromatotron (DCM (angesäuert mit 0.5% Essigsäure)/MeOH-Gradient (angesäuert mit 0.5% Essigsäure)) und im Anschluss die Gefriertrocknung aus Acetonitri und Wasser (1:2 v/v).

AAV 5: Synthese peracetylierter Glycopyranosen

Die entsprechende Glycopyranose wurde in absolutem Pyridin gelöst und bei 0 °C mit Essigsäureanhydrid (3.0 Äquivalente pro zu acetylierende OH-Gruppe) tropfenweise versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und 16 h gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle PE/EE 1:1) wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der erhaltene Rückstand mehrmals mit Toluol coevaporiert, bis kein Pyridingeruch mehr vorhanden war. Das Rohprodukt wurde in Ethylacetat aufgenommen und gründlich mit Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum säulenchromatographisch (PE/EE 3:2) gereinigt.

AAV 6: Selektive Entschützung der anomeren Hydroxygruppe peracetylierter Glycopyranosen

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Die zu entschützende Pyranose wurde in absolutem DMF gelöst und mit 1.2 Äquivalenten Hydraziniumacetat versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde zum Lösen des Hydraziniumacetats kurzzeitig auf 50 °C erwärmt und im Anschluss 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle PE/EE 3:2 v/v) wurde das Reaktionsgemisch mit Ethylacetat verdünnt und zweimal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel mit Hilfe einer Arbeitskühlfalle im Ölpumpenvakuum entfernt. Der erhaltene ölige Rückstand wurde mehrfach mit Toluol und Dichlormethan coevaporiert und anschließend säulenchromatographisch (PE/EE 1:2) gereinigt.

AAV 7: Synthese von Nucleosid-5'-di- und –triphosphaten sowie Dinucleosid-5',5'-oligophosphaten

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 2.0 Äquivalente des jeweiligen Phosphatsalzes wurden zunächst 3 h im Vakuum getrocknet, anschließend in absolutem DMF gelöst und eine weitere Stunde über einigen Körnern aktiviertem Molsieb (4Å) getrocknet. Das jeweilige *cyclo*Sal-Nucleotid (1.0 Äquivalente) wurde ebenfalls einige Zeit im Vakuum getrocknet, anschließend in wasserfreiem DMF gelöst und mit Hilfe eines Tropftrichters langsam zu der Lösung des entsprechenden Nucleophils getropft. Das Reaktionsgemisch wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständiger Umsetzung der *cyclo*Sal-Verbindung (DC-Kontrolle DCM/MeOH 9:1 v/v) wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der erhaltene Rückstand mehrmals mit Ethylacetat und Wasser extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden gefriergetrocknet und das erhaltene Rohprodukt in einem Gemisch aus Methanol, Wasser sowie Triethylamin (7:3:1 v/v) aufgenommen und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Methanols im Vakuum wurde die Reaktionslösung mit Wasser verdünnt und wieder gefriergetrocknet.

Variante A: Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und mittels Ionenaustauschchromatographie an Dowex (W50x8, NH_4^+) in das entsprechende Ammoniumsalz überführt. Nach erneuter Gefriertrocknung wurde das Rohprodukt

säulenchromatographisch an RP-18-Silicagel mit Wasser als Eluent gereinigt. Die Detektion der Produktfraktionen erfolgte dünnschichtchromatographisch mit einem Gemisch aus *iso*-Propanol und einer 1 M Ammoniumacetat-Lösung (2:1 v/v). Nach Gefriertrocknung wurden die reinen Produkte in Form ihrer Ammoniumsalze als farblose Feststoffe erhalten.
Variante B: Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an RP-18-Silicagel mit Wasser als Eluent gereinigt. Die Detektion der Produktfraktionen erfolgte dünnschichtchromatographisch mit einem Gemisch aus *iso*-Propanol und einer 1 M Ammoniumacetat-Lösung (2:1 v/v). Durch nachfolgende Gefriertrocknung wurden die reinen Produkte in Form ihrer Triethylammoniumsalze als farblose Feststoffe erhalten.

AAV 8: Synthese von Nucleosidmonophosphatpyranosen

Die Reaktionen wurden unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Die entsprechende Glycopyranose (4.0 Äquivalente) wurde mit gewaschenem Natriumhydrid (4.0 Äquivalente) zunächst eine Stunde im Vakuum getrocknet und anschließend in absolutem Dichlormethan gelöst. Das *cyclo*Sal-Nucleotid wurde ebenfalls einige Zeit im Vakuum getrocknet und anschließend, gelöst in abs. Dichlormethan, zu der deprotonierten Pyranose getropft. Das Reaktionsgemisch wurde bis zur vollständigen Umsetzung (DC-Kontrolle DCM/MeOH 9:1 v/v) etwa 1-2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der erhaltene Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und mehrfach mit Wasser extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden anschließend gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde in einem Gemisch aus Methanol, Wasser und Triethylamin (7:3:1 v/v) aufgenommen und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Methanols im Vakuum wurde die Reaktionslösung mit Wasser verdünnt und erneut gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an RP-18-Silicagel mit Wasser als Eluent gereinigt. Die Detektion der Produktfraktionen erfolgte dünnschichtchromatographisch mit einem Gemisch aus *iso*-Propanol und einer 1 M Ammoniumacetat-Lösung (2:1 v/v). Durch nachfolgende Gefriertrocknung wurden die reinen Produkte als farblose Feststoffe erhalten.

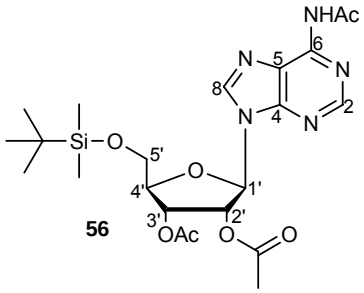
AAV 9: Ionenaustausch an Phosphatsalzen

Variante A: Das entsprechende Natriumsalz wurde durch Säulenchromatographie an DOWEX-50x8-Ionenaustauscherharz (H^+-Form) mit Wasser als Eluent in die freie Säure überführt. Das Eluat wurde sofort mit 40 %-iger wässriger tetra-*n*-Butylammoniumhydroxid-Lösung auf pH=6 titriert und anschließend lyophilisiert.
Variante B: Das Eluat wurde mit einigen Millilitern THF versetzt und durch Zugabe von Triethylamin auf pH=6 titriert. Das Lösungsmittel wurde durch Gefriertrocknung entfernt.

8.2.2 Synthese der modifizierten Nucleoside

Synthese von 5'-O-(tert-Butyldimethylsilyl)-N^6,2',3'-triacetyladenosin ***56***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 1 durchgeführt. Es wurden 3.00 g Adenosin **51** (11.2 mmol, 1.0 Äq.), 2.00 g *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (13.4 mmol, 1.2 Äq.), 14.3 mL Essigsäureanhydrid (151 mmol, 13.5 Äq) und 50 mL Pyridin eingesetzt.



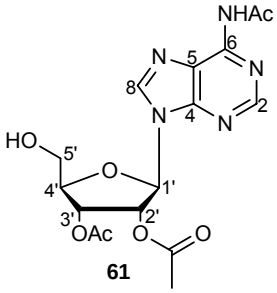
56

Ausbeute: 4.66 g (9.18 mmol, 82%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{22}H_{33}N_5O_7Si$; Molgewicht: 507.6 g/mol; R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.73.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 8.69 (s, 1H, H2), 8.62 (s, 1H, NH), 8.37 (s, 1H, H8), 6.39 (d, $^3J_{HH}$ = 6.8 Hz, 1H, H1'), 5.77 (dd, $^3J_{HH}$ = 5.2 Hz, $^3J_{HH}$ = 6.8 Hz, 1H, H2'), 5.53 (dd, $^3J_{HH}$ = 2.6 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.2 Hz, 1H, H3'), 4.33-4.32 (m, 1H, H4'), 3.96 (dd, $^3J_{HH}$ = 2.4 Hz, $^2J_{HH}$ = 11.6 Hz, 1H, H5'), 3.89 (dd, $^3J_{HH}$ = 2.3 Hz, $^2J_{HH}$ = 11.6 Hz, 1H, H5'), 2.61 (s, 3H, NH-Acetyl), 2.15, 2.03 (je s, je 3H, CH_3-Acetyl), 0.95 (s, 9H, *t*Bu-CH_3), 0.15 (s, 6H, Silyl-CH_3).
^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 170.4, 170.0, 169.5 (C_q-Acetyl), 152.8 (C2), 151.5 (C4), 149.4 (C6), 140.9 (C8), 121.8 (C5), 85.1 (C1'), 84.3 (C4'), 74.4 (C2'), 72.0 (C3'), 26.1 (*t*Bu-CH_3), 25.8 (NH-CH_3-Acetyl), 20.8, 20.5 (CH_3-Acetyl), 18.5 (C_q-*t*Bu), -5.3 (Silyl-CH_3).
MS (FAB): ber. 508.6 [M+H^+], gef. 508.4.
IR ν [cm^{-1}]: 2928, 2856, 1747, 1702, 1605, 1584, 1464, 1371, 1330, 1117, 1007, 976, 830.

*Synthese von N^6,2',3'-Triacetyladenosin **61***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 2 durchgeführt. Es wurden 4.00 g 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-N^6,2',3'-triacetyladenosin **56** (7.90 mmol, 1.0 Äq.), 7.70 mL Triethylamintrihydrofluorid (47.0 mmol, 6.0 Äq.), 20 mL Dichlormethan und 20 mL THF eingesetzt.



61

Ausbeute: 2.80 g (7.10 mmol, 92%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{16}H_{19}N_5O_7$; Molgewicht: 393.4 g/mol; R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.62.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 10.76 (s, 1H, NH), 8.71 (s, 1H, H8), 8.68 (s, 1H, H2), 6.31 (d, $^3J_{HH}$ = 6.5 Hz, 1H, H1'), 5.96 (dd, $^3J_{HH}$ = 5.6 Hz, $^3J_{HH}$ = 6.5 Hz, 1H, H2'), 5.45 (dd, $^3J_{HH}$ = 3.0 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.6 Hz, 1H, H3'), 5.42 (t, $^3J_{HH}$ = 5.4 Hz, 1H, OH), 4.27-4.25 (m, 1H, H4'), 3.77-3.72 (m, 1H, H5'), 3.69-3.63 (m, 1H, H5'), 2.26 (s, 3H, NH-Acetyl), 2.21, 1.99 (je s, je 3H, CH_3-Acetyl).

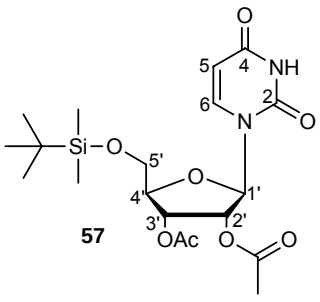
^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 169.5, 169.2, 168.9 (C_q-Acetyl), 151.9 (C2), 151.6 (C4), 149.8 (C6), 123.6 (C5), 85.1 (C1'), 83.7 (C4'), 72.6 (C2'), 71.1 (C3'), 60.9 (C5'), 24.3 (NH-CH_3-Acetyl), 20.4, 20.2 (CH_3-Acetyl).

MS (FAB): ber. 394.4 [M+H^+], gef. 394.3.

IR ν [cm^{-1}]: 3250, 3119, 2930, 2858, 1746, 1702, 1606, 1585, 1485, 1370, 1211, 1083, 952, 917.

*Synthese von 5'-O-(tert-Butyldimethylsilyl)-2',3'-*O*-acetyluridin **57***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 1 durchgeführt. Es wurden 3.00 g Uridin **52** (12.3 mmol, 1.0 Äq.), 2.22 g *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (14.7 mmol, 1.2 Äq.), 10.5 mL Essigsäureanhydrid (111 mmol, 9.0 Äq) und 50 mL Pyridin eingesetzt.



57

Ausbeute: 4.63 g (10.5 mmol, 85%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{19}H_{30}N_2O_8Si$; Molgewicht: 442.5 g/mol; R_f-Wert (PE/EE 2:3 v/v): 0.42.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 9.05 (s, 1H, NH), 7.86 (d, $^3J_{HH}$ = 8.2 Hz, 1H, H6), 6.29 (d, $^3J_{HH}$ = 6.8 Hz, 1H, H1'),

5.73 (dd, $^4J_{HH}$ = 1.8 Hz, $^3J_{HH}$ = 8.2 Hz, 1H, H5), 5.35-5.31 (m, 2H, H2', H3'), 4.21-4.20 (m, 1H, H4'), 3.92 (dd, $^3J_{HH}$ = 1.9 Hz, $^2J_{HH}$ = 11.5 Hz, 1H, H5'), 3.83 (dd, $^3J_{HH}$ = 1.7 Hz, $^2J_{HH}$ = 11.5 Hz, 1H, H5'), 2.13, 2.07 (je s, je 3H, CH_3-Acetyl), 0.94 (s, 9H, *t*Bu-CH_3), 0.15, 0.13 (je s, je 3H, Silyl-CH_3).

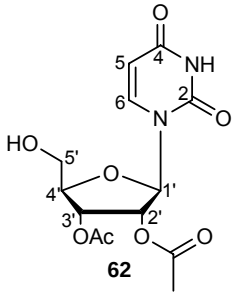
^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 170.1, 170.0 (C_q-Acetyl), 163.0 (C4), 150.7 (C2), 139.7 (C6), 103.3 (C5), 85.4 (C1'), 83.9 (C4'), 73.5 (C2'), 71.9 (C3'), 63.3 (C5'), 26.0 (*t*Bu-CH_3), 20.8, 20.5 (CH_3-Acetyl), 18.4 (C_q-*t*Bu), -5.5 (Silyl-CH_3).

MS (FAB): ber. 443.5 [M+H$^+$], gef. 443.4.

IR (KBr) ν [cm^{-1}]: 3207, 3072, 2955, 2931, 2859, 1751, 1460, 1378, 1244, 1093, 1046, 1002, 833, 779.

Synthese von 2',3'-O-Acetyluridin ***62***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 2 durchgeführt. Es wurden 4.3 g 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-*O*-acetyluridin **57** (9.7 mmol, 1.0 Äq.), 9.5 mL Triethylamin-trihydrofluorid (58 mmol, 6.0 Äq.), 20 mL Dichlormethan und 20 mL THF eingesetzt.



62

Ausbeute: 2.87 g (8.73 mmol, 90%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{13}H_{16}N_2O_6$; Molgewicht: 328.3 g/mol; R_f-Wert (EE/MeOH 9:1 v/v): 0.67.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 11.41 (s, 1H, NH), 7.90 (d, $^3J_{HH}$ = 8.1 Hz, 1H, H6), 6.02 (d, $^3J_{HH}$ = 6.2 Hz, 1H, H1'), 5.73 (d, $^3J_{HH}$ = 8.1 Hz, 1H, H5), 5.41 (bs, 1H, OH), 5.37-5.31 (m, 2H, H2', H3'), 4.15-4.13 (m, 1H, H4'), 3.67-3.60 (m, 2H, H5'), 2.10, 2.02 (je s, je 3H, CH_3-Acetyl).

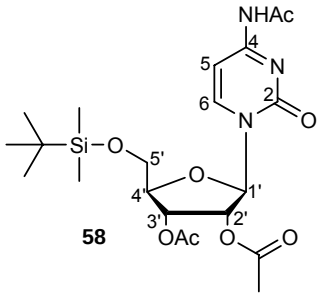
^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 169.5, 169.3 (C_q-Acetyl), 162.9 (C4), 150.5 (C2), 140.3 (C6), 102.6 (C5), 85.4 (C1'), 83.1 (C4'), 72.3 (C2'), 71.0 (C3'), 60.8 (C5'), 20.4, 20.2 (CH_3-Acetyl).

MS (FAB): ber. 329.3 [M+H$^+$], gef. 329.2.

IR (KBr): ν [cm^{-1}]= 3447, 3066, 2939, 1751, 1690, 1464, 1378, 1244, 1107, 1047, 816.

*Synthese von 5'-O-(tert-Butyldimethylsilyl)-N^4,2',3'-triacetylcytidin **58***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 1 durchgeführt. Es wurden 3.50 g Cytidin **53** (14.4 mmol, 1.0 Äq.), 2.59 g *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (17.3 mmol, 1.2 Äq.), 18.3 mL Essigsäureanhydrid (194 mmol, 13.5 Äq) und 60 mL Pyridin eingesetzt.



58

Ausbeute: 5.64 g (11.7 mmol, 81%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{21}H_{33}N_3O_8Si$; Molgewicht: 483.6 g/mol; R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.67.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 10.97 (s, 1H, NH), 8.20 (d, $^3J_{HH}$ = 7.6 Hz, 1H, H6), 7.23 (d, $^3J_{HH}$ = 7.6 Hz, 1H, H5), 6.02 (d, $^3J_{HH}$ = 4.5 Hz, 1H, H1'), 5.38 (dd, $^3J_{HH}$ = 4.5 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.3 Hz, 1H, H2'), 5.31 (dd, $^3J_{HH}$ = 5.3 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.3 Hz, 1H, H3'), 4.27-4.24 (m, 1H, H4'), 3.94 (dd, $^3J_{HH}$ = 2.7 Hz, $^2J_{HH}$ = 11.8 Hz, 1H, H5'), 3.80 (dd, $^3J_{HH}$ = 3.2 Hz, $^2J_{HH}$ = 11.8 Hz, 1H, H5'), 2.10, 2.07, 2.05 (je s, je 3H, CH_3-Acetyl), 0.88 (s, 9H, *t*Bu-CH_3), 0.08, 0.07 (je s, je 3H, Silyl-CH_3).

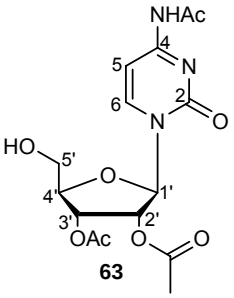
^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 171.1, 169.3, 169.2 (C_q-Acetyl), 162.7 (C4), 154.3 (C2), 144.7 (C6), 95.8 (C5), 88.1 (C1'), 82.3 (C4'), 73.5 (C2'), 69.8 (C3'), 25.6 (*t*Bu-CH_3), 24.4 (NH-CH_3-Acetyl), 20.3, 20.2 (CH_3-Acetyl), 17.9 (C_q-*t*Bu), -5.7, -5.8 (Silyl-CH_3).

MS (FAB): ber. 484.6 [M+H$^+$], gef. 484.2.

IR ν [cm^{-1}]: 2929, 2857, 1748, 1669, 1557, 1489, 1371, 1224, 1083, 999, 830, 810, 780.

*Synthese von N^4,2',3'-Triacetylcytidin **63***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 2 durchgeführt. Es wurden 2.50 g 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-*N*^{4},2',3'-triacetylcytidin **58** (5.17 mmol, 1.0 Äq.), 5.1 mL Triethylamin-trihydrofluorid (31 mmol, 6.0 Äq.), 12 mL Dichlormethan und 12 mL THF eingesetzt.



63

Ausbeute: 1.70 g (4.60 mmol, 89%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{15}H_{19}N_3O_8$; Molgewicht: 369.3 g/mol; R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.48.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 9.25 (s, 1H, NH), 8.17 (d, $^3J_{HH}$ = 7.5 Hz, 1H, H6), 7.45 (d, $^3J_{HH}$ = 7.5 Hz, 1H, H5), 6.03 (d, $^3J_{HH}$ = 4.8 Hz, 1H, H1'), 5.62 (dd, $^3J_{HH}$ = 4.8 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.3 Hz, 1H, H2'), 5.53 (dd, $^3J_{HH}$ = 5.0 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.3 Hz, 1H, H3'), 4.28-4.26 (m, 1H, H4'), 4.00 (d, $^2J_{HH}$ = 11.2 Hz, 1H, H5'), 3.85 (d, $^2J_{HH}$ = 11.2 Hz, 1H, H5'), 2.25 (s, 3H, NH-Acetyl), 2.11, 2.08 (je s, je 3H, CH_3-Acetyl).

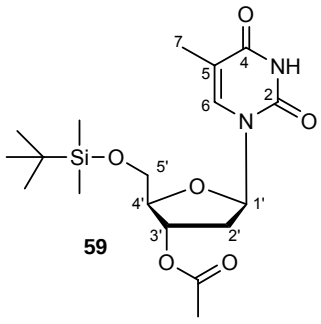
^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 171.5, 169.8, 169.6 (C_q-Acetyl), 163.1 (C4), 154.9 (C2), 145.9 (C6), 96.4 (C5), 88.3 (C1'), 83.3 (C4'), 73.7 (C2'), 70.6 (C2'), 60.7 (C5'), 24.8 (NH-CH_3-Acetyl), 20.8, 20.6 (CH_3-Acetyl).

MS (FAB): ber. 370.3 [M+H$^+$], gef. 370.2.

IR ν [cm^{-1}]: 3463, 3270, 3134, 2929, 2858, 1744, 1652, 1554, 1493, 1371, 1232, 1064, 1041, 812.

*Synthese von 5'-O-(tert-Butyldimethylsilyl)-3'-O-acetyl-2'-desoxythymidin **59***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 1 durchgeführt. Es wurden 5.00 g 2'-Desoxythymidin **54** (20.6 mmol, 1.0 Äq.), 3.72 g *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (24.8 mmol, 1.2 Äq.), 8.8 mL Essigsäureanhydrid (93 mmol, 4.5 Äq) und 90 mL Pyridin eingesetzt.



59

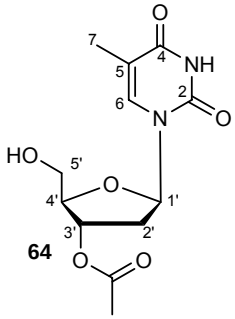
Ausbeute: 7.55 g (18.9 mmol, 92%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{18}H_{30}N_2O_6Si$; Molgewicht: 398.5 g/mol; R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.65.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 8.61 (s, 1H, N*H*), 7.54 (q, $^4J_{HH}$ = 1.3 Hz, 1H, H6), 6.36 (dd, $^3J_{HH}$ = 9.2 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.1 Hz, 1H, H1'), 5.24–5.32 (m, 1H, H3'), 4.09 (dt, $^3J_{HH}$ = 2.4 Hz, $^3J_{HH}$ = 2.4 Hz, 1H, H4'), 3.91–3.90 (m, 2H, H5'), 2.40 (ddd, $^2J_{HH}$ = 14.0 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.8 Hz, $^3J_{HH}$ = 2,4 Hz, 1H, H2'a), 2.09 (ddd, $^2J_{HH}$ = 14.0 Hz, $^3J_{HH}$ = 8.2 Hz, $^3J_{HH}$ = 6.1 Hz, 1H, H2'b), 2.09 (s, 3H, CH_3-Acetyl), 1.92 (d, $^4J_{HH}$ = 1.3 Hz, 3H, H7), 0.93 (s, 9H, *t*Bu-CH_3), 0.13 (s, 6H, Silyl-CH_3).

^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 170.8 (C_q-Acetyl), 163.7 (C4), 150.4 (C2), 135.2 (C6), 111.4 (C5), 85.5 (C4'), 84.8 (C1'), 75.5 (C3'), 63.7 (C5'), 38.1 (C2'), 26.1 (*t*Bu-CH_3), 21.2 (CH_3-Acetyl), 18.5 (C_q-*t*Bu), 12.6 (C7), -5.3 (Silyl-CH_3).
MS (EI): ber.: 389 (M); gef.: 389 (M, 5 %), 341 (68), 281 (19), 165 (21), 145 (30), 117 (45), 81 (100), 43 (25).
IR (KBr): ν [cm^{-1}] = 3245, 3071, 2928, 2883, 1728, 1689, 1462, 1363, 1248, 1120, 1003, 834, 782.

*Synthese von 3'-O-Acetyl-2'-desoxythymidin **64***

5´-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-3´-*O*-acetyl-2'-desoxythymidin **59** (7.40 g, 18.6 mmol, 1.0 Äq.) wurde bei Raumtemperatur in THF gelöst, mit 1.5 Äquivalenten einer 1.0 M Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung (27.8 mL, 27.8 mmol) versetzt und 1 h gerührt. Nach vollständiger Reaktion (DC-Kontrolle DCM/MeOH 9:1 v/v) wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Essigester/Methanol 4:1 v/v) gereinigt.

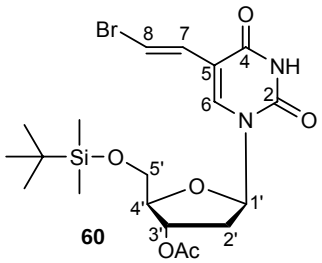


Ausbeute: 5.02 g (17.6 mmol, 95%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{12}H_{16}N_2O_6$; Molgewicht: 284.3; R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.54.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 8.35 (s, 1H, N*H*), 7.48 (q, $^4J_{HH}$ = 0.8 Hz, 1H, H6), 6.24 (dd, $^3J_{HH}$ = 8.1 Hz, $^3J_{HH}$ = 8.1 Hz, 1H, H1'), 5.34 (dt, $^3J_{HH}$ = 5.8 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.1 Hz, 1H, H3'), 4.10–4.08 (m, 1H, H4'), 3.96–3.89 (m, 2H, H5'), 2.43–2.37 (m, 2H, H2'), 2.11 (s, 3H, CH_3-Acetyl), 1.92 (d, $^4J_{HH}$ = 1.0 Hz, 3H, H7).
^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 170.8 (C_q-Acetyl), 163.6 (C4), 150.4 (C2), 136.3 (C6), 111.6 (C5), 86.2 (C4'), 85.2 (C1'), 74.8 (C3'), 62.8 (C5'), 37.3 (C2'), 21.1 (CH_3-Acetyl), 12.8 (C7).
MS (EI): ber.: 284 (M); gef.: 284 (M, 4 %),159 (18), 99 (100), 69 (92), 43 (59), 40 (72).
IR (KBr): ν [cm^{-1}]= 3469, 3192, 3071, 2951, 2920, 2794, 1709, 1660, 1473, 1244, 1093, 1021, 961, 876, 786, 563.

*Synthese von 5'-O-(tert-Butyldimethylsilyl)-3'-O-acetyl-BVdU **60***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 1 durchgeführt. Es wurden 900 mg BVdU **55** (2.70 mmol, 1.0 Äq.), 530 mg *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (3.30 mmol, 1.2 Äq.), 1.20 mL Essigsäureanhydrid (12.0 mmol, 4.5 Äq) und 20 mL Pyridin eingesetzt.



60

Ausbeute: 1.00 g (2.00 mmol, 76%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{19}H_{29}BrN_2O_6Si$; Molgewicht: 489.4 g/mol; R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.75.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 9.28 (s, 1H, NH), 7.75 (s, 1H, H6), 7.40 (d, $^3J_{HH}$ = 13.6 Hz, 1H, H8), 6.66 (d, $^3J_{HH}$ = 13.6 Hz, 1H, H7), 6.32 (dd, $^3J_{HH}$ = 5.4 Hz, $^3J_{HH}$ = 8.8 Hz, 1H, H1'), 5.24-5.22 (m, 1H, H3'), 4.14-4.13 (m, 1H, H4'), 3.92-3.91 (m, 2H, H5'), 2.50 (dd, $^3J_{HH}$ = 5.4 Hz, $^2J_{HH}$ = 14.3 Hz, 1H, H2'), 2.15-2.05 (m, 4H, H2', CH_3-Acetyl), 0.93 (s, 9H, *t*Bu-CH_3), 0.15, 0.13 (je s, je 3H, Silyl-CH_3).

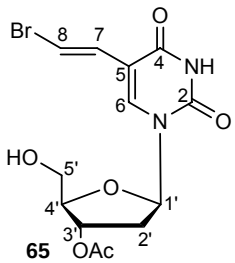
^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 170.7 (C_q-Acetyl), 161.4 (C4), 149.4 (C2), 137.3 (C6), 128.5 (C7), 111.8 (C5), 110.4 (C8), 86.1 (C4'), 85.7 (C1'), 75.4 (C3'), 63.7 (C5'), 38.8 (C2'), 26.1 (*t*Bu-CH_3), 21.1 (CH_3-Acetyl), 18.5 (C_q-*t*Bu), -5.2, -5.3 (Silyl-CH_3).

MS (FAB): ber. 489.0, 491.0 [M+H$^+$], gef. 489.2, 491.2.

IR ν [cm^{-1}]: 3186, 3061, 2952, 2928, 2856, 1679, 1460, 1404, 1232, 1195, 1122, 1003, 940, 889, 829.

*Synthese von 3'-O-Acetyl-BVdU **65***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 2 durchgeführt. Es wurden 860 mg 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-3'-*O*-acetyl-BVdU **60** (1.80 mmol, 1.0 Äq.), 1.70 mL Triethylamin-trihydrofluorid (11.0 mmol, 6.0 Äq.), 5 mL Dichlormethan und 5 mL THF eingesetzt.



65

Ausbeute: 630 mg (1.70 mmol, 89%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{13}H_{15}BrN_2O_6$; Molgewicht: 375.2 g/mol; R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.65.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 11.61 (s, 1H, NH), 8.07 (s, 1H, H6), 7.25 (d, $^3J_{HH}$ = 13.6 Hz, 1H, H8), 6.84 (d, $^3J_{HH}$ = 13.6 Hz,

1H, H7), 6.16 (dd, $^3J_{HH}$ = 6.5 Hz, $^3J_{HH}$ = 7.7 Hz, 1H, H1'), 5.23-5.21 (m, 1H, H3'), 4.03-4.01 (m, 1H, H4'), 3.67 (dd, $^3J_{HH}$ = 4.3 Hz, $^2J_{HH}$ = 12.8 Hz, 1H, H5'), 3.63 (dd, $^3J_{HH}$ = 4.5 Hz, $^2J_{HH}$ = 12.8 Hz, 1H, H5'), 2.33-2.29 (m, 2H, H2'), 2.06 (s, 3H, CH_3-Acetyl).

^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 169.9 (C_q-Acetyl), 161.6 (C4), 149.2 (C2), 139.0 (C6), 129.7 (C7), 110.0 (C5), 106.8 (C8), 84.9 (C4'), 84.4 (C1'), 74.4 (C3'), 61.1 (C5'), 37.0 (C2'), 20.8 (CH_3-Acetyl).

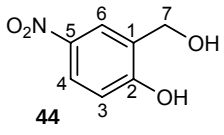
MS (FAB): ber. 375.0, 377.0 [M+H$^+$], gef. 375.1, 377.1.

IR ν [cm^{-1}]: 3433, 3187, 3057, 2931, 2832, 1673, 1462, 1365, 1279, 1232, 1099, 1057, 993, 944, 875.

8.2.3 Synthese der Salicylalkohole

*Synthese von 5-Nitrosalicylalkohol **44***

Es wurden 4.00 g 5-Nitrosalicylaldehyd **48** (24.0 mmol, 1.0 Äq.) in 120 mL absolutem Ethanol gelöst und portionsweise bei Raumtemperatur mit 800 mg Natriumborhydrid (21.2 mmol, 0.9 Äq.) versetzt und 16 h gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle DCM/MeOH 9:1 v/v) wurde überschüssiges Natriumborhydrid durch Zugabe von 4.0 mL Wasser zerstört. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch solange tropfenweise mit konzentrierter Salzsäure versetzt, bis ein farbloser Feststoff ausfiel (ca. pH 4-5). Der Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt. Der erhaltene Rückstand wurde dreimal mit Methanol coevaporiert und anschließend aus Wasser umkristallisiert.



44

Ausbeute: 3.50 g (21.0 mmol, 86%) eines gelb kristallinen Feststoffes; Summenformel: $C_7H_7NO_4$; Molgewicht: 169.1 g/mol; R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.55.

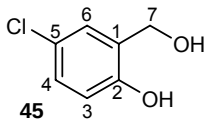
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 11.09 (s, 1H, O*H*-Phenol), 8.21 (d, $^4J_{HH}$ = 3.0 Hz, 1H, H6), 8.02 (dd, $^3J_{HH}$ = 8.9 Hz, $^4J_{HH}$ = 3.0 Hz, 1H, H4), 6.93 (d, $^3J_{HH}$ = 8.9 Hz, 1H, H3), 5.35 (s, 1H, O*H*-Benzyl), 4.51 (s, 2H, H7).

^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 160.5 (C2), 139.6 (C5), 130.3 (C1), 124.0 (C4), 122.7 (C6), 114.7 (C3), 57.4 (C7).

MS (EI): ber.: 169 (M); gef.:169 (M, 72 %), 151 (100), 93 (11), 79 (28), 65 (26), 51 (20), 39 (12).
IR (KBr) ν [cm^{-1}]= 3457, 3080, 1592, 1490, 1329, 821, 756, 702.

*Synthese von 5-Chlorsalicylalkohol **45***

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 5.00 g 5-Chlorsalicylsäure **46** (29.0 mmol, 1.0 Äq.) in 30 mL absolutem THF gelöst und bei 0 °C mit 50.0 mL einer 1 M Boran-THF-Komplex-Lösung (50.0 mmol, 1.7 Äq.) tropfenweise versetzt. Die Reaktionslösung wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde überschüssiges Hydrid durch Zugabe von Wasser zerstört. Das Reaktionsgemisch wurde mit 3 N Natronlauge versetzt und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde auf 0 °C gekühlt, mit verdünnter Essigsäure ein pH-Wert von 6.7 eingestellt und drei bis fünf Mal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH 9:1 v/v) gereinigt.



45

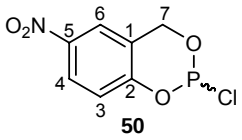
Ausbeute: 3.70 g (23.0 mmol, 81%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_7H_7ClO_2$; Molgewicht: 158.6 g/mol; R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.49.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 9.15 (s, 1H, OH-Phenol), 7.26 (d, $^4J_{HH}$ = 2.8 Hz, 1H, H6), 7.06 (dd, $^3J_{HH}$ = 8.4 Hz, $^4J_{HH}$ = 2.8 Hz, 1H, H4), 6.75 (d, $^3J_{HH}$ = 8.4 Hz, 1H, H3), 5.07 (s, 1H, OH-Benzyl), 4.44 (s, 2H, H7).
^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 152.8 (C2), 131.1 (C1), 126.7 (C4), 126.6 (C6), 122.3 (C5), 115.9 (C3), 57.7 (C7).
MS (EI): ber.: 158 (M); gef.:158 (M, 40%), 142 (29), 140 (100), 114 (30), 112 (98), 77 (58), 51 (20), 40 (44).
IR (KBr) ν [cm^{-1}]= 3348, 3180, 1613, 1517, 1440, 1319, 1255, 1231, 1158, 1041, 997, 931, 820, 702.

8.2.4 Synthese der *cyclo*Saligenylchlorphosphite

*Synthese von 5-Nitrosaligenylchlorphosphit **50***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 3 durchgeführt. Es wurden 2.00 g 5-Nitrosalicylalkohol **44** (11.8 mmol, 1.0 Äq.), 1.26 mL PCl_3 (14.2 mmol, 1.2 Äq.), 2.20 mL Pyridin (27.1 mmol, 2.3 Äq.), gelöst in 8.0 mL abs. Diethylether, und 80 mL abs. Diethylether eingesetzt.



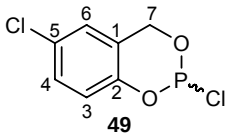
50

Ausbeute: 2.12 g eines noch verunreinigten orangenen Öls als Gemisch zweier Enantiomere; Summenformel: $C_7H_5ClNO_4P$; Molgewicht: 233.6.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 8.22 (dd, $^3J_{HH}$ = 8.6 Hz, $^4J_{HH}$ = 2.0 Hz, 1H, H4), 8.10 (d, $^4J_{HH}$ = 2.0 Hz, 1H, H6), 5.98 (d, $^3J_{HH}$ = 8.6 Hz, 1H, H3), 4.81 (dd, $^2J_{HH}$ = 14.2 Hz, $^3J_{HP}$ = 2.6 Hz, 1H, H7), 4.78 (dd, $^2J_{HH}$ = 14.2 Hz, $^3J_{HP}$ = 9.6 Hz, 1H, H7).
^{31}P-NMR (161 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 139.8.

*Synthese von 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **49***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 3 durchgeführt. Es wurden 1.80 g 5-Chlorsalicylalkohol **45** (11.4 mmol, 1.0 Äq.), 1.20 mL PCl_3 (13.6 mmol, 1.2 Äq.), 2.10 mL Pyridin (26.2 mmol, 2.3 Äq.), gelöst in 6.0 mL abs. Diethylether, und 60 mL abs. Diethylether eingesetzt.



49

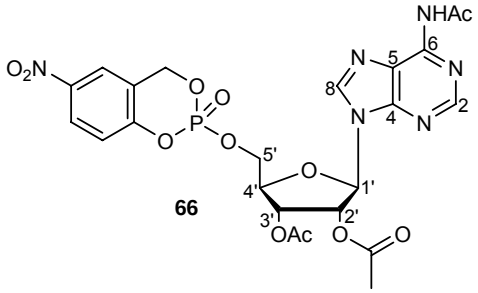
Ausbeute: 2.16 g eines noch verunreinigten gelblichen Öls als Gemisch zweier Enantiomere; Summenformel: $C_7H_5Cl_2O_2P$; Molgewicht: 223.0.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 7.22 (dd, $^3J_{HH}$ = 8.6 Hz, $^4J_{HH}$ = 2.5 Hz, 1H, H4), 6.98 (d, $^4J_{HH}$ = 2.5 Hz, 1H, H6), 6.92 (d, $^3J_{HH}$ = 8.6 Hz, 1H, H3), 5.41 (dd, $^2J_{HH}$ = 14.4 Hz, $^3J_{HP}$ = 2.4 Hz, 1H, H7), 4.98 (dd, $^2J_{HH}$ = 14.4 Hz, $^3J_{HP}$ = 9.6 Hz, 1H, H7).
^{31}P-NMR (161 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 140.3.

8.2.5 Synthese der *cyclo*Sal-Nucleosidmonophosphate

*Synthese von 5-Nitro-cycloSal-N^6,2',3'-triacetyladenosinmonophosphat **66***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 4 durchgeführt. Es wurden 0.25 g N^6,2',3'-Triacetyladenosin **61** (0.64 mmol, 1.0 Äq.), 0.30 g 5-Nitrosaligenylchlorphosphit **50** (1.3 mmol, 2.0 Äq.), 0.22 mL DIPEA (1.3 mmol, 2.0 Äq.), 1.56 g Oxone (2.54 mmol, 4.0 Äq.) und 20 mL Acetonitril eingesetzt.



66

Ausbeute: 0.33 g (0.55 mmol, 86%, bezogen auf das nicht chromatographierte Produkt) einer farblosen Watte als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 1:1; Summenformel: $C_{23}H_{23}N_6O_{12}P$; Molgewicht: 606.4 g/mol; R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.54.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 10.74 (s, 1H, NH), 10.71 (s, 1H, NH), 8.60 (s, 1H, H8), 8.59 (s, 1H, H8), 8.58 (s, 1H, H2), 8.56 (s, 1H, H2), 8.18-8.11 (m, 4H, 2x $H6_{ar}$, 2x $H4_{ar}$), 7.23 (d, $^3J_{HH}$ = 8.9 Hz, 1H, $H3_{ar}$), 7.18 (d, $^3J_{HH}$ = 8.9 Hz, 1H, $H3_{ar}$), 6.29 (d, $^3J_{HH}$ = 5.4 Hz, 1H, H1'), 6.27 (d, $^3J_{HH}$ = 5.4 Hz, 1H, H1'), 5.99 (dd, $^3J_{HH}$ = 9.8 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.4 Hz, 2H, 2x H2'), 5.69-5.38 (m, 6H, 2x H3', 2x CH_2-Benzyl), 4.55-4.49 (m, 4H, 2x H5'), 4.44-4.43 (m, 2H, 2x H4'), 2.27, 2.26, 2.11, 2.09, 2.03, 2.02 (je s, je 3H, CH_3-Acetyl).

^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 169.3 (2x C_q-Acetyl), 169.2 (2x C_q-Acetyl), 168.8 (2x C_q-Acetyl), 153.8 ($C2_{ar}$), 153.7 ($C2_{ar}$), 151.8 (2x C2), 151.2 (2x C6), 149.7 (2x C4), 143.4 (2x $C5_{ar}$), 141.8 (2x C8), 125.3 ($C4_{ar}$), 125.2 ($C4_{ar}$), 123.6 (C5), 123.5 (C5), 122.2 (2x $C6_{ar}$), 121.9 (2x $C1_{ar}$), 119.4 ($C3_{ar}$), 119.3 ($C3_{ar}$), 86.0 (2x C1'), 79.8 (d, $^3J_{CP}$ = 7.0 Hz, C4'), 79.7 (d, $^3J_{CP}$ = 7.0 Hz, C4'), 71.9 (2x C2'), 69.2 (C3'), 69.1 (C3'), 67.9 (d, $^2J_{CP}$ = 7.0 Hz, CH_2-Benzyl), 67.8 (d, $^2J_{CP}$ = 7.0 Hz, CH_2-Benzyl), 66.9 (d, $^2J_{CP}$ = 6.2 Hz, C5'), 66.8 (d, $^2J_{CP}$ = 6.2 Hz, C5'), 24.3 (2x NH-CH_3-Acetyl), 20.3 (2x CH_3-Acetyl), 20.1 (2x CH_3-Acetyl).

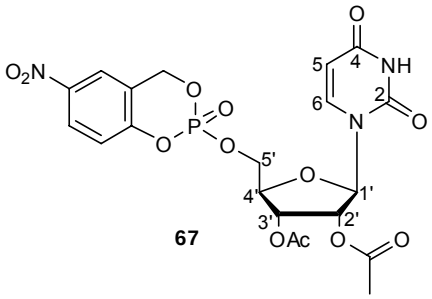
^{31}P-NMR (161 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: -10.97, -11.33.

HRMS (ESI$^+$): ber.: 607.1184 [M+H$^+$], gef.: 607.1184.

IR ν [cm^{-1}]: 3083, 2928, 2359, 1746, 1609, 1587, 1525, 1295, 1230, 1087, 1030, 996, 937, 816.

*Synthese von 5-Nitro-cycloSal-2',3'-O-acetyluridinmonophosphat **67***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 4 durchgeführt. Es wurden 400 mg 2',3'-*O*-Acetyluridin **62** (1.20 mmol, 1.0 Äq.), 560 mg 5-Nitrosaligenylchlorphosphit **50** (2.40 mmol, 2.0 Äq.), 0.420 mL DIPEA (2.40 mmol, 2.0 Äq.), 2.91 g Oxone (4.80 mmol, 4.0 Äq.) und 40 mL Acetonitril eingesetzt.



67

Ausbeute: 530 mg (0.980 mmol, 80%, bezogen auf das nicht chromatographierte Produkt) einer farblosen Watte als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 1:0.9; Summenformel: $C_{20}H_{20}N_3O_{13}P$; Molgewicht: 541.4 g/mol; R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.55.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 8.46 (s, 2H, 2x NH), 8.26-8.25 (m, 1H, $H4_{ar}$), 8.24-8.23 (m, 1H, $H4_{ar}$), 8.09-8.08 (m, 2H, 2x $H6_{ar}$), 7.38 (d, $^3J_{HH}$ = 8.2 Hz, 1H, H6), 7.36 (d, $^3J_{HH}$ = 8.2 Hz, 1H, H6), 7.24 (d, $^3J_{HH}$ = 9.1 Hz, 1H, $H3_{ar}$), 7.23 (d, $^3J_{HH}$ = 9.1 Hz, 1H, $H3_{ar}$), 5.94 (d, $^3J_{HH}$ = 6.8 Hz, 1H, H1'), 5.93 (d, $^3J_{HH}$ = 6.8 Hz, 1H, H1'), 5.74 (d, $^3J_{HH}$ = 8.2 Hz, 1H, H5), 5.72 (d, $^3J_{HH}$ = 8.2 Hz, 1H, H5), 5.53-5.47 (m, 4H, 2x CH_2-Benzyl), 5.39 (dd, $^3J_{HH}$ = 4.8 Hz, $^3J_{HH}$ = 6.0 Hz, 1H, H3'), 5.32 (dd, $^3J_{HH}$ = 4.6 Hz, $^3J_{HH}$ = 6.0 Hz, 1H, H3'), 5.30-5.26 (m, 2H, 2x H2'), 4.62-4.54 (m, 2H, H5'), 4.52-4.42 (m, 2H, H5'), 4.35-4.30 (m, 2H, 2x H4'), 2.13 (s, 3H, CH_3-Acetyl), 2.11 (s, 3H, CH_3-Acetyl), 2.09 (s, 6H, CH_3-Acetyl).

^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 170.3 (2x C_q-Acetyl), 164.6 (2x C4), 153.6 (2x $C2_{ar}$), 150.7 (2x C2), 141.6 (2x $C5_{ar}$), 139.2 (2x C6), 131.1 (2x $C1_{ar}$), 125.7 (2x $C4_{ar}$), 121.5 (2x $C6_{ar}$), 119.5 (2x $C3_{ar}$), 103.4 (2x C5), 88.3 (2x C1'), 80.4 (2x C4'), 72.4 (2x C2'), 69.5 (2x C3'), 68.1 (2x C-Benzyl), 67.4 (2x C5'), 20.5 (CH_3-Acetyl), 20.4 (CH_3-Acetyl).

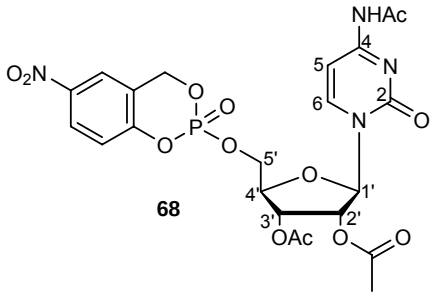
HRMS (ESI^+): ber.: 542.0807 [$M+H^+$], gef.: 542.0806.

IR (KBr) ν [cm^{-1}]: 3434, 2926, 1751, 1701, 1627, 1561, 1486, 1377, 1248, 1091, 1034, 940, 909, 816.

*Synthese von 5-Nitro-cycloSal-N^4,2',3'-triacetylcytidinmonophosphat **68***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 4 durchgeführt. Es wurden 470 mg N^4,2',3'-Triacetylcytidin **63** (1.30 mmol, 1.0 Äq.), 600 mg

5-Nitrosaligenylchlorphosphit **50** (2.60 mmol, 2.0 Äq.), 0.450 mL DIPEA (2.60 mmol, 2.0 Äq.), 3.21 g Oxone (5.12 mmol, 4.0 Äq.) und 40 mL Acetonitril eingesetzt.



68

Ausbeute: 620 mg (1.06 mmol, 83%, bezogen auf das nicht chromatographierte Produkt) einer farblosen Watte als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 1:1; Summenformel: $C_{22}H_{23}N_4O_{13}P$; Molgewicht: 582.4 g/mol; R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.58.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 10.97 (bs, 1H, N*H*), 10.95 (bs, 1H, N*H*), 8.26-8.21 (m, 4H, 2x $H4_{ar}$, 2x $H6_{ar}$), 8.00 (d, $^3J_{HH}$ = 7.5 Hz, 1H, H6), 7.98 (d, $^3J_{HH}$ = 7.5 Hz, 1H, H6), 7.36 (d, $^3J_{HH}$ = 9.1 Hz, 1H, $H3_{ar}$), 7.34 (d, $^3J_{HH}$ = 9.1 Hz, 1H, $H3_{ar}$), 7.09 (d, $^3J_{HH}$ = 7.5 Hz, 1H, H5), 7.06 (d, $^3J_{HH}$ = 7.5 Hz, 1H, H5), 5.83 (d, $^3J_{HH}$ = 3.5 Hz, 1H, H1'), 5.79 (d, $^3J_{HH}$ = 3.5 Hz, 1H, H1'), 5.69–5.54 (m, 4H, 2x CH_2-Benzyl), 5.50-5.41 (m, 3H, 2x H2', H3'), 5.34 (dd, $^3J_{HH}$ = 6.5 Hz, $^3J_{HH}$ = 6.5 Hz, 1H, H3'), 4.56–4.38 (m, 4H, 2x H5'), 4.35-4.29 (m, 2H, 2x H4'), 2.12 (s, 6H, 2x NH-CH_3-Acetyl), 2.11 (s, 3H, CH_3-Acetyl), 2.06 (s, 3H, CH_3-Acetyl), 2.04 (s, 3H, CH_3-Acetyl), 2.01 (s, 3H, CH_3-Acetyl).

^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 171.0 (C_q-acetyl), 169.3 (4x C_q-acetyl), 169.2 (C_q-acetyl), 163.0 (2x C2), 154.1 (2x C4), 146.7 (C6), 146.6 (C6), 129.4 (2x $C4_{ar}$), 128.3 (d, $^2J_{CP}$ = 8.9 Hz, 2x $C2_{ar}$), 128.2 (2x $C5_{ar}$), 126.1 (d, $^3J_{CP}$ = 6.2 Hz, 2x $C1_{ar}$), 125.6 (2x $C6_{ar}$), 120.0 (d, $^3J_{CP}$ = 8.4 Hz, 2x $C3_{ar}$), 91.3 (C5), 91.0 (C5), 84.2 (2x C1'), 79.8 (d, $^3J_{CP}$ = 7.6 Hz, 2x C4'), 69.2 (2x C2'), 68.9 (2x C3'), 68.1 (d, $^2J_{CP}$ = 6.6 Hz, 2x C-Benzyl), 66.8 (d, $^2J_{CP}$ = 5.1 Hz, C5'), 66.5 (d, $^2J_{CP}$ = 5.1 Hz, C5'), 29.7 (2x NH-CH_3-Acetyl), 20.3 (4x CH_3-Acetyl).

^{31}P-NMR (162 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: -11.21, -11.33.

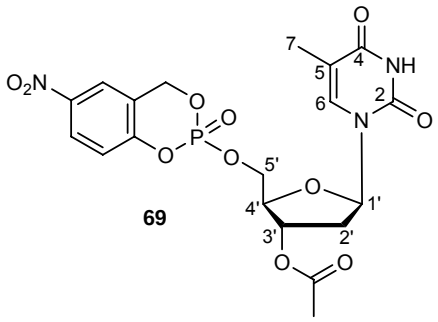
HRMS (ESI$^+$): ber.: 583.1072 [M+H$^+$], gef.: 583.1077.

IR ν [cm^{-1}]: 3081, 2933, 2358, 1746, 1667, 1626, 1527, 1370, 1341, 1316, 1230, 1030, 996, 937, 815.

*Synthese von 5-Nitro-cycloSal-3'-O-acetyl-2'-desoxythymidinmonophosphat **69***

Variante A: Die Reaktion wurde gemäß AAV 4 durchgeführt. Es wurden 490 mg 3'-*O*-Acetyl-2'-desoxythymidin **64** (1.70 mmol, 1.0 Äq.), 800 mg

5-Nitrosaligenylchlorphosphit **50** (3.40 mmol, 2.0 Äq.), 0.600 mL DIPEA (3.40 mmol, 2.0 Äq.), 4.22 g Oxone (6.81 mmol, 4.0 Äq.) und 50 mL Acetonitril eingesetzt.



69

Ausbeute: 700 mg (1.55 mmol, 91%, bezogen auf das nicht chromatographierte Produkt) einer farblosen Watte als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 1:1; Summenformel: $C_{19}H_{20}N_3O_{11}P$; Molgewicht: 497.3 g/mol; R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.60.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 11.35 (bs, 2H, 2x N*H*), 8.30 (d, 2H, $^4J_{HH}$ = 1.9 Hz, 2x H6), 8.26–8.22 (m, 2H, 2x $H4_{ar}$), 7.49 (d, $^4J_{HH}$ = 1.0 Hz, 1H, $H6_{ar}$), 7.47 (d, $^4J_{HH}$ = 1.0 Hz, 1H, $H6_{ar}$), 7.38 (d, $^3J_{HH}$ = 8.8 Hz, 1H, $H3_{ar}$), 7.38 (d, $^3J_{HH}$ = 8.8 Hz, 1H, $H3_{ar}$), 6.15 (dd, $^3J_{HH}$ = 8.2 Hz, $^3J_{HH}$ = 8.2 Hz, 1H, H1'), 6.12 (dd, $^3J_{HH}$ = 8.2 Hz, $^3J_{HH}$ = 8.2 Hz, 1H, H1'), 5.70–5.53 (m, 4H, 2x CH_2-Benzyl), 5.17–5.15 (m, 2H, 2x H3'), 4.46–4.36 (m, 4H, 2x H5'), 4.17–4.15 (m, 2H, 2x H4'), 2.42–2.33 (m, 2H, 2x H2'a), 2.25 (ddd, $^2J_{HH}$ = 7.9 Hz, $^3J_{HH}$ = 6.0 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.35 Hz,2H, 2x H2'b), 2.05 (s, 3H, CH_3-Acetyl), 2.04 (s, 3H, CH_3-Acetyl), 1.76 (s, 3H, H7), 1.73 (s, 3H, H7).
^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 168.9 (2x C_q-Acetyl), 163.6 (2x C4), 156.0 (2x $C5_{ar}$), 150.3 (2x C2), 143.5 (d, $^2J_{CP}$ = 6.1 Hz, 2x $C2_{ar}$), 135.9 (C6), 135.8 (C6), 125.5 ($C4_{ar}$), 125.4 ($C4_{ar}$), 122.6 (2x $C6_{ar}$), 119.7 (d, $^3J_{CP}$ = 9.1 Hz, 2x $C1_{ar}$), 119.6 (d, $^3J_{CP}$ = 8.8 Hz, 2x $C3_{ar}$), 109.9 (2x C5), 84.2 (2x C1'), 81.4 (d, $^3J_{CP}$ = 7.2 Hz, C4'), 81.3 (d, $^3J_{CP}$ = 7.2 Hz, C4'), 73.2 (2x C3'), 68.0 (d, $^2J_{CP}$ = 7.2 Hz, 2x C-Benzyl), 67.9 (d, $^2J_{CP}$ = 6.1 Hz, 2x C5'), 35.5 (C2'), 35.4 (C2'), 20.7 (2x CH_3-Acetyl), 12.0 (2x C7).
^{31}P-NMR (161 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: -10.63, -10.81.
HRMS (ESI$^+$): ber.: 498.0908 [M+H$^+$], gef.: 498.0909.
IR ν [cm^{-1}]: 3169, 3075, 2359, 1685, 1528, 1466, 1293, 1232, 1195, 1121, 1025, 997, 937, 905, 816.

Variante B: Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 100 mg 3'-*O*-Acetyl-2'-desoxythymidin **64** (0.351 mmol, 1.0 Äq.) und 49.0 µL Triethylamin (0.350 mmol, 1.0 Äq.) in 5.00 mL wasserfreiem THF gelöst und 30 min über Molsieb getrocknet. Diese Lösung wurde anschließend bei –70 °C zu einer Lösung aus 65.0 µL $POCl_3$ (0.700 mmol, 2.0 Äq.) in 5.00 mL THF getropft. Das Reaktionsgemisch wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach

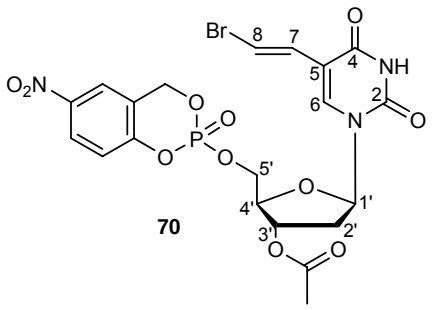
vollständigem Umsatz des Nucleosids (DC-Kontrolle DCM/MeOH 9:1 v/v) wurde der entstandene Niederschlag unter Schutzgas abfiltriert und die flüchtigen Komponenten im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde erneut in 5.0 mL wasserfreiem THF gelöst und bei -70 °C tropfenweise mit einer Lösung aus 0.12 g 5-Nitrosalicylalkohol **44** (0.70 mmol, 2.0 Äq.) und 100 µL Triethylamin (0.700 mmol, 2.0 Äq) in 5.00 mL wasserfreiem THF versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle DCM/MeOH 9:1 v/v) wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde am Chromatotron (DCM/MeOH-Gradient (angesäuert mit 0.1% HOAc)) gereinigt und anschließend gefriergetrocknet (Acetonitril und Wasser (1:2 v/v)).

Ausbeute: 52.0 mg (0.110 mmol, 30%) einer farblosen Watte als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 0.85:1.

Die spektroskopischen Daten entsprechen denen von Variante A.

*Synthese von 5-Nitro-cycloSal-3'-O-acetyl-BVdU-monophosphat **70***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 4 durchgeführt. Es wurden 200 mg 3'-*O*-Acetyl-BVdU **65** (0.530 mmol, 1.0 Äq.), 249 mg 5-Nitrosaligenylchlorphosphit **50** (1.07 mmol, 2.0 Äq.), 0.187 mL DIPEA (1.07 mmol, 2.0 Äq.), 1.31 g Oxone (2.14 mmol, 4.0 Äq.) und 25 mL Acetonitril eingesetzt.



70

Ausbeute: 280 mg (0.461 mmol, 87%, bezogen auf das nicht chromatographierte Produkt) einer farblosen Watte als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 1:1; Summenformel: $C_{20}H_{19}BrN_3O_{11}P$; Molgewicht: 588.3 g/mol; R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.68.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 11.65 (bs, 2H, 2x N*H*), 7.86 (s, 1H, H6), 7.83 (s, 1H, H6), 7.44-7.39 (m, 4H, 2x $H4_{ar}$, 2x $H6_{ar}$), 7.30 (d, $^3J_{HH}$ = 13.6 Hz, 1H, H8), 7.29 (d, $^3J_{HH}$ = 13.6 Hz, 1H, H8), 7.17 (d, $^3J_{HH}$ = 8.5 Hz, 1H, $H3_{ar}$), 7.14 (d, $^3J_{HH}$ = 8.5 Hz, 1H, $H3_{ar}$), 6.84 (d, $^3J_{HH}$ = 13.6 Hz, 1H, H7), 6.83 (d, $^3J_{HH}$ = 13.6 Hz,

1H, H7), 6.17-6.11 (m, 2H, 2x H1'), 5.55–5.40 (m, 4H, 2x CH_2-Benzyl), 5.20–5.17 (m, 2H, 2x H3'), 4.47–4.33 (m, 4H, 2x H5'), 4.21–4.18 (m, 2H, 2x H4'), 2.41–2.32 (m, 4H, 2x H2'), 2.05 (s, 3H, CH_3-Acetyl), 2.04 (s, 3H, CH_3-Acetyl).

^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 169.9 (2x C_q-Acetyl), 161.6 (2x C4), 149.2 (2x C2), 145.7 (2x $C5_{ar}$), 139.3 (C6), 139.2 (C6), 129.6 (2x C7), 128.3 (2x $C2_{ar}$), 126.0 (2x $C4_{ar}$, 2x $C6_{ar}$), 122.9 (2x $C1_{ar}$), 120.1 (d, $^3J_{CP}$ = 9.1 Hz, 2x $C3_{ar}$), 110.3 (C5), 110.2 (C5), 107.2 (2x C8), 84.9 (C1'), 84.6 (C1'), 81.8 (d, $^3J_{CP}$ = 6.1 Hz, 2x C4'), 73.1 (C3'), 73.0 (C3'), 68.1 (d, $^2J_{CP}$ = 6.9 Hz, 2x C-Benzyl), 67.8 (d, $^2J_{CP}$ = 6.0 Hz, 2x C5'), 36.0 (C2'), 35.8 (C2'), 20.8 (2x CH_3-Acetyl).

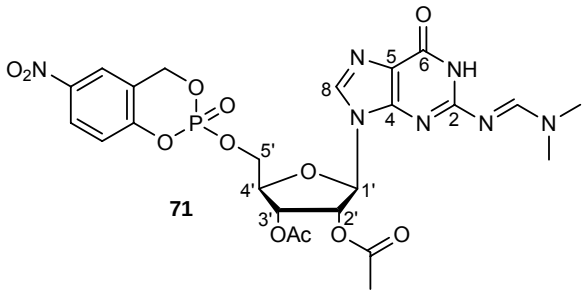
^{31}P-NMR (162 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: -11.14, -11.32.

HRMS (ESI^+): ber.: 588.0013 [$M+H^+$], gef.: 588.0015.

IR ν [cm^{-1}]: 3188, 3076, 2955, 2356, 2339, 1681, 1626, 1590, 1526, 1461, 1345, 1233, 1089, 1025, 996, 937, 868.

*Synthese von 5-Nitro-cycloSal-N^2-formamidin-2',3'-O-Ac-guanosinmonophosphat **71***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 4 durchgeführt. Es wurden 200 mg N^2-Formamidin-2',3'-*O*-acetylguanosin **73** (0.470 mmol, 1.0 Äq.), 220 mg 5-Nitrosaligenylchlorphosphit **50** (0.941 mmol, 2.0 Äq.), 0.161 mL DIPEA (0.940 mmol, 2.0 Äq.), 1.15 g Oxone (1.88 mmol, 4.0 Äq.) und 30 mL Acetonitril eingesetzt.



71

Ausbeute: 250 mg (0.390 mmol, 83%, bezogen auf das nicht chromatographierte Produkt) einer farblosen Watte als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 1:1; Summenformel: $C_{24}H_{26}N_7O_{12}P$; Molgewicht: 635.5 g/mol; R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.42.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 11.39 (bs, 1H, NH), 11.25 (bs, 1H, NH), 8.60 (s, 1H, CH-Formamidin), 8.59 (s, 1H, CH-Formamidin), 8.21–8.15 (m, 4H, 2x $H4_{ar}$, 2x $H6_{ar}$), 7.91 (s, 1H, H8), 7.90 (s, 1H, H8), 7.21 (d, $^3J_{HH}$ = 8.9 Hz, 1H, $H3_{ar}$), 7.20 (d, $^3J_{HH}$ = 8.9 Hz, 1H, $H3_{ar}$), 6.09 (d, $^3J_{HH}$ = 5.1 Hz, 2H, 2x H1'), 5.98 (dd, $^3J_{HH}$ = 4.8 Hz, 2H, 2x H2'); 5.92–5.75 (m, 2H, H3'); 5.59–5.32 (m, 4H, 2x CH_2-Benzyl), 4.52-4.31

(m, 6H, 2x H4', 2x H5'), 3.13 (s, 6H, 2x CH_3-Formamidin), 3.03 (s, 6H, 2x CH_3-Formamidin), 2.08 (s, 6H, 2x CH_3-Acetyl), 2.07 (s, 6H, 2x CH_3-Acetyl).

^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 169.4 (2x C_q-Acetyl), 157.9 (2x CH-Formamidin), 157.3 (2x C6, 2x C2), 149.2 (2x C4), 149.0 (2x $C2_{ar}$), 143.4 (2x $C5_{ar}$), 138.2 (C8), 138.0 (C8), 125.5 ($C6_{ar}$), 125.4 ($C6_{ar}$), 122.3 ($C4_{ar}$), 122.1 ($C4_{ar}$), 121.9 (2x $C1_{ar}$), 120.2 (2x C5), 119.3 ($C3_{ar}$), 119.2 ($C3_{ar}$), 86.6 (C1'), 86.4 (C1'), 78.5 (d, $^3J_{CP}$ = 7.3 Hz, 2x C4'), 72.5 (C2'), 72.3 (C2'), 67.7 (C3'), 67.5 (C3'), 66.4 (2x C-Benzyl), 65.8 (2x C5'), 40.5 (CH_3-Formamidin), 34.7 (CH_3-Formamidin), 20.3 (2x CH_3-Acetyl).

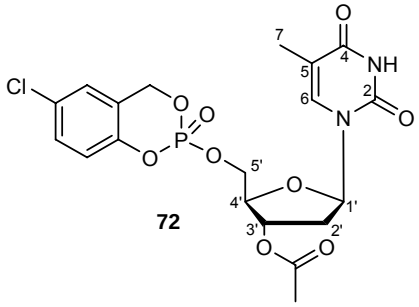
^{31}P-NMR (162 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: -10.46, -10.63.

HRMS (ESI^+): ber.: 636.1450 [M+H^+], gef.: 636.1451.

IR ν [cm^{-1}]: 3075, 2930, 2361, 1742, 1681, 1628, 1589, 1522, 1344, 1295, 1233, 1195, 1023, 937, 814.

*Synthese von 5-Chlor-cycloSal-3'-O-acetyl-2'-desoxythymidinmonophosphat **72***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 4 durchgeführt. Es wurden 850 mg 3'-*O*-Acetyl-2'-desoxythymidin **64** (2.99 mmol, 1.0 Äq.), 1.33 g 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **49** (5.98 mmol, 2.0 Äq.), 1.04 mL DIPEA (5.98 mmol, 2.0 Äq.), 7.34 g Oxone (12.0 mmol, 4.0 Äq.) und 60 mL Acetonitril eingesetzt. Das Produkt wurde am Chromatotron (DCM/MeOH-Gradient (angesäuert mit 0.1% HOAc) gereinigt.



72

Ausbeute: 944 mg (1.94 mmol, 65%) einer farblosen Watte als Gemisch zweier Diastereomere im Verhältnis 0.9:1; Summenformel: $C_{19}H_{20}ClN_2O_9P$; Molgewicht: 486.8 g/mol; R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.55.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 11.36 (bs, 2H, 2x N*H*), 7.49 (d, $^4J_{HH}$ = 0.8 Hz, 2H, 2x H6), 7.46–7.43 (m, 2H, 2x $H4_{ar}$), 7.42–7.41 (m, 2H, 2x $H6_{ar}$), 7.17 (d, $^3J_{HH}$ = 8.8 Hz, 1H, $H3_{ar}$), 7.16 (d, $^3J_{HH}$ = 8.8 Hz, 1H, $H3_{ar}$), 6.15 (dd, $^3J_{HH}$ = 6.3 Hz, $^3J_{HH}$ = 6.3 Hz, 1H, H1'), 6.13 (dd, $^3J_{HH}$ = 6.3 Hz, $^3J_{HH}$ = 6.3 Hz, 1H, H1'), 5.55–5.41 (m, 4H, 2x CH_2-Benzyl), 5.17–5.15 (m, 2H, 2x H3'), 4.41–4.34 (m, 4H, 2x H5'), 4.16–4.14 (m, 2H, 2x H4'), 2.39–2.30 (m, 2H, 2x H2'a), 2.25 (ddd, $^2J_{HH}$ = 7.9 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.35 Hz, $^3J_{HH}$ = 6.0 Hz, 2H, 2x H2'b), 2.05 (s, 3H, CH_3-Acetyl),

2.04 (s, 3H, CH_3-Acetyl), 1.75 (d, $^4J_{HH}$ = 0.8 Hz, 3H, H7), 1.73 (d, $^4J_{HH}$ = 0.8 Hz, 3H, H7).

^{13}C-NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 170.0 (2x C_q-Acetyl), 163.6 (2x C4), 150.4 (2x C2), 148.2 (d, $^2J_{CP}$ = 6.1 Hz, 2x $C2_{ar}$), 135.8 (C6), 135.6 (C6), 129.6 (2x $C4_{ar}$), 128.3 (2x $C5_{ar}$) 127.7 (2x $C6_{ar}$), 122.7 (d, $^3J_{CP}$ = 9.1 Hz, 2x $C1_{ar}$), 120.1 (d, $^3J_{CP}$ = 8.8 Hz, 2x $C3_{ar}$), 110.0 (2x C5), 84.1 (2x C1'), 81.4 (d, $^3J_{CP}$ = 7.6 Hz, C4'), 81.3 (d, $^3J_{CP}$ = 7.6 Hz, C4'), 73.3 (2x C3'), 68.0 (d, $^2J_{CP}$ = 7.5 Hz, 2x C-Benzyl), 67.7 (d, $^2J_{CP}$ = 6.5 Hz, C5'), 35.6 (C2'), 35.4 (C2'), 20.7 (2x CH_3-Acetyl), 12.0 (2x C7).

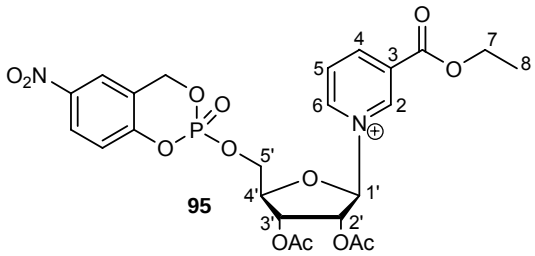
^{31}P-NMR (162 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: -10.09, -10.21.

HRMS (FAB): ber.: 487.0673 ($M+H^+$), gef.: 487.0638.

IR ν [cm^{-1}]: 3475, 3186, 3071, 2830, 1708, 1473, 1358, 1298, 1238, 1117, 1027, 937, 870, 822.

*Synthese von 5-Nitro-cycloSal-2',3'-di-O-acetylnicotinsäureethylesterribonucleosid-monophosphat **95***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 4 durchgeführt. Es wurden 230 mg 2',3'-Di-*O*-acetylnicotinsäureethylesterribonucleosid **105** (0.470 mmol, 1.0 Äq.), 220 mg 5-Nitrosaligenylchlorphosphit **50** (0.940 mmol, 2.0 Äq.), 0.161 mL DIPEA (0.940 mmol, 2.0 Äq.), 1.16 g Oxone (1.88 mmol, 4.0 Äq.) und 20 mL Acetonitril eingesetzt.



95

Summenformel: $C_{24}H_{26}N_2O_{13}P^+$; Molgewicht: 581.4 g/mol.

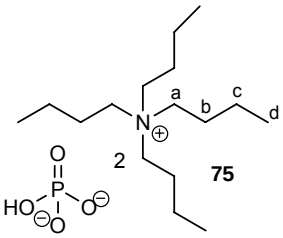
Anmerkung: Es wurden 270 mg eines farblosen Feststoffes nach Gefriertrocknung erhalten. Das ^{31}P-NMR-Spektrum zeigte neben wenigen Verunreinigungen die Diastereomere des gewünschten Produktes **95**. Das zugehörige ^{1}H-NMR-Spektrum war jedoch nicht auswertbar. **95** wurde dennoch weiter umgesetzt (Kap. 8.2.9, S. 191).

8.2.6 Synthese der Nucleophile

*Bis-(tetra-n-butylammonium)-hydrogenphosphat **75***

Die Durchführung erfolgte gemäß AAV 9, Variante A. Es wurden 500 mg Natriumdihydrogenphosphat (4.20 mmol, 1.0 Äq.) eingesetzt und mit $N(Bu_4)OH$ auf pH=6 titriert.

Anmerkung: Der Einfachheit halber wurden in der Überschrift zwei Gegenionen angegeben. Tatsächlich werden bei einem pH-Wert von 6 pro Phosphat lediglich etwa 1.5 Gegenionen ausgetauscht. Das Molgewicht wurde im Folgenden auf 1.5 Gegenionen berechnet.



75

Ausbeute: 1.90 g (4.10 mmol, 98%) eines farblosen hygroskopischen Feststoffes; Molgewicht: 459.5 g/mol.

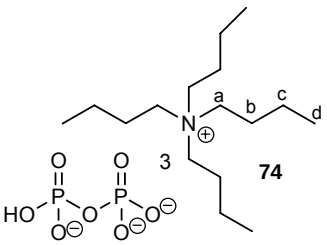
^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 3.08 (m, 12H, H1), 1.56 (m, 12H, H2), 1.25 (m, 12H, H3), 0.84 (t, $^3J_{HH}$ = 7.3 Hz, 18H, 4x H4).

^{31}P-NMR (162 MHz, D_2O) δ/ppm: 0.21.

*Tris-(tetra-n-butylammonium)-hydrogenpyrophosphat **74***

Die Durchführung erfolgte gemäß AAV 9, Variante A. Es wurden 500 mg Dinatriumdihydrogenpyrophosphat (2.30 mmol, 1.0 Äq.) eingesetzt und mit $N(Bu_4)OH$ auf pH=6 titriert.

Anmerkung: Der Einfachheit halber wurden in der Überschrift drei Gegenionen aufgeführt. Laut Literaturangaben liegen am Neutralpunkt (pH=7) drei Tetra-*n*-butylammonium-Ionen pro Pyrophosphat vor.[218] Das Molgewicht wurde im Folgenden auf 3 Gegenionen berechnet.



74

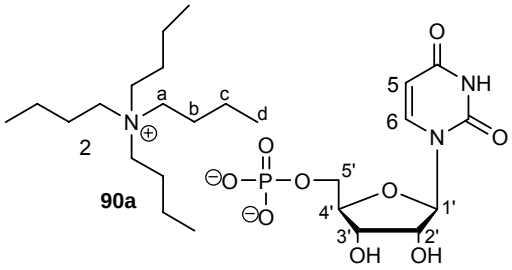
Ausbeute: 2.01 g (2.23 mmol, 97%) eines farblosen hygroskopischen Feststoffes; Molgewicht: 902.4 g/mol.

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 3.09 (m, 24H, H1), 1.55 (m, 24H, H2), 1.25 (m, 24H, H3), 0.85 (t, $^3J_{HH}$ = 7.3 Hz, 36H, H4).

^{31}P-NMR (162 MHz, D_2O) δ/ppm: -9.73.

Bis-(tetra-n-butylammonium)-uridinmonophosphat ***90a***

Die Durchführung erfolgte gemäß AAV 9, Variante A. Es wurden 550 mg Dinatrium-uridinmonophosphat (1.49 mmol, 1.0 Äq.) eingesetzt und mit $N(Bu_4)OH$ auf pH=6 titriert.



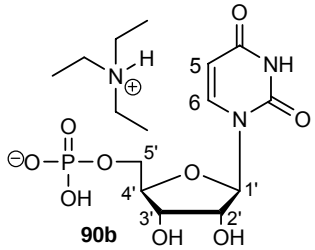
90a

Ausbeute: 1.20 g (1.48 mmol, 99%) eines farblosen hygroskopischen Feststoffes; Summenformel: $C_{41}H_{83}N_4O_9P$; Molgewicht: 807.1 g/mol.

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 7.89 (d, $^3J_{HH}$ = 8.1 Hz, 1H, H6), 5.92 (d, $^3J_{HH}$ = 4.7 Hz, 1H, H1'), 5.90 (d, $^3J_{HH}$ = 8.1 Hz, 1H, H5), 4.40-4.31 (m, 2H, H2', H3'), 4.28-4.24 (m, 1H, H4'), 4.15 (ddd, $^2J_{HH}$ = 11.7 Hz, $^3J_{HH}$ = 4.3 Hz, $^3J_{HP}$ = 2.3 Hz, 1H, H5'), 4.05 (ddd, $^2J_{HH}$ = 11.7 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.2 Hz, $^3J_{HP}$ = 2.9 Hz, 1H, H5'), 3.20-3.17 (m, 16H, Ha), 1.65-1.63 (m, 16H, Hb), 1.41-1.35 (m, 16H, Hc), 0.92 (t, $^3J_{HH}$ = 7.4 Hz, 24H, Hd).
^{31}P-NMR (162 MHz, D_2O) δ/ppm: 0.08.

Triethylammoniumuridinmonophosphat ***90b***

Die Durchführung erfolgte gemäß AAV 9, Variante B. Es wurden 600 mg Dinatrium-uridinmonophosphat (1.63 mmol, 1.0 Äq.) eingesetzt und mit Triethylamin, nach Zugabe von 5.00 mL THF, auf pH=6 titriert.



90b

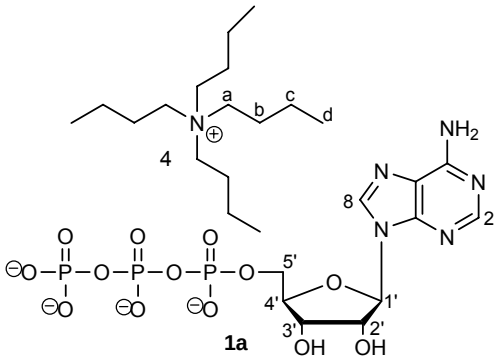
Ausbeute: 686 mg (1.61 mmol, 99%) eines farblosen hygroskopischen Feststoffes; Molgewicht: 425.4 g/mol.

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 7.96 (d, $^3J_{HH}$ = 8.1 Hz, 1H, H6), 5.96 (d, $^3J_{HH}$ = 4.8 Hz, 1H, H1'), 5.92 (d, $^3J_{HH}$ = 8.1 Hz, 1H, H5), 4.36-4.30 (m, 2H, H2', H3'), 4.27-4.24 (m, 1H, H4'), 4.13 (ddd, $^2J_{HH}$ = 11.8 Hz, $^3J_{HH}$ = 4.3 Hz, $^3J_{HP}$ = 2.5 Hz, 1H, H5'), 4.05 (ddd, $^2J_{HH}$ = 11.8 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.2 Hz, $^3J_{HP}$ = 2.9 Hz, 1H, H5'), 3.18 (q, $^3J_{HH}$ = 7.3 Hz, 6H, CH_2-NEt_3), 1.26 (t, $^3J_{HH}$ = 7.3 Hz, 9H, CH_3-NEt_3).
^{31}P-NMR (162 MHz, D_2O) δ/ppm: 0.23.

Tetrakis-(tetra-n-butylammonium)-adenosintriphosphat ***1a***

Die Durchführung erfolgte gemäß AAV 9, Variante A. Es wurden 500 mg Dinatrium-adenosintriphosphat (0.910 mmol, 1.0 Äq.) eingesetzt und mit $N(Bu_4)OH$ auf pH=6 titriert.

Anmerkung: Der Einfachheit halber wurden in der Überschrift vier Gegenionen angegeben. Tatsächlich werden bei einem pH-Wert von 6 pro ATP lediglich etwa 3.6 Gegenionen ausgetauscht. Das Molgewicht wurde im Folgenden auf 3.6 Gegenionen berechnet.



1a

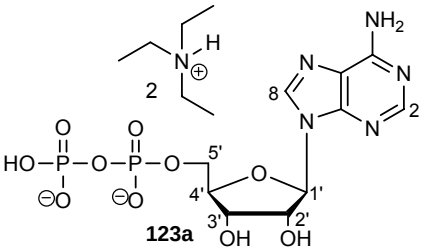
Ausbeute: 1.20 g (0.880 mmol, 97%) eines farblosen hygroskopischen Feststoffes; Molgewicht: 1376.2 g/mol.

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 8.59 (s, 1H, H8), 8.26 (s, 1H, H2), 6.13 (d, $^3J_{HH}$ = 6.3 Hz, 1H, H1'), 4.82 (dd, $^3J_{HH}$ = 5.4 Hz, $^3J_{HH}$ = 6.3 Hz, 1H, H2'), 4.66 (dd, $^3J_{HH}$ = 3.2 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.4 Hz, 1H, H3'), 4.39-4.38 (m, 1H, H4'), 4.32 (ddd, $^2J_{HH}$ = 11.7 Hz, $^3J_{HH}$ = 6.7 Hz, $^3J_{HP}$ = 2.6 Hz, 1H, H5'), 4.18 (ddd, $^2J_{HH}$ = 11.7 Hz, $^3J_{HH}$ = 4.1 Hz, $^3J_{HP}$ = 3.1 Hz, 1H, H5'), 3.19-3.15 (m, 29H, Ha), 1.65-1.61 (m, 29H, Hb), 1.38-1.32 (m, 29H, Hc), 0.94 (t, $^3J_{HH}$ = 7.4 Hz, 43H, Hd).

^{31}P-NMR (162 MHz, D_2O) δ/ppm: -7.45 (d, $^2J_{PP}$ = 20.5 Hz, Pγ), -11.43 (d, $^2J_{PP}$ = 20.5 Hz, Pα), -22.72 (dd, $^2J_{PP}$ = 20.5 Hz, $^2J_{PP}$ = 20.5 Hz, Pβ).

Bis-(triethylammonium)-dihydrogenadenosindiphosphat ***123a***

Die Durchführung erfolgte gemäß AAV 9, Variante B. Es wurden 400 mg Kaliumadenosindiphosphat (0.860 mmol, 1.0 Äq.) eingesetzt und mit Triethylamin, nach Zugabe von 4.0 mL THF, auf pH=6 titriert.



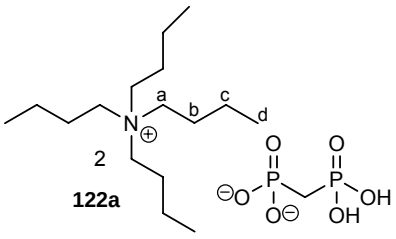
123a

Ausbeute: 490 mg (0.790 mmol, 92%) eines farblosen hygroskopischen Feststoffes; Molgewicht: 629.6 g/mol.

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 8.49 (s, 1H, H8), 8.20 (s, 1H, H2), 6.10 (d, $^{3}J_{HH}$ = 5.8 Hz, 1H, H1'), 4.74 (dd, $^{3}J_{HH}$ = 4.3 Hz, $^{3}J_{HH}$ = 5.8 Hz, 1H, H2'), 4.53 (dd, $^{3}J_{HH}$ = 4.3 Hz, $^{3}J_{HH}$ = 4.8 Hz, 1H, H3'), 4.38-4.36 (m, 1H, H4'), 4.21-4.18 (m, 2H, H5'), 3.16 (q, $^{3}J_{HH}$ = 7.3 Hz, 12 H, CH_2-NEt_3), 1.24 (t, $^{3}J_{HH}$ = 7.3 Hz, 18H, CH_3-NEt_3).
^{31}P-NMR (162 MHz, D_2O) δ/ppm: -10.17 (d, $^{2}J_{PP}$ = 20.4 Hz, Pα), -11.29 (d, $^{2}J_{PP}$ = 20.4 Hz, Pβ).

*Bis-(tetra-n-butylammonium)-dihydrogenmethylenpyrophosphat **122a***

Es wurden 1.00 g Methylenpyrophosphorsäure (5.68 mmol, 1.0 Äq.) in Wasser gelöst und sofort mit 40 %-iger wässriger tetra-*n*-Butylammoniumhydroxid-Lösung bis zum Neutralpunkt titriert. Das Lösungsmittel wurde anschließend durch Gefriertrocknung entfernt.



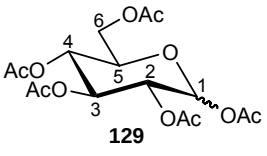
122a

Ausbeute: 3.74 g (5.68 mmol, 100%) eines farblosen hygroskopischen Feststoffes; Molgewicht: 658.9 g/mol.

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 3.16-3.12 (m, 16H, Ha), 2.05 (t, $^{2}J_{HP}$ = 19.6 Hz, 2H, CH_2), 1.59-1.55 (m, 16H, Hb), 1.35-1.26 (m, 16H, Hc), 0.89 (t, $^{3}J_{HH}$ = 7.4 Hz, 24H, Hd).
^{31}P-NMR (162 MHz, D_2O) δ/ppm: 15.74.

*Synthese von 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-D-glucopyranose **129***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 5 durchgeführt. Es wurden 2.00 g D-Glucose (11.0 mmol, 1.0 Äq.), 15.8 mL Essigsäureanhydrid (165 mmol, 15 Äq.) und 20 mL Pyridin eingesetzt.



129

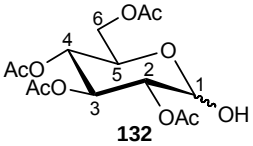
Ausbeute: 3.95 g (10.1 mmol, 92%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{16}H_{22}O_{11}$; Molgewicht: 390.3 g/mol; R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.72;

Anomerenverhältnis: α/β ~ 2:1.

α-^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 6.31 (d, $^{3}J_{HH}$ = 3.8 Hz, 1H. H1), 5.44 (dd, $^{3}J_{HH}$ = 9.2 Hz, $^{3}J_{HH}$ = 9.2 Hz, 1H, H3), 5.10-5.02 (m, 2H, H2, H4), 4.26-4.20 (m, 1H, H6), 4.12-4.03 (m, 2H, H5, H6), 2.14, 2.07, 2.06, 2.01, 1.99 (je s, je 3H, CH_3-Acetyl).
α-^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 170.5 (C_q-Acetyl), 170.3 (C_q-Acetyl), 170.0 (C_q-Acetyl), 169.5 (2x C_q-Acetyl), 89.7 (C1), 71.5 (C2), 69.9 (C3), 68.8 (C4), 67.4 (C5), 61.7 (C6), 20.9 (CH_3-Acetyl), 20.7 (CH_3-Acetyl), 20.6 (2x CH_3-Acetyl), 20.5 (CH_3-Acetyl).

*Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-glucopyranose **132***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 6 durchgeführt. Es wurden 2.50 g 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-D-glucopyranose **129** (6.40 mmol, 1.0 Äq.), 700 mg Hydraziniumacetat (7.70 mmol, 1.2 Äq.) und 5.00 mL DMF eingesetzt.



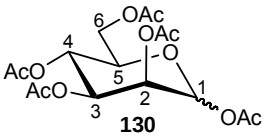
132

Ausbeute: 1.75 g (5.02 mmol, 79%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{14}H_{20}O_{10}$; Molgewicht: 348.3 g/mol; R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.66; Anomerenverhältnis: α/β ~ 3:1.

α-^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 5.51 (dd, $^{3}J_{HH}$ = 9.8 Hz, $^{3}J_{HH}$ = 9.8 Hz, 1H. H3), 5.44 (dd, $^{3}J_{HH}$ = 3.0 Hz, $^{3}J_{HH}$ = 3.6 Hz, 1H, H1), 5.06 (dd, $^{3}J_{HH}$ = 9.8 Hz, $^{3}J_{HH}$ = 9.8 Hz, 1H, H4), 4.87 (dd, $^{3}J_{HH}$ = 3.6 Hz, $^{3}J_{HH}$ = 9.8 Hz, 1H, H2), 4.26-4.19 (m, 2H, H5, H6), 4.14-4.07 (m, 1H, H6), 3.83 (d, $^{3}J_{HH}$ = 3.0 Hz, 1H, OH), 2.07, 2.06, 2.01, 1.99 (je s, je 3H, CH_3-Acetyl).
α-^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 170.8 (C_q-Acetyl), 170.7 (C_q-Acetyl), 170.2 (C_q-Acetyl), 169.6 (C_q-Acetyl), 90.0 (C1), 71.2 (C2), 69.8 (C3), 68.5 (C4), 67.1 (C5), 61.9 (C6), 20.7 (CH_3-Acetyl), 20.6 (2x CH_3-Acetyl), 20.5 (CH_3-Acetyl).
MS (FAB): ber. 331.3 [M-OH^-], gef. 331.2.
IR ν [cm^{-1}]: 3466, 2960, 1740, 1433, 1366, 1210, 1152, 1029, 943, 910, 599.

*Synthese von 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-D-mannopyranose **130***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 5 durchgeführt. Es wurden 1.00 g D-Mannose (5.55 mmol, 1.0 Äq.), 8.30 mL Essigsäureanhydrid (83.3 mmol, 15 Äq.) und 12 mL Pyridin eingesetzt.



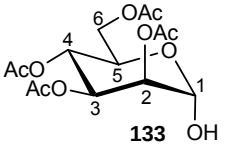
130

Ausbeute: 1.72 g (4.41 mmol, 79%) eines farblosen Öls; Summenformel: $C_{16}H_{22}O_{11}$; Molgewicht: 390.3 g/mol; R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.75; Anomerenverhältnis: α/β ~ 3:1.

α-^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 6.13 (d, $^{3}J_{HH}$ = 2.0 Hz, 1H. H1), 5.38-5.33 (m, 2H, H3, H4), 5.26-5.24 (m, 1H, H2), 4.32-4.37 (m, 1H, H6), 4.12-4.09 (m, 1H, H6), 4.05-4.03 (m, 1H, H5), 2.15, 2.13, 2.11, 2.06, 2.03 (je s, je 3H, CH_3-Acetyl).
α-^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 171.4 (C_q-Acetyl), 170.9 (C_q-Acetyl), 170.3 (C_q-Acetyl), 169.8 (2x C_q-Acetyl), 90.3 (C1), 77.2 (C5), 71.1 (C3), 68.3 (C2), 66.1 (C4), 62.5 (C6), 21.3 (CH_3-Acetyl), 20.1 (CH_3-Acetyl), 20.9 (2x CH_3-Acetyl), 20.6 (CH_3-Acetyl).

*Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-mannopyranose **133***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 6 durchgeführt. Es wurden 1.60 g 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-D-mannopyranose **130** (4.10 mmol, 1.0 Äq.), 453 mg Hydraziniumacetat (4.92 mmol, 1.2 Äq.) und 4 mL DMF eingesetzt.



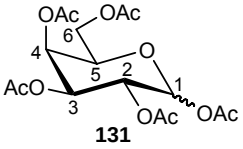
133

Ausbeute: 700 mg (2.00 mmol, 49%) eines farblosen Öls; Summenformel: $C_{14}H_{20}O_{10}$; Molgewicht: 348.3 g/mol; R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.65; Anomerenverhältnis: α-anomerenrein; $[\alpha]_D^{20}$= +20.4° (c=1.0, $CHCl_3$).

α-^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 6.33 (dd, $^{3}J_{HH}$ = 3.3 Hz, $^{3}J_{HH}$ = 10.0 Hz, 1H, H3), 5.31-5.32 (m, 3H, H1, H2, H4), 4.27-4.20 (m, 2H, H5, H6), 4.15-4.12 (m, 1H, H6), 2.15, 2.10, 2.04, 2.00 (je s, je 3H, CH_3-Acetyl).
α-^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 171.0 (C_q-Acetyl), 170.4 (C_q-Acetyl), 170.2 (C_q-Acetyl), 170.0 (C_q-Acetyl), 92.3 (C1), 70.2 (C2), 68.9 (C3), 68.6 (C5), 66.3 (C4), 62.6 (C6), 21.0 (CH_3-Acetyl), 20.9 (CH_3-Acetyl), 20.8 (2x CH_3-Acetyl).
MS (FAB): ber. 331.3 [M-OH^-], gef. 331.2.
IR ν [cm^{-1}]: 3475, 2958, 1739, 1452, 1370, 1211, 1152, 1029, 944, 912, 603, 599.

*Synthese von 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-D-galactopyranose **131***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 5 durchgeführt. Es wurden 1.50 g D-Galactose (8.34 mmol, 1.0 Äq.), 11.8 mL Essigsäureanhydrid (125 mmol, 15 Äq.) und 20 mL Pyridin eingesetzt.



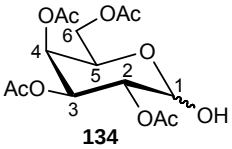
131

Ausbeute: 2.96 g (7.59 mmol, 91%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{16}H_{22}O_{11}$; Molgewicht: 390.3 g/mol; R_f-Wert (DCM/MeOH 9:1 v/v): 0.77; Anomerenverhältnis: α/β ~ 5:1.

α-^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 6.33 (d, $^3J_{HH}$ = 2.4 Hz, 1H, H1), 5.45-5.44 (m, 1H, H2), 5.29-5.28 (m, 2H, H3, H4), 4.30 (dt, $^3J_{HH}$ = 0.9 Hz, $^3J_{HH}$ = 2.4 Hz, 1H, H5), 4.09-4.03 (m, 2H, H6), 2.12, 2.11, 2.00, 1.97, 1.95 (je s, je 3H, CH_3-Acetyl).
α-^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 170.4 (C_q-Acetyl), 170.2 (C_q-Acetyl), 170.1 (C_q-Acetyl), 169.9 (C_q-Acetyl), 168.9 (C_q-Acetyl), 89.8 (C1), 68.8 (C3), 67.5 (C2), 67.4 (C4), 66.5 (C5), 61.3 (C6), 20.9 (CH_3-Acetyl), 20.8 (CH_3-Acetyl), 20.7 (2x CH_3-Acetyl), 20.6 (CH_3-Acetyl).

*Synthese von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-galactopyranose **134***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 6 durchgeführt. Es wurden 1.52 g 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-D-galactopyranose **131** (3.90 mmol, 1.0 Äq.), 431 mg Hydraziniumacetat (4.68 mmol, 1.2 Äq.) und 4 mL DMF eingesetzt.



134

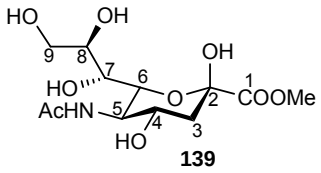
Ausbeute: 630 mg (1.81 mmol, 46%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{14}H_{20}O_{10}$; Molgewicht: 348.3 g/mol; R_f-Wert (PE/EE 2:3 v/v): 0.65; Anomerenverhältnis: α/β ~ 5:1.

α-^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 5.49 (d, $^3J_{HH}$ = 2.9 Hz, 1H, H1), 5.44 (dd, $^3J_{HH}$ = 3.5 Hz, $^3J_{HH}$ = 1.0 Hz, 1H, H3), 5.38-5.42 (m, 1H, H2), 5.10 (dd, $^3J_{HH}$ = 10.9 Hz, $^3J_{HH}$ = 3.5 Hz, 1H, H4), 4.46 (dd, $^3J_{HH}$ = 6.6 Hz, $^3J_{HH}$ = 6.6 Hz, 1H, H5), 4.13 (dd, $^3J_{HH}$ = 6.6 Hz, $^3J_{HH}$ = 6.6 Hz, 1H, H6), 4.08-4.05 (m, 1H, H6), 2.08, 2.05, 2.03, 1.96 (je s, je 3H, CH_3-Acetyl).

α-^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 170.8 (C_q-Acetyl), 170.6 (C_q-Acetyl), 170.3 (C_q-Acetyl), 169.8 (C_q-Acetyl), 90.6 (C1), 71.3 (C2), 69.5 (C3), 68.4 (C4), 67.5 (C5), 61.9 (C6), 20.7 (CH_3-Acetyl), 20.6 (2x CH_3-Acetyl), 20.5 (CH_3-Acetyl).
MS (FAB): ber. 331.3 [M-OH$^-$], gef. 331.2.
IR ν [cm^{-1}]: 3468, 2957, 1741, 1433, 1368, 1210, 1152, 1029, 943, 910, 735, 599.

*Synthese von Methyl-5-acetamido-3,5-didesoxy-β-D-glycero-D-2-nonulopyranosyl-onat **139***

Es wurden 1.00 g *N*-Acetylneuraminsäure (3.24 mmol, 1.0 Äq.) mit 1.00 g gewaschenem Ionentauscher (Dowex, W50X8, H^+) in 32 mL wasserfreiem Methanol suspendiert und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle (EtOH/AcOH/H_2O 4:1:1 v/v) wurde der Ionentauscher abfiltriert, mit Methanol gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.



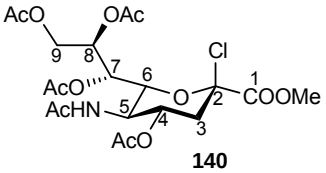
139

Ausbeute: 1.05 g (3.24 mmol, 100%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{12}H_{21}NO_9$; Molgewicht: 323.3 g/mol; R_f-Wert (EtOH/AcOH/H_2O 4:1:1 v/v): 0.77; Anomerenverhältnis: β-anomerenrein; $[\alpha]_D^{20}$= -43° (c=1.0, MeOH).

β-^{1}H-NMR (400 MHz, MeOD) δ/ppm: 4.07-3.98 (m, 2H, H4, H6), 3.83-3.79 (m, 2H, H5, H9), 3.78 (s, 3H, OCH_3), 3.70 (ddd, $^3J_{HH}$ = 3.0 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.8 Hz, $^3J_{HH}$ = 8.9 Hz, 1H, H8), 3.61 (dd, $^3J_{HH}$ = 5.8 Hz, $^2J_{HH}$ = 11.2 Hz, 1H, H9), 3.48 (dd, $^3J_{HH}$ = 1.5 Hz, $^3J_{HH}$ = 8.9 Hz, 1H, H7), 2.22 (dd, $^3J_{HH}$ = 4.8 Hz, $^2J_{HH}$ = 12.8 Hz, 1H, $H3_{eq}$), 2.02 (s, 3H, CH_3-Acetyl), 1.89 (dd, $^3J_{HH}$ = 11.4 Hz, $^2J_{HH}$ = 12.8 Hz, 1H, $H3_{ax}$).
β-^{13}C-NMR (101 MHz, MeOD) δ/ppm: 175.2 (C_q-Acetyl), 171.9 (C1), 96.8 (C2), 72.2 (C6), 71.8 (C8), 70.3 (C7), 68.0 (C4), 65.0 (C9), 54.5 (C5), 53.2 (OCH_3), 40.8 (C3), 22.7 (CH_3-Acetyl).
MS (FAB): ber. 324.3 [M+H$^+$], gef. 324.2.
IR ν [cm^{-1}]: 3324, 2936, 2881, 1736, 1632, 1541, 1428, 1370, 1273, 1144, 1122, 1025, 993, 941, 893, 615.

Synthese von Methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-2-chlor-3,5-didesoxy-β-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat ***140***

Es wurden 1.00 g *N*-Acetylneuraminsäuremethylester **139** (3.09 mmol, 1.0 Äq.) bei 0 °C in 60 mL Acetylchlorid gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend bei verschlossenem Reaktionsgefäß 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum. Anschließend wurde der erhaltene Rückstand bei 0 °C wieder in 15 mL Acetylchlorid gelöst und zusätzlich mit 0.3 mL wasserfreiem Methanol versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde erneut bei verschlossenem Reaktionsgefäß 16 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand wurde dreimal mit Toluol coevaporiert und anschließend gründlich im Vakuum getrocknet.



140

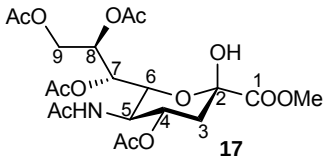
Ausbeute: 1.57 g (3.09 mmol, 100%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{20}H_{28}ClNO_{12}$; Molgewicht: 509.9 g/mol; R_f-Wert (Toluol/Aceton 1:1 v/v): 0.51; Anomerenverhältnis: β-anomerenrein; $[\alpha]_D^{20}$= -58.0° (c=1.0, $CHCl_3$).

β-^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 5.52 (d, $^3J_{HH}$ = 10.4 Hz, 1H, NH), 5.47 (dd, $^3J_{HH}$ = 2.5 Hz, $^3J_{HH}$ = 7.0 Hz, 1H, H7), 4.43-4.36 (m, 1H, H4), 5.17 (td, $^3J_{HH}$ = 2.8 Hz, $^3J_{HH}$ = 6.0 Hz, $^3J_{HH}$ = 6.0 Hz, 1H, H8), 4.42 (dd, $^3J_{HH}$ = 2.8 Hz, $^2J_{HH}$ = 12.6 Hz, 1H, H9), 4.35 (dd, $^3J_{HH}$ = 2.2 Hz, $^3J_{HH}$ = 10.4 Hz, 1H, H5), 4.24-4.17 (m, 1H, H6), 4.06 (dd, $^3J_{HH}$ = 6.0 Hz, $^2J_{HH}$ = 12.6 Hz, 1H, H9), 3.87 (s, 3H, OCH_3), 2.78 (dd, $^3J_{HH}$ = 4.8 Hz, $^2J_{HH}$ = 13.9 Hz, 1H, $H3_{eq}$), 2.27 (dd, $^3J_{HH}$ = 11.3 Hz, $^2J_{HH}$ = 13.9 Hz, 1H, $H3_{ax}$), 2.12, 2.07, 2.05, 2.04 (je s, je 3H, CH_3-Acetyl), 1.91 (s, 3H, NH-Acetyl).
β-^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 171.1, 170.7, 170.5, 170.1, 169.8 (C_q-Acetyl), 165.6 (C1), 96.8 (C2), 74.1 (C6), 70.1 (C8), 68.9 (C7), 67.0 (C4), 62.2 (C9), 53.9 (OCH_3), 49.0 (C5), 40.8 (C3), 23.3 (NH-CH_3-Acetyl), 21.0-20.9 (CH_3-Acetyl).

Synthese von Methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-didesoxy-β-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat ***17***

Die Umsetzung erfolgte in einem mit Alufolie ummantelten Reaktionsgefäß. Es wurden 1.50 g des Chlorids **140** (2.94 mmol, 1.0 Äq.) in 73 mL Aceton und 18 mL

destilliertem Wasser gelöst, mit 2.43 g Silbercarbonat (8.83 mmol, 3.0 Äq.) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde über Celite filtriert, mit Ethylacetat gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch mit einem Gemisch aus Petrolether und Aceton (1:1 v/v).



17

Ausbeute: 968 mg (1.97 mmol, 67%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{20}H_{29}NO_{13}$; Molgewicht: 491.4 g/mol; R_f-Wert (Toluol/Aceton 1:1 v/v): 0.31; Anomerenverhältnis: β-anomerenrein; $[\alpha]_D^{20}$= +23.0° (c=0.1, $CHCl_3$).

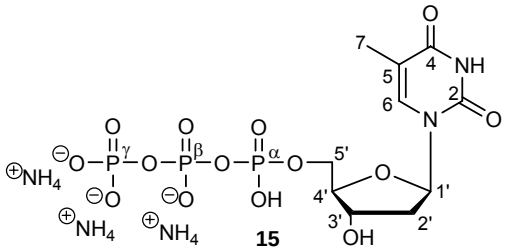
β-^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 5.78 (d, $^3J_{HH}$ = 9.4 Hz, 1H, NH), 5.35 (dd, $^3J_{HH}$ = 1.9 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.3 Hz, 1H, H7), 5.25-5.17 (m, 2H, H4, H8), 4.51 (dd, $^3J_{HH}$ = 2.5 Hz, $^2J_{HH}$ = 12.3 Hz, 1H, H9), 4.21-4.14 (m, 2H, H5, H6), 4.02 (dd, $^3J_{HH}$ = 7.6 Hz, $^2J_{HH}$ = 12.3 Hz, 1H, H9), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 2.24-2.17 (m, 2H, H3), 2.13, 2.09, 2.02, 2.01 (je s, je 3H, CH_3-Acetyl), 1.89 (s, 3H, NH-Acetyl).
β-^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 171.1, 171.0, 170.9, 170.5, 170.4 (C_q-Acetyl), 169.2 (C1), 95.0 (C2), 71.4 (C8), 71.2 (C6), 69.5 (C4), 68.2 (C7), 62.8 (C9), 53.6 (OCH_3), 49.7 (C5), 36.7 (C3), 23.3 (NH-CH_3-Acetyl), 21.1-20.9 (CH_3-Acetyl).
MS (FAB): ber. 492.4 [M+H$^+$], gef. 492.3.
IR ν [cm^{-1}]: 3352, 2961, 1736, 1659, 1542, 1435, 1369, 1209, 1154, 1125, 1071, 1030, 945, 595.

8.2.7 Synthese der Nucleosid-5'-di und –triphosphate

Anmerkung: Der Einfachheit halber wurde zur Berechnung der Ausbeute von drei Ammonium-Gegenionen pro NTP und von zwei Ammoniumionen pro NDP ausgegangen. Da die Produkte durch Gefriertrocknung erhalten wurden, muss von einem teilweisen Ausgasen von Ammoniak unter Protonierung der Phosphatgruppe ausgegangen werden, sodass die Anzahl der Gegenionen schwankt. Dies sollte allerdings rechnerisch keinen großen Einfluss auf die Ausbeuten haben.

*Synthese von 2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat **15***

Variante A: Die Reaktion wurde gemäß AAV 7, Variante A durchgeführt. Es wurden 100 mg 5-Nitro-*cyclo*Sal-3'-*O*-acetyl-2'-desoxythymidinmonophosphat **69** (0.200 mmol, 1.0 Äq.), 360 mg Tris-(tetra-*n*-butylammonium)-hydrogen-pyrophosphat **74** (0.400 mmol, 2.0 Äq.) und 6.00 mL DMF eingesetzt.



15

Ausbeute: 85.0 mg (0.160 mmol, 80%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{10}H_{26}N_5O_{14}P_3$; Molgewicht: 533.3 g/mol; R_f-Wert (*i*Pr/NH_4OAc 2:1 v/v): 0.10.

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 7.72 (d, $^4J_{HH}$ = 1.2 Hz, 1H, H6), 6.33 (dd, $^3J_{HH}$ = 6.8 Hz, $^3J_{HH}$ = 6.8 Hz, 1H, H1'), 4.66–4.63 (m, 1H, H3'), 4.21–4.16 (m, 3H, H4', H5'), 2.42–2.30 (m, 2H, H2'), 1.91 (d, $^4J_{HH}$ = 1.2 Hz, 3H, H7).

^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O) δ/ppm: 167.0 (C4), 153.4 (C2), 137.8 (C6), 112.1 (C5), 85.8 (d, $^3J_{CP}$ = 8.7 Hz, C4'), 85.3 (C1'), 71.0 (C3'), 65.8 (d, $^2J_{CP}$ = 5.6 Hz, C5'), 38.9 (C2'), 12.0 (C7).

^{31}P-NMR (162 MHz, D_2O) δ/ppm: -7.72 (d, $^2J_{PP}$ = 19.8 Hz, P_γ), -11.42 (d, $^2J_{PP}$ = 19.8 Hz, P_α), -22.43 (dd, $^2J_{PP}$ = 19.8 Hz, $^2J_{PP}$ = 19.8 Hz, P_β).

HRMS (ESI^-): ber.: 583.1072 [$M+H^+$], gef.: 583.1077.

Variante B: Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 280 mg 3'-*O*-Acetyl-2'-desoxythymidin **64** (0.990 mmol, 1.0 Äq.) zunächst dreimal mit wasserfreiem Pyridin coevaporiert und anschließend in einer Mischung aus wasserfreiem Pyridin und abs. Dioxan (4.00 mL, 1:3 v/v) gelöst. Diese Lösung wurde bei Raumtemperatur mit einer 0.1 M Lösung von 2-Chloro-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on **12** (200 mg, 0.990 mmol, 1.0 Äq.) in wasserfreiem Dioxan versetzt. Die erhaltene Suspension wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und dann mit 1.40 g Tris-(tetra-*n*-butylammonium)-pyrophosphat **74** (1.48 mmol, 1.5 Äq.), gelöst in 1.00 mL wasserfreiem DMF, versetzt und 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde durch Zugabe von 20.0 mL einer 1%-igen Iod-Lösung (1.48 mmol, 1.5 Äq., gelöst in Pyridin/Wasser 98:2 v/v) oxidiert und 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Überschüssiges Iod wurde durch

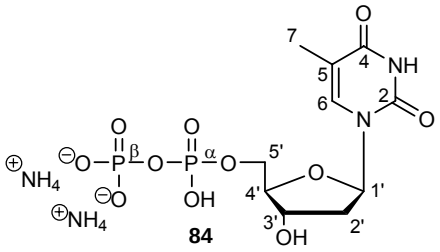
Zugabe einer wässrigen Natriumhydrogensulfit-Lösung zerstört. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das erhaltene Rohprodukt in 10 mL Wasser aufgenommen, mit 20 mL 25%-igem Ammoniak versetzt und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Wasser verdünnt und gefriergetrocknet. Der erhaltene Rückstand wurde über eine RP-18-Phase mit Wasser als Eluent gereinigt. Die Detektion der Produktfraktionen erfolgte dünnschichtchromatographisch mit einem Gemisch aus *iso*-Propanol und einer 1 M Ammoniumacetat-Lösung (2:1 v/v). Durch nachfolgende Gefriertrocknung wurden die reinen Produkte in Form ihrer Ammoniumsalze als farblose Feststoffe erhalten.

Ausbeute: 105 mg (0.198 mmol, 20%) eines farblosen Feststoffes.

Die spektroskopischen Daten entsprachen denen von Variante A.

Synthese von 2'-Desoxythymidin-5'-diphosphat ***84***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 7, Variante A durchgeführt. Es wurden 100 mg 5-Nitro-*cyclo*Sal-3'-*O*-acetyl-2'-desoxythymidinmonophosphat **69** (0.200 mmol, 1.0 Äq.), 0.185 g Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-hydrogenphosphat **75** (0.400 mmol, 2.0 Äq.) und 6.00 mL DMF eingesetzt.



84

Ausbeute: 72.4 mg (0.166 mmol, 83%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{10}H_{22}N_4O_{11}P_2$; Molgewicht: 436.2 g/mol; R_f-Wert (*i*Pr/NH_4OAc 2:1 v/v): 0.13.

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 7.75 (d, $^4J_{HH}$ = 1.1 Hz, 1H, H6), 6.34 (dd, $^3J_{HH}$ = 7.1 Hz, $^3J_{HH}$ = 7.1 Hz, 1H, H1'), 4.64-4.61 (m, 1H, H3'), 4.17-4.14 (m, 3H, H4', H5'), 2.39-2.34 (m, 2H, H2'), 1.92 (d, $^4J_{HH}$ = 1.1 Hz, 3H, H7).

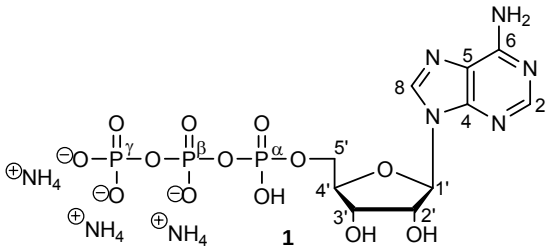
^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O) δ/ppm: 166.9 (C4), 152.1 (C2), 137.8 (C6), 112.1 (C5), 85.8 (d, $^3J_{CP}$ = 8.8 Hz, C4'), 85.3 (C1'), 71.4 (C3'), 65.7 (d, $^2J_{CP}$ = 5.1 Hz, C5'), 38.9 (C2'), 12.0 (C7).

^{31}P-NMR (162 MHz, D_2O) δ/ppm: -9.24 (d, $^2J_{PP}$ = 21.6 Hz, P_α), -10.66 (d, $^2J_{PP}$ = 21.6 Hz, P_β).

MS (HR-ESI$^-$): ber. 401.0157 [M-H$^+$], gef.: 401.0161.

*Synthese von Adenosin-5'-triphosphat **1***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 7, Variante A durchgeführt. Es wurden 110 mg 5-Nitro-*cyclo*Sal-*N*^{6},2',3'-triacetyladenosinmonophosphat **66** (0.180 mmol, 1.0 Äq.), 327 mg Tris-(tetra-*n*-butylammonium)-hydrogenpyrophosphat **74** (0.360 mmol, 2.0 Äq.) und 8.0 mL DMF eingesetzt.



1

Ausbeute: 65.3 mg (0.117 mmol, 65%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{10}H_{25}N_8O_{13}P_3$; Molgewicht: 558.3 g/mol; R_f-Wert (*i*Pr/NH_4OAc 2:1 v/v): 0.09.

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 8.60 (s, 1H, H8), 8.42 (s, 1H, H2), 6.12 (d, $^3J_{HH}$ = 5.3 Hz, 1H, H1'), 4.69 (dd, $^3J_{HH}$ = 4.8 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.3 Hz, 1H, H2'), 4.55 (dd, $^3J_{HH}$ = 4.1 Hz, $^3J_{HH}$ = 4.8 Hz, 1H, H3'), 4.44-4.42 (m, 1H, H4'), 4.39-4.35 (m, 1H, H5'), 4.30 (ddd, $^2J_{HH}$ = 11.7 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.5 Hz, $^3J_{HP}$ = 2.9 Hz, 1H, H5').

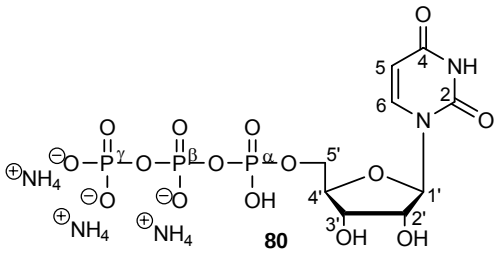
^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O) δ/ppm: 153.1 (C2), 150.0 (C6), 148.1 (C4), 142.2 (C8), 118.2 (C5), 87.9 (C1'), 84.1 (d, $^3J_{CP}$ = 9.1 Hz, C4'), 75.0 (C2'), 70.2 (C3'), 65.2 (d, $^2J_{CP}$ = 4.9 Hz, C5').

^{31}P-NMR (162 MHz, D_2O) δ/ppm: -10.72 (d, $^2J_{PP}$ = 19.0 Hz, P_γ), -11.26 (d, $^2J_{PP}$ = 19.0 Hz, P_α), -22.91 (dd, $^2J_{PP}$ = 19.0 Hz, $^2J_{PP}$ = 19.0 Hz, P_β).

MS (HR-ESI$^-$): ber. 505.9885 [M-H$^+$], gef.: 505.9874.

*Synthese von Uridin-5'-triphosphat **80***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 7, Variante A durchgeführt. Es wurden 150 mg 5-Nitro-*cyclo*Sal-2',3'-*O*-uridinmonophosphat **67** (0.280 mmol, 1.0 Äq.), 500 mg Tris-(tetra-*n*-butylammonium)-hydrogenpyrophosphat **74** (0.550 mmol, 2.0 Äq.) und 10.0 mL DMF eingesetzt.



80

Ausbeute: 75.0 mg (0.140 mmol, 50%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_9H_{24}N_5O_{15}P_3$; Molgewicht: 535.2 g/mol; R_f-Wert (*i*Pr/NH_4OAc 2:1 v/v): 0.11.

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 7.95 (d, $^3J_{HH}$ = 8.3 Hz, 1H, H6), 6.10 (d, $^3J_{HH}$ = 4.9 Hz, 1H, H1'), 6.00 (d, $^3J_{HH}$ = 8.3 Hz, 1H, H5), 4.45–4.39 (m, 2H, H2', H3'), 4.29–4.25 (m, 3H, H4', H5').

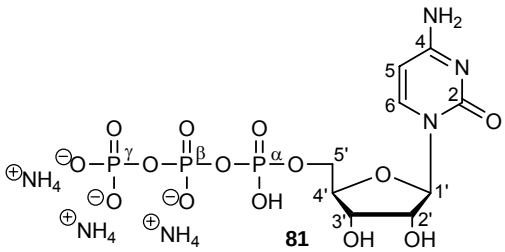
^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O) δ/ppm: 165.4 (C4), 149.3 (C2), 142.1 (C6), 103.1 (C5), 88.8 (C1'), 83.6 (d, $^3J_{CP}$ = 8.7 Hz, C4'), 74.1 (C3'), 70.0 (C2'), 65.4 (d, $^2J_{CP}$ = 5.1 Hz, C5').

^{31}P-NMR (162 MHz, D_2O) δ/ppm: -9.85 (d, $^2J_{PP}$ = 19.8 Hz, P_γ), -11.41 (d, $^2J_{PP}$ = 19.8 Hz, P_α), -22.90 (dd, $^2J_{PP}$ = 19.8 Hz, $^2J_{PP}$ = 19.8 Hz, P_β).

MS (ESI^-): ber.: 483.1 [$M\text{-}H^+$], gef.: 483.

*Synthese von Cytidin-5'-triphosphat **81***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 7, Variante A durchgeführt. Es wurden 100 mg 5-Nitro-*cyclo*Sal-*N*^{4},2',3'-triacetylcytidinmonophosphat **68** (0.170 mmol, 1.0 Äq.), 310 mg Tris-(tetra-*n*-butylammonium)-hydrogenpyrophosphat **74** (0.340 mmol, 2.0 Äq.) und 6.0 mL DMF eingesetzt.



81

Ausbeute: 39.0 mg (0.0730 mmol, 43%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_9H_{25}N_6O_{14}P_3$; Molgewicht: 534.2 g/mol; R_f-Wert (*i*Pr/NH_4OAc 2:1 v/v): 0.10.

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 8.22 (d, $^3J_{HH}$ = 8.0 Hz, 1H, H6), 6.33 (d, $^3J_{HH}$ = 8.0 Hz, 1H, H5), 5.96 (d, $^3J_{HH}$ = 3.6 Hz, 1H, H1'), 4.41-4.37 (m, 2H, H2', H3'), 4.35-4.31 (m, 2H, H4', H5'), 4.26-4.22 (m, 1H, H5').

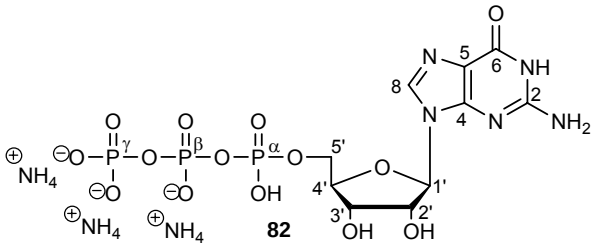
^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O) δ/ppm: 160.0 (C4), 149.5 (C2), 144.0 (C6), 95.6 (C5), 89.5 (C1'), 83.5 (d, $^3J_{CP}$ = 9.4 Hz, C4'), 74.5 (C2'), 69.2 (C3'), 64.6 (d, $^2J_{CP}$ = 5.4 Hz, C5').

^{31}P-NMR (162 MHz, D_2O) δ/ppm: -9.56 (d, $^2J_{PP}$ = 19.5 Hz, P_γ), -11.37 (d, $^2J_{PP}$ = 19.5 Hz, P_α), -23.04 (dd, $^2J_{PP}$ = 19.5 Hz, $^2J_{PP}$ = 19.5 Hz, P_β).

MS (HR-ESI^-): ber. 481.9772 [$M\text{-}H^+$], gef.: 481.9760.

*Synthese von Guanosin-5'-triphosphat **82***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 7, Variante A durchgeführt. Es wurden 120 mg 5-Nitro-*cyclo*Sal-N^2-formamidin-2',3'-*O*-acetyl-guanosinmonophosphat **71** (0.19 mmol, 1.0 Äq.), 340 mg Tris-(tetra-*n*-butylammonium)-hydrogenpyrophosphat **74** (0.380 mmol, 2.0 Äq.) und 8.00 mL DMF eingesetzt.



82

Ausbeute: 44.0 mg (0.0760 mmol, 40%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{11}H_{25}N_8O_{14}P_3$; Molgewicht: 574.3 g/mol; R_f-Wert (*i*Pr/NH_4OAc 2:1 v/v): 0.09.

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 8.11 (s, 1H, H8), 5.92 (d, $^3J_{HH}$ = 6.1 Hz, 1H, H1'), 4.78-4.75 (m, 1H, H2'), 4.56 (dd, $^3J_{HH}$ = 3.3 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.1 Hz, 1H, H3'), 4.37-4.34 (m, 1H, H4'), 4.28-4.18 (m, 2H, H5').

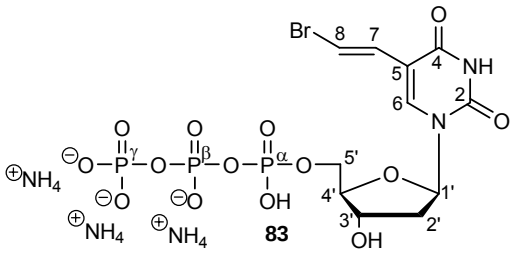
^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O) δ/ppm: 158.9 (C6), 153.9 (C2), 151.8 (C4), 144.3 (C8), 116.2 (C5), 86.7 (C1'), 83.8 (d, $^3J_{CP}$ = 9.2 Hz, C4'), 73.7 (C2'), 70.2 (C3'), 65.2 (d, $^2J_{CP}$ = 5.4 Hz, C5').

^{31}P-NMR (162 MHz, D_2O) δ/ppm: -9.11 (d, $^2J_{PP}$ = 18.9 Hz, P_γ), -11.17 (d, $^2J_{PP}$ = 18.9 Hz, P_α), -22.18 (dd, $^2J_{PP}$ = 18.9 Hz, $^2J_{PP}$ = 18.9 Hz, P_β).

MS (HR-ESI$^-$): ber. 521.9834 [M-H$^+$], gef.: 521.9836.

*Synthese von BVdU-5'-triphosphat **83***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 7, Variante A durchgeführt. Es wurden 90.0 mg 5-Nitro-*cyclo*Sal-3'-*O*-acetyl-BVdU-monophosphat **70** (0.150 mmol, 1.0 Äq.), 280 mg Tris-(tetra-*n*-butylammonium)-hydrogenpyrophosphat **74** (0.300 mmol, 2.0 Äq.) und 6.00 mL DMF eingesetzt.



83

Ausbeute: 49.0 mg (0.0780 mmol, 52%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{11}H_{25}BrN_5O_{14}P_3$; Molgewicht: 624.2 g/mol; R_f-Wert (*i*Pr/NH_4OAc 2:1 v/v): 0.10.

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 7.91 (s, 1H, H6), 7.25 (d, $^3J_{HH}$ = 13.8 Hz, 1H, H8), 6.95 (d, $^3J_{HH}$ = 13.8 Hz, 1H, H7), 6.29 (dd, $^3J_{HH}$ = 6.5 Hz, $^3J_{HH}$ = 6.5 Hz, 1H, H1'), 4.66-4.63 (m, 1H, H3'), 4.24-4.14 (m, 3H, H4', H5'), 2.40-2.37 (m, 2H, H2').

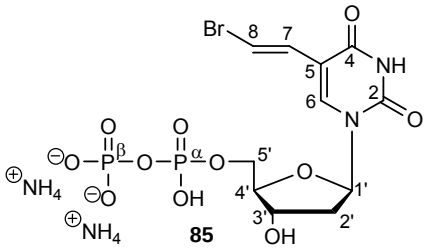
^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O) δ/ppm: 163.7 (C4), 150.7 (C2), 139.0 (C6), 122.4 (C7), 111.8 (C5), 109.2 (C8), 85.7 (d, $^3J_{CP}$ = 8.8 Hz, C4'), 85.6 (C1'), 70.8 (C3'), 65.2 (d, $^2J_{CP}$ = 5.2 Hz, C5'), 38.7 (C2').

^{31}P-NMR (161 MHz, D_2O) δ/ppm: -7.70 (d, $^2J_{PP}$ = 20.2 Hz, Pγ), -11.42 (d, $^2J_{PP}$ = 20.2 Hz, Pα), -22.44 (dd, $^2J_{PP}$ = 20.2 Hz, $^2J_{PP}$ = 20.2 Hz, Pβ).

MS (HR-ESI$^-$): ber.: 570.8920, 572.8899 [M-H$^+$], gef.: 570.8919, 572.8897.

*Synthese von BVdU-5'-diphosphat **85***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 7, Variante A durchgeführt. Es wurden 90.0 mg 5-Nitro-*cyclo*Sal-3'-*O*-acetyl-BVdU-monophosphat **70** (0.150 mmol, 1.0 Äq.), 140 mg Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-hydrogenphosphat **75** (0.300 mmol, 2.0 Äq.) und 6.00 mL DMF eingesetzt.



85

Ausbeute: 44.0 mg (0.0840 mmol, 56%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{11}H_{21}BrN_4O_{11}P_2$; Molgewicht: 527.2 g/mol; R_f-Wert (*i*Pr/NH_4OAc 2:1 v/v): 0.13.

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 7.95 (s, 1H, H6), 7.29 (d, $^3J_{HH}$ = 13.8 Hz, 1H, H8), 6.98 (d, $^3J_{HH}$ = 13.8 Hz, 1H, H7), 6.34 (dd, $^3J_{HH}$ = 6.8 Hz, $^3J_{HH}$ = 6.8 Hz, 1H, H1'), 4.66-4.62 (m, 1H, H3'), 4.24-4.15 (m, 3H, H4', H5'), 2.43-2.40 (m, 2H, H2').

^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O) δ/ppm: 162.6 (C4), 150.9 (C2), 140.6 (C6), 121.2 (C7), 111.5 (C5), 109.6 (C8), 85.6 (d, $^3J_{CP}$ = 8.6 Hz, C4'), 85.5 (C1'), 71.4 (C3'), 65.2 (d, $^2J_{CP}$ = 5.5 Hz, C5'), 38.9 (C2').

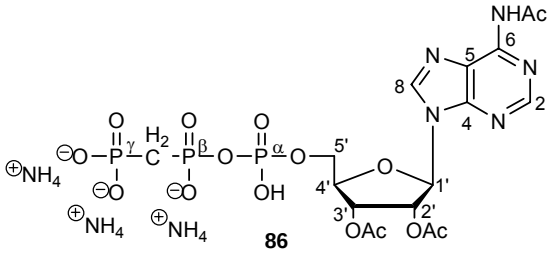
^{31}P-NMR (161 MHz, D_2O) δ/ppm: -8.37 (d, $^2J_{PP}$ = 20.5 Hz, Pα), -8.98 (d, $^2J_{PP}$ = 20.5 Hz, Pβ).

MS (HR-ESI$^-$): ber.: 490.9256, 492.9236 [M-H$^+$], gef.: 490.9258, 492.9236.

*Synthese von Adenosin-5'-β,γ-methylentriphosphat **86***

Ansatz 1:

Die Reaktion wurde gemäß AAV 7, Variante A durchgeführt. Es wurden 200 mg 5-Nitro-*cyclo*Sal-*N*^{6},2',3'-triacetyladenosinmonophosphat **66** (0.330 mmol, 1.0 Äq.), 440 mg Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-dihydrogenmethylenpyrophosphat **122a** (0.660 mmol, 2.0 Äq.) und 10.0 mL DMF eingesetzt. Das Produkt wurde nicht entschützt, da es zur Synthese des entsprechenden Tetraphosphates **87** weiter eingesetzt wurde.



86

Ausbeute: 113 mg (0.165 mmol, 50%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{17}H_{33}N_8O_{15}P_3$; Molgewicht: 682.4 g/mol; R_f-Wert (*i*Pr/NH_4OAc 2:1 v/v): 0.12.

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 8.47 (s, 1H, H8), 8.16 (s, 1H, H2), 6.12 (d, $^3J_{HH}$ = 5.7 Hz, 1H, H1'), 4.75 (dd, $^3J_{HH}$ = 5.0 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.7 Hz, 1H, H2'), 4.56 (dd, $^3J_{HH}$ = 3.9 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.0 Hz, 1H, H3'), 4.42-4.39 (m, 1H, H4'), 4.26-4.23 (m, 2H. H5'), 2.34 (dd, $^2J_{HP}$ = 20.4 Hz, $^2J_{HP}$ = 20.4 Hz, 2H, P-CH_2-P), 2.34 (s, 3H, NH-Acetyl), 2.20, 2.06 (je s, je 3H, CH_3-Acetyl).

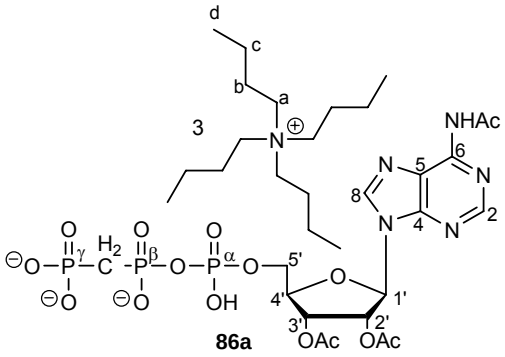
^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O) δ/ppm: 155.2 (C6), 152.5 (C2), 148.7 (C4), 139.6 (C8), 118.2 (C5), 86.7 (C1'), 83.7 (d, $^3J_{CP}$ = 9.0 Hz, C4'), 74.2 (C2'), 70.1 (C3'), 64.9 (d, $^2J_{CP}$ = 5.0 Hz, C5'), 29.3 (dd, $^1J_{CP}$ = 121.1 Hz, $^1J_{CP}$ = 131.8 Hz, P-CH_2-P), 23.8 (NH-CH_3-Acetyl), 20.1, 19.8 (CH_3-Acetyl).

^{31}P-NMR (162 MHz, D_2O) δ/ppm: 16.02 (d, $^2J_{PP}$ = 9.7 Hz, Pγ), 7.53 (dd, $^2J_{PP}$ = 9.7 Hz, $^2J_{PP}$ = 25.3 Hz, Pβ), -11.51 (d, $^2J_{PP}$ = 25.3 Hz, Pα).

Ansatz 2:

Die Reaktion wurde zunächst gemäß AAV 7 durchgeführt. Es wurden 300 mg 5-Nitro-*cyclo*Sal-*N*^{6},2',3'-triacetyladenosinmonophosphat **66** (0.490 mmol, 1.0 Äq.), 650 g Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-dihydrogenmethylenpyrophosphat **74**

(0.990 mmol, 2.0 Äq.) und 10.0 mL DMF eingesetzt. Das Produkt wurde nicht entschützt, da es zur Synthese des entsprechenden Tetraphosphates **87** weiter eingesetzt wurde. Außerdem erfolgte kein Austausch der Gegenionen. Das Produkt wurde als tetra-*n*-Butylammoniumsalz an einer RP-18-Phase mit einem Gemisch aus Wasser und Acetonitril (2:1 v/v) als Eluent gereinigt.



86a

Ausbeute: 210 mg (0.155 mmol, 32%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{65}H_{129}N_8O_{15}P_3$; Molgewicht: 1355.8 g/mol; R_f-Wert (*i*Pr/NH_4OAc 2:1 v/v): 0.14.

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 8.80 (s, 1H, H8), 8.66 (s, 1H, H2), 6.44 (d, $^3J_{HH}$ = 5.5 Hz, 1H, H1'), 5.80 (dd, $^3J_{HH}$ = 5.4 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.4 Hz, 1H, H2'), 5.67 (dd, $^3J_{HH}$ = 4.5 Hz, $^3J_{HH}$ = 4.5 Hz, 1H, H3'), 4.65 (m, 1H, H4'), 4.31-4.28 (m, 2H, H5'), 3.16-3.11 (m, 24H, Ha), 2.38 (dd, $^2J_{HP}$ = 20.5 Hz, $^2J_{HP}$ = 20.5 Hz, 2H, P-CH_2-P), 2.34 (s, 3H, NH-Acetyl), 2.20, 2.06 (je s, je 3H, CH_3-Acetyl), 1.59 (m, 24H, Hb), 1.34-1.28 (m, 24H, Hc), 0.90 (t, $^3J_{HH}$ = 7.3 Hz, 36H, Hd).

^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O) δ/ppm: 172.7, 172.6, 172.1 (C_q-Acetyl), 152.0 (C2), 151.6 (C6), 148.7 (C4), 144.2 (C8), 122.7 (C5), 85.8 (C1'), 82.1 (C4'), 74.3 (C2'), 71.4 (C3'), 64.9 (C5'), 58.2 (C_a), 29.2 (t, $^1J_{CP}$ = 122.0 Hz, P-CH_2-P), 23.8 (NH-CH_3-Acetyl), 23.2 (C_b), 20.1, 19.8 (CH_3-Acetyl), 19.2 (C_c), 12.9 (C_d).

^{31}P-NMR (162 MHz, D_2O) δ/ppm: 15.99 (d, $^2J_{PP}$ = 9.8 Hz, P_γ), 7.50 (dd, $^2J_{PP}$ = 9.8 Hz, $^2J_{PP}$ = 25.4 Hz, P_β), -11.49 (d, $^2J_{PP}$ = 25.4 Hz, P_α).

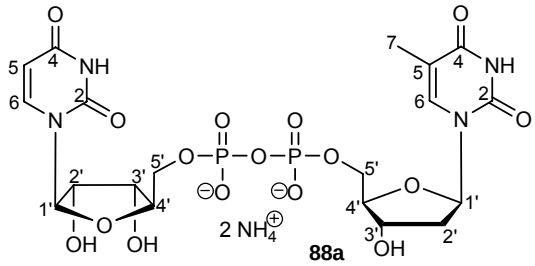
MS (HR-ESI$^-$): ber. 630.0409 [M-H$^+$], gef.: 630.0397.

8.2.8 Synthese der Dinucleosid-5',5'-oligophosphate

*Synthese von Uridin-2'-desoxythymidin-5',5'-diphosphat **88***

Ansatz 1:

Die Reaktion wurde gemäß AAV 7, Variante A durchgeführt. Es wurden 100 mg 5-Nitro-*cyclo*Sal-3'-*O*-acetyl-2'-desoxythymidinmonophosphat **69** (0.200 mmol, 1.0 Äq.), 320 mg Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-uridinmonophosphat **90a** (0.400 mmol, 2.0 Äq.) und 6.00 mL DMF eingesetzt.



88a

Ausbeute: 13.0 mg (0.0200 mmol, 20%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{19}H_{32}N_6O_{16}P_2$; Molgewicht: 662.4 g/mol; R_f-Wert (*i*Pr/NH_4OAc 2:1 v/v): 0.49.

Anmerkung: Der Einfachheit halber wurde zur Berechnung der Ausbeute von zwei Ammoniumionen pro Up_2T **88a** ausgegangen. Da das Produkt durch Gefriertrocknung erhalten wurde, muss von einem teilweisen Ausgasen von Ammoniak unter Protonierung der Phosphatgruppe ausgegangen werden, sodass die Anzahl der Gegenionen schwankt. Dies sollte allerdings rechnerisch keinen großen Einfluss auf die Ausbeuten haben.

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 7.93 (d, $^3J_{HH}$ = 8.3 Hz, 1H, H6-U), 7.70 (d, $^4J_{HH}$ = 1.0 Hz, 1H, H6-T), 6.31 (t, $^3J_{HH}$ = 6.6 Hz, 1H, H1'-T), 5.96-5.94 (m, 2H, H5-U, H1'-U), 4.62-4.58 (m, 1H, H3'-T), 4.36-4.33 (m, 2H, H2'-U, H3'-U), 4.27-4.23 (m, 2H, H4'-U, H4'-T), 4.19-4.15 (m, 4H, H5'-U, H5'-T), 2.37-2.33 (m, 2H, H2'-T), 1.92 (d, $^4J_{HH}$ = 1.0 Hz, 3H, H7-T).

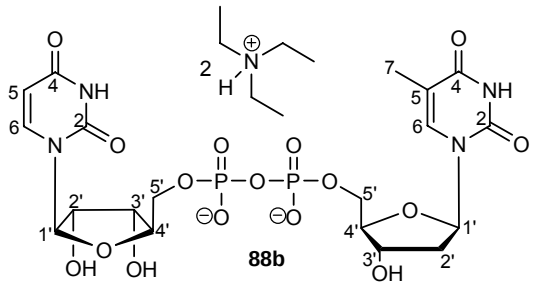
^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O) δ/ppm: 166.2 (C4-T), 165.9 (C4-U), 151.6, 151.2 (C2-T, C2-U), 141.9 (C6-U), 137.6 (C6-T), 111.5 (C5-T), 102.5 (C5-U), 88.4 (C1'-U), 85.3 (d, $^3J_{CP}$ = 8.8 Hz, C4'-U), 85.1 (C1'-T), 83.4 (d, $^3J_{CP}$ = 8.3 Hz, C4'-T), 73.9 (C3'-T), 71.0, 69.6 (C2'-U, C3'-U), 65.6, 64.7 (je d, je $^2J_{CP}$ = 4.5 Hz, C5'-U, C5'-T), 38.6 (C2'-T), 11.9 (C7-T).

^{31}P-NMR (162 MHz, D_2O) δ/ppm: -11.23, -11.54 (je d, je $^2J_{PP}$ = 20.2 Hz).

MS (HR-ESI$^-$): ber. 628.0819 [M], gef.: 628.0812.

Ansatz 2:

Die Reaktion wurde gemäß AAV 7, Variante B durchgeführt. Es wurden 90.0 mg 5-Nitro-*cyclo*Sal-3'-*O*-acetyl-2'-desoxythymidinmonophosphat **69** (0.180 mmol, 1.0 Äq.), 154 mg Triethylammoniumuridinmonophosphat **90b** (0.360 mmol, 2.0 Äq.) und 6.00 mL DMF eingesetzt.



88b

Ausbeute: 88.0 mg (0.110 mmol, 60%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{31}H_{56}N_6O_{16}P_2$; Molgewicht: 796.7 g/mol; R_f-Wert (*i*Pr/NH_4OAc 2:1 v/v): 0.52.

Anmerkung: Der Einfachheit halber wurde die Summenformel für 2 Gegenionen angegeben. Tatsächlich liegen jedoch nur 1.6 Gegenionen pro Up_2T **88b** vor. Bei den verbliebenen 0.4 Gegenionen müsste es sich um ein Proton handeln. Die Molmasse wurde dementsprechend berechnet.

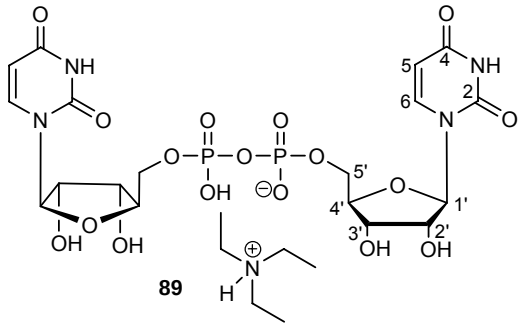
^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 7.92 (d, $^3J_{HH}$ = 8.3 Hz, 1H, H6-U), 7.72 (d, $^4J_{HH}$ = 1.1 Hz, 1H, H6-T), 6.32 (t, $^3J_{HH}$ = 6.8 Hz, 1H, H1'-T), 5.95-5.93 (m, 2H, H5-U, H1'-U), 4.62-4.59 (m, 1H, H3'-T), 4.35-4.34 (m, 2H, H2'-U, H3'-U), 4.25-4.24 (m, 2H, H4'-U, H4'-T), 4.19-4.16 (m, 4H, H5'-U, H5'-T), 3.21 (q, $^3J_{HH}$ = 7.4 Hz, 10H, CH_2-NEt_3), 2.37-2.33 (m, 2H, H2'-T), 1.91 (d, $^4J_{HH}$ = 1.1 Hz, 3H, H7-T), 1.29 (t, $^3J_{HH}$ = 7.4 Hz, 15H, CH_3-NEt_3).

^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O) δ/ppm: 166.5 (C4-T), 166.0 (C4-U), 151.7, 151.6 (C2-T, C2-U), 141.6 (C6-U), 137.5 (C6-T), 111.7 (C5-T), 102.7 (C5-U), 88.4 (C1'-U), 85.3 (d, $^3J_{CP}$ = 8.8 Hz, C4'-U), 84.9 (C1'-T), 83.2 (d, $^3J_{CP}$ = 8.1 Hz, C4'-T), 73.8 (C3'-T), 70.9, 69.6 (C2'-U, C3'-U), 65.4, 64.9 (je d, je $^2J_{CP}$ = 4.4 Hz, C5'-U, C5'-T), 46.7 (CH_2-NEt_3), 38.6 (C2'-T), 11.7 (C7-T), 8.3 (CH_3-NEt_3).

^{31}P-NMR (162 MHz, D_2O) δ/ppm: -11.46, -11.62 (je d, je $^2J_{PP}$ = 20.2 Hz).

*Synthese von Diuridin-5',5'-diphosphat **89***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 7, Variante B durchgeführt. Es wurden 320 mg 5-Nitro-*cyclo*Sal-2',3'-*O*-acetyluridinmonophosphat **67** (0.590 mmol, 1.0 Äq.), 502 mg Triethylammoniumuridinmonophosphat **90b** (1.18 mmol, 2.0 Äq.) und 12.0 mL DMF eingesetzt.



89

Ausbeute: 260 mg (0.355 mmol, 60%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{24}H_{39}N_5O_{17}P_2$; Molgewicht: 731.5 g/mol; R_f-Wert (*i*Pr/NH_4OAc 2:1 v/v): 0.50.

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 7.80 (d, $^3J_{HH}$ = 8.0 Hz, 2H, 2x H6), 5.83-5.80 (m, 4H, 2x H5, 2x H1'), 4.23-4.13 (m, 4H, 2x H2', 2x H3'), 4.07 (m, 4H, 2x H4', 2x H5'a), 4.05-4.03 (m, 2H, 2x H5'b), 3.08 (q, $^3J_{HH}$ = 7.3 Hz, 6H, CH_2-NEt_3), 1.16 (t, $^3J_{HH}$ = 7.3 Hz, 9H, CH_3-NEt_3).

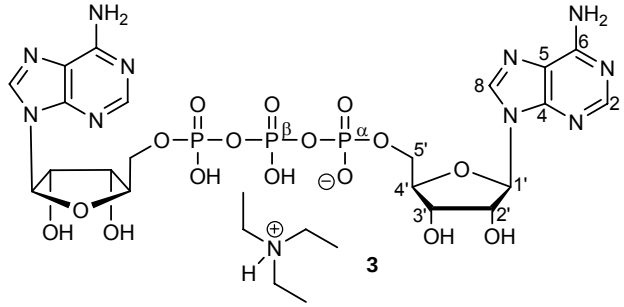
^{13}C-NMR (126 MHz, D_2O) δ/ppm: 166.0 (2x C4), 151.7 (2x C2), 141.6 (2x C6), 102.6 (2x C5), 88.3 (2x C1'), 83.1 (d, $^3J_{CP}$ = 9.2 Hz, 2x C4'), 73.8, 69.6 (2x C3', 2x C2'), 64.9 (2x C5'), 46.6 (CH_2-NEt_3), 8.2 (CH_3-NEt_3).

^{31}P-NMR (162 MHz, D_2O) δ/ppm: -11.51 (s, 2P).

MS (HR-ESI$^-$): ber. 629.0539 [M-H$^+$], gef.: 629.0529.

*Synthese von Diadenosin-5',5'-triphosphat **3***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 7, Variante B durchgeführt. Es wurden 130 mg 5-Nitro-*cyclo*Sal-*N*^{6},2',3'-triacetyladenosinmonophosphat **66** (0.220 mmol, 1.0 Äq.), 270 mg Bis-(triethylammonium)-dihydrogenadenosindiphosphat **123a** (0.430 mmol, 2.0 Äq.) und 10.0 mL DMF eingesetzt.



3

Ausbeute: 110 mg (0.128 mmol, 58%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{26}H_{42}N_{11}O_{16}P_3$; Molgewicht: 857.6 g/mol; R_f-Wert (*i*Pr/NH_4OAc 2:1 v/v): 0.28.

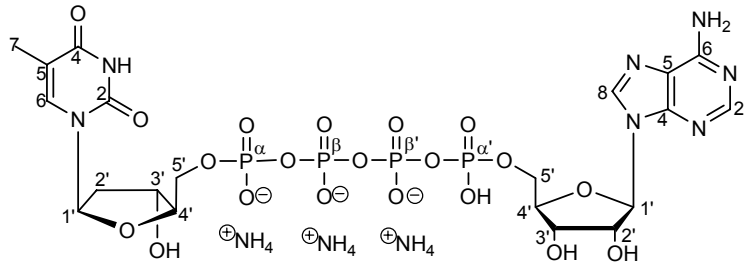
^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 8.34 (s, 1H, 2x H8), 8.12 (s, 1H, 2x H2), 5.99 (d, $^3J_{HH}$ = 4.9 Hz, 1H, 2x H1'), 4.61 (dd, $^3J_{HH}$ = 4.7 Hz, $^3J_{HH}$ = 4.9 Hz, 1H, 2x H2'), 4.49 (dd, $^3J_{HH}$ = 4.7 Hz, $^3J_{HH}$ = 4.8 Hz, 1H, 2x H3'), 4.36-4.34 (m, 1H, 2x H4'), 4.31-4.29 (m, 2H, 2x H5'), 3.19 (q, $^3J_{HH}$ = 7.3 Hz, 8H, CH_2-NEt_3), 1.27 (t, $^3J_{HH}$ = 7.3 Hz, 12H, CH_3-NEt_3).

^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O) δ/ppm: 153.5 (2x C6), 150.7 (2x C2), 148.1 (2x C4), 139.8 (2x C8), 117.8 (2x C5), 87.3 (2x C1'), 83.3 (d, $^3J_{CP}$ = 9.1 Hz, 2x C4'), 74.8 (2x C2'), 69.7 (2x C3'), 64.8 (d, $^2J_{CP}$ = 5.2 Hz, 2x C5'), 46.6 (CH_2-NEt_3), 8.2 (CH_3-NEt_3).
^{31}P-NMR (162 MHz, D_2O) δ/ppm: -11.60 (d, $^2J_{PP}$ = 19.3 Hz, 2x Pα), -23.13 (t, $^2J_{PP}$ = 19.3 Hz, Pβ).
MS (HR-ESI$^-$): ber. 755.0747 [M-H$^+$], gef.: 755.0751.

*Synthese von Adenosin-2'-desoxythymidin-5',5'-tetraphosphat **121***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 7, Variante A durchgeführt. Es wurden 320 mg 5-Nitro-*cyclo*Sal-3'-*O*-acetyl-2'-desoxythymidinmonophosphat **69** (0.640 mmol, 1.0 Äq.), 1.76 g Tetrakis-(tetra-*n*-butylammonium)-adenosintriphosphat **1a** (1.28 mmol, 2.0 Äq.) und 14.0 mL DMF eingesetzt.

Ausbeute: 276 mg (0.320 mmol, 50%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{20}H_{38}N_{10}O_{20}P_4$; Molgewicht: 862.5 g/mol; R_f-Wert (*i*Pr/NH_4OAc 2:1 v/v): 0.21.



121

Anmerkung: Der Einfachheit halber wurde zur Berechnung der Ausbeute von drei Ammoniumionen pro Ap_4T **121** ausgegangen. Da das Produkt durch Gefriertrocknung erhalten wurde, muss von einem teilweisen Ausgasen von Ammoniak unter Protonierung der Phosphatgruppe ausgegangen werden, sodass die Anzahl der Gegenionen schwankt. Dies sollte allerdings rechnerisch keinen großen Einfluss auf die Ausbeuten haben.

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 8.47 (s, 1H, H8-A), 8.12 (s, 1H, H2-A), 7.58 (d, $^4J_{HH}$ = 1.0 Hz, 1H, H6-T), 6.20 (t, $^3J_{HH}$ = 7.0 Hz, 1H, H1'-T), 6.07 (d, $^3J_{HH}$ = 6.0 Hz, 1H, H1'-A), 4.74 (dd, $^3J_{HH}$ = 5.2 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.2 Hz, 1H, H2'-A), 4.60-4.56 (m, 2H, H3'-A, H3'-T), 4.41-4.13 (m, 6H, H4'-A, H4'-T, H5'-A, H5'-T), 2.30-2.25 (m, 2H, H2'-T), 1.83 (d, $^4J_{HH}$ = 1.0 Hz, 3H, H7-T).

^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O) δ/ppm: 166.3 (C4-T), 155.4 (C6-A), 152.7 (C2-A), 151.3 (C2-T), 149.0 (C4-A), 137.1 (C8-A, C6-T), 118.4 (C5-A), 111.6 (C5-T), 86.9 (C1'-A), 85.5 (d, $^3J_{CP}$ = 8.4 Hz, C4'-A), 84.9 (C1'-T), 83.9 (d, $^3J_{CP}$ = 9.3 Hz, C4'-T), 70.8, 70,4 (C3'-A, C3'-T), 65.5, 65.4 (je d, je $^2J_{CP}$ = 5.4 Hz, C5'-A, C5'-T), 38.6 (C2'-T), 11.7 (C7-T).

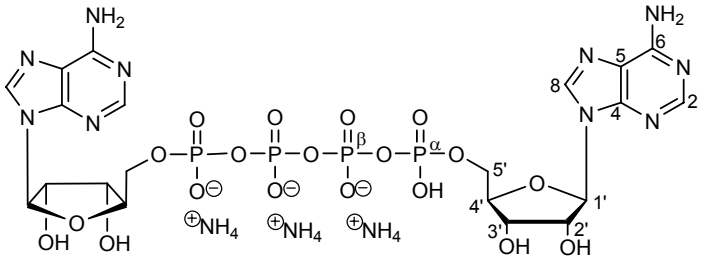
^{31}P-NMR (162 MHz, D_2O) δ/ppm: -11.15, -11.35 (P_α, P_α'), -22.57 (P_β, P_β').

MS (HR-ESI$^-$): ber. 810.0345 [M-H$^+$], gef.: 810.0343.

*Synthese von Diadenosin-5',5'-tetraphosphat **4***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 7, Variante A durchgeführt. Es wurden 150 mg 5-Nitro-*cyclo*Sal-*N*^{6},2',3'-triacetyladenosinmonophosphat **66** (0.250 mmol, 1.0 Äq.), 700 mg Tetrakis-(tetra-*n*-butylammonium)-adenosintriphosphat **1a** (0.500 mmol, 2.0 Äq.) und 10.0 mL DMF eingesetzt.

Ausbeute: 88.0 mg (0.100 mmol, 40%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{20}H_{37}N_{13}O_{19}P_4$; Molgewicht: 887.5 g/mol; R_f-Wert (*i*Pr/NH_4OAc 2:1 v/v): 0.19.



4

Anmerkung: Der Einfachheit halber wurde zur Berechnung der Ausbeute von drei Ammoniumionen pro Ap_4A **4** ausgegangen. Da das Produkt durch Gefriertrocknung erhalten wurde, muss von einem teilweisen Ausgasen von Ammoniak unter Protonierung der Phosphatgruppe ausgegangen werden, sodass die Anzahl der Gegenionen schwankt. Dies sollte allerdings rechnerisch keinen großen Einfluss auf die Ausbeuten haben.

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 8.49 (bs, 2H, 2x H8), 8.17 (bs, 2H, 2x H2), 5.95 (d, $^3J_{HH}$ = 5.2 Hz, 2H, 2x H1'), 4.59-4.57 (m, 2H, 2x H2'), 4.51-4.49 (m, 2H, 2x H3'), 4.37 (m, 2H, 2x H4'), 4.31 (m, 4H, 2x H5').

^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O) δ/ppm: 152.7 (2x C6), 149.9 (2x C2), 148.0 (2x C4), 141.2 (2x C8), 117.7 (2x C5), 87.1 (2x C1'), 83.9 (d, $^3J_{CP}$ = 9.4 Hz, 2x C4'), 74.9 (2x C2'), 70.1 (2x C3'), 65.2 (d, $^2J_{CP}$ = 5.1 Hz, 2x C5').
^{31}P-NMR (162 MHz, D_2O) δ/ppm: -11.52 (2x Pα), -22.85 (2x Pβ).
MS (HR-ESI$^-$): ber.: 835.0410 [M-H$^+$], gef.: 835.0400.

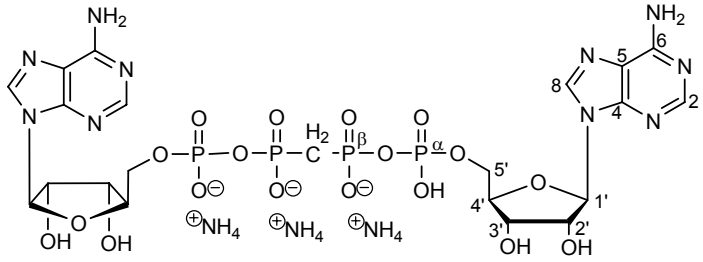
*Synthese von Diadenosin-β,γ-methylentetraphosphat **87***

Variante 1: Die Reaktion wurde gemäß AAV 7, Variante A durchgeführt. Es wurden 70.0 mg 5-Nitro-*cyclo*Sal-*N*^{6},2',3'-triacetyladenosinmonophosphat **66** (0.120 mmol, 1.0 Äq.), 310 mg Tris-(tetra-*n*-butylammonium)-adenosin-β,γ-methylen-triphosphat **86a** (0.240 mmol, 2.0 Äq.) und 10 mL DMF eingesetzt.
Es wurde kein Produkt erhalten.

Variante 2: Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 92.0 mg Bis-(tetra-*n*-butylammonium)-methylenpyrophosphat **122a** (0.140 mmol, 1.0 Äq.) zunächst gründlich im Vakuum getrocknet und anschließend in 4.00 mL wasserfreiem DMF gelöst und zusätzlich 2 h über Molsieb getrocknet. Zu dieser Lösung wurden bei Raumtemperatur langsam 85.0 mg 5-Nitro-*cyclo*Sal-*N*^{6},2',3'-triacetyladenosin-monophosphat **66** (0.140 mmol, 1.0 Äq.), gelöst in 4.00 mL abs. DMF, getropft. Das Reaktionsgemisch wurde bis zur vollständigen Umsetzung des Triesters (DC-Kontrolle DCM/MeOH 9:1 v/v) 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden zu dieser Lösung erneut 85.0 mg 5-Nitro-*cyclo*Sal-*N*^{6},2',3'-triacetyladenosin-monophosphat **66** (0.140 mmol, 1.0 Äq.), gelöst in 4.00 mL abs. DMF, gegeben und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der erhaltene Rückstand mit Ethylacetat und Wasser extrahiert und die wässrige Phase anschließend gefriergetrocknet. Der erhaltene Rückstand wurde in einem Gemisch aus Methanol, Wasser und Triethylamin (7:3:1 v/v) aufgenommen und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Methanols im Vakuum wurde die Reaktionslösung mit Wasser verdünnt und wieder gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und mittels Ionenaustauschchromatographie an Dowex (W50x8, NH_4^+) in das entsprechende Ammoniumsalz überführt. Nach erneuter Gefriertrocknung wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch an RP-18-Silicagel mit Wasser als Eluent gereinigt. Die Detektion der Produktfraktionen erfolgte

dünnschichtchromatographisch mit einem Gemisch aus *iso*-Propanol und einer 1 M Ammoniumacetat-Lösung (2:1 v/v). Die entsprechenden Fraktionen wurden zur Entfernung des Lösungsmittels gefriergetrocknet.

Ausbeute: 12.0 mg eines gelblichen, noch leicht verunreinigten Feststoffes; Summenformel: $C_{21}H_{39}N_{13}O_{18}P_4$; Molgewicht: 885.5 g/mol; R_f-Wert (*i*Pr/NH_4OAc 2:1 v/v): 0.21.



87

Anmerkung: Aufgrund der vorhandenen Verunreinigungen erfolgte lediglich eine Auswertung des ^{1}H-NMR- sowie des Protonenbreitband entkoppelten ^{31}P-NMR-Spektrums.

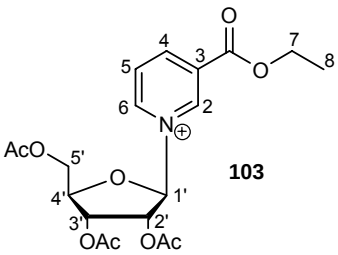
^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 8.37 (s, 2H, 2x H8), 8.13 (s, 2H, 2x H2), 6.04 (d, $^3J_{HH}$ = 5.6 Hz, 2H, 2x H1'), 4.71 (dd, $^3J_{HH}$ = 4.8 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.6 Hz, 2H, 2x H2'), 4.55 (dd, $^3J_{HH}$ = 4.0 Hz, $^3J_{HH}$ = 4.8 Hz, 2H, 2x H3'), 4.36-4.35 (m, 2H, 2x H4'), 4.27-4.18 (m, 4H, 2x H5'), 2.55 (dd, $^2J_{HP}$ = 21.0 Hz, $^2J_{HP}$ = 21.0 Hz, 2H, P-CH_2-P).
^{31}P-NMR (162 MHz, D_2O) δ/ppm: 7.40 (d, $^2J_{PP}$ = 25.0 Hz, 2x Pβ), -11.07 (d, $^2J_{PP}$ = 25.0 Hz, 2x Pα).

8.2.9 Versuch der Synthese von Nicotinamidadenosindinucleotid 92

*Synthese von 2',3',5'-Tri-O-acetylnicotinsäureethylesterribonucleosid **103***

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 1.00 g 1,2,3,5-Tetra-*O*-acetyl-D-ribofuranose **101** (3.14 mmol, 1.0 Äq.) in 35.0 mL wasserfreiem Dichlormethan gelöst und mit 0.650 mL Nicotinsäureethylester **102** (4.71 mmol, 1.5 Äq.) versetzt. Zu dieser Lösung wurden bei Raumtemperatur vorsichtig 0.570 mL Trimethylsilyltriflat (3.14 mmol, 1.0 Äq.) tropfenweise gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 4 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle EE/MeOH/TEA 5/0.3/0.05 v/v) wurde das Lösungsmittel im

Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in Methanol aufgenommen und fünf mal mit Hexan extrahiert. Anschließend wurde das Methanol unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung als Gemisch mit dem überschüssigem Nicotinsäureethylester **102** (1:0.5 **103**:**102**) für die nachfolgende Entschützung eingesetzt.



103

Ausbeute: 1.29 g (3.14 mmol, 100%) eines farblosen Öls; Summenformel: $C_{11}H_{15}N_2O_5^+$; Molgewicht: 255.2 g/mol; R_f-Wert (DCM/MeOH 7:4 v/v): 0.73.

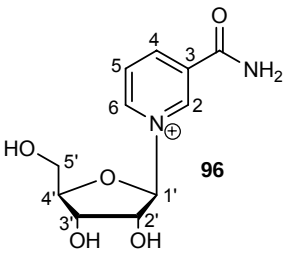
Anmerkung: Theoretisch müsste das Produkt als TFA-Salz vorliegen, wobei das Triflat-Anion im ^{13}C-NMR-Spektrum durch ein Signal bei ca. 120 ppm erkennbar sein sollte. Da in diesem Bereich allerdings keine Absorption vorhanden ist, bezieht sich die angegebene Ausbeute der Einfachheit halber auf das positiv geladene Produkt.

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 9.47 (s, 1H, H2), 9.27 (d, $^3J_{HH}$ = 6.3 Hz, 1H, H6), 8.97 (d, $^3J_{HH}$ = 8.3 Hz, 1H, H4), 8.28 (dd, $^3J_{HH}$ = 6.3 Hz, $^3J_{HH}$ = 8.3 Hz, 1H, H5), 6.50 (d, $^3J_{HH}$ = 3.8 Hz, 1H, H1'), 5.41 (dd, $^3J_{HH}$ = 3.8 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.2 Hz, 1H, H2'), 5.52 (dd, $^3J_{HH}$ = 5.5 Hz, $^3J_{HH}$ = 5.5 Hz, 1H, H3'), 4.67-4.62 (m, 1H, H4'), 4.43-4.40 (m, 4H, H5', H7), 2.05 (s, 3H, CH_3-Acetyl), 2.04 (s, 3H, CH_3-Acetyl), 2.01 (s, 3H, CH_3-Acetyl), 1.33 (t, $^3J_{HH}$ = 7.0 Hz, 3H, H8).
^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O) δ/ppm: 175.3 (C_q-Acetyl), 165.5 (C_q-Etyl), 150.8 (C4), 146.9 (C6), 145.1(C2), 134.2(C3), 131.5 (C5), 100.7 (C1'), 88.2(C4'), 79.4 (C2'), 72.3 (C3'), 66.9 (C7), 65.8(C5'), 22.5, 22.4 (CH_3-Acetyl), 15.8 (C8).

*Synthese von β-Nicotinamidribonucleosid **96***

2',3',5'-Tri-*O*-acetylnicotinsäureethylesterribonucleosid **103** (1.30 g, 3.14 mmol, 1.0 Äq.) wurden bei 0 °C in 34.0 mL 4 N ammoniakalischem Methanol gelöst und 16 h bei 5 °C gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der erhaltene Rückstand vier mal mit Methanol coevaporiert. Anschließend wurde das Rohprodukt in Wasser aufgenommen, mit Cyclohexan extrahiert und zur Entfernung des Lösungsmittels gefriergetrocknet. Die Reinigung erfolgte chromatographisch an RP-18-Silicagel mit Wasser als Eluent. Die Detektion

der Produktfraktionen erfolgte dünnschichtchromatographisch (RP-18-DC-Folie, H_2O). Durch nachfolgende Gefriertrocknung wurde das reine Produkt als farbloser Feststoff erhalten.



96

Ausbeute: 560 mg (2.20 mmol, 69%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{11}H_{15}N_2O_5^+$; Molgewicht: 255.2 g/mol; R_f-Wert (RP-18-DC-Folie, H_2O): 0.62.

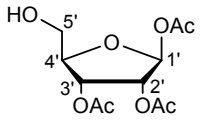
Anmerkung: Theoretisch müsste das Produkt als TFA-Salz vorliegen, wobei das Triflat-Anion im ^{13}C-NMR-Spektrum durch ein Signal bei ca. 120 ppm erkennbar sein sollte. Da in diesem Bereich allerdings keine Absorption vorhanden ist, bezieht sich die angegebene Ausbeute der Einfachheit halber auf das positiv geladene Produkt.

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 9.63 (s, 1H, H2), 9.29 (d, $^3J_{HH}$ = 6.3 Hz, 1H, H6), 9.00 (d, $^3J_{HH}$ = 8.1 Hz, 1H, H4), 8.30 (dd, $^3J_{HH}$ = 6.3 Hz, $^3J_{HH}$ = 8.1 Hz, 1H, H5), 6.27 (d, $^3J_{HH}$ = 4.6 Hz, 1H, H1'), 4.53 (dd, $^3J_{HH}$ = 4.6 Hz, $^3J_{HH}$ = 4.7 Hz, 1H, H2'), 4.52-4.50 (m, 1H, H4'), 4.38 (dd, $^3J_{HH}$ = 4.7 Hz, $^3J_{HH}$ = 4.7 Hz, 1H, H3'), 4.08 (dd, $^3J_{HH}$ = 2.9 Hz, $^2J_{HH}$ = 12.9 Hz, 1H, H5'), 3.93 (dd, $^3J_{HH}$ = 3.5 Hz, $^2J_{HH}$ = 12.9 Hz, 1H, H5').
^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O) δ/ppm: 145.7 (C4), 142.7 (C6), 140.4 (C2), 134.0 (C3), 128.5 (C5), 100.0 (C1'), 87.8 (C4'), 77.5 (C2'), 69.9 (C3'), 60.3 (C5').
MS (FAB): ber. 255.2 [M^+], gef. 255.1
IR ν [cm^{-1}]: 3396, 3087, 2944, 1739, 1685, 1618, 1402, 1242, 1223, 1161, 1086, 1024, 634, 514.

*Synthese von 1,2,3-Tri-O-acetyl-D-ribofuranose **106***

Es wurden 1.00 g 1,2,3,5-Tetra-*O*-acetyl-D-ribofuranose **101** (3.14 mmol, 1.0 Äq.) in 4 mL DMF gelöst und mit 34.0 mL 0.1 M Phosphatpuffer (pH=7) verdünnt. Anschließend wurden 1.50 g *Candida rugosa* Lipase (Typ VII, Sigma L 1754) hinzugegeben und die erhaltene Suspension 16 h langsam bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle PE/EE 2:3 v/v) wurde der Ansatz zentrifugiert und der Überstand gefriergetrocknet. Der erhaltene Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen, mit Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung

gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum säulenchromatographisch (PE/EE 2:3) gereinigt.



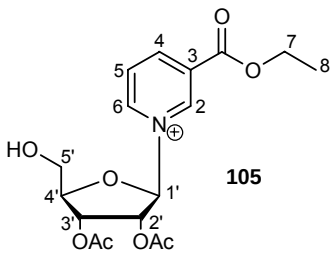
106

Ausbeute: 440 mg (1.60 mmol, 51%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{11}H_{16}O_8$; Molgewicht: 276.2 g/mol; R_f-Wert (PE/EE 2:3 v/v): 0.31.

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 6.16 (d, $^3J_{HH}$ = 0.9 Hz, 1H, H1'), 5.41 (dd, $^3J_{HH}$ = 4.9 Hz, $^3J_{HH}$ = 7.1 Hz, 1H, H3'), 5.35 (dd, $^3J_{HH}$ = 0.9 Hz, $^3J_{HH}$ = 4.9 Hz, 1H, H2'), 4.27-4.24 (m, 1H, H4'), 3.86 (dd, $^3J_{HH}$ = 3.2 Hz, $^2J_{HH}$ = 12.5 Hz, 1H, H5'), 3.66 (dd, $^3J_{HH}$ = 4.0 Hz, $^2J_{HH}$ = 12.5 Hz, 1H, H5'), 2.13, 2.10, 2.07 (je s, je 3H, CH_3-Acetyl).
^{13}C-NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm: 170.1, 169.5, 169.3 (C_q-Acetyl), 98.4 (C1'), 82.5 (C4'), 74.7 (C2'), 70.0 (C3'), 62.1 (C5'), 21.2, 20.9, 20.6 (CH_3-Acetyl).
MS (FAB): ber. 277.2 [M+H$^+$], gef. 277.3.

*Synthese von 2',3'-Di-O-acetylnicotinsäureethylesterribonucleosid **105***

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 400 mg 1,2,3-Tri-*O*-acetyl-D-ribofuranose **106** (1.45 mmol, 1.0 Äq.) in 30.0 mL wasserfreiem Dichlormethan gelöst und mit 0.300 mL Nicotinsäureethylester **102** (2.20 mmol, 1.5 Äq.) versetzt. Zu dieser Lösung wurden bei Raumtemperatur vorsichtig 0.530 mL Trimethylsilyltriflat (2.90 mmol, 2.0 Äq.) tropfenweise gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde fünf Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle EE/MeOH/TEA 5/0.3/0.05 v/v) wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in Methanol aufgenommen und fünfmal mit Hexan extrahiert. Anschließend wurde das Methanol unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron (DCM/MeOH-Gradient von 0-1%) gereinigt.



105

Ausbeute: 354 mg (0.960 mmol, 66%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{17}H_{22}NO_8^+$; Molgewicht: 368.4 g/mol; R_f-Wert (DCM/MeOH 7:4 v/v): 0.67.

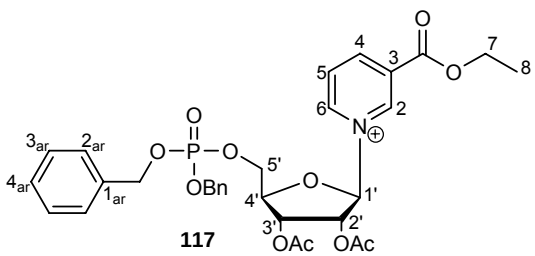
Anmerkung: Theoretisch müsste das Produkt als TFA-Salz vorliegen, wobei das Triflat-Anion im ^{13}C-NMR-Spektrum durch ein Signal bei ca. 120 ppm erkennbar sein sollte. Da in diesem Bereich

allerdings keine Absorption vorhanden ist, bezieht sich die angegebene Ausbeute der Einfachheit halber auf das positiv geladene Produkt.

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 9.89 (s, 1H, H2), 9.36 (d, $^{3}J_{HH}$ = 6.3 Hz, 1H, H6), 9.18 (d, $^{3}J_{HH}$ = 8.3 Hz, 1H, H4), 8.34 (dd, $^{3}J_{HH}$ = 6.3 Hz, $^{3}J_{HH}$ = 8.3 Hz, 1H, H5), 6.63 (d, $^{3}J_{HH}$ = 3.8 Hz, 1H, H1'), 5.64 (dd, $^{3}J_{HH}$ = 3.8 Hz, $^{3}J_{HH}$ = 5.2 Hz, 1H, H2'), 5.52 (dd, $^{3}J_{HH}$ = 5.5 Hz, $^{3}J_{HH}$ = 5.5 Hz, 1H, H3'), 4.76-4.74 (m, 1H, H4'), 4.54 (q, $^{3}J_{HH}$ = 7.0 Hz, 2H, H7), 4.15 (dd, $^{3}J_{HH}$ = 2.3 Hz, $^{2}J_{HH}$ = 13.2 Hz, 1H, H5'a), 3.98 (dd, $^{3}J_{HH}$ = 2.3 Hz, $^{2}J_{HH}$ = 13.2 Hz, 1H, H5'b), 2.03, 2.00 (CH_3-Acetyl), 1.44 (t, $^{3}J_{HH}$ = 7.0 Hz, 3H, H8).
^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O) δ/ppm: 175.1 (C_q-Acetyl), 165.2 (C_q-Etyl), 150.5 (C4), 146.6 (C6), 144.8 (C2), 133.9 (C3), 131.2 (C5), 100.4 (C1'), 87.9 (C4'), 79.1 (C2'), 72.0 (C3'), 66.6 (C7), 61.9 (C5'), 22.5, 22.4 (CH_3-Acetyl), 15.8 (C8).
MS (FAB): ber. 368.4 [M^+], gef. 368.2.
IR ν [cm^{-1}]: 3433, 3075, 2943, 1734, 1637, 1372, 1237, 1222, 1155, 1106, 1027, 751, 635.

*Synthese von Bis-(benzyl)-2',3'-di-O-acetylnicotinsäureethylesterribonucleotid **117***

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Zu einer Suspension von 566 mg Triphenylphosphin **112** (2.16 mmol, 2.5 Äq.) in wasserfreiem Acetonitril (4.00 mL) wurden langsam 0.440 mL DIAD **113** (2.24 mmol, 2.6 Äq.) bei 0 °C getropft und das Reaktionsgemisch für 30 min bei dieser Temperatur gerührt. Die erhaltene Lösung wurde anschließend zu einer Lösung aus 320 mg 2',3'-Di-*O*-acetylnicotinsäureethylesterribonucleosid **105** (0.860 mmol, 1.0 Äq.) und 479 mg Bisbenzylphosphat **116** (1.72 mmol, 2.0 Äq.) in wasserfreiem Acetonitril (10.0 mL) bei -40 °C getropft. Das Reaktionsgemisch wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 16 h gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohprodukt am Chromatotron (DCM/MeOH-Gradient von 0-5%) gereinigt.



117

Ausbeute: 242 mg (0.385 mmol, 45%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{31}H_{35}NO_{11}P^+$; Molgewicht: 628.6 g/mol; R_f-Wert (DCM/MeOH 7:4 v/v): 0.69.

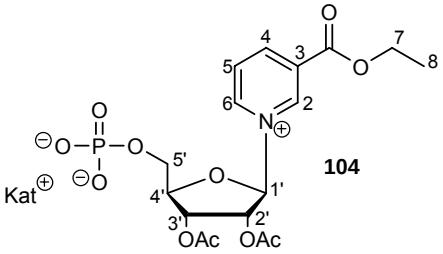
^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 9.48 (s, 1H, H2), 9.31 (d, $^{3}J_{HH}$ = 6.4 Hz, 1H, H6), 9.12 (d, $^{3}J_{HH}$ = 8.0 Hz, 1H, H4), 8.29 (dd, $^{3}J_{HH}$ = 6.4 Hz, $^{3}J_{HH}$ = 8.0 Hz, 1H, H5), 7.41-7.36 (m, 10H, Benzyl-H_{ar}), 6.59 (d, $^{3}J_{HH}$ = 3.5 Hz, 1H, H1'), 5.61 (dd, $^{3}J_{HH}$ = 3.5 Hz, $^{3}J_{HH}$ = 5.3 Hz, 1H, H2'), 5.50 (dd, $^{3}J_{HH}$ = 5.5 Hz, $^{3}J_{HH}$ = 5.5 Hz, 1H, H3'), 4.86 (s, 2H, CH_2-Benzyl), 4.84 (s, 2H, CH_2-Benzyl) 4.74-4.71 (m, 1H, H4'), 4.52 (q, $^{3}J_{HH}$ = 7.0 Hz, 2H, H7), 4.14 (dd, $^{3}J_{HH}$ = 2.5 Hz, $^{2}J_{HH}$ = 13.3 Hz, 1H, H5'a), 3.95 (dd, $^{3}J_{HH}$ = 2.2 Hz, $^{2}J_{HH}$ = 13.2 Hz, 1H, H5'a), 2.22, 2.20 (je s, je 3H, CH_3-Acetyl),1.43 (t, $^{3}J_{HH}$ = 7.0 Hz, 3H, H8).

^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O) δ/ppm: 172.6, 172.5 (C_q-Acetyl), 162.7 (C_q-Etyl), 147.9 (C4), 144.0 (C6), 142.1 (C2), 137.3 ($C1_{ar}$), 131.3 (C3), 128.7, 128.3, 127.8 ($C2_{ar}$, $C3_{ar}$, $C4_{ar}$), 126.1 (C5), 97.9 (C1'), 85.4 (C4'), 76.5 (C2'), 69.5 (C3'), 67.7 (CH_2-Benzyl), 67.6 (CH_2-Benzyl), 64.1 (C7), 59.3 (C5'), 19.9, 19.8 (CH_3-Acetyl), 13.3 (C8).

^{31}P-NMR (162 MHz, D_2O) δ/ppm: 0.37.

HRMS (FAB): ber.: 628.1942 [M^+], gef.: 628.1943.

*Versuch der Synthese von 2',3'-Di-O-acetylnicotinsäureethylesterribonucleotid **104***



104

Summenformel: $C_{17}H_{21}NO_{11}P^-$; Molgewicht: 446.3 g/mol.

Ansatz 1: Durch Hydrierung von Bis-(benzyl)-2',3'-di-O-acetylnicotinsäureethylester-ribonucleotid **117**

Variante A: Es wurden 50.0 mg Bis-(benzyl)-2',3'-di-O-acetylnicotinsäureethylester-ribonucleotid **117** (0.0800 mmol, 1.0 Äq.) in Wasser gelöst, mit 22.0 µL Triethylamin (0.160 mmol, 2.0 Äq.) und einer Spatelspitze Pd/C (10%ig) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit leichtem H_2-Überdruck bei Raumtemperatur 16 h reduziert. Nach vollständigem Umsatz des Eduktes wurde die Suspension zentrifugiert und der Überstand gefriergetrocknet.

Das ^{1}H-NMR-Spektrum zeigte keinerlei aromatische Protonen, weshalb es sich nicht um das gewünschte Produkt **104** handeln konnte.

Variante B: Analog zu Variante A, allerdings mit wasserfreiem Dioxan als Lösungsmittel und unter Stickstoff als Inertgas. Nach vollständigem Umsatz des Eduktes wurde die Suspension über Celite filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Das ^{1}H-NMR-Spektrum zeigte keinerlei aromatische Protonen, weshalb es sich nicht um das gewünschte Produkt **104** handeln konnte.

Ansatz 2: Durch Phosphorylierung von 2',3'-Di-*O*-acetylnicotinsäureethylester-ribonucleosid **105** nach Sowa und Ouchi

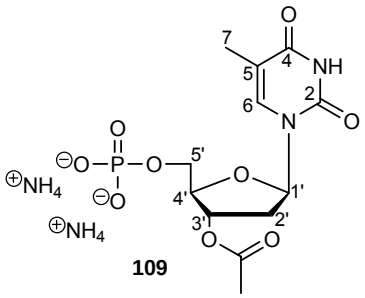
Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 5.00 mL wasserfreies Acetonitril wurden bei 0 °C mit 0.180 mL $POCl_3$ (1.89 mmol, 4.4 Äq.), 17.0 µL destilliertem Wasser (0.950 mmol, 2.2 Äq.) und 0.150 mL wasserfreiem Pyridin (1.89 mmol, 4.4 Äq.) versetzt. Nach 5 min wurden bei dieser Temperatur 180 mg 2',3'-Di-*O*-acetylnicotinsäureethylesterribonucleosid **105** (0.430 mmol, 1.0 Äq.) als Feststoff portionsweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 5 h gerührt. Anschließend wurde der Ansatz bei 0 °C durch Zugabe von Eiswasser hydrolysiert und eine Stunde bei dieser Temperatur gerührt. Durch vorsichtige Zugabe von festem Ammoniumhydrogencarbonat wurde ein pH-Wert von 8 eingestellt. Die Lösungsmittel wurden durch Gefriertrocknung entfernt. Der Rückstand wurde in einem Gemisch aus Wasser und Acetonitril (1:1 v/v) gelöst und über eine RP-18-Säule in diesem Laufmittelgemisch chromatographiert.
Es wurde kein Produkt erhalten.

Ansatz 3: Durch Phosphorylierung von 2',3'-Di-*O*-acetylnicotinsäureethylester-ribonucleosid **105** nach Yoshikawa

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 49.0 µL $POCl_3$ (0.540 mmol, 2.0 Äq.) in 3.00 mL Trimethylphosphat gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurden 100 mg 2',3'-Di-*O*-acetylnicotinsäureethylester-ribonucleosid **105** (0.270 mmol, 1.0 Äq.) portionsweise als Feststoff gegeben und weitere 5 h bei dieser Temperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend mit gesättigter Ammoniumhydrogencarbonatlösung auf pH = 8 eingestellt und 10 min gerührt. Das Lösungsmittel wurde durch Gefriertrocknung entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde über eine RP-18-Phase mit reinem Wasser chromatogerphiert.
Es wurde kein Produkt erhalten.

*Synthese von 3'-O-Acetyl-2'-desoxythymidinmonophosphat **109***

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 10.0 mL wasserfreies Acetonitril wurden bei 0 °C mit 0.720 mL $POCl_3$ (7.70 mmol, 4.4 Äq.), 70.0 µL destilliertem Wasser (3.96 mmol, 2.2 Äq.) und 0.620 mL wasserfreiem Pyridin (7.70 mmol, 4.4 Äq.) versetzt. Nach 5 min wurden bei dieser Temperatur 500 mg 3'-*O*-Acetyl-2'-desoxythymidin **64** (1.80 mmol, 1.0 Äq.) als Feststoff portionsweise zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 4 h gerührt. Anschließend wurde der Ansatz bei 0 °C durch Zugabe von Eiswasser hydrolysiert und eine Stunde bei dieser Temperatur gerührt. Durch vorsichtige Zugabe von festem Ammoniumhydrogencarbonat wurde ein pH-Wert von 8 eingestellt. Die Lösungsmittel wurden durch Gefriertrocknung entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und über eine RP-18-Säule mit Wasser als Eluent chromatographiert. Die Detektion der Produktfraktionen erfolgte dünnschichtchromatographisch mit einem Gemisch aus *iso*-Propanol und einer 1 M Ammoniumacetat-Lösung (2:1 v/v). Durch nachfolgende Gefriertrocknung wurde das reine Produkt erhalten.



109

Ausbeute: 557 mg (1.40 mmol, 78%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{12}H_{23}N_4O_9P$; Molgewicht: 398.3 g/mol; R_f-Wert (*i*Pr/NH_4OAc 2:1 v/v): 0.56.

Anmerkung: Der Einfachheit halber wurde zur Berechnung der Ausbeute von zwei Ammonium-Gegenionen ausgegangen. Da das Produkt durch Gefriertrocknung erhalten wurde, muss von einem teilweisen Ausgasen von Ammoniak unter Protonierung der Phosphatgruppe ausgegangen werden, sodass die Anzahl der Gegenionen schwankt. Dies sollte allerdings rechnerisch keinen großen Einfluss auf die Ausbeute haben.

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 7.81 (d, $^4J_{HH}$ = 1.2 Hz, 1H, H6), 6.39 (dd, $^3J_{HH}$ = 6.0 Hz, $^3J_{HH}$ = 8.5 Hz, 1H, H1'), 5.41-5.39 (m, 1H, H3'), 4.40-4.37 (m, 1H, H4'), 4.13-4.11 (m, 2H, H5'), 2.47-2.40 (m, 2H, H2'), 2.15 (s, 3H, CH_3-Acetyl), 1.93 (d, $^4J_{HH}$ = 1.2 Hz, 3H, H7).

^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O) δ/ppm: 173.9 (C_q-Acetyl), 166.9 (C4), 152.1 (C2), 137.6 (C6), 112.3 (C5), 85.4 (C1'), 83.8 (d, $^3J_{CP}$ = 8.9 Hz, C4'),76.0 (C3'), 65.5 (d, $^2J_{CP}$ = 5.1 Hz, C5'), 36.8 (C2'), 20.8 (CH_3-Acetyl), 12.0 (C7).
^{31}P-NMR (161 MHz, D_2O) δ/ppm: -0.01.
HRMS (ESI^-): ber. 363.0599 [$M-H^+$], gef.: 363.0594.

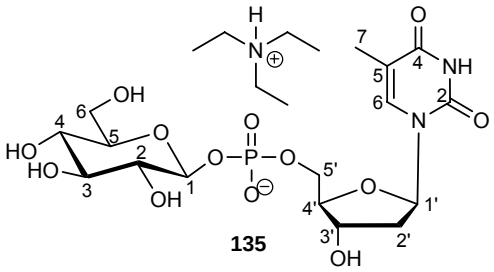
*Versuch der Synthese von Nicotinamiduridindinucleotid **111***

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 270 mg 5-NO_2-*cyclo*Sal-2',3'-di-*O*-acetylnicotinsäureethylesterribonucleosidmonophosphat **95** (verunreinigtes Rohprodukt) in 5.00 mL wasserfreiem DMF gelöst. Diese Lösung wurde langsam zu einer Lösung von 200 mg Triethylammonium-UMP **90b** (0.470 mmol, getrocknet im Vakuum und über Molsieb in abs. DMF) in 5.00 mL wasserfreiem DMF getropft. Das Reaktionsgemisch wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle DCM/MeOH 9:1 v/v) wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand mit Ethylacetat und Wasser extrahiert. Die wässrige Phase wurde gefriergetrocknet und das Rohprodukt an einer RP-18-Phase mit Wasser und einem Acetonitrilgradienten (0-10%) gereinigt.
Es wurde kein Produkt erhalten.

8.2.10 Synthese der Nucleosidmonophosphatpyranosen

*Synthese von β-D-Glucose-2'-desoxythymidinmonophosphat **135***

Ansatz 1:
Die Reaktion wurde gemäß AAV 8 durchgeführt. Es wurden 70.0 mg 5-Nitro-*cyclo*Sal-3'-*O*-acetyl-2'-desoxythymidinmonophosphat **69** (0.140 mmol, 1.0 Äq.), 200 mg 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-glucopyranose **132** (0.560 mmol, 4.0 Äq.), 13.0 mg Natriumhydrid (0.560 mmol, 4.0 Äq.) und 10.0 mL Dichlormethan eingesetzt.



135

Ausbeute: 66.0 mg (0.110 mmol, 81%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{22}H_{40}N_3O_{13}P$; Molgewicht: 585.5 g/mol; R_f-Wert (*i*Pr/NH_4OAc 2:1 v/v): 0.62; Anomerenverhältnis: β-anomerenrein; $[\alpha]_D^{20}$= +16.0° (c=0.1, H_2O).

β-^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 7.75 (d, $^4J_{HH}$ = 1.0 Hz, 1H, H6-T), 6.36 (t, $^3J_{HH}$ = 6.8 Hz, 1H, H1'), 4.93 (dd, $^3J_{HP}$ = 7.8 Hz, $^3J_{HH}$ = 7.8 Hz, 1H, H1), 4.62-4.60 (m, 1H, H3'), 4.17-4.10 (m, 3H, H4', H5'), 3.90 (dd, $^3J_{HH}$ = 2.2 Hz, $^2J_{HH}$ = 12.4 Hz, 1H, H6), 3.72 (dd, $^3J_{HH}$ = 5.8 Hz, $^2J_{HH}$ = 12.4 Hz, 1H, H6), 3.55-3.47 (m, 2H, H3, H5), 3.43-3.33 (m, 2H, H2, H4), 3.21 (q, $^3J_{HH}$ = 7.0 Hz, 6H, CH_2-NEt_3), 2.40-2.36 (m, 2H, H2'), 1.94 (d, $^4J_{HH}$ = 1.0 Hz, 3H, H7), 1.29 (t, $^3J_{HH}$ = 7.0 Hz, 9H, CH_3-NEt_3).

β-^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O) δ/ppm: 166.6 (C4-T), 151.7 (C2-T), 137.4 (C6-T), 111.7 (C5-T), 97.8 (d, $^2J_{CP}$ = 6.1 Hz, C1), 85.5 (d, $^3J_{CP}$ = 9.6 Hz, C4'), 85.1 (C1'), 76.5 (C3), 75.4 (C5), 73.7 (d, $^3J_{CP}$ = 9.1 Hz, C2), 71.2 (C3'), 69.5 (C4), 65.4 (d, $^2J_{CP}$ = 6.1 Hz, C5'), 60.8 (C6), 46.7 (CH_2-NEt_3), 38.8 (C2'), 11.7 (C7), 8.3 (CH_3-NEt_3).

β-^{31}P-NMR (162 MHz, D_2O) δ/ppm: -1.90.

MS (HR-ESI$^-$): ber. 483.1021 [M-H$^+$], gef.: 483.1024.

Ansatz 2:

Analog zu Ansatz 1, allerdings mit 77.0 mg Kaliumcarbonat (0.560 mmol, 4.0 Äq.) als Base.

Ausbeute: 25.0 mg (0.0480 mmol, 34%) eines farblosen Feststoffes.

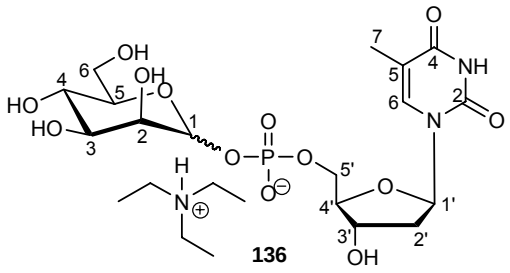
Die spektroskopischen Daten entsprachen denen von Ansatz 1.

*Synthese von D-Mannose-2'-desoxythymidinmonophosphat **136***

Ansatz 1:

Die Reaktion wurde gemäß AAV 8 durchgeführt. Es wurden 60.0 mg 5-Nitro-*cyclo*Sal-3'-*O*-acetyl-2'-desoxythymidinmonophosphat **69** (0.120 mmol, 1.0 Äq.), 168 mg 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranose **133** (0.480 mmol,

4.0 Äq.), 12.0 mg Natriumhydrid (0.480 mmol, 4.0 Äq.) und 8.00 mL Dichlormethan eingesetzt.



136

Ausbeute: 51.0 mg (0.0870 mmol, 72%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{22}H_{40}N_3O_{13}P$; Molgewicht: 585.5 g/mol; R_f-Wert (*i*Pr/NH_4OAc 2:1 v/v): 0.61; Anomerenverhältnis: α/β ~ 1:3.

β–^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 7.73 (d, $^{4}J_{HH}$ = 0.9 Hz, 1H, H6-T), 6.34 (t, $^{3}J_{HH}$ = 7.0 Hz, 1H, H1'), 5.14 (d, $^{3}J_{HP}$ = 8.2 Hz, 1H, H1), 4.62-4.59 (m, 1H, H3'), 4.17-4.13 (m, 3H, H4', H5'), 4.01 (d, $^{3}J_{HH}$ = 3.0 Hz, 1H, H2), 3.90 (dd, $^{3}J_{HH}$ = 2.1 Hz, $^{2}J_{HH}$ = 12.3 Hz, 1H, H6), 3.76-3.71 (m, 1H, H6), 3.63 (dd, $^{3}J_{HH}$ = 3.2 Hz, $^{3}J_{HH}$ = 9.7 Hz, 1H, H3), 3.75 (dd, $^{3}J_{HH}$ = 9.6 Hz, $^{3}J_{HH}$ = 9.7 Hz, 1H, H4), 3.40-3.37 (m, 1H, H5), 3.20 (q, $^{3}J_{HH}$ = 7.3 Hz, 9H, CH_2-NEt_3), 3.38-3.36 (m, 2H, H2'), 1.93 (d, $^{4}J_{HH}$ = 0.9 Hz, 3H, H7-T), 1.28 (t, $^{3}J_{HH}$ = 7.3 Hz, 14H, CH_3-NEt_3).

β–^{13}**C-NMR** (101 MHz, D_2O) δ/ppm: 166.4 (C4-T), 151.6 (C2-T), 137.5 (C6-T), 111.7 (C5-T), 95.4 (d, $^{2}J_{CP}$ = 4.7 Hz, C1), 85.3 (d, $^{3}J_{CP}$ = 8.9 Hz, C4'), 84.9 (C1'), 76.9 (C5), 72.6 (C3), 70.9 (C3'), 70.5 (d, $^{3}J_{CP}$ = 8.3 Hz, C2), 66.3 (C4), 65.2 (d, $^{2}J_{CP}$ = 5.5 Hz, C5'), 61.0 (C6), 46.6 (CH_2-NEt_3), 38.8 (C2'), 11.7 (C7-T), 8.2 (CH_3-NEt_3).

β–^{31}**P-NMR** (162 MHz, D_2O) δ/ppm: -1.98.

MS (HR-ESI$^-$): ber. 483.1021 [M-H$^+$], gef.: 483.1027.

Ansatz 2:

Durchführung wie Ansatz 1, allerdings mit 50.0 mg 5-Chlor-*cyclo*Sal-3'-*O*-acetyl-2'-desoxythymidinmonophosphat **72** (0.100 mmol, 1.0 Äq.), 150 mg 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranose **133** (0.400 mmol, 4.0 Äq.), 10.0 mg Natriumhydrid (0.400 mmol, 4.0 Äq.) und 6.00 mL Dichlormethan.

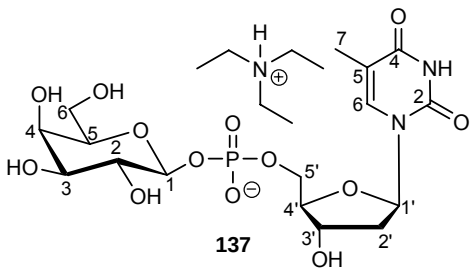
Ausbeute: 35.0 mg (0.0600 mmol, 60%) eines farblosen Feststoffes; Anomerenverhältnis: α/β ~ 1:0.7.

Die spektroskopischen Daten entsprachen denen von Ansatz 1.

*Synthese von β-D-Galactose-2'-desoxythymidinmonophosphat **137***

Ansatz 1:

Die Reaktion wurde gemäß AAV 8 durchgeführt. Es wurden 77.0 mg 5-Nitro-*cyclo*Sal-3'-*O*-acetyl-2'-desoxythymidinmonophosphat **69** (0.160 mmol, 1.0 Äq.), 220 mg 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-galactopyranose **134** (0.640 mmol, 4.0 Äq.), 15.0 mg Natriumhydrid (0.640 mmol, 4.0 Äq.) und 10.0 mL Dichlormethan eingesetzt.



137

Ausbeute: 65.0 mg (0.110 mmol, 69%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{22}H_{40}N_3O_{13}P$; Molgewicht: 585.5 g/mol; R_f-Wert (*i*Pr/NH_4OAc 2:1 v/v): 0.64; Anomerenverhältnis: β-anomerenrein; $[\alpha]_D^{20}$= +55.0° (c=0.1, H_2O).

β-^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 7.76 (d, $^4J_{HH}$ = 1.1 Hz, 1H, H6-T), 6.36 (t, $^3J_{HH}$ = 7.0 Hz, 1H, H1'), 4.88 (dd, $^3J_{HP}$ = 7.6 Hz, $^3J_{HH}$ = 7.6 Hz, 1H, H1), 4.63-4.60 (m, 1H, H3'), 4.20-4.14 (m, 3H, H4', H5'), 3.95 (d, $^3J_{HH}$ = 3.3 Hz, 1H, H4), 3.83-3.72 (m, 3H, H5, H6), 3.69 (dd, $^3J_{HH}$ = 3.3 Hz, $^3J_{HH}$ = 10.0 Hz, 1H, H3), 3.59 (dd, $^3J_{HH}$ = 7.6 Hz, $^3J_{HH}$ = 10.0 Hz, 1H, H2), 3.21 (q, $^3J_{HH}$ = 7.3 Hz, 6H, CH_2-NEt_3), 2.40-2.37 (m, 2H, H2'), 1.95 (d, $^4J_{HH}$ = 1.1 Hz, 3H, H7), 1.29 (t, $^3J_{HH}$ = 7.3 Hz, 9H, CH_3-NEt_3).

β-^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O) δ/ppm: 166.6 (C4-T), 151.8 (C2-T), 137.5 (C6-T), 111.7 (C5-T), 98.4 (d, $^2J_{CP}$ = 6.1 Hz, C1), 85.8 (d, $^3J_{CP}$ = 9.1 Hz, C4'), 85.1 (C1'), 75.7 (C5), 72.4 (C3), 71.2 (d, $^3J_{CP}$ = 9.1 Hz, C2), 71.1 (C3'), 68.6 (C4), 65.3 (d, $^2J_{CP}$ = 5.1 Hz, C5'), 61.1 (C6), 46.7 (CH_2-NEt_3), 38.7 (C2'), 11.7 (C7), 8.3 (CH_3-NEt_3).

β-^{31}P-NMR (162 MHz, D_2O) δ/ppm: -1.80.

MS (HR-ESI$^-$): ber. 483.1021 [M-H$^+$], gef.: 483.1027.

Ansatz 2:

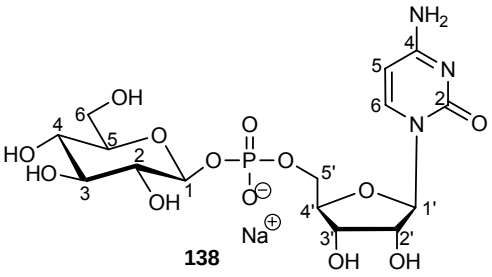
Durchführung wie Ansatz 1, allerdings mit 50.0 mg 5-Chlor-*cyclo*Sal-3'-*O*-acetyl-2'-desoxythymidinmonophosphat **72** (0.100 mmol, 1.0 Äq.), 150 mg 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-galactopyranose **134** (0.400 mmol, 4.0 Äq.), 10.0 mg Natriumhydrid (0.400 mmol, 4.0 Äq.) und 6.00 mL Dichlormethan.

Ausbeute: 36.0 mg (0.0610 mmol, 62%) eines farblosen Feststoffes; Anomerenverhältnis: α/β ~ 1:10.

Die spektroskopischen Daten entsprachen denen von Ansatz 1.

*Synthese von β-D-Glucose-cytidinmonophosphat **138***

Die Reaktion wurde gemäß AAV 8 durchgeführt. Es wurden 80.0 mg 5-Nitro-*cyclo*Sal-*N*^{4},2',3'-triacetylcytidinmonophosphat **68** (0.140 mmol, 1.0 Äq.), 200 mg 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-glucopyranose **132** (0.560 mmol, 4.0 Äq.), 13.0 mg Natriumhydrid (0.560 mmol, 4.0 Äq.) und 10.0 mL Dichlormethan eingesetzt.



138

Ausbeute: 43.0 mg (0.0850 mmol, 61%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{15}H_{23}N_3NaO_{13}P$; Molgewicht: 507.3 g/mol; R_f-Wert (*i*Pr/NH_4OAc 2:1 v/v): 0.62; Anomerenverhältnis: β-anomerenrein; $[\alpha]_D^{20}$= +34.0° (c=0.1, H_2O).

β-^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 7.96 (d, $^3J_{HH}$ = 7.6 Hz, 1H, H6), 6.13 (d, $^3J_{HH}$ = 7.6 Hz, 1H, H5), 6.01 (d, $^3J_{HH}$ = 4.2 Hz, 1H, H1'), 4.94 (dd, $^3J_{HH}$ = 7.6 Hz, $^3J_{HP}$ = 7.6 Hz, 1H, H1), 4.38-4.27 (m, 4H, H2', H3', H4', H5'), 4.20-4.15 (m, 1H, H5'), 3.91 (dd, $^3J_{HH}$ = 1.7 Hz, $^2J_{HH}$ = 12.4 Hz, 1H, H6), 3.74 (dd, $^3J_{HH}$ = 5.6 Hz, $^2J_{HH}$ = 12.4 Hz, 1H, H6), 3.57-3.49 (m, 2H, H3, H5), 3.44 (d, $^3J_{HH}$ = 9.1 Hz, 1H, H4), 3.41-3.35 (m, 1H, H2).

β-^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O) δ/ppm: 166.0 (C4), 152.2 (C2), 141.5 (C6), 97.9 (d, $^2J_{CP}$ = 6.6 Hz, C1), 96.5 (C5), 89.3 (C1'), 82.7 (d, $^3J_{CP}$ = 8.8 Hz, C4'), 76.5 (C3), 75.3 (C5), 74.2 (C2'), 73.6 (d, $^3J_{CP}$ = 8.8 Hz, C2), 69.4 (C3', C4), 64.6 (d, $^2J_{CP}$ = 6.6 Hz, C5'), 60.7 (C6).

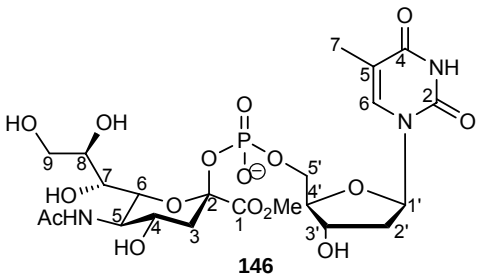
β-^{31}P-NMR (161 MHz, D_2O) δ/ppm: -1.77.

MS (HR-ESI$^-$): ber. 484.0974 [M-H$^+$], gef.: 484.0984.

Versuch der Synthese von 5-Acetamido-3,5-didesoxy-β-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl-thymidinmonophosphat (TMP-β-D-Neu5Ac) ***142***

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 396 mg Methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-β-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat **17** (0.804 mmol, 4.0 Äquivalente) mit 20.0 mg gewaschenem Natriumhydrid (0.804 mmol, 4.0 Äquivalente) zunächst eine Stunde im Vakuum getrocknet und anschließend auf -40 °C gekühlt und in einem Gemisch aus 6.0 mL absolutem Dichlormethan sowie 2.0 mL abs. DMF (3:1 v/v) aufgenommen. Das Gemisch wurde 30 min bei dieser Temperatur gerührt. 100 mg 5-Nitro-*cyclo*Sal-3'-*O*-acetyl-2'-desoxythymidinmonophosphat **69** (0.200 mmol, 1.0 Äquivalente) wurden ebenfalls einige Zeit im Vakuum getrocknet, in absolutem Dichlormethan (5.00 mL) gelöst und langsam bei -40 °C zu der deprotonierten Pyranose getropft. Das Reaktionsgemisch wurde bei dieser Temperatur bis zur vollständigen Umsetzung des *cyclo*Sal-Nucleotids 4 h gerührt (DC-Kontrolle DCM/MeOH 19:1 v/v). Daraufhin wurde zunächst das Dichlormethan bei 0 °C im Vakuum entfernt und die verbleibende Reaktionslösung mit Wasser verdünnt und gefriergetrocknet. Der erhaltene Rückstand wurde je zweimal mit Wasser und Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde in 5.00 mL absolutem Methanol gelöst und mit 3.0 Äquivalenten einer 0.5 M methanolischen Natriummethanolat-Lösung bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle DCM/MeOH 3:1 v/v) wurde das Reaktionsgemisch durch vorsichtige Zugabe von Dowex (W50x8, H^+) neutralisiert. Der Ionentauscher wurde abfiltriert, mit Methanol gewaschen und das Filtrat im Vakuum bis zur Trockne eingeengt. Der erhaltene Rückstand wurde in 2.00 mL Natronlauge (0.1 M) aufgenommen und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle *i*Pr/NH_4OAc 2:1 v/v) wurde das Reaktionsgemisch erneut durch vorsichtige Zugabe von Dowex (W50x8, H^+) neutralisiert. Der Ionentauscher wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und das Filtrat gefriergetrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an RP-18-Silicagel mit Wasser als Eluent gereinigt. Die Detektion der Produktfraktionen erfolgte dünnschichtchromatographisch mit einem Gemisch aus *iso*-Propanol und einer 1 M Ammoniumacetat-Lösung (2:1 v/v). Das Lösungsmittel wurde durch Gefriertrocknung entfernt.

Anmerkung: Es wurden 4.00 mg des noch Salze enthaltenden gewünschten Produktes **142** und 12.0 mg (0.0200 mmol, 10%) des reinen Methylesters **146** erhalten, weshalb die Analytik von dieser Verbindung im Folgenden angegeben ist.



146

Ausbeute: 12.0 mg (0.0200 mmol, 10%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{22}H_{33}N_3O_{16}P^-$; Molgewicht: 626.5 g/mol; R_f-Wert (*i*Pr/NH_4OAc 2:1 v/v): 0.72; Anomerenverhältnis: β-anomerenrein; $[\alpha]_D^{20}$= -42.0° (c=0.1, H_2O).

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 7.69 (s, 1H, H6-T), 6.34 (dd, $^3J_{HH}$ = 7.0 Hz, $^3J_{HH}$ = 7.0 Hz, 1H, H1'), 4.58-4.55 (m, 1H, H3'), 4.18-4.05 (m, 5H, H4', H5', H4, H6), 3.95 (dd, $^3J_{HH}$ = 9.7 Hz, $^3J_{HH}$ = 10.0 Hz, 1H, H8), 3.92-3.85 (m, 2H, H5, H9), 3.83 (s, 3H, OCH_3), 3.61 (dd, $^3J_{HH}$ = 6.8 Hz, $^2J_{HH}$ = 12.0 Hz, 1H, H9), 3.48 (d, $^3J_{HH}$ = 9.7 Hz, 1H, H7), 2.48 (dd, $^3J_{HH}$ = 4.7 Hz, $^2J_{HH}$ = 13.1 Hz, 1H, $H3_{eq}$), 2.37-2.35 (m, 2H, H2'), 2.04 (s, 3H, NH-Acetyl), 1.92 (s, 3H, H7), 1.76 (ddd, $^3J_{HH}$ = 11.4 Hz, $^2J_{HH}$ = 13.1 Hz, $^4J_{HP}$ = 5.2 Hz, 1H, $H3_{ax}$).

^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O) δ/ppm: 174.8 (C_q-Acetyl), 170.4 (C_q-Acetyl), 166.7 (C4-T), 151.9 (C2-T), 137.4 (C6-T), 111.7 (C5-T), 98.1 (d, $^2J_{CP}$ = 7.3 Hz, C2), 85.4 (d, $^3J_{CP}$ = 8.1 Hz, C4'), 85.2 (C1'), 71.8 (C3'), 71.2 (C6), 69.3 (C8), 68.7 (C4), 66.5 (C7), 65.6 (d, $^2J_{CP}$ = 5.9 Hz, C5'), 63.0 (C9), 53.5 (OCH_3), 51.7 (C5), 40.3 (d, $^3J_{CP}$ = 9.6 Hz, C3), 38.8 (C2'), 22.1 (NH-CH_3-Acetyl), 11.7 (C7).

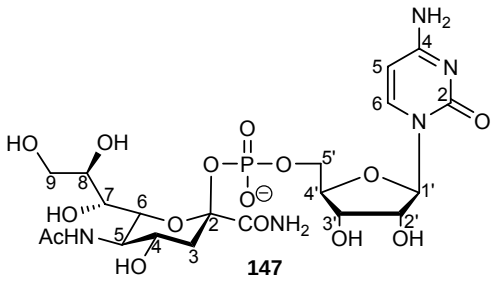
^{31}P-NMR (162 MHz, D_2O) δ/ppm: -4.61.

HRMS (ESI^-): ber.: 626.1571 [$M-H^+$], gef.: 626.1575.

Versuch der Synthese von 5-Acetamido-3,5-didesoxy-β-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl-cytidinmonophosphat (CMP-β-D-Neu5Ac) ***8***

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 490 mg Methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy-β-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonat **17** (1.00 mmol, 4.0 Äquivalente) mit 24.0 mg gewaschenem Natriumhydrid (1.00 mmol, 4.0 Äquivalente) zunächst eine Stunde im Vakuum getrocknet und anschließend auf -40 °C gekühlt und in einem Gemisch aus 10.0 mL absolutem Dichlormethan sowie 3.0 mL abs. DMF aufgenommen. Das Gemisch wurde 30 min bei dieser Temperatur gerührt. Es wurden 145 mg 5-Nitro-*cyclo*Sal-

N^4,2',3'-triacetylcytidinmonophosphat **68** (0.250 mmol, 1.0 Äquivalente) ebenfalls einige Zeit im Vakuum getrocknet, in absolutem Dichlormethan (8 mL) gelöst und langsam bei -40 °C zu der deprotonierten Pyranose getropft. Das Reaktionsgemisch wurde bei dieser Temperatur bis zur vollständigen Umsetzung des *cyclo*Sal-Nucleotids 4 h gerührt (DC-Kontrolle DCM/MeOH 19:1 v/v). Daraufhin wurde zunächst das Dichlormethan bei 0 °C im Vakuum entfernt und die verbleibende Reaktionslösung mit Wasser verdünnt und gefriergetrocknet. Der erhaltene Rückstand wurde je zweimal mit Wasser und Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde in einem Gemisch aus 20.0 mL wässriger Ammoniaklösung (25%) und 1.0 mL Methanol gelöst und 7 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle DCM/MeOH 3:1 v/v) wurde das Reaktionsgemisch mit Wasser verdünnt und zur Entfernung des Lösungsmittel gefriergetrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wurde mehrfach über Sephadex G15 mit reinem Wasser als Eluent chromatographiert und abschließend an RP-18-Silicagel mit Wasser gereinigt. Die Detektion der Produktfraktionen erfolgte dünnschichtchromatographisch mit einem Gemisch aus *iso*-Propanol und einer 1 M Ammoniumacetat-Lösung (2:1 v/v).
Das Lösungsmittel wurde durch Gefriertrocknung entfernt.
Anmerkung: Das gewünschte Produkt, CMP-β-D-Neu5Ac, **8** wurde auf diesem Weg nicht erhalten, da aufgrund der Entschützungsbedingungen das Säureamid **147** generiert wurde. Daher ist im Folgenden die Analytik von **147** angegeben.



147

Ausbeute: 29.0 mg (0.0470 mmol, 19%) eines farblosen Feststoffes; Summenformel: $C_{20}H_{31}N_5O_{15}P^-$; Molgewicht: 612.5 g/mol; R_f-Wert (*i*Pr/NH_4OAc 2:1 v/v): 0.57; Anomerenverhältnis: β-anomerenrein; $[\alpha]_D^{20}$= -35.0° (c=0.1, H_2O).

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O) δ/ppm: 7.93 (d, $^3J_{HH}$ = 7.6 Hz, 1H, H6-C), 6.09 (d, $^3J_{HH}$ = 7.6 Hz, 1H, H5-C), 5.97 (d, $^3J_{HH}$ = 3.8 Hz, 1H, H1'), 4.29-4.17 (m, 6H, H2', H3', H4', H5', H6), 4.11-4.05 (m, 1H, H4), 3.99 (d, $^3J_{HH}$ = 10.3 Hz, 1H, H5), 3.94-3.90 (m, 1H, H9), 3.90-3.85 (m, 1H, H8), 3.62 (dd, $^3J_{HH}$ = 6.3 Hz, $^2J_{HH}$ = 13.3 Hz, 1H, H9), 3.52 (d, $^3J_{HH}$ = 9.5 Hz, 1H, H7), 2.50 (dd, $^3J_{HH}$ = 4.7 Hz, $^2J_{HH}$ = 13.3 Hz, 1H, $H3_{eq}$), 2.04 (s, 3H, NH-Acetyl), 1.70 (ddd, $^3J_{HH}$ = 11.3 Hz, $^2J_{HH}$ = 13.3 Hz, $^4J_{HP}$ = 5.7 Hz, 1H, $H3_{ax}$).

^{13}C-NMR (101 MHz, D_2O) δ/ppm: 174.9 (C_q-Acetyl), 172.9 (C_q-Acetyl), 166.0 (C4-C), 152.7 (C2-C), 141.6 (C6-C), 98.4 (d, $^2J_{CP}$ = 7.9 Hz, C2), 96.9 (C5-C), 89.3 (C1'), 82.7 (d, $^3J_{CP}$ = 8.3 Hz, C4'), 74.3 (C3'), 72.3 (C2'), 69.4 (C6), 69.4 (C8), 68.6 (C7), 66.4 (C4), 64.9 (d, $^2J_{CP}$ = 5.6 Hz, C5'), 62.9 (C9), 51.7 (C5), 40.7 (d, $^3J_{CP}$ = 9.6 Hz, C3), 22.1 (NH-CH_3-Acetyl).

^{31}P-NMR (162 MHz, D_2O) δ/ppm: -4.79.

HRMS (ESI^-): ber.: 626.1560 [M-H^+], gef.: 612.1562.

9. GEFAHRSTOFFVERZEICHNIS

Das folgende Verzeichnis umfasst Verbindungen und Lösemittel, mit denen während dieser Promotion gearbeitet wurde. Die Gefahrstoffe sind mit den jeweiligen Gefahrensymbolen sowie den R-Sätzen und S-Sätzen gekennzeichnet. Die Substanzen, für die keine Gefahreneinschätzung bekannt ist, sind als gefährlich einzustufen. Es ist zu vermeiden, sich oder eine andere Person mit diesen Substanzen zu kontaminieren und diese Stoffe in die Umwelt einzubringen.

Substanz	**Gefahren-symbole**	**R-Sätze**	**S-Sätze**
Acetanhydrid	C	10-20/22-34	(1/2-)26-36/37/39-45
Aceton	F	11-36-66-67	2-9-16-26
Acetonitril	F, T	11-23/24/25	16-27-45
Acetylchlorid	F, C	11-14-34	9-16-26-45
Ammoniak (25%ige Lösung)	C, N	34-50	26-36/37/39-45.1-61
Ammoniumacetat	---	---	---
Benzol	F, T	45-11-48/23/24/25.1	53.1-45
Benzophenon	Xi, N	36/37/38-50/53	26-36-60-61
Boran-THF-Komplex	F, X_i	11-19-22-14/15-36/37/38-66-67	16-26-29-33-36
tert-Butylhydroperoxid	O, C	7-10-21	3/7-26-36/37/39-45
n-Butyllithium	F,C	14/15-17-34-48/20	26-36/37/39/45
Calciumhydrid	F	15	24/25-43.1-7/8
Celite	X_n	68/20	22
Chloroform	X_n	22-38-40-48/20/22	36/37
5-Chlorsalicylsäure	X_i	36/37/38	26-36
Deuteriumoxid (D_2O)	---	---	---
Dichlormethan	X_n	40	23.2-24/25-36/37

Diethylether	F^+	12-19-22-66-67	(2-)-9-16-29-33
Dimethylformamid	T	61-E20/21-36	53-45
Dimethylsulfoxid	X_i	36/38	26
Dinatriumdihydrogen-pyrophosphat	---	---	---
1,4-Dioxan	F, X_n	11-19-36/37-40-66	9-16-36/37-46
DIPEA	F, C	11-22-34-52/53	16-26-36/37/39-45-60
DOWEX 50x8	X_i	36/37/38	26-36
Essigsäure (Eisessig)	C	10-35	23.2-26-45
Ethanol	F	11	7-16
Ethylacetat	F	11-36-66-67	16-26-33
Nicotinsäureethylester	Xn	36-42	23-26
H_2	F	12	9-16-33
Hexan	Xn, F, N	51/53-62-65-67	61-62
Hydraziniumacetat	T	45-46-23/24/25-34	53-23-26-27-28-36/37/39-45
iso-Propanol	F, Xi	11-36-67	7-16-24/25-26
Kaliumhydroxid	C	35	26-37/39-45
Kaliumcarbonat	Xn, Xi	22-36/37/38	26-36
Kieselgel	Xn	40-37	26-37/39
Methanol	F, T	11-23/25	7-16-24-45
Natriumchlorid	---	---	---
Natriumborhydrid	F,T	15-25-34	14-26-26/37/39-43.6-45
Natriumhydrid	F, C	15-34	7/8-26-36/37/39-43.6-45
Natriumhydrogencarbonat	---	---	---
Natriumdihydrogenphosphat	---	---	---
Natriumhydroxid	C	35	26-37/39-45
Natriumsulfat	---	---	---
5-Nitrosalicylaldehyd	Xi	36/38	26-36
Palladium/Kohle 5 %	---	---	14.1-22

Petrolether	F, X_n	11-52/53-65	9-16-23.2-24-33-62
Phosphortrichlorid	T^+, C	14-26/28-29-35-48/20	26-36/37/39-45-7/8
Phosphorylchlorid	T^+,C	14-22-26-29-35-48/23	7/8-26-45
Pyridin	F, X_n	11-20/21/22	26-28.1
Salzsäure	C	34-37	26-36/37/39-45
Schwefelsäure	C	35	26-30-45
Silbercarbonat	Xi	36/37/38	26-36
TBDMS-Cl	F, C	11-35-37	16-26-36/37/39-45
Tetrahydrofuran	F, X_i	11-19-36/37	16-29-33
2'-Desoxythymidin		---	22-24/25
Toluol	F, X_n	11-20	16-25-29-33
Triethylamin	F, C	11-20/21/22-35	3-16-26-29-36/37/39-45
Triethylamintrihydrofluorid	T^+, C	26/27/28-35	7/9-26-28.1-36/37/39-45
Trimethylphosphat	T	46-22-40	26-36/37-45-
Trimethylsilyl-trifluoromethansulfonat	C	10-14-34	16-26-36/37/39-45

10. LITERATURVERZEICHNIS

[1] H. M. Kalckar, The enzymic action of myokinase, *J. Biol. Chem.* **1942**, *143*, 299-300.

[2] J. Balzarini, P. Herdewijn, C. E. DeClerq, Differential Patterns of Intracellular Metabolism of 2',3'-Didehydro-2',3'-dideoxythymidine and 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine, Two Potent *Anti*-human Immunodeficiency Virus Compounds; *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 6127-6133.

[3] M. Vaghefi, Nucleoside Triphosphates and their analogs: Chemistry, Biotechnology and Biological Applications; *Taylor & Francis Group* **2005**.

[4] L. L. Kisselev, J. Justesen, A. D. Wolfson, L. Y. Frolova, Diadenosine oligophosphates (Ap_nA), a novel class of signalling molecules? *FEBS Lett.* **1998**, *427*, 157-163.

[5] A. G. McLennan, Dinucleoside polyphosphates-friend or foe? *Pharmacol. Ther.* **2000**, *87*, 73-89.

[6] A. G McLennan, L. D. Barnes, G. M. Blackburn, C. Brenner, A. Guranowski, A. D. Miller, J. M. Rovira, P. Rotllan, B. Soria, J. A. Tanner, A. Sillero, Recent progress in the study of the intracellular functions of diadenosine polyphosphates, *Drug Dev. Res.* **2001**, *52*, 249-259.

[7] M. J. Harrison, R. Brossmer, R. S. Goody, Inhibition of platelet aggregation and the platelet release reaction by α,ω-diadenosine polyphosphates, *FEBS Lett.* **1975**, *54*, 57-60.

[8] A. Jovanovic, A. Terzic, Diadenosine-hexaphosphate is an inhibitory ligand of myocardial ATP-sensitive K+ channels, *Eur. J. Pharmacol.* **1995**, *286*, R1-2.

[9] C. Ripoll, F. Martin, J. M. Rovira, J. Pintor, M. T. Miras-Portugal, B. Soria, Diadenosine polyphosphates. A novel class of glucose-induced intracellular messengers in the pancreatic β-cell, *Diabetes* **1996**, *45*, 1431-1434.

[10] M. Tepel, J. Jankowski, H. Schluter, J. Bachmann, M. Van Der Giet, C. Ruess, J. Terliesner, W. Zidek, Diadenosine polyphosphates' action on calcium and vessel contraction, *Am. J. Hypertens.* **1997**, *10*, 1404-1410.

[11] E. Busshardt, W. Gerok, D. Haeussinger, Regulation of hepatic parenchymal and nonparenchymal cell function by the diadenine nucleotides Ap_3A and Ap_4A, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* **1989**, *1010*, 151-9.

[12] E. J. Verspohl, B. Johannwille, Diadenosine polyphosphates in insulin-secreting cells: interaction with specific receptors and degradation, *Diabetes* **1998**, *47*, 1727-1734.

[13] N. A. Flores, B. M. Stavrou, D. J. Sheridan, The effects of diadenosine polyphosphates on the cardiovascular system, *Cardiovas. Res.* **1999**, *42*, 15-26.

[14] J. Luo, V. Jankowski, N. Guengaer, J. Neumann, W. Schmitz, W. Zidek, H. Schlueter, J. Jankowski, Endogenous Diadenosine Tetraphosphate, Diadenosine Pentaphosphate, and Diadenosine Hexaphosphate in Human Myocardial Tissue, *Hypertension* **2004**, *43*, 1055-1059.

[15] E. F. Neufeld, W. Z. Hassid, Biosynthesis of saccharides from Glycopyranosyl Esters of Nucleotides, *Adv. Carbohydr. Chem.* **1963**, *18*, 309–356.

[16] T. J Martin, H. Braun, R. R. Schmidt, A convenient synthesis of nucleoside monophosphate-N-acetylneuraminic acids (NMP-Neu5Ac), *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, *2*, 1203-8.

[17] T. Angata, A. Varki, Chemical Diversity in the Sialic Acids and Related α-Keto Acids: An Evolutionary Perspective, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 439-469.

[18] S. Kelm, R. Schauer, Sialic acids in molecular and cellular interactions, *Int Rev Cytol.* **1997**, *175*, 137-240.

[19] M. J. Kiefel, M. von Itzstein, Recent Advances in the Synthesis of Sialic Acid Derivatives and Sialyl-Mimetics as Biological Probes, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 471-490.

[20] S. Roseman, J. J. Distler, J. G. Moffatt, H. G. Khorana, Nucleoside polyphosphates. XI. An improved general method for the synthesis of nucleotide coenzymes. Synthesis of uridine 5'-, cytidine 5'-, and guanosine 5'-diphosphate derivatives, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 659-63.

[21] J. G. Moffatt, H. G. Khorana, Nucleoside polyphosphates. VIII. New and improved syntheses of uridine diphosphate glucose and flavine adenine dinucleotide by use of nucleoside 5'-phosphoramidates. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 3756-61.

[22] J. Tomasz, A. Simoncsits, M. Kajtar, R. M Krug, A. J. Shatkin, Chemical synthesis of 5'-pyrophosphate and triphosphate derivatives of 3'-5' ApA, ApG, GpA and GpG. CD study of the effect of 5'-phosphate groups on the conformation of 3'-5' GpG, *Nucleic Acids Res.* **1978**, *5*, 2945-57.

[23] A. Simoncsits, J. Tomasz, Nucleoside 5'-phosphordiamidates, synthesis and some properties, *Nucleic Acids Res.* **1975**, *2*, 1223-33.

[24] D. E. Hoard, D. G. Ott, Conversion of mono- and oligodeoxyribonucleotides to 5'-triphosphates, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 1785-8.

[25] M. Shimazu, K. Shinozuka, H. Sawai, Facile synthesis of nucleotides containing polyphosphates by manganese(II) and cadmium(II) ion-catalyzed pyrophosphate bond formation in aqueous solution, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 235-8.

[26] J. Ludwig, A New Route to Nucleoside-5’-triphosphates, *Acta. Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung.* **1981**, *16*, 131–133.

[27] J. L. Ruth, Y. C. Cheng, Nucleoside analogs with clinical potential in antivirus chemotherapy. The effect of several thymidine and 2'-deoxycytidine analog 5'-triphosphates on purified human (α, β) and herpes simplex virus (types 1, 2) DNA polymerases, *Mol. Pharmacol.* **1981**, *20*, 415–422.

[28] M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi, A novel method for phosphorylation of nucleosides to 5'-nucleotides, *Tetrahedron Lett.* **1967**, *50*, 5065–5068.

[29] W. Feldmann; Condensed phosphates and arsenates. LIII. Trimetaphosphate as triphosphorylation agent for alcohols and carbohydrates in aqueous solution. Its special position among condensed phosphates, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 3850-3860.

[30] A. W. Schwartz, Specific phosphorylation of the 2'- and 3'-positions in ribonucleosides, *J. Chem. Soc. Chem. Commun*. **1969**, *23*, 1393.

[31] J. Ludwig, A simple one flask synthesis of nucleoside 5'-triphosphates from unprotected nucleosides via nucleoside 5'-*cyclo*triphosphates, *Bioact. Mol.* **1987**, *3*, 201-204.

[32] W. Wu, D. E. Bergstrom, V. J. Davisson, A Combination Chemical and Enzymatic Approach for the Preparation of Azole Carboxamide Nucleoside Triphosphate, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 3860-3865.

[33] T. Kovacs, L. Otvos, Simple synthesis of 5-vinyl- and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine-5'-triphosphates, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4525-8.

[34] J. Ludwig, F. Eckstein, Rapid and efficient synthesis of nucleoside 5'-*O*-(1-thiotriphosphates), 5'-triphosphates and 2',3'-*cyclo*phosphorothioates using 2-chloro-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 631–635.

[35] V. S. Bogachev, Synthesis of deoxynucleoside 5'-triphosphates using trifluoroacetic anhydride as an activating reagent, *Bioorg. Khim.* **1996**, *22*, 699-705.

[36] S. Mohamady, D. L. Jakeman, An Improved Method for the Synthesis of Nucleoside Triphosphate Analogs, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10588-10591.

[37] R. L. Baughn, O. Adalsteinsson, G. M. Whitesides, Large-scale enzyme-catalyzed synthesis of ATP from adenosine and acetyl phosphate. Regeneration of ATP from AMP, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *100*, 304-306.

[38] M. E. Theoclitou, E. P. L. Wittung, A. D. Hindley, T. S. H. El-Thaher, A. D. Miller, Characterization of stress protein LysU. Enzymic synthesis of diadenosine 5',5'''-P1,P4-tetraphosphate (Ap4A) analogs by LysU, *J. Chem. Soc.*, *Perkin Trans. 1* **1996**, *16*, 2009-2019.

[39] J. R. Reiss, J. G. Moffatt, Dismutation reactions of nucleoside polyphosphates. III. The synthesis of α ,ω-dinucleoside 5'-polyphosphates, *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 3381-7.

[40] P. Feldhaus, T. Froehlich, R. S. Goody, M. Isakov, R. H Schirmer, Synthetic inhibitors of adenylate kinases in the assays for ATPases and phosphokinases, *Eur. J. Biochem.* **1975**, *57*, 197-204.

[41] G. M. Blackburn, G. E. Taylor, G. R. Thatcher, M. Prescott, A. G. McLennan, Synthesis and resistance to enzymic hydrolysis of stereochemically-defined phosphonate and thiophosphate analogues of P1,P4-bis(5'-adenosyl) tetraphosphate, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 6991-7004.

[42] A. G. McLennan, G. E. Taylor, M. Prescott, G. M. Blackburn, Recognition of β, β'-substituted and α, β, α' β'-disubstituted phosphonate analogues of bis(5'-adenosyl) tetraphosphate by the bis(5'-nucleosidyl)-tetraphosphate pyrophosphohydrolases from Artemia embryos and Escherichia coli, *Biochemistry* **1989**, *28*, 3868-75.

[43] K. E. Ng, L. E. Orgel, The action of a water-soluble carbodiimide on adenosine-5'-polyphosphates, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 3573-80

[44] Q. Han, B. L. Gaffney, R. A. Jones, One-Flask Synthesis of Dinucleoside Tetra- and Penta-Phosphates, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2075-2077.

[45] P. C. Zamecnik, M. L. Stephenson, C. M. Janeway, K. Randerath, Enzymic synthesis of diadenosine tetraphosphate and diadenosine triphosphate with a purified lysyl-sRNA synthetase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1966**, *24*, 91-7.

[46] A. Guranowski, S. Blanquet, Phosphorolytic cleavage of diadenosine 5',5'''-P1,P4-tetraphosphate. Properties of homogeneous diadenosine 5',5'''-P1,P4-tetraphosphate α,β-phosphorylase from Saccharomyces cerevisiae, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 3542-7.

[47] A. Brevet, H. Coste, M. Fromant, P. Plateau, S. Blanquet, Yeast diadenosine 5',5'''-P1,P4-tetraphosphate α,β-phosphorylase behaves as a dinucleoside tetraphosphate synthetase, *Biochemistry* **1987**, *26*, 4763-8.

[48] A. Guranowski, M. A. Gunther Sillero, A. Sillero, Firefly luciferase synthesizes P1,P4-bis(5'-adenosyl)tetraphosphate (Ap4A) and other dinucleoside polyphosphates, *FEBS Lett.* **1990**, *271*, 215-18.

[49] B. Ortiz, A. Sillero, M. A. Gunther Sillero, Specific synthesis of adenosine(5')tetraphospho(5')nucleoside and adenosine(5')oligophospho(5')adenosine (n>4) catalyzed by firefly luciferase, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *212*, 263-70.

[50] J. E. Heidlas, K. W. Williams, G. M. Whitesides, Nucleoside phosphate sugars: syntheses on practical scales for use as reagents in the enzymatic preparation of oligosaccharides and glycoconjugates, *Acc. Chem. Res.* **1992**, *25*, 307-14.

[51] R. Schauer, Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1982**, *40*, 131-234.

[52] E. L. Kean, S. Roseman, The sialic acids. X. Purification and properties of cytidine 5'-monophosphosialic acid synthetase, *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 5643-50.

[53] J. C. Feo-Manga, L. B. Rodriguez-Aparicio, M. A. Ferrero, A. Reglero, Purification and partial characterization of CMP-Neu5Ac synthetase from rat brain, *Anal. Chim. Acta* **2006**, *564*, 141-150.

[54] H. H. Higa, J. C. Paulson, Sialylation of glycoprotein oligosaccharides with N-acetyl-, N-glycolyl-, and N-O-diacetylneuraminic acids, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 8838-48.

[55] R. Schauer, M. Wember, C. F. do Amaral, Synthesis of CMP-glycosides of radioactive N-acetyl-,N-glycoloyl-,N-acetyl-7-O-acetyl- and N-acetyl-8-O-acetylneuraminic acids by CMP-sialate synthase from bovine submaxillary glands, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1972**, *353*, 883-6.

[56] D. H. van den Eijnden, W. van Dijk, A convenient method for the preparation of cytidine 5'-monophospho-N-acetylneuraminic acid, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1972**, *353*, 1817-20.

[57] J. Thiem, W. Treder, Synthesis of the trisaccharide Neu-5-Ac-α(2→6)Gal-β(1→4)GlcNAc with immobilized enzymes, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 1100-1.

[58] H. Yu, H. Yu, R. Karpel, X. Chen, Chemoenzymatic synthesis of CMP-sialic acid derivatives by a one-pot two-enzyme system: comparison of substrate flexibility of three microbial CMP-sialic acid synthetases, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 6427-6435.

[59] M. Izumi, G.-J. Shen, S. Wacowich-Sgarbi, T. Nakatani, O. Plettenburg, C.-H. Wong, Microbial Glycosyltransferases for Carbohydrate Synthesis: α-2,3-Sialyltransferase from Neisseria gonorrheae, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10909-10918.

[60] Y. Kajihara, T. Ebata, K. Koseki, H. Kodama, H. Matsushita, H. Hashimoto, Efficient Chemical Synthesis of CMP-Neu5Ac and CMP-(Neu5Acα2→8Neu5Ac), *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5732-5.

[61] M. D. Chappell, R. L. Halcomb, Synthesis of CMP-sialic acid conjugates: substrates for the enzymic synthesis of natural and designed sialyl oligosaccharides, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 11109-11120.

[62] S. Hashimoto, T. Honda, S. Ikegami, A rapid and efficient synthesis of 1,2-trans-β-linked glycosides via benzyl- or benzoyl-protected glycopyranosyl phosphates, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, *11*, 685-7.

[63] C. Meier, 2-Nucleos-5'-*O*-yl-4H-1,3,2-benzodioxaphosphin-2-oxides–A New Concept for lipophilic, potential Prodrugs of biologically activ Nucleoside Monophosphates, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 77–79, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 70–73.

[64] C. Meier, *cyclo*Sal-Pronucleotides–Design of the Concept, Chemistry and Antiviral Activity, *Advances in Antiviral Drug Design,* Elsevier **2004**, *4*, 147–213.

[65] C. Meier, M. Lorey, E. De Clercq, J. Balzarini, Cyclic Saligenylphosphotriesters of 2'-3'-Dideoxy-2'-3'-didehydrothymidine (d4T)–A New Pro-Nucleotide Approach, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 99–104.

[66] C. Meier, M. Lorey, E. De Clercq, J. Balzarini; *Cyclo*saligenyl-2'-3'-dideoxy-2'-3'-didehydrothymidine Monophosphate (*cyclo*Sal-d4TMP): Synthesis and antiviral Evaluation of a new d4TMP delivery system, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1417–1427.

[67] J. Balzarini, S. Aquaro, T. Knispel, C. Rampazzo, V. Bianchi, C.-F. Perno, E. de Clercq, C. Meier; *Cyclo*saligenyl-2'-3'-dideoxy-2'-3'-didehydrothymidine Monophosphate (*cyclo*Sal-d4TMP): efficient intracellular delivery of d4TMP, *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 928-935.

[68] C. Meier, T. Knispel, E. de Clercq, J. Balzarini; *cyclo*Sal-Pronucleotides of 2'-3'-Dideoxyadenosine and 2'-3'-Dideoxy-2'-3'-didehydroadenosine: Synthesis and antiviral Evaluation of a highly efficient Nucleotide delivery system, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1604–1614.

[69] C. Meier, T. Knispel, E. de Clercq, J. Balzarini; ADA-Bypass by lipophilic *cyclo*Sal-ddAMP Pro-Nucleotides. A second Example of the Efficiency of the *cyclo*Sal-Concept, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1577–1582.

[70] C. Meier, T. Knispel, V. E. Marquez, E. de Clercq, J. Balzarini; *cyclo*Sal-2'-*ara*(*ribo*)-Fluoro-2'-3'-Dideoxyadenosine Monophosphate – an Effort to Solve the Structure-Activity Relationship of 2'-Fluoro-ddA, *Nucleosides & Nucleotides* **1999**, *18*, 907–912.

[71] C. Meier, T. Knispel, V. E. Marquez, M. A. Siddiqui, E. De Clercq, J. Balzarini; *cyclo*Sal-Pronucleotides of 2'-Fluoro-ara- and 2'-Fluoro-ribo-2',3'-dideoxyadenosine as a Strategy to Bypass a Metabolic Pathway; *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1615-1624.

[72] C. Meier, L. Habel, F. Haller, P. Wutzler, Chemistry and Properties of *cyclo*Saligenyl-Nucleotides (*cyclo*Sal-NMP) of Acyclic Nucleoside Analogues as Potential Anti-HSV Agents, *Antiviral Res.* **1998**, *37*, A75.

[73] A. Meerbach, R. Klöcking, C. Meier, P. Wutzler, Inhibitory Effect of *cyclo*Saligenyl-Nucleoside Monophosphates (*cyclo*Sal-NMP) of Acyclic Nucleoside Analogues on HSV-1 and EBV, *Antiviral Res.* **1998**, *37*, A76.

[74] C. Meier, L. Habel, F. Haller-Meier, A. Lomp, M. Herderich, R. Klocking, A. Meerbach, P. Wutzler, Chemistry and anti-herpes simplex virus type 1 evaluation of *cyclo*Sal-nucleotides of acyclic nucleoside analogs, *Antiviral Chem. Chemother.* **1998**, *9*, 389-402.

[75] A. Meerbach, R. Klocking, C. Meier, A. Lomp, B. Helbig, P. Wutzler, Inhibitory effect of *cyclo*Saligenyl-nucleoside monophosphates (*cyclo*Sal-NMP) of acyclic nucleoside analogues on HSV-1 and EBV, *Antiviral Res.* **2000**, *45*, 69-77.

[76] J. Balzarini, F. Haller-Meier, E. De Clercq, C. Meier Antiviral activity of *cyclo*saligenyl prodrugs of a*cyclo*vir, carbovir, and abacavir, *Antiviral Chem. Chemother.* **2001**, *12*, 301-306.

[77] A. Meerbach, P. Wutzler, A. Lomp, C. Meier, Synthesis, Properties and Anti-EBV Activity of a New Series of 3‘-Modified *cyclo*Sal-BVDUMP Pronucleotides, *Antiviral Res.* **2000**, *46*, A82.

[78] C. Meier, A. Lomp, A. Meerbach, P. Wutzler, *cyclo*Saligenyl-5-[(E)-2-bromovinyl]-2'-deoxyuridine monophosphate (*cyclo*Sal-BVDUMP) pronucleotides active against Epstein-Barr virus, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 283-5.

[79] C. Meier, A. Lomp, A. Meerbach, P. Wutzler, *Cyclo*Sal-BVDUMP Pronucleotides: How to Convert an Antiviral-Inactive Nucleoside Analogue into a Bioactive Compound against EBV, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5157-5172.

[80] C. Meier, M. Ruppel, D. Vukadinović, A. Meerbach, P. Wutzler, E. De Clercq, J. Balzarini, “Lock-in”-Modified *cyclo*Sal-d4TMP and –BVdUMP Triesters – Extention of a Pronucleotide System, *Antiviral Res.* **2003**, *57*, A39.

[81] C. Meier, M. Ruppel, D. Vukadinović, J. Balzarini, “Lock-in”-*cyclo*Sal-Pronucleotides – A New Generation of Chemical Trojan Horses, *Mini Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 383-394.

[82] C. Meier, M. Ruppel, D. Vukadinović, J. Balzarini, Second Generation of *cyclo*Sal-Pronucleotides with Esterase-Cleavable Sites –the “Lock-in”-Concept, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2004**, *23*, 89-115.

[83] D. Vukadinović, N. P. H. Böge, J. Balzarini, C. Meier, Second Generation of *cyclo*Sal-Pronucleotides with Esterase-Cleavable Site : the “Lock-in” Concept, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2005**, *24*, 939-942.

[84] C. Meier, C. Ducho, H. J. Jessen, D. Vukadinović-Tenter, J. Balzarini, Second Generation *cyclo*Sal-d4TMP Pronucleotides Bearing Esterase-Cleavable Sites – The Trapping-Concept, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 197-206.

[85] N. Gisch, J. Balzarini, C. Meier, Enzymatically Activated *cyclo*Sal-d4T-monophosphates – The Third Generation of *cyclo*Sal-Pronucleotides, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1658-1667.

[86] H. J. Jessen, J. Balzarini, C. Meier, Intracellular Trapping of *cyclo*Sal-Pronucleotides: Modification of Prodrugs with Amino Acid Esters, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6592-6598.

[87] N. Gisch, F. Pertenbreiter, J. Balzarini, C. Meier, 5-(1-Acetoxyvinyl)-*cyclo*Saligenyl-2’,3’-dideoxy-2’,3’-didehydrothymidine Monosposphates – A Second Type of New, Enzymatically Activated *cyclo*Saligenyl Pronucleotides, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 8115-8123.

[88] C. Ducho, U. Goerbig, S. Jessel, N. Gisch, J. Balzarini, C. Meier, Bis-*cyclo*Sal-d4T-monophosphates: Drugs That Deliver Two Molecules of Bioactive Nucleotides, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1335-1346.

[89] C. Meier, N. Gisch, C. Ducho, J. Balzarini, *Cyclo*Saligenyl-di-d4TMP: Highly Loaded *Cyclo*Sal-Pronucleotides that Release Two Equivalents of Nucleotides and Leaving One Masking Unit, *Antiviral Res.* **2009**, *82*, A61.

[90] N. Gisch, J. Balzarini, C. Meier, Doubly Loaded *cyclo*Saligenyl-Pronucleotides. 5,5'-Bis(*cyclo*Saligenyl-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine Monophosphates), *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 3464-3473.

[91] H. C. Müller, Welche Faktoren beeinflussen die Eigenschaften von Nucleosidmonophosphaten? Untersuchungen zu den Substrateigenschaften gegenüber Thymidylatkinase; *Dissertation*, Hamburg, **2003**.

[92] A. Lomp, Design, Synthese und Eigenschaften neuer antiviral aktiver Nucleotid Prodrugs; *Dissertation*, Hamburg, **2002**.

[93] O. R. Ludek, Synthese carbocyclischer Analoga des Thymidylats für Struktur-Aktivitätsuntersuchungen an Thymidylatkinasen, *Dissertation*, Hamburg, **2005**.

[94] S. Warnecke, *Cyclo*Sal-aktivierte Phosphatdonatoren zur Synthese von Phosphatestern, *Diplomarbeit*, Hamburg, **2006**.

[95] O. R. Ludek, T. Kraemer, J. Balzarini, C. Meier, Divergent synthesis and biological evaluation of carbocyclic α-, iso- and 3'-epi-nucleosides and their lipophilic nucleotide prodrugs, *Synthesis* **2006**, *8*, 1313-1324.

[96] P. L. Boyer, B. C. Vu, Z. Ambrose, J. G. Julias, S. Warnecke, C. Liao, C. Meier, V. E. Marquez, S. H. Hughes, The Nucleoside Analogue D-carba T Blocks HIV-1 Reverse Transcription, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5356-5364.

[97] S. Wendicke, S. Warnecke, C. Meier, Efficient synthesis of nucleoside diphosphate glycopyranoses, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1523; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1500-1502.

[98] S. Wolf, T. Zismann, N. Lunau, C. Meier, Reliable Synthesis of Various Nucleoside Diphosphate Glycopyranoses, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7656-7664.

[99] V. Wittmann, C.-H. Wong, 1H-Tetrazole as Catalyst in Phosphoromorpholidate Coupling Reactions: Efficient Synthesis of GDP-Fucose, GDP-Mannose, and UDP-Galactose, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2144-2147.

[100] A. Zamyatina, S. Gronow, C. Oertelt, M. Puchberger, H. Brade, P. Kosma, Efficient chemical synthesis of the two anomers of ADP-L-glycero- and D-glycero-D-manno-heptopyranose allows the determination of the substrate specificities of bacterial heptosyltransferases, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4150-4153.

[101] Y. Kajihara, H. Hashimoto, H. Kodama, Methyl-3-O-(2-acetamido-2-deoxy-6-thio-β-D-glucopyranosyl)-β-D-galactopyranoside: a slow reacting acceptor-analog which inhibits glycosylation by UDP-D-galactose-N-acetyl-D-glucosamine-(1→4)-β-D-galactosyltransferase. *Carbohydr. Res.* **1992**, *229*, C5-C9.

[102] C. L. F. Meyers, R. F. Borch, A Novel Method for the Preparation of Nucleoside Diphosphates, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3765-3768.

[103] M. Arlt, O. Hindsgaul, Rapid Chemical Synthesis of Sugar Nucleotides in a Form Suitable for Enzymic Oligosaccharide Synthesis, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 14-15.

[104] V. C. Tonn, Synthese und Reaktionen von festphasengebundenen *cyclo*Sal-Nucleotiden, *Diplomarbeit*, Hamburg, **2007**.

[105] F. Cramer, M. Winter, Imido esters. VI. Catalytic effect of dimethylformamide in reactions with phosphoric acid ester chlorides, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 989-96.

[106] A. Holy, Simple microscale chemical 5'-phosphorylation of unprotected dinucleoside monophosphates, *Journal of Carbohydrates, Nucleosides, Nucleotides* **1975**, *2*, 63-72.

[107] W. H. Dawson, R. L. Cargill, R. B. Dunlap, The phosphorylation of unprotected nucleosides. Nonselectivity of phosphorus oxychloride in trialkylphosphate, *Journal of Carbohydrates, Nucleosides, Nucleotides* **1977**, *4*, 363-75.

[108] M. Lorey, *cyclo*Saligenyl-Nucleosidmonophosphate, ein neues Pro-Nucleotid-Konzept für antiviral und antitumor active Nucleosidanaloga, *Dissertation*, Würzburg, **1999**.

[109] Y.-S. Zhou, Z.-W. Miao, Y.-F. Zhao, Chlorination of nucleosides by N-chlorodiisopropylamine and triphenylphosphine, *Synlett* **2000**, *5*, 671-673.

[110] R. Lucas, V. Neto, A. Hadj Bouazza, R. Zerrouki, R. Granet, P. Krausz, Y. Champavier, Microwave-assisted synthesis of a triazole-linked 3'-5' dithymidine using click chemistry, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 1004-1007.

[111] D. E. Gibbs, J. G. Verkade, Improved syntheses of chlorodeoxynucleosides, *Synt. Commun.* **1976**, *6*, 563-73.

[112] P. Dewevre, C. Tapiero, J. L. Imbach, 5'-S-(3-aminopropyl)-5'-thioadenosine. Preparation of substituted 5'-thioadenosine nucleosides, *Nucleic Acid Chem.* **1991**, 171-3.

[113] K. Kusashio, M. Yoshikawa, Phosphorylation. II. Reaction of 2',3'-O-isopropylidene-inosine and -guanosine with phosphoryl chloride, *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1968**, *41*, 142-9.

[114] H. J. Jessen, Untersuchungen zur intrazellulären Freisetzung von Nucleosidphosphaten, *Dissertation,* Hamburg, **2008**.

[115] P. F. Alewood, S. Palma, R. B. Johns, Synthesis of a model phosphopeptide, *Aust. J. Chem.* **1984**, *37*, 425-8.

[116] P. F. Alewood, J. W. Perich, R. B. Johns, Preparation of Nα-(tert-butoxycarbonyl)-O-(dibenzylphosphono)-L-serine, *Aust. J. Chem.* **1984**, *37*, 429-33.

[117] J. W. Perich, R. B. Johns, Synthesis of casein-related peptides and phosphopeptides. XV. The efficient synthesis of multiple-Ser(P)-containing peptides, *Australian Journal of Chemistry* **1991**, *44*, 1683-90.

[118] S. Wendicke, Neue Synthese von Nucleosiddiphosphatpyranosen mit Hilfe von *cyclo*Sal-aktivierten Phosphatdonatoren, *Dissertation*, Hamburg, **2007**.

[119] R. J. Kennedy, A. M. Stock, Oxidation of organic substances by potassium peroxymonosulfate, *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 1901-6.

[120] B. R. Travis, M. Sivakumar, G. O. Hollist, B. Borhan, Facile Oxidation of Aldehydes to Acids and Esters with Oxone, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1031-1034.

[121] J. H. Clark, D. G. Cork, Synthesis of 1,4-diketones by fluoride-catalyzed Michael addition and supported permanganate oxidation, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1982**, *11*, 635-6.

[122] M. M. Abu-Omar, J. H. Espenson, Oxidations of Cyclic β-Diketones Catalyzed by Methylrhenium Trioxide, *Organometallics* **1996**, *15*, 3543-3549.

[123] S. E. Denmark, D. C. Forbes, D. S. Hays, J. S. DePue, R. G. Wilde, Catalytic Epoxidation of Alkenes with Oxone, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1391-407.

[124] L. A. Wozniak, W. J. Stec, Oxidation in organophosphorus chemistry: potassium peroxymonosulfate, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2637-2640.

[125] K. S. Webb, D. Levy, A facile oxidation of boronic acids and boronic esters, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5117-18.

[126] K. S. Webb, A mild, inexpensive and practical oxidation of sulfides, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 3457-60.

[127] B. M. Trost, D. P. Curran, Chemoselective oxidation of sulfides to sulfones with potassium hydrogen persulfate, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1287-90.

[128] F. A. Davis, S. G. Lal, H. D. Durst, Chemistry of oxaziridines. 10. Selective catalytic oxidation of sulfides to sulfoxides using N-sulfonyloxaziridines, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5004-7.

[129] F. A. Davis, S. Chattopadhyay, J. C. Towson, S. Lal, T. Reddy, Chemistry of oxaziridines. 9. Synthesis of 2-sulfonyl- and 2-sulfamyloxaziridines using potassium peroxymonosulfate (oxone), *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2087-9.

[130] M. Curini, F. Epifano, M. C. Marcotullio, O. Rosati, Oxone. A convenient reagent for the oxidation of acetals, *Synlett* **1999**, *6*, 777-779.

[131] N. Gisch, unveröffentliche Ergebnisse, *Dissertation*, Hamburg, **2008**.

[132] N. M. Yoon, C. S. Pak, H. C. Brown, S. Krishnamurthy, T. P. Stocky; Selective Reductions; XIX. The Rapid Reaction of Carbocylic Acids with Borane-

Tetrahydrofurane. A Remarkably Convenient Procedure for the Selective Conversion of Carboxylic Acids to the Corresponding Alcohols in the Presence of Other Functional Groups; *J. Org. Chem.* **1973**, *58*, 2786 – 2792.

[133] C. Arenz, A. Giannis, Synthesis of the first selective irreversible inhibitor of neutral sphingomyelinase, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 137-140.

[134] a.) E. J. Corey, A. Venkateswarlu, Protection of hydroxyl groups as tert-butyldimethylsilyl derivatives, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6190-1. b.) H. Weber, H. G. Khorana, H. G. Polynucleotides. CIV. Total synthesis of the structural gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast. Chemical synthesis of an icosadeoxynucleotide corresponding to the nucleotide sequence 21 to 40, *J. Mol. Biol.* **1972**, *72*, 219-49. c.) M. C. Pirrung, S. W. Shuey, D. C. Lever, L. Fallon, A convenient procedure for the deprotection of silylated nucleosides and nucleotides using triethylamine trihydrofluoride, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1345-6. d.) C. E. Elmquist, J. S. Stover, Z. Wang, C. J. Rizzo, Site-Specific Synthesis and Properties of Oligonucleotides Containing C8-Deoxyguanosine Adducts of the Dietary Mutagen IQ, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11189-11201.

[135] C. Meier, *Cyclo*Sal-Phosphates as Chemical Trojan Horses for the intracellular Nucleotide and Glycosylmonophosphate Delivery – Chemistry meets Biology, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1081-1102.

[136] S. Takei, Metabolic pathway of NAD in yeast cells. VI. New method for preparation of NMN by an enzyme from yeast, *Agr. Biol. Chem.* **1970**, *34*, 23-7.

[137] B. L. Kam, N. J. Oppenheimer, Synthesis of a new class of D-aldopentofuranosylamines, the 5-O-trityl-D-aldopentofuranosylamines, *Carbohydr. Res.* **1979**, *77*, 275-80.

[138] R. Jeck, P. Heik, C. Woenckhaus, Simple methods of preparing nicotinamide mononucleotide, *FEBS Lett.* **1974**, *42*, 161-4.

[139] I. A. Mikhailopulo, T. I. Prikota, V. A. Timoshchuk, A. A. Akhrem, Synthesis of glycosides of nicotinamide and nicotinamide mononucleotide, *Synthesis* **1981**, *5*, 388-9.

[140] J. Lee, H. Churchil, W.-B. Choi, J. E. Lynch, F. E. Roberts, R. P. Volante, P. J. Reider, A chemical synthesis of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+), *Chem. Commun.* **1999**, *8*, 729-730.

[141] S. Tanimori, T. Ohta, M. Kirihata, An efficient chemical synthesis of nicotinamide riboside (NAR) and analogs, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1135-1137.

[142] A. K. Ghosh, W. Liu, Total Synthesis of (+)-Sinefungin, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6175-6182.

[143] T. Yang, N. Y.-K. Chan, A. A. Sauve, Syntheses of Nicotinamide Riboside and Derivatives: Effective Agents for Increasing Nicotinamide Adenine Dinucleotide Concentrations in Mammalian Cells, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 6458-6461.

[144] P. Franchetti, M. Pasqualini, R. Petrelli, M. Ricciutelli, P. Vita, L. Cappellacci, Stereoselective synthesis of nicotinamide β-riboside and nucleoside analogs, *Bioorg. Med. Chem. Lett* **2004**, *14*, 4655-4658.

[145] M. Terreni, R. Salvetti, L. Linati, R. Fernandez-Lafuente, G. Fernandez-Lorente, A. Bastida, J. M. Guisan, Regioselective enzymatic hydrolysis of acetylated pyranoses and pyranosides using immobilized lipases. An easy chemoenzymatic synthesis of α- and β-D-glucopyranose acetates bearing a free secondary C-4 hydroxyl group, *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 1615-1621.

[146] A. Bastida, R. Fernandez-Lafuente, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, G. Pagani, M. Terreni, Regioselective hydrolysis of peracetylated α-D-glucopyranose catalyzed by immobilized lipases in aqueous medium. A facile preparation of useful intermediates for oligosaccharide synthesis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 633-636.

[147] T.-C. Chien, J.-W. Chern, A convenient preparation of 1,2,3-tri-O-acetyl-β-D-ribofuranose by enzymatic regioselective 5-O-deacetylation of the peracetylated ribofuranose, *Carbohydr. Res.* **2004**, 339, 1215-1217.

[148] T. Sowa, S. Ouchi, Facile synthesis of 5'-nucleotides by the selective phosphorylation of a primary hydroxyl group of nucleosides with phosphoryl chloride, *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1975**, *48*, 2084-90.

[149] O. Mitsunobu, K. Kato, J. Kimura, Selective phosphorylation of the 5'-hydroxy groups of thymidine and uridine, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 6510-11.

[150] J. Kimura, Y. Fujisawa, T. Yoshizawa, K. Fukuda, O. Mitsunobu, Studies on nucleosides and nucleotides. VII. Preparation of pyrimidine nucleoside 5'-phosphates and N3,5'-purine *cyclo*nucleosides by selective activation of the 5'-hydroxyl group, *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1979**, *52*, 1191-6.

[151] M. Saady, L. Lebeau, C. Mioskowski, Synthesis of adenosine-5'-phosphates and 5'-alkylphosphonates via the Mitsunobu reaction, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2239-42.

[152] O. Mitsunobu, The use of diethyl azodicarboxylate and triphenylphosphine in synthesis and transformation of natural products, *Synthesis* **1981**, *1*, 1-28.

[153] D. A. Evans, J. R. Gage, J. L. Leighton, Asymmetric synthesis of calyculin A. 3. Assemblage of the calyculin skeleton and the introduction of a new phosphate monoester synthesis, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1964-6.

[154] T. Kurihara, T. Hata, Acetylation of nucleotides by acetic anhydride in pyridine, *Chem. Lett.* **1975**, 495-6.

[155] D. L. Jakeman, A. J. Ivory, G. M. Blackburn, M. P. Williamson, Orientation of 1,3-Bisphosphoglycerate Analogs Bound to Phosphoglycerate Kinase, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 10957-10962.

[156] C. E. Bystrom, D. W. Pettigrew, B. P. Branchaud, P. O'Brien, S. J. Remington, Crystal Structures of Escherichia coli Glycerol Kinase Variant S58→W in Complex with Nonhydrolyzable ATP Analogs Reveal a Putative Active Conformation of the Enzyme as a Result of Domain Motion, *Biochemistry* **1999**, *38*, 3508-3518.

[157] X. Liu, C. Brenner, A. Guranowski, E. Starzynska, G. M. Blackburn, New tripodal "supercharged" analogues of adenosine nucleotides: inhibitors for the Fhit Ap3A hydrolase, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1244-1247.

[158] E. A. Shirokova, A. V. Shipitsin, L. S. Victorova, N. B. Dyatkina, L. E. Goryunova, R. Sh. Beabealashvilli, C. J. Hamilton, S. M. Roberts, A. A, Krayevsky, Modified nucleoside 5'-triphosphonates as a new type of antiviral agents, *Nucleosides & Nucleotides* **1999**, *18*, 1027-1028.

[159] B. E. Bernstein, D. M. Williams, J. C. Bressi, P. Kuhn, M. H. Gelb, G. M. Blackburn, W. G. J. Hol, A bisubstrate analog induces unexpected conformational changes in phosphoglycerate kinase from Trypanosoma brucei, *J. Mol. Biol.* **1998**, *279*, 1137-1148.

[160] C. E. Bystrom, D. W. Pettigrew, S. J. Remington, B. P. Branchaud, ATP analogs with non-transferable groups in the γ-position as inhibitors of glycerol kinase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2613-2616.

[161] R. R. Schmidt, New methods of glycoside and oligosaccharide syntheses - are there alternatives to the Koenigs-Knorr method? *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 213-36; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 212-235.

[162] R. R. Schmidt, J. Michel, M. Roos, Glycosyl imidates, 12. Direct synthesis of O-α- and O-β-glycosyl imidates, *Liebigs Ann. Chem.* **1984**, 1343-57.

[163] R. R. Schmidt, M. Reichrath, U. Moering, O-Alkylation at the anomeric center. Part 5. 1-O-Alkylation of D-glucopyranose, *J. Carbohydr. Chem.* **1984**, *3*, 67-84.

[164] R. R. Schmidt, J. Michel, Glycosylimidates. Part 11. Direct O-glycosyl trichloroacetimidate formation. Nucleophilicity of the anomeric oxygen atom, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 821-4.

[165] J. Coniche, G. A. Levy, Aryl Glycopyranosides by the Helferich Method, *Methods Carbohyr. Res.* **1963**, *2*, 345-347.

[166] G. Excoffier, D. Gagnare, J. P. Utille, Synthesis of oligosaccharides on polymeric supports. V. Selective cleavage by hydrazine of the anomeric acetyl groups of acetylated glycosyl residues, *Carbohydr. Res.* **1975**, *39*, 368-73.

[167] H. Yuasa, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, Chemical-enzymic synthesis of 5'-thio-N-acetyllactosamine: the first disaccharide with sulfur in the ring of the non-reducing sugar, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5891-2.

[168] H. Paulsen, O. Lockhoff, Building units for oligosaccharides. XXX. New effective β-glycoside synthesis of mannose glycosides. Syntheses of mannose containing oligosaccharides, *Chem. Ber.* **1981**, *114*, 3102-14.

[169] H. Paulsen, R. Lebuhn, O. Lockhoff, Building blocks of oligosaccharides. XXXVIII. Synthesis of the branched tetrasaccharide building block of the key sequence of N-glycoproteins, *Carbohydr. Res.* **1982**, *103*, C7-C11.

[170] H. Paulsen, R. Lebuhn, Building units of oligosaccharides. XLVII. Synthesis of tri- and tetrasaccharide sequences of N-glycoproteins including a β-D-mannosidic linkage, *Liebigs Ann. Chem.* **1983**, 1047-72.

[171] H. Paulsen, O. Lockhoff, Building blocks for oligosaccharides. XV. Synthesis of β-D-mannopyranosyl- and 2-azido-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl-containing disaccharide-halide-building block. *Tetrahedron Lett.* **1978**, 4027-30.

[172] P. Westerduin, T. Beetz, M. J. Dees, C. Erkelens, P. Smid, H. Zuurmond, C. A. A. Van Boeckel, J. H. Van Boom, An approach to the synthesis of four Rhodomicrobium Vannielii lipid A analogs, *J. Carbohydr. Chem.* **1988**, *7*, 617-44.

[173] O. Theander, Oxidation of glycosides. X. Reduction of methyl D-oxoglucopyranosides, *Acta Chem. Scand.* **1958**, *12*, 1883-5.

[174] M. A. E. Shaban, R. W. Jeanloz, Amino sugars. CIV. Synthesis of O-β-D-mannopyranosyl oligosaccharides. Part II. Synthesis of 2-acetamido-2-deoxy-3-O-β-D-mannopyranosyl-D-glucose, *Carbohydr. Res.* **1976**, *52*, 103-14.

[175] M. A. E.Shaban, R. W. Jeanloz, Amino sugars. CV. Synthesis of O-β-D-mannopyranosyl oligosaccharides. Part II. The synthesis of 2-acetamido-2-deoxy-4-O-β-D-mannopyranosyl-D-glucose, *Carbohydr. Res.* **1976**, *52*, 115-27.

[176] C. Auge, C. D. Warren, R. W. Jeanloz, M. Kiso, L. Anderson, The synthesis of O-β-D-mannopyranosyl-(1 → 4)-O-(2-acetamido-2-deoxyy-β-D-glucopyranosyl)-(1 → 4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose. Part II, *Carbohydr. Res.* **1980**, *82*, 85-95.

[177] C. D. Warren, C. Auge, M. L. Laver, S. Suzuki, D. Power, R. W. Jeanloz, The synthesis of O-β-D-mannopyranosyl-(1 → 4)-O-(2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-(1 → 4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose. Part I, *Carbohydr. Res.* **1980**, *82*, 71-83.

[178] G. Ekborg, B. Lindberg, J. Lonngren, Synthesis of β-D-mannopyranosides, *Acta Chem. Scand.* **1972**, *26*, 3287-92.

[179] E. E. Lee, G. Keaveney, P. S. O'Colla, Synthesis of β-D-mannopyranosides, *Carbohydr. Res.* **1977**, *59*, 268-73.

[180] S. David, A. Malleron, C. Dini, Preparation of oligosaccharides with β-D-mannopyranosyl and 2-azido-2-deoxy-β-D-mannopyranosyl residues by inversion at C-2 after coupling, *Carbohydr.Res.* **1989**, *188*, 193-200.

[181] A. Furstner, I. Konetzki, A practical synthesis of β-D-mannopyranosides, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5721-5724.

[182] A. Fuerstner, I. Konetzki, Total Synthesis of Caloporoside, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3072-3080.

[183] R. R. Schmidt, U. Moering, M. Reichrath, O-alkylation at the anomeric center. 4. 1-O-alkylation of D-mannofuranose and D-mannopyranose, *Chem. Ber.* **1982**, *115*, 39-49.

[184] A. Terjung, K.-H. Jung, R. R. Schmidt, Anomeric O-alkylation. Part 15. New 2/1-type surfactants by anomeric O-alkylation of mannofuranose, *Liebigs Ann. Chem.* **1996**, 1313-1321.

[185] F. Barresi, O. Hindsgaul, The synthesis of β-mannopyranosides by intramolecular aglycon delivery: scope and limitations of the existing methodology, *Can. J. Chem.* **1994**, *72*, 1447-65.

[186] F. Barresi, O. Hindsgaul, Synthesis of β-mannopyranosides by intramolecular aglycon delivery, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9376-7.

[187] F. Barresi, O. Hindsgaul, Improved synthesis of β-mannopyranosides by intramolecular aglycon delivery, *Synlett* **1992**, 759-61.

[188] G. Stork, G. Kim, Stereocontrolled synthesis of disaccharides via the temporary silicon connection, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1087-8.

[189] G. Stork, J. J. La Clair, Stereoselective Synthesis of β-Mannopyranosides via the Temporary Silicon Connection Method, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 247-8.

[190] M. Arlt, O. Hindsgaul, Rapid Chemical Synthesis of Sugar Nucleotides in a Form Suitable for Enzymic Oligosaccharide Synthesis, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 14-15.

[191] K. Okamoto, T. Goto, Glycosidation of sialic acid, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 5835-57.

[192] G. Pazynina, A. Tuzikov, A. Chinarev, P. Obukhova, N. Bovin, Simple stereoselective synthesis of α2-6 sialooligosaccharides, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 8011-8013.

[193] R. Kuhn, P. Lutz, D. L. MacDonald, Synthesis of anomeric sialic acid methyl ketosides, *Chem. Ber.* **1966**, *99*, 611-17.

[194] J. Rothermel, H. Faillard, Phase-transfer-catalyzed synthesis of aryl alpha-ketosides of N-acetylneuraminic acid. A 2-methylfluoran-6-yl glycoside of N-acetylneuraminic acid, 2-methyl-6-(5-acetamido-3,5-dideoxy-alpha-D-glycero-D-galacto-nonulopyrano-sylonicacid)-xanthene-9-spiro-1'-isobenzofuran-3'-one, a new substrate for neuraminidase assay, *Carbohydr. Res.* **1990**, *196*, 29-40.

[195] R. Roy, C. A. Laferriere, Synthesis of protein conjugates and analogs of n-acetylneuraminic acid, *Can. J. Chem.* **1990**, *68*, 2045-54.

[196] J. M. Haberman, D. Y. Gin, Dehydrative Sialylation with C2-Hemi-Ketal Sialyl Donors, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2539-2541.

[197] J. M. Beau, R. Schauer, J. Haverkamp, J. P. Kamerling, L. Dorland, J. F. G. Vliegenthart, Chemical behavior of cytidine 5'-monophospho-N-acetyl-β-D-neuraminic acid under neutral and alkaline conditions, *Eur. J. Biochem.* **1984**, *140*, 203-8.

[198] G. Zemplen, E. Pacsu, Saponification of acetylated sugars and related substances, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1929**, *62B*, 1613-4.

[199] H. Paulsen, H. Tietz, Building blocks of oligosaccharides. Part 43. Synthesis of trisaccharide units from N-acetylneuraminic acid and N-acetyllactosamine, *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 934-5.

[200] S. Prytulla, J. Lauterwein, M. Klessinger, J. Thiem, Configurational assignment of N-acetylneuraminic acid and analogs via the vicinal carbon-hydrogen coupling constants, *Carbohydr. Res.* **1991**, *215*, 345-9.

[201] E. S. Simon, M. D. Bednarski, G. M. Whitesides, Synthesis of CMP-NeuAc from N-acetylglucosamine: generation of CTP from CMP using adenylate kinase, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7159-63.

[202] Y. Kajihara, K. Koseki, T. Ebata, H. Kodama, H. Matsushita, H. Hashimoto, Synthesis of a novel CMP-Neu5Ac analog: CMP-[α-Neu5Ac-(2→8)-Neu5Ac], *Carbohydr. Res.* **1994**, *264*, C1-C5.

[203] A. Kobata, The acid-soluble nucleotides of milk. II. Isolation and identification of two novel uridine nucleotide oligosaccharide conjugates from human milk and colostrum, *J. Biochem.* **1963**, *53* 167-75.

[204] G. W. Jourdian, F. Shimizu, S. Roseman, Isolation of nucleotide-oligosaccharide containing silaic acid, *Fed. Proc.* **1961**, *20*, 161.

[205] E. Uhlmann, A. Peyman, Antisense oligonucleotides: A new therapeutic principle, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 543-84.

[206] J. F. Milligan, M. D. Matteucci, J. C. Martin, Current concepts in antisense drug design, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1923-37.

[207] J. Haralambidis, K. Angus, S. Pownall, L. Duncan, M. Chai, G. W. Tregear, The preparation of polyamide-oligonucleotide probes containing multiple non-radioactive labels, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 501-5.

[208] G. Tong, J. M. Lawlor, G. M. Tregear, J. Haralambidis, The synthesis of oligonucleotide-polyamide conjugate molecules suitable as PCR primers, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 2223-31.

[209] J. Nielsen, S. Brenner, K. D. Janda, Synthetic methods for the implementation of encoded combinatorial chemistry, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9812-13.

[210] B. Juodka, M. Pfuetz, D. Werner, Chemical and enzymic analysis of covalent bonds between peptides and chromosomal DNA, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 6391-8.

[211] a.) M. J. Ostro, Liposomes, *Sci. Am.* **1987**, *256*, 102-11; b) G. Gregoriadis, Liposome Technology, *CRC Press*, Inc.: Boca Raton, FL, 1984; Vol I-III.

[212] a.) G. Gregoriadis, Ed. Liposomes as Drug Carriers. Recent Trends and Progress. **1988**, 885 pp; b.) C. G. Knight, Ed. Research Monographs in Cell and Tissue Physiology, Vol. 7: Liposomes: From Physical Structure to Therapeutic Applications. **1981**, 497 pp.

[213] P. Wang, M. Schuster, Y. F. Wang, C. H. Wong, Synthesis of phospholipid-inhibitor conjugates by enzymic transphosphatidylation with phospholipase D, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10487-91.

[214] a.) W. Spevak, J. O. Nagy, D. H. Charych, M. E. Schaefer, J. H. Gilbert, M. D. Bednarski, Polymerized liposomes containing C-glycosides of sialic acid: potent inhibitors of influenza virus in vitro infectivity, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1146-7; b.) J. E. Kingery-Wood, K. W. Williams, G. B. Sigal, G. M. Whitesides, The agglutination of erythrocytes by influenza virus is strongly inhibited by liposomes incorporating an analog of sialyl gangliosides, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7303-5; c.) G. Wess, W. Kramer, G. Schubert, A. Enhsen, K. H. Baringhaus, H. Glombik, S. Muellner, K. Bock, H. Kleine, et al., Synthesis of bile acid - drug conjugates: potential drug shuttles for liver specific targeting, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 819-22.

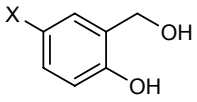
[215] G. M. T. Van Wijk, K. Y. Hostetler, M. Schlame, H. Van den Bosch, Cytidine diphosphate diglyceride analogs of antiretroviral dideoxynucleosides: Evidence for release of dideoxynucleoside-monophosphates by phospholipid biosynthetic enzymes in rat liver subcellular fractions, *Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.* **1991**, *1086*, 99-105.

[216] A. C. Weymouth-Wilson, The role of carbohydrates in biologically active natural products, *Nat. Prod. Rep.* **1997**, *14*, 99-110.

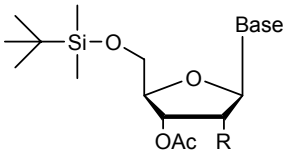
[217] R. M. Adibhatla, J. F. Hatcher, Cytidine 5'-Diphosphocholine (CDP-Choline) in Stroke and Other CNS Disorders, *Neurochem. Res.* **2005**, *30*, 15-23.

[218] J. G. Moffatt, A General Synthesis of Nucleoside-5'-Triphosphates, *Can. J. Chem.* **1964**, *42*, 599-604.

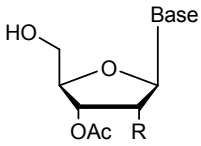
VERBINDUNGSÜBERSICHT



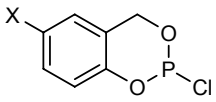
X = NO_2: **44**
X = Cl: **45**



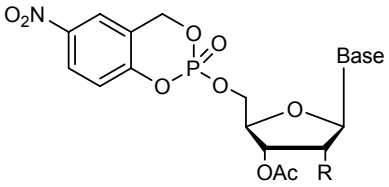
Base = A^{NHAc}, R = OAc: **56**
Base = U, R = OAc: **57**
Base = C^{NHAc}, R = OAc: **58**
Base = T, R = H: **59**
Base = BVU, R = H: **60**



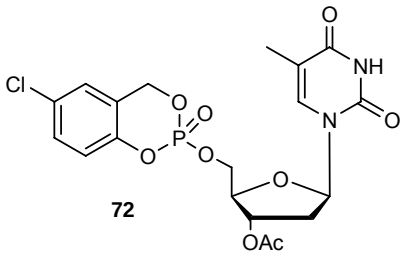
Base = A^{NHAc}, R = OAc: **61**
Base = U, R = OAc: **62**
Base = C^{NHAc}, R = OAc: **63**
Base = T, R = H: **64**
Base = BVU, R = H: **65**



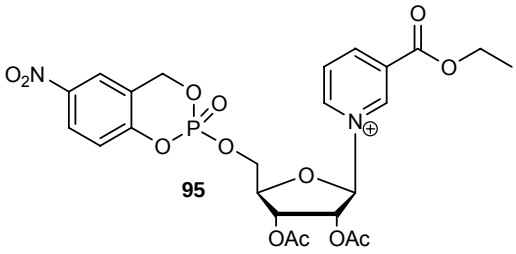
X = NO_2: **50**
X = Cl: **49**



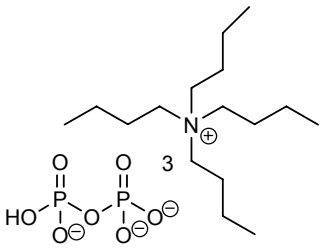
Base = A^{NHAc}, R = OAc: **66**
Base = U, R = OAc: **67**
Base = C^{NHAc}, R = OAc: **68**
Base = T, R = H: **69**
Base = BVU, R = H: **70**
Base = G^{Form}, R = OAc: **71**



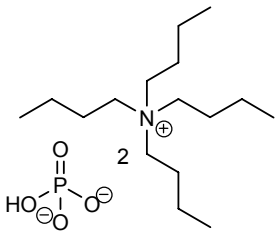
72



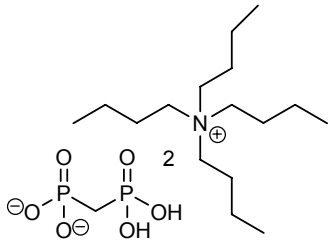
95



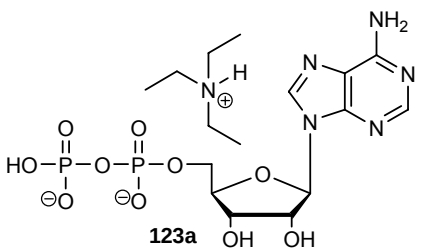
74



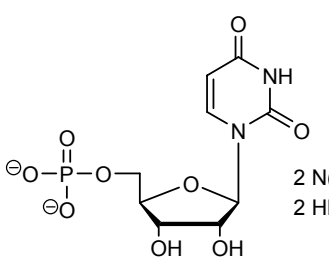
75



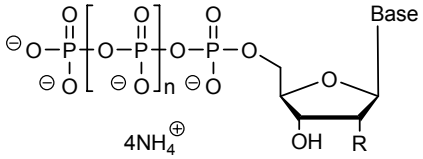
122a



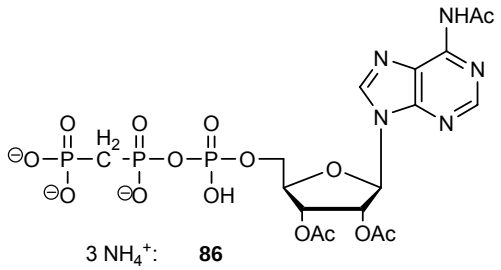
123a



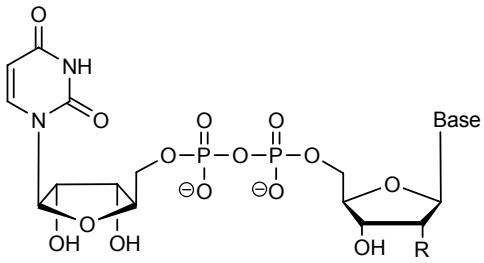
2 $N(nBu)_4^+$: **90a**;
2 $HNEt_3^+$: **90b**



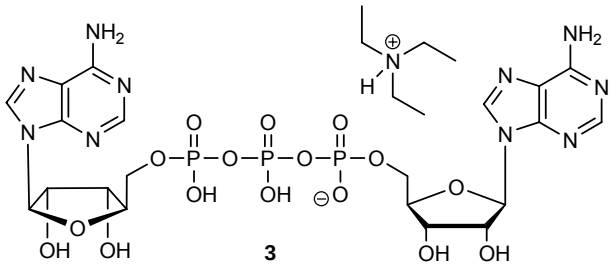
Base = A, R = OH, n = 1: **1**
Base = U, R = OH, n = 1: **80**
Base = C, R = OH, n = 1: **81**
Base = T, R = H, n = 1: **15**
Base = G, R = OH, n = 1: **82**
Base = BVU, R = H, n = 1: **83**
Base = T, R = H, n = 0: **84**
Base = BVU, R = H, n = 0: **85**



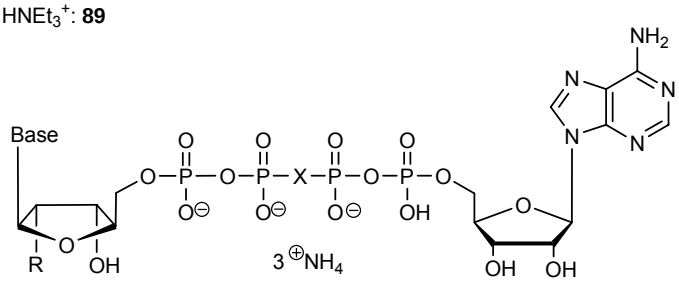
3 NH_4^+: **86**
3 $N(nBu)_4^+$: **86a**
3 $HNEt_3^+$: **86b**



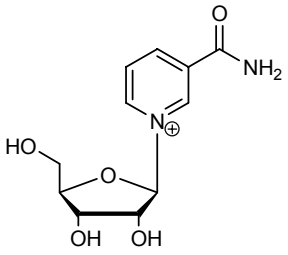
Base = T, R = H, 2 NH_4^+: **88a**
Base = T, R = H, 2 $HNEt_3^+$: **88b**
Base = U, R = OH, 2 $HNEt_3^+$: **89**



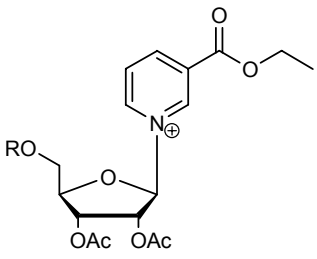
3



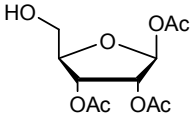
Base = A, R = OH, X = O: **4**
Base = T, R = H, X = O: **121**
Base = A, R = OH, X = CH_2: **87**



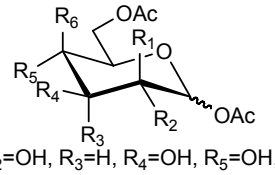
96



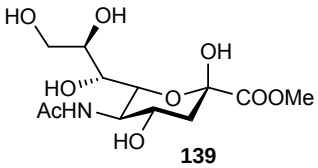
R = Ac: **103**
R = H: **105**



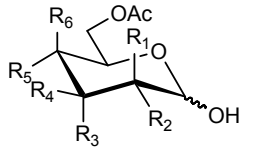
106



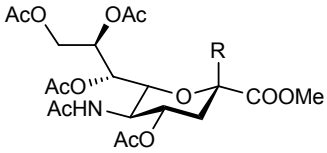
R_1=H, R_2=OH, R_3=H, R_4=OH, R_5=OH, R_6=H: **129**
R_1=OH, R_2=H, R_3=H, R_4=OH, R_5=OH, R_6=H: **130**
R_1=H, R_2=OH, R_3=H, R_4=OH, R_5=H, R_6=OH: **131**



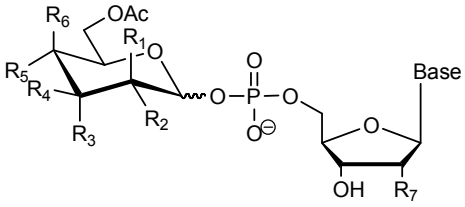
139



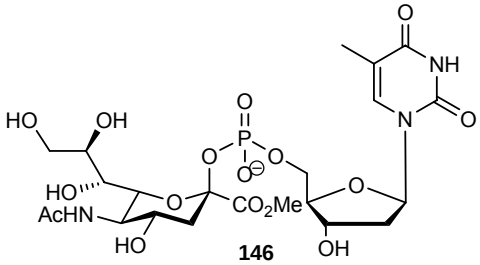
R_1=H, R_2=OH, R_3=H, R_4=OH, R_5=OH, R_6=H: **132**
R_1=OH, R_2=H, R_3=H, R_4=OH, R_5=OH, R_6=H: **133**
R_1=H, R_2=OH, R_3=H, R_4=OH, R_5=H, R_6=OH: **134**



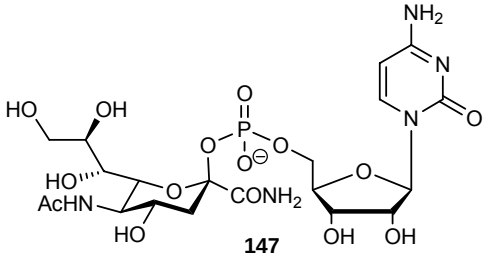
R = OH: **17**
R = Cl: **140**



R_1=H, R_2=OH, R_3=H, R_4=OH, R_5=OH, R_6=H, R_7=H, Base=T: **135**
R_1=OH, R_2=H, R_3=H, R_4=OH, R_5=OH, R_6=H, R_7=H, Base=T: **136**
R_1=H, R_2=OH, R_3=H, R_4=OH, R_5=H, R_6=OH, R_7=H, Base=T: **137**
R_1=H, R_2=OH, R_3=H, R_4=OH, R_5=OH, R_6=H, R_7=OH, Base=C: **138**



146



147

Lebenslauf

Persönliche Daten

Svenja Warnecke
geboren am 07.10.1980 in Hamburg

Schulbildung

1987-1991	Grund- und Hauptschule in Nahe
1991-2000	Lise-Meitner-Gymnasium in Norderstedt – Abschluss: Abitur

Akademische Ausbildung

10/00-02/06	Universität Hamburg: Studium der Chemie
06/05-02/06	Diplomarbeit an der Universität Hamburg am Institut für Organische Chemie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Chris Meier („*Cyclo*Sal-aktivierte Phosphatdonatoren zur Synthese von Phosphatestern“)
03/06-04/10	Promotion an der Universität Hamburg am Institut für Organische Chemie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Chris Meier

Universitäre Arbeiten

03/06-09/09	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Department Chemie der Universität Hamburg: Assistentin im organisch chemischen Grundpraktikum, Assistentin im Fortgeschrittenpraktikum in Organischer Chemie sowie im Integrierten Synthesepraktikum in Anorganischer und Organischer Chemie

Stipendien und Auszeichnungen

10/06-09/08	Promotionsstipendium der Universität Hamburg
09/08	TAIHO Travel Award (zur Teilnahme am 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids 2008, Kyoto, Japan)
07/06	Preis des Freundes- und Fördervereins Chemie der Universität Hamburg e.V. für eine der besten Diplomarbeiten 2006

Publikationen

Zeitschriftenbeiträge

S. Wolf, T. Zismann, N. Lunau, S. Warnecke, S. Wendicke, C. Meier, A convenient synthesis of nucleoside diphosphate glycopyranoses and other phosphorylated bioconjugates, *Eur. J. Cell Biol.* **2010**, *89*, 63-75.

S. Warnecke, C. Meier, Synthesis of nucleoside di- and triphosphates and dinucleoside polyphosphates with *cyclo*Sal-nucleotides, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3024-30.

P. L. Boyer, B. C Vu, Z. Ambrose, J. G. Julias, S. Warnecke, C. Liao, C. Meier, V. E. Marquez, S. H Hughes, The nucleoside analogue D-carba T blocks HIV-1 reverse transcription, *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52*, 5356-64.

S. Warnecke, C. Meier, New and efficient synthesis of nucleoside polyphosphates and nucleoside monophosphate sugars, *Nucleic Acids Symposium Series* **2008**, *52*, 583-4.

S. Wendicke, S. Warnecke, C. Meier, Efficient Synthesis of Nucleoside Diphosphate Glycopyranoses, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1523-1525; *Angew. Chem. Int. Ed*. **2008**, *47*, 1500-1502.

Posterbeiträge

S. Warnecke, C. Meier; A Novel Access to Nucleoside Polyphosphates, 17th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids 2006, Bern, Schweiz.

S. Warnecke, C. Meier; New and efficient synthesis of nucleoside polyphosphates and nucleoside monophosphate sugars, 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids 2008, Kyoto, Japan.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation „Neue Synthese phosphorylierter Biokonjugate aus *cyclo*Sal-aktivierten Nucleotiden“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwandt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer mit den im Zulassungsversuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Hamburg, im Februar 2010