



**Synthese funktionalisierter Zuckernucleotide
und deren Anwendbarkeit als biologische Tools**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

von

Katharina Pahnke

vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Universität Hamburg

Hamburg 2017

Die Druckfreigabe für diese Arbeit wurde am 11.09.2017 durch das Studienbüro des Fachbereiches Chemie der Universität Hamburg erteilt.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Chris Meier in der Zeit von Oktober 2012 bis Juni 2017 angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Chris Meier

2. Gutachter: Prof. Dr. Joachim Thiem

Datum der Disputation: 08.09.2017

Meiner Familie

Publikationsliste

Artikel

K. Pahnke, C Meier, Synthesis of a bioreversible masked, lipophilic Adenosine Diphosphate Ribose Derivative, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 1616-1626.

K. Seelhorst, K. Pahnke, C. Meier, U. Hahn, Tagging Glycoproteins with Fluorescently Labeled GDP-Fucoses by Using α 1,3-Fucosyltransferases, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 2046-2053.

E. Erikson, P. R. Wratil, M. Frank, I. Ambiel, K. Pahnke, M. Pino, P. Azadi, N. Izquierdo-Useros, J. Martinez-Picado, C. Meier, R. L. Schnaar, P. R. Crocker, W. Reutter, O. T. Keppler, Mouse Siglec-1 Mediates *Trans*-Infection of Surface-Bound Murine Leukemia Virus in a Sialic Acid *N*-Acyl Side Chain-Dependent Manner *J. Biol. Chem.* **2015**, *58*, 6114-6130.

Vortrag

K. Pahnke, C. Meier, Synthesis of functionalized sugar nucleotides and their biological importance, *7th Baltic Meeting on Microbial Carbohydrates*, **2016**, Güstrow.

Posterbeitrag

K. Klingeberg, N. Lunau, K. Seelhorst, U. Hahn, C. Meier, Synthesis of fluorescently labelled nucleoside diphosphate 6-amino-6-deoxy- β -L-galactoses, *17th European Carbohydrate Symposium*, **2013**, Tel-Aviv.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Symbole	I
Zusammenfassung	V
Abstract	VIII
1 Einleitung	1
2 Kenntnisstand	4
2.1 Biochemischer Nutzen von Zuckernucleotid-Derivaten	4
2.1.1 Zuckernucleotide für den terminalen Glycosylierungsschritt von Glycanen	4
2.1.1.1 Fucosylierung von wichtigen Epitopen	4
2.1.1.2 Fucosyltransferasen	5
2.1.1.3 Fluoreszenz-basierte Methoden für biochemische Assays mittels modifizierter GDP-Fuc-Derivate	7
2.1.1.4 Vorkommen und Bedeutung von Sialinsäuren	10
2.1.1.5 Biosynthese von <i>N</i> -Acetylneuraminsäure 14 und CMP-Neu5Ac 15	12
2.1.1.6 Bedeutung von modifizierten Neuraminsäure- und CMP-Neu5Ac-Derivaten ..	13
2.1.1.7 Bedeutung von zellgängigen CMP-Neu5Ac-Derivaten	15
2.1.2 Das regulatorische Zuckernucleotid Adenosindiphosphat-Ribose 21	16
2.1.2.1 Der Ionenkanal <i>transient receptor potential melastatin 2</i> (TRPM2)	16
2.1.2.2 Adenosindiphosphat-Ribose (ADPR) 21 als Aktivator des TRPM2	16
2.1.2.3 Zellstudie mit ADPR-Analoga	19
2.2 Chemische Darstellung von Zuckernucleotiden	20
2.2.1 Chemische Darstellung von Nucleosiddiphosphat-Zuckern	20
2.2.1.1 Chemische Synthesen von NDP-Zuckern ausgehend von einem aktivierten Nucleosidmonophosphat (Strategie B)	21
2.2.2 Darstellung von Nucleosidmonophosphat-Zuckern	24
2.2.2.1 Chemische Synthesen zur Darstellung von CMP-Neu5Ac 15 ausgehend von einem aktivierten Cytidinmonophosphat (Strategie B)	24
3 Aufgabenstellung	27
4 Resultate und Diskussion	30
4.1 Darstellung potenter Tools für Fucosyltransferase-Studien	30
4.1.1 Synthese fluoreszenzmarkierter Nucleosiddiphosphat-Zucker	30

4.1.1.1 Synthese der benötigten Kupplungsbausteine: Die <i>cycloSal</i> -Triester 40 und 46 und das Azid-modifizierte Galactosephosphat-Derivat 31	34
4.1.1.2 Synthese der fluoreszenzmarkierten NDP-Fucose-Derivate 41-43	40
4.1.1.3 Fazit der Syntheserouten	47
4.1.2 Fucosyltransferase-Studien	47
4.1.2.1 Fazit der Fucosyltransferase-Studien.....	51
4.2 Darstellung von lipophilen Cytidinmonophosphat- <i>N</i> -acetylneuraminsäure-Derivaten ..	52
4.2.1 Darstellung von bioreversibel maskierten, lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivaten über Phosphoramiditchemie	53
4.2.1.1 Synthese der benötigten Kupplungsbausteine	55
4.2.1.2 Synthese der bioreversibel maskierten, lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivate 58 und 59	57
4.2.1.3 Fazit der Darstellung der bioreversibel maskierten, lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivate 58 und 59 mittels Phosphoramiditchemie	60
4.2.2 Chemische Hydrolysestudien der lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivate 58 und 59	61
4.2.2.1 Fazit der chemischen Hydrolysen	66
4.2.3 Darstellung von bioreversibel maskierten, lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivaten mittels <i>cycloSal</i> -Technik.....	67
4.2.3.1 Synthese der benötigten Kupplungsbausteine	69
4.2.3.2 Synthese der lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivate 27 und 74	71
4.2.3.3 Fazit der Syntheseroute zur Darstellung von lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivaten mittels <i>cycloSal</i> -Technik	80
4.2.4 Enzymatische Hydrolysestudien der lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivate 27 und 74	80
4.2.4.1 Enzymatische Hydrolysestudie der Verbindung $^{Ac}CMP\text{-Neu5Ac}^{COOMe}$ 27	81
4.2.4.2 Enzymatische Hydrolysestudie der Verbindung $^{Ac}CMP\text{-Neu5Ac}^{COOAM}$ 74	84
4.2.4.3 Fazit der enzymatischen Hydrolysestudien und Ausblick	91
4.3 <i>N</i> -Acyl-modifizierte Neuraminsäuren.....	92
4.4 Darstellung von bioreversibel maskierten, lipophilen Adenosindiphosphat-Ribose-Derivaten	94
4.4.1 Darstellung von lipophilen ADPR-Derivaten.....	96

4.4.1.1	Synthese von 4-Pentanoyloxybenzyl-(5'-O-adenosin)phosphoramidit 88	99
4.4.1.2	Synthese von 4-Pentanoyloxybenzyl-(5'-O-adenosin ^{Ac})phosphoramidit 95 ..	101
4.4.1.3	Synthese von 1,2,3-Triacetyl- α - und - β -D-ribose α - und β - 92	103
4.4.1.4	Versuch der Synthese von D-Ribosyl-5-monophosphat 89 sowie Darstellung von 1,2,3-Tri-O-acetyl- α - und - β -D-ribose-5-monophosphat α - und β - 96	105
4.4.1.5	Synthese von ^{C5} AB-ADP α - und - β -R ^{Ac} α - und β - 94	112
4.4.1.6	Fazit der entwickelten Syntheserouten.....	116
4.4.2	Hydrolysestudien des ^{C5} AB-ADP β -R ^{Ac} β - 94	116
4.4.2.1	Chemische Hydrolyse in phosphatgepufferter Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i> , PBS)	117
4.4.2.2	Enzymatische Hydrolysestudien.....	118
4.4.2.3	Fazit der Hydrolysestudien und Ausblick.....	126
5.	Experimenteller Teil	128
5.1	Allgemeines	128
5.1.1	Edukte und Reagenzien	128
5.1.2	Lösungsmittel	128
5.1.2.1	Absolute Lösungsmittel.....	128
5.1.3	Chromatographische Methoden.....	130
5.1.4	Spektroskopie.....	132
5.1.5	Spektrometrie	132
5.1.6	Weitere Geräte	133
5.2	Synthesen.....	134
5.2.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)	134
5.2.2	Darstellung selektiv blockierter Nucleoside.....	140
5.2.3	Darstellung des <i>cycloSal</i> -Chlorphosphits 53	147
5.2.4	Darstellung von <i>cycloSal</i> -Triestern	149
5.2.5	Darstellung des modifizierten β -L-Galactopyranosylphosphates 31	152
5.2.6	Darstellung von Neuraminsäure-Derivaten	157
5.2.7	Darstellung von 1,2,3-Tri-O-acetyl- α - und - β -D-ribose-5-monophosphat α - und β - 96	168

Inhaltsverzeichnis

5.2.8 Darstellung von Phosphoramiditen	174
5.2.9 Darstellung von Guanosindiphosphat-Fucose-Derivaten	179
5.2.10 Darstellung von fluoreszenzmarkierten Guanosindiphosphat-Fucose- Derivaten.....	182
5.2.11 Darstellung lipophiler CMP-Neu5Ac-Derivate	184
5.2.12 Darstellung lipophiler ADPR-Derivate	188
5.3 Hydrolysestudien	190
5.3.1 Chemische Hydrolysestudien in Phosphatpuffer bei pH 7.3.....	190
5.3.2 Enzymatische Hydrolysestudien mit PLE bei pH 7.3.....	191
6 Literaturverzeichnis	192
Anhang.....	207

Abkürzungen und Symbole

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
AB	Acyloxybenzyl
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ac	Acetyl
^{C2} AB-Maske	Acetoxybenzyl-Maske
^{C2} AB-CMP-Neu5Ac ^{COOMe}	peracetyliertes CMP-Neu5Ac-Derivat mit einer ^{C2} AB-Maske am Phosphat, Säureschutzgruppe Methylester
^{C5} AB-Maske	Pentanoxybenzyl-Maske
^{C5} AB-ADPR	ADPR mit einer ^{C5} AB-Maske am Phosphat
^{C5} AB-ADP α -/ β -R ^{Ac}	peracetyliertes, anomereneines ADPR-Derivat mit einer ^{C5} AB-Maske am Phosphat
^{pMPH} AB-Maske	(4-Methoxybenzoyloxy)-benzyl-Maske
^{pMPH} AB- CMP-Neu5Ac ^{COOMe}	peracetyliertes CMP-Neu5Ac-Derivat mit einer ^{pMPH} AB-Maske am Phosphat, Säureschutzgruppe Methylester
ADPR	Adenosindiphosphat-Ribose
AM	Acetoxymethyl
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ber.	berechnet
Bn	Benzyl
c	<i>cyclo</i>
CMAS	CMP-Neu5Ac-Synthase
CMP	Cytidinmonophosphat
Ac ^{CMP} -Neu5Ac ^{COOAM}	peracetyliertes CMP-Neu5Ac-Derivat, Säureschutzgruppe Acetoxymethylester
Ac ^{CMP} -Neu5Ac ^{COOMe}	peracetyliertes CMP-Neu5Ac-Derivat, Säureschutzgruppe Methylester
COSY	Korrelationsspektroskopie (<i>correlation spectroscopy</i>)
CuAAC	Kupferkatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (<i>copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition</i>)
C _q	quartäres C-Atom
<i>cyclo</i> Sal	<i>cyclo</i> Saligenyl
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett (NMR)
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en

Abkürzungen und Symbole

DC	Dünnschichtchromatographie
dd	doppeltes Dublett (NMR)
ddd	dreifaches Dublett (NMR)
DAD	<i>diode array detector</i>
DCI	Dicyanoimidazol
DNA	Desoxyribonucleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMP	2,2-Dimethoxypropan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTr	4,4'-Dimethoxytrityl
EE	Ethylacetat
ESI	Elektronenspray-Ionisation
Et	Ethyl
FAM	5-Carboxyfluorescein
FITC	Fluorescein/ <i>isothiocyanat</i>
Fm	Fluorenylmethyl
FP	Fluoreszenz-Polarisation
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
Fuc	Fucose
FucT	Fucosyltransferase
G	Guanin
GAG	Glycosaminoglycane
Gal	Galactose
GalNAc	2-Acetamido-2-desoxygalactose
GDP	Guanosindiphosphat
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
Glc	Glucose
GlcA	Glucuronsäure
GlcN	2-Amino-2-desoxyglucose
GlcNAc	2-Acetamido-2-desoxyglucose
GNE	Epimerase/ <i>N</i> -Acetylmannosamin-Kinase
GPI	Glycophosphatidylinositol
HMBC	Korrelationsspektroskopie (<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>)

Abkürzungen und Symbole

HP	<i>Helicobacter pylori</i>
HRMS	hochauflösende Massenspektrometrie (<i>high resolution mass spectrometry</i>)
HSQC	Korrelationsspektroskopie (<i>heteronuclear single quantum coherence</i>)
HTS	Hochdurchsatzscreening (<i>high-throughput-screening</i>)
<i>i</i> Pr	Isopropyl
IdoA	Iduronsäure
IR	Infrarot
<i>J</i>	skalare Kopplung (NMR)
kat.	katalytisch
KDN	2-Keto-3-desoxyonansäure
Le	Lewis-Epitop
LN	Lactosamin
m	Multipllett (NMR)
ManNAc	2-Acetamindo-2-desoxymannose
Man	Mannose
Me	Methyl
MMTr	4-Monomethoxytrityl
NAADP	Nicotinsäureadenindinucleotidphosphat
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
NANS	Neu5Ac-9-Phosphat-Synthase
NAPS	Neu5Ac-9-P Phosphatasen
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NDP	Nucleosiddiphosphat
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure
^O AcNeu5NAc ^{COOAM}	peracetylierte <i>N</i> -Acetylneuraminsäure, Säureschutzgruppe Acetoxymethylester
^O AcNeu5NAc ^{COOMe}	peracetylierte <i>N</i> -Acetylneuraminsäure, Säureschutzgruppe Methylester
Neu5Gc	<i>N</i> -Glycolylneuraminsäure
NMP	Nucleosidmonophosphat
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NPE	1-(2-Nitrophenyl)-ethyl
NTP	Nucleosidtriphosphat
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PE	Petrolether

Abkürzungen und Symbole

PEP	Phosphoenolpyrovat
PLE	Schweineleberesterase (<i>pig liver esterase</i>)
PSA	Polysialinsäure
R_f	<i>ratio of fronts</i>
RNA	Ribonucleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
RP	<i>reversed phase</i>
R_t	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR)
SG	Schutzgruppe
sLe	Sialyl Lewis-Epitop
Smp	Schmelzpunkt
ST	Sialyltransferasen
t	Triplett (NMR)
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
THF	Tetrahydrofuran
Ts	Tosyl
TRPM2	<i>transient receptor potential melastatin 2</i>
U	Uracil
UDP	Uridindiphosphat
Xyl	Xylose

Zusammenfassung

Zuckernucleotide und die entsprechenden Glycosyltransferasen sind an einer Vielzahl von biologisch wichtigen Glycosylierungsprozessen involviert. Speziell Glycane mit einem terminalen Fucose- oder Sialinsäure-Rest sind bei den Glycosylierungsprozessen beteiligt.

Um Informationen über fucosylierte Glycoproteine oder Informationen über die Fucosyltransferaseaktivität zu bekommen, hat sich unter anderem der Einsatz von fluoreszenzmarkierten Substraten bewährt (Abschnitt 2.1.1.3, S. 7ff.). Zur Untersuchung von Inhibitoren von Sialyltransferasen in Zellstudien ist beispielsweise die Verwendung von lipophilen Verbindungen notwendig (Abschnitt 2.1.1.7, S. 15).

Ein wichtiger Vertreter eines regulatorischen Zuckernucleotids ist Adenosindiphosphat-Ribose (ADPR). Dieses ist der potenteste Aktivator des Ionenkanals *transient receptor potential melastatin 2* (TRPM2). Die Aktivierung dieses Ionenkanals steht unter anderem mit Krankheiten in Verbindung, welche durch oxidativen Stress ausgelöst werden. Zur Durchführung von Zellstudien zur Aufklärung des Aktivierungsmechanismus ist auch hier die Verwendung von zellgängigen Derivaten erforderlich (Abschnitt 2.1.2, S. 16ff.).

Die Entwicklung chemischer Synthesestrategien zur Darstellung dieser unterschiedlich funktionalisierten Zuckernucleotide ist somit von großem Interesse.

Zur Darstellung modifizierter Nucleosidmono- und -diphosphatzucker haben sich zwei Synthesestrategien bezogen auf die vielseitige Anwendbarkeit, die hohen Ausbeuten und die kurzen Reaktionszeiten bewährt: zum einen die *cycloSal*-Methode (Abschnitt 2.2.1.1, S. 22f. und Abschnitt 2.2.2.1 S. 25f.) und zum anderen die Darstellung über die Nutzung der Phosphoramiditchemie (Abschnitt 2.2.1.1, S. 21f. und Abschnitt 2.2.2.1, S. 24f.). Das *DiPPro*- und das *TriPPPPro*-Konzept zeigen für die Synthese von lipophilen Nucleosiddi- und -triphosphaten, die Diffusion durch die Zellmembran und die selektive intrazelluläre Freisetzung des entsprechenden Nucleotids sehr gute Ergebnisse (Abschnitt 4.4, S. 93f.).

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung verschiedener Synthesestrategien zur Darstellung funktionalisierter Zuckernucleotide. Die Funktionalisierung sollte zum einen durch die Einführung von Fluoreszenzfarbstoffen mit unterschiedlicher Linkerstruktur und -länge auf GDP-Fucose-Derivate erfolgen. Darüber hinaus sollte eine breite Anwendbarkeit der Methode durch Verwendung eines weiteren Nucleosids gewährleistet werden. Diese Verbindungen sollten in Enzym-Assays hinsichtlich ihrer Substrateigenschaften untersucht werden. Zum anderen sollten CMP-Neu5Ac und ADPR durch die Einführung lipophiler Gruppen modifiziert werden, um eine Zellgängigkeit und eine intrazelluläre Freisetzung dieser Verbindungen zu erreichen. Diese Verbindungen könnten in Zellstudien als potentielle Tools eingesetzt werden. Durch die Verwendung einer Acyloxybenzyl-Maske als lipophile Gruppe zur Maskierung einer Phosphatgruppe bei den ADPR-Derivaten sollte die Erweiterung des *DiPPro*-

und des TriPPPro-Konzeptes auf Zuckernucleotide erfolgen. Die dargestellten Verbindungen sollten in Fluoreszenz-Assays beziehungsweise in chemischen und enzymatischen Hydrolysestudien auf ihre Anwendbarkeit als potentielle biologische Tools hin untersucht werden.

Die erfolgreiche Darstellung von fluoreszenzmarkierten GDP-Fucose-Derivaten mit unterschiedlicher Linkerstruktur und -länge gelang durch die Weiterentwicklung der Syntheseroute von *N. Lunau*^[1] zur Darstellung von ATTO 550-GDP-Fuc. Es wurden zwei unterschiedlich verbrückte fluoreszenzmarkierte GDP-Fucose-Derivate, ein FITC-GDP-Fuc-Derivat und ein FAM-GDP-Fuc-Derivat sowie ein fluoreszenzmarkiertes UDP-Fucose-Derivat in Ausbeuten bis 75% dargestellt (Abschnitt 4.1.1.2, S. 40ff.). Diese wurden in Fucosyltransferase-Studien, welche von *K. Seelhorst* aus der Arbeitsgruppe von *Prof. U. Hahn*, Universität Hamburg, durchgeführt wurden, untersucht (Abschnitt 4.1.2 S. 47ff.). Es wurden eine bakterielle und drei humane Fucosyltransferasen als Enzyme sowie drei Glycoproteine verwendet. Es wurde gezeigt, dass sowohl die Linkerstruktur als auch die Linkerlänge einen Einfluss auf die Substraterkennung haben. Das FITC-GDP-Fuc-Derivat zeigte die besten Substrateigenschaften, wohingegen das FAM-GDP-Fuc-Derivat kein Substrat der verwendeten Fucosyltransferasen war (s. S. 49ff.). Das FITC-GDP-Fuc-Derivat könnte daher sehr gut für weitere biochemische Untersuchungen geeignet sein.

Zur Erhöhung der Lipophilie von CMP-Neu5Ac sollten Esterfunktionen eingebracht werden, da diese durch Esterasen gespalten werden können. Die Darstellung von zwei vollständig geschützten CMP-Neu5Ac-Derivaten erfolgte durch Verwendung der Phosphoramiditchemie. Zur Blockierung der Hydroxylgruppen wurden Acetylgruppen und zur Maskierung der negativen Ladung am Phosphat wurden zwei unterschiedliche Acyloxybenzylmasken verwendet. Die benötigten Kupplungsbausteine wurden jeweils über drei Stufen in sehr guten Ausbeuten erhalten (Abschnitt 4.2.1.1 S. 55ff.). Anschließend wurde erstmalig ein bioreversibel und vollständig geschütztes lipophiles CMP-Neu5Ac-Derivat in einer Ausbeute von 30% synthetisiert (Abschnitt 4.2.1.2, S. 57ff.). Bei einem zweiten, vollständig geschützten Derivat war die Abtrennung aller Nebenprodukte nicht möglich. Die chemischen Hydrolysestudien bei pH 7.3 der beiden lipophilen Verbindungen zeigten allerdings, dass die Derivate chemisch nicht stabil sind. Es wurde sehr schnell die glycosidische Bindung gespalten (Abschnitt 4.2.2, S. 61ff.). Als Tools für Zellstudien sind diese Verbindungen somit nicht geeignet. Neben den vollständig geschützten Derivaten wurden des Weiteren nicht vollständig geschützte CMP-Neu5Ac-Derivate, die noch die negative Ladung am Phosphat trugen, dargestellt. (Abschnitt 4.2.3, S. 67ff.). Als Schutzgruppen an der Säurefunktion der Neuraminsäure wurden zum einen ein Methylester und zum anderen ein Acetyloxymethylester verwendet. Zur Darstellung des Neuraminsäure-Kupplungsbausteines mit dem Acetyloxymethylester wurde ein dreistufiges Syntheseprotokoll entwickelt. Die Darstellung

gelang in sehr guten Ausbeuten (Abschnitt 4.2.3.1, S. 69f.). Die Synthese der lipophilen Derivate erfolgte durch Verwendung der *cycloSal*-Technik nach Optimierung der von S. Wolf^[2] entwickelten Syntheseroute zur Darstellung von CMP-Neu5Ac. Das lipophile CMP-Neu5Ac-Derivat mit dem Methylester wurde in einer Ausbeute von 39% erhalten und das lipophile CMP-Neu5Ac-Derivat mit dem Acetoxymethylester in einer Ausbeute von 20% (Abschnitt 4.2.3.2, S. 71ff.). Die Reinigung der Verbindungen erwies sich als sehr aufwendig. Die enzymatischen Hydrolysestudien mit PLE wurden mittels HPLC-MS und HR-MS analysiert. Die Hydrolysestudie der lipophilen Verbindung mit dem Methylester (Abschnitt 4.2.4.1, S. 80ff.) zeigte, dass das Molekül vermutlich kein Substrat der verwendeten Esterase ist. Im Gegensatz hierzu scheint das lipophile Derivat mit dem Acetoxymethylester ein Substrat der Esterase zu sein (Abschnitt 4.2.4.2, S. 83ff.). Es wurde jedoch kein eindeutiges Hydrolyseergebnis erhalten, so dass noch weitere Untersuchungen notwendig sind (Abschnitt 4.2.4.2, s. S. 87f.).

Für die Darstellung lipophiler ADPR-Derivate war die Entwicklung einer effektiven Synthesestrategie nötig. Es sollte zum einen ein Derivat dargestellt werden, bei dem nur die negative Ladung einer Phosphatgruppe mit einer Acyloxybenzyl-Gruppe maskiert ist. Zum anderen sollten, bezogen auf die Riboseeinheit, anomenreine ADPR-Derivate synthetisiert werden. Bei diesen sollten zusätzlich die Hydroxylgruppen mit Acetylgruppen verestert werden. Die Darstellung der NDP-Zucker erfolgte durch Verwendung der Phosphoramiditchemie. Für diese Kupplung waren die Synthesen der Zuckerphosphate sowie der nicht-symmetrischen Phosphoramidite nötig. Die Darstellung eines ADPR-Derivates, das nur eine AB-Maske an dem α -Phosphat trägt und sonst ungeschützt war, gelang nicht. Die Reinigung des benötigten nicht-symmetrischen Phosphoramidites war nicht möglich (Abschnitt 4.4.1.1, S. 98f.). Des Weiteren war die Synthese des ebenfalls benötigten Ribosephosphates nicht erfolgreich (Abschnitt 4.4.1.4, S. 104ff.). Erfolgreich allerdings gelang die Entwicklung eines Syntheseweges zur Darstellung lipophiler anomenreiner ADPR-Derivate (Abschnitt 4.4.1.5, S. 111ff.). Es war sowohl die Synthese anomenreiner, peracetylierter Ribosephosphate in sehr guten Ausbeuten (Abschnitt 4.4.1.4, S. 104ff.) als auch die Darstellung des benötigten nicht-symmetrischen Phosphoramidites in sehr guten Ausbeuten (Abschnitt 4.4.1.2, S. 100f.) erfolgreich. Die erstmalige Darstellung von lipophilen ADP α - und - β -R-Derivaten gelang in guten Ausbeuten von 43% bzw. 56%. Die chemische Hydrolysestudie der β -Verbindung zeigte, dass diese Verbindung eine hohe chemische Stabilität bei pH 7.3 hat (Abschnitt 4.4.2.1, S. 115f.). Die enzymatische Hydrolysestudie der β -Verbindung, welche mittels HPLC-MS und HR-MS analysiert wurde, zeigte, dass erwartete Intermediate und ADPR gebildet wurden (Abschnitt 4.4.2.2, S. 116ff.). Durch die Freisetzung von ADPR waren die Erweiterung der DiPPro-/TriPPro-Konzepte sowie die Darstellung eines potentiellen Tools für TRPM2 Studien erfolgreich.

Abstract

Sugar nucleotides and the corresponding glycosyltransferases are involved in many biologically important glycosylation processes. In particular glycans containing a terminal fucose or sialic acid residue are implicated in these glycosylation processes.

The use of fluorescently labeled substrates is one option to visualize glycans or to gain information about enzyme activity (chapter 2.1.1.3, p. 7ff.). The application of lipophilic compounds is necessary for doing research on for example sialyltransferase inhibitors in cell studies (chapter 2.1.1.7, p. 15).

Adenosine diphosphate ribose (ADPR) is one important example for a regulatory sugar nucleotide. ADPR is the most potent activator of the ion channel *transient receptor potential melastatin 2* (TRPM2). The activation is inter alia correlated with diseases caused by reactive oxygen species. The use of lipophilic compounds is also necessary for TRPM2 studies (chapter 2.1.2, p. 16ff.).

Thus, the development of chemical syntheses towards such functionalized compounds is of great interest.

Two synthesis strategies for the preparation of modified nucleoside monophosphate and nucleoside diphosphate sugars have been proven to be valuable concerning the versatile application, the high yields and the short reaction times: the *cycloSal*-method (chapter 2.2.1.1, p. 22f. and chapter 2.2.2.1 p. 25f.) and the preparation by using phosphoramidite reagents (chapter 2.2.1.1, p. 21f. and chapter 2.2.2.1 p. 24f.). The *DiPPro*- and *TriPPPPro*-approaches show very good results concerning the synthesis of lipophilic nucleoside diphosphates and triphosphates, the diffusion through the cell membrane and the selective intracellular release of the corresponding nucleotide (chapter 4.4, p. 93 f).

Developing different synthesis routes for the synthesis of functionalized sugar nucleotides was one aim of this thesis. The functionalization ought to be accomplished on the one hand by introducing fluorescent dyes with different linker structures and linker lengths to GDP-Fucose derivatives. Furthermore, a broad application of this method ought to be ensured by using a second nucleoside. The substrate ability of these compounds ought to be investigated in enzyme assays. On the other hand CMP-Neu5Ac and ADPR ought to be modified by introducing lipophilic groups and thereby achieving cell permeability and the intracellular release of these compounds. These analogs could be used as potential tools in future cell studies. The extension of the *DiPPro*- and *TriPPPPro*-approaches to nucleoside sugars ought to be performed by using an acyloxybenzyl mask for the protection of one phosphate group of ADPR. The use of the synthesized compound as potential biological tools ought to be investigated by either fluorescent assays or chemical and enzymatic hydrolysis studies respectively.

The successful synthesis of fluorescently labeled GDP-Fucose derivatives with different linker structures and linker lengths was enabled by further developing the synthesis route developed by *N. Lunau*^[1] for the preparation of an ATTO 550 labeled GDP-Fucose derivative. Two differently fluorescently labeled GDP-Fucose derivatives were synthesized in yields up to 75%: a FITC-labeled GDP-Fucose derivative and a FAM-labeled GDP-Fucose derivative (chapter 4.1.1.2, p. 40ff.). These compounds have been investigated in fucosyltransferases studies accomplished by *K. Seelhorst* from the working group of *Prof. U. Hanh*, University Hamburg, (chapter 4.1.2, 47ff.). One bacterial and three human fucosyltransferases were used as enzymes in the performed studies as well as three glycoproteins. The data showed that the linker structure or linker length has an influence on substrate recognition. The FITC-labeled GDP-Fucose derivative was accepted best by the tested fucosyltransferases whereas the FAM-labeled GDP-Fuc derivative has been no substrate of the used fucosyltransferases (see p. 49ff.). Therefore, the FITC labeled derivative might be useful in further biochemical studies.

Ester functions ought to be used to increase the lipophilicity of CMP-Neu5Ac, since they can be cleaved by esterases. The preparation of two fully protected CMP-Neu5Ac derivatives was done by phosphoramidite reagents. Acetyl groups were used for the protection of the hydroxyl functions and the negatively charged phosphate was protected with a different acyloxybenzyl mask each. The synthesis of the required building blocks was achieved each in high yields by a three step synthesis route (chapter 4.2.1.1, p. 55ff.). Afterwards, the synthesis of a bioreversible and fully protected CMP-Neu5Ac derivative was accomplished for the first time in a yield of 30% (chapter 4.2.1.2, p. 57ff.). The removal of all side products by a second fully protected derivative was not possible. Chemical hydrolysis studies (pH 7.3) of both compounds revealed a very low chemical stability of the fully protected compounds. The glycosidic bond was cleaved almost immediately (chapter 4.2.2, p. 61ff.). Thus, these compounds are unsuitable as lipophilic tools for cell studies. Furthermore, not fully protected CMP-Neu5Ac derivatives with an unprotected phosphate group were synthesized (chapter 4.2.3, p. 67ff.). The acid function was either protected with a methyl ester or an acetyloxymethyl ester. For the preparation of the needed neuraminic acid derivative containing the acetyloxymethyl ester a three step synthesis protocol has been developed. The synthesis was accomplished in high yields (chapter 4.2.3.1, p. 69ff.). The successful synthesis of the not fully protected CMP-Neu5Ac derivatives was performed by using the *cycloSal* method and by optimizing the synthesis protocol of *S Wolff*^[2] for the preparation of CMP-Neu5Ac. The lipophilic compound with the methyl ester was obtained in a yield of 39% and the lipophilic compound containing the acetyloxymethyl ester was obtained in a yield of 20% (chapter 4.2.3.2, p. 71ff.). The purification was found to be rather complicated. The enzymatic hydrolysis studies with PLE were analyzed with HPLC-MS and HR-MS. The

hydrolysis study of the methyl protected derivative (chapter 4.2.4.2, p. 80ff.) revealed that this compound is probably no substrate of the used esterase. On the contrary, the acetyloxymethyl protected derivative is most likely a substrate of the used esterase. The hydrolysis study showed an inconclusive result. Thus, further research needs to be done here (chapter 4.2.4.2, p. 88ff.).

For the formation of lipophilic ADPR derivatives the development of an effective synthesis was required. On the one hand a derivative bearing only an acyloxybenzyl group as a masking unit to protect the negative charge of one phosphate ought to be synthesized. On the other hand the synthesis of lipophilic and, with respect to the ribose moiety, anomerically pure derivatives ought to be accomplished. In this case the hydroxyl functions ought to be protected with acetyl groups. The formation of the NDP-sugars was done by using phosphoramidite chemistry. At first, the synthesis of the required sugar phosphates as well as the non-symmetrical phosphoramidites was required for the coupling to the NDP-sugars. The synthesis of an ADPR derivative bearing an AB mask only at the α -phosphate was not possible. The purification of the needed phosphoramidite has not been achieved (chapter 4.4.1.1, p. 98f.) as well as the formation of the also required ribose phosphate has not been possible yet (chapter 4.4.1.4, p. 104ff.). The development of a synthesis route towards the formation of lipophilic and anomerically pure ADPR derivatives was successful (chapter 4.4.1.5, p. 111ff.). The syntheses of anomerically pure and peracetylated ribose phosphates was achieved in high yields (chapter 4.4.1.4, p. 104ff) as well as the formation of the required non-symmetrical phosphoramidite in very good yields (chapter 4.4.1.2, p. 100ff.). The first successful synthesis of ADPR α - and - β -R-derivatives was performed in good yields of 43% and 56% respectively. The chemical hydrolysis study at pH 7.3 of the β -compound revealed a great stability of this compound (chapter 4.4.2.1, p. 115f.). The enzymatic hydrolysis study with PLE of the β -compound was analyzed by HPLC-MS and HR-MS. The data showed that expected intermediates as well as ADPR **21** were formed (chapter 4.4.2.2, p. 116ff). Since ADPR was released by the enzyme it can be concluded that the extension of the DiPPro-/TriPPPro-concepts as well as the formation of a potential tool for TRPM2 studies were successful.

1 Einleitung

Proteine, DNA, RNA und Glycane sind die vier Biopolymerklassen, welche für alle Formen des Lebens von essenzieller Bedeutung sind. Glycane unterscheiden sich von den anderen Drei auf mehrere Weisen. Zum einen ist die Biosynthese von Glycanen templatunabhängig und kann nicht genau vorhergesagt werden, zum anderen können Glycane verzweigt vorliegen. Sie tragen diverse Modifikationen und haben eine deutlich größere strukturelle Vielfalt.^[3-5] Der Informationsgehalt von Glycanen ist auf Grund dieser strukturellen Vielfalt sehr groß. Den „Glycancode“ zu verstehen und Beziehungen zu verschiedenen Krankheitsbildern zu entschlüsseln ist von großem Interesse.^[6-7] Glycosylierungen sind somit eine der wichtigsten und auch komplexesten posttranslationalen Modifikationen.^[1,8] Glycokonjugate spielen eine zentrale Rolle bei einer Vielzahl von biologisch relevanten Prozessen, wie beispielsweise der Zell-Zell-Erkennung, der Signaltransduktion und der Immunantwort.^[9] Des Weiteren sind sie von Bedeutung bei der Entwicklung von Embryonen, dem Gehirn und dem Nervensystem.^[10] Zudem ändert sich die Struktur der Glycane mit dem Beginn einer Krebserkrankung oder einer Entzündung.^[6-7]

Als Glycosylierung wird der enzymatische Prozess bezeichnet, bei dem eine glycosidische Bindung eines Saccharids zu einem weiteren Saccharid, Protein oder Lipid ausgebildet wird. Im Allgemeinen können Glycokonjugate in fünf Hauptklassen eingeteilt werden (Abb. 1).

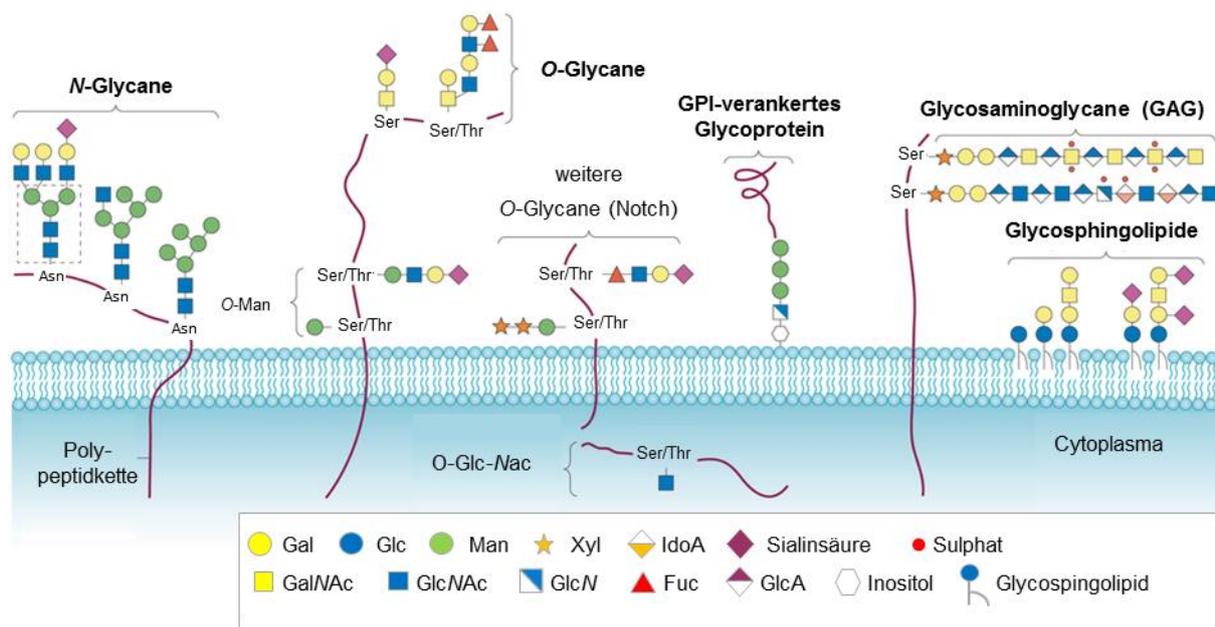


Abb. 1: Fünf Hauptklassen der Glycokonjugate (bearbeitet nach S.S. *Pinho*, C. A. *Reis*).^[11]

N-verbrückte Glycane sind über eine β -glycosidische Bindung zwischen einem GlcNAc-Rest und dem Stickstoffatom eines Asparaginrestes an ein Protein gebunden. Etwas weniger weit verbreitet sind *O*-verbrückte Glycane. Diese sind über eine α -glycosidische Bindung zwischen beispielsweise GalNAc und der Hydroxylgruppe eines Serin- oder Threoninrestes

ebenfalls mit einem Protein verbunden. Glycophosphatidylinositol (GPI)-Anker „befestigen“ Glycoproteine fest mit der extrazellulären Seite der Plasmamembran und Glycosaminoglycane (GAGs) sind lineare Co-polymere, die über einen Serinrest mit einem Proteoglycan verbrückt sind. Als letztes sind Glycolipide zu nennen, welche einen Lipidträger haben. In der Abbildung 1 sind als Beispiel Sphingolipide gezeigt. Diese sind eine Hauptkomponente der äußeren Hülle der Plasmamembran.^[6,11-13]

Eine Schlüsselrolle bei der Biosynthese von Glycanen spielen Zuckernucleotide, da sie als Glycosyldonoren fungieren. Zuckernucleotide wurden von *L. F. Leloir* entdeckt und können in zwei Klassen eingeteilt werden: die Nucleosidmonophosphat-Zucker (NMP-Zucker) und die Nucleosiddiphosphat-Zucker (NDP-Zucker) (Abb. 2). Die meisten der natürlich vorkommenden Zuckernucleotide sind NDP-Zucker.^[14-16]

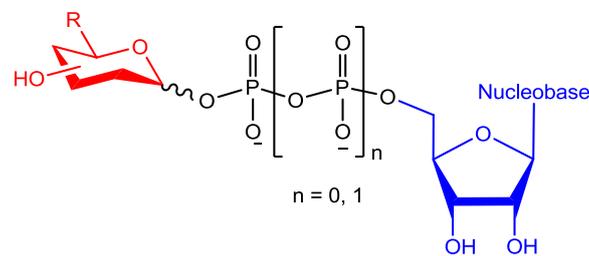


Abb. 2: Allgemeiner Aufbau von NMP- und NDP-Zuckern: Glycosylrest (rot), Phosphat-/Pyrophosphateinheit (schwarz), Nucleosidrest (blau).

Zuckernucleotide sind aus drei funktionellen Einheiten aufgebaut: einem Glycosylrest, einer Phosphat-/Pyrophosphateinheit und einem Nucleosidrest. Der Glycosylrest wird für den enzymatischen Transfer durch die Phosphatbindung am anomeren Zentrum aktiviert. Katalysiert wird diese Reaktion meist von Glycosyltransferasen, denen der Nucleosidrest, neben dem Glycosylrest, als zusätzliches Erkennungsmerkmal dient.^[12]

Glycosyltransferasen wurden von *L. F. Leloir* in die *Leloir*-Glycosyltransferasen und die *Nicht-Leloir*-Transferasen eingeteilt. Die *Leloir*-Glycosyltransferasen verwenden als Substrate Zuckernucleotide, wohingegen *Nicht-Leloir*-Transferasen Zuckerphosphate oder Saccharide als Substrate nutzen.^[12,15] Die *Leloir*-Glycosyltransferasen katalysieren die Übertragung eines Monosaccharids von einem Zuckernucleotid auf eine Hydroxylgruppe der vielen möglichen Akzeptorsubstrate. Mögliche Akzeptorsubstrate sind zum einen nicht-reduzierende Enden von wachsenden Oligosaccharidketten, zum anderen kann es sich dabei um Aglycons (wie beispielsweise Lipide oder Proteine) handeln. Die Übertragung eines Glycosylrestes kann sowohl unter Inversion als auch unter Retention der Konfiguration am anomeren Zentrum des Zuckers erfolgen.^[17-19] Bei dem Transfer eines Monosaccharidrestes, von beispielsweise einem NDP-Zucker, wird die energiereiche Bindung zwischen dem anomeren Zentrum des Glycosylrestes und dem β -Phosphat unter Freisetzung des Nucleosiddiphosphates gespalten. Von den Säugetier-Glycosyltransferasen werden lediglich neun verschiedene Zuckernucleotide als Glycosyldonoren zum Aufbau von Glycokonjugaten

genutzt: UDP-Glc, UDP-GlcNAc, UDP-GlcA, UDP-Gal, UDP-GalNAc, UDP-Xyl, GDP-Fuc, GDP-Man und CMP-Neu5Ac.^[19-21]

Glycosyltransferasen bzw. die entsprechenden Glycoproteine spielen auch bei verschiedenen Krankheiten wie Entzündungen^[22], Infektionen^[23] und Krebs^[6] eine entscheidende Rolle. Bereits aufgeklärt wurde beispielsweise, dass eine stärkere Präsenz von sialyl-Lewis X (sLe^x)-Strukturen direkt mit der Metastasierung verschiedener Tumore in Verbindung steht. Diese Epitope dienen in Zelladhäsionsprozessen als Liganden für Selektine.^[24-25] An der terminalen Position des Glycons befinden sich Fucose und Sialinsäuren.^[26] Glycosyltransferasen sind an der Biosynthese der sLe^x-Epitope beteiligt. Es wird angenommen, dass es aufgrund einer Überexpression von diesen Enzymen zu der verstärkten Anwesenheit dieser Epitope kommt.^[27-30] Sialinsäuren sind nicht nur terminale Saccharide bei sLe^x-Strukturen, sondern sie sind ebenfalls bei der Entwicklung von Embryonen von großer Bedeutung. Eine genetische Interferenz bei der Biosynthese von Sialoglykokonjugaten führt bei Mäusen zum Beispiel zum Tod von Embryonen.^[2,31]

Neben den Zuckernucleotiden, die an dem Aufbau von Glycanen beteiligt sind, gibt es auch Zuckernucleotide, die bei intrazellulären regulatorischen Prozessen eine zentrale Rolle einnehmen. Adenosindiphosphat-Ribose (ADPR) aktiviert beispielsweise den Plasmamembran-Kationenkanal, *transient receptor potential melastatin 2* (TRPM2), wodurch Calcium und Natrium in die Zelle gelangen können. Calcium-Signaltransduktionsmechanismen sind weit verbreitet in Tier- und Pflanzenzellen. Das Einströmen von Calcium in die Zelle durch TRPM2 wurde für viele physiologische und pathologische Prozesse wie die Insulinsekretion, pro-inflammatorische Cytokinproduktion, Zellreifung und Ca²⁺-vermitteltem Zelltod beschrieben. ADPR wird auf drei bekannten Wegen sowohl extra- als auch intrazellulär aus Nicotinamidadenindinucleotid (NAD) gebildet.^[32-33] Zwei der intrazellulären Bildungsmechanismen werden durch reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* ROS) aktiviert.^[33-34] Krankheiten wie autoimmune Erkrankungen, Diabetes Mellitus und neurodegenerative Störungen können durch oxidativen Stress ausgelöst werden, wodurch ADPR und die Aktivierung von TRPM2 durch ADPR mit diesen Krankheiten in Verbindung stehen.^[35-38]

Glycosyltransferasen und somit auch Zuckernucleotide spielen, wie an den Beispielen gezeigt, bei der Biosynthese von ganz unterschiedlichen Glycanen oder bei Regulationsprozessen eine Schlüsselrolle. Daher ist die chemische Darstellung von Derivaten der natürlich vorkommenden Zuckernucleotide, wie zum Beispiel speziell markierten NDP-Zuckern oder zellgängigen Zuckernucleotiden, von großer Bedeutung. Mittels dieser modifizierten Zuckernucleotide könnten genauere Informationen über die Aktivität der entsprechenden Glycosyltransferasen erhalten werden, Proteine markiert und Zellstudien durchgeführt werden. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, effektive Synthesestrategien zur Darstellung von Zuckernucleotid-Derivaten zu entwickeln.

2 Kenntnisstand

2.1 Biochemischer Nutzen von Zuckernucleotid-Derivaten

2.1.1 Zuckernucleotide für den terminalen Glycosylierungsschritt von Glycanen

Glycane mit terminalen Fucose- oder Sialinsäure-Resten übernehmen eine fundamentale Rolle bei sowohl physiologischen als auch pathologischen Prozessen wie beispielsweise bei Zell-Zell-Interaktionen, Entzündungen, Fertilisation, viralen Infektionen und bösartigen Krebserkrankungen.^[31,39-41] Da, wie in der Einleitung erwähnt, Zuckernucleotide eine Schlüsselrolle bei der Biosynthese von Glycanen spielen, sind hier die Darstellung modifizierter Guanosindiphosphat- β -L-fucose (GDP-Fuc)-Derivate bzw. Cytidinmonophosphat-*N*-acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac)-Derivate von zentraler Bedeutung, um die resultierenden Glycane oder die beteiligten Enzyme eingehender untersuchen oder um Zellstudien durchführen zu können.

2.1.1.1 Fucosylierung von wichtigen Epitopen

Der Transfer eines L-Fucose-Restes von Guanosindiphosphat- β -L-fucose (GDP-Fuc) **1** (Abb. 3) auf mögliche Akzeptoren, beispielsweise Oligosaccharide, Glycoproteine oder Glycolipide, wird von Fucosyltransferasen (FucTs) katalysiert. Die dabei möglichen Verknüpfungen sind α 1,2-, α 1,3-, α 1,4- oder α 1,6-Verknüpfungen und erfolgen unter Inversion der Konfiguration am Anomerenzentrum.^[42-43] Zusätzlich kann eine Fucosylierung als O-Fucosylierung an Proteinen über Serin oder Threonin erfolgen.^[42,44]

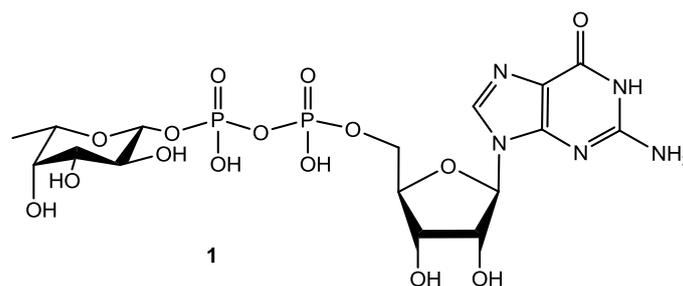


Abb. 3: Guanosindiphosphat- β -L-fucose (GDP-Fuc) **1**.

Humane Glycokonjugate mit einem terminalen L-Fucose-Rest wie die Blutgruppen ABH-Antigene und die ähnlichen Lewis-Antigene können entweder an Zellmembranen gebunden oder in biologische Flüssigkeiten abgegeben werden.^[45-46] Bei der Biosynthese der biologisch wichtigen Glycane, wie zum Beispiel den Lewis- und Sialyl Lewis-Epitopen Lewis X (Le^x) **2** und Sialyl-Lewis X (sLe^x) **3** (Abb. 4) sowie Sialyl-Lewis A (sLe^a), Lewis B (Le^b) und Sialyl-

Lewis B (sLe^b), ist die Fucosylierung häufig der letzte Glycosylierungsschritt.^[43] Diese Epitope sind aus verschiedenen Gründen von zentraler Bedeutung. Sialyl-Lewis-Epitope sind beispielsweise eng mit der Progression und der Metastasierung einer Vielzahl von Krebserkrankungen wie Lungen-, Pankreas- oder Magenkrebs verbunden.^[47] Hierbei ist, wie in der Einleitung erwähnt, die Überexpression von sLe^x hervorzuheben.^[24-25] Das Epitop Le^b hingegen wird auf humanen gastrischen Epithelzellen exprimiert und dient als ein Rezeptor für das Gram-negative Bakterium *Helicobacter pylori* (HP). HP ist eines der Hauptverursacher von chronischer Gastritis und verschiedenen Magengeschwüren. Darüber hinaus ist es an der Bildung von Magen-Adenokarzinomen und Magen-Lymphomen beteiligt.^[47-49] An dieser Stelle ist ebenfalls die Relevanz von Sialinsäuren hervorzuheben, wie an den Sialyl-Lewis-Epitopen deutlich wird.

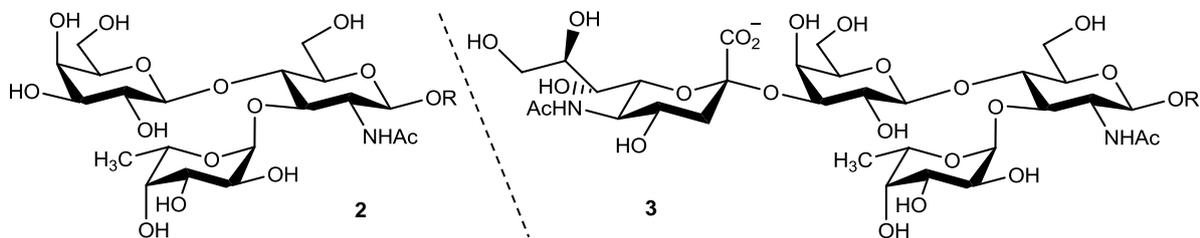


Abb. 4: Beispiele für Lewis und Sialyl-Lewis-Epitope: Lewis X (Le^x) **2** (links), Sialyl-Lewis X (sLe^x) **3** (rechts).

In Prokaryoten befinden sich L-Fucose-Reste hauptsächlich in Polysacchariden. Es wird angenommen, dass diese zur Mimikry, Adhäsion, Lokalisation und Modulation der Wirts-Immunantwort dienen.^[42,45]

2.1.1.2 Fucosyltransferasen

Die humanen Fucosyltransferasen werden abhängig von der Verknüpfungsart in vier Subfamilien eingeteilt: α 1,2-, α 1,3-/ α 1,4-, α 1,6-FucTs und O-FucTs. Die Fucosyltransferasen FucT I, FucT II und Sec1 transferieren Fucose mit einer α 1,2-Verknüpfung. Akzeptoren sind die terminale Gal β -Einheit von Vorläuferverbindungen der Typ II Gal β 1,4GlcNAc- oder Typ I Gal β 1,3GlcNAc-Strukturen (LN-Strukturen). Hierüber wird das Blutgruppen H-Antigen gebildet.^[42,45]

Die Fucosyltransferasen FucT III-VII und FucT IX verknüpfen alle α 1,3. Zusätzlich können FucT III und FucT V auch α 1,4-verknüpfen. Diese sechs FucTs lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die drei Fucosyltransferasen FucT III, FucT V und FucT VI haben eine sehr ähnliche Sequenz, wohingegen die anderen drei Fucosyltransferasen FucT IV, FucT VII und FucT IX eine deutlich heterogenere Gruppe darstellen. Als Akzeptoren dieser FucTs dienen unter anderem LN-Einheiten, um das Le^x-Epitop und analoge Strukturen zu bilden. Allerdings fucosylieren die FucTs unterschiedliche Positionen der LN-Einheiten.^[42,50-51] Die

Fucosyltransferase FucT VII fucosyliert α 2,3-sialylierte Typ II LN-Strukturen. Der Sialylierungsgrad spielt hier eine entscheidende Rolle. Befinden sich keine Sialyleinheiten auf dem Akzeptor wird dieser kaum bis gar nicht von der FucT VII fucosyliert. Bei den Fucosyltransferasen FucT VI und FucT IX ist dies genau anders herum. Die drei homologen Fucosyltransferasen FucT III, FucT V und FucT VI reagieren sowohl mit sialylierten als auch mit nicht-sialylierten LN-Einheiten. Am vielseitigsten sind die FucT III und FucT V. Diese können mit den Typ II LN- und Typ I LN-Einheiten reagieren. Weitere Akzeptoren sind LN-Einheiten von Polylactosaminen. Hier können Fucosylierungen sowohl am reduzierenden und nicht-reduzierenden Ende als auch mittig erfolgen. FucT VII und FucT IX fucosylieren *N*-Acetyllactosamine an dem nichtreduzierenden Ende von Polylactosaminen. Wie auch bei der Darstellung der Lewis-Strukturen präferiert die FucT VII hierbei α 2,3-sialylierte LN-Einheiten, wohingegen FucT IX neutrale (nicht sialylierte) Polylactosamine bevorzugt. Sowohl die FucT IV als auch die FucT V fucosylieren bevorzugt die mittigen *N*-Acetyl-lactosamin-Einheiten von sialylierten sowie nicht-sialylierten Polylactosaminen. Der Unterschied ist, dass FucT V das reduzierende Ende von LN-Einheiten bevorzugt und FucT IV mittlere LN-Einheiten. Die Fucosyltransferasen FucT III und FucT VI fucosylieren ähnliche innere LN-Einheiten von kurzen neutralen Polylactosaminen.^[50]

Die FucT IV und FucT VII sind die einzigen FucTs, welche in Leukozyten exprimiert werden. Hier sind sie für die Produktion von Selektinen verantwortlich. FucT VII ist eine der Hauptfucosyltransferasen, welche an der Bildung des sLe^X beteiligt ist. FucT IX ist hoch konserviert zwischen Säugetieren und weist die höchste Expressionsrate im Gehirn sowohl beim ausgewachsenen als auch beim sich entwickelnden Gehirn auf.^[42,50,52] Die resultierenden Produkte (s)Le^X und analoge Strukturen der α 1,3/ α 1,4-FucTs sind an biologischen Prozessen wie Adhäsionsvorgängen, Entzündungsreaktionen und Metastasierung beteiligt.^[50]

FucT VIII katalysiert die Übertragung eines Fucoserestes auf *N*-Acetylglucosamine (GlcNAc) mit einer α 1,6-Verknüpfung.^[42,45] Über die Fucosyltransferasen FucT X und XI ist nicht viel bekannt. Sie gehören wahrscheinlich ebenfalls zu den α 1,3-Fucosyltransferasen. Die Funktion und die Akzeptormoleküle sind nicht bekannt. O-Fucosylierung wird von den O-FucTs O-FucT I und O-FucT II katalysiert.^[42]

Das Gram-negative Bakterium HP besitzt zwei α 1,3-/ α 1,4-FucTs, die die Kohlenhydrate auf den Lipopolysacchariden des Bakteriums fucosylieren. Die Funktionen dieser Glycane sind nicht vollständig geklärt. Da jedoch die Magenschleimhaut hoch glycosylierte Moleküle, welche Lewis-Strukturen enthalten, sekretiert, ist es wahrscheinlich, dass das Bakterium molekulare Mimikry nutzt. Somit spielt die molekulare Mimikry durch Lewis-Antigene höchstwahrscheinlich eine entscheidende Rolle der Pathogenese durch *Helicobacter pylori*.^[42,48-49]

2.1.1.3 Fluoreszenz-basierte Methoden für biochemische Assays mittels modifizierter GDP-Fuc-Derivate

Da sich, wie bereits erwähnt, L-Fucose an der terminalen Position von Glycanen befindet, die an wichtigen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt sind, ist die Erforschung von diesen Glycanen und den beteiligten Enzymen von Interesse. Glycane weisen eine sehr komplexe Struktur auf, weshalb die Synthese, die Isolation und die Charakterisierung eine Herausforderung darstellen. Um die Synthese von Glycanen und die damit verbundenen Schwierigkeiten zu umgehen, ist es von großem Interesse, spezielle Markierungsmethoden zur Visualisierung von fucosylierten Glycanen zu entwickeln.^[41] Des Weiteren ist wenig über die Enzymaktivität der verschiedenen Fucosyltransferasen bekannt und es gibt kaum zuverlässige Assays, die die Identifikation von Inhibitoren für Fucosyltransferasen mittels Hochdurchsatz-Screening (*high-throughput-screening*, HTS) ermöglichen.^[1,53] Der Anspruch an biologische Testsysteme ist sehr hoch. Eine hohe Empfindlichkeit, sehr geringe Reaktionsvolumen, die Verwendung von geringen Mengen an biologischen Reagenzien sowie eine homogene Durchführung sind Grundvoraussetzungen. Sehr geeignet sind fluoreszenz-basierte Assays, da diese sich speziell durch eine hohe Empfindlichkeit sowie eine homogene Durchführung auszeichnen. Der Einsatz von fluoreszenzmarkierten Verbindungen in Bioassays und in HTS-Studien ist daher offensichtlich.^[54] Über die Jahre wurden unterschiedliche Methoden zur Visualisierung von fucosylierten Glycanen, für HTS-Studien von Inhibitor-Bibliotheken und zur Messung der Enzymaktivität entwickelt. Da Fucosyltransferasen eine ausgeprägte Toleranz gegenüber Modifikationen an der C6-Position des Fucoserestes aufweisen,^[43] werden Modifikationen meistens an dieser Stelle in das Molekül eingebracht.

Von *C. D. Rillahan et al.*^[53] wurde ein fluoreszenzmarkiertes GDP-Fuc-Derivat **4**, welches an der C6-Position des Fucoserestes über einen 5-Carboxyfluorescein-NHS-Ester verbrückt ist, hergestellt (Abb. 5). Diese Verbindung wurde zum einen erfolgreich in einem Fluoreszenz-Polarisations- (FP)-Assay für Fucosyltransferasen eingesetzt, wobei das Glycoprotein Fetuin als Akzeptorsubstrat verwendet wurde, zum anderen wurde der FP-Assay zur Identifizierung von Fucosyltransferase-Inhibitoren mittels HTS verwendet. Es ist mit diesem Assay möglich, eine große Anzahl von Verbindungen zu screenen und Inhibitoren zu identifizieren. Um das Anwendungsgebiet auf Zellstudien und *in vivo* Tests zu erweitern, ist die Entwicklung von zellgängigen Inhibitoren nötig, denn Glycosyltransferasen sind Golgi-bezogene Enzyme. Dies bedeutet, dass potentielle Inhibitoren dieser Enzyme die Zellmembran passieren müssen, um an ihren Wirkort zu gelangen.

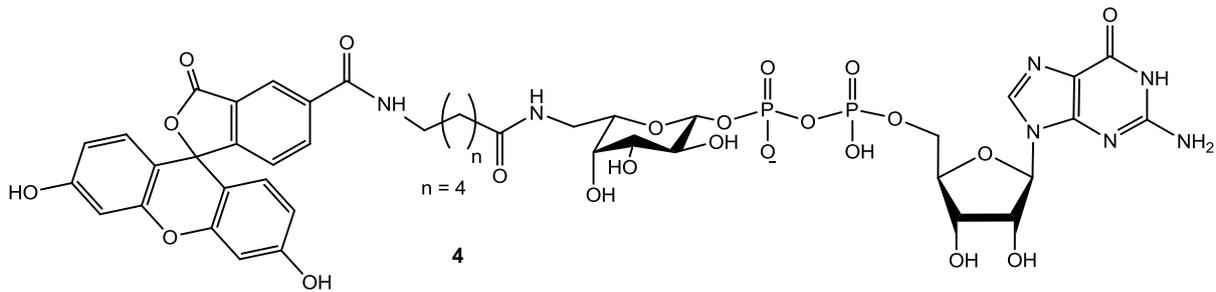


Abb. 5: GDP-^{Fluor}Fuc **4** von *Rillahan et al.*^[53]

Um Glycoproteine *in vitro* und *in vivo* visualisieren zu können, wurden von *M. Sawa et al.* drei Verfahren entwickelt.^[41] Bei einem *in vitro* Assay werden fucosylierte Glycoproteine markiert. Bei den *in vivo* Assays werden fucosylierte Glycokonjugate sowohl auf der Zelloberfläche als auch innerhalb der Zelle markiert. Im Folgenden wird nur näher auf die Markierung von fucosylierten Glycoproteinen eingegangen. Um diese zu visualisieren, werden an C6-Position modifizierte GDP-Fucose-Derivate mit einer Azidgruppe **5** oder einer Acetyleneinheit **6** eingesetzt (Abb. 6).

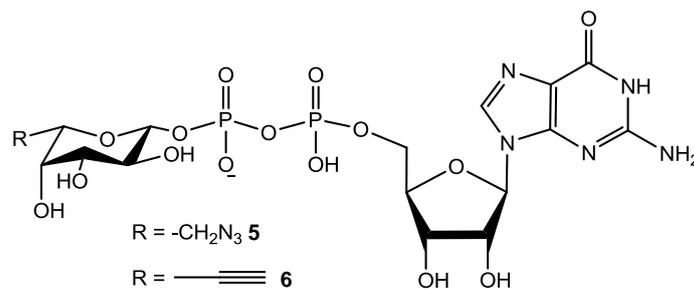


Abb. 6: GDP-Fuc-Derivate mit einer Azidgruppe **5** oder einer Acetyleneinheit **6** nach *Sawa et al.*^[41]

In einem Enzymassay katalysiert die FucT V die Übertragung eines der modifizierten Fucose-Derivate auf das humane α_1 -Acid-Glycoprotein. Nach der Übertragung erfolgt durch Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (*copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*, CuAAC) die Kupplung mit dem entsprechenden Alkin- oder Azid-Fluoreszenzfarbstoff basierend auf 1,8-Naphthalimiden. Bei diesem Verfahren erfolgt die Markierung des Glycoproteins somit erst nach der Übertragung des modifizierten Fucoserestes. Die markierten Proteine werden mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) analysiert und unter Verwendung von UV-Licht visualisiert.

Um die Aktivität von Fucosyltransferasen zu analysieren, können fluoreszenzmarkierte Substrate eingesetzt werden. Von *N. Lunau et al.*^[1] wurden hierzu ein fluoreszenzmarkiertes GDP-Fuc-Derivat **7** als Glycosyldonor und ein fluoreszenzmarkiertes LacNAc-Derivat **8** als Akzeptor synthetisiert. Die katalytische Umsetzung der fluoreszenzmarkierten Verbindungen **7** und **8** erfolgt mit Hilfe der $\alpha_1,3$ -Fucosyltransferase FucT IX zu dem zweifach

markierten Le^x-Derivat **9** (Abb. 7). Die Analyse der enzymatischen Reaktion erfolgt mittels *high-performance thin-layer chromatography* (HPTLC) gekoppelt mit Massenspektrometrie und *dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy* (FCCS). Die Verwendung dieser Analysemethoden erlaubt eine schnelle und zuverlässige Untersuchung der Fucosyltransferaseaktivität. Im Fall der FucT IX ist die Enzymaktivität bei Verwendung des markierten Donorsubstrates **7** um das 1000fache geringer im Vergleich zu dem unmarkierten Donor. Im Fall des Akzeptorsubstrates **8** ist die Aktivität ähnlich der des unmarkierten Akzeptors. Da es sich bei den verwendeten Farbstoffen um ein FRET-Paar handelt, wurde ebenfalls versucht, einen Förster-Resonanz-Elektronen-Transfer (FRET) zu messen. Dies gelang nicht, da der Abstand der Farbstoffe in der Verbindung **9** vermutlich größer als 10 nm ist.

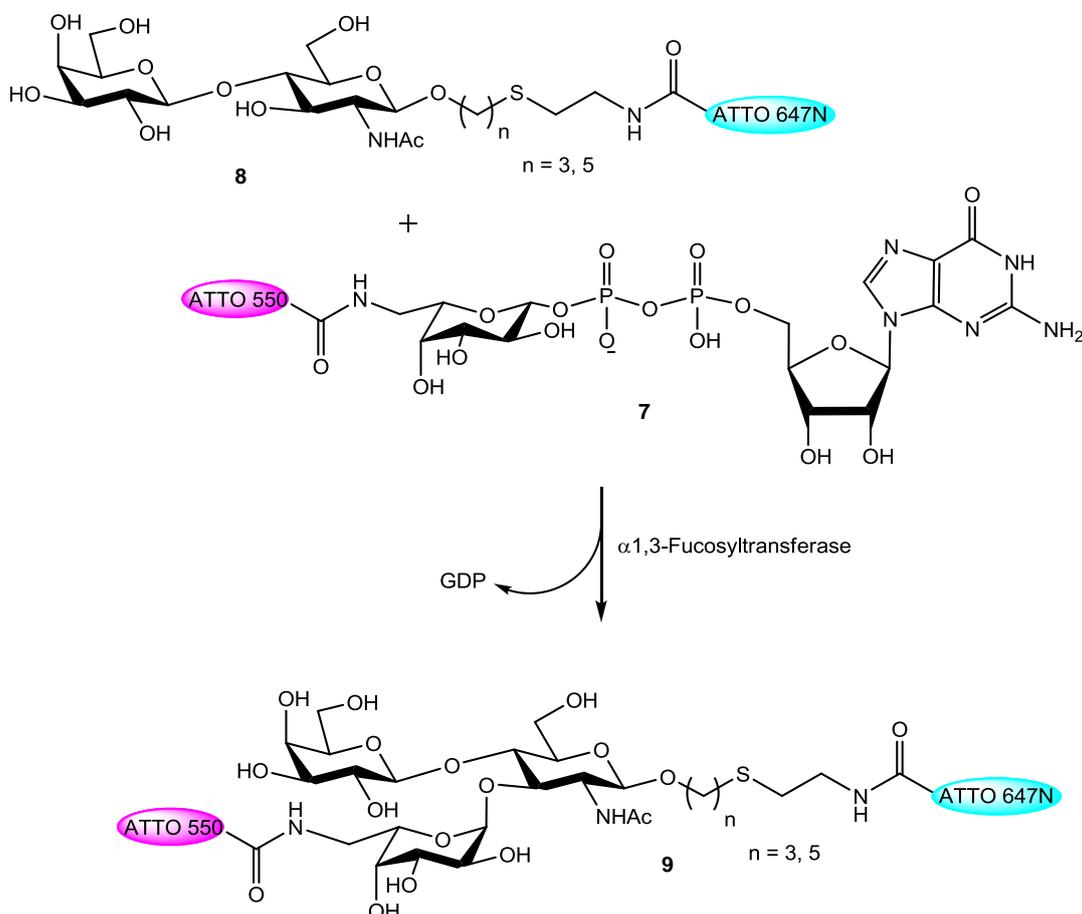


Abb. 7: Bildung des zweifach fluoreszenzmarkierten Lewis X-Derivates **9**, katalysiert von der humanen α 1,3-Fucosyltransferase IX.^[1]

Von *T. Maeda et al.*^[43] wurde eine Methode entwickelt, die ein kontinuierliches Monitoring der Fucosyltransferaseaktivität basierend auf FRET sowie das Screenen nach Inhibitoren ermöglicht. In diesem Rahmen wurden ebenfalls fluoreszenzmarkierte GDP-Fuc-Derivate synthetisiert. Unter anderem das Derivat **10** (Abb. 8), bei dem der Farbstoff über eine Triazoleinheit mit der C6-Position des Zuckerrestes verbrückt ist. Das Derivat **10** ist ein

Inhibitor der verwendeten FucT VI. Der inhibitorische Effekt ist höchstwahrscheinlich auf die enthaltene Triazolkomponente zurückzuführen. Ein weiteres getestetes Molekül, bei dem eine Naphthylmethylgruppe über eine Amidbindung anstatt über eine Triazoleinheit mit der Fucoseinheit der GDP-Fuc verbunden ist, zeigt keine inhibitorischen Effekte.

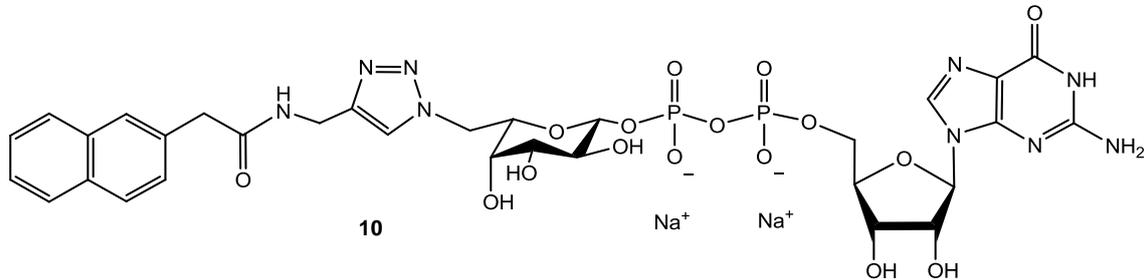


Abb. 8: Fluoreszenzmarkiertes GDP-Fuc-Derivat **10** von *Maeda et al.*^[43]

Die beschriebenen fluoreszenz-basierten Methoden zeigen speziell das Potential von fluoreszenzmarkierten Substraten. Mit diesen Substraten können sowohl Proteine markiert als auch Enzymaktivitäten analysiert werden. Des Weiteren können diese in Assays zur Identifikation von Glycosyltransferase-Inhibitoren eingesetzt werden. Wichtig ist daher die Entwicklung effektiver Synthesestrategien zur Darstellung solch modifizierter Substrate.

2.1.1.4 Vorkommen und Bedeutung von Sialinsäuren

Sialinsäuren gehören zu den wichtigsten und auch ungewöhnlichsten Bausteinen für Glykokonjugate.^[55] Sie sind negativ geladene α -Ketosäuren und aus einem C9-Kohlenstoffgerüst aufgebaut.^[56-58] Aufgrund ihrer negativen Ladung sind Sialinsäuren sowohl an der Bindung und an dem Transport von positiv geladenen Molekülen, unter anderem Ionen, Aminosäuren und Viren, sowie an der Anziehung und Abstoßung von Zellen beteiligt.^[58-59] Als weitere Besonderheit ist zu nennen, dass Sialinsäuren im Vergleich zu den meisten anderen Sacchariden nicht ubiquitär sind. Hauptsächlich kommen Sialinsäuren in Vertebraten und einigen höheren Invertebraten sowie bestimmten Bakterien vor.^[31,39-40] Die Familie der Sialinsäuren besteht aus mehr als 50 strukturell unterschiedlichen *N*- und *O*-Modifikationen der Neuraminsäure sowie 2-Keto-3-desoxynonansäure (KDN) und deren Derivaten.^[40,56-57,59] Die allgemeine Struktur der nicht modifizierten Neuraminsäure (Neu5) **11** sowie der nicht modifizierten KDN **12** sind in Abbildung 9 dargestellt.

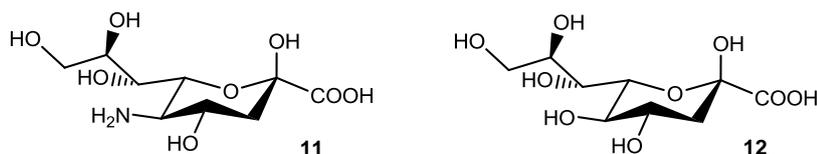


Abb. 9: Struktur der nicht modifizierten Neuraminsäure (Neu5) **11** (links) sowie der nicht modifizierten 2-Keto-3-desoxynonansäuren (KDN) **12** (rechts).

Modifikationen der Neuraminsäure können an der Aminofunktion in Form eines Acetyl- oder Glycolylrestes vorkommen. Die Hydroxylgruppen können methyliert oder mit Acetyl-, Lactyl-, Sulfat- oder Phosphatgruppen verestert sein. Diese Modifikationen können einzeln oder auch mehrfach in einem Molekül auftreten. Durch Deacetylierung der Aminofunktion kann es zur Bildung eines 1,5-Lactams kommen. Daher kommt Neuraminsäure in Vertebraten entweder mit einer *N*-Modifikation oder in einer gebundenen Form vor.^[55-56,59-61] Das Vorkommen dieser vielen Derivate korreliert mit Zelltypen, Zellalter und Gewebetypen. Sialinsäuren kommen in natürlichen Glycokonjugaten nur als α -Anomere typischerweise mit einer von fünf unterschiedlichen Verknüpfungen vor: α 2,3- oder α 2,6-verknüpft zu einem β -D-Galactopyranosylrest, ebenfalls α 2,6-verknüpft zu einem β -D-*N*-Acetylglucosaminrest oder einem β -D-*N*-Acetylgalactosaminrest. Des Weiteren kommen Sialinsäuren mit einer α 2,8-Verknüpfung zu weiteren Sialinsäureresten in Gangliosiden oder in Polysialinsäuren (PSA) vor.^[62-63] Die α -glycosidische Bindung der Neuraminsäuren wird unter anderem von dem Enzym Neuraminidase, auch Sialidase genannt, hydrolysiert. Neuraminidasen kommen in etlichen Gewebetypen vor. Hier regulieren sie den Sialylierungsrad der Zellen. Solch eine Regulierung ist für viele Funktionen entscheidend. Hierzu gehören die Regulation von Halbwertszeiten für zirkulierende Zelle und die Regulation der Apoptose.^[64-65]

Die meisten Säugetiere produzieren hauptsächlich *N*-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) **13** (Abb. 10 links). Eine Ausnahme stellen allerdings die Humanen dar. Diese produzieren keine Neu5Gc sondern hauptsächlich *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) **14** (Abb. 10 rechts). Neu5Ac **14** liegt in der ungebundenen Form bevorzugt als β -Anomer vor. Neu5Ac **14** sowie KDN **12** stellen die biosynthetische Grundlage für alle Vertreter der Sialinsäuren dar.^[59,61,65-66]

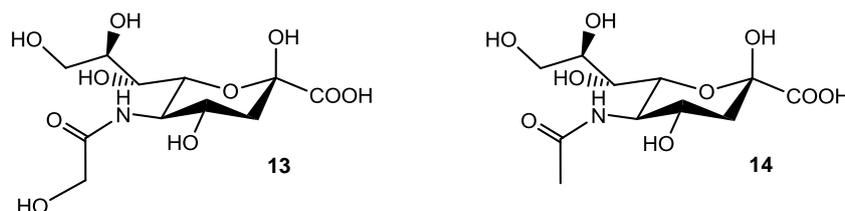


Abb. 10: *N*-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) **13** (links) und *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) **14** (rechts).

In ihrer aktivierten Form liegt *N*-Acetylneuraminsäure als Cytidinmonophosphat-*N*-acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac) **15** ebenfalls als β -Anomer vor (Abb. 11).^[56]

Wie in Abschnitt 2.1.1.1 gezeigt, sind Sialinsäuren ebenfalls an der Synthese wichtiger Glycane wie den sLe-Antigenen beteiligt.

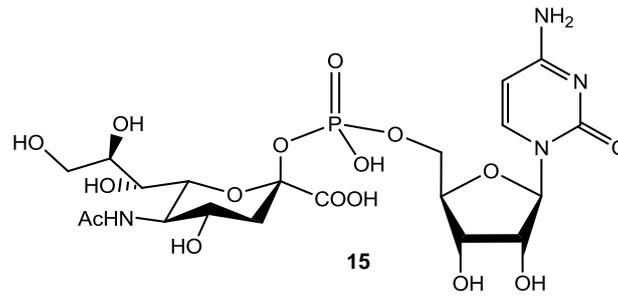


Abb. 11: Cytidinmonophosphat-*N*-acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac) **15**.

Übertragen werden Sialinsäuren von Sialyltransferasen. Zu der Familie der humanen Sialyltransferasen gehören mindestens 18 verschiedene intrazelluläre, Golgi-Membrangebundene Glycosyltransferasen. Mindestens 20 verschiedene Mitglieder zählen zu den Säugetiersialyltransferasen.^[62]

2.1.1.5 Biosynthese von *N*-Acetylneuraminsäure **14** und CMP-Neu5Ac **15**

Sialinsäuren werden im Cytosol, ausgehend von Uridindiphosphat-*N*-acetylglucosamin (UDP-GlcNAc), in vier aufeinander folgenden, enzymatischen Reaktionen synthetisiert (Abb. 12).^[31,67]

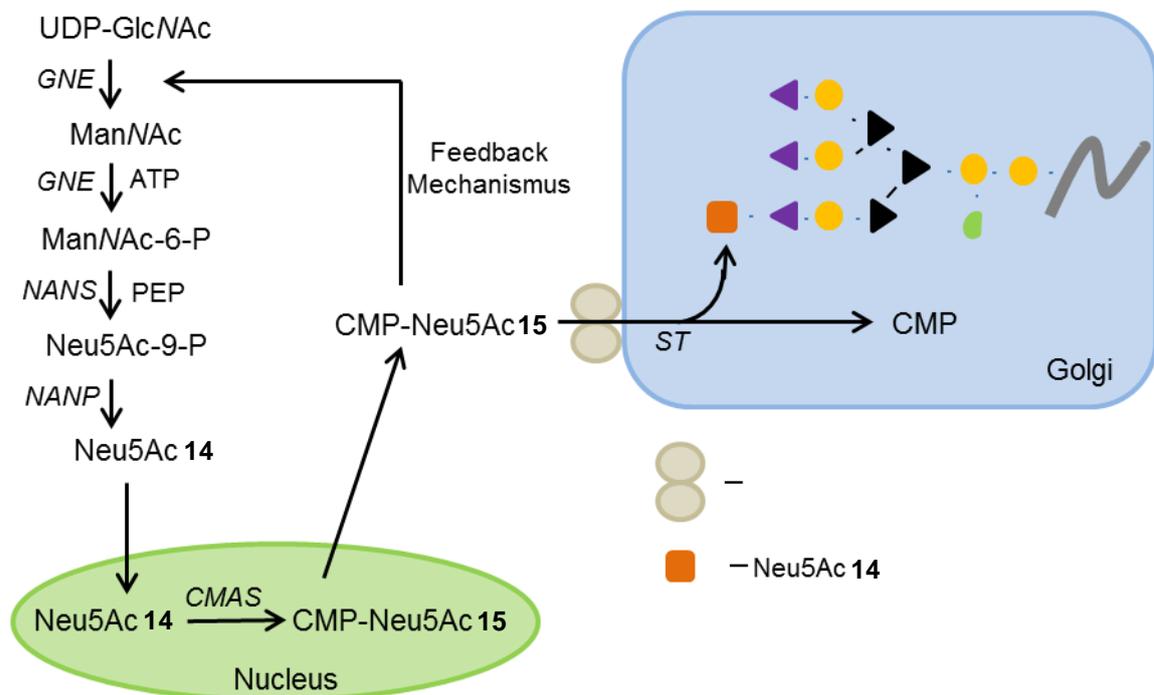


Abb. 12: Schematische Darstellung der Biosynthese von Neu5Ac **14** und CMP-Neu5Ac **15** (bearbeitet nach *K. Bork et al. und A. Castilho et al.*).^[67-68]

Die ersten zwei Schritte werden von dem bifunktionellen Enzym UDP-*N*-acetylglucosamin-2-Epimerase/*N*-Acetylmannosamin-Kinase (GNE) katalysiert. Im ersten Schritt wird 2-Acet-

amindo-2-desoxymannose (ManNAc) aus UDP-GlcNAc durch Epimerisierung der Hydroxylgruppe in C2-Position und anschließender Abspaltung von UDP gebildet.^[69-73] ManNAc wird im Folgenden an der C6-Position durch den Verbrauch von ATP phosphoryliert.^[74] Im dritten Schritt erfolgt die Kondensation von ManNAc-6-Phosphat mit Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Neu5Ac-9-Phosphat, katalysiert durch das Enzym Neu5Ac-9-Phosphat-Synthase (NANS).^[68-69,74-75] Neu5Ac-9-P Phosphatasen (NAPS) spalten anschließend die Phosphatgruppe und es entsteht Neu5Ac **14**.^[68-69,76] Im Folgenden wird Neu5Ac **14** entweder zu einer der anderen Sialinsäuren modifiziert oder wird als CMP-Neu5Ac **15** aktiviert.^[77-78] Die Aktivierung von Neu5Ac **14** durch das Enzym CMP-Neu5Ac-Synthase (CMAS) findet im Gegensatz zu der Aktivierung anderer Monosaccharide im Nucleus und nicht im Cytosol statt.^[68,77,79] Das gebildete CMP-Neu5Ac **15** wird über den CMP-Neu5Ac-Golgi-Transporter aus dem Nucleus in den Golgi transportiert.^[80-81] Die Sialylierung von Glykokonjugaten durch die verschiedenen Sialyltransferasen (ST) erfolgt im Golgi.^[62] Eine Schlüsselrolle bei der Biosynthese von CMP-Neu5Ac **15** spielt das Enzym GNE. Dieses katalysiert nicht nur wie beschrieben die beiden ersten Syntheseschritte, sondern das gebildete CMP-Neu5Ac **15** bindet an das GNE und hemmt so selektiv die Epimeraseaktivität des Enzyms. Die Regulierung der Sialinsäurebiosynthese verläuft damit über einen Feedback-Mechanismus.^[73,82]

2.1.1.6 Bedeutung von modifizierten Neuraminsäure- und CMP-Neu5Ac-Derivaten

Modifizierte Derivate der Neuraminsäure bzw. der aktivierten Form sind in unterschiedlichen Bereichen von Bedeutung. Glykokonjugate, die modifizierte Neuraminsäuren enthalten, können genutzt werden, um wichtige biologische und physiologische Eigenschaften von sialinsäurehaltigen Strukturen zu verstehen.^[40]

Da häufig *N*-Acetylneuraminsäure **14** in Tumorzellen überproduziert wird, ist dieses Molekül ein interessanter Ansatzpunkt für die Entwicklung eines Impfstoffes gegen Krebs.^[59,83] Modifizierte Sialinsäuren haben in diesem Bereiche bereits positive Eigenschaften gezeigt. Unter anderem können sie die Immunogenität von Impfstoffen auf Basis von Glycanen verstärken.^[6,84] Sialinsäuren mit unnatürlichen *N*-Acyl-Resten wie *N*-Propanoyl, *N*-Butanoyl, *N*-Phenylacetat und *N*-Levulinoyl zeigen eine höhere Immunwirkung als die korrespondierende natürliche Sialinsäure.^[6] Analoge Studien hierzu wurden ebenfalls von *Chefalo et al.*^[83] durchgeführt. Durch die Verwendung von modifizierten Sialinsäuren konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es zu einer Hemmung der Aufnahme von Influenza A-Viren kommt.^[85-86] Um nach möglichen Sialyltransferaseinhibitoren zu screenen, wurde von *Rillahan et al.*, neben dem in Abschnitt 2.1.1.3 dargestellt fluoreszenzmarkierten GDP-Fuc-Derivat **4**, ein fluoreszenzmarkiertes CMP-Neu5Ac-Derivat **16** synthetisiert (Abb. 13) und in dem FP-Assay und dem HTS eingesetzt.^[53]

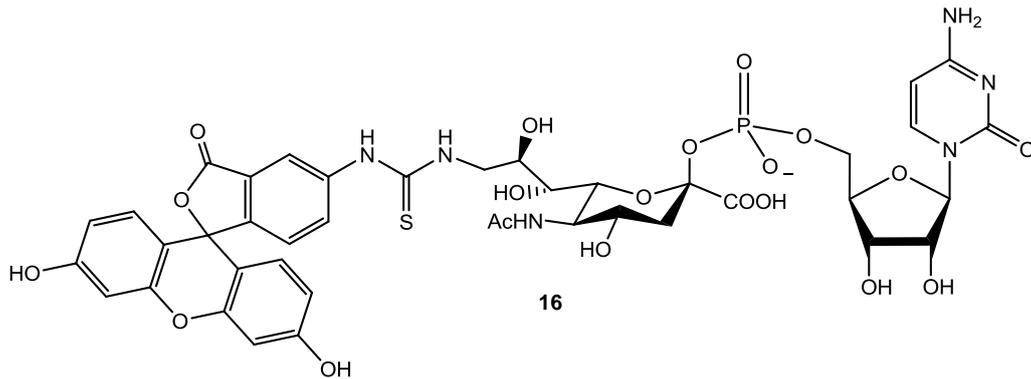


Abb. 13: CMP-FITC-Neu5Ac **16** von *Rillahan et al.*^[53]

Da wenig bekannt ist, wie sich die verschiedenen Sialyltransferasen in Bezug auf Modifikationen der Substrate verhalten, wurden von *S. Wolf* vier unterschiedlich *N*-Acyl-modifizierte CMP-Neuraminsäurederivate synthetisiert: CMP-Neu5Prop **17**, CMP-Neu5But **18**, CMP-Neu5Pent **19** und CMP-Neu5Cycloprop **20** (Abb. 14).^[2]

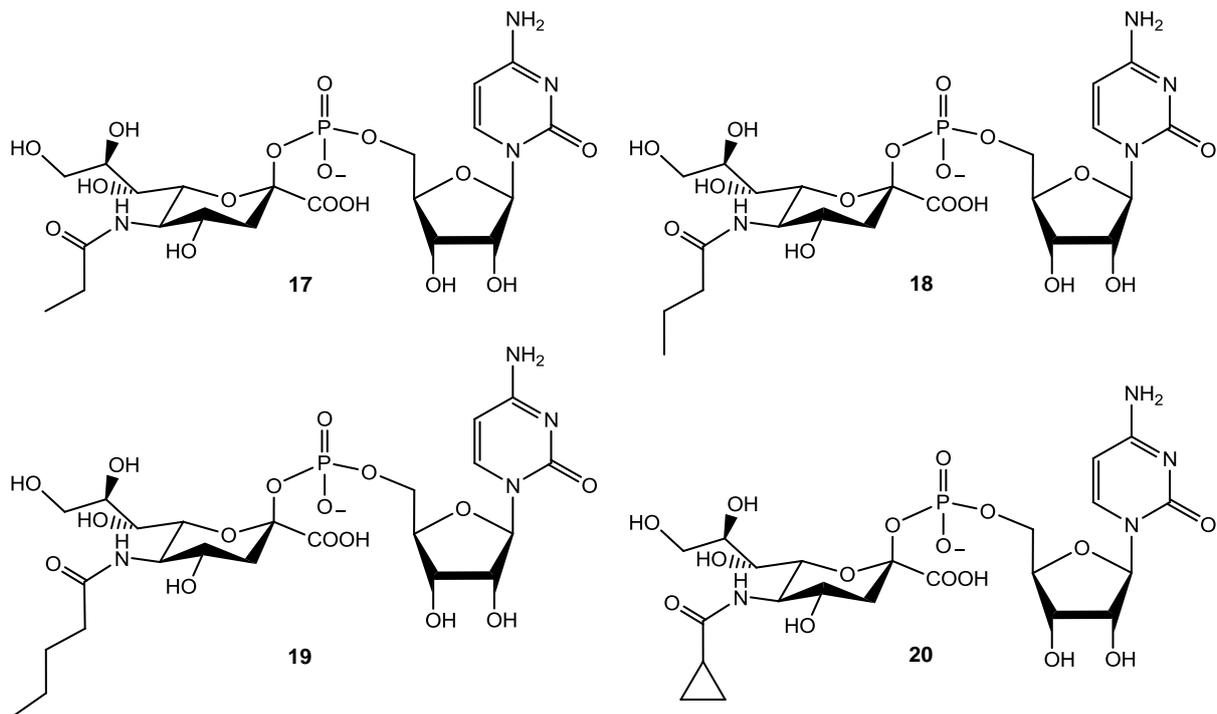


Abb. 14: Modifizierte CMP-Neu5Acyl-Derivate von *S. Wolf*.^[2]

Diese Verbindungen wurden verwendet, um die Akzeptanz einer rekombinanten Polysialyltransferase (polyST), isoliert aus *Neisseria meningitidis* Serogruppe B, von modifizierten Substraten zu testen. Der Assay zeigte, dass die Modifikationen einen deutlichen Einfluss auf die Substrateigenschaften haben, denn die Substratakzeptanz nimmt mit steigender Kettenlänge ab und das sterisch anspruchsvollere CMP-Neu5Cycloprop **20**

war kein Substrat der getesteten Sialyltransferase.^[2] Dieser Assay wurde weiterentwickelt und es zeigte sich, dass CMP-Neu5Cycloprop **20** sogar ein kompetitiver Inhibitor der verwendeten polyST ist.^[87]

2.1.1.7 Bedeutung von zellgängigen CMP-Neu5Ac-Derivaten

Um das Anwendungsgebiet von beispielsweise identifizierten Inhibitoren von Sialyltransferasen auf Zellstudien zu erweitern oder um intrazelluläre Prozesse untersuchen zu können, ist die Entwicklung von zellgängigen CMP-Neuraminsäuren-Derivaten nötig. Um die Lipophilie von polaren Molekülen zu erhöhen und um damit die Diffusion durch die Zellmembran zu ermöglichen, werden häufig Ester eingesetzt wie beispielsweise Acetyl-, Isopropyl-, Pivalinsäure-, Pivaloyloxymethyl- oder Acyloxybenzylester.^[88-89]

Rillahan et al. zeigten die Relevanz, zellgängige Inhibitoren für Glycosyltransferasen zu entwickeln, um unter anderem Zellstudien durchführen zu können (Abschnitt 2.1.1.3).

Die Entwicklung und Untersuchung von Sialyltransferase-Inhibitoren ist speziell in Bezug auf Krebserkrankungen von großem Interesse. Eine Überproduktion an Sialinsäuren ist ein häufig beobachtetes Phänomen bei Tumorzellen. Darüber hinaus ist beschrieben, dass Selektine, die Sialinsäuren erkennen, an der Bildung von Metastasen involviert sind.^[59,66]

Bei Polysialinsäuren (PSA) handelt es sich um Oncofoetale-Antigene, welche in großer Fülle während der embryonalen Entwicklung vorkommen. Während der Reifung des Gewebes nimmt die Anzahl an PSA schrittweise ab und ist praktisch nicht mehr detektierbar in peripherem adulten Gewebe. Allerdings erscheinen PSA in verschiedenen Tumorgeweben wieder. Die Polysialyltransferase ST8Siall ist eine von zwei polyST, welche an der Biosynthese von PSA beteiligt ist.^[87] Damit zum Beispiel der von *S. Wolf* synthetisierte und von *R. Gerardy-Schahn* identifizierte Inhibitor CMP-Neu5Cycloprop **20** (Abschnitt 2.1.1.6) der ST8Siall in Zellassays getestet werden kann, muss dieser die Zellmembran passieren können. Die Verwendung eines lipophilen Derivates könnte dies ermöglichen. Um solche zellgängigen, modifizierten CMP-Neu5Acyl-Derivate zu erhalten, ist die Entwicklung einer effektiven Synthesestrategie nötig.

Sialinsäuren sind ebenfalls ein entscheidender Faktor für die Halbwertszeit von beispielsweise im Blut zirkulierenden Glycoproteinen. Fehlen terminale Sialinsäuren werden die darunterliegenden Monosaccharide, wie beispielsweise Galactose, von Rezeptoren in der Leber oder anderen Organen erkannt und die Glycoproteine schnell abgebaut. Dieses Phänomen ist unter anderem im Bereich der Biotherapeutika von Bedeutung, da viele dieser Produkte (Antikörper, Cytokine und Hormone) Glycoproteine sind.^[67,69,90-91] Produziert werden solche Biotherapeutika in Säugetierzelllinien. Der Sialylierungsgrad, auch *capping* genannt, kann je nach Bedingungen der Kultur und Produktion variieren. „*Uncapping*“ wird lediglich in geringem Maße toleriert. Jede größere Menge resultiert in einem schnellen Abbau des Moleküls. Aus diesem Grund wurden viele Versuche unternommen, den

Sialyierungsgrad zu erhöhen.^[67,91] Auch hier könnte untersucht werden, ob durch Zugabe eines zellgängigen CMP-Neu5Ac-Derivates der Sialyierungsgrad ansteigt und somit ein Abbau von Biotherapeutika mit einem kritischen Sialyierungsgrad verringert werden kann.

2.1.2 Das regulatorische Zuckernucleotid Adenosindiphosphat-Ribose 21

2.1.2.1 Der Ionenkanal *transient receptor potential melastatin 2* (TRPM2)

Der Ionenkanal *transient receptor potential melastatin 2* (TRPM2) ist ein multifunktionaler, nicht-selektiver Ionenkanal. Dieser ist unter anderem permeabel für Calciumionen. Er besitzt sechs transmembrane Domänen, welche von den intrazellulären *N*- und *C*-Termini flankiert sind. TRPM2 gehört unter anderem neben TRPM6 und TRPM7 zu der speziellen Gruppe der *channel-enzymes* (chanzymes), da TRPM2 als Ionenkanal und Pyrophosphatase fungiert. Die Pyrophosphataseeinheit (NUDIX-entsprechende oder NUDT9 homologe Domäne) ist am cytosolischen *C*-Terminus lokalisiert. Am *N*-Terminus befinden sich vier homologe Domänen und ein Calmodulin bindendes IQ-ähnliches Motiv, welches eine regulierende Rolle bei der Aktivierung des Kanals einnimmt.^[32-33,38,92-94] TRPM2 wird in einer Vielzahl von Gewebezellen exprimiert. Die höchsten Konzentrationen befinden sich im Gehirn und in Zellen des Immunsystems.^[32] Bei den Zellen des Immunsystems befindet sich TRPM2 in der Plasmamembran, außer bei dendritischen Zellen. Hier ist TRPM2 in der lysosomalen Membran lokalisiert.^[33] Das Einströmen von Calcium durch TRPM2 in das Zellinnere wurde für viele physiologische und pathologische Prozesse beschrieben. Hierzu gehören Insulinsekretion, proinflammatorische Cytokinproduktion, Permeabilität des Endotheliums, Zellreifung und Chemotaxis. Des Weiteren kann die Aktivierung des TRPM2 zum Ca²⁺-vermitteltem Zelltod führen. Die Aktivierung des TRPM2 steht außerdem in Verbindung mit Krankheiten, welche durch oxidativen Stress ausgelöst werden.^[34,38]

2.1.2.2 Adenosindiphosphat-Ribose (ADPR) 21 als Aktivator des TRPM2

2001 wurde in zwei Studien erstmals beschrieben, dass TRPM2 durch Adenosindiphosphat-Ribose (ADPR) 21 (Abb. 15) aktiviert werden kann.^[92-93] Die Anwesenheit von ADPR 21 in eukaryotischen Zellen ist schon länger bekannt, allerdings ist ADPR 21 zelltoxisch und wurde somit als Abfallprodukt angesehen. Die Toxizität kommt dadurch zustande, dass die reaktive Riboseeinheit nicht enzymatische, unspezifische Reaktionen mit Aminogruppen von zellulären Proteinen eingehen kann. Hierbei werden Schiff'sche-Basen gebildet. Aus diesem Grund gibt es effektive Abbaumechanismen von ADPR 21 zu AMP und Ribose-5'-phosphat durch enzymatische Hydrolyse des Pyrophosphates.^[32,95] Es gibt sowohl cytosolische^[96] als auch mitochondriale^[97-98] ADPR-Pyrophosphatasen. AMP und Ribose-5'-phosphat werden wieder für metabolische Prozesse verwendet.^[32]

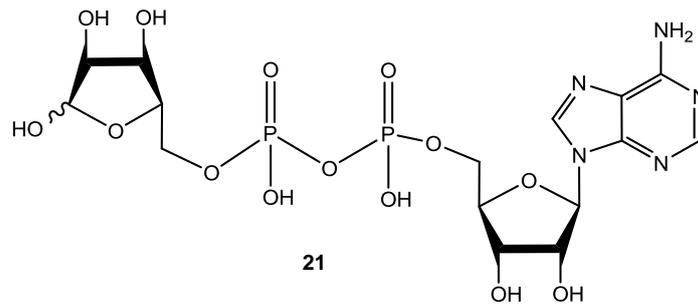


Abb. 15: Adenosindiphosphat-Ribose (ADPR) **21**.

Die Bildung von ADPR **21** kann auf mindestens drei bekannten Wegen aus Nicotinamidadenindinucleotid (NAD) und ebenfalls aus cyclischer Adenosindiphosphat-Ribose cADPR erfolgen (Abb. 16). Zum einen gehört ADPR **21** zu dem regulatorischen Calciummobilisierendem *second messengers* Netzwerk, welches neben ADPR **21** auch Nicotinsäureadenindinucleotidphosphat (NAADP) und cADPR beinhaltet.^[32,95] In diesem Fall werden ADPR **21** und cADPR auf der extrazellulären oder der intrazellulären Seite durch das multifunktionale Ectoenzym NAD-Glycohydrolase/ADP-Ribosyl-Cyclase (CD38) gebildet, wobei die *N*-glycosidische Bindung zwischen dem Nicotinamid und der Ribose hydrolysiert wird. Innerhalb dieses Netzwerkes wird ADPR **21** auch aus dem Metaboliten cADPR, ebenfalls durch das Enzym CD38, gebildet.^[32,38,99-102] Das Enzym CD38 existiert in zwei Orientierungen. Die aktive Seite des Enzyms CD38 kann sich sowohl auf der extrazellulären (Typ II) als auch auf der intrazellulären Seite (Typ III) befinden. Somit kann hier ADPR **21** extra- und intrazellulär gebildet werden. Es ist anzumerken, dass die physiologische Funktion des extrazellulär gebildeten ADPR **21** noch unklar ist.^[103-104]

Des Weiteren wird ADPR **21** in den Mitochondrien durch die mitochondriale NADase aus NAD gebildet.^[33-34,38,105] Die Bildung von ADPR **21** erfolgt, ausgelöst durch reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* ROS) induzierte DNA-Schäden, auch im Nucleus. Durch das Enzym poly-ADPR-Polymerase (PARP) wird zunächst aus NAD Poly-ADPR gebildet und in einem zweiten Reaktionsschritt hydrolysiert das Enzym poly-ADPR-Glycohydrolase (PARG) das gebildete Poly-ADPR zu ADPR **21**.^[34,106] Die beiden zuletzt genannten Mechanismen werden durch ROS, wie beispielsweise Wasserstoffperoxid, aktiviert. ROS werden unter anderem von Phagozyten durch die NADPH-Oxidase gebildet oder auch in Mitochondrien als Antwort auf bestimmte Partikel wie Lipide, Silica oder Aluminium.^[33] Die indirekte Aktivierung von TRPM2 durch ROS steht mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung. Hierzu gehören autoimmune Erkrankungen, Diabetes Mellitus, neurodegenerative Störungen (Alzheimer und Parkinson), Infektionen, Herzinfarkt und Krebs.^[35-38]

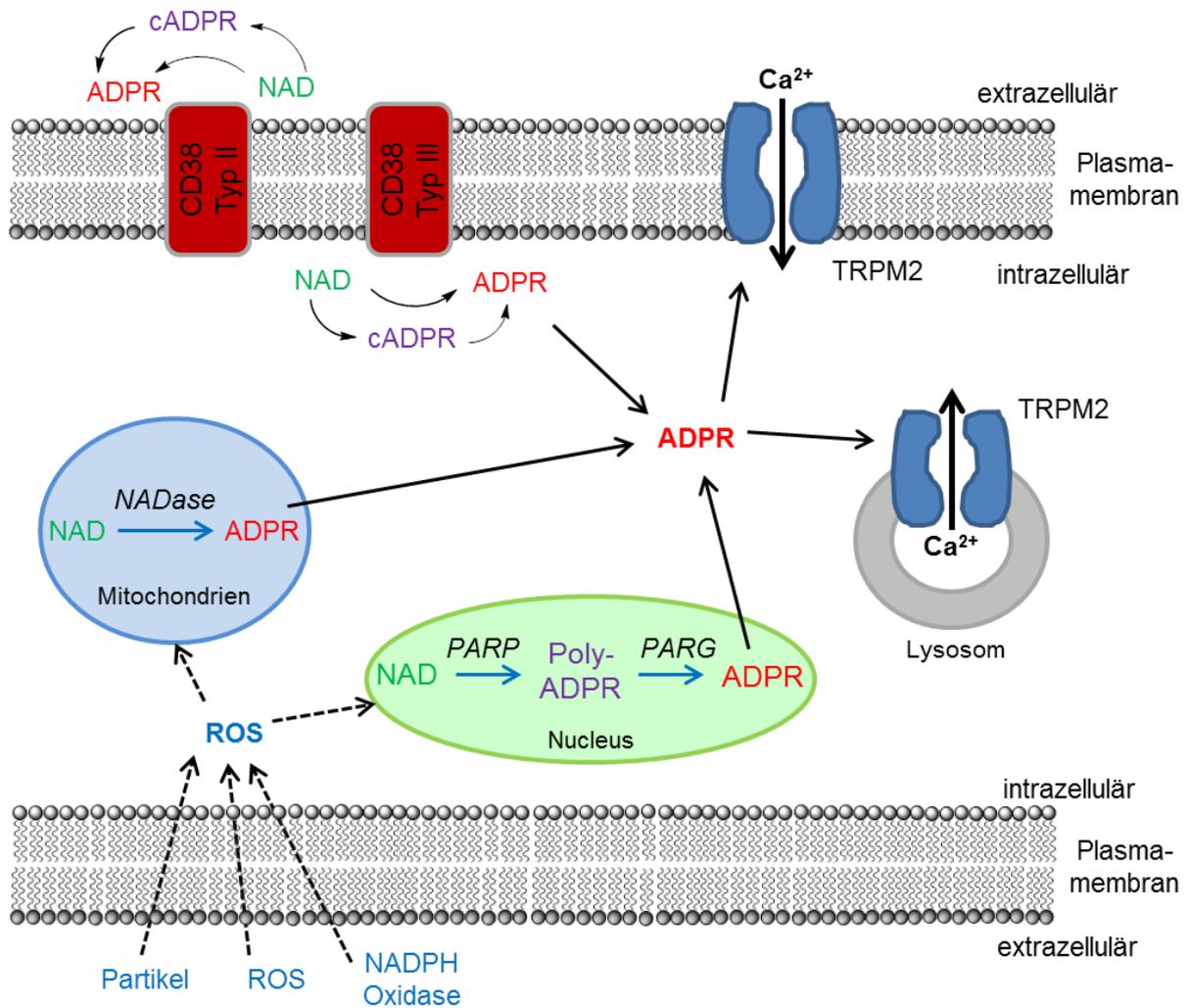


Abb. 16: Signalmechanismen zur TRPM2 Aktivierung (bearbeitet nach A. Sumoza-Toledo, R. Penner und S. Syed-Mortadza et al).^[33-34]

Das auf den beschriebenen Wegen gebildete und ins Cytosol freigesetzte ADPR **21** aktiviert den TRPM2-Kanal der Membran bzw. des Lysosoms. Hierbei bindet ADPR **21** an die NUDT9 homologe Domäne am C-Terminus des TRPM2-Kanals und wird zu Ribose-5-phosphat und AMP hydrolysiert. AMP inhibiert wiederum die TRPM2-Aktivierung und dient damit als Antagonist. Durch die Aktivierung des TRPM2-Kanals kommt es zum Einstrom von Calcium ins Zellinnere durch die Plasmamembran bzw. zur Freisetzung von lysosomalem Calcium. Die Calciumkonzentration des Cytosols steigt an. Eine Überladung mit Calcium kann Apoptose und wahrscheinlich Nekrose auslösen.^[33-34,38,107]

Intrazelluläres ADPR **21** ist der potenteste Aktivator dieses Ionenkanals.^[92-93,108] Zusätzlich aktiviert intrazelluläres Ca²⁺ durch Bindung an das Calmodulin bindende IQ-ähnliche Motiv den TRPM2 Ionenkanal.^[33] Des Weiteren haben die Temperatur und der pH-Wert einen Einfluss auf das TRPM2-gating.^[38] Von *Balázs Tóth et al.* wurden in Studien von 2010 und 2014 gezeigt, dass weder eines der anderen Pyridinucleotide (cADPR, NAD, NAAD oder

NAADP) TRPM2 aktiviert noch dass NAADP die Aktivierung von TRPM2 durch ADPR **21** potenziert.^[94,107,109] Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Hydrolyse von ADPR **21** nicht zwingend mit der Aktivierung oder Deaktivierung von TRPM2 verbunden ist. Dies bedeutet, dass Strategien entwickelt werden können, um Modulatoren gezielt bei der Steuerung von TRPM2 einzusetzen. Als Modulatoren können sowohl Aktivatoren, welche an den geöffneten Kanal binden, als auch Inhibitoren, welche an den geschlossenen Kanal binden, dienen.^[94]

ADPR **21** ist, wie bereits erwähnt, der potenteste Aktivator des Ionenkanals TRPM2. Deswegen sind Studien zur Aufklärung des Aktivierungsmechanismus von TRPM2 durch ADPR **21** sowie das Design möglicher Aktivatoren oder Inhibitoren von zentraler Bedeutung. Zusätzlich stellt TRPM2 einen möglichen Ansatzpunkt dar, um Erkrankungen zu bekämpfen, welche durch oxidativen Stress ausgelöst werden.

2.1.2.3 Zellstudie mit ADPR-Analoga

ADPR **21** kann aufgrund seiner Hydrophilie die Zellmembran nicht passieren. Untersuchungen des TRPM2-Kanals erfolgen daher hauptsächlich durch elektrophysiologische Methoden (patch-clamp-Methoden) an einzelnen Zellen.^[38] Mit dieser Methode können Ionenströme durch Plasmamembranen gemessen werden.^[110-111] Zellgängige ADPR-Analoga sind daher interessante Tools, um die Mechanismen des Kanals TRPM2 eingehender untersuchen zu können. Bislang gibt es jedoch nur wenige Studien bei denen ADPR-Analoga eingesetzt wurden. Die Arbeitsgruppe von *Jianbo Yue*^[38] synthetisierte 2012 1-(2-Nitrophenyl)-ethyl (NPE)-caged-ADPR, um damit einen möglichen TRPM2 vermittelten Kationen-Einstrom untersuchen zu können. Die Synthese des NPE-caged-ADPR erfolgt ausgehend von ADPR **21** durch Umsetzung mit 1-(2-Nitrophenyl)-diazaoethan mit einer Ausbeute von 24%. Isoliert wird das Produkt mittels HPLC. Das NPE ist hier entweder an dem α - oder an dem β -Phosphat des ADPR gebunden und liegt als Gemisch der beiden Regioisomere vor. Als Nebenprodukt kommt unter anderem ein ADPR-Analogon vor, welches fünf NPE Moleküle enthält. Die mono-caged-ADPR-Analoga können die Zellmembran von den eingesetzten Zelllinien Jurkat T-Lymphozyten und HEK293 passieren. ADPR **21** wird mittels Photolyse freigesetzt und TRPM2 durch ADPR **21** aktiviert. Durch die Aktivierung des TRPM2-Kanals gelangen unter anderem Ca^{2+} , Mg^{2+} und Zn^{2+} in die Zelle. Darüber hinaus kommt es zu einem geringen Einstrom von Ca^{2+} in Wildtyp HEK293 Zellen, die keinen TRPM2-Kanal präsentieren. Dies könnte durch eine Aktivierung des P2Y_1 -Rezeptors nach der Photolyse erklärt werden. Der P2Y_1 -Rezeptor ist generell für die ADP-induzierte Aggregation von Thrombozyten von zentraler Bedeutung.^[112]

Trotz der Schwierigkeiten zeigt dieses Experiment das Potential von zellgängigen, monomaskierten ADPR-Derivaten. Somit scheint es erfolgsversprechend, diesen Ansatz weiter zu verfolgen und verbesserte Konzepte zu entwickeln.

2.2 Chemische Darstellung von Zuckernucleotiden

2.2.1 Chemische Darstellung von Nucleosiddiphosphat-Zuckern

Die chemische Darstellung von Nucleosiddiphosphat-Zuckern (NDP-Zuckern) kann auf zwei Wegen erfolgen (Abb. 17). Eine Möglichkeit ist, NDP-Zucker aus einem Nucleosiddiphosphat und einem aktivierten Monosaccharid darzustellen (Abb. 17, Strategie A). Alternativ kann die Pyrophosphatbindung aus zwei Monophosphaten gebildet werden. Hierbei werden ein Monosaccharidmonophosphat und ein aktiviertes Nucleosidmonophosphat eingesetzt (Abb. 17, Strategie B).^[14]

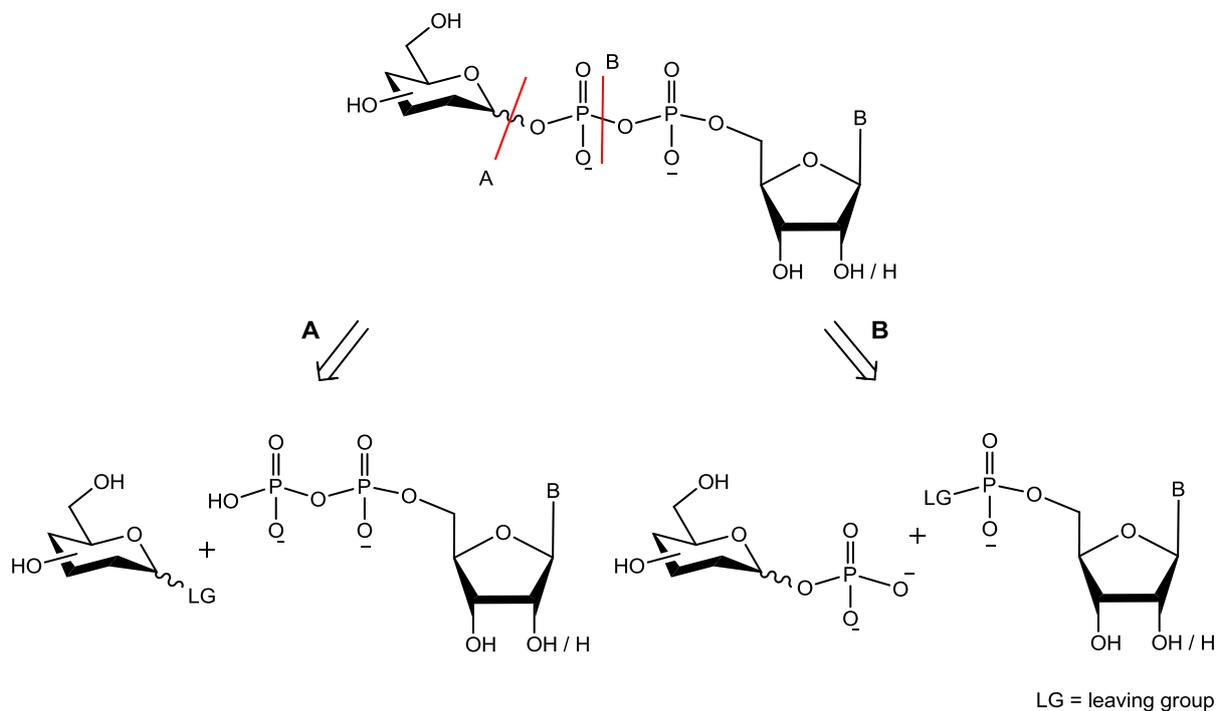


Abb. 17: Allgemeine Synthesestrategien zur Darstellung von NDP-Zuckern.

Über die Jahre wurden viele Synthesemethoden zur Darstellung von NDP-Zuckern entwickelt.^[12,16,113-120] Hierbei hat sich der Syntheseweg B im Vergleich zu dem Syntheseweg A in Bezug auf Ausbeute, Stereoselektivität und breite Anwendbarkeit als die effektivere Strategie herausgestellt.^[14,120-122] Im Folgenden wird somit nur auf die wichtigsten chemischen Synthesen der Synthesestrategie B eingegangen. Diese Synthesestrategie erlaubt die Kontrolle der Stereochemie am anomeren Zentrum durch Verwendung anomerenreiner Zuckerphosphate. Des Weiteren ist hier die Darstellung sowohl über P^V-Chemie als auch über P^{III}-Chemie möglich.

2.2.1.1 Chemische Synthesen von NDP-Zuckern ausgehend von einem aktivierten Nucleosidmonophosphat (Strategie B)

Die klassische Methode zur chemischen Darstellung von NDP-Zuckern nach der Synthesestrategie B (Abb. 17) beinhaltet die Kupplung eines Glycosylphosphates mit einem Nucleotid-Morpholidat (*Moffat-Khorana-Methode* 1958) (Abb. 18).^[116] Hierbei handelt es sich um eine Darstellung der NDP-Zucker bei der Phosphorbausteine in der Oxidationsstufe V verwendet werden. Es wird ein Pyranosylmonophosphat mit einem Nucleosid-5'-phosphormorpholidat als *N,N'*-Dicyclohexylcarboxamidiniumsalz umgesetzt. Mit dieser Methode können sowohl natürliche NDP-Zucker als auch nicht-natürliche NDP-Zucker dargestellt werden. Allerdings schwanken die Ausbeuten zwischen 16 und 90%.^[14] Der Ausschluss von Feuchtigkeit während der Reaktion ist hier zwingend erforderlich, um eine Hydrolyse des Phosphormorpholidates während der Kupplung zu verhindern.^[116,123-127] Darüber hinaus sind die sehr langen Reaktionszeiten von mehreren Tagen und eine fehlende Reproduzierbarkeit der Ausbeuten problematisch. Aufgrund der langen Reaktionszeiten kommt es zu Nebenreaktionen beziehungsweise zu hydrolytischen Zersetzungsreaktionen.^[14]

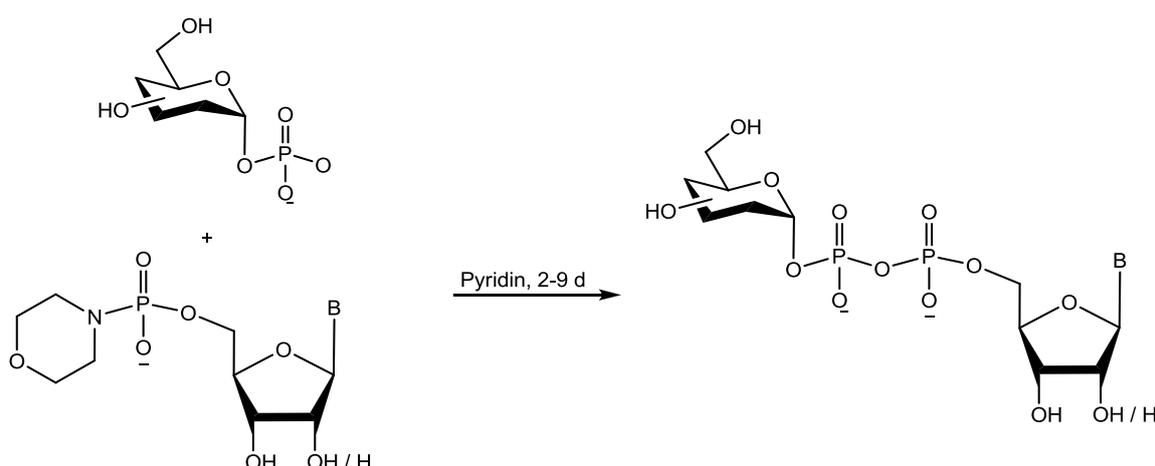


Abb. 18: Phosphormorpholidat-Methode zur Darstellung von NDP-Zuckern nach *Moffat* und *Khorana*.^[116]

Eine Variante der Morpholidat-Methode wurde von *Wittmann* und *Wong* 1997 vorgestellt.^[117] Hier gelang durch die Verwendung von 1*H*-Tetrazol als Aktivator eine Verkürzung der Reaktionszeit auf zwei Tage und Ausbeuten von bis zu 91%. Allerdings ist auch hier die Reproduzierbarkeit problematisch. Als Nebenprodukte entstehen NMPs und NMP-Dimere, so dass die Ausbeuten zum Teil auf 30% sinken.^[128]

Van der Marel et al. stellten 2008 eine Methode zur Darstellung der NDP-Zucker vor, die die Synthese durch Verwendung von P^{III}-Reagenzien ermöglicht (Abb. 19).^[118] Hierbei werden 5'-Nucleosylphosphoramidite mit anomenreinen Pyranosylphosphaten unter Verwendung von Dicyanoimidazol als Aktivator gekuppelt. Nach der Kupplung erfolgt *in situ* die Oxidation

zum Phosphat mit *tert*-Butylhydroperoxid. Die Reaktionszeit beträgt hier lediglich etwa eine Stunde. Auf diesem Weg stellten *Marel et al.* drei NDP-Zucker mit guten Ausbeuten bis 76% dar. Auch wenn diese Strategie bislang keine weite Verbreitung in der Literatur fand, ist sie ein interessanter Ansatzpunkt zur Darstellung von NDP-Zuckern. Gerade die kurzen Reaktionszeiten sollten die Problematik der zuvor genannten Nebenreaktionen bei der Morpholidat-Methode umgehen können. Allerdings schließt der notwendige Oxidationsschritt die Anwendung der Methode auf die Darstellung von oxidationsempfindlichen NDP-Zuckern möglicherweise aus.

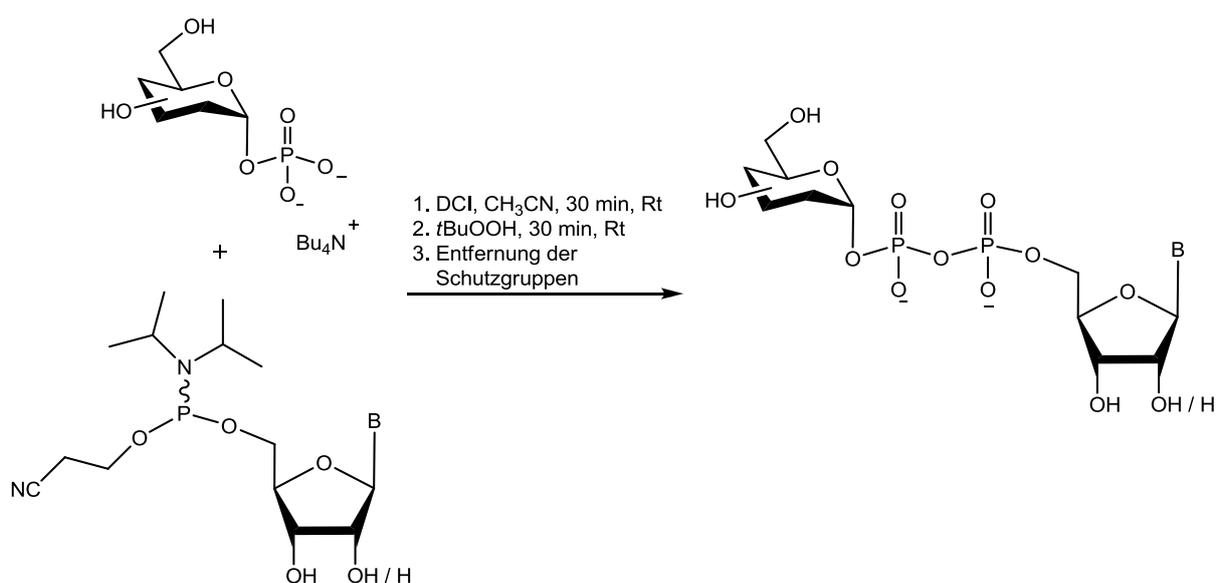


Abb. 19: Phosphoramidit-Methode zur Darstellung von NDP-Zuckern
 nach *van der Marel et al.*^[118]

Eine weitere Synthesestrategie wurde ebenfalls 2008 von *S. Wendicke* und *S. Warnecke* vorgestellt.^[16] Diese basiert auf der von *C. Meier* 1996 entwickelten *cycloSal*-Technik.^[129]

Bei dieser Methode erfolgt die Darstellung der NDP-Zucker ebenfalls über Phosphorbausteine in der Oxidationsstufe V, durch Umsetzung von *cycloSal*-Triestern mit anomerreinen Pyranosylmonophosphaten (Abb. 20). Die *cycloSal*-Triester fungieren hier als aktivierte Nucleotide.^[16]

Die Bildung eines NDP-Zuckers wird hierbei durch den nucleophilen Angriff eines Glycosylphosphates auf das Phosphoratom des Triesters eingeleitet. Bedingt durch die verschiedenen Stabilitäten der Phenyl-, Benzyl- und Alkylphosphatesterbindung verläuft die folgende Spaltung äußerst selektiv. So erfolgt nach dem nucleophilen Angriff zunächst die Spaltung der phenylischen Phosphatesterbindung unter Bildung eines (2-Hydroxybenzyl)-phosphatdiesters. Dieser wird aufgrund seiner Mesomeriestabilisierung bevorzugt gebildet. Des Weiteren wird der zunächst schwache Donorsubstituent in einen starken Donorsubstituenten überführt. Dadurch erfolgen über einen spontanen Bindungsbruch der benzylichen C-O-

Bindung sowohl die Freisetzung des Chinonmethids, welches nach Reaktion mit Wasser den entsprechenden Salicylalkohol bildet, als auch die Freisetzung des NDP-Zuckers.^[120,122,130]

Um eine vollständige Umsetzung des *cycloSal*-Triesters in möglichst kurzer Zeit zu erreichen, ist es nötig, die Elektrophilie des Phosphoratoms zu erhöhen. Dies kann durch Substituenten am aromatischen System gesteuert werden, wobei Elektronendonatoren wie zum Beispiel X = 3-Me (hier nicht gezeigt) eine desaktivierende Wirkung aufweisen. Elektronenakzeptoren wie zum Beispiel X = 5-NO₂ oder X = 5-Cl hingegen weisen eine aktivierende Wirkung auf. Durch die Aktivierung wird eine rasche Umsetzung mit den Pyranosylphosphaten gewährleistet.^[120]

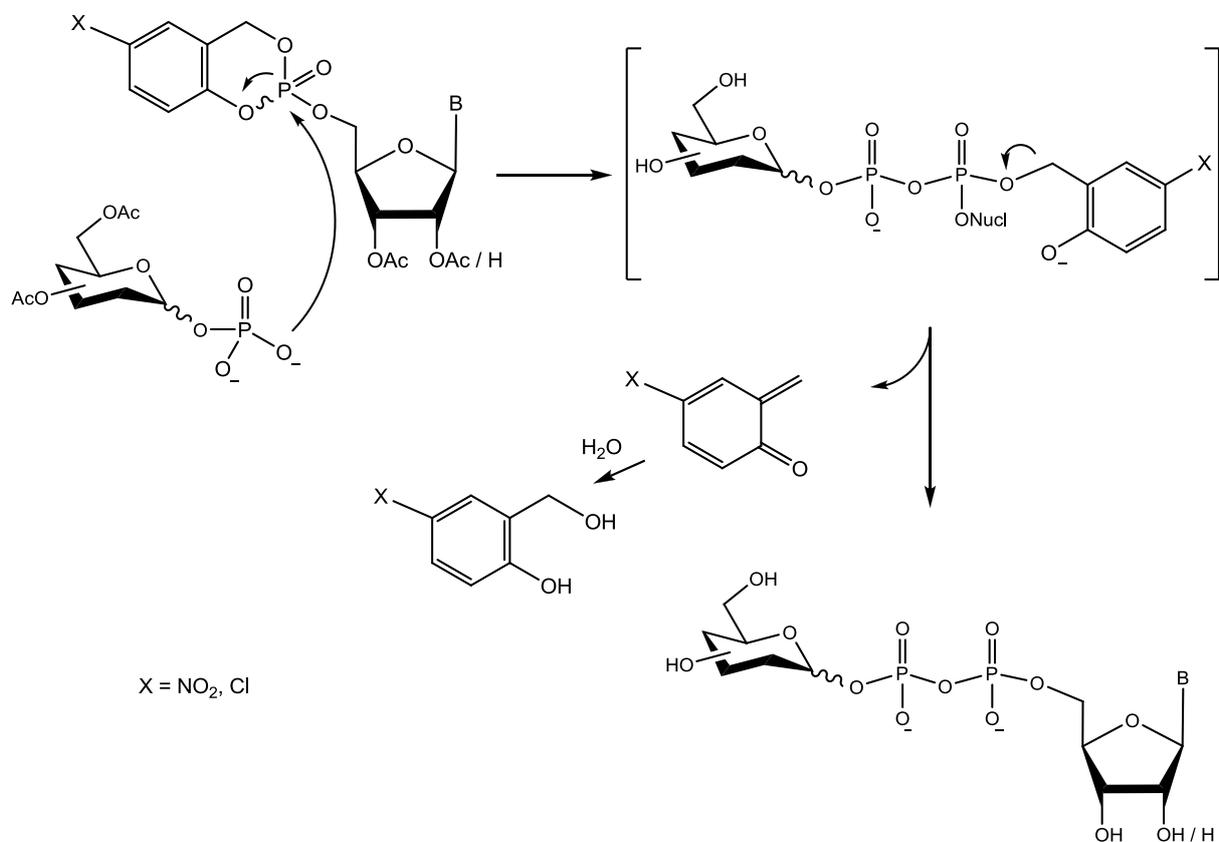


Abb. 20: Allgemeiner Reaktionsmechanismus von *cycloSal*-Triestern mit Pyranosylphosphaten.^[16]

Mittels der von S. Wendicke und S. Warnecke vorgestellten Methode können NDP-Zucker innerhalb von 3-5 Stunden mit Ausbeuten von 46-60% synthetisiert werden. Nach Optimierung der Methode von S. Wolf *et al.* durch Änderung der Reihenfolge der Reagenzienzugabe, des Äquivalentenverhältnisses sowie des Lösungsmittelvolumens können eine große Bandbreite von natürlichen und nicht-natürlichen NDP-Zuckern dargestellt werden. Die Ausbeuten liegen bei bis zu 88%.^[120-122] Neben den Pyranosylphosphaten können auch weitere Nucleophile eingesetzt werden, so dass mit dieser Methode auch eine Vielzahl weiterer phosphorylierter Biomoleküle dargestellt werden können.^[130]

2.2.2 Darstellung von Nucleosidmonophosphat-Zuckern

Im Unterschied zu den NDP-Zuckern sind NMP-Zucker über nur eine Phosphatgruppe verbrückt. Die Darstellung der NMP-Zucker kann ebenfalls, wie bei den NDP-Zuckern (siehe Abschnitt 2.2.1, Abb. 17), über eine Aktivierung des Monosaccharides, Strategie A, oder über die Aktivierung des Nucleotids, Strategie B, erfolgen. Der wichtigste Vertreter dieser Verbindungsklasse ist CMP-Neu5Ac **15**, welcher als Sialinsäuredonor fungiert. Im Folgenden sind nur Beispiele zur Darstellung von CMP-Neu5Ac **15** ebenfalls nur mittels der Synthesestrategie B gezeigt.

2.2.2.1 Chemische Synthesen zur Darstellung von CMP-Neu5Ac **15** ausgehend von einem aktivierten Cytidinmonophosphat (Strategie B)

Für die chemische Darstellung von CMP-Neu5Ac **15** mittels Strategie B gibt es zwei hauptsächlich verwendete Konzepte. Die Darstellung von CMP-Neu5Ac **15** kann über diese Synthesewege ebenfalls durch Verwendung von Phosphorbausteinen in der Oxidationsstufe III oder V erfolgen. Bei den Methoden von *Kajihara et al.* (1995) (Abb. 21)^[131] und *Halcomb et al.* (1997)^[132] werden Cytidin-5'-phosphoramidite mit dem vollständig geschützten Halbacetal des Neuraminsäurederivates **22** in Gegenwart von 1*H*-Tetrazol umgesetzt.

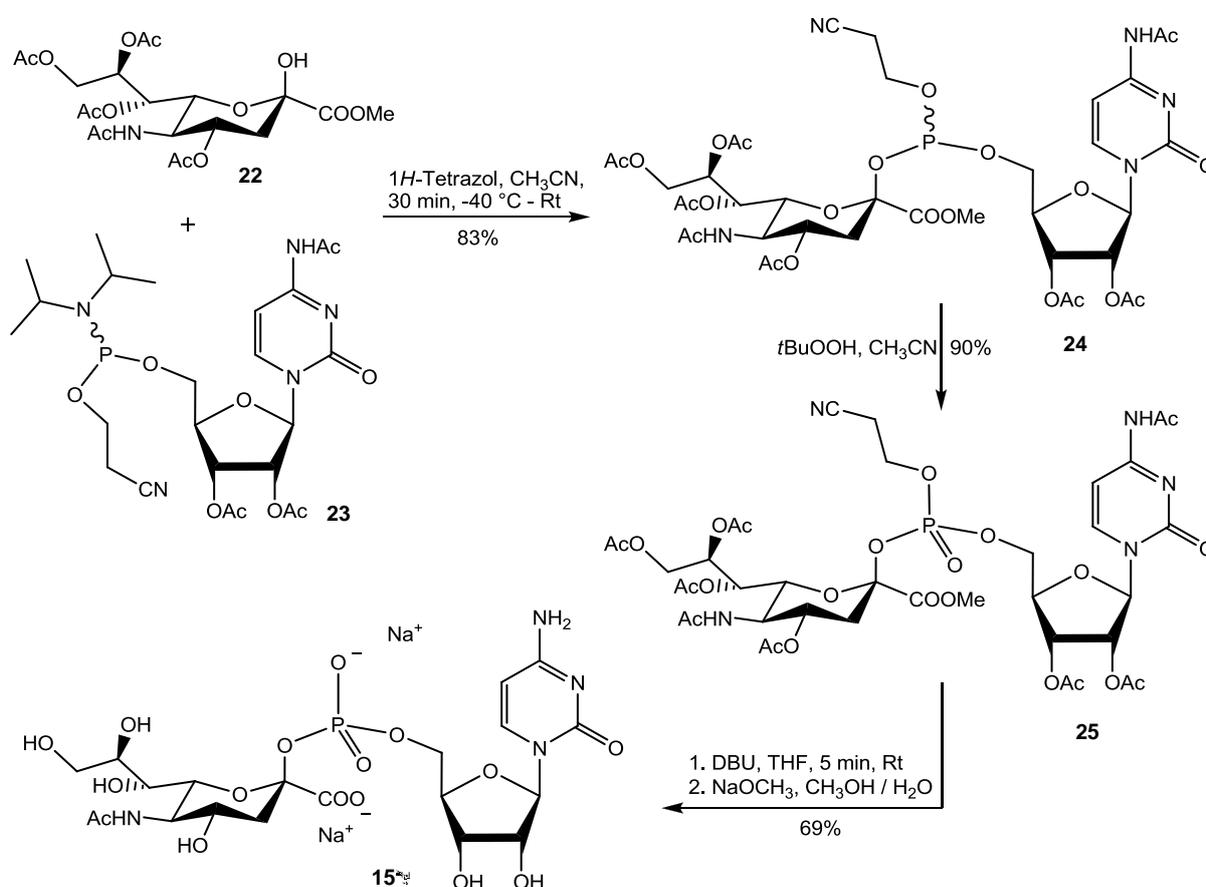


Abb. 21: CMP-Neu5Ac-Synthese nach *Kajihara et al.*^[131]

Kajihara et al. verwenden Cyanoethyl-geschützte Phosphoramidite **23**, wohingegen *Halcomb et al.* eine Allylschutzgruppe für das Phosphoratom verwenden. In beiden Fällen konnte das β -Anomer der CMP-*N*-Acetylneuraminsäure **15** erhalten werden. Die Gesamtausbeute nach Kupplung, Oxidation und Deblockierung liegt bei *Kajihara et al.* bei 50% und bei *Halcomb et al.* lediglich bei 30%. Gründe für die moderaten Ausbeuten sind die erhöhte Eliminierungstendenz des vollständig blockierten Phosphattriesters **25** im Vergleich zu der bei dem im folgenden genierten Phosphatdiester **15**.^[131,133] Außerdem kommt es aufgrund des nötigen Oxidationsschrittes zu weiteren Nebenreaktionen.

Die Verwendung eines vollständig blockierten Phosphattriesters sowie die Problematik der Oxidation konnten mit der von *Wolf et al.* (2012) entwickelten Synthesemethode, basierend auf Phosphor-haltigen Reagenzien in der Oxidationsstufe V, zur Darstellung von CMP-Neu5Ac **15** umgangen werden (Abb. 22).^[2] Die Darstellung des Produktes erfolgt analog der Synthese der NDP-Zucker von *S. Wendicke* und *S. Warnecke* (siehe Abschnitt 2.2.1.1).

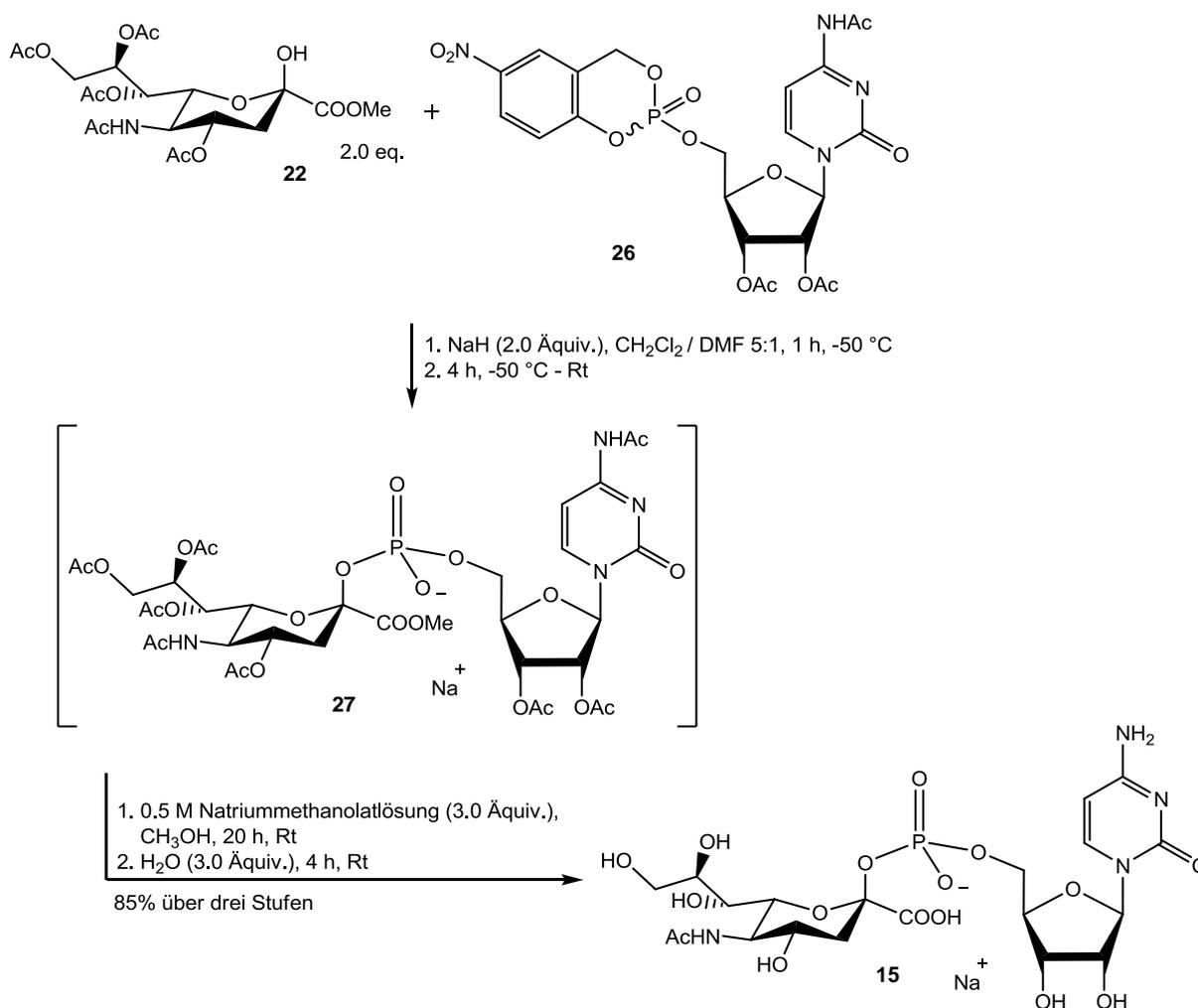


Abb. 22: Darstellung von CMP-Neu5Ac nach *Wolf et al.*^[2]

Als Nucleophil wird hier ebenfalls das vollständig geschützte Halbacetal des Neuraminsäurederivates **22** eingesetzt, welches zuvor durch Deprotonierung der 2-OH-Gruppe in ein Oxyanion überführt wird. Das nach der Kupplung erhaltene, selektiv blockierte Produkt weist bereits eine sehr hohe Reinheit auf, so dass direkt die Deblockierung der Schutzgruppen erfolgen kann. Die Darstellung von CMP-Neu5Ac **15** als reines β -Anomer erfolgt über drei Stufen mit einer Gesamtausbeute von 85%. Mit dieser Methode können auch Modifikationen an der Aminofunktion eingebracht werden. Die bereits erzielten Ausbeuten lagen zwischen 54 und 71% (Abschnitt 2.1.1.6).

3 Aufgabenstellung

Zuckernucleotide und die entsprechenden Glycosyltransferasen sind bei einer Vielzahl von biologisch wichtigen Glycosylierungsprozessen involviert. Hierzu gehören die Zell-Zell-Erkennung, die Signaltransduktion und die Immunantwort.^[9] Des Weiteren spielen sie eine zentrale Rolle bei Erkrankungen wie Entzündungen,^[22] Infektionen^[23] und Krebs.^[6] Speziell Glycane mit einem terminalen Fucose- oder Sialinsäure-Rest sind bei diesen Prozessen beteiligt.^[31,39-41] Die Darstellung modifizierter Guanosindiphosphat- β -L-fucose (GDP-Fuc)-Derivate bzw. Cytidinmonophosphat-*N*-acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac)-Derivate ist von großer Wichtigkeit, um die resultierenden Glycane oder die beteiligten Enzyme eingehender zu untersuchen oder um Zellstudien durchführen zu können.

Um Informationen über fucosylierte Glycoproteine, welche an physiologischen oder pathologischen Prozessen beteiligt sind oder Informationen über die Fucosyltransferaseaktivität zu bekommen, hat sich unter anderem der Einsatz von fluoreszenzmarkierten Substraten bewährt.^[1,43,53] Um einen breiten Zugang zu solchen Verbindungen zu ermöglichen, ist die Entwicklung geeigneter Synthesestrategien von zentraler Bedeutung.

Ein Ziel dieser Arbeit war es somit eine Syntheseroute zu entwickeln, in Anlehnung an die von *N. Lunau* entwickelte Syntheseroute,^[1] um fluoreszenzmarkierte GDP-Fucose-Derivate mit unterschiedlicher Linkerstruktur und -länge darzustellen (Abb. 23). Als Farbstoffderivate sollten Verbindungen eingesetzt werden, die sich durch eine gute Leuchtkraft und Quantenausbeute auszeichnen.

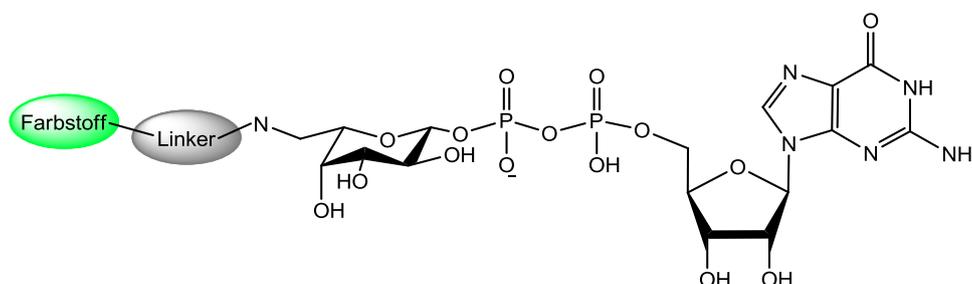


Abb. 23: Zu synthetisierende, fluoreszenzmarkierte Guanosindiphosphat-Fucose-Derivate.

Mit den dargestellten Verbindungen sollte in Fucosyltransferase-Studien, welche von *K. Seelhorst* aus der Arbeitsgruppe von *Prof. U. Hahn* an der Universität Hamburg durchgeführt werden sollten, überprüft werden, ob die Linkerstruktur und/oder -länge einen Einfluss auf die Substratakzeptanz von Fucosyltransferasen hat. Darüber hinaus sollte eine breite Anwendbarkeit der Methode durch Verwendung eines weiteren Nucleosids gewährleistet werden und somit ebenfalls eine Referenzsubstanz für die Fucosyltransferase-Studien bereitgestellt werden.

Um das Anwendungsgebiet von beispielsweise identifizierten Inhibitoren von Sialyltransferasen auf Zellstudien zu erweitern oder um intrazelluläre Prozesse untersuchen zu können, ist die Entwicklung von zellgängigen CMP-Neuraminsäure-Derivaten nötig. Daher war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Entwicklung einer solchen Synthesestrategie. Hierzu sollte die Lipophilie des Moleküls CMP-Neu5Ac **15** erhöht werden. In allen Fällen sollten Esterfunktionen verwendet werden, da diese durch Esterasen gespalten werden können. Da keine Informationen über die Stabilität eines bioreversibel vollständig geschützten CMP-Neu5Ac-Derivates zu Verfügung standen, sollten solche Derivate dargestellt werden (Abb. 24, links). Da sich die Verwendung von Acyloxybenzyl (AB)-Ethern zur Maskierung negativer Ladungen an Phosphaten bei verschiedenen Prodrugkonzepten bewährt hat,^[89,134-139] sollten diese auch hier eingesetzt werden. Es sollten zwei in Phosphatpuffer unterschiedlich stabile AB-Masken verwendet werden, um Informationen über die Stabilität der Derivate zu erhalten.

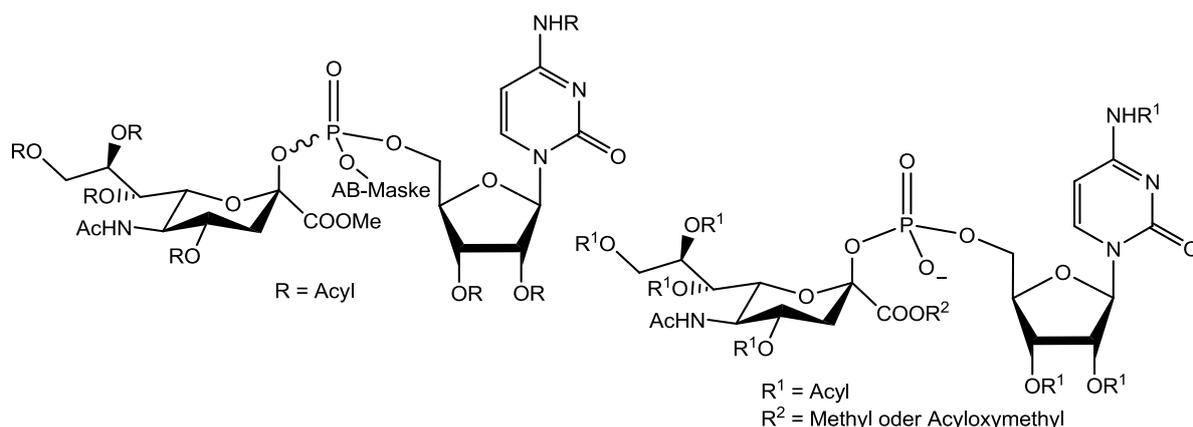


Abb. 24: Zu synthetisierende bioreversibel maskierte, lipophile Cytidinmonophosphat-*N*-acetylneuraminsäure-Derivate.

Die Hydroxylgruppen und die Aminofunktion sollten mit kurzkettigen Esterfunktionen geschützt werden. Die Säuregruppe sollte als Methyl ester vorliegen, da dieser bei den in Abschnitt 2.2.2.1 vorgestellten Syntheserouten verwendet wird.

Weiterhin sollten nicht vollständig geschützte CMP-Neu5Ac-Derivate dargestellt werden (Abb. 24, rechts). Diese sollten ebenfalls mit kurzkettigen Esterfunktionen geschützt werden. In diesem Fall sollten zwei verschiedene Säureschutzgruppen verwendet werden, um hier Informationen über die Stabilität unterschiedlich geschützter Carboxyl-Derivate zu erhalten. Es sollte auch hier der Methyl ester und zusätzlich eine Acyloxymethyl-Gruppe verwendet werden. Abschließend sollten die dargestellten Verbindungen anhand von chemischen und enzymatischen Hydrolysestudien auf ihre Stabilität und die Bildung von Hydrolyseprodukten hin untersucht werden.

Zuckernucleotide sind nicht nur an dem Aufbau von Glycanen beteiligt, sondern auch bei intrazellulären, regulatorischen Prozessen. Beispielsweise ist das Zuckernucleotid Adenosindiphosphat-Ribose (ADPR) **21** der potenteste Aktivator des Ionenkanals *transient receptor potential melastatin 2* (TRPM2).^[92-93,108] Das Einströmen von Calcium durch TRPM2 in das Zellinnere wurde für viele physiologische und pathologische Prozesse beschrieben. Hierzu gehören Insulinsekretion, proinflammatorische Cytokinproduktion, Zellreifung und Chemotaxis. Des Weiteren kann die Aktivierung des TRPM2 zum Ca²⁺-vermittelten Zelltod führen und die Aktivierung steht in Verbindung mit Krankheiten, welche durch oxidativen Stress ausgelöst werden.^[34,38] Die Durchführung von Zellstudien zur Aufklärung des Aktivierungsmechanismus von TRPM2 durch ADPR **21** ist daher von zentraler Bedeutung. Die Arbeitsgruppe von J. Yue^[38] zeigte das Potential von zellgängigen, monomaskierten ADPR-Derivaten. Allerdings verläuft die Synthese nicht selektiv zu einem Produkt und es kommt bei Zellen, die keinen TRPM2 präsentieren, bei der Abspaltung der verwendeten Maske durch Photolyse zu einem Einstrom von Calciumionen. Aus diesen Gründen war ein weiteres Ziel dieser Arbeit eine Synthesestrategie zu entwickeln, die den Zugang zu einem selektiv an einer Phosphatgruppe monomaskierten Derivat ermöglicht. Des Weiteren sollte durch die Verwendung einer AB-Maske am Phosphat eine Weiterentwicklung der in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Prodrug-Konzepte, das DiPPro- und das TriPPPro-Konzept,^[134-138,140] auf Nucleosiddiphosphat-Zucker erfolgen. Es sollte zum einen versucht werden, ob die Darstellung eines am α -Phosphat monomaskierten, aber ansonsten ungeschützten Derivates möglich ist (Abb. 25, links). Zum anderen sollte durch Verwendung von Acetylschutzgruppen die Lipophilie weiter erhöht werden. Zusätzlich sollten mit Letztgenanntem anomerenreine Verbindungen dargestellt werden (Abb. 25, rechts). Die Durchführung von chemischen und enzymatischen Hydrolysestudien sollte Informationen über die Stabilität der eingesetzten Verbindung und die Bildung von Hydrolyseprodukten geben.

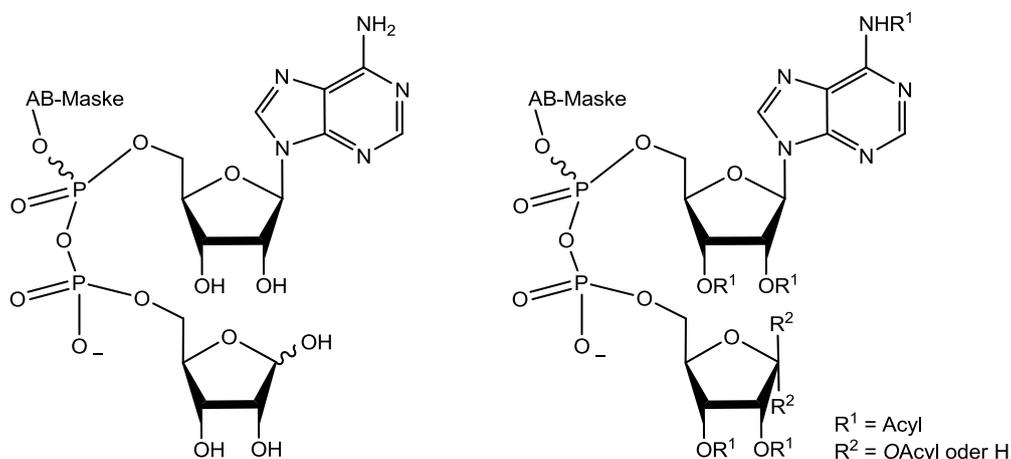


Abb. 25: Zu synthetisierende bioreversibel maskierte, lipophile Adenosindiphosphat-Ribose-Derivate.

4 Resultate und Diskussion

4.1 Darstellung potenter Tools für Fucosyltransferase-Studien

L-Fucose befindet sich häufig an der terminalen Position von Glycanen, die an wichtigen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt sind (Abschnitt 2.1.1.1). Die Erforschung dieser Glycane und der beteiligten Enzymen ist von großer Bedeutung. Wie in Abschnitt 2.1.1.3 beschrieben, ist die Entwicklung spezieller Markierungsmethoden zur Visualisierung von fucosylierten Glycanen sehr wichtig, um beispielsweise Glycoproteine zu visualisieren oder um Enzymaktivitäten analysieren zu können. Durch die Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Substrates der Fucosyltransferasen, ist es möglich, sowohl markierte Proteine zu detektieren als auch Informationen über die Aktivität der Fucosyltransferase zu erhalten.

4.1.1 Synthese fluoreszenzmarkierter Nucleosiddiphosphat-Zucker

Für die Darstellung von Nucleosiddiphosphat-Zuckern hat sich die *cycloSal*-Methode in Bezug auf Ausbeuten, Anomerenreinheit und der vielseitigen Anwendbarkeit bewährt.^[1,120-122] *N. Lunau* gelang bereits die erfolgreiche Darstellung des fluoreszenzmarkierten GDP-Fucose-Derivates ATTO 550-Guanosindiphosphat-6-amino-6-desoxy- β -L-galactose **7** in guten Ausbeuten.^[1] Die Reaktionsabfolge wird im Folgenden erläutert und ist in Abb. 27 abgebildet. Der verwendete ATTO 550-Farbstoff stellt mit dem bei dem Akzeptorsubstrat **8** ebenfalls eingesetzten Farbstoff ATTO 647N ein FRET-Paar dar. Mit dem Derivat **7** wurde, wie in Abschnitt 2.1.1.3 beschrieben, die Aktivität der humanen Fucosyltransferase IX analysiert. Es ist ebenfalls möglich, dieses markierte Substrat **7** zur Markierung von Glycoproteinen oder in Hochdurchsatz-Screenings (*high-throughput-screening*, HTS) zur Identifizierung von Fucosyltransferase-Inhibitoren zu verwenden (Abschnitt 2.1.1.3). Der Einsatz hochpreisiger FRET-Farbstoffe ist hier nicht erforderlich, weshalb ein anderer Farbstoff verwendet werden sollte. ATTO-Farbstoffe zeichnen sich im Allgemeinen durch eine hohe Photo- und Thermostabilität und eine hohe Quantenausbeute aus (0.8). Diese Farbstoffe haben jedoch häufig sperrige Strukturen und Gruppen, welche Ladungen tragen. Darüber hinaus werden nicht alle Strukturen der ATTO-Farbstoffe veröffentlicht. Die Struktur des ATTO 550 Farbstoffes ist zum Beispiel nicht bekannt.^[141] Die geladenen Gruppen können beispielsweise den Einsatz in lebenden Zellen ausschließen, da die Zellmembran eventuell nicht passiert werden kann. Neben den ATTO-Farbstoffen gehören Alexa Fluor-Farbstoffe^[142] und auch siliciumhaltige Rhodaminfluorophore (SiR)^[143] zu den in den letzten beiden Jahrzehnten entwickelten Fluorophoren. Die Alexa Fluor-Farbstoffe weisen ähnliche Eigenschaften auf wie die ATTO-Farbstoffe.^[144] Das Alexa Fluor 488 **28** ist exemplarisch in der Abbildung 26 links gezeigt. Zu den Fluorophoren, welche bereits seit langem

Verwendung finden, gehören unter anderem Fluorescein-Derivate wie beispielsweise Fluorescein/isothiocyanat (FITC) **29** (Abb. 26, Mitte) und Rhodamin-Derivate wie das Tetramethylrhodamin **30** (Abb. 26, rechts). Viele Labelingstrategien konzentrieren sich auf diese klassischen Fluorophore, da sie sich durch eine gute Leuchtkraft mit geringer Größe auszeichnen. Darüber hinaus weisen sie eine gute Zellpermeabilität auf, da sie keine Nettoladung aufweisen. Allerdings sind beispielsweise Fluorescein-Derivate anfälliger für Photobleaching als beispielsweise ATTO-Fluorophore. Die Quantenausbeute ist jedoch im Vergleich zu ATTO-Fluorophoren ebenfalls sehr gut und liegt je nach Reaktionsbedingungen in einem Bereich von 0.4-0.9.^[144-145] Fluorescein-Derivate stellen somit zu dem von *N. Lunau* verwendeten ATTO 550-Farbstoff eine sehr gute Alternative dar, um in Fucosyltransferase-Studien eingesetzt zu werden.

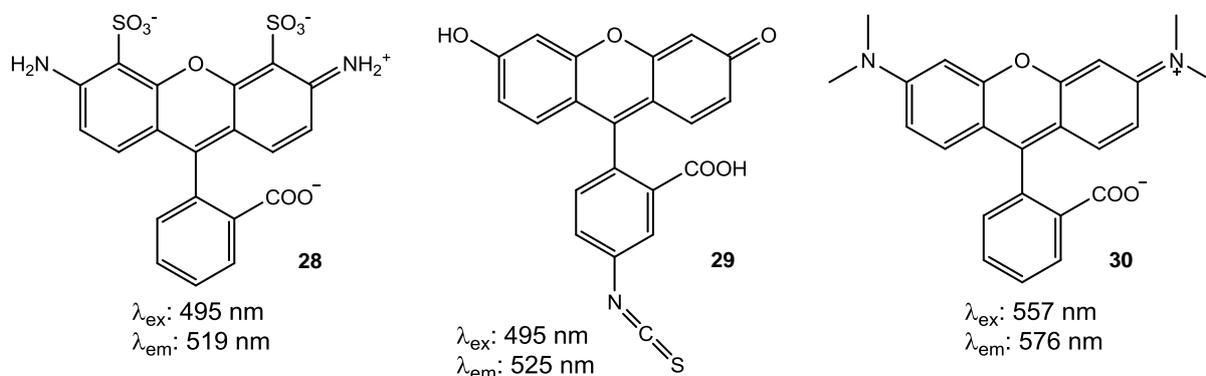


Abb. 26: Die Fluorophore Alexa Fluor 488 **28** (links) Fluorescein/isothiocyanat **29** (Mitte) und Tetramethylrhodamin **30** (rechts).

Die von *N. Lunau* entwickelte Synthesestrategie zur Darstellung der ATTO 550-markierten Guanosindiphosphat-6-amino-6-desoxy-β-L-galactose **7** (Abb. 27) zeichnet sich speziell durch die Entwicklung einer 7-stufigen Syntheseroute zur Darstellung des zentralen Synthesebausteins, dem Azid-modifizierten Galactosylphosphat **31**, mit einer Gesamtausbeute von 9% aus.^[1,146] Ausgehend von L-Galacto-1,4-lacton **32** erfolgte durch Reduktion die Darstellung von L-Galactose **33** und anschließender Schützung mit Isopropylidenacetalen zu dem Derivat **34**. Nach Einführung einer Tosylgruppe an der C6 OH-Gruppe **35** erfolgte die Umwandlung in das Azid **36**. Anschließend wurde ein Austausch der Isopropylidenacetale gegen Acetylgruppen zur Darstellung der Verbindung **37** durchgeführt. Abschließend wurde das Galactosylbromid **38** und daraus das Galactosylphosphat **31** generiert. Zuvor entwickelte Synthesestrategien erstreckten sich über deutlich mehr Stufen.^[43] Darüber hinaus stellt die Syntheseroute eine gute Möglichkeit dar, um an der C6-Position des Zucker-Restes verschiedene Farbstoffe sowohl in das Azid-modifizierte GDP-Fuc-Derivat **5** als auch in das Amin-modifizierte GDP-Fuc-Derivat **39** (Abb. 27) einzuführen. Für den Kupplungsschritt zu dem Derivat **5** hat *N. Lunau* die *cycloSal*-Methode verwendet. Dieser Schritt gelingt durch

Kupplung mit dem Guanosin-*cycloSal*-Triester **40** mit einer Ausbeute von 41% über zwei Stufen (Abb. 27). Andere Syntheserouten, wie beispielsweise die von *Maeda et al.*,^[43] verwenden für den zentralen Kupplungsschritt zu dem Azid-modifizierten GDP-Fucose-Derivat **5** Phosphormorpholidatchemie. Dieser Schritt gelingt lediglich mit einer Ausbeute von 11%.

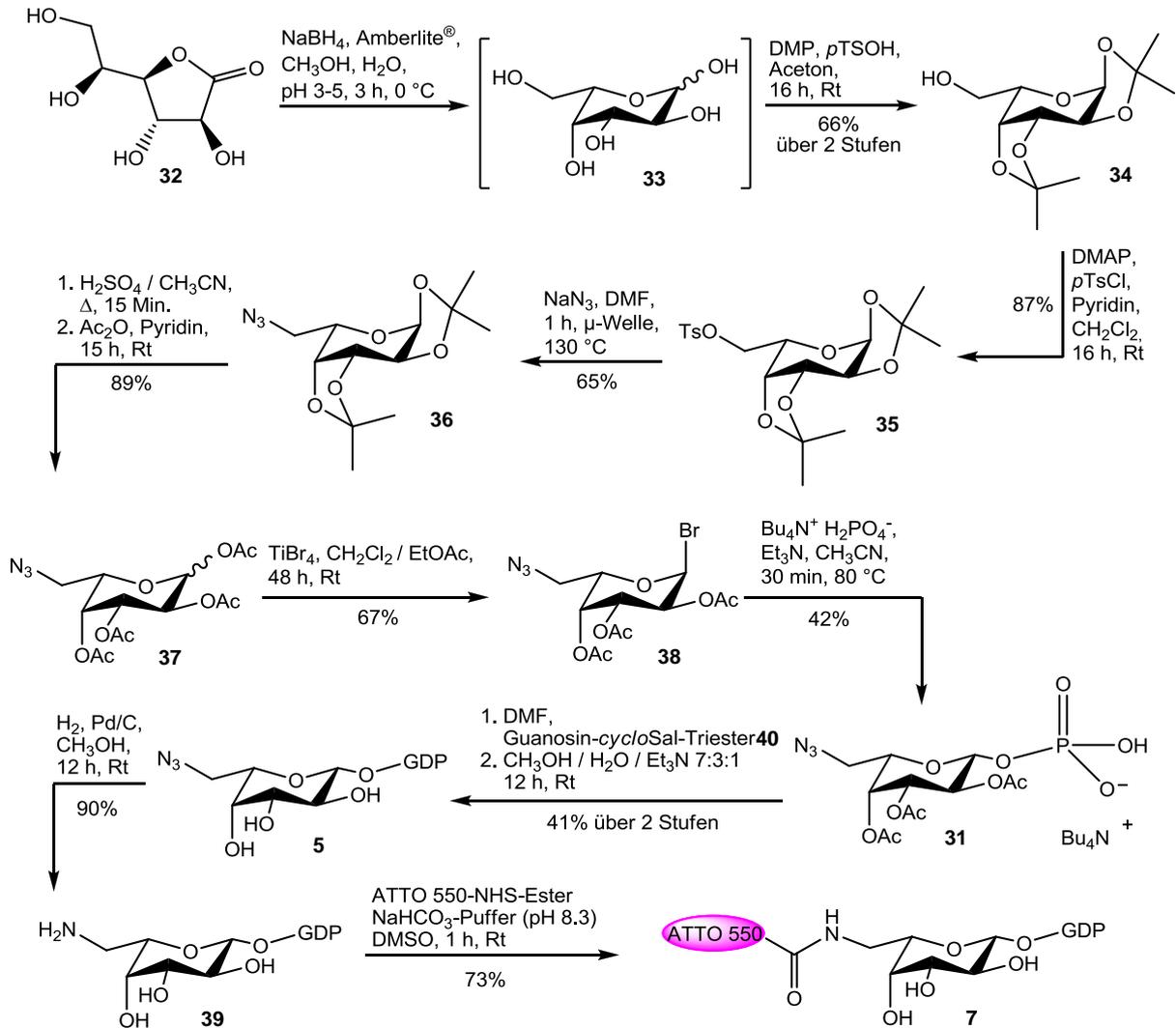


Abb. 27: Syntheseroute von *N. Lunau* zur Darstellung ATTO 550-markierter Guanosindiphosphat-6-amino-6-desoxy- β -L-galactose **7**.^[1,146]

Aus den genannten Gründen eignet sich die Synthesemethode von *N. Lunau* für die Fluoreszenzmarkierung verschiedener NDP-Zucker und sollte somit als Grundlage für die Darstellung der fluoreszenzmarkierten NDP-Zucker **41-43** dienen. In Abbildung 28 ist das Retrosyntheschema zur Darstellung der verschiedenen fluoreszenzmarkierten NDP-Zucker **41-43** dargestellt. Die erste Verbrückung zur Darstellung des FITC-Thioharnstoffverbrückten GDP-Fucose-Derivates **41** sollte durch Umsetzung des Amin-modifizierten GDP-Fuc-Derivates **32** mit Fluorescein/isothiocyanat (FITC) **29** erfolgen. Das Amin-Derivat **39**

sollte durch Hydrierung aus dem Azid-modifiziertem GDP-Fucose-Derivat **5** erhalten werden. Dieser Hydrierungsschritt schließt die Anwendbarkeit der Syntheseroute auf hydrierempfindliche Verbindungen aus. Die Syntheseroute zur Einführung einer zweiten Verbrückung sollte daher keinen Hydrierungsschritt enthalten. Zur Überprüfung, ob die Methode eine breite Anwendbarkeit ermöglicht, sollte ein weiteres Nucleosid verwendet werden. Zwei Faktoren weisen Uridin als ideale Nucleobase für eine Überprüfung der Erweiterung der neuen Syntheseroute aus. Bei dem Nucleosid Uridin handelt es sich im Gegensatz zu Guanosin um eine Pyrimidinbase, welche am Häufigsten als Nucleobase in Säugetier-Zuckernucleotiden vorkommt (Abschnitt 1). Des Weiteren weist Uridin zwischen dem C5- und dem C6-Kohlenstoffatom eine Doppelbindung auf. Diese ist empfindlich gegenüber Hydrogenolyse.

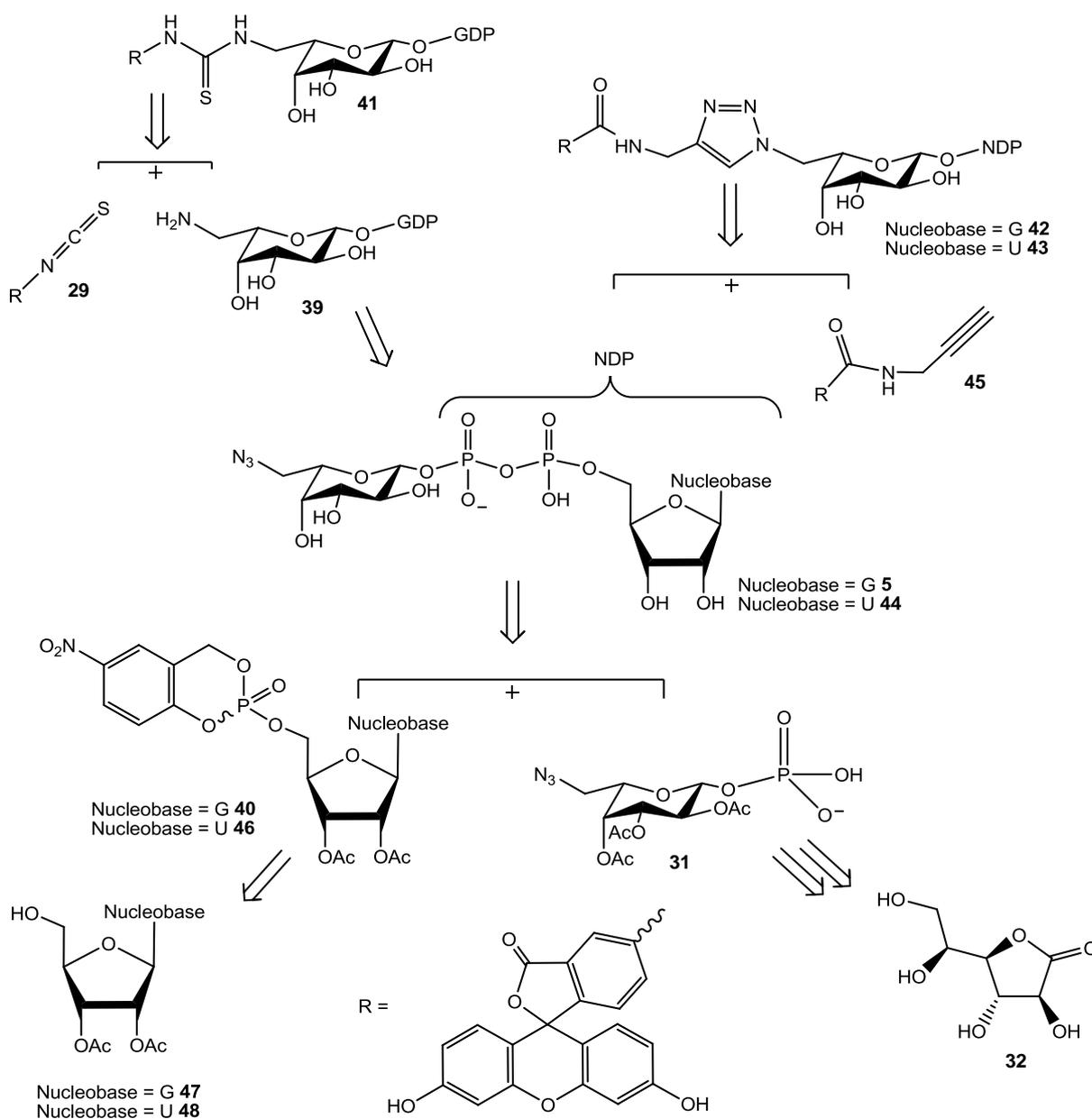


Abb. 28: Retrosyntheseschema zur Darstellung der fluoreszenzmarkierten-NDP-Fucose-Derivate **41-43**.

Die zweite Verbrückung sollte somit durch Umsetzung der Azid-modifizierten GDP/UDP-Fuc-Derivate **5** bzw. **44** mit dem Fluorescein-Derivat 5-Carboxyfluorescein-Alkin (5-FAM)-Alkin **45** erfolgen. Die Azid-modifizierten NDP-Fucose-Derivate **5** und **44** sollten ausgehend von dem Azid-modifizierten Glycosylphosphat **31** und dem entsprechenden *cycloSal*-Triester **40** bzw. **46** dargestellt werden. Für die Darstellung des Azid-modifizierten Glycosylphosphates **31** sollte die von *N. Lunau* entwickelte Syntheseroute ausgehend von L-Galacto-1,4-lacton **32** als Grundlage dienen (Abb. 27).^[1] Die Darstellung der *cycloSal*-Triester **40** und **46** sollte nach einer etablierten Methode aus dem entsprechenden Nucleosid **47** bzw. **48** erfolgen.^[120,122,147]

4.1.1.1 Synthese der benötigten Kupplungsbausteine: Die *cycloSal*-Triester **40** und **46** und das Azid-modifizierte Galactosephosphat-Derivat **31**

Für die Umsetzung eines *cycloSal*-Triesters mit einem Pyranosylphosphat zu einem NDP-Zucker ist es von Vorteil, wenn die Hydroxylgruppen des *cycloSal*-Nucleotids in Position 2' und 3' blockiert sind und nur die 5'-Hydroxylgruppe frei zugänglich ist. Dies gewährleistet eine selektive Synthese, da alle weiteren reaktiven Positionen geschützt sind. Für die Darstellung der selektiv blockierten Nucleoside **47** und **48** mussten zwei verschiedene Synthesewege gewählt werden. Die Darstellung des 2,3-Diacetyluridins **48** erfolgte nach einer etablierten Methode zur Darstellung 2',3'-acetylierter Nucleoside durch Verwendung einer orthogonale Schutzgruppenstrategie (Abb. 29).^[120,122,148-150] Unter Inertgasatmosphäre wurde zunächst selektiv die 5'-Hydroxylgruppe von Uridin **49** mit *tert*-Butyldimethylsilylchlorid blockiert. Anschließend wurde das 5'-O-geschützte Nucleosid mit Essigsäureanhydrid zu 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-di-O-acetyluridin **50** umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde das Produkt **50** in einer Ausbeute von 93% erhalten.

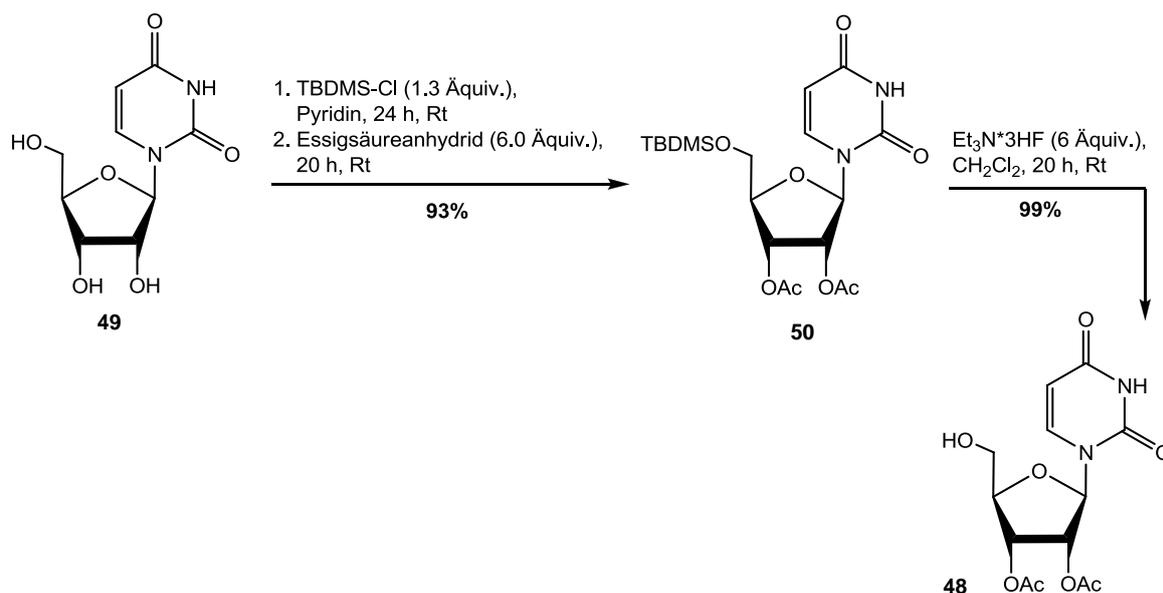


Abb. 29: Synthese von 2,3-Diacetyluridin **48**.

Zur Entfernung der TBDMS-Schutzgruppe wurde das Nucleosid **50** in Dichlormethan gelöst und durch Zugabe von $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$ als Fluorid-Donor gespalten. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde das Produkt 2',3'-Diacetyluridin **48** in einer Ausbeute von 99% erhalten.

Die Darstellung von *N*²-Acetyl-2',3'-di-*O*-acetylguanosin **47** erfolgte nicht über den eben beschriebenen Syntheseweg. Bei der Silylierung von Guanosin **51** wurde von *T. Zismann*^[151] beobachtet, dass neben dem einfach silylierten Produkt in 5'-Position auch das zweifach silylierte Produkt in 3'- und 5'-Position erhalten wird. Die Trennung ist auf Grund ähnlicher *R_f*-Werte sehr schwierig. Diese Methode ist daher für die Darstellung des Nucleosids **47** nicht geeignet. Aus diesem Grund wurde Guanosin **51** zunächst mit Essigsäureanhydrid unter basischen Bedingungen nach *Panero et al.* peracetyliert (Abb. 30).^[152] Nach mehrfacher säulenchromatographischer Reinigung wurde das Produkt **52** in einer Ausbeute von 50% erhalten. Als Hauptgrund für die moderate Ausbeute ist zu nennen, dass sich das Produkt nach der wässrigen Aufarbeitung auch in der wässrigen Phase befand. Eine Extraktion aus der wässrigen Phase war nicht erfolgreich. Bei künftigen Reaktionen sollte auf diesen Aufarbeitungsschritt verzichtet werden. Des Weiteren zeigte sich die Abtrennung von nicht vollständig umgesetztem Edukt und nicht peracetylierten Nebenprodukten als sehr schwierig. Weitere Produktfraktionen lagen noch als Mischfraktionen vor.

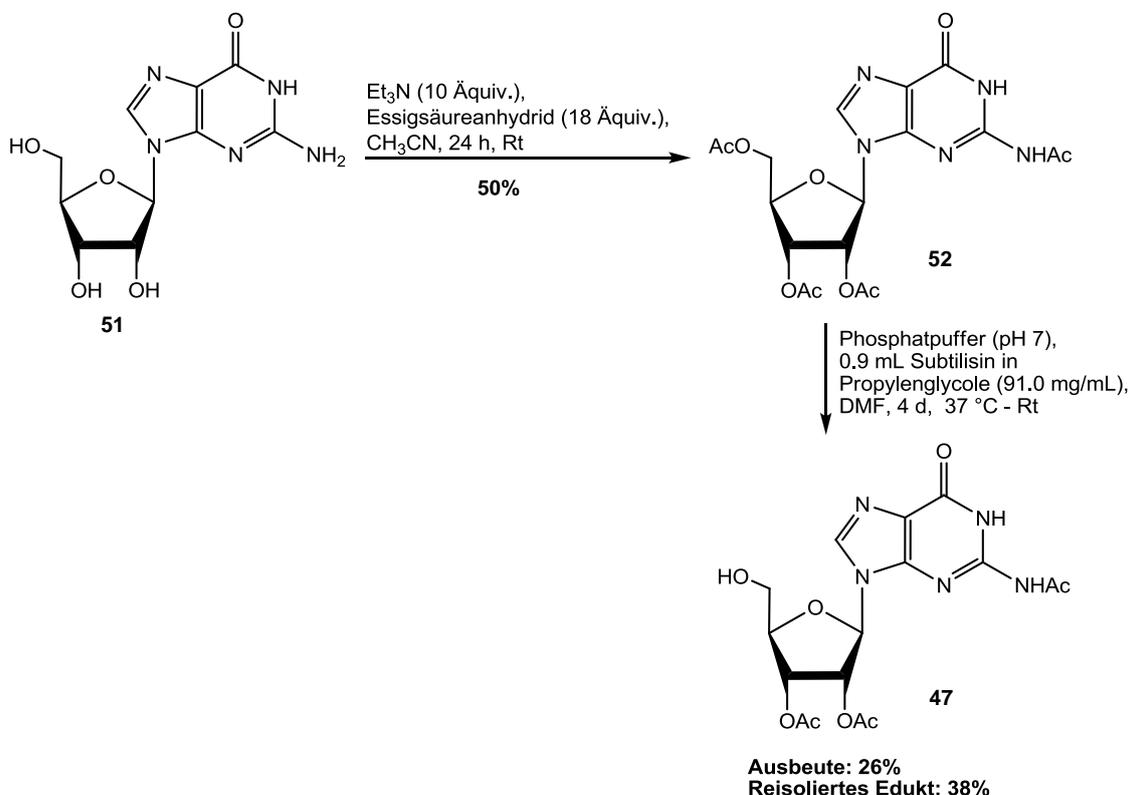


Abb. 30: Synthese von *N*²-Acetyl-2',3'-di-*O*-acetylguanosin **47**.

Im zweiten Reaktionsschritt erfolgte die Darstellung des 5'-OH-freien Nucleosids **47** über eine enzymatisch-katalysierte, regioselektive Deacetylierung in der 5'-Position nach einer von *Singh et al.* entwickelten Methode mit dem Enzym Subtilisin.^[153] Auch hier waren mehrere langwierige säulenchromatographische Schritte für eine vollständige Reinigung nötig. Die Trennung wurde durch sehr ähnliche Retentionsfaktoren von Edukt, Produkt und unselektiv deacetylierten Nebenprodukten erschwert. Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 26% erhalten. Des Weiteren konnten 38% des Eduktes **52** reisoliert werden.

Die Darstellung der *cycloSal*-Triester **40** und **46** erfolgte durch Umsetzung der selektiv blockierten Nucleoside **47** und **48** mit 5-Nitro-*cycloSal*igenylchlorphosphit **53** (Abb. 31). Das Chlorphosphit **53** wurde ausgehend von 5-Nitrosalicylaldehyd **54** über zwei Stufen dargestellt. Zunächst wurde 5-Nitrosalicylalkohol **55** durch Reduktion von 5-Nitrosalicylaldehyd **54** erhalten. Das Produkt **55** wurde durch Kristallisation aus Wasser in einer Ausbeute von 77% dargestellt. Anschließend erfolgte mit Phosphor(III)-chlorid die Umsetzung von 5-Nitrosalicylalkohol **55** zu 5-Nitro-*cycloSal*igenylchlorphosphit **53** in Diethylether. Dieses konnte nach Aufarbeitung als farbloses Öl in einer Rohausbeute von 57% dargestellt werden. Zur Abtrennung des während der Reaktion entstandenen Pyridiumchlorids erfolgte eine Schlenk-Filtration. Da das Pyridiumchlorid teilweise in Diethylether löslich ist, wurde auf ein Waschen des Rückstandes mit Diethylether verzichtet. Wahrscheinlich kam es bei diesem Schritt zu Produktverlusten. Das ³¹P-NMR- sowie das ¹H-NMR-Spektrum des Chlorphosphits **53** zeigte eine hohe Reinheit, so dass aufgrund der hohen Empfindlichkeit gegenüber Luftfeuchtigkeit auf eine Reinigung verzichtet wurde. Das Chlorphosphit **53** wurde als Rohprodukt in der weiteren Synthese eingesetzt.

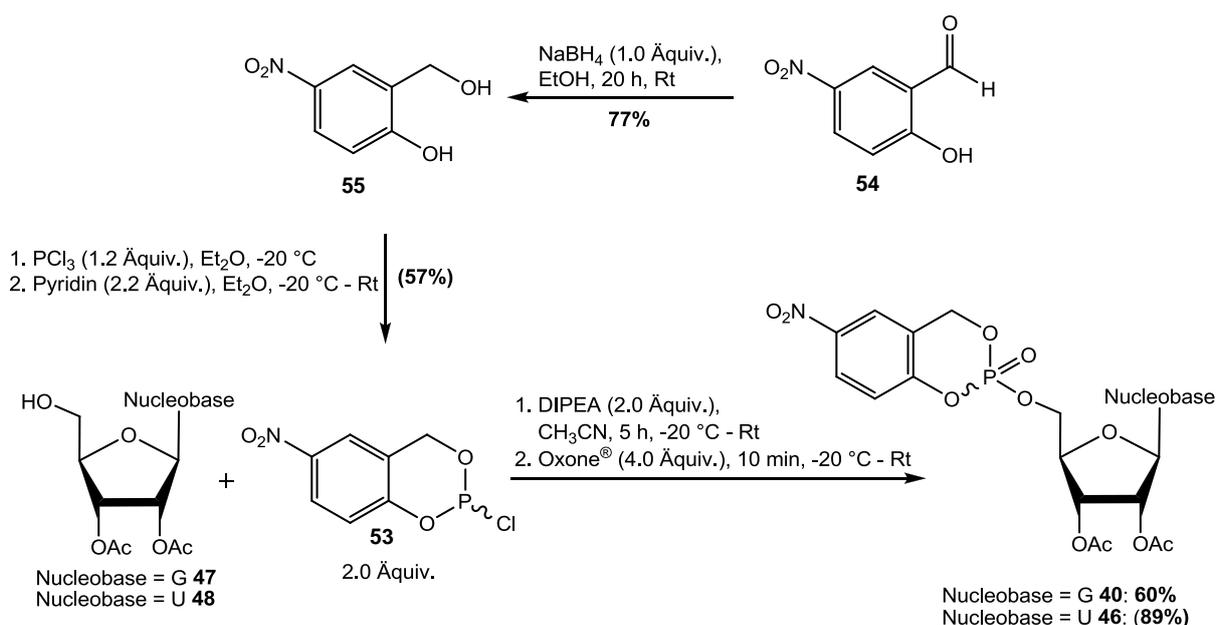


Abb. 31: Synthese der *cycloSal*-Triester **45** und **46**.

Die Synthese der *cycloSal*-Triester **40** und **46** erfolgte in zwei Stufen in einer Eintopf-Reaktion. Zu Beginn erfolgte die Umsetzung des entsprechenden Nucleosids **47** bzw. **48** mit dem *cycloSal*-Chlorphosphit **53**. Anschließend erfolgte durch Oxone[®] die Oxidation des entsprechenden Phosphittriesters zu der entsprechenden Phosphor(V)-Verbindung. Der Uridin-Triester **46** wurde als farblose Watte mit einer Rohausbeute von 89% als Gemisch zweier Diastereomere erhalten. Da das ³¹P-NMR-Spektrum bereits eine hohe Reinheit aufwies, wurde aufgrund der hohen Reaktivität des Produktes auf eine säulenchromatographische Reinigung verzichtet. Die Darstellung von GDP-Zuckern erfolgte ungeklärter Weise mit deutlich geringeren Ausbeuten als die der anderen Nucleobasen Uridin, Adenosin, Thymin und Cytosin.^[120,122] Aus diesem Grund wurde eine säulenchromatographische Reinigung des Guanosin-Triesters **40** mit CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1 v/v durchgeführt, um eine mögliche Beeinträchtigung der Kupplungsreaktion durch nicht abgetrennte Oxone-Salze auszuschließen. Das Produkt **40** wurde mit einer Ausbeute von 60% nach säulenchromatographischer Reinigung erhalten. Die ³¹P-NMR-Spektren der *cycloSal*-Triester **40** und **46** zeigten die für 5-Nitro-*cycloSal*-Triester typischen Verschiebungen von -10.3 und -10.7 ppm in CDCl₃.^[130]

Die Darstellung von 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-azido-β-L-galactopyranosylphosphat **31** erfolgte analog zu der von *N. Lunau* entwickelten Syntheseroute.^[1] Zunächst sollte die Darstellung von 1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden-L-galactopyranose **34** ausgehend von L-Galactono-1,4-lacton **32** über zwei Stufen erfolgen (Abb. 32). Zuerst wurde L-Galactono-1,4-lacton **32** in einem Methanol/Wasser-Gemisch gelöst. Die Reduktion des Eduktes zu L-Galactopyranose **33** erfolgte mit Natriumborhydrid in Gegenwart von Amberlite[®]. Wichtig bei dieser Reaktion ist, dass der pH-Wert zwischen 3-5 gehalten wird.^[154] Die erhaltene L-Galactopyranose **33** wurde ohne weitere Reinigung mit 2,2-Dimethoxypropan (DMP) und einer katalytischen Menge *para*-Toluolsulfonsäure (*p*TsOH) zu 1,2:3,4-Di-*O*-isopropyliden-L-galactopyranose **34** umgesetzt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch. Das ¹H-NMR-Spektrum zeigte jedoch, dass auch nach mehrfacher säulenchromatographischer Reinigung kein sauberes Produkt erhalten werden konnte. Es wurden sehr viele Nebenprodukte erhalten, die nicht identifiziert werden konnten. Da es sich bei dem Produkt **34** um ein farbloses Öl handelt, war auch eine Reinigung durch Ausfällen oder Umkristallisation nicht möglich. Deshalb wurde direkt die Tosylierung (Abb. 32) angeschlossen, da so aufgrund einer möglichen Veränderung der *R_F*-Werte eine bessere Reinigung erhofft wurde. Hierzu wurde das Rohprodukt **34** in Pyridin gelöst und mit *para*-Toluolsulfonylchlorid (*p*TsCl) und *N,N*-Dimethylaminopyridin (DMAP) versetzt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch gereinigt. Zur vollständigen Reinigung waren zwei säulenchromatographische Schritte nötig. Der Tosylzucker **35** wurde in einer geringen Ausbeute von 12% über drei Stufen erhalten und lag, wie erwartet, als reines α-Anomer vor.

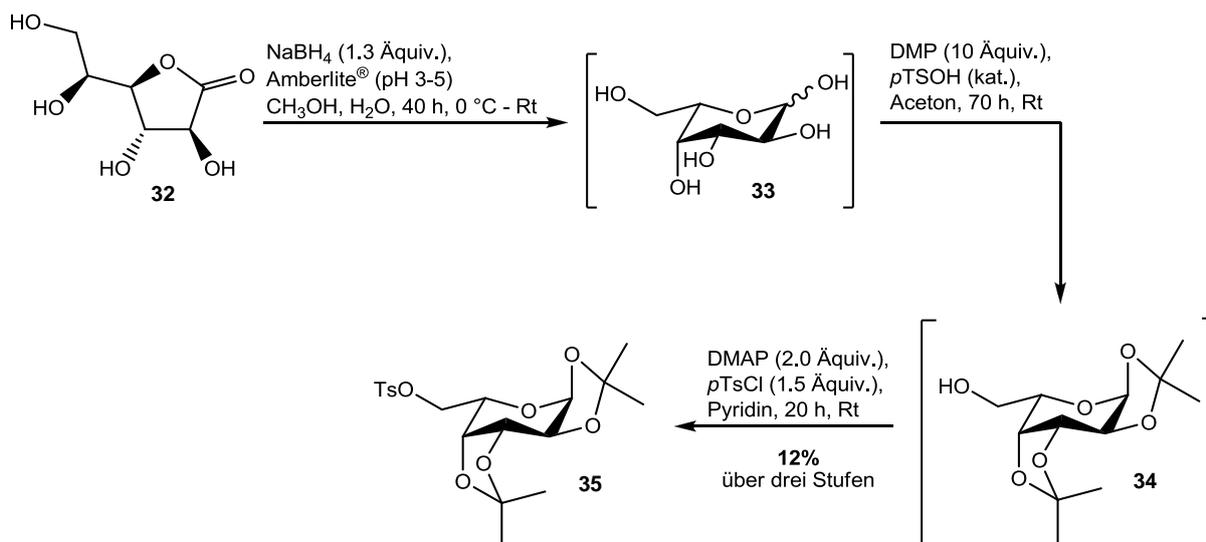


Abb. 32: Synthese des Tosylzuckers **35** über drei Stufen.

Da es hauptsächlich bei der *Isopropyliden*-Schützung nach der vorangegangenen Reduktion zu der Bildung einer hohen Anzahl von Nebenprodukten kam, wurde nach der Reduktion unter Standardbedingungen eine vollständige Acetylierung der Hydroxylgruppen durchgeführt (Abb. 33). Es wurde angenommen, dass die Reinigung des peracetylierten Produktes **56** aufgrund eines anderen R_F -Wertes als der der Verbindung **34** besser möglich wäre. Erfreulicherweise konnte die peracetylierte L-Galactose **56** in einer Ausbeute von 56% über zwei Stufen erhalten werden. Ein Grund für die moderate Ausbeute ist, dass auch nach einer Reaktionszeit von 48 h kein vollständiger Umsatz des Eduktes **32** festgestellt werden konnte. Da keine Veränderung mehr mittels Dünnschichtchromatographie detektiert wurde, wurde mit der Acetylierung fortgefahren.

Danach erfolgte die Entfernung der Acetylschutzgruppen unter basischen Bedingungen in einem Gemisch aus $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{Et}_3\text{N}$ und die Schützung mit *Isopropyliden*-Schutzgruppen, da hier die 6-OH-Gruppe freizugänglich für die Einführung des Azids blieb. Die Reaktion erfolgte analog der zuvor durchgeführten Synthese. Die Darstellung der 1,2:3,4-*Isopropyliden* geschützten L-Galactose **34** gelang durch den Umweg über die peracetylierte Verbindung **56** in einer Ausbeute von 59% über zwei Stufen.

Anschließend wurde die 6-OH-Gruppe tosyliert, um eine bessere Austrittsgruppe für die folgende Einführung der Azid-Gruppe zu erhalten, ebenfalls analog zu der zuvor durchgeführten Reaktion. Die Synthese von 1,2:3,4-Di-*O-isopropyliden*-6-*O-para*-toluolsulfonyl-L-galactopyranose **35** gelang in einer sehr guten Ausbeute von 79%.

Nach der erfolgreichen Darstellung des L-Tosylzuckers **35** erfolgte die Darstellung von 6-Azido-1,2:3,4-di-*O-isopropyliden*-L-galactopyranose **36**. Hierzu wurde das Derivat **35** in Dimethylformamid gelöst und mit Natriumazid in einer S_N -Reaktion unter Mikrowellenbedingungen umgesetzt. Nach wässriger Aufarbeitung erfolgte eine säulenchromatogra-

phische Reinigung. Der Azid-*isopropyliden*zucker **36** wurde in einer Ausbeute von 93% erhalten. Die Erhöhung der Ausbeute von 64% (*N. Lunau*)^[1] auf über 90% gelang durch die Verlängerung der Reaktionszeit auf drei Stunden. Die erfolgreiche Einführung der Azidgruppe wurde IR-spektroskopisch anhand der für organische Azide typischen Valenzschwingung von 2100 cm⁻¹ belegt.

Im nächsten Reaktionsschritt erfolgte ein Austausch der *Isopropyliden*-Schutzgruppen gegen Acetylschutzgruppen, um eine basische Abspaltung der Schutzgruppen des NDP-Zuckers zu ermöglichen. Die Entfernung der *Isopropyliden*-Schutzgruppen erfolgte durch saure Katalyse in einem Gemisch aus Acetonitril/Wasser. Nach wässriger Aufarbeitung des Rohproduktes erfolgte die Acetylierung unter Standardbedingungen. Das Produkt **37** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 99% erhalten.

Im Folgenden wurde das gewünschte β -L-Phosphat **31** nach der Koenigs-Knorr-Methode dargestellt. Bei der Koenigs-Knorr-Methode dienen Glycosylhalogenide in Gegenwart von Silbercarbonat zur Glycosylübertragung auf Nucleophile.^[155] Hierzu erfolgte zunächst die Darstellung des α -L-Bromids **38** aus dem peracetylierten L-6-Azid-Zucker **37** nach dem Syntheseprotokoll von *Srivastava et al.*^[156] Als Bromierungsreagenz wurde Titan-tetrabromid verwendet. Das Produkt **38** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 57% erhalten.

In einem letzten Syntheseschritt erfolgte die Phosphorylierung des anomeren Kohlenstoffs mit Tetrabutylammoniumphosphat. Die hohe Reaktionstemperatur von 80 °C ermöglicht eine Kontrolle der Stereochemie am anomeren Zentrum. Dadurch wird selektiv das kinetisch begünstigte β -Phosphat **31** gebildet. Dieses konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 61% erhalten werden. Das bei dieser Reaktion eingesetzte Phosphorylierungsreagenz ist hygroskopisch. Aus diesem Grund war die Durchführung der Reaktion unter wasserfreien Bedingungen erschwert. Als Nebenreaktion trat sehr wahrscheinlich die hydrolytische Spaltung des Bromids **38** auf. Es wurden jedoch keine Nebenprodukte isoliert, da bei der säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel ein sehr polares Lösungsmittelgemisch von CH₃CN/H₂O 5:1 verwendet wurde. Das Rohprodukt wurde als Suspension aufgetragen. Es ist daher denkbar, dass mögliche Nebenprodukte nicht eluiert wurden. Die zuvor publizierte Ausbeute lag bei 42% (Abschnitt 4.1.1, Abb. 27).

Bei der Darstellung des Azid-modifizierten Zuckerphosphates **31** erwiesen sich die ersten beiden Reaktionsschritte als nicht reproduzierbar. Die Verwendung eines weiteren Syntheseschrittes war daher notwendig. Durch Optimierung der Syntheseroute gelang jedoch speziell durch den zusätzlichen Syntheseschritt zu Beginn, durch die Verlängerung der Reaktionszeit bei der Einführung der Azidgruppe und durch die gute Ausbeute bei dem Phosphorylierungsschritt des anomeren Kohlenstoffs die Darstellung des gewünschten β -L-Phosphates **31** mit

einer Gesamtausbeute von 8.4%. Diese ist analog der von *N. Lunau* erreichten Gesamtausbeute (Abschnitt 4.1.1).

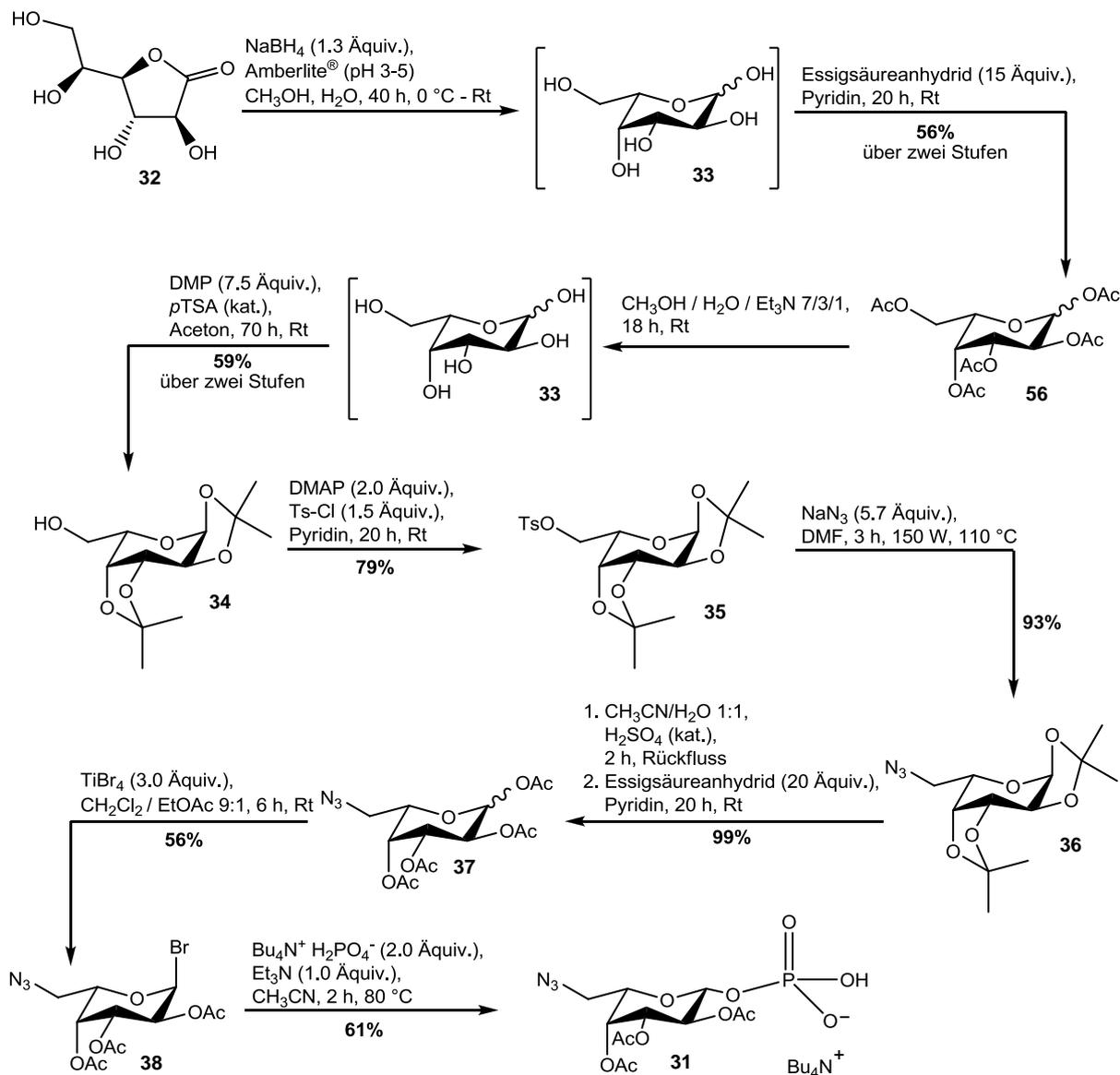


Abb. 33: Synthese des zweiten Bausteins **31** zur Darstellung fluoreszenzmarkierter NDP-Zucker.

4.1.1.2 Synthese der fluoreszenzmarkierten NDP-Fucose-Derivate 41-43

Nach der erfolgreichen Darstellung der benötigten Bausteine **31**, **40** und **46** zur Darstellung der Azid-modifizierten NDP-Fucose-Derivate **5** und **44** erfolgten abschließend die Synthesen der fluoreszenzmarkierten NDP-Fucose-Derivate **41-43** (Abb. 34). Die Darstellung der Azid-modifizierten NDP-Fucose-Derivate **5** und **44** erfolgte über zwei Stufen in einer Eintopfreaktion nach einem etablierten Syntheseprotokoll.^[120,122] In dem ersten Syntheseschritt erfolgte die Kupplung zu dem entsprechenden vollständig peracetylierten Azid-modifizierten NDP-Fucose-Derivat. Nach Aufarbeitung des Rohproduktes erfolgte die basische Abspaltung der Acetylenschutzgruppen in einem Gemisch aus $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{Et}_3\text{N}$. Das

Azid-modifizierte UDP-Fucose-Derivat **44** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in einer sehr guten Ausbeute von 73% als Triethylammoniumsalz erhalten werden.

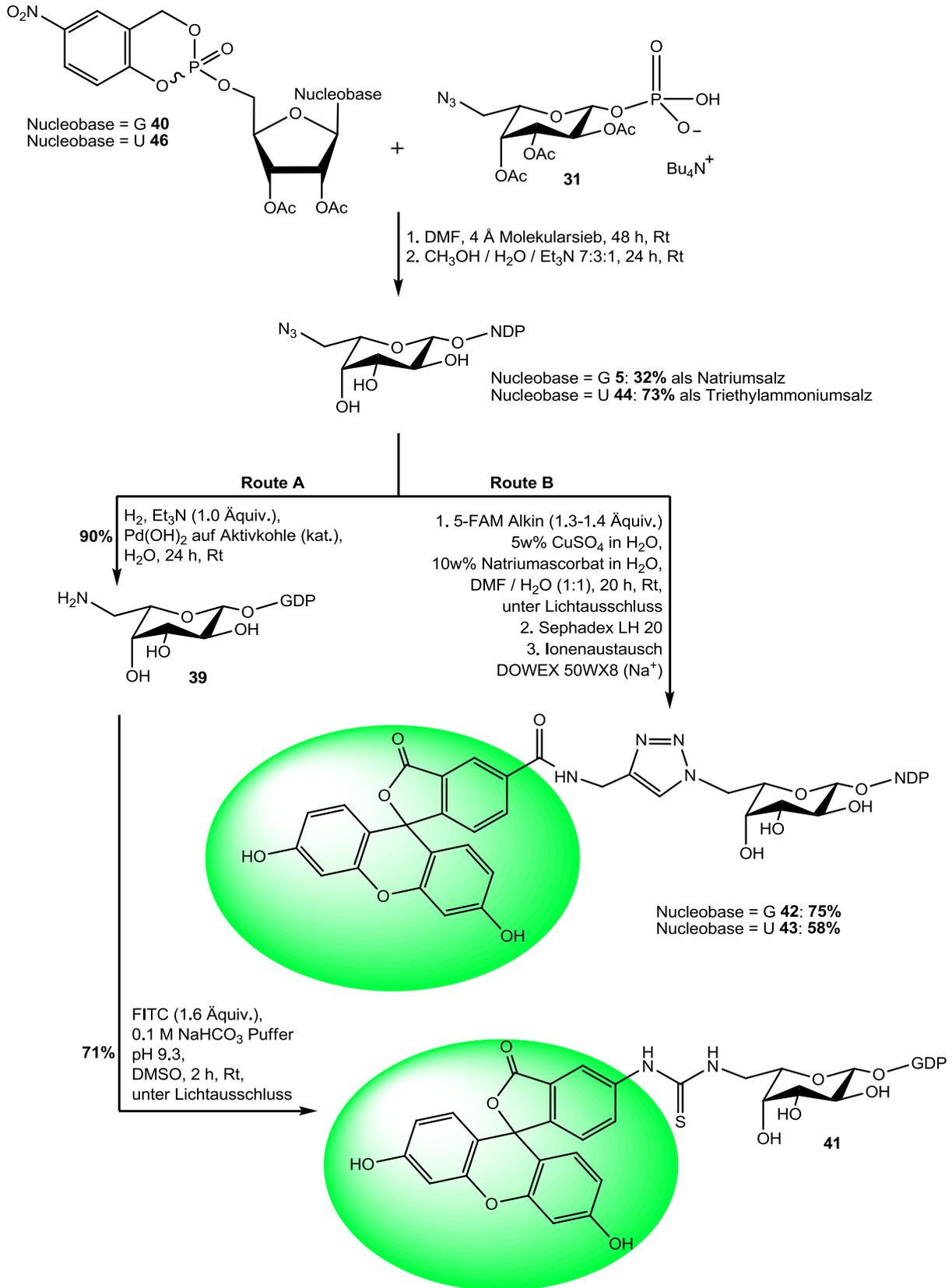


Abb. 34: Synthese der fluoreszenzmarkierten NDP-Zucker **41-43**.

Das Azid-modifizierte GDP-Fucose-Derivat **5** konnte trotz der Reinigung des Triesters **40** lediglich in einer moderaten Ausbeute von 32% als Natriumsalz dargestellt werden. Diese Ausbeute entsprach den Ausbeuten der zuvor dargestellten GDP-Zucker.^[1,120,122] Im Vergleich zu dem UDP-Fucose-Derivat **44** kam es vermutlich während der säulenchromatographischen Reinigung zu einem Austausch der durch die Reaktionsbedingungen gebildeten Triethylammoniumionen gegen Natriumionen.

Die Syntheseroute A zeigt die Darstellung des FITC-markierten GDP-Fucose-Derivates **41** mit einer Thioharnstoff-Verbrückung. Für die Darstellung des Amins **39** löste *N. Lunau*^[1] das Azid-modifizierte GDP-Fucose-Derivat **5** unter neutralen Bedingungen in Methanol und die Darstellung des GDP-Fuc-Amins **39** erfolgte in Gegenwart von katalytischen Mengen Pd/C durch Hydrogenolyse. Bei der Verwendung dieses Protokolls in dieser Arbeit wurden jedoch Löslichkeitsprobleme beobachtet. Es löste sich weder das Azid-modifizierte GDP-Fucose-Derivates **5** vollständig in Methanol noch wurde während der Reaktion eine Lösung erhalten. Für die Hydrierung des GDP-Fucose-Azids **5** zu dem Amin-Derivat **39** wurde daher ein neues Protokoll entwickelt. Ansonsten hätte es während der Abtrennung des Katalysators durch Zentrifugation zu erheblichen Edukt- bzw. Produktverlusten kommen können.

Die Darstellung des Amin-modifizierten GDP-Fucose-Derivates **39** erfolgte unter basischen Bedingungen in Wasser und in Gegenwart von katalytischen Mengen Palladiumhydroxid durch Hydrogenolyse. Das Amin **39** wurde in einer Ausbeute von 90% erhalten. Die abschließende Reaktion zur Darstellung des FITC-Thioharnstoff-verbrückten GDP-Fucose-Derivates **41** wurde in einer gepufferten Lösung mit einem pH von 9.3 durchgeführt. Dies stellte sicher, dass das Amin in der reaktiveren, nicht-protonierten Form vorlag. Unter Lichtausschluss wurde zu einer Lösung des Amin-modifizierten GDP-Fucose-Derivates **39** in Puffer der Farbstoff FITC **29** in Dimethylsulfoxid gegeben. Eine vollständige Umsetzung des Eduktes **39** war nach zwei Stunden Reaktionszeit erreicht. Die Trennung der FITC-Thioharnstoff-verbrückten GDP-Fucose **41** von nicht umgesetztem Farbstoff **29** wurde mittels Größenausschlusschromatographie erreicht. Die Darstellung des FITC-markierten Zielmoleküls **41** gelang in einer Ausbeute von 71%.

Die erfolgreiche Einführung des Farbstoffes wurde mittels Dünnschichtchromatographie visualisiert und über HRMS bestätigt (Abb. 35). Die gefundene Masse 992.1196 konnte als [M-H]⁻ dem Zielmolekül **41** zugeordnet werden.

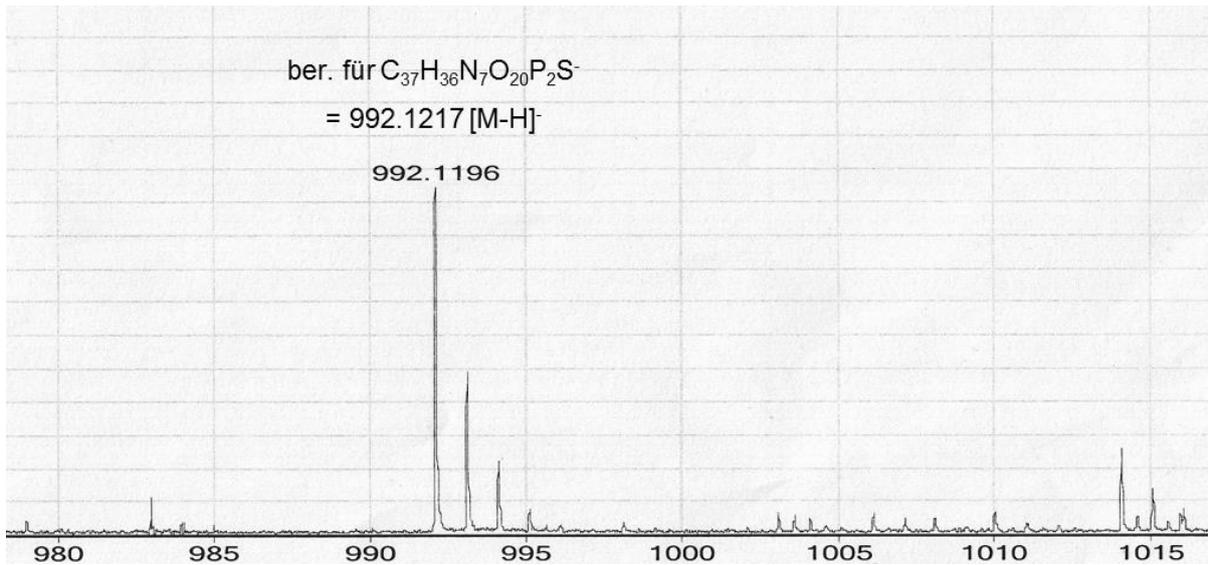


Abb. 35: HR-ESI-MS-Spektrum der FITC-Thioharnstoff-verbrückten GDP-Fucose **41**.

Das ^{31}P -NMR-Spektrum der FITC-Thioharnstoff-verbrückten GDP-Fucose **41** ist in Abbildung 36 gezeigt. Das ^{31}P -NMR-Spektrum zeigt die für NDP-Zucker typischen Verschiebungen von -10.9 bis -11.7 ppm und -12.8 bis -13.6 ppm in D_2O .^[16,120]

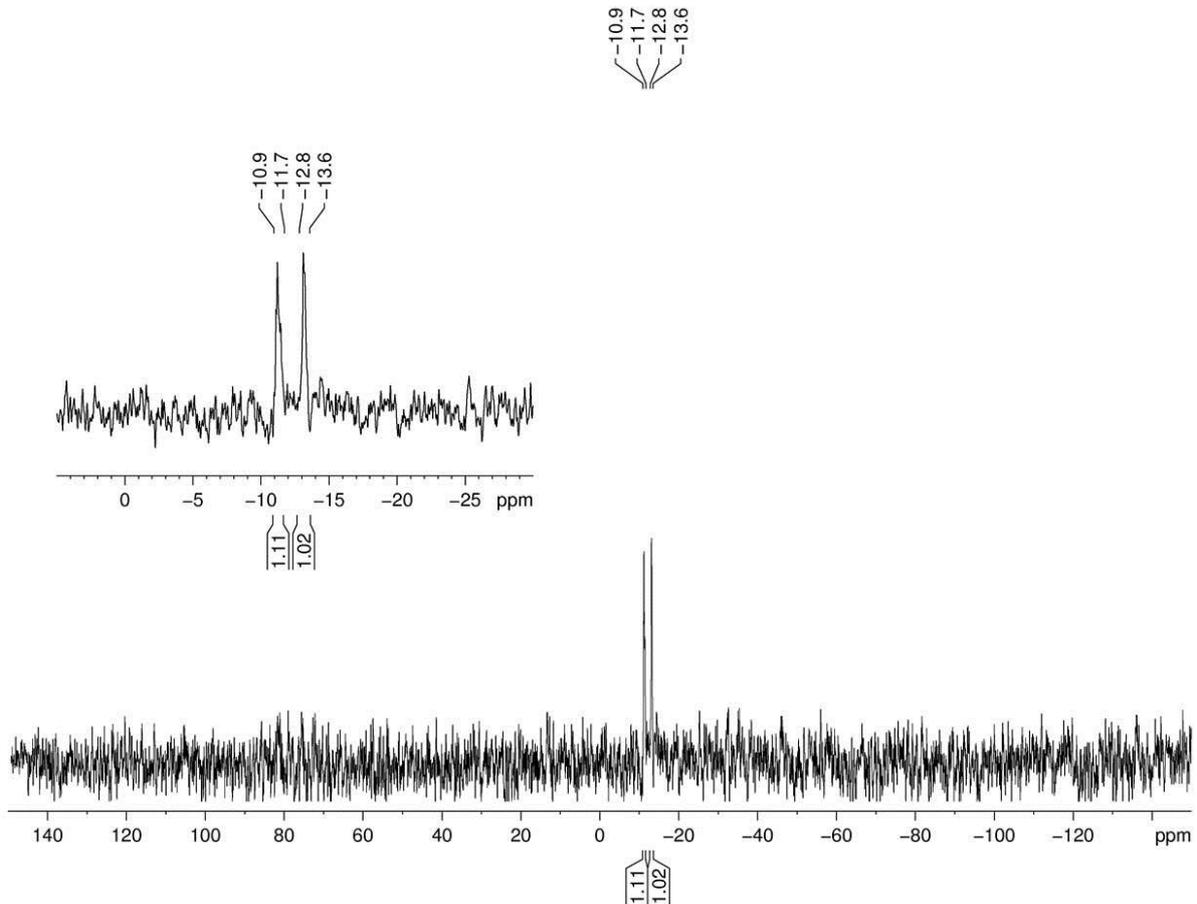


Abb. 36: ^{31}P -NMR-Spektrum des FITC-Thioharnstoff-verbrückten GDP-Fucose-Derivates **41**.

Wie bereits vermutet wurde, war die Darstellung eines FITC-Thioharnstoff-verbrückten UDP-Derivates über die Route A nicht möglich. Während des Reaktionsschrittes, bei dem das Azid zum Amin hydriert wurde, wurde ebenfalls die Nucleobase unter den gewählten Reaktionsbedingungen hydriert. Die in Abbildung 37 dargestellten $^1\text{H-NMR}$ -Spektren zeigen eindeutig den Verlust der Doppelbindung der Nucleobase. Die Hydrierung vor der Kupplung zu dem NDP-Zucker durchzuführen war ebenfalls nicht vielversprechend, da eine Wanderung der Acetylgruppe der C4-Position auf die Aminofunktion an der C6-Position wahrscheinlich ist.^[157] Die Relevanz einer Erweiterung der Syntheseroute zur Darstellung von fluoreszenzmarkierten-NDP-Zuckern wurde anhand der gezeigten Reaktion mit Uridin als Nucleobase deutlich.

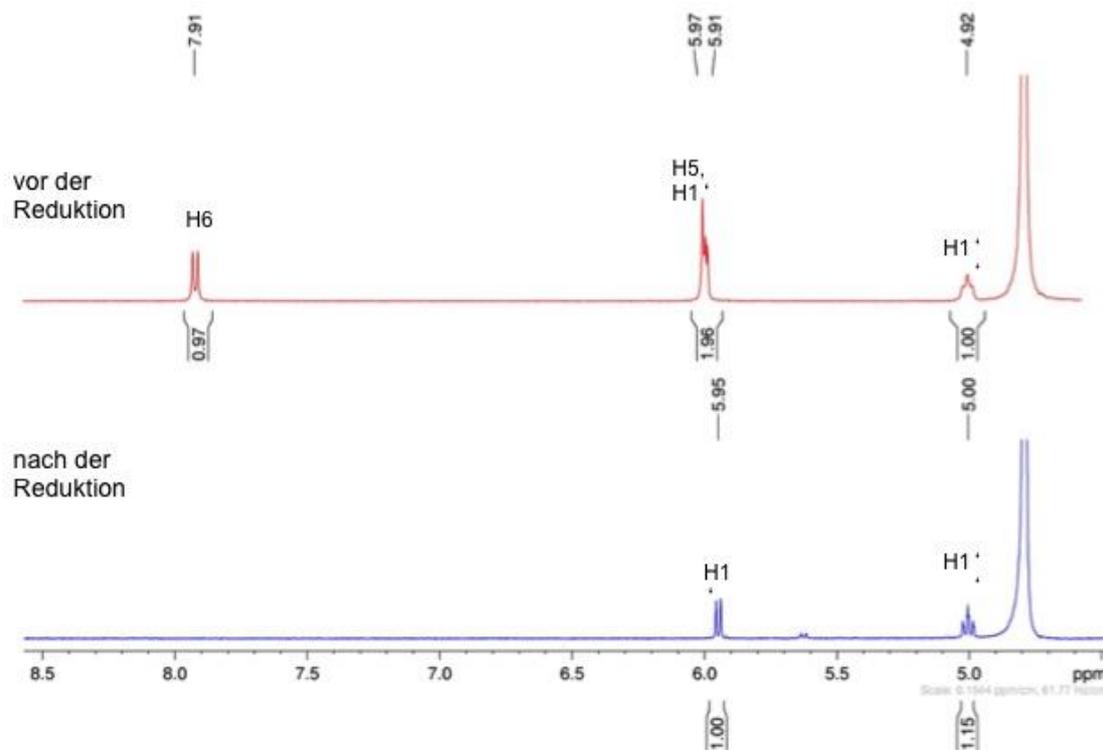


Abb. 37: Hydrierung der Uracil-Doppelbindung während der Hydrierung vom Azid zum Amin.

Route B (Abb. 34) zeigt die Einführung des 5-FAM-Alkin-Farbstoffes **45** in die NDP-6-Azido-6-desoxy- β -L-galactose-Derivate **5** und **44** durch Kupfer-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition (*copper alkyne-azide cycloaddition* CuAAC). Der erste Reinigungsschritt erfolgte ebenfalls mittels Größenausschlusschromatographie. Um die aus den Reaktionsbedingungen erhaltenen Kupferionen vollständig zu entfernen, wurden diese mittels Kationentauschersäule gegen Natriumionen ersetzt und die sauberen Produkte **42** (75%) und **43** (58%) erhalten. Da beide Reaktionen jeweils lediglich zweimal durchgeführt wurden, ist der Unterschied in der

Ausbeute nicht über zu bewerten. Die erfolgreiche Einführung des Farbstoffes wurde ebenfalls mittels Dünnschichtchromatographie visualisiert und über HRMS bestätigt. Die gefundene Masse 1042.1434 konnte als $[M-H]^-$ der FAM-Triazol-verbrückten-GDP-Fucose **42** zugeordnet werden (Abb. 38 oben) und die gefundene Masse 1003.1460 konnte als $[M-H]^-$ dem FAM-Triazol-verbrückten-UDP-Fuc-Derivat **43** zugeordnet werden (Abb. 39 oben).

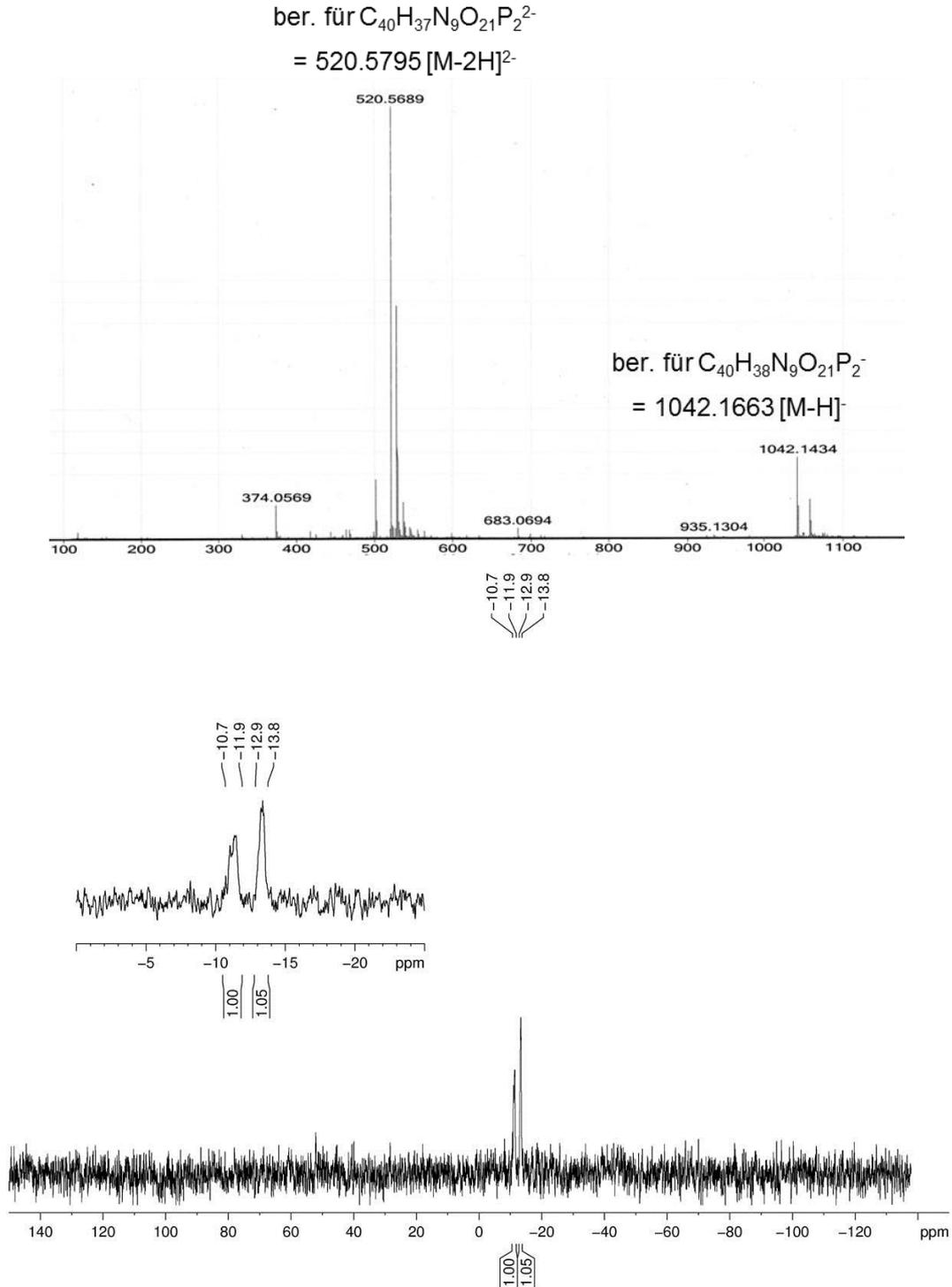


Abb. 38: HR-ESI-MS-Spektrum (oben) und ^{31}P -NMR-Spektrum (unten) der FAM-Triazol-verbrückten GDP-Fucose **42**.

Die ^{31}P -NMR-Spektren zeigten ebenfalls Signale mit denen für NDP-Zucker typischen Verschiebungen von -10.5 bis -11.9 ppm und -12.8 bis -13.8 ppm in $\text{D}_2\text{O}^{[16,120]}$ (Abb. 38 unten bzw. Abb. 39 unten).

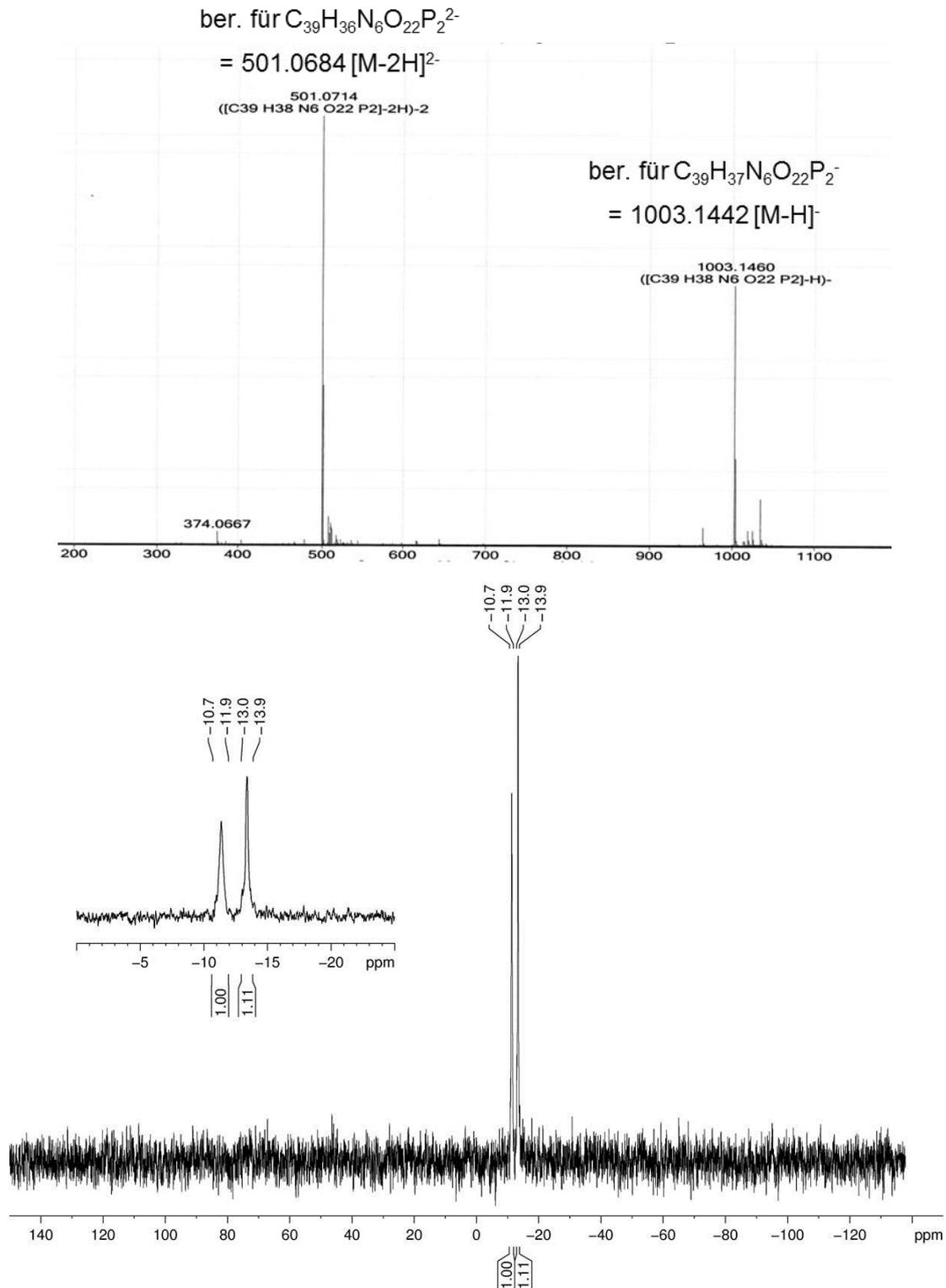


Abb. 39: HR-ESI-Spektrum (oben) und ^{31}P -NMR-Spektrum (unten) der FAM-Triazol-
 verbrückten UDP-Fucose **43**.

4.1.1.3 Fazit der Syntheserouten

Der Vorteil der Syntheseroute A ist, dass es leicht möglich ist, verschiedene Linkerstrukturen und Linkerlängen als Verbrückung zwischen dem Farbstoff und dem NDP-Zucker einzubringen. Durch Verwendung einer Isothiocyanateinheit war die Darstellung einer Thioharnstoff-Verbrückung möglich. *N. Lunau* benutzte beispielsweise einen NHS-Ester.^[1] Es werden ebenfalls Sulfonylchloride, Succinimidylester oder Carbonsäuren als funktionelle Gruppen zur Kupplung eines Farbstoffes mit einem Amin eingesetzt.^[158] Die Syntheseroute B zeichnet sich im Vergleich zu der Route A durch mehrere Vorteile aus. Zum einen war die Reinigung der Zielprodukte **42** und **43** schneller und einfacher. Zum anderen kann die Click-Chemie im Allgemeinen in verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt werden^[159] und es wird keine gepufferte Lösung benötigt. Darüber hinaus können funktionelle Gruppen, welche gegenüber Hydrogenolyse labil sind, eingesetzt werden. Durch Variation der Kettenlänge des Alkins können auch hier unterschiedliche Linkerlängen generiert werden. Die Verwendung unterschiedlicher Linkerstrukturen und -längen ist notwendig, um beispielsweise inhibitorische Effekte ausschließen zu können. Die Verwendung beider Syntheserouten ermöglicht einen breiten Zugang zur Darstellung von fluoreszenzmarkierten NDP-Zuckern. Mit der modifizierten Syntheseroute A und der neuen Route B war die erfolgreiche Darstellung der zwei fluoreszenzmarkierten GDP-Fucose-Derivate **41** und **42** mit einer unterschiedlichen Verbrückung in sehr guten Ausbeuten möglich. Zusätzlich ermöglichte die Syntheseroute B die Darstellung des fluoreszenzmarkierten FAM-Triazol-verbrückten UDP-Fucose-Derivates **43** ebenfalls in guter Ausbeute. Die markierten Verbindungen **41-43** standen nun für Fucosyltransferase-Studien zur Verfügung.

4.1.2 Fucosyltransferase-Studien

Das Ziel der Fucosyltransferase-Studien war es herauszufinden, ob die Linkerstruktur und die Linkerlänge einen Einfluss auf die Substratazeptanz von humanen Fucosyltransferasen sowie einer bakteriellen Fucosyltransferase haben. Des Weiteren sollte analysiert werden, welches Substrat im Allgemeinen am besten für Fucosyltransferase-Studien geeignet ist und welche Fucosyltransferase die getesteten Substrate am besten akzeptiert. Die Fucosyltransferase-Studien wurden von *K. Seelhorst*^[160] aus der Arbeitsgruppe von *Prof. U. Hahn* an der Universität Hamburg durchgeführt. Im Folgenden werden daher nur die Ergebnisse diskutiert und es wird nicht näher auf die Reaktionsbedingungen eingegangen. Neben den drei in dieser Arbeit dargestellten fluoreszenzmarkierten Verbindungen **41-43** wurde ebenfalls das von *N. Lunau* dargestellte ATTO 550-Derivat **7** untersucht. Die Abbildung 40 zeigt schematisch die durchgeführte Enzymreaktion. Ein fluoreszenzmarkiertes Substrat sollte durch eine α 1,3-FucT umgesetzt werden und so der markierte Fucoserest auf ein Glycoprotein übertragen werden. Es wurden die humanen Fucosyltransferasen FucT V, FucT VII, FucT IX

und eine bakterielle Fucosyltransferase des Bakteriums *Helicobacter Pylori* HP-FucT verwendet. Die humanen Fucosyltransferasen gehören alle zu den α -1,3-FucTs. Wie in Abschnitt 2.1.1.2 herausgearbeitet, unterscheiden sich die verwendeten Fucosyltransferasen in ihrer Sequenz und ihrer Substrateigenschaft. Es war daher davon auszugehen, dass die getesteten Substrate unterschiedlich gut akzeptiert werden würden. Als Proteine wurden die Glycoproteine Fetuin, Asialofetuin und gp130 eingesetzt. Die Glycanstruktur der verwendeten Glycoproteine ist bekannt. Die Glycanstruktur des Glycoproteins Fetuin beinhaltet drei *N*-Glycane und drei *O*-Glycane. Bei Fetuin handelt es sich um ein sialyliertes Glycoprotein.^[161-163] Das Glycoprotein Asialofetuin enthält als Besonderheit weniger als 0,5% Sialinsäuren.^[164] Es wurde gerade deswegen mit Blick auf FucT IX verwendet. Wie in Abschnitt 2.1.1.2 beschrieben ist, wird angenommen, dass dieses Enzym nur fucosyliert, wenn keine Sialinsäuren in dem Akzeptor vorhanden sind. Das Glycoprotein gp130 ist ein humanes Protein, welches in einer Vielzahl von Zellen vorkommt. Es enthält elf potentielle *N*-Glycosylierungsstellen, von denen neun glycosyliert sind.^[165] Gerade diese hohe Zahl an Glycosylierungsstellen sowie das Vorkommen in einer Vielzahl von Zellen wiesen gp130 als ein interessantes Glycoprotein aus.

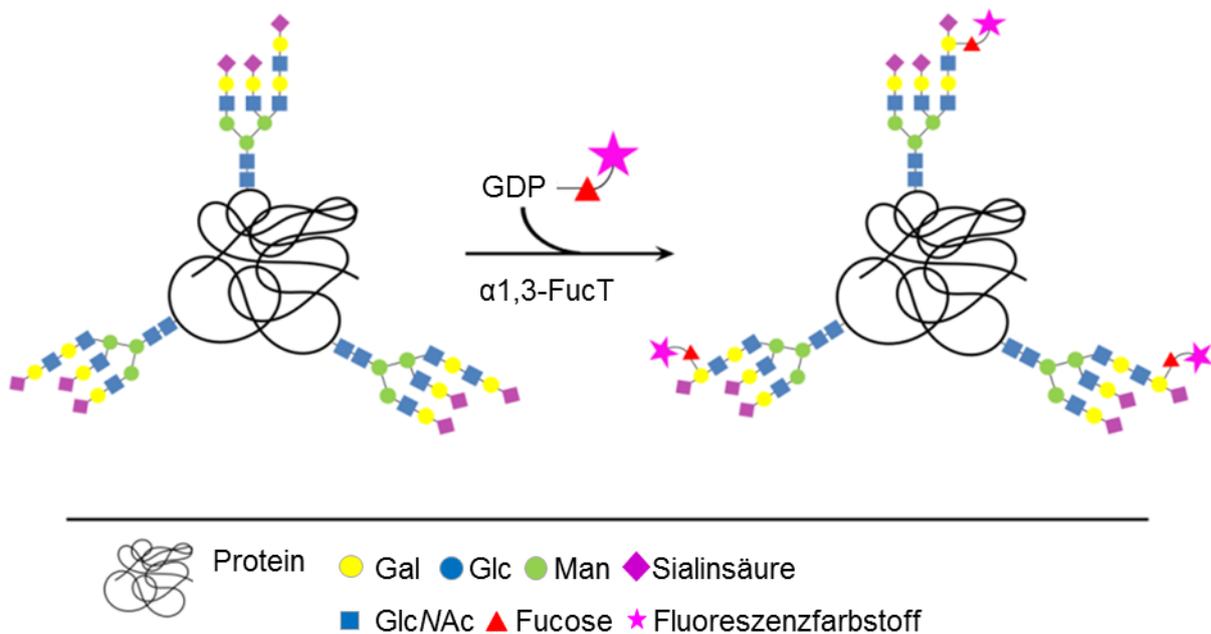


Abb. 40: Schematische Darstellung der Glycoproteinmarkierung mit fluoreszenzmarkierten Substraten durch α 1,3-Fucosyltransferasen.^[160]

Die Markierungsreaktion wurde mittels in-gel Fluoreszenzdetektion und Fluoreszenz-Polarisation (FP) analysiert.

Zur Bestimmung der in-gel Fluoreszenz wurde das jeweilige Glycoprotein durch Verwendung der verschiedenen Fucosyltransferasen fluoreszenzmarkiert. Nach Trennung des jeweiligen Reaktionsansatzes mittels SDS-Page wurde die in-gel Fluoreszenz gemessen (Abb. 41). Die

Fucosyltransferase FucT VII war in der Lage, alle drei Glycoproteine mit dem FITC-Fucose-Derivat bzw. dem ATTO 550-Fucose-Derivat zu markieren. Im Gegensatz hierzu markierte die FucT IX nur die Glycoproteine Asialofetuin und gp130 erfolgreich. Wie erwartet, schien FucT IX nicht in der Lage zu sein, das Glycoprotein Fetuin, vermutlich aufgrund seiner Glycanstruktur, zu markieren. Die Fucosyltransferase FucT V zeigte ein komplett anderes Verhalten als die anderen beiden. FucT V akzeptierte das FITC-GDP-Fuc-Derivat **41** scheinbar moderat, wohingegen das ATTO-markierte Fucose-Derivat weder auf Fetuin noch auf Asialofetuin übertragen wurde. Nur bei dem Glycoprotein gp130 konnte ein schwaches Signal detektiert werden. Bei Verwendung der Fucosyltransferase HP-FucT wurden sowohl das Glycoprotein Fetuin als auch gp130 mit dem Farbstoff ATTO 550 bzw. FITC markiert. Dies wurde bereits nach einer vergleichsweise kurzen Reaktionszeit von 2 Stunden erreicht.

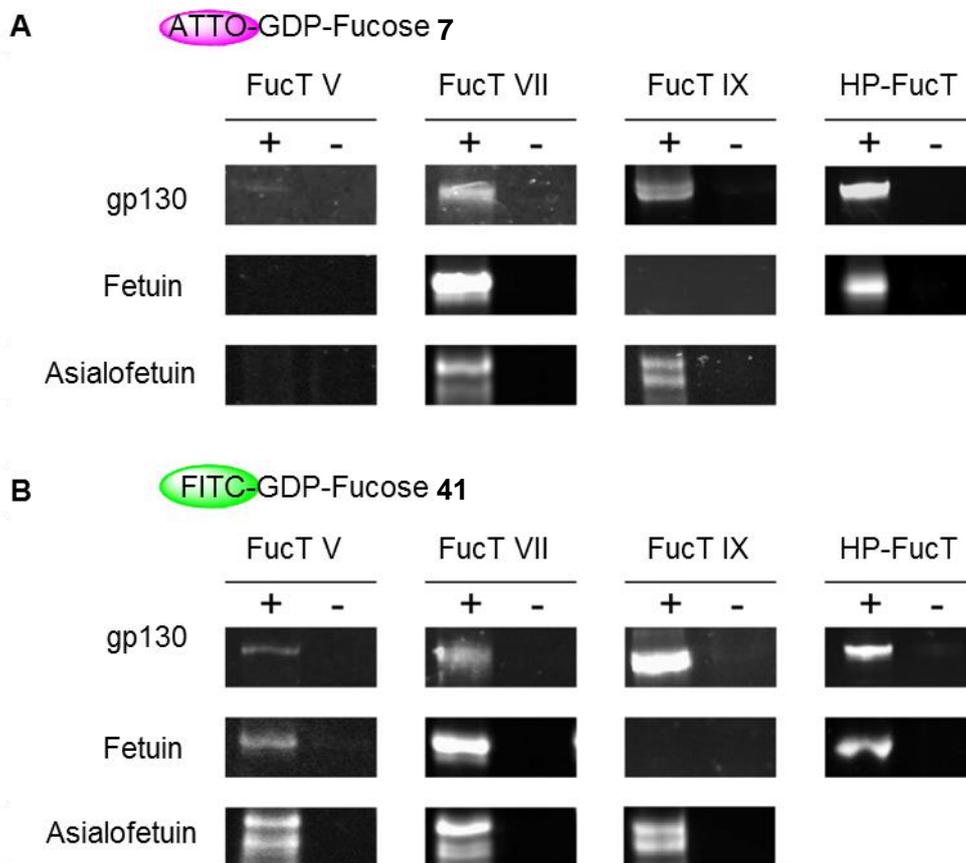


Abb. 41: In-gel Fluoreszenz von drei Glycoproteinen, markiert mit einem ATTO 550-Fucose-Derivat (oben) bzw. einem FITC-Fucose-Derivat (unten).^[160]

Bei Verwendung des FAM-markierten GDP-Fucose-Derivates **42** wurden in allen Fällen keine fluoreszenzmarkierten Glycoproteine erhalten. Dies könnte an der Triazoleinheit liegen. *Maeda et al.*^[43] beschreiben die inhibitorische Eigenschaft des fluoreszenzmarkierten Triazol-verbrückten Derivates **10** (Abschnitt 2.1.1.3). Hier wurde allerdings nur die Fucosyltransferase FucT VI getestet. In Abschnitt 2.1.1.2 ist herausgearbeitet, dass die humanen α 1,3-/ α 1,4-Fucosyltransferasen aufgrund ihrer Sequenz in zwei Gruppen eingeteilt

werden können. FucT V und FucT VI gehören zur selben Gruppe, wohingegen FucT VII und FucT IX anderen Gruppen zugeordnet werden. Des Weiteren sind generelle Unterschiede bei der Substratazeptanz bekannt. Die Substratazeptanz der FAM-Triazol-verbrückten-Verbindung **42** war daher nicht von vornherein ausgeschlossen.

Im Vergleich zu der Thioharnstoffverbrückung stellt die Triazoleinheit eine längere Verbrückung dar. Dies könnte neben der Triazoleinheit ebenfalls zu Problemen bei der Substratazeptanz geführt haben. Durch eine längere Verbrückung können für die Substraterkennung notwendige Bindungen in dem aktiven Zentrum eventuell nicht ausgebildet werden. Das FAM-Triazol-verbrückte UDP-Fucose-Derivat **43** wurde ebenfalls getestet. Da Glycosyltransferasen die Nucleobase, neben dem Glycosylrest, als zusätzliches Erkennungsmerkmal nutzen,^[12] wurde in diesem Fall vermutlich auf Grund der Nucleobase Uridin keine Fluoreszenz detektiert. Das Ziel war, durch die Variation der Nucleobase ebenfalls den Einfluss dieser auf die Substrateigenschaften zu überprüfen. Dieser Ansatz war jedoch nicht erfolgreich, da auch die analoge FAM-Triazol-verbrückte DGP-Fucose **42** vermutlich kein Substrat der verwendeten Enzyme ist. Dass die Triazol-Verbrückung bei allen verwendeten Enzymen problematisch ist, konnte im Vorwege nicht abgesehen werden. Es kann somit nicht eindeutig geschlussfolgert werden, ob das UDP-Derivat **43** aufgrund der variierten Nucleobase und/oder der Triazoleinheit vermutlich kein Substrat der verwendeten Enzyme ist.

Die durchgeführten Enzymreaktionen wurden in einem zweiten Assay mittels Fluoreszenz-Polarisation analysiert. Es wurde lediglich Das ATTO-Derivat **7** eingesetzt. Diese Methode basiert auf dem Größenunterschied der analysierten Verbindungen. Ein markiertes Molekül, wie ein markiertes GDP-Fucose-Derivat, ist sehr viel kleiner als markierte Proteine und rotiert daher sehr viel schneller. Das emittierte Licht ist daher depolarisiert relativ zu dem anregenden linear polarisierten Licht. Ein großes Molekül wie ein fluoreszenzmarkiertes Protein rotiert deutlich langsamer. Das emittierte Licht bleibt somit polarisiert. Ist ein fluoreszierendes Protein in der zu untersuchenden Probe, resultiert dies in einer größeren Fluoreszenz-Polarisation.^[166] Damit ein Assay als *high-throughput-screening* (HTS) verwendet werden kann, sollte der Assay als exzellent klassifiziert werden. Bei einem HTS-Verfahren werden in kurzer Zeit viele potente Moleküle gegenüber einer Positiv- und einer Negativkontrolle analysiert. Ein wichtiger Faktor für die Brauchbarkeit eines HTS ist der Z-Faktor. Für einen exzellenten Assay sollte dieser zwischen $Z = 0.5$ und 1 liegen.^[167]

Der FP Assay zeigte im Gegensatz zu der in-gel Fluoreszenz, dass FucT IX in der Lage ist, Fetuin mit dem ATTO-Fucose-Derivat zu markieren (Abb. 42). Allerdings wurde lediglich ein Z-Faktor von $Z = 0.14$ erreicht. Eine leichte Erhöhung des Z-Faktors auf $Z = 0.21$ konnte durch Verwendung der Fucosyltransferase FucT VII erreicht werden. Diese geringen Faktoren erlauben zwar die potentielle Anwendbarkeit dieses Assays zur Detektion jedoch

nicht zur Quantifizierung der Fucosyltransferaseaktivität in einem HTS. Die bakterielle Fucosyltransferase HP-FucT zeigte eine deutlich bessere Akzeptanz des markierten Substrates **7** gegenüber den getesteten humanen Fucosyltransferasen. Das Ergebnis des FP-Assays bestätigt somit das Ergebnis des in-gel Assays, dass HP-FucT das effizientere Enzym zur Umsetzung der fluoreszenzmarkierten Substrate ist. Bei Verwendung der Fucosyltransferase HP-FucT in dem FP-Assay wurde ein Z-Faktor von $Z = 0.64$ erreicht. Dies zeichnet den FP-Assay als exzellent aus.

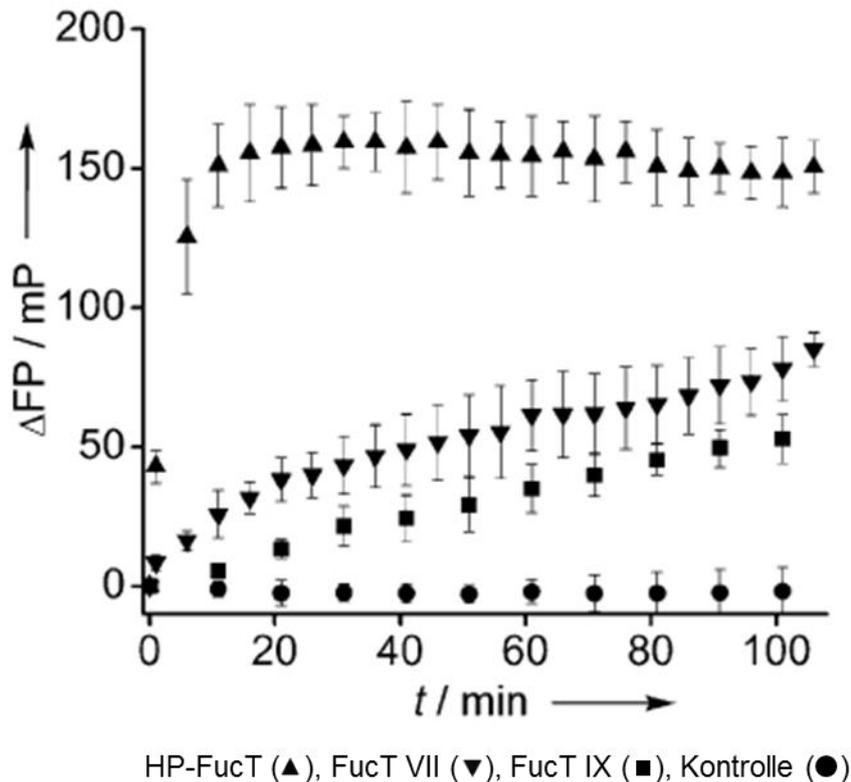


Abb. 42: Fluoreszenz-Polarisations Assay von Fucosyltransferase katalysierten Reaktionen mit ATTO-GDP-Fuc **7**.^[160]

4.1.2.1 Fazit der Fucosyltransferase-Studien

Anhand der erhaltenen Daten konnte gezeigt werden, dass die bakterielle Fucosyltransferase HP-FucT im Vergleich zu den humanen Fucosyltransferasen die getesteten fluoreszenzmarkierten Substrate **41** bzw. **7** am besten umsetzte. Des Weiteren zeigte sich anhand des In-gel-Assays, dass das FITC-GDP-Fuc-Derivat **41** im Vergleich zu dem ATTO-GDP-Fuc-Derivat **7** das bessere Substrat war. Dies könnte an den unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften der Farbstoffe liegen. Bei dem ATTO-Farbstoff handelt es sich um eine kationische Verbindung, welche auf Rhodaminstrukturen basiert.^[141,146] Das Fluorescein-Derivat hingegen ist eine neutrale Verbindung.

Der FP-Assay mit einem Z-Faktor von $Z = 0.64$ ermöglicht den Zugang zu Konzepten, die die Fucosyltransferaseaktivität in einem HTS analysieren können. Dies könnte genutzt werden,

um beispielsweise nach FucT-Inhibitoren zu screenen. Analysen von Glycosylierungsprozessen *in vitro* oder *in vivo* könnten Informationen über Reaktionsprozesse liefern, die noch nicht aufgeklärt sind. Gerade für solche Tests könnte das in dieser Arbeit dargestellte FITC-Thioharnstoff-verbrückte-GDP-Fuc-Derivat **41** als Grundlage dienen, da der Farbstoff, wie in diesem Abschnitt einleitend beschrieben, eine gute Zellpermeabilität aufweist. Allerdings wäre eine Weiterentwicklung der Syntheseroute auf lipophil-maskierte fluoreszenzmarkierte NDP-Derivate nötig.

4.2 Darstellung von lipophilen Cytidinmonophosphat-*N*-acetylneuraminsäure-Derivaten

Um, wie in dem Abschnitt 2.1.1.7 erläutert, potentielle Inhibitoren für Sialyltransferasen in Zellassays oder *in vivo* testen zu können, müssen diese die Zellmembran passieren können. Das Molekül CMP-Neu5Ac **15** hat neben einer negativen Ladung am Phosphat eine Säurefunktion an C1-Position, welche ebenfalls eine negative Ladung tragen kann, und außerdem fünf Hydroxylgruppen. Im Allgemeinen haben sich Esterfunktionen zur Erhöhung der Lipophilie bewährt. Diese können durch Esterasen nach erfolgreicher Diffusion in die Zelle intrazellulär abgespalten werden.^[88]

Die Verwendung von Acyloxybenzyl (AB)-Ethern zur Blockierung negativer Ladungen an Phosphaten hat sich bei verschiedenen Prodrugkonzepten bewährt.^[89,134-139] Der Abspaltmechanismus der 4-Acyloxybenzylester ist beispielhaft für ein monomaskiertes Nucleosiddiphosphat in Abbildung 43 gezeigt. Die Spaltung der AB-Maske wird durch Hydrolyse des phenolischen Acylesters durch Esterasen initiiert. Daraus resultiert eine Umwandlung des Akzeptorsubstituenten in einen Donorsubstituenten, was in einer Destabilisierung der Benzylphosphatesterbindung resultiert. Dadurch erfolgt über eine 1,6-Eliminierung der spontane Zerfall des Intermediates und somit die Freisetzung der phosphathaltigen Verbindung sowie die Bildung von 4-Hydroxybenzylalkohol **57**.^[89,136]

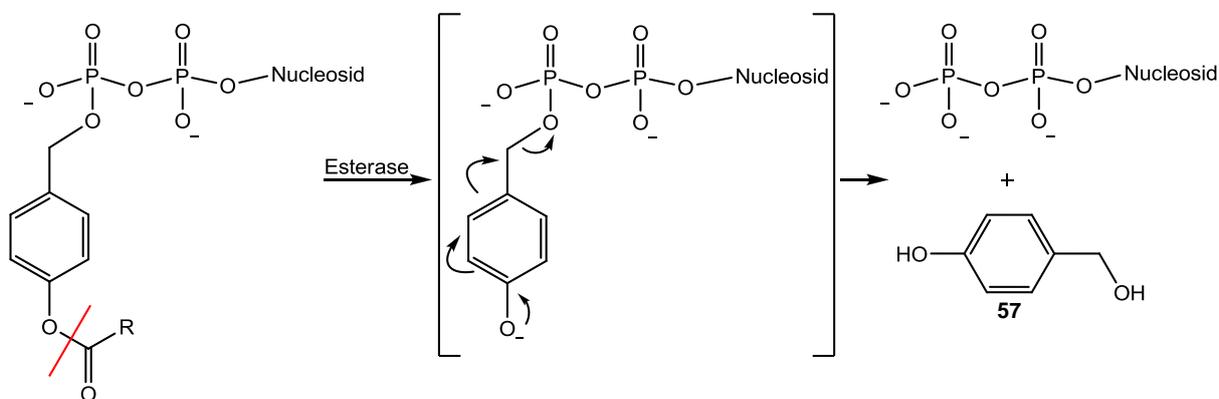


Abb. 43: Enzymatischer Spaltungsmechanismus der 4-Acyloxybenzylester.

Hydroxylgruppen können durch kurzketten Ester, welche ebenfalls durch Esterasen gespalten werden können, blockiert werden.^[88] Die in Abschnitt 2.2.2.1 vorgestellten Syntheserouten zur Darstellung von CMP-Neu5Ac **15** nutzen als Kupplungsbaustein das vollständig geschützte Halbacetal des Neuraminsäurederivates (^OAcNeu5NAc^{COOMe}) **22**. Bei diesem werden die Hydroxylgruppen mit Acetylgruppen und die Säuregruppe als Methylester blockiert. Für eine Darstellung von bioreversibel maskierten, lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivaten sollte das Molekül **22** genutzt und zur Blockierung des Phosphates eine AB-Maske verwendet werden. Für die Entwicklung einer geeigneten Syntheseroute und um erste Informationen zu erhalten, sollten noch keine *N*-Acyl-modifizierten Derivate verwendet werden.

Nach einer erfolgreichen Diffusion in die Zelle sollte eine enzymatische Spaltung der verwendeten Gruppen erfolgen und somit die intrazelluläre Bildung von CMP-Neu5Ac **15** ermöglicht werden. Bei CMP-Neu5Ac **15** handelt es sich um einen Glycosyldonor. Bei einem am Phosphat vollständig geschützten Derivat könnte die Stabilität der Phosphatbrücke ein Problem sein. Des Weiteren beschrieben *Kajihara et al.*^[131] (Abschnitt 2.2.2.1) eine erhöhte Eliminierungstendenz des Phosphattriesters **25** im Vergleich zu dem Phosphatdiester **15**. Aus diesem Grund sollten zwei verschiedene AB-Masken getestet werden. Zum einen die Acetoxybenzyl (^{C2}AB)-Maske und zum anderen die (4-Methoxybenzoyloxy)-benzyl (^{pMPH}AB)-Maske. Diese beiden Masken wurden innerhalb des DiPPro-Konzeptes untersucht und zeigen sehr unterschiedliche Hydrolysehalbwertszeiten. Das DiPPro-Konzept wird im Abschnitt 4.4 beschrieben. Die DiPPro-Verbindung mit der ^{C2}AB-Maske weist bei der Abspaltung der Maske und damit Freisetzung von d4TDP eine Hydrolysehalbwertszeit von 10 Stunden in Phosphatpuffer (pH 7.3) auf.^[136] Die DiPPro-Verbindung mit der ^{pMPH}AB-Maske hingegen weist unter diesen Bedingungen eine Hydrolysehalbwertszeit von 480 Stunden auf.^[140] Dieser große Unterschied sollte genutzt werden, um Informationen über die Stabilität der am Phosphat lipophil maskierten CMP-Neu5Ac-Derivate zu erhalten.

Die Eignung dieser lipophilen Derivate als potentielle Tools für Zellstudien sollte in Hydrolysestudien untersucht werden.

4.2.1 Darstellung von bioreversibel maskierten, lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivaten über Phosphoramiditchemie

Zur Darstellung vollständig maskierter CMP-Neu5Ac-Derivate diene als Grundlage die Synthesemethode von *Kajihara et al.*^[131] (Abschnitt 2.2.2.1). Bei dieser Methode basiert der Kupplungsschritt auf der Phosphoramiditchemie. Die Darstellung von CMP-Neu5Ac **15** verläuft über das vollständig blockierte CMP-Neu5Ac-Derivat **25**, welches in einer sehr guten Ausbeute isoliert worden ist. Als Kupplungsbausteine werden ^OAcNeu5NAc^{COOMe} **22** und das nicht-symmetrische Phosphoramidit **23**, welches Cytidin und eine Cyanoethylgruppe enthält,

eingesetzt. Anstelle der verwendeten Cyanoethylgruppe sollte in dieser Arbeit die entsprechende AB-Maske benutzt werden. Das Retrosyntheschema zur Darstellung der bioreversibel maskierten, lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivate ^{C2}AB-CMP-Neu5Ac^{COOMe} **58** und ^{pMPH}AB-CMP-Neu5Ac^{COOMe} **59** ist in Abbildung 44 dargestellt.

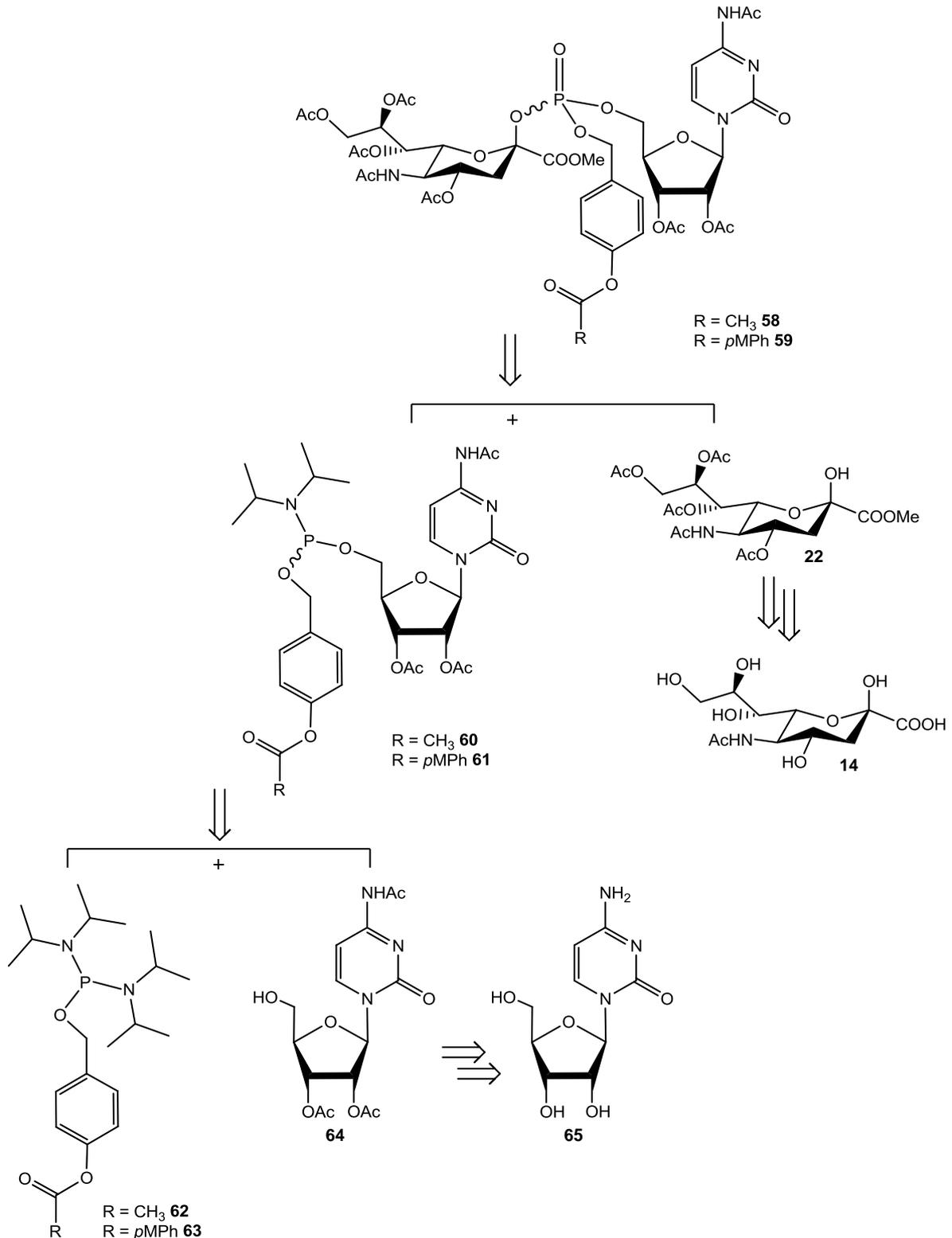


Abb. 44: Retrosyntheschema zur Darstellung der bioreversibel maskierten, lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivate **58** und **59** über Phosphoramiditchemie.

Die Synthese der Zielmoleküle **58** und **59** sollte durch Kupplung der ^OAcNeu5NAc^{COOMe} **22** mit dem entsprechenden Phosphoramidit C²AB- bzw. ^pMPhAB-(5'-O-cytidin^{Ac})phosphoramidit **60** bzw. **61** erfolgen. Die Phosphoramidite **60** bzw. **61** sollten durch Umsetzung des entsprechenden Diamidites **62** bzw. **63** mit dem selektiv geschützten Cytidin-Derivat **64** erfolgen. Dieses sollte aus Cytidin **65** erhalten werden. Die Synthese der ^OAcNeu5NAc^{COOMe} **22** sollte ausgehend von *N*-Acetylneuraminsäure **14** erfolgen.

4.2.1.1 Synthese der benötigten Kupplungsbausteine

Zunächst erfolgte die Darstellung der benötigten Phosphoramidite **60** und **61** (Abb. 45). Hierzu wurde das selektiv geschützte Cytidin-Derivat **64** analog zu der Synthesemethode zur Darstellung des entsprechenden Uridin-Derivates **48** (Abschnitt 4.1.1.1) synthetisiert. Das vollständig geschützte Cytidin-Derivat **66** wurde in einer Ausbeute von 72% erhalten. Als Nebenprodukt wurde in geringem Maße das an der Nucleobase zweifach acetylierte Produkt erhalten. Die Abspaltung der TBDMS-Gruppe erfolgte in quantitativer Ausbeute.

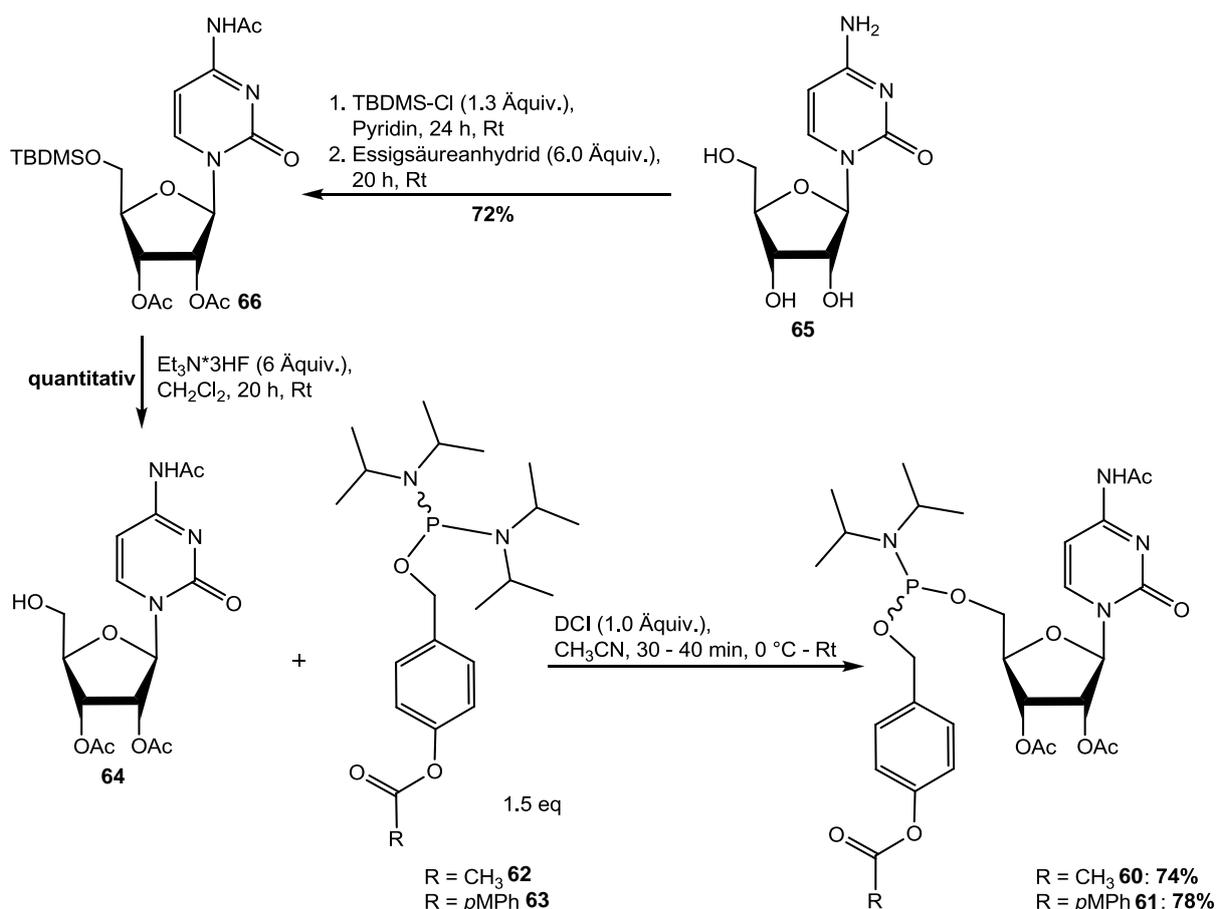


Abb. 45: Synthese der Phosphoramidite **60** und **61**.

Die anschließende Kupplung mit dem entsprechenden Phosphordiamidit **62** bzw. **63**, welche freundlicherweise von *L. Weinschenk* zur Verfügung gestellt wurden, erfolgte nach einem

von *L. Weinschenk* entwickelten Protokoll zur Darstellung nicht-symmetrischer Phosphoramidite.^[138] Die Synthese erfolgt hierbei in einer Dicyanoimidazol vermittelten Kupplung eines Diamidits mit einer Hydroxylgruppe.

Zur Darstellung der Phosphoramidite **60** und **61** wurden zu einer Lösung des entsprechenden Phosphordiamidites **62** bzw. **63** das Nucleosid **64** und Dicyanoimidazol gegeben. Nach der wässrigen Aufarbeitung erfolgte die Reinigung der Produkte **60** und **61** am Chromatotron. Das ^{C2}AB-(5'-O-cytidin^{Ac})phosphoramidit **60** wurde in einer Ausbeute von 74% und das ^{pMPH}AB-(5'-O-cytidin^{Ac})phosphoramidit **61** in einer Ausbeute von 78% erhalten. Weitere Produktfraktionen liegen noch verunreinigt vor. Als Nebenprodukte wurden unter anderem Verbindungen mit chemischen Verschiebungen von 8.8 ppm und 13.3 ppm erhalten. Hierbei könnte es sich um ein H-Phosphonat oder Amidat handeln. Eine genaue Identifikation war nicht möglich, da die Nebenprodukte lediglich in geringem Maße in den Produktfraktionen enthalten waren. Die Nebenprodukte konnten aufgrund der geringen Menge nicht isoliert werden.

Die Synthese des zweiten Kupplungsbausteins ^{OAc}Neu5NAc^{COOMe} **22** (Abb. 46) erfolgte über drei Stufen analog zu der von *S. Wolf*^[2] verwendeten Syntheseroute. Im ersten Schritt wurde die Säurefunktion der *N*-Acetylneuraminsäure **14** durch saure Katalyse mit Methanol verestert.^[168] Der Methylester **67** wurde in einer Ausbeute von 95% erhalten und wurde ohne weitere Reinigung in das β -Chlor-Derivat **68** umgesetzt. Zuerst erfolgte eine Peracetylierung des Methylesters **67** mit Acetylchlorid. In einem zweiten Schritt erfolgte die Synthese des β -Chlor-Derivates **68** in Acetylchlorid und Methanol durch intermediär generiertes HCl. Es erfolgt durch das Chlorid eine S_N1-artige Substitution der acetylgeschützten Hydroxylgruppe am anomeren Zentrum. Das β -Chlor-Derivat **68** wurde quantitativ erhalten. Das β -Anomer entsteht aufgrund der höheren Stabilität bevorzugt.^[169]

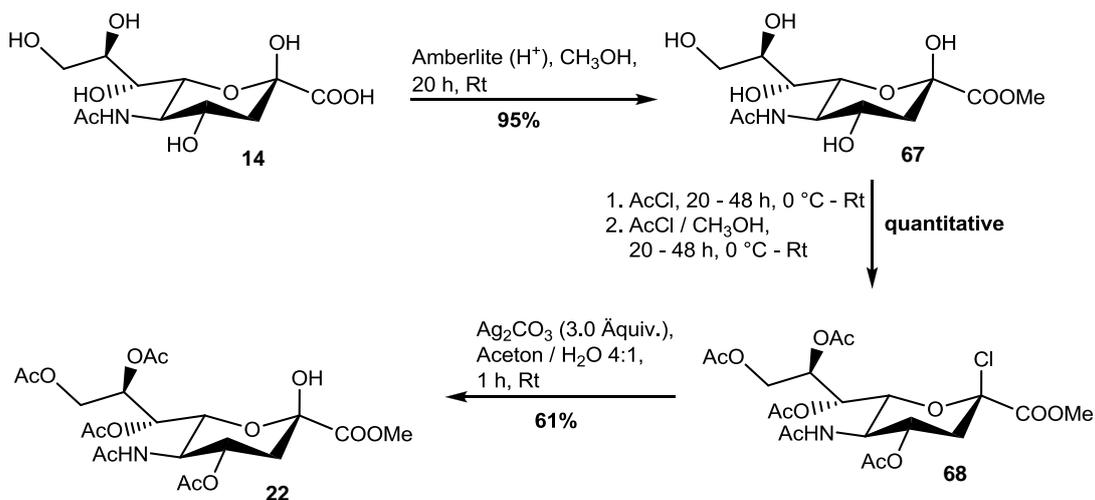


Abb. 46: Synthese der ^{OAc}Neu5NAc^{COOMe} **22**.

Im letzten Reaktionsschritt erfolgte nach der Koenigs-Knorr-Methode die Substitution des Chlorids gegen eine Hydroxylgruppe. Die Koenigs-Knorr-Methode wurde bereits in dem Abschnitt 4.1.1.1 erläutert. Das β -Chlor-Derivat **68** wurde in einem Gemisch aus Aceton/Wasser gelöst und mit Silbercarbonat versetzt.^[170] Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte das Produkt **22** in einer Ausbeute von 61% erhalten werden. Auffällig ist die geringere Ausbeute im Vergleich zu 82% von *S. Wolf*.^[2] Es konnten Verunreinigungen mit einem höheren R_f -Wert abgetrennt werden. Eine Identifikation der Nebenprodukte war nicht möglich.

4.2.1.2 Synthese der bioreversibel maskierten, lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivate **58** und **59**

Nach der erfolgreichen Darstellung der benötigten Kupplungsbausteine **22**, **60** und **61** erfolgte die Synthese der bioreversibel maskierten, lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivate **58** und **59** analog zu dem von *L. Weinschenk*^[138] entwickelten Protokoll zur Darstellung von DiPPro-Nucleosid-Diphosphaten. Bei dieser Synthese handelte es sich auch um eine Dicyanoimidazol vermittelte Kupplung. Die Reaktion erfolgte in diesem Fall durch Umsetzung eines Phosphoramidites mit einer Hydroxylgruppe.

Die Darstellung der lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivate **58** und **59** erfolgte durch Kupplung des entsprechenden Phosphoramidites **60** bzw. **61** mit ^{OAc}Neu5NAc^{COOMe} **22** und anschließender Oxidation mit *tert*-Butylhydroperoxid (Abb. 47).

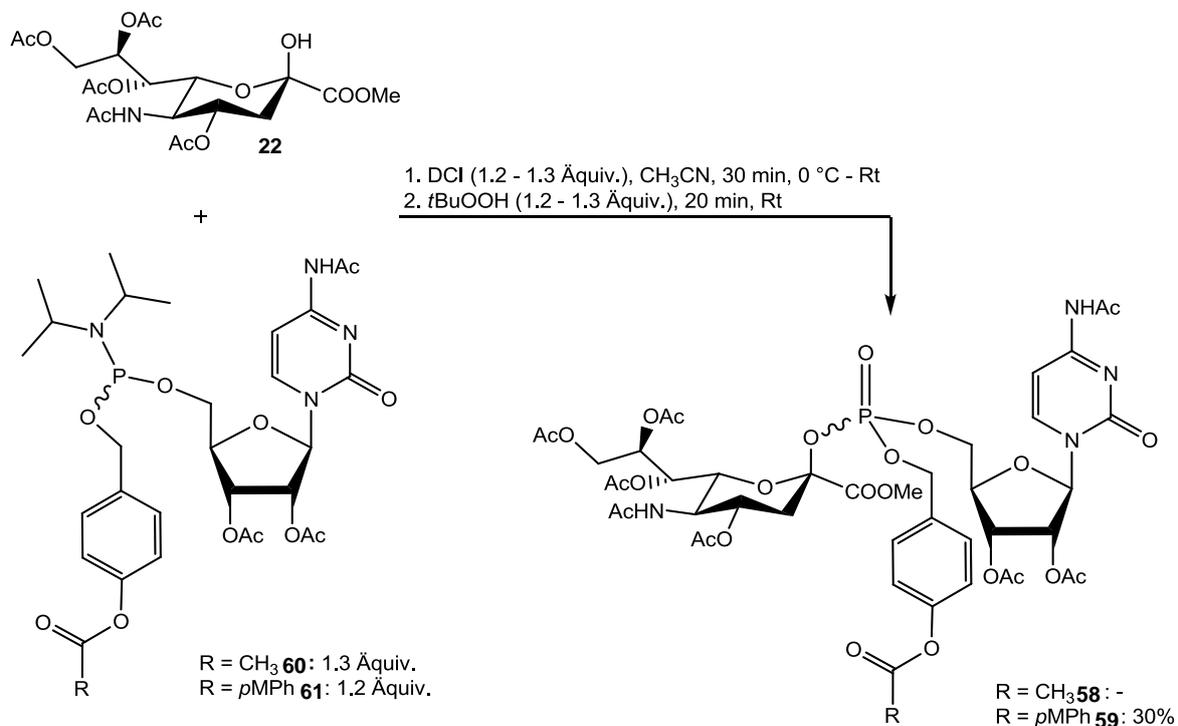


Abb. 47: Synthese der bioreversibel maskierten, lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivate **58** und **59**.

Im Fall des Produktes C^2AB -CMP-Neu5Ac COOMe **58** wurden verschiedene Reinigungsmethoden zur Isolierung des Produktes **58** durchgeführt, welches als Diastereomerenmischung vorliegen sollte. Zunächst erfolgte die Reinigung am Chromatotron, da hier generell eine zügige Reinigung und die Visualisierung von UV-aktiven Verbindungen möglich sind. Als Elutionsmittel wurde ein Gemisch aus Ethylacetat/Methanol 9:1 mit 10% Triethylamin verwendet.

Das vollständig blockierte CMP-Neu5Ac-Derivat **25** (s. Abb. 21), welches von *Kajihara et al.*^[131] isoliert worden ist, wies eine chemische Verschiebung von -7.61 ppm und -8.44 ppm auf. Es wurde eine Fraktion erhalten, bei der Signale mit einer ähnlichen chemischen Verschiebung von -6.99 ppm und -7.10 ppm erhalten wurden. Da diese Verschiebung ähnlich der von *Kajihara et al* war, wurde vermutet, dass es sich bei der Verbindung mit einer chemischen Verschiebung von -6.99 ppm und -7.10 ppm um das Produkt **58** handeln könnte. Das erhaltene ^{31}P -NMR-Spektrum dieser Fraktion zeigte jedoch eine Vielzahl an Signalen (Abb. 48). Es konnte kein reines Produkt erhalten werden. Es ist zu erkennen, dass das vermutete Produkt **58** nicht als Hauptprodukt vorlag.

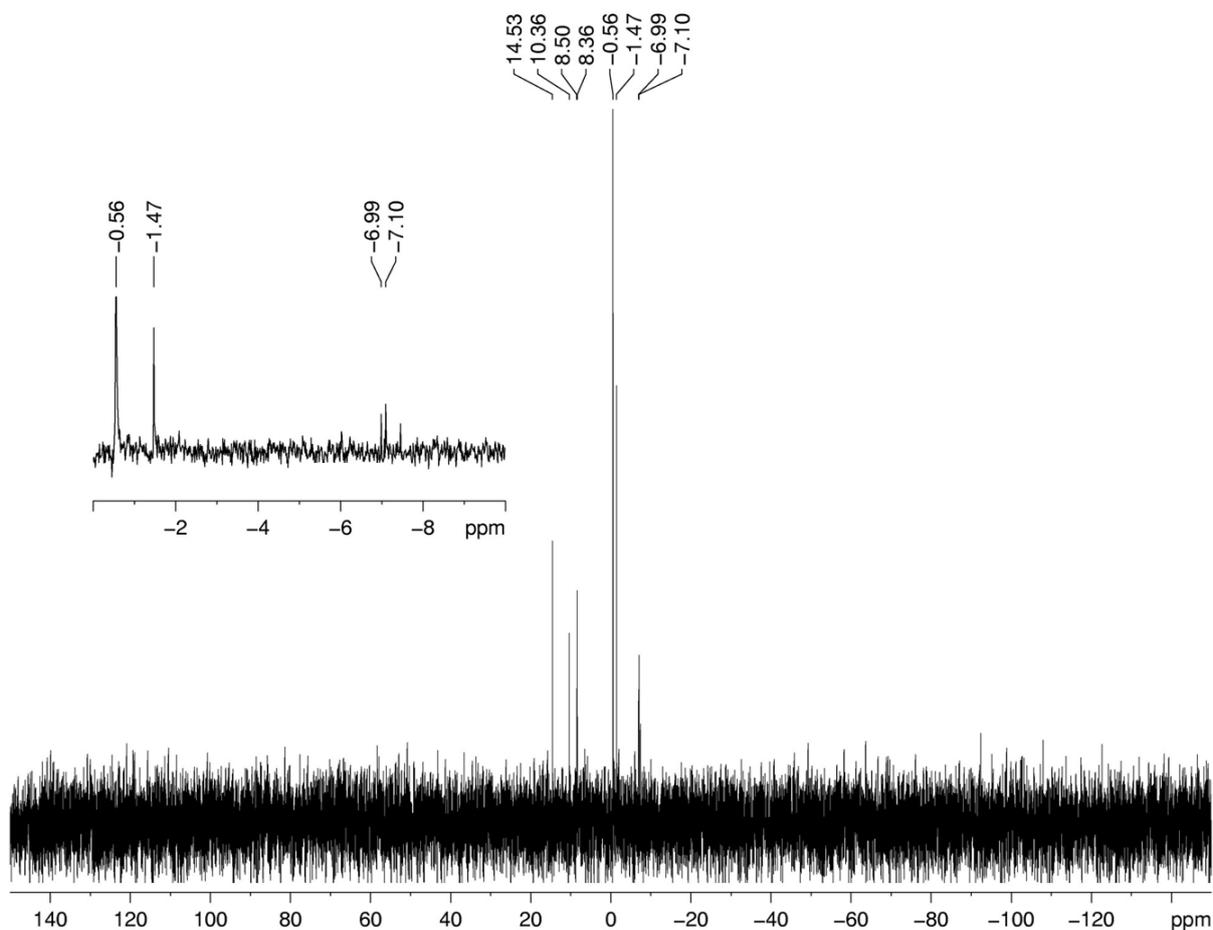


Abb. 48: ^{31}P -NMR-Spektrum der Synthese von C^2AB -CMP-Neu5Ac COOMe **58** nach der Reinigung am Chromatotron.

Kajihara et al. verwendeten zur Isolierung des vollständig blockierten CMP-Neu5Ac-Derivates **25** Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH-20 mit Dichlormethan als Elutionsmittel. Diese Methode wurde ebenfalls getestet. Es war jedoch nicht möglich, das Nebenprodukt mit einer Verschiebung von 0.71 ppm vollständig von dem vermutlichen Produkt **58** mit einer Verschiebung von -6.99 ppm und -7.10 ppm abzutrennen (Abb. 49). Eine vollständige Reinigung des vermutlichen Produktes **58** war nicht möglich. Die Fraktion die vermutlich das Produkt **58** enthielt wurde mittels hochauflösender Massenspektrometrie analysiert. Das Produkt **58** weist berechnet für $C_{44}H_{56}N_4O_{25}P^+$ eine Masse von $m/z = 1071.2971$ als $[M+H]^+$ auf. Die gefundene Masse von $m/z = 1071.2972$ konnte dem Zielprodukt **58** als $[M+H]^+$ zugeordnet werden. Somit wurde bestätigt, dass das Produkt **58** in dieser Fraktion enthalten war. In dem Abschnitt 2.2.1.1 ist herausgearbeitet, dass *Kajihara et al.* eine erhöhte Eliminierungstendenz des Phosphatresters **25** beobachtet haben. Diese könnte eine Möglichkeit für die Bildung von Nebenprodukten bei der Synthese des vollständig geschützten CMP-Neu5Ac-Derivates **58** sein. In diesem Fall würden das Glycol **69** der Neuraminsäure **22** und ein monomaskiertes CMP-Derivat entstehen.

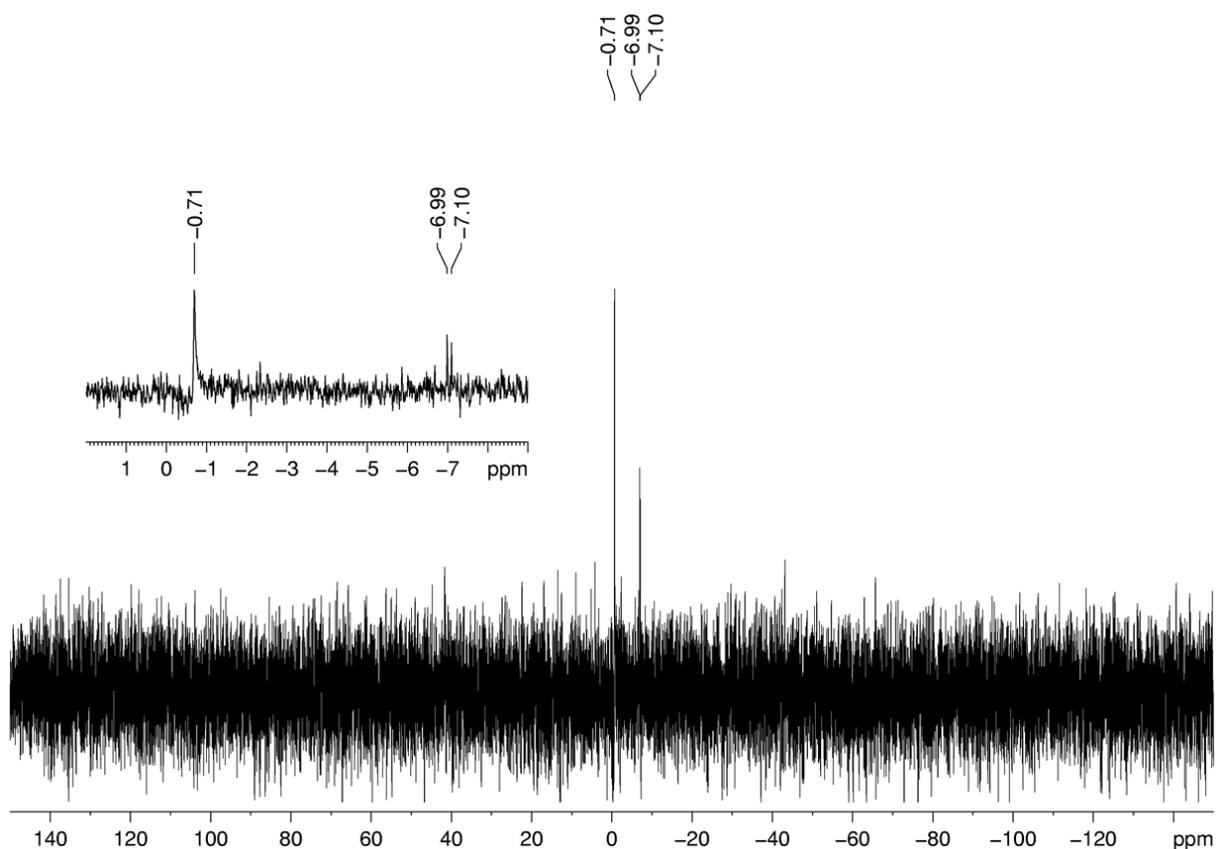


Abb. 49: ^{31}P -NMR-Spektrum der Synthese von C^2AB -CMP-Neu5Ac COOMe **58** nach der Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie.

Im Gegensatz zu der Reinigung der Verbindung C^2AB -CMP-Neu5Ac COOMe **58** gelang die Reinigung der Zielmoleküls pMP^h AB-CMP-Neu5Ac COOMe **59** mittels Größenausschlusschromatographie an Sephadex mit Dichlormethan als Elutionsmittel ohne Probleme. Das Produkt **59** konnte mit einer Ausbeute von 30% als Diastereomergemisch erhalten werden. Auch hier war die Abtrennung von einer Vielzahl an Nebenprodukten nötig, die aufgrund der hohen Anzahl nicht isoliert werden konnten. Das ^{31}P -NMR-Spektrum der sauberen Verbindung pMP^h AB-CMP-Neu5Ac COOMe **59** ist in Abbildung 50 gezeigt. Anhand des Spektrums ist zu erkennen, dass das Zielprodukt **59** mit hoher Reinheit erhalten werden konnte.

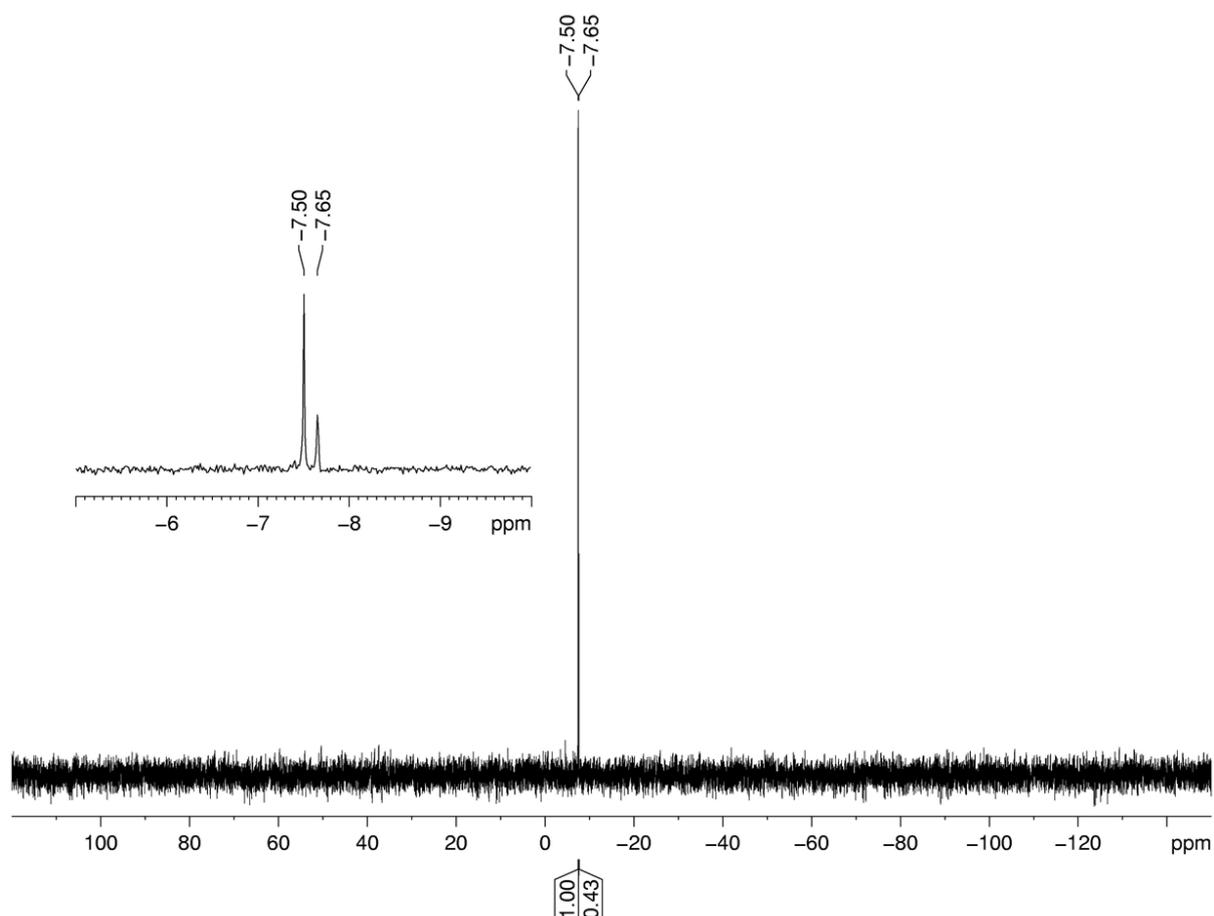


Abb. 50: ^{31}P -NMR-Spektrum der pMP^h AB-CMP-Neu5Ac COOMe **59**.

4.2.1.3 Fazit der Darstellung der bioreversibel maskierten, lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivate **58** und **59** mittels Phosphoramiditchemie

Die Darstellung der benötigten Bausteine **22**, **60** und **61** gelang in sehr guten Ausbeuten. Problematisch bei dieser Syntheseroute war die Darstellung der C^2AB -CMP-Neu5Ac COOMe **58**. In diesem Fall gelang eine vollständige Reinigung nicht, vermutlich aufgrund der Labilität des Produktes **58**. Während der Reinigungsversuche der C^2AB -CMP-Neu5Ac COOMe **58** wurde als Nebenprodukt eine Verbindung mit einer Verschiebung von 0.71 ppm erhalten. Da die vollständig peracetylierte CMP-Neu5Ac COOMe (Ac CMP-Neu5Ac COOMe) **27** ohne eine Maske an

dem Phosphat eine chemische Verschiebung von -5.65 aufweist,^[171] muss davon ausgegangen werden, dass ein Zuckerphosphat oder ein Nucleosidmonophosphat entstanden war. In dem Fall von ^{pMPH}AB-CMP-Neu5Ac^{COOMe} **59** war eine Reinigung des Produktes ohne Probleme möglich. Dieses Zielmolekül konnte zwar nur mit einer moderaten Ausbeute von 30% isoliert werden, jedoch gelang erstmalig die Darstellung eines bioreversibel maskierten, lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivates.

4.2.2 Chemische Hydrolysestudien der lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivate **58** und **59**

Um Informationen über die chemische Stabilität des Produktes ^{pMPH}AB-CMP-Neu5Ac^{COOMe} **59** zu erhalten, wurde eine chemische Hydrolysestudie bei physiologischem pH-Wert (pH 7.3) in 50 mM phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) durchgeführt. Die zentrale Frage war, ob die glycosidische Bindung unter diesen Bedingungen stabil ist. Es könnte zur Spaltung der glycosidischen Bindung sowohl durch Hydrolyse als auch durch eine Eliminierungsreaktion kommen. Bei der Spaltung dieser Phosphatesterbindung wäre die Verbindung **59** nicht als potentiell, lipophiles Tool für Zellassays geeignet. Auch die benzyliche Phosphatesterbindung der ^{pMPH}AB-Maske sollte unter diesen Bedingungen eine ausreichende Stabilität zeigen, da die Verbindung somit auch extrazellulär eine ausreichende Stabilität aufweisen sollte. Durch eine sehr schnelle Spaltung könnte die negative Ladung an der Phosphatgruppe ansonsten eine Diffusion durch die Zellmembran eventuell verhindern. Somit ist eine ausreichende chemische Stabilität der lipophilen Verbindungen eine zentrale Voraussetzung, um in Zellstudien eingesetzt werden zu können. Sollte die Verbindung **59** gegenüber chemischer Hydrolyse stabil sein, sollte ^{pMPH}AB-CMP-Neu5Ac^{COOMe} **59** zusätzlich mit Hinblick auf die Freisetzung von CMP-Neu5Ac **15** in einer enzymatischen Hydrolysestudie analysiert werden.

Die Analyse der chemischen Hydrolysestudie erfolgte sowohl ³¹P-NMR-spektroskopisch als auch mittels HPLC und einem *diode array detector* (DAD). Hierbei war entweder die Detektion von phosphathaltigen Hydrolyseprodukten und/oder die Detektion von nucleosidischen Hydrolyseprodukten aufgrund der UV-Absorption der Nucleobase bei einer Wellenlänge von 272 nm^[172] möglich. Zur Identifikation von Hydrolyseprodukten wurden erwartete Hydrolyseprodukte coinjiziert und mittels HPLC analysiert. Zusätzlich wurde hochauflösende Massenspektrometrie verwendet.

Des Weiteren wurde eine chemische Hydrolyse der Verbindung ^{C2}AB-CMP-Neu5Ac^{COOMe} **58** durchgeführt, auch wenn diese nicht vollständig gereinigt werden konnte. Es sollte überprüft werden, ob durch chemische Hydrolyse weitere Produkte als das bereits enthaltene Nebenprodukt/Zersetzungsprodukt entstehen. Die chemische Hydrolyse der verunreinigten Verbindung ^{C2}AB-CMP-Neu5Ac^{COOMe} **58** wurde mittels ³¹P-NMR-Spektroskopie (Abb. 51)

analysiert. Bereits nach 5 Minuten war das vermutete Ausgangsmaterial **58** mit einer chemischen Verschiebung von -6.71 ppm und -6.76 ppm fast vollständig umgesetzt und nach 20 Minuten nicht mehr detektierbar. Es konnte gezeigt werden, dass das während der Reaktion oder Reinigung erhaltene Nebenprodukt/Zersetzungsprodukt mit dem Produkt der Hydrolyse identisch war, da nur ein Produkt mit einer chemischen Verschiebung von -1.46 ppm und kein weiteres Signal in dem ^{31}P -NMR-Spektrum erhalten wurde.

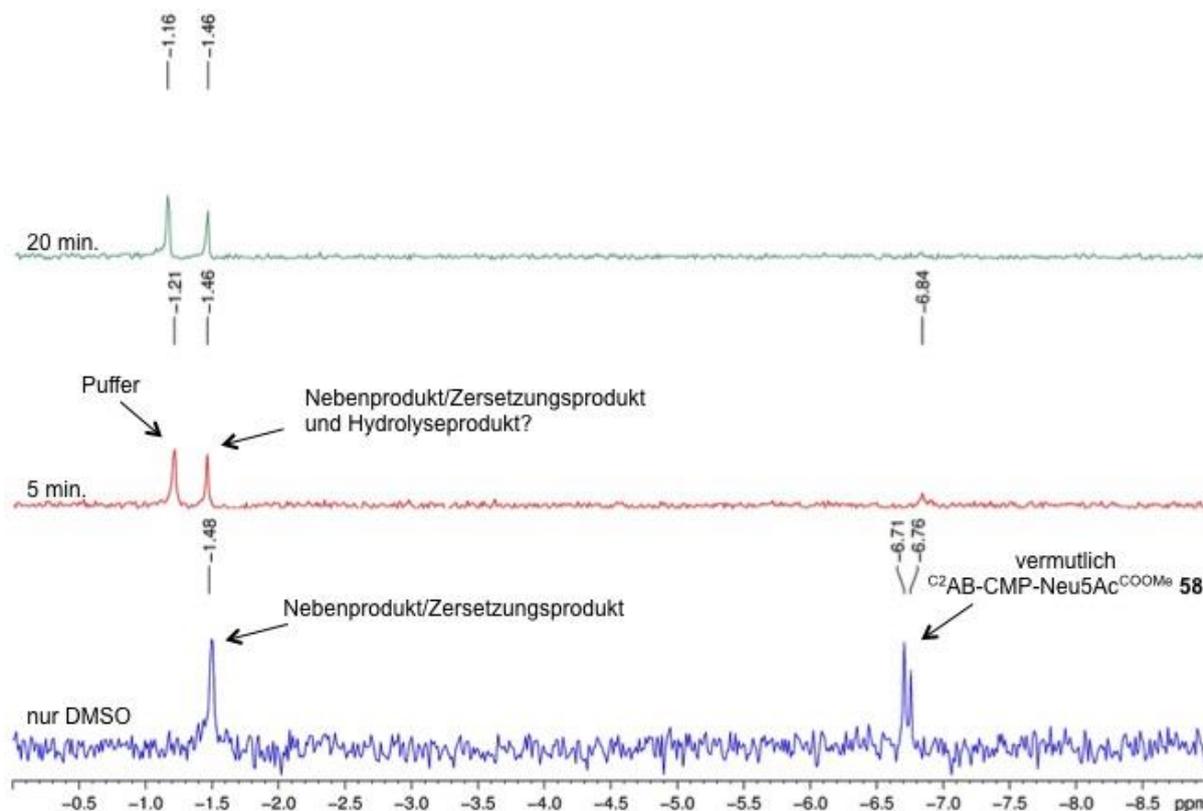


Abb. 51: Chemische Hydrolyse der $\text{C}^2\text{AB-CMP-Neu5Ac}^{\text{COOMe}}$ **58** analysiert mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie.

Die chemische Hydrolyse der zweiten Verbindung $^{\text{PMPH}}\text{AB-CMP-Neu5Ac}^{\text{COOMe}}$ **59**, analysiert mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie, zeigte ein ähnliches Ergebnis (Abb. 52). Bereits beim Startwert ohne Phosphatpuffer wurde eine geringe Menge eines Hydrolyseproduktes/Eliminierungsproduktes detektiert, obwohl diese Verbindung vollständig isoliert worden war. Auch hier war nach 20 Minuten kaum noch das Ausgangsmaterial **59** detektierbar. Es konnte kein Hydrolyseprodukt mit einer Verschiebung von -5.65 ppm, welche $\text{AcCMP-Neu5Ac}^{\text{COOMe}}$ **27** entsprechen würde, detektiert werden. Es wurde lediglich ein Hydrolyseprodukt mit einer Verschiebung von -1.47 ppm detektiert. Diese Verschiebung entsprach dem Hydrolyseprodukt der Verbindung $\text{C}^2\text{AB-CMP-Neu5Ac}^{\text{COOMe}}$ **58**. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass nicht $\text{AcCMP-Neu5Ac}^{\text{COOMe}}$ **27** durch Spaltung der

benzylischen Phosphatesterbindung gebildet wurde, sondern wahrscheinlich die glycosidische Bindung gespalten wurde.

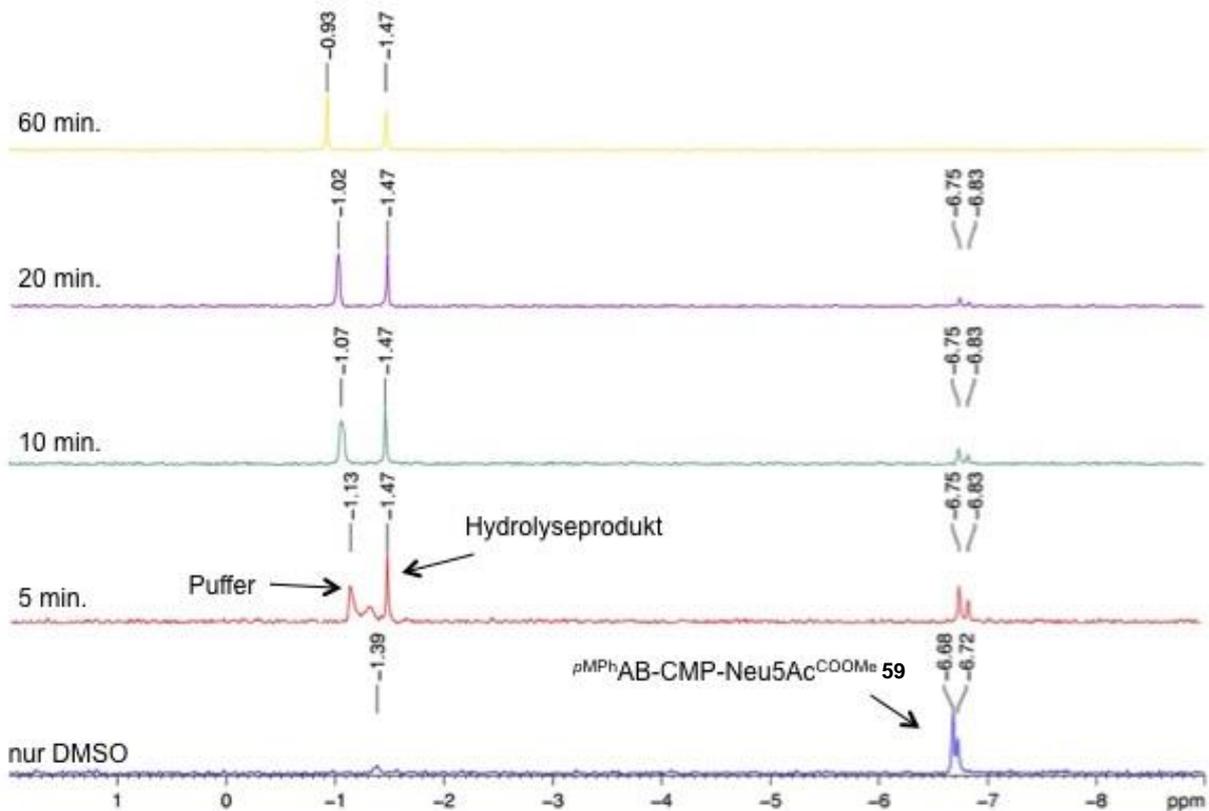


Abb. 52: Chemische Hydrolyse der $pMPHAB-CMP-Neu5Ac^{COOMe}$ **59** analysiert mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie.

Zur Identifizierung der Hydrolyseprodukte wurde die Hydrolyselösung der Verbindung $pMPHAB-CMP-Neu5Ac^{COOMe}$ **59** zusätzlich mittels HPLC und einem DAD analysiert. Der Verlauf der Hydrolyse ist in Abbildung 53 gezeigt. Auch hier war die Ausgangsverbindung **59**, welche eine Retentionszeit von 14 Minuten aufwies, sehr schnell umgesetzt. Es wurde lediglich ein UV-aktives Produkt mit einer Retentionszeit von 8 Minuten detektiert. Dieses hydrolysiert über die Zeit nicht. Als mögliche UV-aktive Produkte kamen im Fall der Abspaltung der Maske der 4-Hydroxybenzylalkohol **57** oder bei unvollständiger Hydrolyse der Maske der 4-(4'-Methoxybenzoyloxy)benzylalkohol **70** in Frage. Bei einer Spaltung der glycosidischen Bindung wäre die Bildung von Cytidinmonophosphat mit und ohne Maske **71** bzw. **72** möglich.

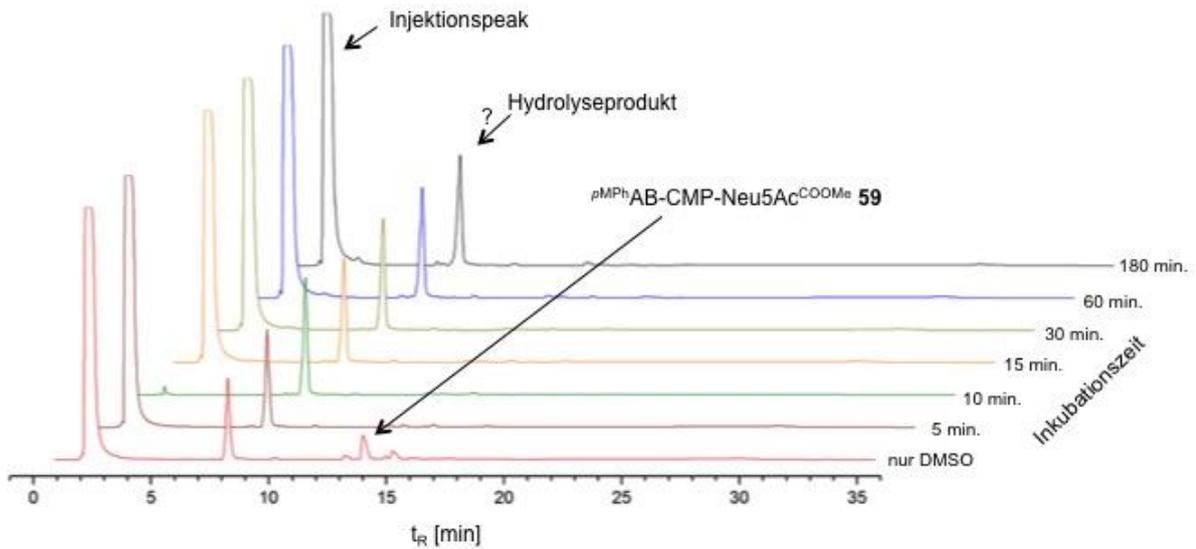


Abb. 53: RP-HPLC-Chromatogramm der chemischen Hydrolyse der $pMPHAB-CMP-Neu5Ac^{COOMe}$ **59** (HPLC-Methode A, 272 nm).

Zur Identifizierung des Hydrolyseproduktes wurden sowohl der 4-Hydroxybenzylalkohol **57** (Abb. 54 links) als auch der 4-(4'-Methoxybenzoyloxy)benzylalkohol **70** (Abb. 54 rechts) coinjiziert. In beiden Fällen war das gebildete Produkt nicht identisch mit der coinjizierten Verbindung, da beide coinjizierten Verbindungen andere Retentionszeiten aufwiesen.

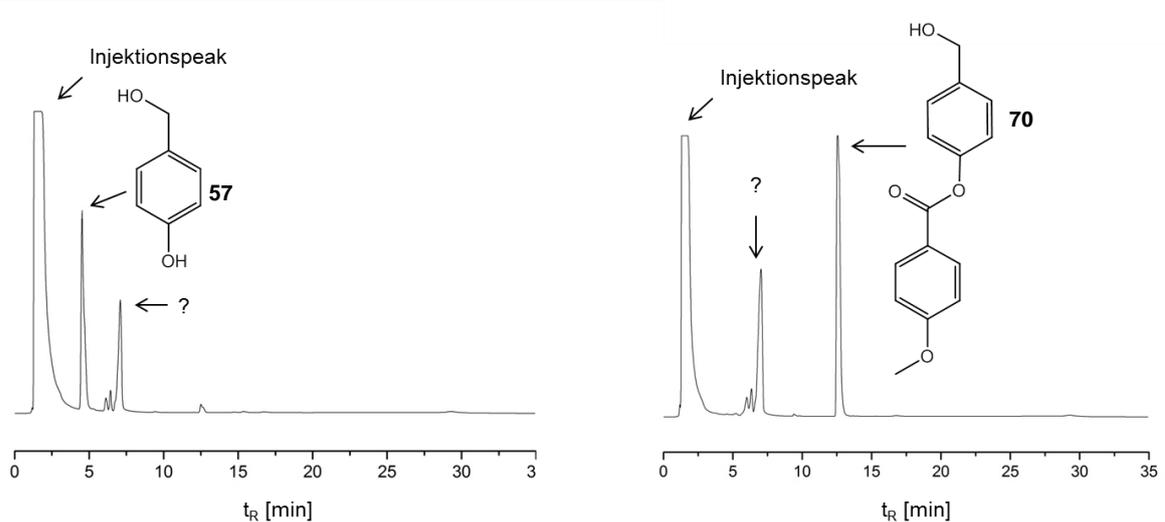


Abb. 54: RP-HPLC-Chromatogramm der Coinjektion zur Identifizierung des Hydrolyseproduktes von $pMPHAB-CMP-Neu5Ac^{COOMe}$ **59** (Methode A, 272 nm).

Da auch diese Analyse keinen Aufschluss über das beobachtete Produkt gab, wurde die Kinetik-Lösung mittels hochauflösender Massenspektrometrie analysiert (Abb. 55). Des Weiteren ist mittels Massenspektrometrie auch die Identifizierung nicht UV-aktiver und/oder phosphathaltiger Hydrolyseprodukte möglich.

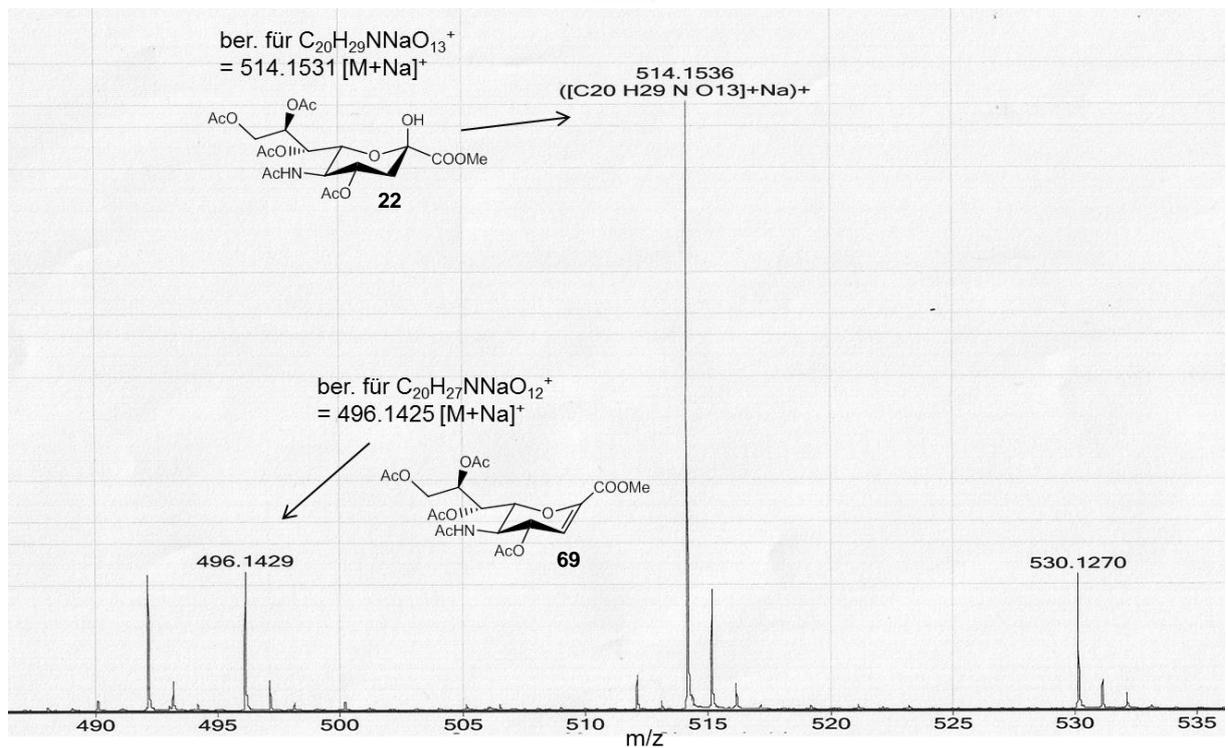
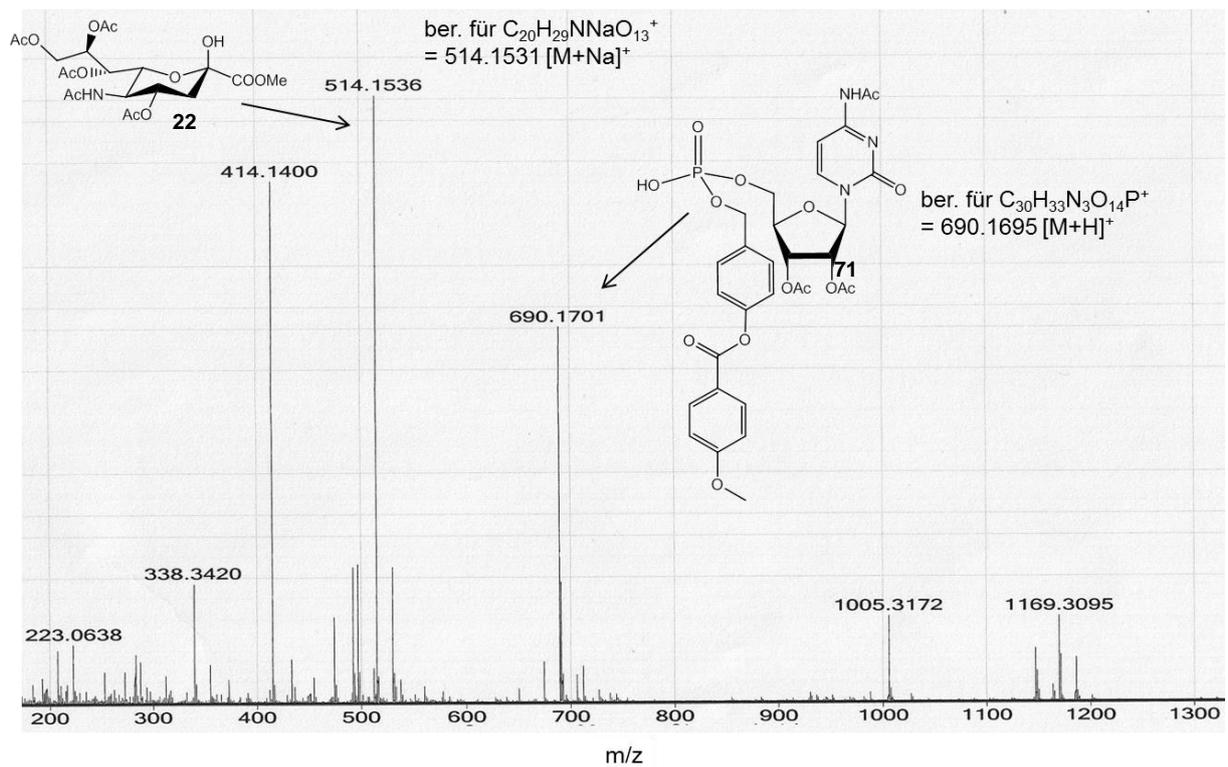


Abb. 55: ESI⁺-HRMS-Spektren zur Identifizierung der Hydrolyseprodukte von ^pMPhAB-CMP-Neu5Ac^{COOMe} **59**.

Diese Analyse ermöglichte die Bestimmung von zwei Hydrolyseprodukten: der ^OAcNeu5NAc^{COOMe} **22** sowie des UV-aktiven monomaskierten Cytidinmonophosphates **71**. Die gefundene Masse von $m/z = 514.1536$ konnte dem Neuraminsäurederivat **22** berechnet

für $C_{20}H_{29}NNaO_{13}^+ = 514.1531$ als $[M+Na]^+$ zugeordnet werden und die gefundene Masse von $m/z = 690.1701$ konnte dem monomaskierten Cytidinmonophosphat ($^{pMP}AB-CMP$) **71** berechnet für $C_{30}H_{33}N_3O_{14}P^+ = 690.1695$ als $[M+H]^+$ zugeordnet werden (Abb. 55 oben).

Das Glycal **69** weist berechnet für $C_{20}H_{27}NNaO_{12}^+$ als $[M+Na]^+$ eine Masse von $m/z = 496.1425$ auf. Diese wurde ebenfalls detektiert (Abb. 55 unten). Somit scheint die glycosidische Bindung sowohl durch Hydrolyse als auch durch eine Eliminierungsreaktion gespalten zu werden.

Bei den durchgeführten Hydrolysestudien wurde jeweils ein Hydrolyseprodukt mit gleicher chemischer Verschiebung im ^{31}P -NMR-Spektrum detektiert. Bei der Hydrolyse der Verbindung $^{pMP}AB-CMP-Neu5Ac^{COOMe}$ **59** konnte als Hydrolyseprodukt das $^{pMP}AB-CMP$ **71** nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass auch im Fall des $^{C2}AB-CMP-Neu5Ac^{COOMe}$ **58** das monomaskierte CMP-Derivat $^{C2}AB-CMP$ **73** entstand.

Bei der Verbindung **59** wurde bei der chemischen Hydrolyse sehr schnell die glycosidische Bindung durch Hydrolyse oder durch eine Eliminierungsreaktion gespalten und somit wurde eine sehr geringe chemische Stabilität festgestellt. Damit war eine zentrale Voraussetzung nicht gegeben, um diese Verbindung in Zellstudien verwenden zu können. Somit wurden mit dieser Verbindung keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

4.2.2.1 Fazit der chemischen Hydrolysen

Die chemischen Hydrolysestudien der Verbindungen $^{C2}AB-CMP-Neu5Ac^{COOMe}$ **58** und $^{pMP}AB-CMP-Neu5Ac^{COOMe}$ **59** zeigten, dass die glycosidische Bindung sowohl durch Hydrolyse als auch durch eine Eliminierungsreaktion gespalten wurde (Abb. 56). Die beiden Verbindungen **58** und **59** weisen somit eine sehr geringe chemische Stabilität auf. Obwohl sehr unterschiedlich stabile Masken verwendet wurden, wurde in dem jeweiligen ^{31}P -NMR-Spektrum ein Produkt mit gleicher chemischer Verschiebung detektiert. Die Verwendung von AB-Masken, die sehr unterschiedliche Hydrolysehalbwertszeit aufweisen, scheint keinen Einfluss auf die chemische Stabilität der Phosphatdiester **58** bzw. **59** zu haben.

Die Blockierung der Phosphatgruppe mit einer AB-Maske scheint einen größeren Einfluss auf die Stabilität der Phosphatbrücke zu haben als die von *Kajihara et al.* verwendete Cyanoethylgruppe, da hier der Phosphatdiester **25** in einer Ausbeute von 75% über zwei Stufen erhalten werden konnte. Da die glycosidische Bindung gespalten wurde und nicht die Maske, sind die beiden Verbindungen **58** und **59** nicht als Tools für Zellassays geeignet. Zur Entwicklung eines lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivates sollte auf eine Blockierung der negativen Ladung an der Phosphatgruppe verzichtet werden.

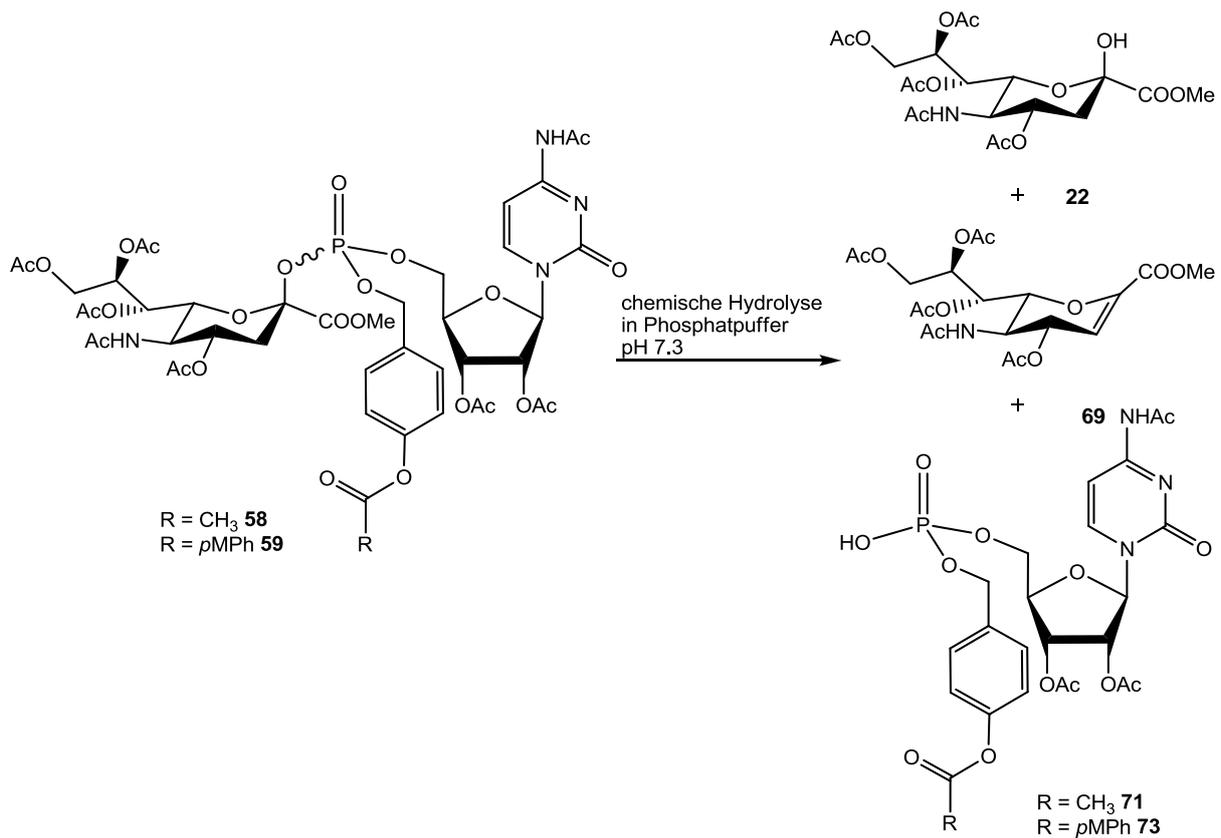


Abb. 56: Hydrolyseprodukte der chemischen Hydrolysen der ^{C2}AB-CMP-Neu5Ac^{COOMe} **58** und ^{pMPh}AB-CMP-Neu5Ac^{COOMe} **59**.

4.2.3 Darstellung von bioreversibel maskierten, lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivaten mittels *cycloSal*-Technik

Die Verwendung eines lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivates, welches noch eine negative Ladung am Phosphat trägt, scheint für Zellassays nicht ausgeschlossen, da sogar Nucleosidtriphosphat-Prodrugs, welche noch zwei negative Ladungen tragen, die Zellmembran passieren können.^[135] Um die Lipophilie der CMP-Neu5Ac **15** zu erhöhen, sollten wieder Acetylschutzgruppen zur Blockierung der Hydroxylgruppen verwendet werden. Da nicht sichergestellt war, dass der Methyl ester zur Blockierung der Säurefunktion von Esterasen gespalten werden würde, sollte zusätzlich eine weitere enzymatisch spaltbare Gruppe zur Blockierung der Säurefunktion verwendet werden. Um Carbonsäuren zu blockieren, werden häufig Pivaloyloxymethyl- (POM) oder Acetoxymethyl- (AM) Ester verwendet.^[173-175] Um die Kupplung nicht zu beeinflussen, sollte die AM-Gruppe verwendet werden, da diese sterisch nicht so anspruchsvoll wie die POM-Gruppe ist.

Die von S. Wolf^[2] entwickelte Syntheseroute zur Darstellung von CMP-Neu5Ac **15** stellte für die Darstellung eines lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivates, welches eine negative Ladung am Phosphat trägt, eine ideale Grundlage dar (Abschnitt 2.2.2.2). Die Synthese erfolgte im ersten Reaktionsschritt zu ^{Ac}CMP-Neu5Ac^{COOMe} **27**. In diesem Fall war eine Isolierung der

Verbindung $^{\text{Ac}}\text{CMP-Neu5Ac}^{\text{COOMe}}$ **27** nicht durchgeführt worden. Da jedoch die Darstellung von CMP-Neu5Ac **15** über zwei Stufen mit einer Ausbeute von 85% erfolgte, sollte auch die Synthese der $^{\text{Ac}}\text{CMP-Neu5Ac}^{\text{COOMe}}$ **27** mit einer sehr guten Ausbeute möglich sein. Die Kupplung zum Nucleosidmonophosphat-Zucker sollte somit mittels *cycloSal*-Technik und nicht über Phosphoramiditchemie erfolgen. Des Weiteren ist bei der Verwendung der *cycloSal*-Methode kein weiterer Reaktionsschritt nach der Kupplung nötig. Bei der Verwendung der Phosphoramiditchemie wird als Zwischenprodukt ein Phosphatriester erhalten. Die Schutzgruppe an der Phosphatgruppe, wie beispielsweise Cyanoethyl, müsste im Folgenden noch neben den Acetylgruppen an der Zucker- und der Nucleosid-Einheit gespalten werden.

Die Retrosynthese zur Darstellung der an der Säurefunktion unterschiedlich blockierten, lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivate **27** und **74** mittels der *cycloSal*-Technik ist in Abbildung 57 gezeigt.

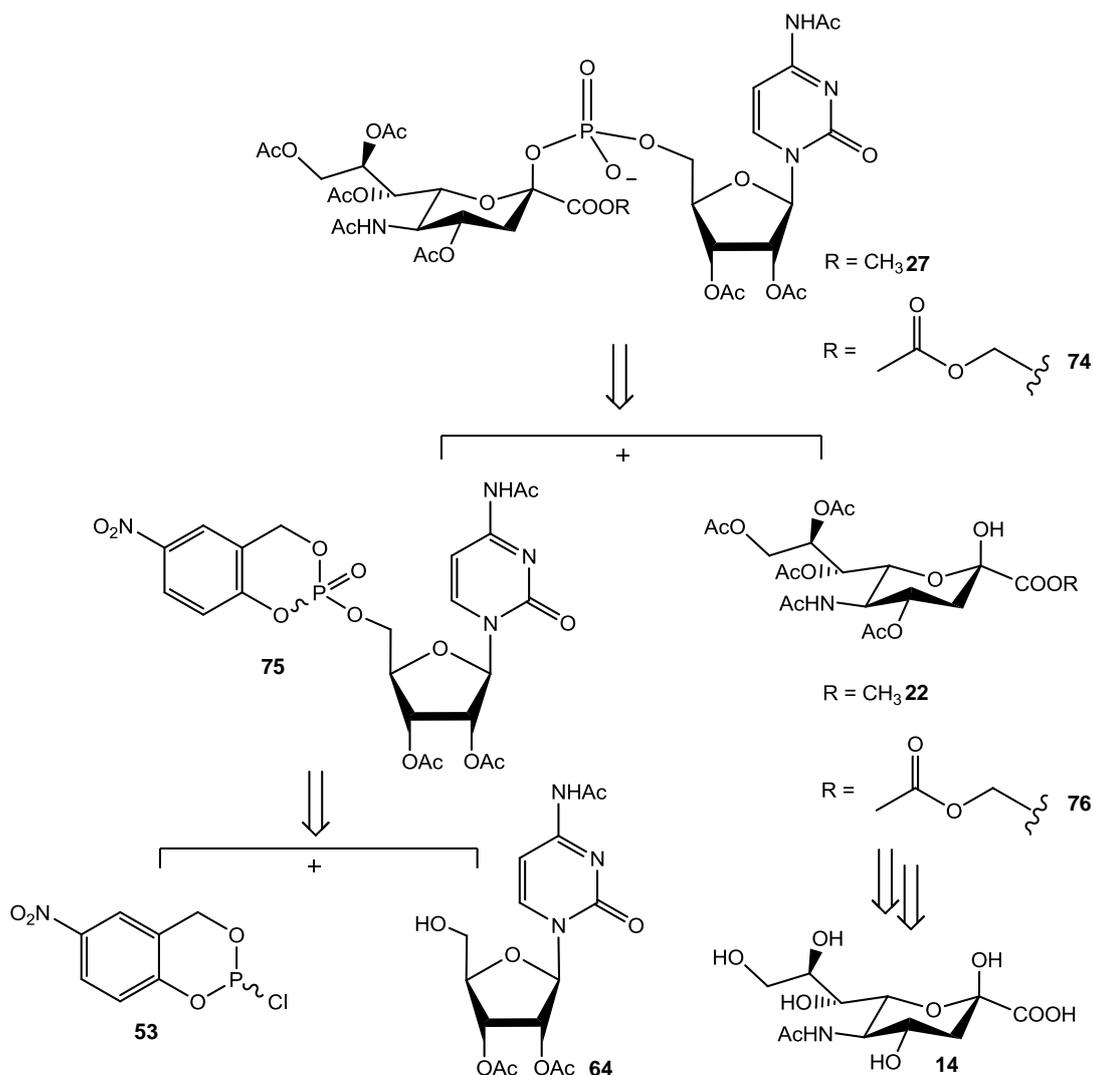


Abb. 57: Retrosyntheseschema zur Darstellung der bioreversibel maskierten, lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivate **27** und **74** mittels *cycloSal*-Technik.

Die lipophilen vollständig acetylierten CMP-Neu5Ac-Derivate ${}^{\text{Ac}}\text{CMP-Neu5Ac}^{\text{COOMe}}$ **27** und ${}^{\text{Ac}}\text{CMP-Neu5Ac}^{\text{COOAM}}$ **74** sollten aus dem Cytidin-*cycloSal*-Triester **75** und dem entsprechenden vollständig geschützten Halbacetal ${}^{\text{OAc}}\text{Neu5Ac}^{\text{COOMe}}$ **22** bzw. ${}^{\text{OAc}}\text{Neu5Ac}^{\text{COOAM}}$ **76** dargestellt werden. Die Darstellung der ${}^{\text{OAc}}\text{Neu5Ac}^{\text{COOAM}}$ **76** sollte ebenfalls ausgehend von Neu5Ac **14** erfolgen. Die Synthese des *cycloSal*-Triesters **75** sollte aus dem Chlorphosphit **53** und dem Cytidin-Derivat **64** erfolgen.

4.2.3.1 Synthese der benötigten Kupplungsbausteine

Die Syntheserouten des selektiv geschützten Cytidin-Derivates **64** und des Chlorphosphits **53** wurden bereits in Abschnitt 4.2.1.1 und 4.1.1.1 beschrieben. Die Synthese des benötigten Cytidin-*cycloSal*-Triesters **75** erfolgte analog der in Abschnitt 4.1.1.1 durchgeführten Triestersynthesen. Der Cytidin-Triester **75** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 59% erhalten (Abb. 58).

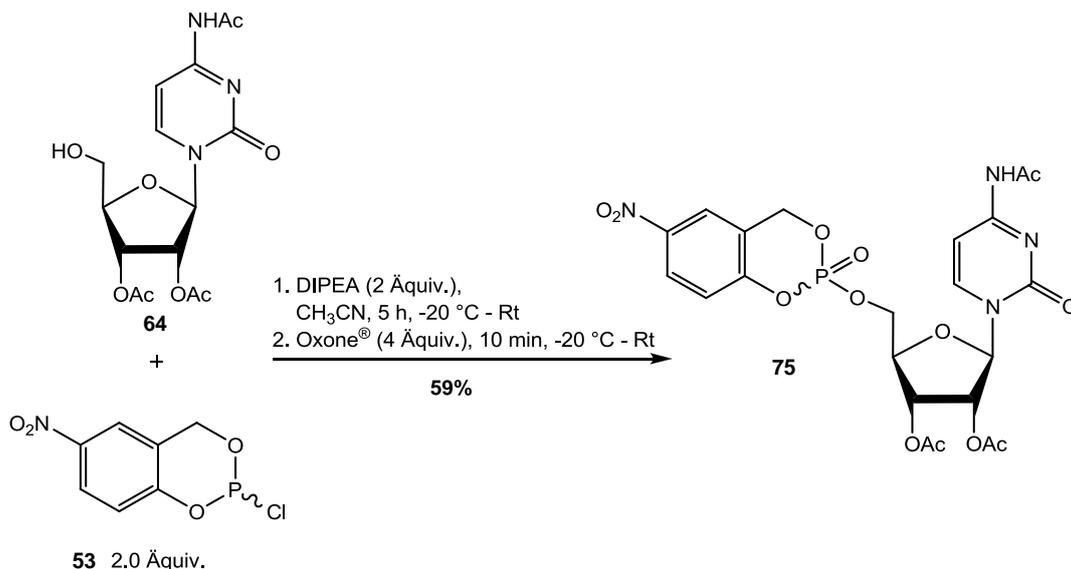


Abb. 58: Synthese des Cytidin-*cycloSal*-Triesters **75**.

Die Darstellung von ${}^{\text{OAc}}\text{Neu5Ac}^{\text{COOMe}}$ **22** wurde bereits in Abschnitt 4.2.1.1 beschrieben. Die Synthese von ${}^{\text{OAc}}\text{Neu5Ac}^{\text{COOAM}}$ **76** erfolgte ebenfalls über drei Stufen ausgehend von Neu5Ac **14** (Abb. 59) und in Anlehnung an die Syntheseroute von ${}^{\text{OAc}}\text{Neu5Ac}^{\text{COOMe}}$ **22**.

Zuerst erfolgte die Blockierung der Säurefunktion. Eine Möglichkeit zur Einführung von Acyloxymethyl-Gruppen ist die Verwendung von Acyloxymethylhalogeniden und Dimethylformamid als Lösungsmittel.^[176]

In dieser Arbeit wurde das kommerziell erhältliche Brommethylacetat verwendet. Zur Blockierung der Säurefunktion mit einem AM-Ester musste diese zunächst deprotoniert werden. Hierzu wurde Neu5Ac **14** in Dimethylformamid gelöst und zur Deprotonierung der Säure mit 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) versetzt. DBU wurde verwendet, da es

sich hierbei um eine nicht-nucleophile starke Base handelt. Die Deprotonierung der Säure sollte möglichst schnell erfolgen, um mögliche Nebenreaktionen an den Hydroxylgruppen zu verhindern. Eine nicht-nucleophile Base wurde eingesetzt, um auch die Spaltung der *N*-Acetylgruppe zu verhindern. Nach einer Reaktionszeit von 10 Minuten erfolgte die Umsetzung mit Brommethylacetat. Nach der vollständigen Umsetzung des Eduktes wurde in diesem Fall direkt die Acetylierung der Hydroxylgruppen unter Standardbedingungen durch Verwendung von Essigsäureanhydrid in Pyridin durchgeführt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung wurde das Produkt **77** über zwei Stufen in einer Ausbeute von 54% als Anomerengemisch im Verhältnis 2:1 erhalten. Da die Konfiguration des anomeren Zentrums für die folgende Halogenierung nicht relevant war, wurde auf eine Trennung der Anomere verzichtet. Da dieser Ansatz erfolgreich war, wurde keine weitere nicht-nucleophile Base, wie beispielsweise Triethylamin, eingesetzt.

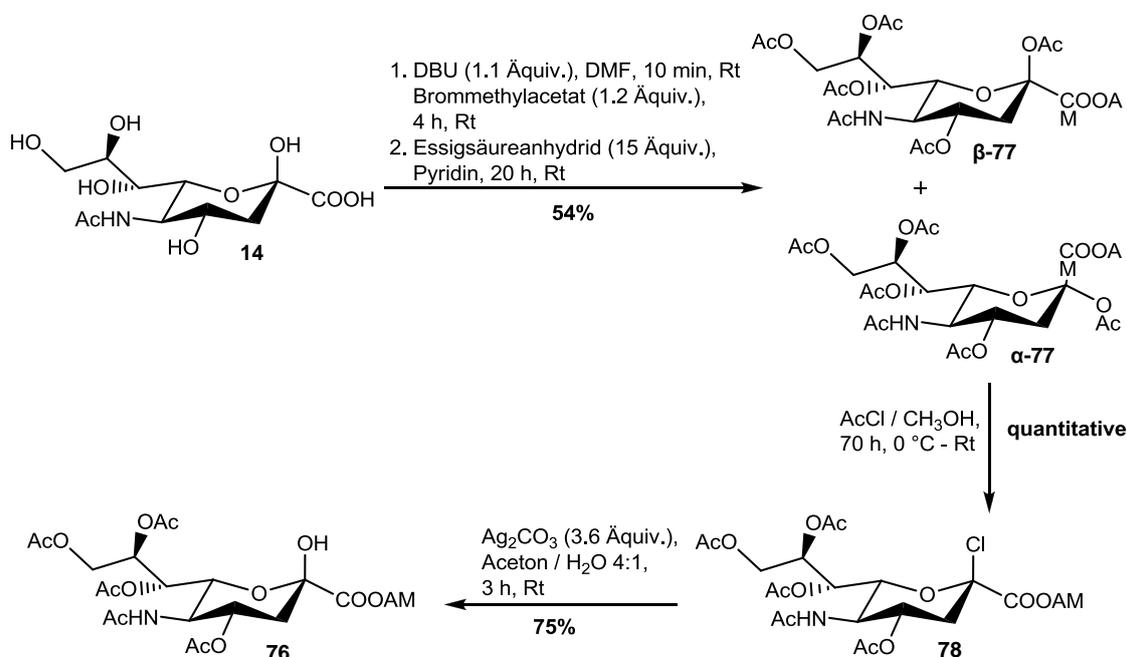


Abb. 59: Synthese von ^{OAc}Neu5NAc^{COOAM} **76**.

Im zweiten Schritt erfolgte die Darstellung des Zuckerchlorids **78**. Diese Synthese sowie der letzte Reaktionsschritt erfolgten analog der in Abschnitt 4.2.1.1 beschriebenen Synthesen zur Darstellung von ^{OAc}Neu5NAc^{COOMe} **22**. Die Darstellung des Zuckerchlorids **78** verlief quantitativ und es war ebenfalls kein Reinigungsschritt nötig. Erwartungsgemäß wurde selektiv das β -Anomer erhalten, da dieses eine höhere Stabilität aufweist. ^{OAc}Neu5NAc^{COOAM} **76** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung ebenfalls als reines β -Anomer und in einer sehr guten Ausbeute von 75% erhalten. Somit gelang über diese drei Stufen die Darstellung des zweiten Neuraminsäure-Derivates **76** in guten bis sehr guten Ausbeuten.

4.2.3.2 Synthese der lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivate **27** und **74**

Die Darstellung der lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivate **27** und **74** sollte analog der von *S. Wolf*^[2] entwickelten Syntheseroute zur Darstellung von CMP-Neu5Ac **15** erfolgen (Abschnitt 2.2.2.2). Hierbei sollte der letzte Schritt, die Entfernung der Schutzgruppen, selbstverständlich ausgelassen werden. Da das vollständig blockierte CMP-Neu5Ac-Derivat **27** nicht von *S. Wolf* isoliert worden war, musste hier eine geeignete Reinigungsmethode gefunden werden. Es stellte sich schnell heraus, dass sowohl die Synthese als auch die Isolierung der gewünschten Verbindung **27** eine große Herausforderung darstellten. In der Tabelle 1 sind daher verschiedene Varianten aufgelistet, die zur Optimierung der Syntheseroute durchgeführt wurden.

Tab. 1: Variationen der Reaktionsbedingungen zur Darstellung von ^{Ac}CMP-Neu5Ac^{COOMe} **27**.

Varia- nte	Triester (Äquiv.)	Zucker (Äquiv.)	Base (Äquiv.)	Zugabe- reihenfolge	Reaktions- zeit [h]	Vortrock- nung der Edukte	Ergebnis
a	1.0	2.0	NaH 2.0	Triester zum Zucker	4	ja	kein Erfolg
b	1.0	1.1	NaH 1.1	Triester zum Zucker	4	ja	Produkt- bildung, keine Reproduzier- barkeit
c	1.0	1.1	NaH 1.1	Zucker zum Triester	4	ja	kein Erfolg
d	1.0	1.1	NaH 1.1	Triester zum Zucker	1	ja	kein Erfolg
e	1.0	1.1	DBU 1.1	Triester zum Zucker	4	ja	kein Erfolg
f	1.0	1.1	NaH 1.1	Triester zum Zucker	4	nein	analoges Ergebnis zu b
g	1.0	1.5	NaH 1.1	Triester zum Zucker	4	nein	Produkt- bildung, Reproduzier- barkeit

Die Reaktion analog der von *S. Wolf* beschriebenen Reaktionsbedingungen durchzuführen, brachte auch nach mehrfachen Versuchen keinen Erfolg (Tabelle 1, Variante a). In diesen Fällen wurde eine Vielzahl von Signalen mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie detektiert.

$^{\text{Ac}}\text{CMP-Neu5Ac}^{\text{COOMe}}$ **27** weist, wie bereits erwähnt, eine chemische Verschiebung von -5.65 ppm im ^{31}P -NMR-Spektrum auf.^[171] Die Darstellung der Verbindung $^{\text{Ac}}\text{CMP-Neu5Ac}^{\text{COOAM}}$ **74** wird im Folgenden beschrieben. Das ^{31}P -NMR-Spektrum dieser Verbindung ist in Abbildung 66 gezeigt.

Bei Verwendung der Variante a konnten auch nach mehrfacher Reinigung durch PR-Säulenchromatographie, Größenausschlusschromatographie oder automatisierter RP-18-Säulenchromatographie weder das gewünschte Produkt **27** erhalten werden, welches vermutlich mit einer chemischen Verschiebung von -5.70 ppm im ^{31}P -Roh-NMR-Spektrum detektiert worden war (Abb. 60), noch Nebenprodukte isoliert und identifiziert werden. Die leichte Abweichung könnte durch noch vorhandene Salze entstanden sein.

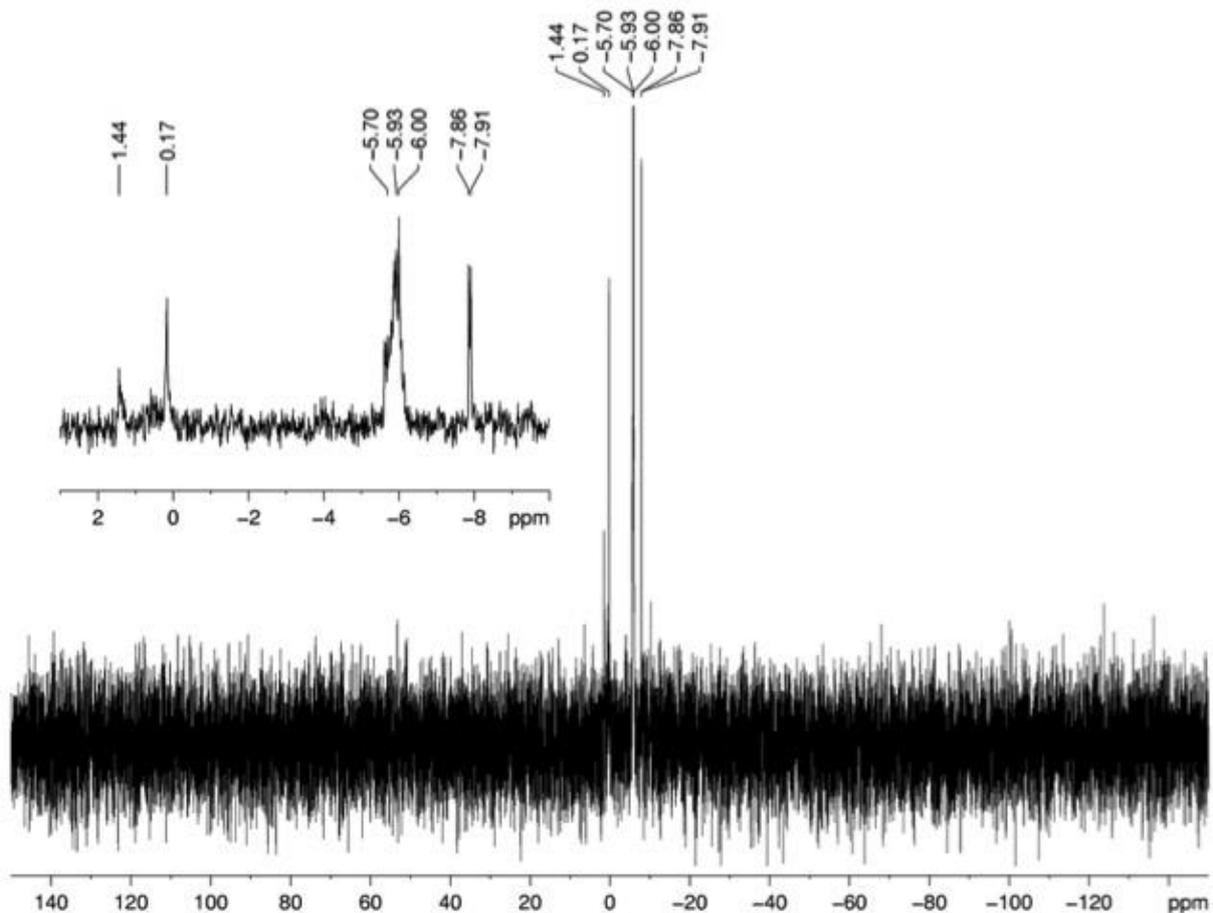
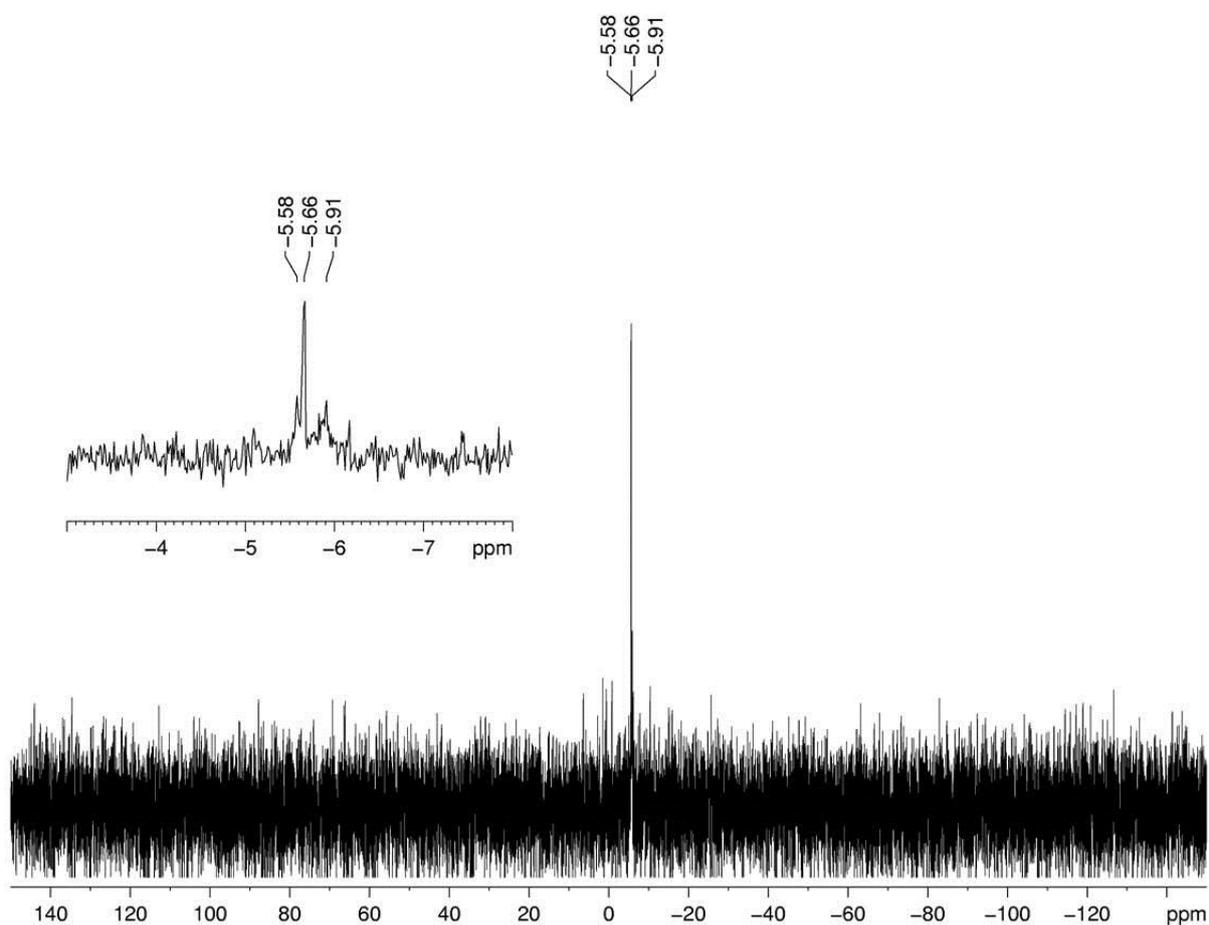


Abb. 60: ^{31}P -Roh-NMR-Spektrum der Variante a zur Darstellung der Verbindung $^{\text{Ac}}\text{CMP-Neu5Ac}^{\text{COOMe}}$ **27**.

Aus diesen Gründen wurden nach und nach verschiedene Parameter verändert, um zu untersuchen, ob so die Darstellung und Isolierung der Verbindung $^{\text{Ac}}\text{CMP-Neu5Ac}^{\text{COOMe}}$ **27**

durchgeführt werden konnte. Die jeweiligen Veränderungen sind in der Tabelle 1 aufgelistet. Da die Verwendung von 2.0 Äquivalenten an Natriumhydrid keinen Erfolg brachte, wurden diese auf 1.1 Äquivalente reduziert (Tabelle 1, Variante b). Im gleichen Schritt wurden die Äquivalente des Zuckers **22** der der Base angepasst, um das gleiche Verhältnis wie zuvor zu haben. Da es sich bei Natriumhydrid um eine schwache nucleophile Base handelt,^[177] wurde durch die Reduktion der Base erhofft, dass eine mögliche Destabilisierung des *cycloSal*-Triesters durch die Base verhindert wird. Diese Variante zeigte eine deutliche Verbesserung. Bereits nach der Entfernung des Lösungsmittels und dem erneuten Lösen in Wasser, welches wiederum durch Gefriertrocknung entfernt wurde, war in dem ³¹P-NMR-Spektrum hauptsächlich das Produkt **27** zu erkennen (Abb. 61).



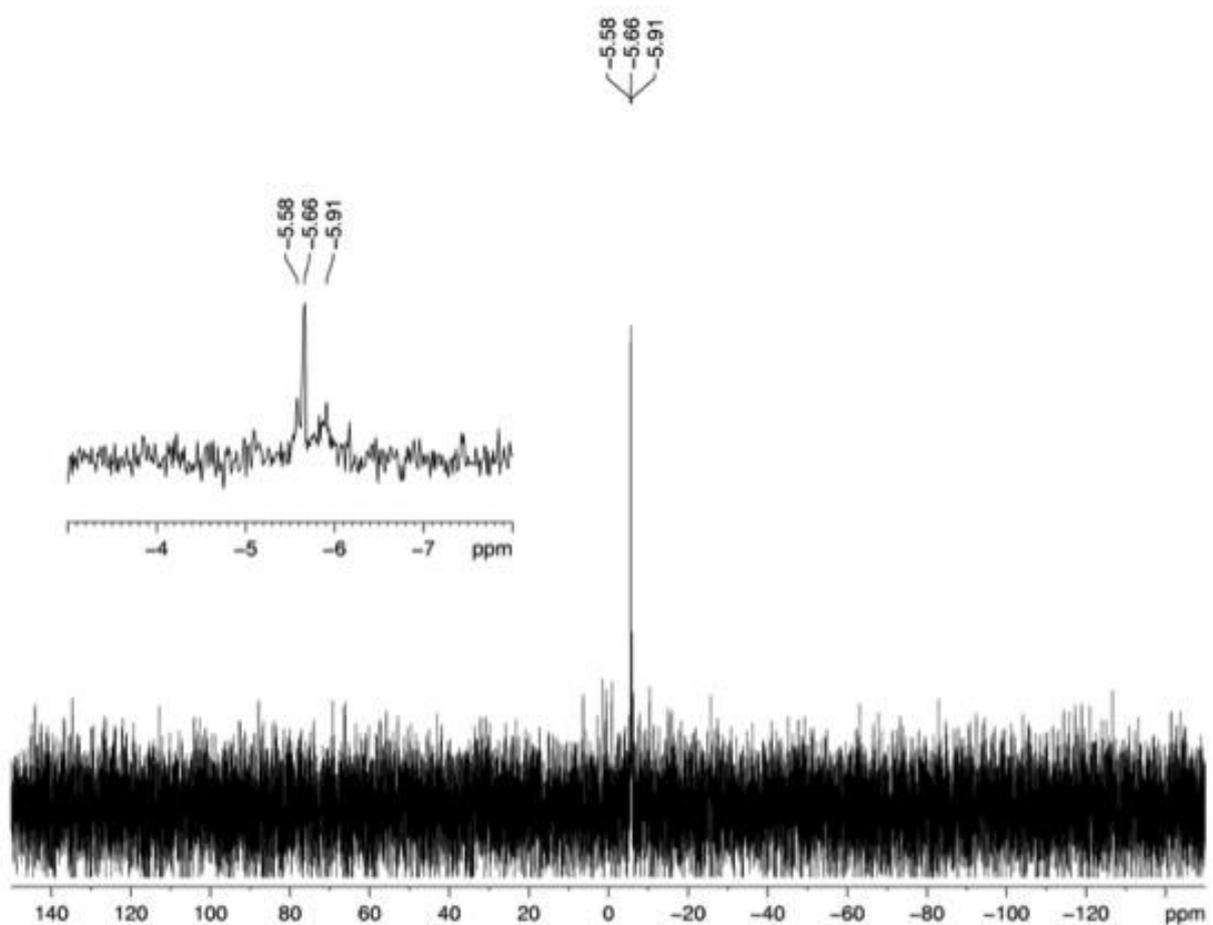


Abb. 61: ^{31}P -NMR-Spektrum der Variante b zur Darstellung der Verbindung $^{\text{Ac}}\text{CMP-Neu5Ac}^{\text{COOMe}}$ **27** nach Entfernung des Lösungsmittels und erneutem Lösen in Wasser.

Nach zweimaliger Reinigung mittels automatisierter RP-18-Säulenchromatographie konnte das gewünschte Produkt **27** isoliert werden. Dieses wies eine chemische Verschiebung von -5.66 auf (Abb. 62). Das Produkt wurde, wie anhand des NMR-Spektrums zu sehen ist, mit hoher Reinheit erhalten. Die Reduktion der Äquivalente der Base war somit sinnvoll und brachte den Erfolg, dass das Produkt **27** erhalten werden konnte. Problematisch war jedoch die Reproduzierbarkeit der Reaktion. Ein parallel angesetzter Reaktionsansatz zeigte wieder mehr Nebenprodukte. Der einzige Unterschied bei den Ansätzen war die Zeit, die die Ausgangsverbindungen **22** und **75** im Ölpumpenvakuum getrocknet wurden.

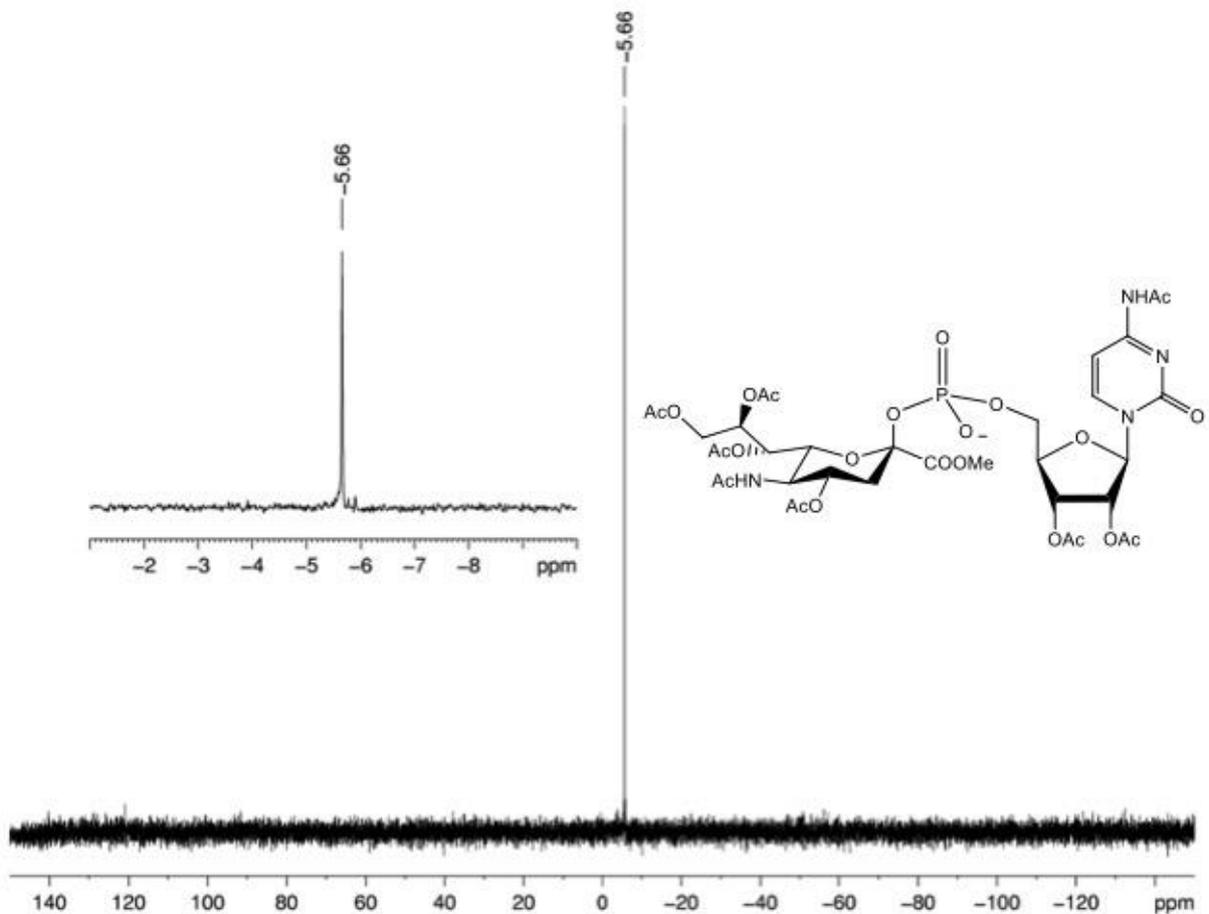


Abb. 62: ^{31}P -NMR-Spektrum der Variante b zur Darstellung der Verbindung $^{\text{Ac}}\text{CMP}$ - $\text{Neu5Ac}^{\text{COOMe}}$ **27** nach säulenchromatographischer Reinigung.

Es wurden weitere Varianten überprüft, um eine reproduzierbare Synthese zu entwickeln. Die Änderung der Reihenfolge der Reagenzienzugabe (Tab 1, Variante c), die Verkürzung der Reaktionszeit auf eine Stunde (Tab 1, Variante d) und die Verwendung einer nicht nucleophilen Base (Tab 1, Variante e) brachten keinen Erfolg. Um genauere Informationen über den Reaktionsverlauf zu erhalten, wurde die Reaktion bei Verwendung der Variante b mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie verfolgt (Abb. 63). Diese zeigte deutlich, dass der Triester bereits nach 30 Minuten umgesetzt war, sich jedoch erst nach drei Stunden Reaktionszeit eine neue Verbindung detektieren ließ. Diese wies eine chemische Verschiebung von -4.93 ppm auf. Nach einer Reaktionszeit von vier Stunden war keine weitere Veränderung zu erkennen.

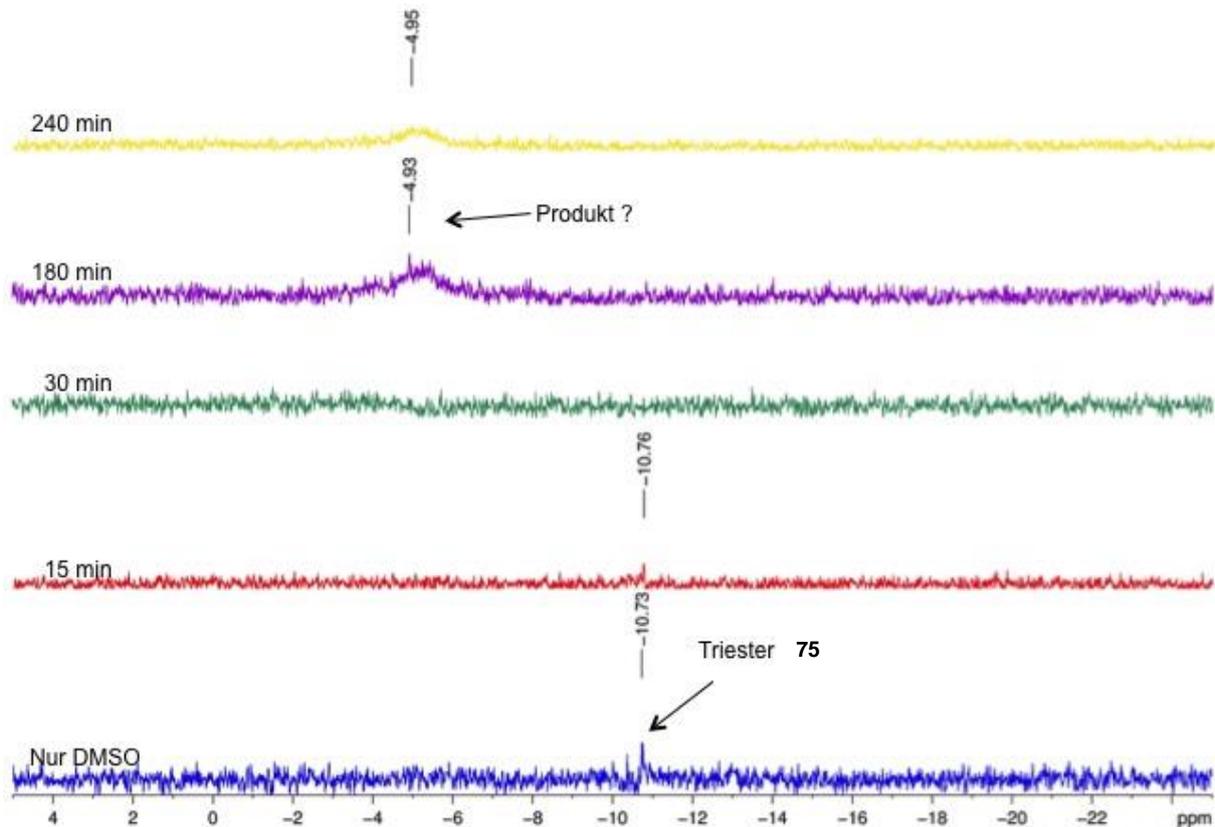


Abb. 63: Reaktionsverfolgung zur Darstellung des ^{Ac}CMP-Neu5Ac-Derivates **27** (Variante b) analysiert mittels ³¹P-NMR-Spektroskopie.

Nach der Aufarbeitung wurde als Hauptprodukt eine Verbindung mit einer Verschiebung von -5.67 ppm detektiert. Die Reaktionsverfolgung lässt somit den Schluss zu, dass eine Reaktionszeit von vier Stunden notwendig ist. Problematisch war dennoch die Reproduzierbarkeit der Synthese. Die Verwendung einer wasserfreien Stammlösung des Zuckers, gelöst in Dimethylformamid und gelagert über Molsieb, brachte eine Verschlechterung der Produktbildung. Möglicherweise war das Trocknen der Ausgangsverbindungen **22** und **75** nicht sinnvoll. Der Triester **75** und der Zucker **22** wurde vor jeder Reaktion, teilweise über Nacht, im Ölpumpenvakuum getrocknet. Bei der Synthese von *S. Wolf*^[171] ist lediglich beschrieben, dass der Triester **75** „einige Zeit“ getrocknet wurde. Es stellte sich die Frage wie lange der Triester **75** tatsächlich getrocknet wurde und ob das Wasser vollständig entfernt wurde. Es wurde daher überprüft, ob bei der Reaktion eine bessere Reproduzierbarkeit erlangt werden kann, wenn die Ausgangsverbindungen **22** und **75** nicht vorgetrocknet werden (Tab. 1, Variante f). Eine Trocknung der Ausgangsverbindungen wurde zuvor durchgeführt, um Nebenreaktionen durch eine Hydrolyse des Triesters zu verhindern. Erstaunlicherweise zeigte jedoch die Verwendung der nicht vorgetrockneten Ausgangsverbindungen **22** und **75** ein analoges Ergebnis zu der Variante b, bei der die Darstellung des Produktes **27** erfolgreich verlief.

Dies ließ den Schluss zu, dass ein Grund für das unterschiedliche Ergebnis bei der Variante b der zeitliche Unterschied beim Vortrocknen der Ausgangsverbindungen **22** und **75** war. Ein Vortrocknen scheint daher nicht nötig zu sein. In einer letzten Reaktionsvariante (Tab. 1, Variante g) wurden die Äquivalente des Zuckers **22** von 1.1 auf 1.5 Äquivalente erhöht. Da das genaue Abwiegen von Natriumhydrid in diesen geringen Mengen aufgrund von Schwankungen während des Wägevorganges fehlerbehaftet war, wurden die Äquivalente des Zuckers erhöht, um sicherzustellen, dass keine Rückstände der Base mehr vorhanden waren, wenn der *cyclo*Sal-Triester **75** zu dem Reaktionsansatz gegeben wurde. Diese letzte Variation brachte den gewünschten Erfolg. Die Reaktion konnte mehrere Male zuverlässig wiederholt werden. Die Darstellung der Zielverbindungen **27** und **74** ist in der Abbildung 64 gezeigt. Die Verbindung $^{Ac}CMP\text{-}Neu5Ac^{COOMe}$ **27** konnte mit einer Ausbeute von 39% und die Verbindung $^{Ac}CMP\text{-}Neu5Ac^{COOAM}$ **74** mit einer Ausbeute von 20% dargestellt werden.

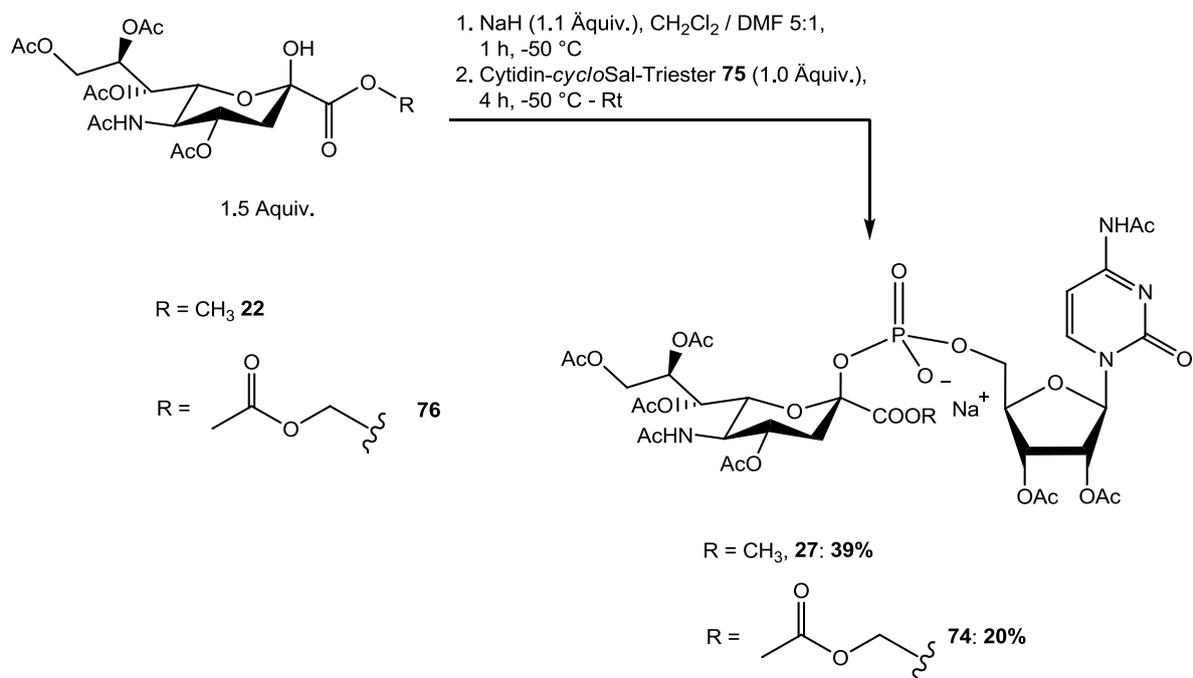


Abb. 64: Synthese der lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivate **27** und **74** nach der Variante g.

Wie einleitend erwähnt, war die Reinigung der Produkte sehr aufwändig. Es waren teilweise drei Reinigungsschritte erforderlich, da noch vorhandene Nebenprodukte, die nicht identifiziert werden konnten, sehr ähnliche R_f-Werte aufwiesen. Die Verwendung der automatisierten RP-18 Säulenchromatographie war zwingend erforderlich, da so aufgrund der UV-Aktivität der Zielverbindungen **27** und **74** eine genauere Detektion als bei der klassischen Säulenchromatographie möglich war. Weitere Verluste an Produkt konnten so vermieden werden. Es wird vermutet, dass es zusätzlich zur Bildung von Zersetzungsprodukten während der Reinigungsschritte kam. Die erhaltenen Roh-³¹P-NMR-Spektren

zeigten eine geringere Anzahl an Signalen als die ^{31}P -NMR-Spektren der verschiedenen Fraktionen die nach der Reinigung erhalten wurden. Die moderaten Ausbeuten lassen sich durch die erschwerte Abtrennung von Nebenprodukten und die einmalige Durchführung der Synthese zu $^{\text{Ac}}\text{CMP-Neu5Ac}^{\text{COOAM}}$ **74** erklären. Falls Nebenprodukte während der Reinigungsschritte gebildet wurden, erklärt dies auch den großen Unterschied zu der von *S. Wolf* erzielten Ausbeute von 85% über zwei Stufen für die Darstellung CMP-Neu5Ac **15**.

Das ^1H -NMR-Spektrum des Zielmoleküls **27** ist in Abbildung 65 gezeigt. Es ist zu sehen, dass die Darstellung des lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivates **27** erfolgreich war. Das ^{31}P -NMR-Spektrum der sauberen Verbindung **27** wurde bereits in der Abbildung 62 gezeigt. Anhand der beiden NMR-Spektren ist auch zu sehen, dass die Zielverbindung **27** in hoher Reinheit erhalten werden konnte.

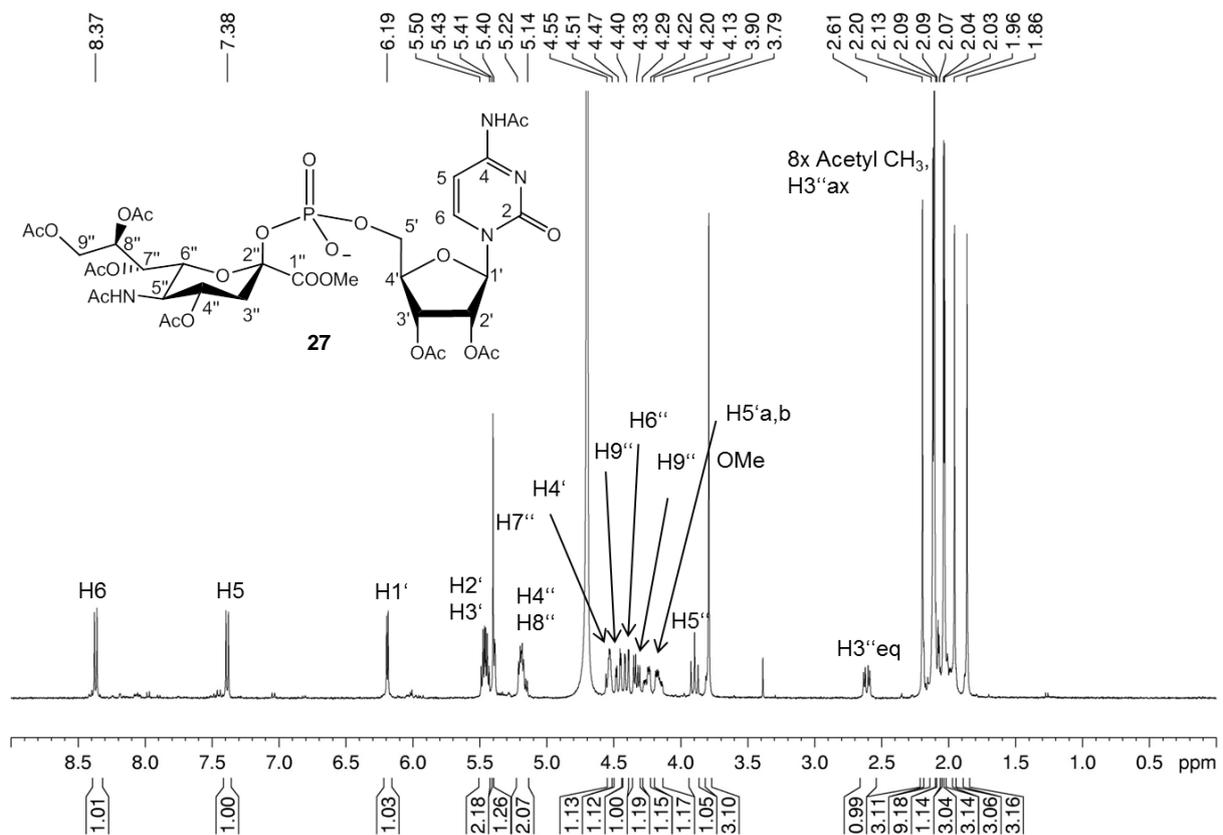


Abb. 65: ^1H -NMR-Spektrum der $^{\text{Ac}}\text{CMP-Neu5Ac}^{\text{COOMe}}$ **27**.

Die Verbindung $^{\text{Ac}}\text{CMP-Neu5Ac}^{\text{COOAM}}$ **74** weist eine chemische Verschiebung von -5.47 ppm im ^{31}P -NMR-Spektrum auf (Abb. 66 oben). Das ^1H -NMR-Spektrum des Zielmoleküls **74** ist in Abbildung 66 unten gezeigt. Auch hier wird bestätigt, dass die Darstellung des lipophilen $^{\text{Ac}}\text{CMP-Neu5Ac}^{\text{COOAM}}$ -Derivates **74** erfolgreich war und dass diese Verbindung in hoher Reinheit erhalten werden konnte.

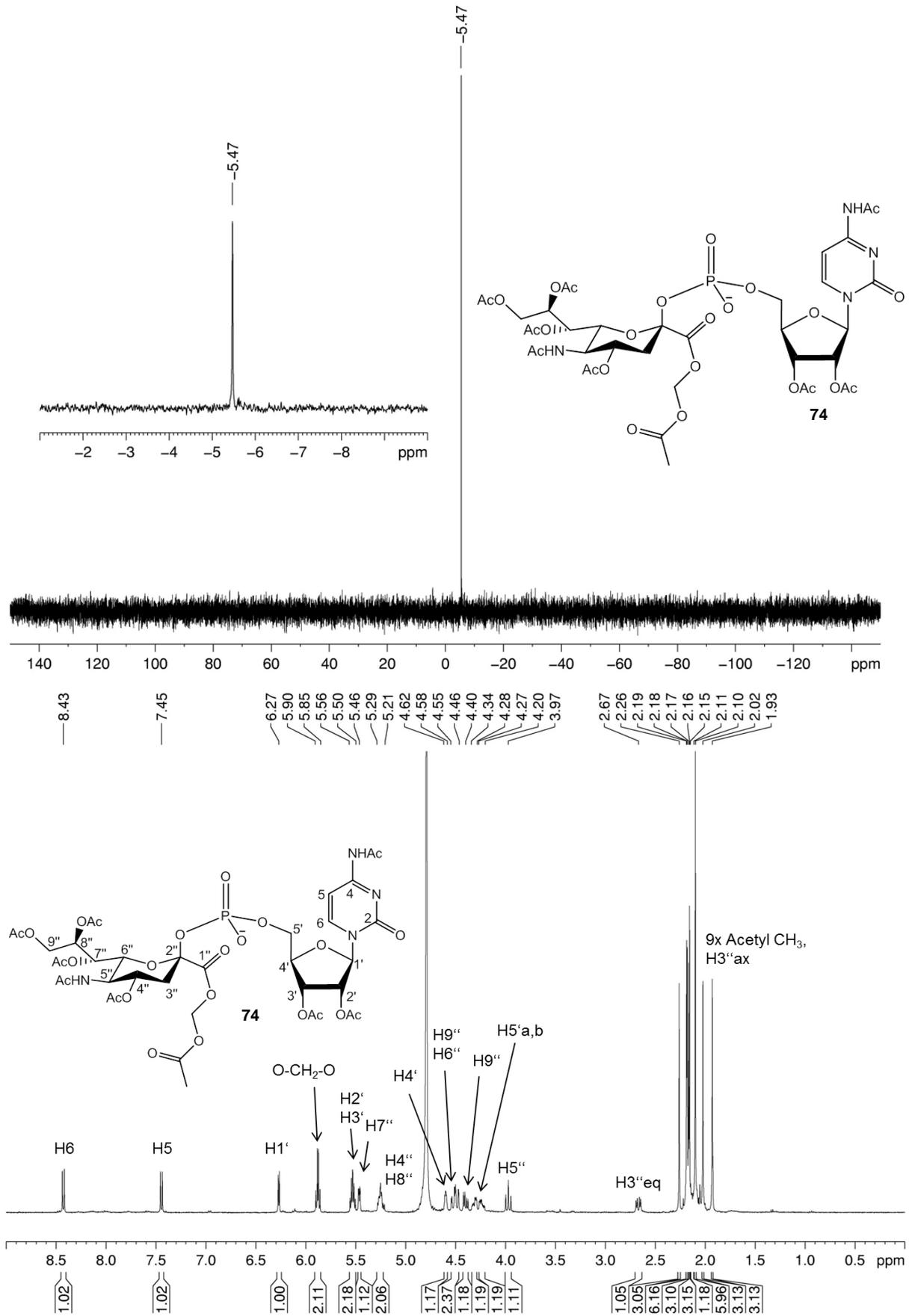


Abb. 66: ^{31}P -NMR-Spektrum (oben), ^1H -NMR-Spektrum (unten) der $^{\text{Ac}}\text{CMP}$ -Neu5Ac^{COOAM} 74.

4.2.3.3 Fazit der Syntheseroute zur Darstellung von lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivaten mittels *cycloSal*-Technik

Es sollten lipophile CMP-Neu5Ac-Derivate mit zwei verschiedenen Schutzgruppen an der Säurefunktion dargestellt werden. Als Schutzgruppe sollte neben dem Methylester ein Acetoxymethylester verwendet werden. Für die Darstellung von ^{OAc}Neu5NAc^{COOAM} **76** wurde ein neues Syntheseprotokoll in Anlehnung an die Syntheseroute zur Darstellung der ^{OAc}Neu5NAc^{COOMe} **22** entwickelt. Die Synthese gelang problemlos und in sehr guten Ausbeuten. Durch Verwendung der *cycloSal*-Technik gelang nach Optimierung der Syntheseroute von S. Wolf die Darstellung der lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivate **27** und **74**. Beide Produkte konnten in hoher Reinheit erhalten werden. Die erhaltenen Ausbeuten der Verbindungen **27** und **74** waren aufgrund von Nebenprodukten mit sehr ähnlichen R_f-Werten lediglich moderat.

4.2.4 Enzymatische Hydrolysestudien der lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivate **27** und **74**

Bei den Verbindungen ^{Ac}CMP-Neu5Ac^{COOMe} **27** und ^{Ac}CMP-Neu5Ac^{COOAM} **74** handelt es sich im Gegensatz zu den zuvor dargestellten vollständig geschützten CMP-Neu5Ac-Derivaten **58** und **59** um Phosphatdiester und nicht um Phosphatriester. *Kajihara et al*^[131] haben, wie in Abschnitt 2.2.2.1 herausgearbeitet ist, bei der Synthese von CMP-Neu5Ac **15** eine deutlich erhöhte Eliminierungstendenz von CMP-Neu5Ac-Phosphatriestern im Vergleich zu dem Phosphatdiester **15** festgestellt. Eine Eliminierungstendenz wurde auch bei den Phosphatriestern **58** und **59** beobachtet. Für die in dieser Arbeit dargestellten Phosphatdiester **27** und **74** wurde aufgrund der Beobachtung von *Kajihara et al* eine geringe Eliminierungstendenz erwartet, als bei den Phosphatriestern **58** und **59**. Die Verbindungen **27** und **74** sollten daher eine höhere chemische Stabilität aufweisen, weshalb keine chemischen Hydrolysestudien durchgeführt wurden. Es wurden enzymatische Hydrolysestudien durchgeführt, mit dem Ziel zu untersuchen, ob die Acetylgruppen sowie die jeweilige Schutzgruppe der Säurefunktion der Verbindungen ^{Ac}CMP-Neu5Ac^{COOMe} **27** bzw. ^{Ac}CMP-Neu5Ac^{COOAM} **74** gespalten werden und ob die glycosidische Bindung, im Gegensatz zu den Verbindungen **58** und **59**, stabiler ist. Als Enzym wurde Schweineleberesterase (*pig liver esterase*, PLE) verwendet. Da es sich um eine Esterase handelt, wurde angenommen, dass beide vorhandenen *N*-Acetylgruppen auf dem Molekül verbleiben und somit das Molekül ^{NHAc}CMP-Neu5Ac **79** gebildet werden würde. Als Besonderheit ist anzumerken, dass es verschiedene Isoenzyme des Enzyms PLE gibt, die sowohl als Esterasen als auch Amidasen mit unterschiedlichem Grad an Substratselektivität fungieren können.^[178]

Es wurde eine schnelle Spaltung der kurzkettigen Acetylestere vermutet. Aus diesem Grund wurde die enzymatische Hydrolysestudie mit 2 µL einer PLE-Lösung (1 mg/mL mit 27 u/mg)

in PBS (pH 7.3) durchgeführt. Hydrolysestudien zur Spaltung von AB-Estern werden beispielsweise mit 7.5 μL einer PLE-Lösung (3 mg/mL mit 17 u/mg) durchgeführt.^[138]

Für jeden Messwert wurde eine Hydrolyselösung angesetzt. Bei dem Startwert wurde anstatt des Enzyms PBS verwendet. Nach der entsprechenden Inkubationszeit bei 37 °C erfolgte die Denaturierung und Fällung des Enzyms durch Zugabe von Methanol und einer fünfminütigen Behandlung bei 0 °C. Abschließend erfolgte eine Filtration der Hydrolyselösung. Die Proben wurden anschließend mittels HPLC mit einem UV- und einem Massendetektor analysiert. Diese Methode ermöglichte zum einen die Detektion von UV-aktiven Verbindungen mit Hilfe eines DAD und zum anderen die Identifikation der während der Hydrolyse gebildeten Verbindungen durch Verwendung eines Massendetektors. Es wurde erwartet, dass nach und nach die O-Acetylgruppen sowie die Säureschutzgruppe gespalten werden würden. Des Weiteren sollte ebenfalls die Detektion von Produkten möglich sein, die durch eine mögliche chemische Hydrolyse oder durch Eliminierung gebildet wurden. Es wurden sowohl ESI⁺ als auch ESI⁻ Messungen durchgeführt. Allerdings enthielten die ESI⁺ Daten mehr relevante Informationen bezogen auf die Detektion von gebildeten Intermediaten. Zusätzlich wurden extrahierte Ionenchromatogramme zur Identifikation von Intermediaten herangezogen. Da bei dem verwendeten System ein *single quad detector* verwendet wurde, wurde bei Bedarf zusätzlich die hochauflösende Massenspektrometrie eingesetzt. Die Hydrolyse wurde jeweils für sieben Tage durchgeführt. Die erste Messung wurde nach 30 Minuten durchgeführt. Weitere Messungen erfolgten nach 2 und 24 Stunden. Anschließend erfolgte alle 24 Stunden eine weitere Messung.

4.2.4.1 Enzymatische Hydrolysestudie der Verbindung ^{Ac}CMP-Neu5Ac^{COOMe} **27**

Zunächst wurde die Hydrolyse der Verbindung ^{Ac}CMP-Neu5Ac^{COOMe} **27** durchgeführt. Die Analyse bei t_0 zeigte, dass ^{Ac}CMP-Neu5Ac^{COOMe} **27** in der Lösung enthalten war und dass diese sowohl mittels UV-Detektion (Abb. 67 HPLC-Chromatogramm oben) analysiert werden konnte als auch eine Detektion mittels Massenspektrometrie (Massenspektrum Abb. 67 unten) möglich war. Die erhaltenen Massenspektren wurden immer aus der entsprechenden gesamten Peakfläche (HPLC-Chromatogramm) generiert. ^{Ac}CMP-Neu5Ac^{COOMe} **27** hat eine Retentionszeit von 6.5 Minuten. Die Peakbreite kommt dadurch zustande, dass kein Laufpuffer verwendet wurde und somit unterschiedliche Gegenionen mit vermutlich leicht verschiedenen Retentionszeiten erhalten wurden. Der Peak mit einer Retentionszeit von 6.8 Minuten enthält keine Massen, die möglichen Hydrolyseprodukten entsprechen würden. Die gefundenen Massen 924.3, 946.3, 968.3 konnten als [M+H]⁺, [M+Na]⁺ und [M-H+2Na]⁺ dem Ausgangsmaterial **27** zugeordnet werden. Auffällig war hier die starke Abweichung der berechneten zu den gefundenen Massen, obwohl zuvor eine Kalibrierung durchgeführt worden war.

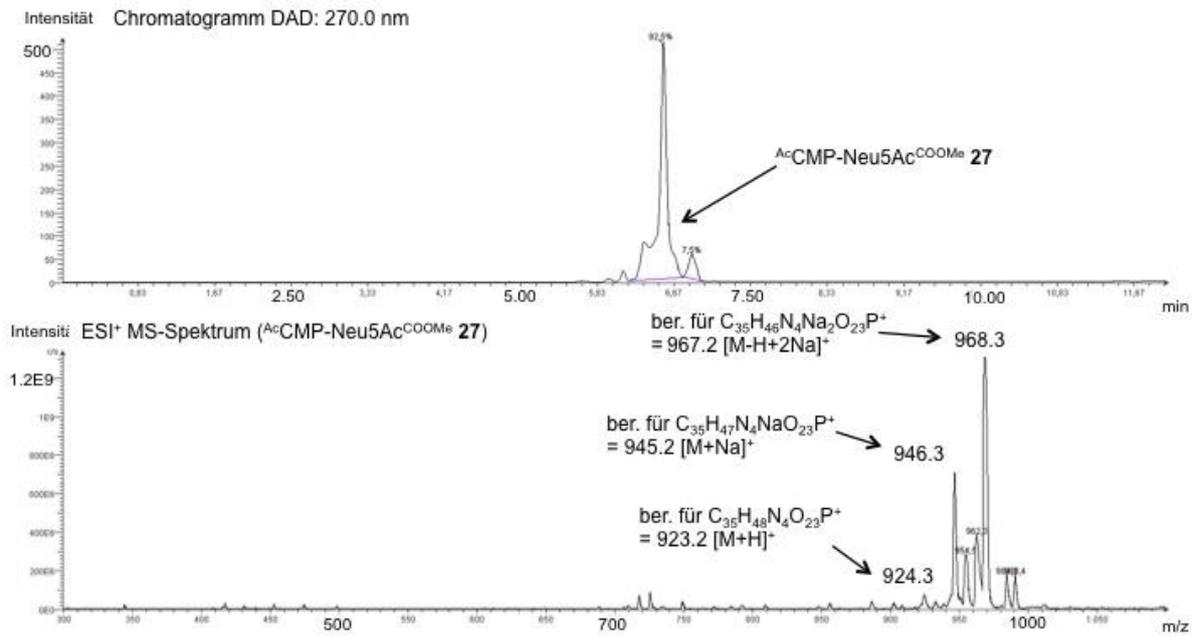


Abb. 67: Analyse von AcCMP-Neu5Ac^{COOMe} 27 bei t_0 ; HPLC-Chromatogramm (oben) und ESI⁺-MS-Spektrum (unten), (HPLC-Methode B, 272 nm).

Da nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden kein Umsatz zu erkennen war, erfolgte die nächste Messung nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden (Abb. 68). Erstaunlicherweise wurde auch hier hauptsächlich die Ausgangsverbindung AcCMP-Neu5Ac^{COOMe} 27 detektiert (Abb. 68, HPLC-Chromatogramm oben).

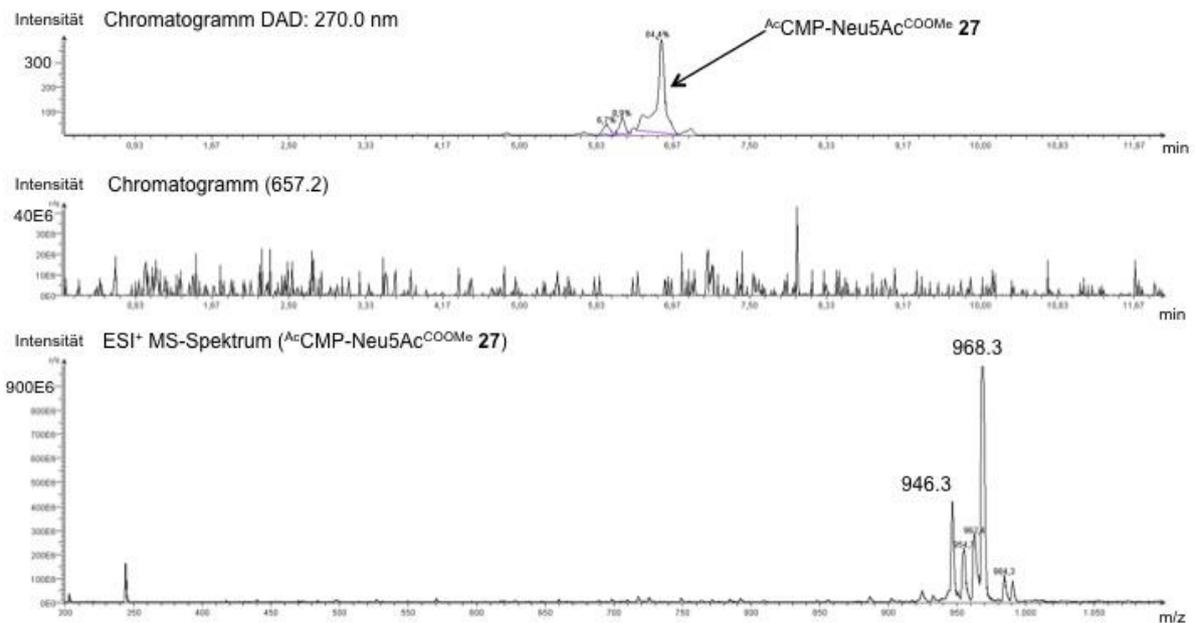


Abb. 68: Enzymatische Hydrolysestudie von AcCMP-Neu5Ac^{COOMe} 27 nach 24 Stunden; HPLC-Chromatogramm (oben), extrahiertes Ionenchromatogramm bei $m/z = 657.2$ (Mitte) und ESI⁺-MS-Spektrum (unten), (HPLC-Methode B, 272 nm).

Das extrahierte Ionenchromatogramm bei $m/z = 567.7$ (Abb. 68 Mitte) wurde generiert um zu überprüfen, ob die Verbindung $^{NHAc}CMP\text{-}Neu5Ac$ **79** als $[M+H]^+$ in der Hydrolyselösung gebildet worden war. Dieses Molekül hat, berechnet für $C_{22}H_{34}N_4O_{17}P^+$, eine Masse von $657.2 [M+H]^+$. Weder dieses Molekül noch eines der erwarteten Intermediate konnte detektiert werden.

Alle weiteren Analysen von 48 Stunden bis zu 7 Tage (Abb. 69) zeigten dasselbe Ergebnis. Aus diesem Grund wurde eine weitere Hydrolyse durchgeführt, bei der die 5-fache Enzymkonzentration verwendet wurde. Die Analyse dieser Hydrolysestudie zeigte keine Veränderung. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass das selektiv blockierte Derivat $^{Ac}CMP\text{-}Neu5Ac^{COOMe}$ **27** kein Substrat der verwendeten PLE ist. Die Verbindung $^{Ac}CMP\text{-}Neu5Ac^{COOMe}$ **27** zeigte eine große Stabilität unter den gewählten Hydrolysebedingungen, denn auch nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen wurde $^{Ac}CMP\text{-}Neu5Ac^{COOMe}$ **27** noch detektiert. Dieses Ergebnis wurde nicht erwartet, da PLE dafür bekannt ist, dass es eine breite Substrattoleranz hat.^[178]

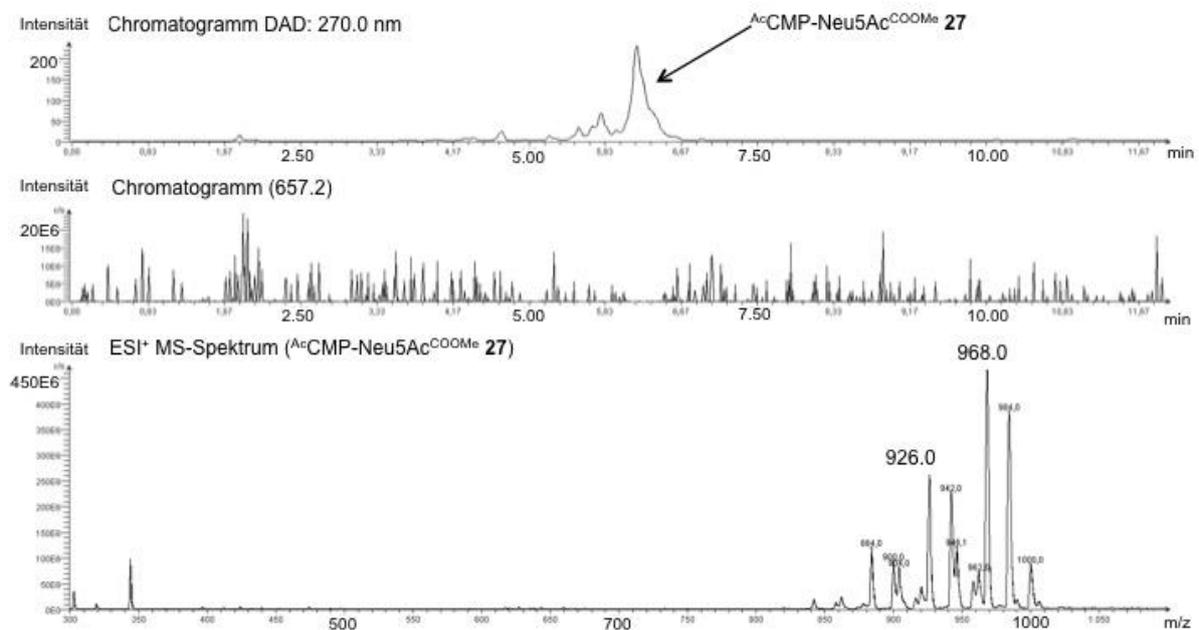


Abb. 69: Enzymatische Hydrolysestudie von $^{Ac}CMP\text{-}Neu5Ac^{COOMe}$ **27** nach 7 Tagen; HPLC-Chromatogramm (oben), extrahiertes Ionenchromatogramm bei $m/z = 657.2$ (Mitte) und ESI⁺-MS-Spektrum (unten), (HPLC-Methode B, 272 nm).

Da die Abweichungen der berechneten zu den gefundenen Massen mit größerer Eins sehr groß waren, wurde zusätzlich nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden die Probe mittels hochauflösender Massenspektrometrie analysiert (Abb. 70).

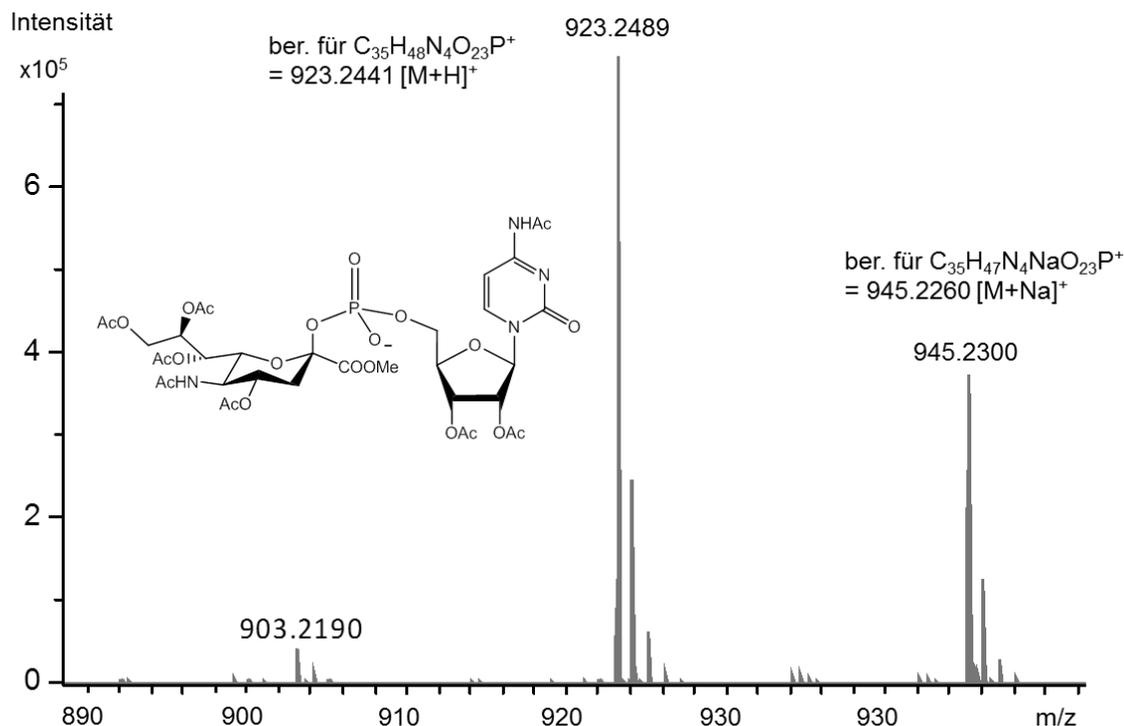


Abb. 70: Enzymatische Hydrolysestudie von ^{Ac}CMP-Neu5Ac^{COOMe} **27** nach 24 Stunden; HR-ESI⁺-MS-Spektrum.

Es sollte überprüft werden, ob tatsächlich noch die Ausgangsverbindung **27** in der Lösung vorlag. Die Analyse zeigte, dass auch nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden ^{Ac}CMP-Neu5Ac^{COOMe} **27** detektiert wurde. Es wurden weder erwartete Intermediate noch ^{NHAc}CMP-Neu5Ac **79** detektiert. Dies unterstützt die Vermutung, dass die Verbindung **27** kein Substrat der verwendeten Esterase PLE ist.

4.2.4.2 Enzymatische Hydrolysestudie der Verbindung ^{Ac}CMP-Neu5Ac^{COOAM} **74**

Als zweites erfolgte die Hydrolysestudie von ^{Ac}CMP-Neu5Ac^{COOAM} **74**. Da es sich bei ^{Ac}CMP-Neu5Ac^{COOMe} **27** vermutlich nicht um ein Substrat des Enzyms PLE handelte, stand die Frage der Substratazeptanz des Enzyms hier mit im Vordergrund. Zusätzlich konnte so überprüft werden, ob die Verwendung einer anderen Säureschutzgruppe einen Einfluss auf die Hydrolyseeigenschaften hatte. Die Analyse bei t₀ zeigte, dass ^{Ac}CMP-Neu5Ac^{COOAM} **74** in der Lösung enthalten war und dass diese sowohl mittels UV-Detektion (Abb. 71 HPLC-Chromatogramm oben) als auch Massendetektion (Abb. 71 Massenspektrum unten) analysiert werden konnte. ^{Ac}CMP-Neu5Ac^{COOAM} **74** hat eine Retentionszeit von 6.8 Minuten. Die beiden anderen kleinen Peaks mit einer Retentionszeit von 3.8 Minuten beziehungsweise 5.0 Minuten enthalten keine relevanten Massen. Der zuletzt genannte Peak wurde ebenfalls in einer Referenzprobe detektiert, welche nur PBS, PLE und DMSO enthielt. Das extrahierte Ionenchromatogramm bei m/z = 1003.2 (Abb. 71 Mitte) zeigt, dass die lipophile Verbindung **74** mit guter Intensität detektiert werden konnte. Die detektierten Massen 1004.4

und 1026.4 konnten als $[M+H]^+$ und $[M+Na]^+$ dem Ausgangsmaterial **74** zugeordnet werden. Auffällig war auch hier die starke Abweichung der berechneten zu den gefundenen Massen.

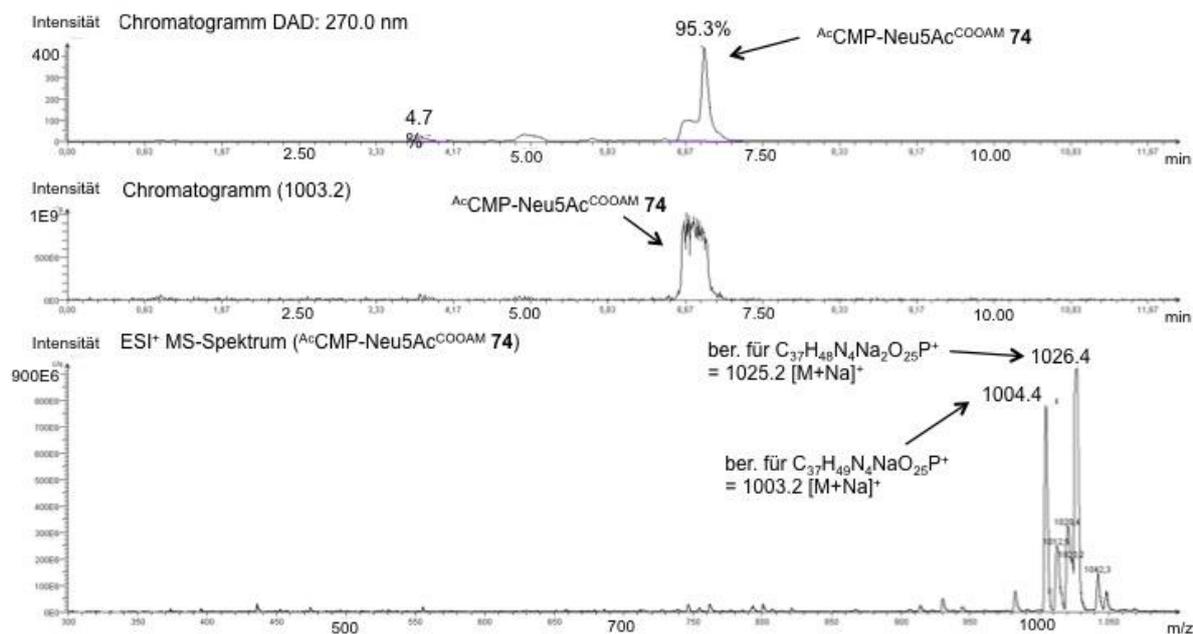


Abb. 71: Analyse von $\text{AcCMP-Neu5Ac}^{\text{COOAM}}$ **74** bei t_0 ; HPLC-Chromatogramm (oben), extrahiertes Ionenchromatogramm bei $m/z = 1003.2$ (Mitte) und ESI⁺-MS-Spektrum (unten), (HPLC-Methode B, 272 nm).

Die Analyse von $\text{AcCMP-Neu5Ac}^{\text{COOAM}}$ **74** nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden (Abb. 72) zeigte ein deutlich anderes Ergebnis als die vergleichbare Hydrolyse von $\text{AcCMP-Neu5Ac}^{\text{COOMe}}$ **27** (Abb. 68). $\text{AcCMP-Neu5Ac}^{\text{COOAM}}$ **74** wurde zwar ebenfalls wie $\text{AcCMP-Neu5Ac}^{\text{COOMe}}$ **27** noch detektiert, allerdings entstanden bei $\text{AcCMP-Neu5Ac}^{\text{COOAM}}$ **74** viele Hydrolyseprodukte, die nicht Basislinien getrennt waren (Abb. 72 HPLC-Chromatogramm oben). Die berechnete Masse des gewünschten Hydrolyseproduktes MHAcCMP-Neu5Ac **79** von $m/ = 657.2$ berechnet als $[M+H]^+$ konnte auch hier nicht in dem extrahierten Ionenchromatogramm detektiert werden. Allerdings zeigte das ESI⁺-MS-Spektrum des im HPLC-Chromatogramm markierten Bereiches, dass eine Masse mit $m/z = 677.9$ detektiert worden war (Abb. 72 unten). Da auch hier starke Abweichungen der berechneten zu den gefundenen Masse bei der Analyse von $\text{AcCMP-Neu5Ac}^{\text{COOAM}}$ **74** festgestellt wurden, könnte diese Masse der Masse der Verbindung MHAcCMP-Neu5Ac **79** als $[M+Na]^+$ entsprechen. MHAcCMP-Neu5Ac **79** hat berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{NaO}_{17}\text{P}^+$ eine Masse von $m/z = 679.1$ als $[M+Na]^+$.

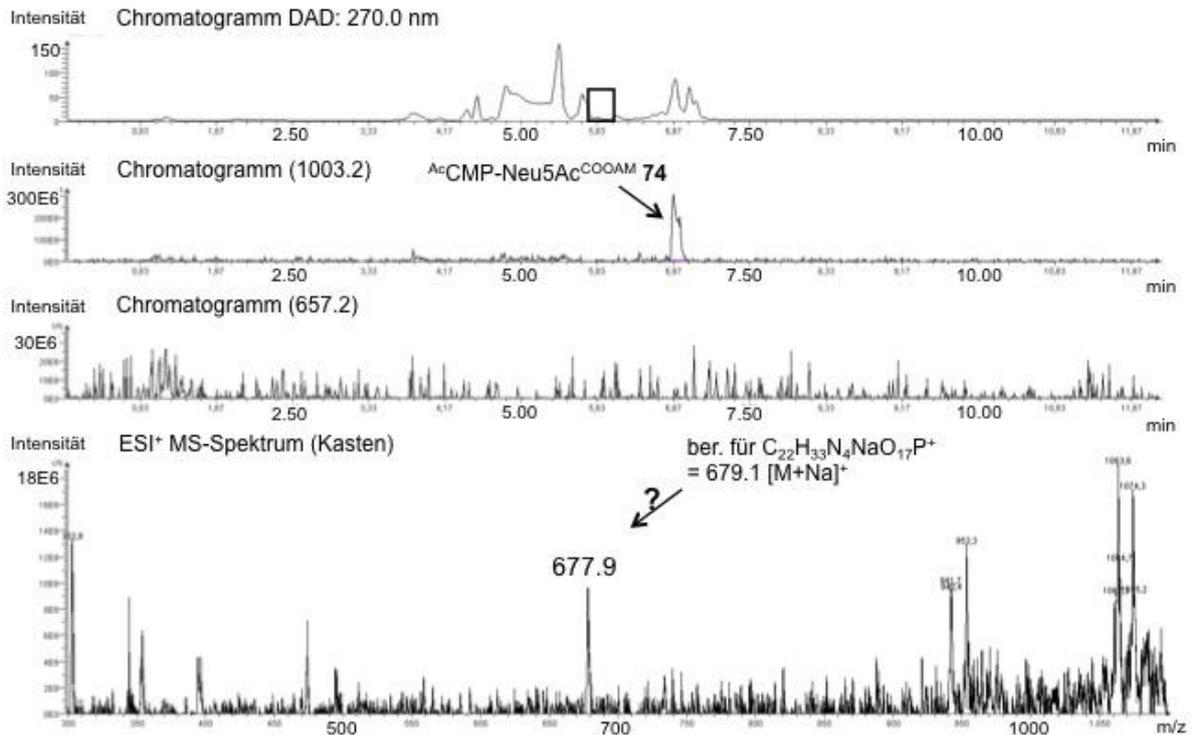


Abb. 72: Enzymatische Hydrolysestudie von $^{\text{Ac}}\text{CMP-Neu5Ac}^{\text{COOAM}}$ **74** nach 24 Stunden; HPLC-Chromatogramm (oben), extrahierte Ionenchromatogramme bei $m/z = 1003.2$ und bei $m/z = 657.2$ (mittig) und ESI⁺-MS-Spektrum des im HPLC-Chromatogramm markierten Bereiches (unten), (HPLC-Methode B, 272 nm).

Auch nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden (Abb. 73) konnte die Masse $m/z = 567.2$ nicht im extrahierten Ionenchromatogramm detektiert werden. Allerdings schien $^{\text{Ac}}\text{CMP-Neu5Ac}^{\text{COOAM}}$ **74** vollständig umgesetzt worden zu sein, da es im extrahierten Ionenchromatogramm bei $m/z = 1003.2$ nicht mehr detektiert wurde. Das ESI⁺-MS-Spektrum desselben markierten Bereiches wie nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden zeigte neben der Masse von $m/z = 677.6$ eine weitere Masse von $m/z = 655.8$ (Abb. 73 unten). Diese Masse könnte der Masse der Verbindung $^{\text{NHAc}}\text{CMP-Neu5Ac}$ **79** als $[\text{M}+\text{H}]^+$ entsprechen. Es konnten keine Massen detektiert werden, die zu Intermediaten gehören könnten, bei denen eine oder mehrere Acetylenschutzgruppen abgespalten worden sind. Des Weiteren wurden auch keine Massen detektiert, die auf eine chemische Hydrolyse der glycosidischen Bindung der Verbindung **74** schließen ließ. Es wurden weder das peracetylierte CMP-Derivat **72** noch das entsprechende Glycal oder die entsprechenden deacetylierten Verbindungen detektiert.

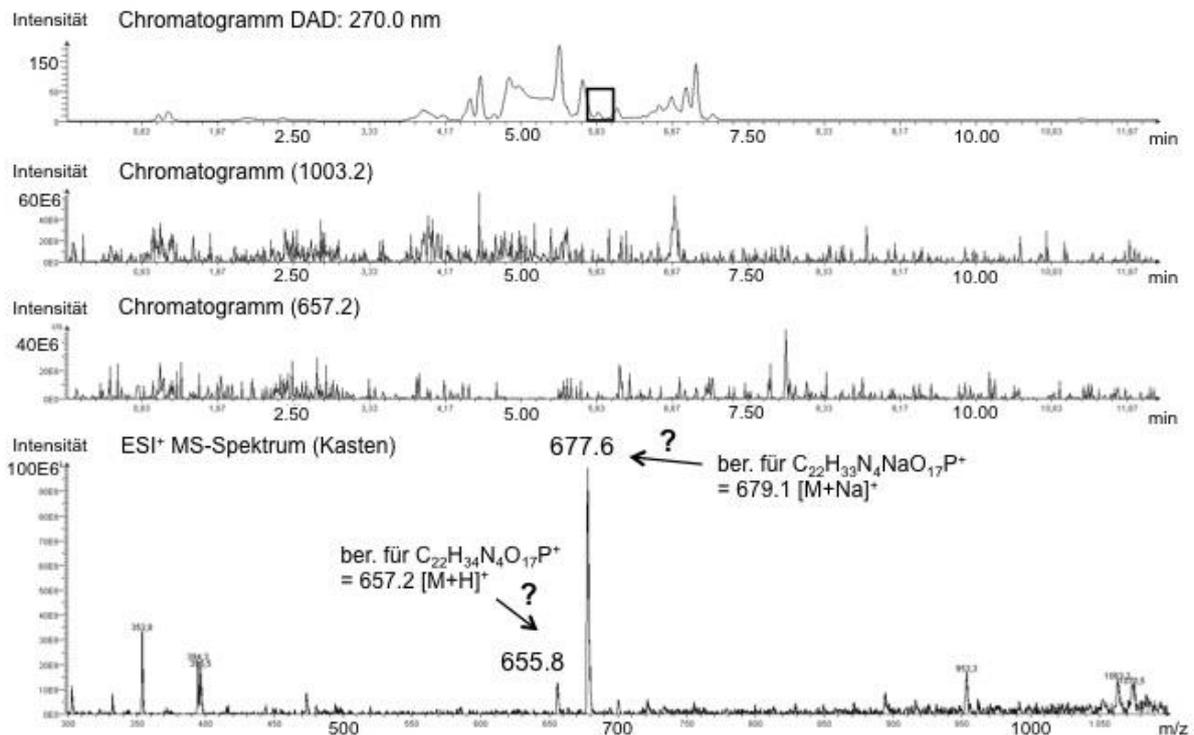


Abb. 73: Enzymatische Hydrolysestudie von ^{Ac}CMP-Neu5Ac^{COOAM} **74** nach 48 Stunden; HPLC-Chromatogramm (oben), extrahierte Ionenchromatogramme bei m/z = 1003.2 und bei m/z = 657.2 (mittig) und ESI⁺-MS-Spektrum des markierten Bereiches (unten), (HPLC-Methode B, 272 nm).

Wie in der Abbildung 74 zu sehen ist, wurde nach einer Inkubationszeit von 120 Stunden die Masse 657.2 im extrahierten Ionenchromatogramm detektiert, welche der berechneten Masse für ^{NHAc}CMP-Neu5Ac **79** als [M+H]⁺ entsprechen würde. Allerdings wurden im ESI⁺-MS-Spektrum des im HPLC-Chromatogramm markierten Bereiches ebenfalls die Massen mit m/z = 655.7 und 677.7 detektiert. Auch hier wurden keine Massen, die zu Intermediaten gehören könnten, bei denen eine oder mehrere Acetylschutzgruppen abgespalten worden sind, oder Massen, die auf eine chemische Hydrolyse der glycosidischen Bindung der Verbindung **74** schließen ließen, detektiert.

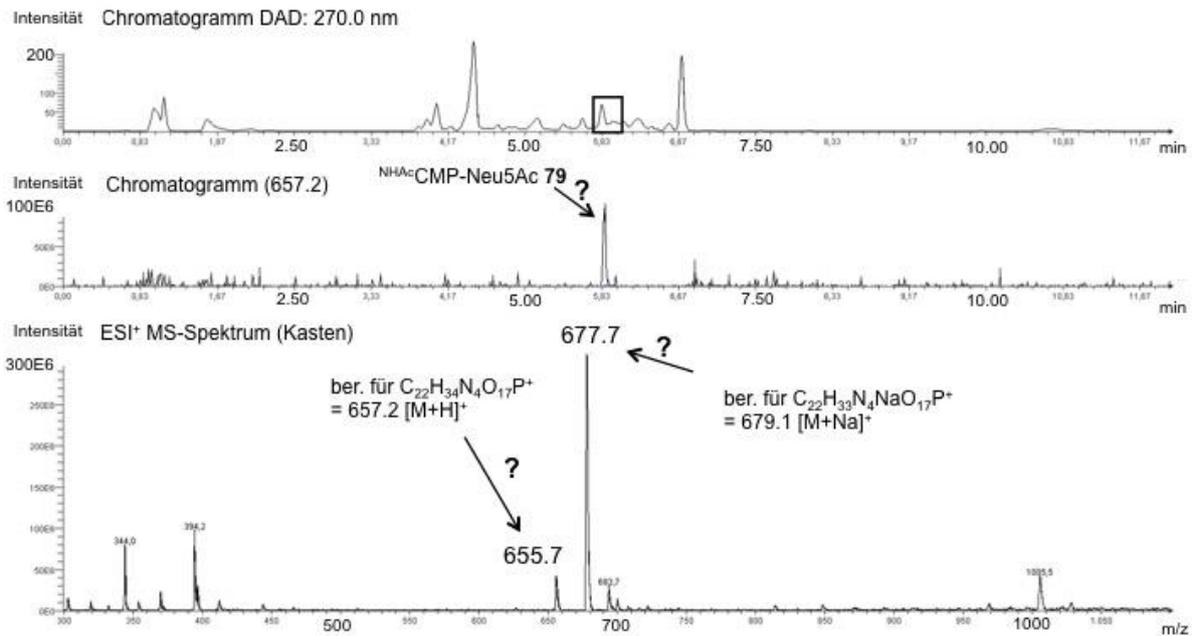


Abb. 74: Enzymatische Hydrolysestudie von $^{Ac}CMP\text{-}Neu5Ac^{COOAM}$ **74** nach 120 Stunden; HPLC-Chromatogramm (oben), extrahiertes Ionenchromatogramm bei $m/z = 657.2$ (Mitte) und ESI⁺-MS-Spektrum des markierten Bereiches (unten), (HPLC-Methode B, 272 nm).

Die erhaltenen Ergebnisse ließen keine Schlussfolgerung zu, ob Hydrolyseprodukte und wenn ja, welche durch das Enzym gebildet worden waren, oder ob das $^{Ac}CMP\text{-}Neu5Ac^{COOAM}$ **74** aufgrund der Hydrolysebedingungen durch chemische Hydrolyse gespalten worden war. Wie auch bei der zuvor durchgeführten Hydrolysestudie von $^{Ac}CMP\text{-}Neu5Ac^{COOMe}$ **27** wurde aus diesem Grund eine Probe nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mittels HR-MS analysiert (Abb. 75). Diese zeigte, dass die lipophile Verbindung $^{Ac}CMP\text{-}Neu5Ac^{COOAM}$ **74** auch nach dieser Zeit noch detektiert werden konnte. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass auch dieses Molekül gegenüber chemischer Hydrolyse relativ stabil ist und das das Molekül **74** somit auch dem Enzym als Substrat zur Verfügung stand. Es wurde ebenfalls nach der Masse 657.2 gesucht, welche für das Molekül $^{NHAc}CMP\text{-}Neu5Ac$ **79** als [M+H]⁺ berechnet worden war. Diese Masse wurde nicht detektiert. Es wurden dieselben Massen wie auch bei der zuvor durchgeführten Analyse mit $m/z = 655.2199$ und 677.2039 detektiert (Abb. 76). Eine eindeutige Identifikation war somit nicht möglich.

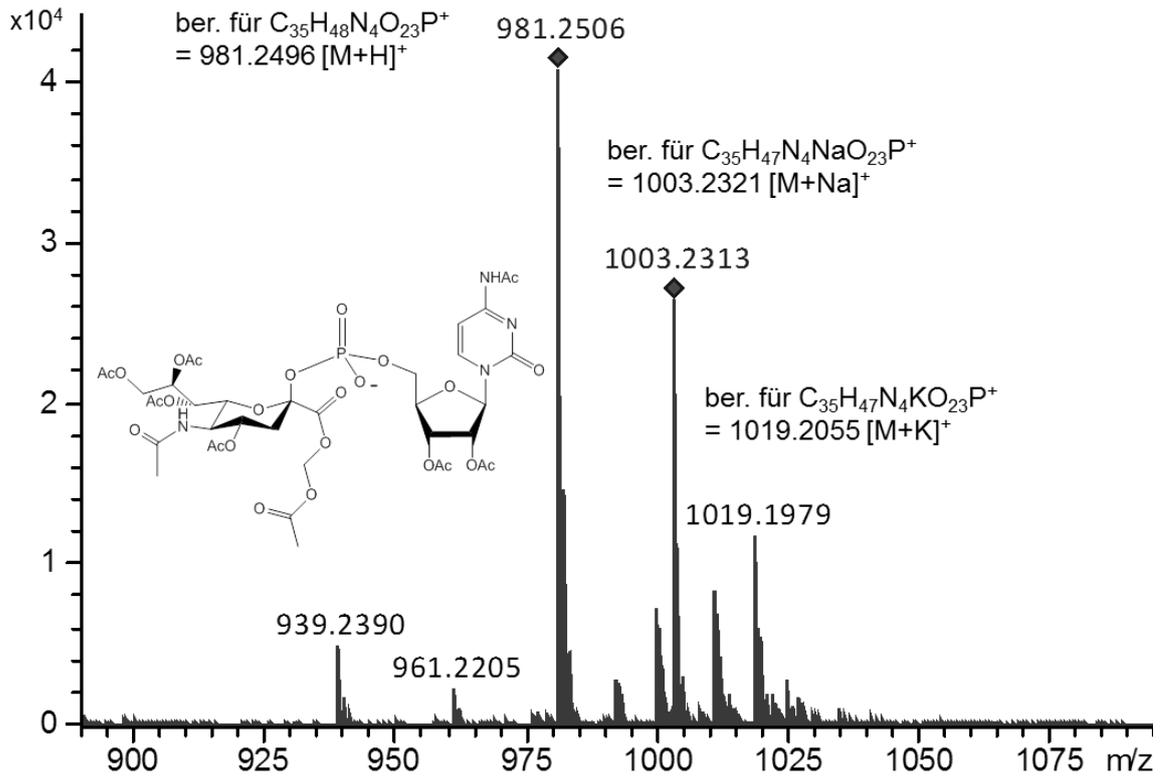


Abb. 75: Enzymatische Hydrolysestudie von ^{13}C CMP-Neu5Ac COOAM **74** nach 24 Stunden;
HR-ESI $^+$ -MS-Spektrum.

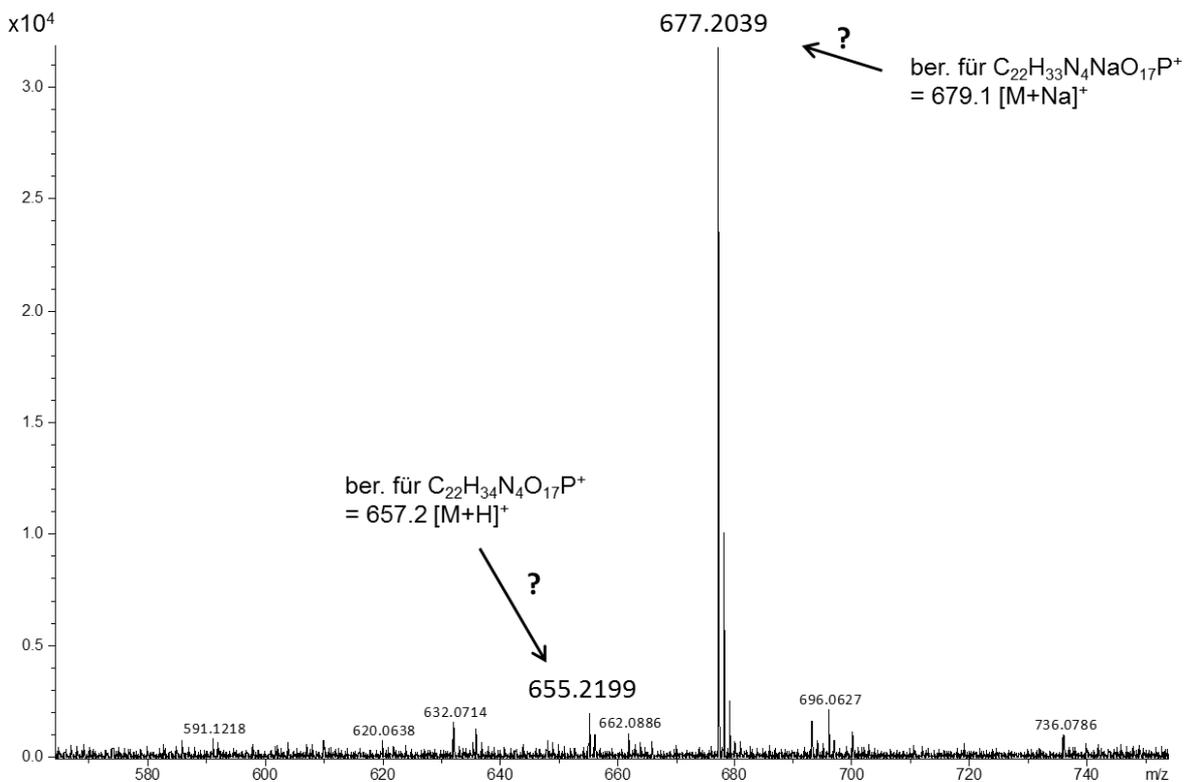


Abb. 76: Enzymatische Hydrolysestudie von ^{13}C CMP-Neu5Ac COOAM **74** nach 24 Stunden;
HR-ESI $^+$ -MS-Spektrum eines möglichen Hydrolyseproduktes.

Um zu überprüfen, ob die Massen $m/z = 655.2199$ dem erwarteten Hydrolyseprodukt $^{NHAc}CMP\text{-}Neu5Ac$ **79** zugeordnet werden könnte, wurde nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden diese Masse mittels MS/MS analysiert (Abb. 77). Die detektierten Massen $m/z = 154.0612$ und 176.0434 wurden als $[M+H]^+$ und $[M+Na]^+$ der Nucleobase Cytidin, welche noch die *N*-Acetylgruppe trug, zugeordnet. Als weiteres entsprechen die detektierten Massen $m/z = 220.0528$ und 265.1528 möglichen Spaltprodukten, welche nur noch aus dem Neuraminsäure-Grundgerüst bestanden. Die detektierte Masse $m/z = 366.0709$ wurde dem Spaltprodukt Cytidinmonophosphat, welches ebenfalls noch die *N*-Acetylgruppe trug, zugeordnet. Ein wichtiger Punkt dieser Analyse war zu überprüfen, ob die Phosphatbrücke noch intakt war. Dies wäre eine Grundvoraussetzung, damit das Molekül **74** als lipophile Vorläuferverbindung eingesetzt werden könnte. Die detektierten Massen $m/z = 402.0776$, 444.0888 und 462.0993 entsprechen drei möglichen Spaltprodukten, bei denen die Phosphatbrücke noch intakt ist. Hierbei trug die Verbindung mit einer berechneten Masse von 444.0902 noch die *N*-Acetylgruppe an der C5-Position des Zuckers. Diese Analyse lässt die Vermutung zu, dass die Verbindung $^{Ac}CMP\text{-}Neu5Ac^{COOAM}$ **74** im Gegensatz zu der Verbindung $^{Ac}CMP\text{-}Neu5Ac^{COOMe}$ **27** ein Substrat des Enzyms PLE ist. Allerdings verlief die Hydrolyse nicht wie gewünscht selektiv zu einem Hydrolyseprodukt.

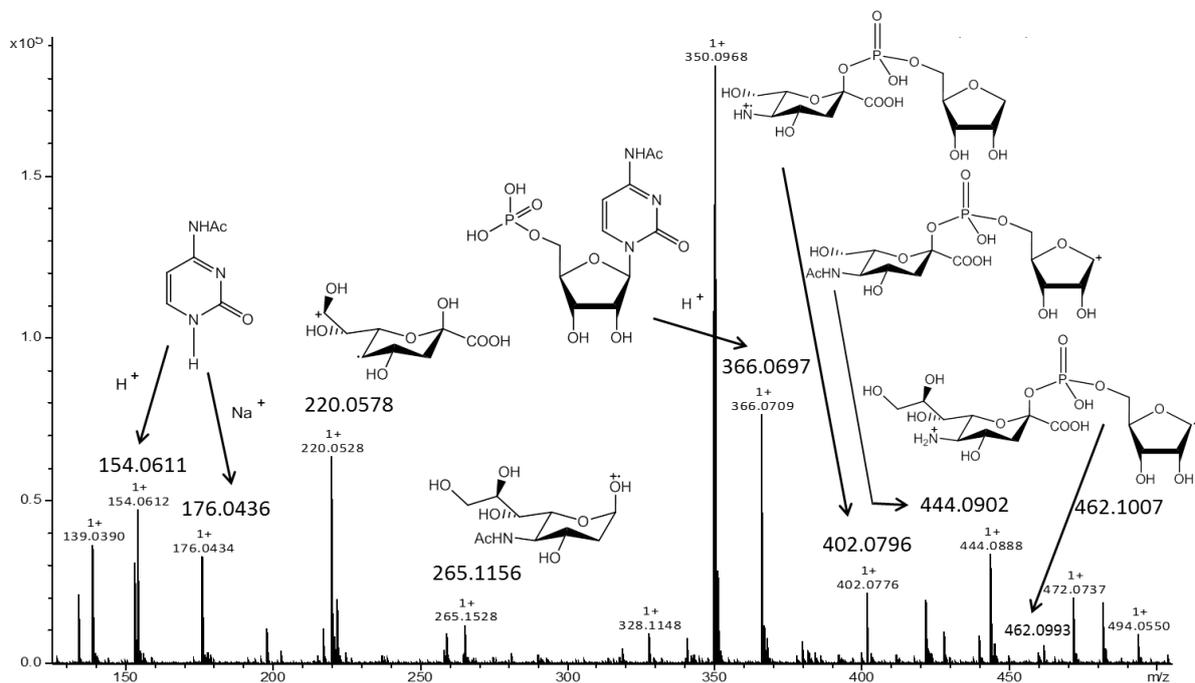


Abb. 77: Enzymatische Hydrolysestudie von $^{Ac}CMP\text{-}Neu5Ac^{COOAM}$ **74** nach 72 Stunden; MS/MS der Masse 655.2199.

4.2.4.3 Fazit der enzymatischen Hydrolysestudien und Ausblick

Die enzymatische Hydrolysestudie der entsprechenden lipophilen Verbindung $^{\text{Ac}}\text{CMP-Neu5Ac}^{\text{COOMe}}$ **27** bzw. $^{\text{Ac}}\text{CMP-Neu5Ac}^{\text{COOAM}}$ **74** ergaben sehr unterschiedliche Ergebnisse.

$^{\text{Ac}}\text{CMP-Neu5Ac}^{\text{COOMe}}$ **27** scheint kein Substrat des Enzyms PLE zu sein, da auch nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen mit PLE kein Umsatz sondern nur $^{\text{Ac}}\text{CMP-Neu5Ac}^{\text{COOMe}}$ **27** detektiert werden konnte.

Die Auswertung der Analyse der zweiten Verbindung $^{\text{Ac}}\text{CMP-Neu5Ac}^{\text{COOAM}}$ **74** war dagegen deutlich schwieriger. $^{\text{Ac}}\text{CMP-Neu5Ac}^{\text{COOAM}}$ **74** scheint eine ausreichende Stabilität unter den gewählten Hydrolysebedingungen zu haben, da auch nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden dieses noch detektiert werden konnte. Somit stand das $^{\text{Ac}}\text{CMP-Neu5Ac}^{\text{COOAM}}$ **74** dem Enzym auch als Substrat zur Verfügung. Nach einer Inkubationszeit von 120 Stunden wurde die Masse von $m/z = 657.2$, welche für das Molekül $^{\text{NHAc}}\text{CMP-Neu5Ac}$ **79** als $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet worden war, im extrahierten Ionenchromatogramm detektiert. Das zu diesem Chromatogramm generierte Massenspektrum zeigte abweichende Massen. Die folgende MS/MS-Analyse lässt die Vermutung zu, dass $^{\text{Ac}}\text{CMP-Neu5Ac}^{\text{COOAM}}$ **74** durch das Enzym PLE umgesetzt worden war. Die detektierten Fragmente wiesen zum einen noch eine intakte Phosphatbrücke und zum anderen noch die beiden *N*-Acetylgruppen auf. $^{\text{Ac}}\text{CMP-Neu5Ac}^{\text{COOAM}}$ **74** scheint somit kein Substrat einer Amidase zu sein. Ob wirklich das Molekül $^{\text{NHAc}}\text{CMP-Neu5Ac}$ **79** während der Hydrolyse gebildet wurde, konnte jedoch nicht eindeutig bestätigt werden. Die gefundene HR-Masse von $m/z = 655.2199$ hat eine zu große Abweichung zu der berechneten Masse von 657.1651.

Für weitere Untersuchungen könnte die Hydrolysestudie mit einer anderen Esterase wiederholt werden. Auch die Verwendung anderer Estergruppen, wie beispielsweise die POM-Gruppe, wäre überlegenswert. Darüber hinaus sollte nach Möglichkeit keine Schutzgruppe an der Nucleobase verwendet werden, damit selektiv CMP-Neu5Ac **15** gebildet werden kann. Im Allgemeinen kann gesagt werden, dass, trotz des nicht eindeutigen Hydrolyseergebnisses, die Basis für lipophile CMP-Neu5Ac -Derivate gelegt wurde. Die Darstellung der lipophilen Verbindungen $^{\text{Ac}}\text{CMP-Neu5Ac}^{\text{COOMe}}$ **27** und $^{\text{Ac}}\text{CMP-Neu5Ac}^{\text{COOAM}}$ **74** gelang nach Optimierung der Syntheseroute zuverlässig. Die Hydrolysestudie lässt den Schluss zu, dass $^{\text{Ac}}\text{CMP-Neu5Ac}^{\text{COOAM}}$ **74** ein Substrat des Enzyms PLE ist, $^{\text{Ac}}\text{CMP-Neu5Ac}^{\text{COOMe}}$ **27** hingegen vermutlich nicht. Somit ist auch die Verwendung der AM-Gruppe zur Maskierung der Säurefunktion für folgende Untersuchungen von zentraler Bedeutung. Durch eine Variation der verwendeten lipophilen Gruppen zur Blockierung der Hydroxylgruppen und des verwendeten Enzyms könnte eventuell ein eindeutigeres Hydrolyseergebnis erlangt werden.

4.3 *N*-Acyl-modifizierte Neuraminsäuren

Im Rahmen einer Kooperation mit *W. Reutter* (Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie, Charité Universitätsmedizin) und *O. T. Keppler* (Institut für Medizinische Virologie, Nationales Referenz Center für Retroviren, Universität Frankfurt) wurden drei *N*-Acyl-modifizierte Neuraminsäure-Derivate dargestellt. Bei den gewünschten Modifikationen handelte es sich um die *N*-Propanoyl (Prop)- **80**, *N*-Butanoyl (But)- **81** und *N*-Pentanoyl (Pent) **82**-modifizierten Neuraminsäure-Derivate. Diese wurden als Referenzmoleküle in einer Studie unter anderem zur Untersuchung der Rolle von Sialinsäuren auf die Interaktion von Maus Siglec-1 und dem *murine leukemia virus* (MLV) verwendet.

Die Darstellung der Derivate **80-82** (Abb. 78) erfolgte analog der von *S. Wolf* entwickelten Syntheseroute.^[2] Da die Spaltung der *N*-Acetylgruppe zur Einführung von Modifikationen notwendig ist, ist die Einführung einer Schutzgruppe am anomeren Zentrum erforderlich die unter den Reaktionsbedingungen nicht gespalten wird. Ansonsten würde das freie Amin die Ketofunktion der C2-Position der offenkettigen Form der Neuraminsäure angreifen. Hierbei würde sich unter Wasserabspaltung eine Schiff'sche Base bilden.^[179] Aus diesem Grund hat sich die Einführung einer Schutzgruppe vor der *N*-Acetylspaltung bewährt. Thioglycoside sind hierfür geeignet,^[180] da diese die Reaktionsbedingungen im Gegensatz zu *O*-Glycosiden von stark sauren sowie stark basischen Bedingungen standhalten.^[181] Auch die selektive Spaltung sowie Funktionalisierung ist aufgrund der unterschiedlichen nucleophilen Eigenschaften zwischen dem Schwefel und den Sauerstoffatomen möglich. Der Schwefel stellt im Gegensatz zu dem Sauerstoff ein weiches Nucleophil dar. Thioglycoside lassen sich beispielsweise durch *N*-Bromsuccinimid (NBS) in Aceton und Wasser spalten.^[181-182]

Im ersten Reaktionsschritt wurde das in Abschnitt 4.2.1.1 beschriebene peracetylierte β -Chlorid **68** durch Verwendung von Thiophenol in einer wässrigen Tetra-*n*-butylammoniumhydrogensulfat-Lösung und Ethylacetat in einer phasenkatalysierten Glycosylierung zum Thioglycosid **83** umgesetzt.^[169,183] Hierbei entstand durch Inversion der Konfiguration am anomeren Zentrum das 1,2-*trans* Thioglycosid **83**. Dieses wurde nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 77% erhalten. Bei dieser Reaktion dienten das Hydrogensulfatsalz als Phasenkatalysator und Wasser und Ethylacetat als Zwei-Phasen-System. Durch die Reaktionsbedingungen entstand als Nebenprodukt das Glycal **69**. Diese Reaktion findet generell bei basisch katalysierten Reaktionen von Neuraminsäurehalogeniden durch konzertierte Eliminierung des axialen Protons an der C3-Position sowie des Chlorids an der C2-Position statt.^[184]

Im zweiten Reaktionsschritt erfolgte die Einführung der *N*-Acyl-Modifikation. Zunächst erfolgte die Spaltung aller Acetylgruppen in Methanol mit einem großen Überschuss an Methansulfonsäure. Die Bildung des freienamins wurde durch Anfärben mit einer Ninhydrin-Lösung verfolgt. Für die folgende Acylierung unter basischen Bedingungen erfolgte die

Zugabe von Triethylamin. Zur Vermeidung einer Veresterung mit dem Lösungsmittel wurde der Reaktionsansatz auf 0 °C gekühlt. Die Acylierung wurde durch Zugabe des entsprechenden Carbonsäureanhydrids gestartet. Nach vollständiger Umsetzung des Amins wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Im letzten Reaktionsschritt erfolgte die Acetylierung aller freien funktionellen Gruppen unter Standardbedingungen mit Essigsäureanhydrid in Pyridin. Die *N*-Acyl-modifizierte Thioglycoside **84-86** wurden nach wässriger Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung in Ausbeuten von 22-50% erhalten. Als Nebenreaktion trat im dritten Reaktionsschritt zum einen die Rückbildung des Eduktes durch Acetylierung des Amins auf. Zum anderen wurden diese Reaktionen lediglich einmal durchgeführt, so dass diese Ausbeuten nicht repräsentativ sind.

Abschließend erfolgte die Spaltung des entsprechenden Thioglycosids mit NBS in einem Gemisch aus Aceton und Wasser 20:1 v/v. Die Produkte **80-82** wurden ebenfalls nach wässriger Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung in Ausbeuten von 48-64% erhalten. Auch diese Reaktionen wurden lediglich einmal durchgeführt.

Nach der erfolgreichen Darstellung der gewünschten *N*-Acyl-modifizierten Neuraminsäure-Derivate **80-82** wurden diese den Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt. Es konnte festgestellt werden, dass die *N*-Acyl-Seitenkette eine entscheidende Determinante für die Maus Siglec-1 MLV Interaktion ist.^[185]

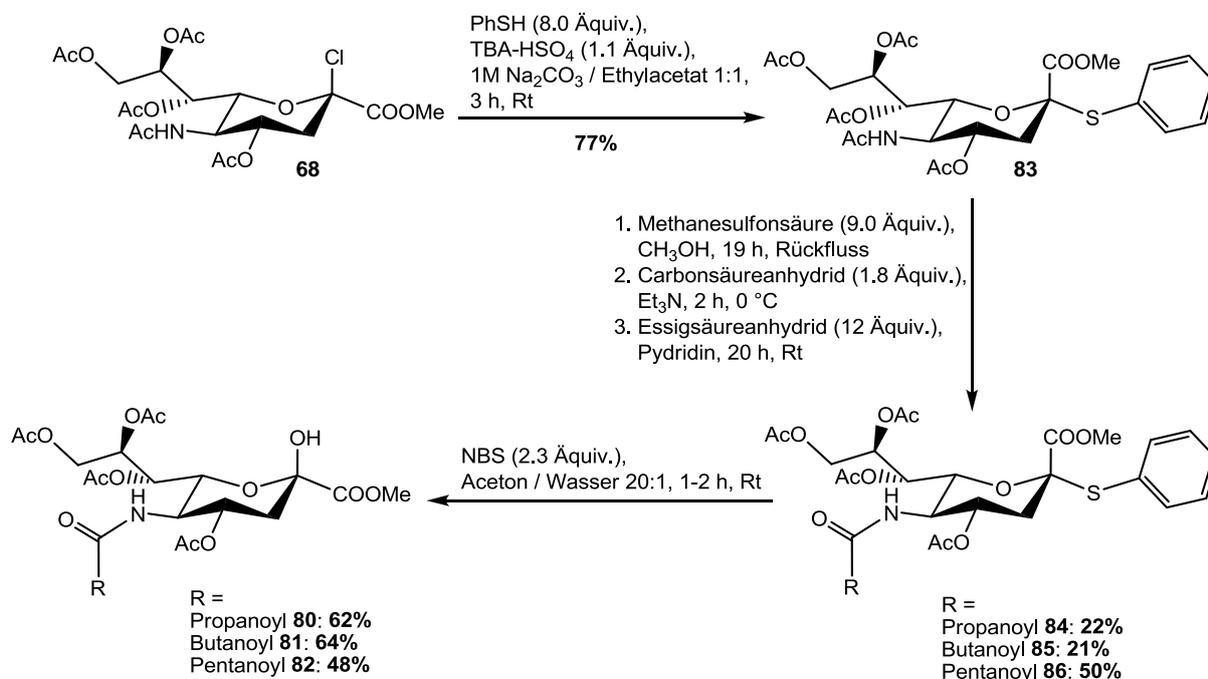


Abb. 78: Synthese *N*-Acyl-modifizierter Neuraminsäure-Derivate **80-82**.

4.4 Darstellung von bioreversibel maskierten, lipophilen Adenosindiphosphat-Ribose-Derivaten

Der Einsatz von Nucleosid/Nucleotid-Analoga als Antikrebs- und antivirale Agenzien ist allgemein bekannt. Hierzu gehören der Wirkmechanismus sowie die Vor- und Nachteile bezogen auf den Einsatz solcher Analoga. Ein Problem ist beispielsweise eine ineffiziente Phosphorylierung innerhalb der Zelle.^[186-191] Nucleotide können aufgrund ihrer negativen Ladung die Zellmembran nicht passieren. Daher werden als lipophile Analoga häufig Prodrugs eingesetzt. Solch ein Prodrug muss eine ausreichende Stabilität außerhalb der Zelle aufweisen sowie, wie bereits in Abschnitt 4.2 erwähnt, eine selektive und schnelle Freisetzung des Nucleotids innerhalb der Zelle ermöglichen.^[88]

In unserer Arbeitsgruppe wurden über die Jahre mehrere Prodrug-Konzepte für Nucleotide entwickelt. Dazu gehören das DiPPro-Konzept für Nucleosiddiphosphate (NDPs) und das TriPPro-Konzept für Nucleosidtriphosphate (NTPs). In beiden Fällen konnte gezeigt werden, dass das entsprechende Nucleosiddiphosphat beziehungsweise -triphosphat selektiv innerhalb der Zelle freigesetzt wird. Es werden sowohl lipophile als auch enzymatisch spaltbare Acyloxybenzyl- (AB)-Komponenten als Masken für das β -Phosphat (NDPs) oder γ -Phosphat (NTPs) verwendet.^[134-136,138] Die verbleibende(n) negative(n) Ladung(en) werden nicht maskiert, da die Phosphatanhydridbindung von diesen kinetisch stabilisiert wird. Der enzymatische Spaltungsmechanismus einer AB-Maske wurde bereits in dem Abschnitt 4.2 beschrieben. Die AB-Masken ermöglichen eine hohe chemische Stabilität, da zum einen die Spaltung der Maske enzymatisch erfolgt und zum anderen ist die Spaltungsstelle räumlich von der labilen Phosphatanhydridbindung getrennt. Dies wird gewährleistet, da die Esterfunktion nicht direkt an dem Phosphat gebunden ist. Zum anderen wird eine geringe intrazelluläre Stabilität erreicht, welche zu einer selektiven Freisetzung des entsprechenden Nucleotids führt.^[136,139] Des Weiteren korreliert die Stabilität mit der Alkylkettenlänge der Acyl-Einheit: Je länger die Alkylkette ist, desto größer ist die Stabilität des Prodrugs. Damit ist es möglich, über die Alkylkettenlänge die Lipophilie, Stabilität und Metabolisierung des Prodrugs zu kontrollieren.^[134,137]

Neben den NDPs und NTPs gibt es weitere Substanzklassen, die eine Nucleotidstruktur beinhalten. Hierzu gehören beispielsweise Zuckernucleotide. Aufgrund des Erfolges des DiPPro- und des TriPPro-Konzeptes sollte eine Erweiterung auf Zuckernucleotide erfolgen. Adenosindiphosphat-Ribose (ADPR) **21** stellt hierfür einen interessanten und biologisch wichtigen Vertreter dieser Verbindungsklasse dar. ADPR **21** ist, wie in Abschnitt 2.1.2.2 beschrieben, der potenteste Aktivator des Ionenkanals *transient receptor potential melastatin 2* (TRPM2). Deswegen sind Studien zur Aufklärung des Aktivierungsmechanismus von TRPM2 durch ADPR **21** von zentraler Bedeutung. Zusätzlich stellt TRPM2 einen möglichen

Ansatzpunkt dar, um Erkrankungen zu bekämpfen, welche durch oxidativen Stress ausgelöst werden. In diesem Zusammenhang zeigt die Studie der Arbeitsgruppe von *J. Yue*^[38] das Potential von zellgängigen monomaskierten ADPR-Derivaten. Allerdings kam es hauptsächlich bei der Abspaltung der verwendeten caged-Einheit durch Photolyse zu Problemen. Diese sind in Abschnitt 2.1.2.3 näher beschrieben. Die Verwendung einer anderen kovalent, aber bioreversibel gebundenen, chemischen Modifikation, welche einen anderen Spaltungsmechanismus als Photochemie beinhaltet, würde ebenfalls zu einem membranpermeablen ADPR-Derivat führen. Dies könnte beispielsweise durch die Verwendung einer AB-Maske, welche von Esterasen gespalten wird, ermöglicht werden. Der Vorteil wäre, dass die entstandene Verbindung nach der intrazellulären enzymatischen Spaltung der bioreversiblen Gruppe aufgrund der entstandenen negativen Ladung innerhalb der Zelle verbleiben würde. Der chemische Zugang zu solch einer Verbindungsklasse ist sehr limitiert. Die Entwicklung einer effektiven Synthesestrategie zur Darstellung eines solchen bioreversibel maskierten, lipophilen ADPR-Derivates, welches nur an einem der beiden möglichen Phosphate maskiert ist, ist daher zwingend erforderlich. In diesem Zusammenhang stellte die Erweiterung der *DiPPro*- und *TriPPPPro*-Konzepte zu einem Zuckernucleotid-Konzept einen vielversprechenden Ansatz dar. Die Studie von *J. Yue* zeigt, dass am Phosphat monomaskierte ADPR-Derivate die Zellmembran von sowohl HEK293 als auch Jurkat-Zellen passieren können. In dieser Arbeit sollte daher zum einen versucht werden, ein ebenfalls monomaskiertes ADPR-Derivat mit einer bioreversiblen Maske darzustellen, bei dem alle Hydroxylgruppen und die Aminogruppe der Nucleobase ungeschützt vorliegen. Die Herausforderung der Synthese liegt bei den ungeschützten funktionellen Gruppen, da die Bildung von Nebenprodukten nur schwer verhindert werden kann. Zum anderen sollten lipophile ADPR-Derivate dargestellt werden, die neben der bioreversiblen Maske noch kurzketttige Esterfunktionen tragen. Um eine Zellpermeabilität von polaren Molekülen zu erreichen, werden unter anderem Acetylschutzgruppen eingesetzt (Abschnitt 2.1.1.7). Diese können durch Esterasen bzw. Amidasen gespalten werden. Da die ^{C5}AB-Maske ebenfalls durch Esterasen gespalten werden kann, sollten weitere enzymatisch spaltbare Gruppen bei der späteren enzymatischen Freisetzung von ADPR **21** unproblematisch sein. Hier sollten, bezogen auf die Riboseeinheit, anomenreine Verbindungen dargestellt werden. Auch die Synthese anomenreiner Verbindungen stellt eine Herausforderung dar, da eine Trennung der Anomere nicht zwingend möglich ist. Durch die Entwicklung eines anomenreinen Syntheseprotokolls wäre auch die Anwendbarkeit auf weitere Zuckernucleotide, bei denen eine anomenreine Darstellung von zentraler Bedeutung ist, möglich.

Um zu überprüfen, ob solch ein lipophiles ADPR-Derivat bei physiologischem pH-Wert (pH 7.3) stabil ist und ob ADPR **21** von entsprechenden Enzymen freigesetzt wird, sollten sowohl chemische als auch enzymatische Hydrolysestudien durchgeführt werden. Durch die

Verwendung von ADPR **21** als Grundbaustein ist es möglich, sowohl die Erweiterung der Prodrug-Konzepte zu erreichen, als auch eine lipophile Verbindung für potentielle TRPM2-Studien darzustellen.

4.4.1 Darstellung von lipophilen ADPR-Derivaten

Für die Synthese eines lipophilen ADPR-Derivates, welches nur eine Maskeneinheit an einem der beiden Phosphate trägt, war es wichtig, dass die Maske an das gewünschte Phosphat gebunden wird und erst dann die Bildung der Pyrophosphatbindung in dem letzten Syntheseschritt erfolgt. Ansonsten erfolgt die Einführung der Maskeneinheit wahrscheinlich nicht selektiv an der gewünschten Phosphatgruppe. Diese Problematik zeigte sich bereits bei der Synthese der NPE-caged ADPR-Derivate von *J. Yue*.^[38] Hier erfolgte die Umsetzung der NPE-Maske direkt mit ADPR **21**, was zur Bildung mehrerer Produkte führte.

Um eine hohe Effizienz der Synthese zu erreichen war die Verwendung einer Methode wichtig, die sich durch kurze Reaktionszeiten, hohe Ausbeuten sowie hohe Kupplungsraten auszeichnet. Die AB-Masken, welche in den DiPPro- und TriPPro-Konzepten verwendet werden, werden mittels der Phosphoramiditchemie in das Molekül eingebracht. Diese Methode schien ideal, da bereits die Darstellung von NDP-Zuckern mittels der Phosphoramiditchemie erfolgreich von *van der Marel et al.*^[118] durchgeführt worden ist (Abschnitt 2.2.1.1). Die Darstellung erfolgt durch Umsetzung eines Zuckerphosphates mit einem nicht-symmetrischen Phosphoramidit, welches ein Nucleosid und eine Cyanoethylgruppe enthält. Bei dieser Methode werden alle Anforderungen von kurzen Reaktionszeiten, hohen Kupplungsraten und guten Ausbeuten erfüllt.

Bei einem lipophilen ADPR-Derivat ist es generell möglich, dass sich die Maskeneinheit entweder an dem α -Phosphat oder an dem β -Phosphat befindet. Bei dem Einsatz der Phosphoramiditchemie wäre entweder die Synthese eines Phosphoramidites nötig, das die Riboseeinheit und die AB-Maske beinhaltet (Maskierung am β -Phosphat) oder eines, das Adenosin und die AB-Maske trägt (Maskierung am α -Phosphat). Zum einen wurden in dieser Arbeit bereits erfolgreich die nicht-symmetrischen Phosphoramidite C^2 AB-(5'-O-cytidin^{Ac})-phosphoramidit **60** und PMPh AB-(5'-O-cytidin^{Ac})phosphoramidit **61**, die ein Nucleosid und eine AB-Maske tragen, dargestellt (Abschnitt 4.2.1.1) und zum anderen werden bei der Synthese von *van der Marel*^[118] (Abschnitt 2.2.1.1) hierzu analoge Kupplungsbausteine eingesetzt. Somit sollte in dieser Arbeit eine Maskierung von ADPR **21** an dem α -Phosphat erfolgen.

Als enzymatisch spaltbare Maske am Phosphat sollte eine 4-Pentanoyloxybenzyl (C^5 AB)-Maske verwendet werden. Diese wurde sowohl intensiv im Rahmen des DiPPro-Konzeptes^[138] als auch im Rahmen der TriPPro-Methode untersucht.^[134]

Zur Darstellung des ADPR-Derivates **87** sollten, wie in dem Retrosyntheseschema in Abbildung 79 gezeigt, zwei Bausteine verwendet werden: Das 4-Pentanoyloxybenzyl-(5'-O-

adenosin)phosphoramidit **88**, welches Adenosin und die ^{C5}AB-Maske enthalten sollte, und das D-Ribosyl-5-monophosphat **89**. Die Darstellung des nicht-symmetrischen Phosphoramidites ^{C5}AB-(5'-O-adenosin)phosphoramidit **88** sollte durch Umsetzung von 4-Pentanoyloxybenzyl-bis(diisopropylamino)phosphoramidit **90** mit Adenosin **91** erfolgen.

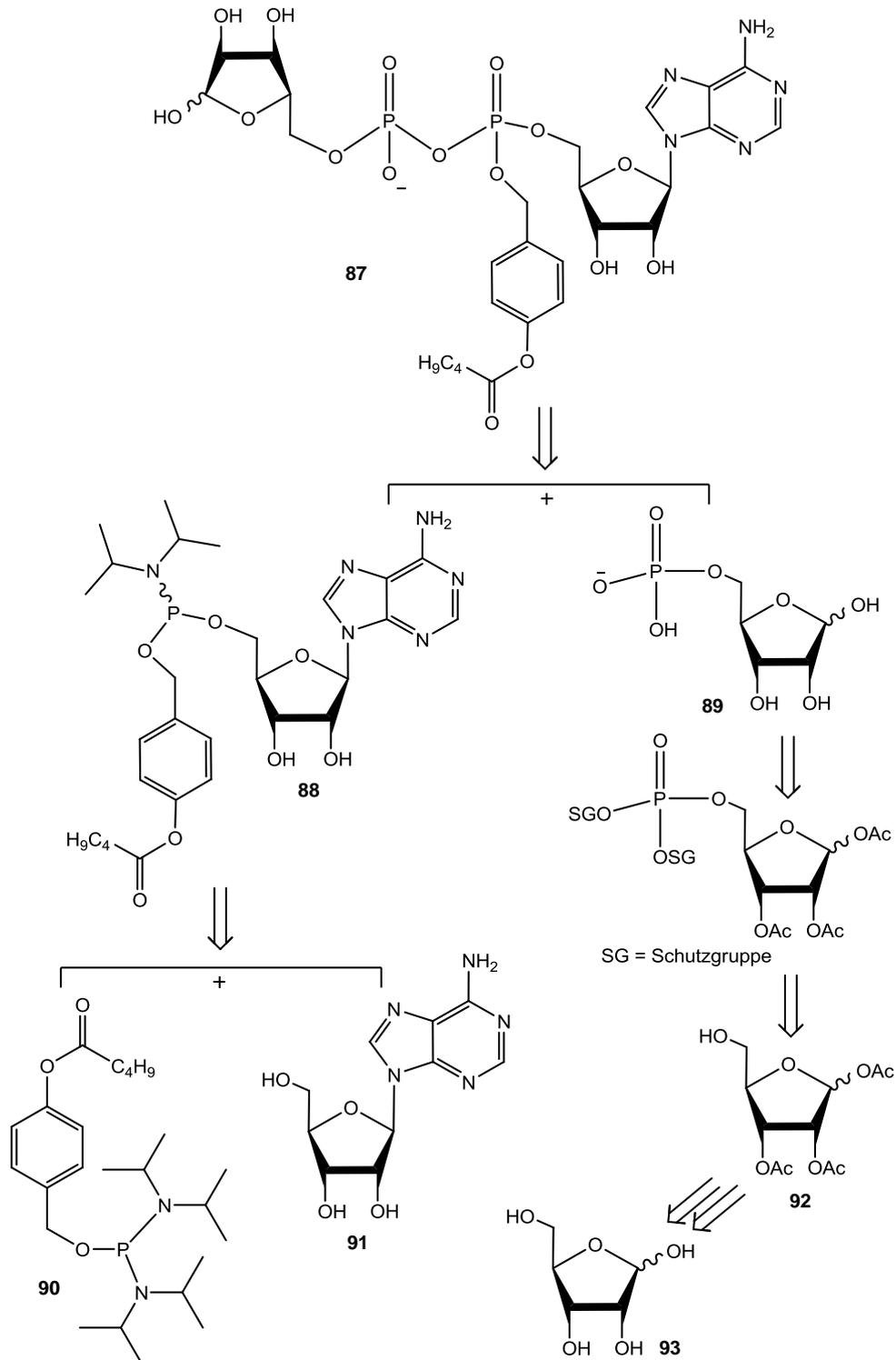


Abb. 79: Retrosyntheseschema zur Darstellung des monomaskierten Adenosindiphosphat-Ribose- (ADPR)-Derivates ^{C5}AB-ADPR **87**.

Der zweite Baustein **89** sollte aus einem vollständig geschützten D-Ribosyl-5-monophosphat erhalten werden. Dieses sollte aus der selektiv geschützten Ribose **92** generiert werden, welche über zwei Stufen aus D-Ribose **93** synthetisiert werden sollte.

Die Retrosynthese zur Darstellung der anomereneinen, am α -Phosphat maskierten peracetyl- ADPR-Derivate C^5AB -ADP α - und β -R^{Ac} α - und β -**94** ist in Abbildung 80 dargestellt.

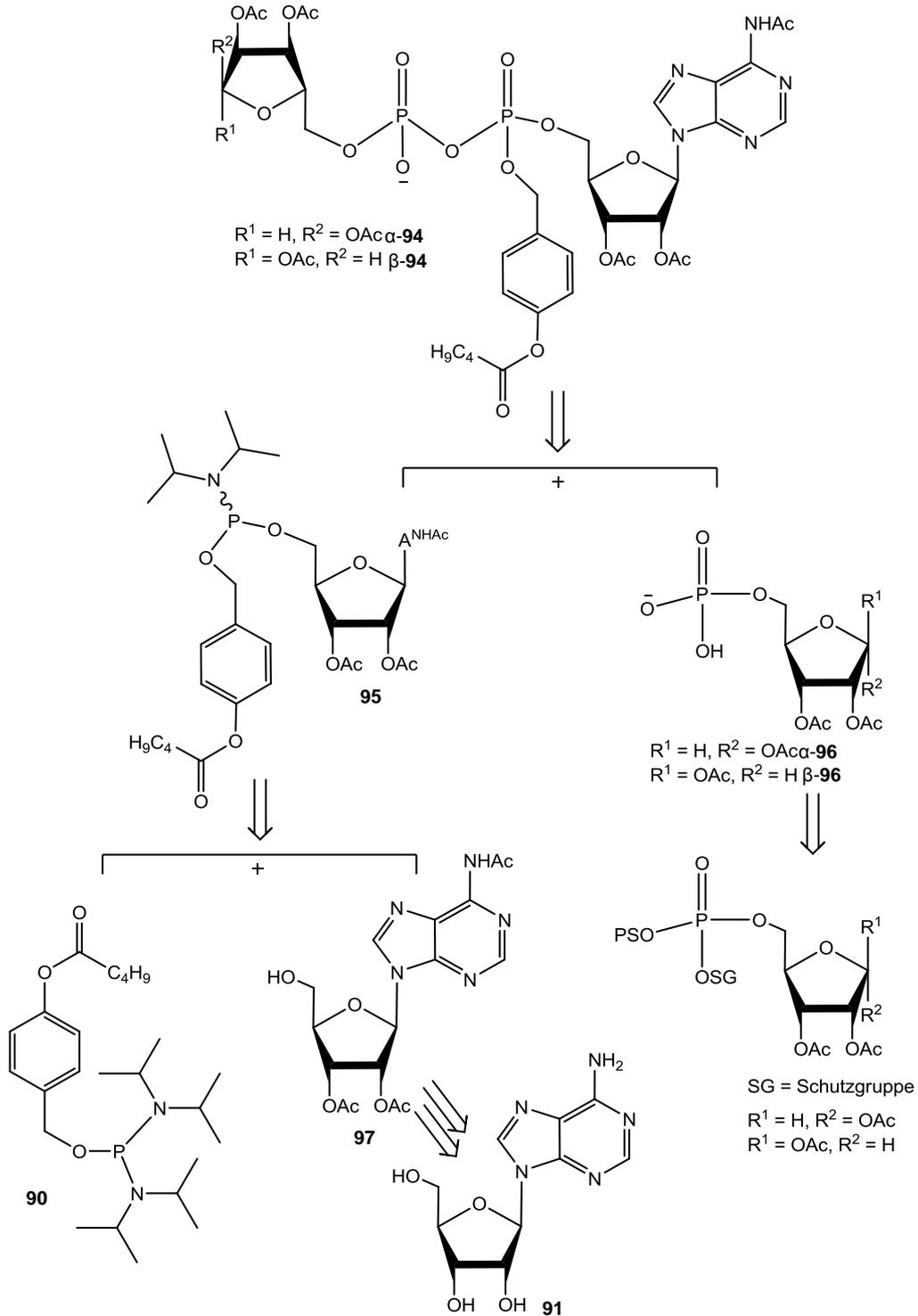


Abb. 80: Retrosyntheseschema zur Darstellung von C^5AB -ADP α - und β -R^{Ac} α - und β -**94**.

Die anomerereinen ADPR-Derivate C^5AB -ADP α - und β -R^{Ac} α - und β -**94** sollten ausgehend von dem nicht-symmetrischen Phosphoramidit 4-Pentanoyloxybenzyl-(5'-O-adenosin^{Ac})-phosphoramidit **95** und dem entsprechenden O-Acetyl-blockierten α - bzw. β -D-ribosyl-5-monophosphat α - und β -**96** dargestellt werden. Der erste Baustein, das nicht-symmetrische Phosphoramidit **95**, sollte durch Umsetzung von 4-Pentanoyloxybenzyl-bis-(diisopropylamino)phosphoramidit **90** mit *N*^t-Acetyl-2',3'-di-O-acetyladenosin **97** erfolgen. Dieses sollte über zwei Stufen aus Adenosin **91** generiert werden. Der zweite Baustein, die O-Acetylgeschützten Monophosphate α - und β -**96**, sollten aus einem vollständig geschützten α - bzw. β -D-Ribosyl-5-monophosphat erhalten werden.

4.4.1.1 Synthese von 4-Pentanoyloxybenzyl-(5'-O-adenosin)phosphoramidit **88**

Bei der Syntheseroute zur Darstellung des C^5AB -(5'-O-adenosin)phosphoramidites **88** (Abb. 81) waren die Herausforderungen die nicht blockierten sekundären Hydroxylgruppen sowie das freie Amin an der Nucleobase. Diese könnten ebenfalls mit dem eingesetzten Phosphordiamidit **90** reagieren. Die höhere Reaktivität der primären Hydroxylgruppe sollte trotzdem überwiegend zu dem 5'-O-Phosphoramidit **88** führen. Das Diamidit **90** wurde freundlicherweise von *T. Nack* zur Verfügung gestellt.

Die Darstellung erfolgte analog des Protokolls zur Darstellung der C^2AB - bzw. ^{pMPH}AB -(5'-O-cytidin^{Ac})phosphoramidite **60** bzw. **61** (Abschnitt 4.2.1.1). Um die denkbaren Nebenreaktionen möglichst zu vermeiden, wurden lediglich 1.1 Äquivalente des Diamidites **90** eingesetzt. Des Weiteren wurde Dimethylformamid als Lösungsmittel für Adenosin **91** verwendet. Zu Beginn der Reaktion wurden 1.0 Äquivalente DCI-Aktivatorlösung (0.25 M in Acetonitril) eingesetzt. Da auch nach 30 Minuten Reaktionszeit noch kein vollständiger Umsatz zu beobachten war, wurden weitere 0.1 Äquivalente DCI-Aktivatorlösung zu dem Reaktionsansatz gegeben. Dies brachte jedoch keinen Erfolg. Nach einer Stunde Reaktionszeit wurde die Reaktion durch Entfernung des Lösungsmittels abgebrochen, um denkbare Nebenreaktionen zu vermeiden. Eine Verbesserung des Umsatzes konnte durch eine portionsweise Zugabe der DCI-Aktivatorlösung in 0.25 Äquivalenten-Portionen erreicht werden. Die Zugabe erfolgte alle fünf Minuten bis 1.0 Äquivalente zu dem Reaktionsansatz gegeben waren. Nach der letzten Zugabe war ein vollständiger Umsatz erreicht. Die Reaktionszeit verkürzte sich dadurch auf 20 Minuten.

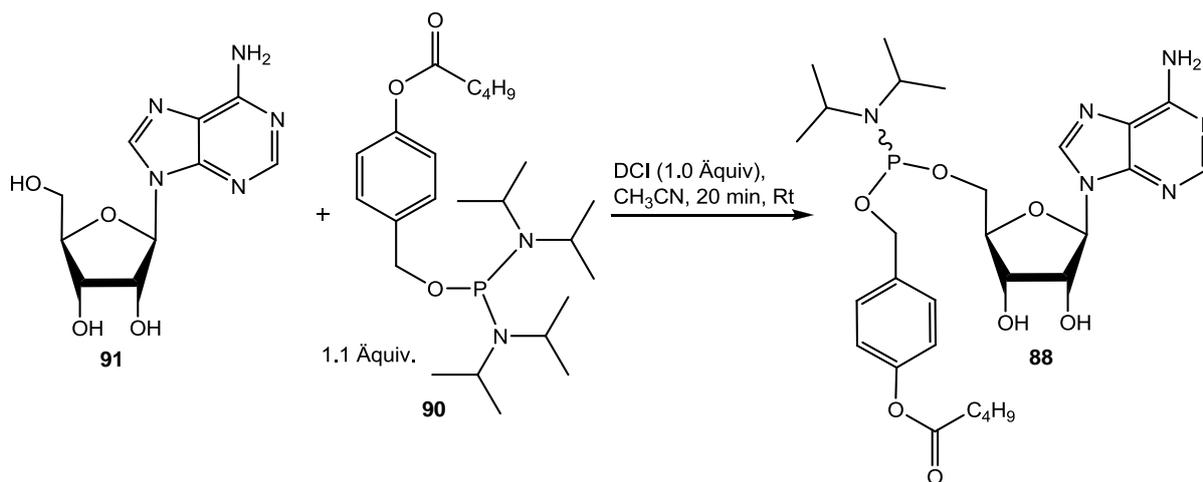


Abb. 81: Synthese von ^{C5}AB-(5'-O-adenosin)phosphoramidit **88**.

Die Reinigung des Produktes **88** erfolgte am Chromatotron mit einem Zusatz von Triethylamin. Die zugesetzte Base sollte eine saure Hydrolyse des Produktes **88** während der Chromatographie auf der Chromatotronplatte verhindern. Eine vollständige Isolierung des Produktes **88** gelang auch nach zweimaliger chromatographischer Reinigung nicht. Aufgrund der Labilität des Produktes **88** gegenüber saurer Hydrolyse wurde auf einen weiteren Reinigungsschritt verzichtet. Das Produkt liegt als Diastereomeregemisch (1:1) vor. Das ³¹P-NMR-Spektrum (Abb. 82) zeigt die typische Verschiebung für diese Phosphoramidite von 149.7 und 148.7 ppm. Die Verunreinigungen mit einer chemischen Verschiebung von 122.2 ppm und 9.4/9.2 ppm konnten nicht abgetrennt werden. Bei der Verunreinigung mit einer chemischen Verschiebung von 122.2 ppm könnte es sich beispielsweise um ein Phosphit handeln. Dieses könnte durch einen weiteren Angriff von Adenosin auf das bereits gebildete Phosphoramidit **88** entstanden sein. Bei den Peaks mit einer Verschiebung von 9.4/9.2 ppm handelt es sich vermutlich um ein Phosphoramidat, welches als Diastereomeregemisch vorliegt. Dies könnte während der chromatographischen Reinigung oder auch durch das erneute Lösen für die NMR-Probe durch Reaktion mit Luftsauerstoff entstanden sein. Des Weiteren könnte es sich bei dem Nebenprodukt auch um ein H-Phosphonat handeln. Es war weder die Isolation des Produktes noch die der Nebenprodukte erfolgreich, da das Produkt aufgrund der polaren funktionellen Gruppen, über einen sehr breiten Bereich von der Chromatotronplatte eluierte. Die Nebenprodukte konnten somit auch nach einem zweiten Reinigungsschritt nicht von dem Produkt abgetrennt werden. Aus diesem Grund war ebenfalls eine Identifizierung der Nebenprodukte nicht möglich.

Bei einer erfolgreichen Synthese des benötigten Monophosphates **89** sollte das nicht vollständig gereinigte Phosphoramidit **88** zur Darstellung der ^{C5}AB-ADPR **87** eingesetzt werden. Die Verunreinigungen könnten sich vermutlich bei der Reinigung des Produktes **87** aufgrund anderer Polaritäten und Stabilitäten der Verbindung **87** besser abtrennen lassen.

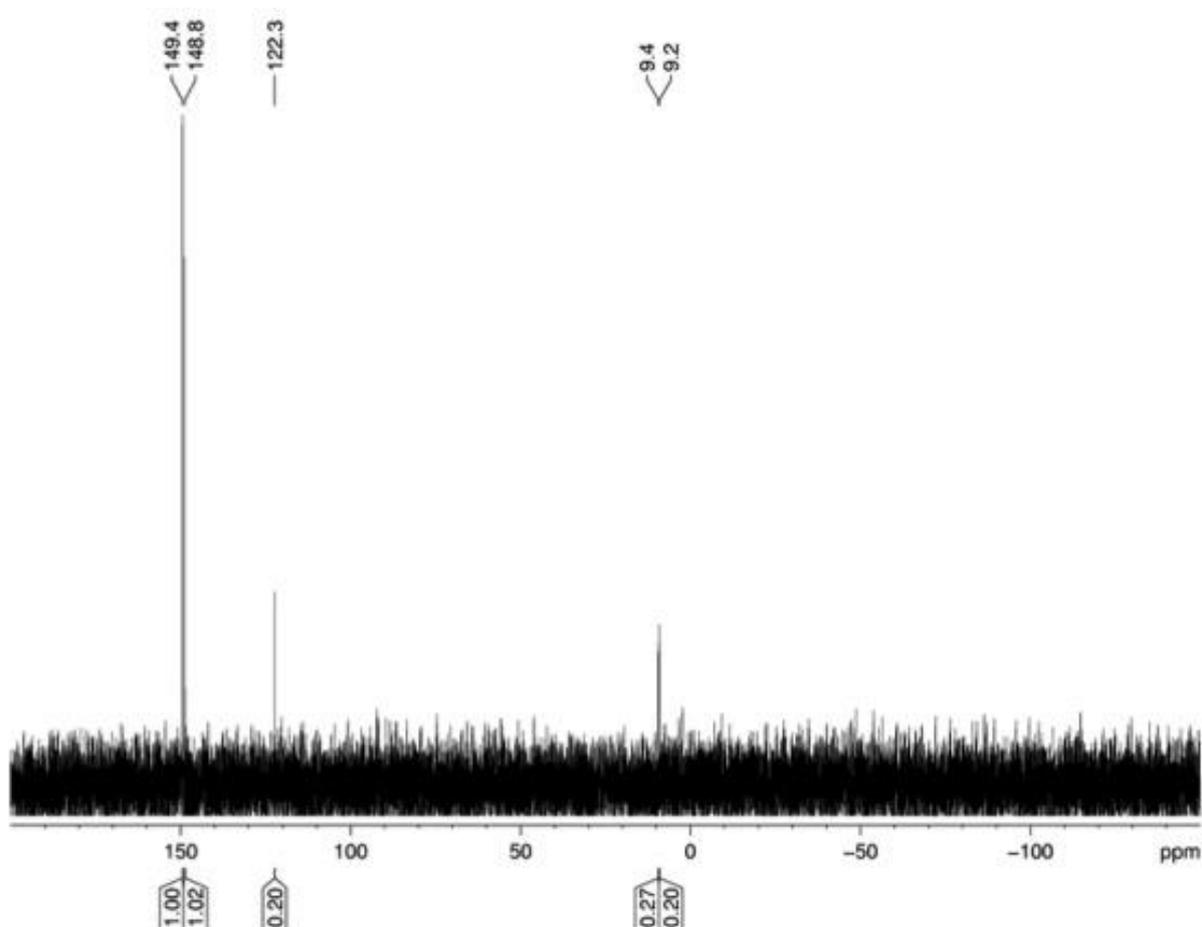


Abb. 82: ^{31}P -NMR-Spektrum des C^5AB -(5'-O-adenosin)phosphoramidites **88**.

4.4.1.2 Synthese von 4-Pentanoyloxybenzyl-(5'-O-adenosin^{Ac})phosphoramidit **95**

Als Nächstes erfolgte die Darstellung des peracetylierten Phosphoramidites C^5AB -(5'-O-adenosin^{Ac})phosphoramidit **95**. Die Verwendung von Acetylschutzgruppen bei der Synthese eines nicht-symmetrischen Phosphoramidites war bereits bei der Darstellung der C^2AB - und $^{\text{pMPH}}\text{AB}$ -(5'-O-cytidin^{Ac})phosphoramidite **60** und **61** erfolgreich (Abschnitt 4.2.1.1). Für die Synthese des C^5AB -(5'-O-adenosin^{Ac})phosphoramidites **95** (Abb. 83) wurde N^4 -Acetyl-2',3'-di-O-acetyladenosin **97** benötigt. Dieses wurde analog der Synthese des 2',3'-Di-O-acetyluridins **48** (Abschnitt 4.1.1.1) synthetisiert. Die 5'-OTBDMS und peracetylierten Adenosin-Derivate **98** und **99** wurden in einer Ausbeute von 44% und 55% erhalten. Auffällig war hier, dass als Hauptprodukt das zweifach an der Aminogruppe acetylierte Produkt **99** entstand. Dies wurde nicht erwartet, da beispielsweise bei der Darstellung des N^4 -Acetyl-2',3'-diacetylcytidins **64** (Abschnitt 4.2.1.1) das an der Base zweifach acetylierte Produkt lediglich in sehr geringem Maße erhalten wurde. Die Abspaltung der TBDMS-Gruppe erfolgte mittels Triethylamin-Trihydrofluorid. N^4 -Acetyl-2',3'-di-O-acetyladenosin **97** wurden quantitativ erhalten, während das Derivat **100** in einer Ausbeute von 84% erhalten wurde. In diesem Fall entstand in geringem Maße auch das an der Nucleobase einfach geschützte Derivat **97**. Für die folgende Synthese wurde nur das Derivat **97** eingesetzt.

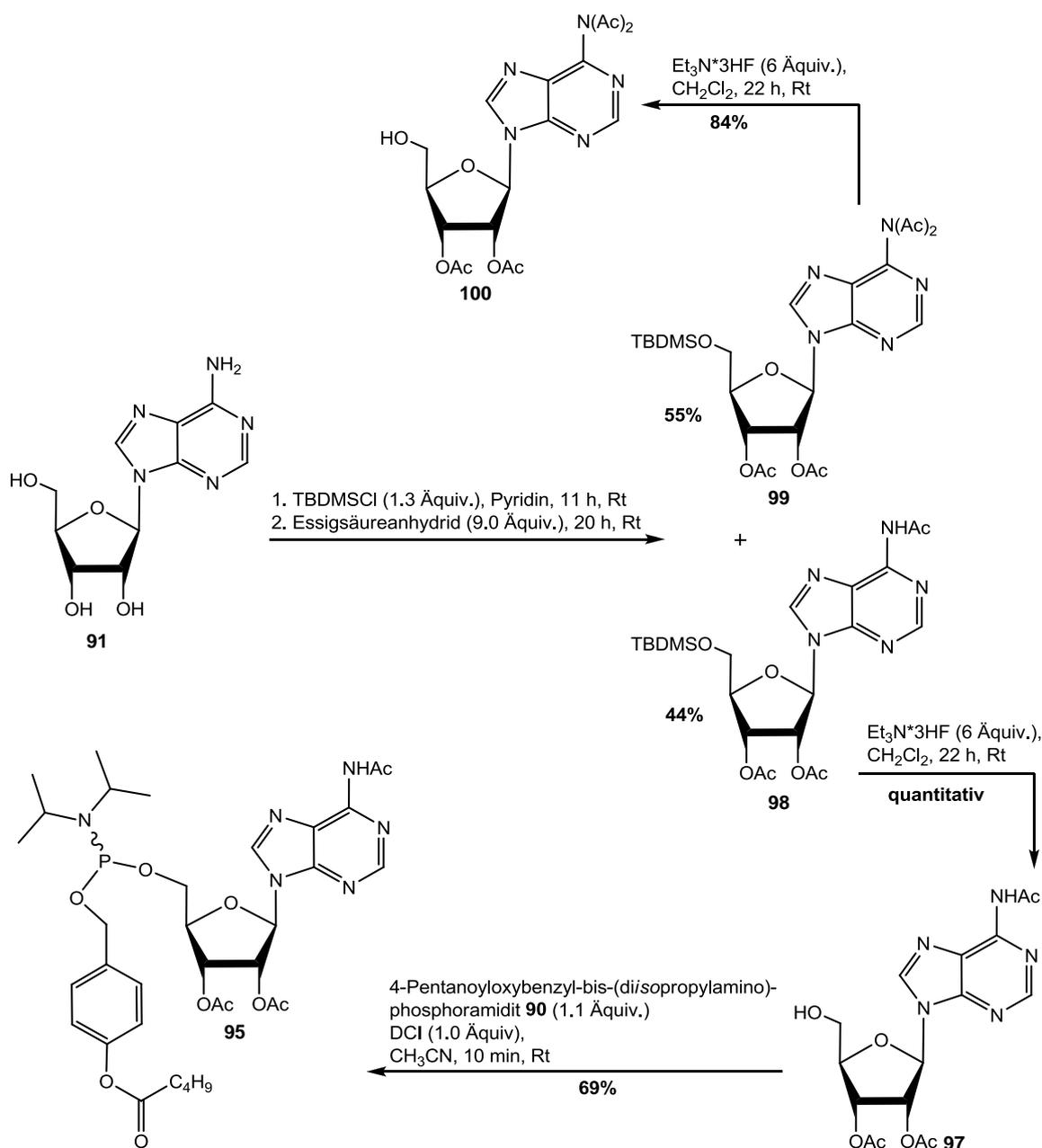


Abb. 83: Synthese von $^{\text{C}5}\text{AB}$ -(5'-O-adenosin $^{\text{Ac}}$)phosphoramidit **95**.

Im letzten Syntheseschritt erfolgte die Darstellung des $^{\text{C}5}\text{AB}$ -(5'-O-adenosin $^{\text{Ac}}$)phosphoramidites **95** analog des Protokolls zur Darstellung des $^{\text{C}2}\text{AB}$ - bzw. $^{\text{pMPh}}\text{AB}$ -(5'-O-cytidin $^{\text{Ac}}$)phosphoramidites **60** bzw. **61** durch Umsetzung des Adenosin-Derivates **97** mit dem $^{\text{C}5}\text{AB}$ -Phosphordiamidit **90**. Das $^{\text{C}5}\text{AB}$ -(5'-O-adenosin $^{\text{Ac}}$)phosphoramidit **95** wurde in einer Ausbeute von 69% als Diastereomengemisch (1:1) nach Reinigung am Chromatotron erhalten. In diesem Fall war trotz der eingesetzten Acetylschutzgruppen die Verwendung von lediglich 1.1 Äquivalenten des Diamidites **90** entscheidend. Bei dem Einsatz von 1.5 Äquivalenten, wie bei den anderen Synthesen zur Darstellung von nicht-symmetrischen Phosphoramiditen, kam es zur Bildung eines nicht UV-aktiven Nebenproduktes, welches

einen sehr ähnlichen R_f -Wert wie das Produkt **95** hatte. Eine Reinigung des Produktes **95** war in diesem Fall nicht möglich. Durch die Verringerung der Äquivalente auf 1.1 Äquiv. gelang die Reinigung der Verbindung **95** problemlos. Über diese Syntheseroute erfolgte die Darstellung des für die Synthese der anomerenreinen ADPR-Derivate α - und β -**94** benötigten Bausteins C^5AB -(5'-O-adenosin^{Ac})phosphoramidit **95** über drei Stufen und in hohen Ausbeuten.

4.4.1.3 Synthese von 1,2,3-Triacetyl- α - und - β -D-ribose α - und β -**92**

Für die Darstellung der benötigten Zuckerphosphat-Bausteine α - und β -**96** war es notwendig, eine Syntheseroute zu entwickeln, die sowohl die selektive Phosphorylierung an der C5-Position als auch eine Trennung der Anomere ermöglichte. Die Darstellung der anomerenreinen, lipophilen ADPR-Derivate α - und β -**94** sollte durch Umsetzung des entsprechenden anomerenreinen Zuckerphosphates erfolgen. Um dies zu erreichen, war eine Trennung der Anomere vor dem finalen Syntheseschritt notwendig. Um selektiv an der C5-Position der Ribose zu phosphorylieren, wurde 1,2,3-Triacetyl- α - und - β -D-ribose α -/ β -**92** benötigt. Der chemische Zugang zu dieser Verbindung ist sehr limitiert, da es nur wenige Publikationen hierzu gibt. In zwei beschriebenen Syntheseansätzen erfolgt die Darstellung von 1,2,3-Triacetyl- α - und - β -D-ribose α -/ β -**92** in einer orthogonalen Zweistufensynthese ausgehend von D-Ribose **93**. Als Schutzgruppe für die 5-O-Position wird eine Monomethoxytrityl (MMTr)-Gruppe verwendet. Die verbleibenden Hydroxylgruppen werden acetyliert. Nach der Spaltung der MMTr-Gruppe ist in einem Fall die Trennung der Anomere durchgeführt worden.^[192-193] Zur Blockierung der C5-Position von sowohl Nucleosiden als auch Kohlenhydraten werden neben der MMTr-Gruppe auch die TBDMS-Gruppe und die 4,4'-Dimethoxytrityl- (DMTr)-Schutzgruppe erfolgreich eingesetzt.^[194-195] Da sich die DMTr-Gruppe schneller unter sauren Bedingungen spalten lässt als die MMTr-Gruppe,^[196] wurde diese zunächst verwendet. Darüber hinaus ist die DMTr-Gruppe sterisch anspruchsvoller als die TBDMS-Schutzgruppe. Es wurde angenommen, dass die Reaktion aufgrund einer möglichen sterischen Hinderung bevorzugt an der 5-Hydroxylgruppe und nicht an der 1-Hydroxylgruppe stattfinden würde. Des Weiteren erfolgt die Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe unter sauren Bedingungen und nicht wie bei der TBDMS-Gruppe mit fluoridhaltigen Reagenzien.

Zunächst wurde D-Ribose **93** mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (DMTrCl) umgesetzt (Abb. 84 oberer Syntheseweg). Es wurde mit 1.1 Äquivalenten gestartet und bis zur vollständigen Umsetzung des Eduktes erfolgte die weitere Zugabe von DMTrCl in Portionen von 0.1 Äquiv. Anschließend wurde Essigsäureanhydrid zur Acetylierung der verbleibenden drei Hydroxylgruppen zu dem Reaktionsansatz gegeben. Um eine saure Abspaltung der DMTr-Gruppe durch die während der Reaktion entstehende Essigsäure zu verhindern, wurde eine äquimolare Menge an Triethylamin, bezogen auf Essigsäureanhydrid, eingesetzt. Das

vollständig blockierte Produkt α - β -**101** wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt. Zur Abspaltung der DMTr-Gruppe wurde eine katalytische Menge *para*-Toluolsulfonsäure (*p*TsOH) eingesetzt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung wurden zwar Fraktionen erhalten, die vermutlich das Produkt α - β -**92** enthielten, jedoch waren die erhaltenen Mengen sehr gering und noch nicht vollständig gereinigt. Aufgrund der geringen Menge wurde auf eine weitere Reinigung verzichtet. Auch der Versuch, das Produkt α - β -**101** vor der Entfernung der DMTr-Schutzgruppe am Chromatotron zu reinigen, brachte keinen Erfolg. Das Produkt α - β -**101** konnte auch nach mehrfacher Reinigung am Chromatotron nicht isoliert werden. Zum einen waren Verunreinigungen von DMTr-Resten enthalten und zum anderen wurden Fraktionen erhalten, in denen nicht identifizierbare Nebenprodukte enthalten waren. Die Fraktionen, in denen das Produkt α - β -**101** enthalten war und die nur wenig Verunreinigungen von DMTr-Resten enthielten, wurden weiter umgesetzt. Auch hier konnte nach der Zugabe von *p*TsOH und anschließender säulenchromatographischer Reinigung kein Produkt α - β -**92** erhalten werden. In diesem Fall wurde keine Fraktion erhalten, die das Produkt α - β -**92** enthielt.

Als nächstes wurde die TBDMS-Gruppe zur Blockierung der 5-Hydroxylgruppe eingesetzt (Abb. 84 unterer Syntheseweg). Die Verwendung der TBDMS-Gruppe ergab bereits bei den durchgeführten Nucleosidsynthesen sehr gute Ergebnisse (Abschnitte 4.1.1.1, 4.2.1.1 und 4.4.1.2). Die Synthese der Produkte α - β -**92** erfolgte somit analog der Protokolle zur Darstellung selektiv geschützter Nucleoside. Zunächst erfolgten eine Blockierung der 5-Hydroxylgruppe mit TBDMSCl und eine Peracetylierung der verbleibenden Hydroxylgruppen. Abschließend wurde die TBDMS-Gruppe durch Verwendung von Triethylamin-Trihydrofluorid gespalten. Die vollständig blockierte *D*-Ribose α - β -**102** wurde in einer Gesamtausbeute von 64% in einem 1:1-Anomerenverhältnis erhalten. Die etwas geringere Ausbeute im Vergleich zu den Nucleosiden kann dadurch erklärt werden, dass es vermutlich zu Nebenreaktionen mit der in diesem Fall freien 1-Hydroxylgruppe kam. Es war möglich, die Anomere mittels Säulenchromatographie zu trennen. Beide Anomere α - β -**92** wurde jeweils in einer Ausbeute von 23% erhalten. Weitere 18% lagen noch als Mischfraktion der beiden Anomere vor. Anschließend erfolgte jeweils die Abspaltung der TBDMS-Gruppe. Das α -Anomer α -**92** wurde in einer Ausbeute von 90% und das β -Anomer β -**92** wurde in einer ähnlichen Ausbeute von 89% erhalten.

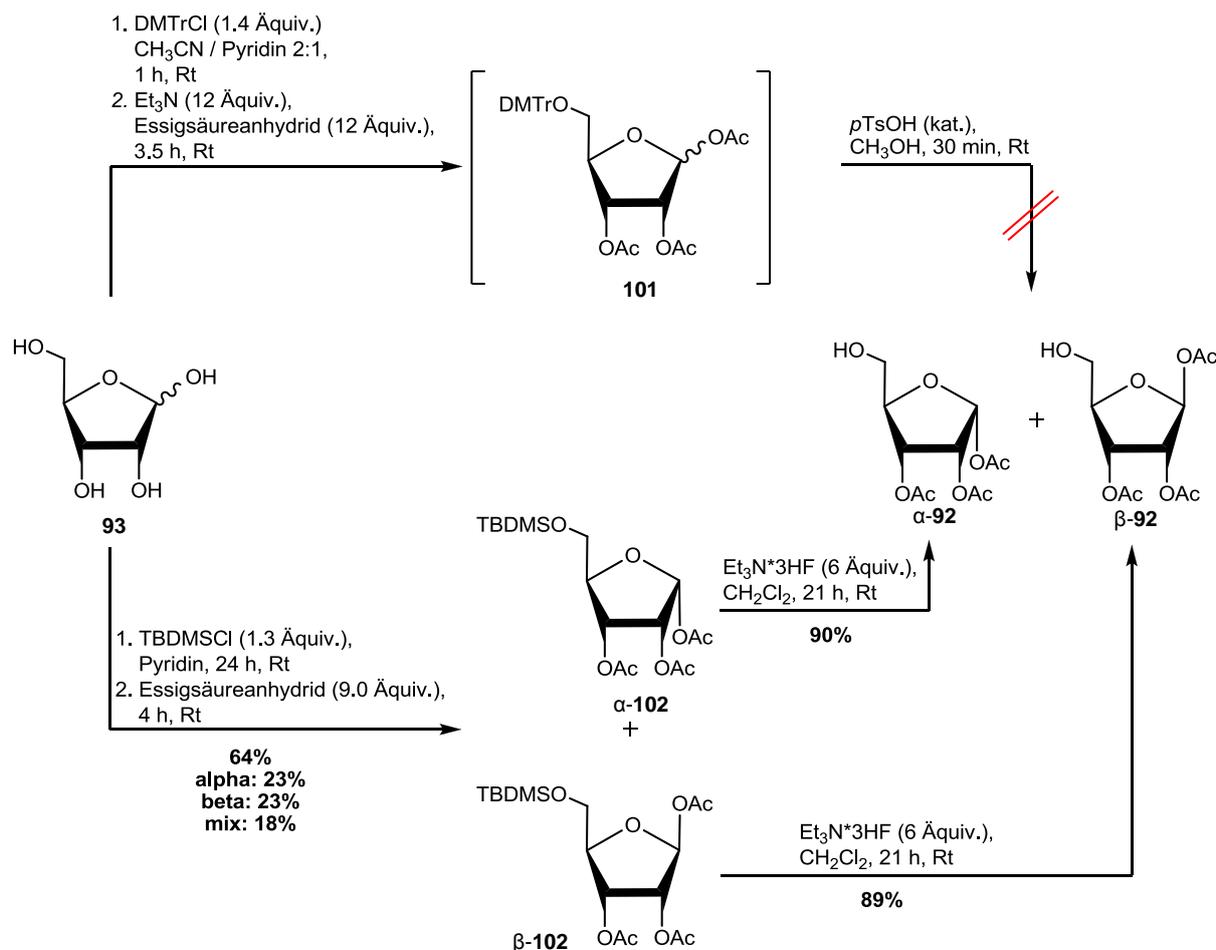


Abb. 84: Synthese von 1,2,3-Triacetyl- α - und - β -D-ribose α - und β -**92**.

Durch Verwendung der TBDMS-Schutzgruppe für die 5-Hydroxylgruppe gelang die Darstellung von 1,2,3-Triacetyl- α - und - β -D-ribose α - und β -**92** in guten Ausbeuten. Des Weiteren war es bereits auf der ersten Stufe möglich, die beiden Anomere zu trennen. Somit war eine zentrale Anforderung an die Syntheseroute zur Darstellung der anomerenreinen ADPR-Derivate α - und β -**94** erfüllt. Die Verwendung der MMTr-Gruppe war somit nicht mehr erforderlich.

4.4.1.4 Versuch der Synthese von D-Ribosyl-5-monophosphat **89** sowie Darstellung von 1,2,3-Tri-O-acetyl- α - und - β -D-ribose 5-monophosphat α - und β -**96**

Zunächst erfolgte die Darstellung der anomerenreinen komplett geschützten Ribosephosphate **103** und **104** (Abb. 85). Die Phosphorylierung kann unter anderem durch Verwendung von P^{III}-Phosphoramiditen erfolgen. Diese können unterschiedliche Schutzgruppen an dem Phosphoratom tragen. Es wurden zwei unterschiedlich spaltbare Gruppen verwendet, um zu überprüfen, ob verschiedene Reaktionsbedingungen einen Einfluss auf die Darstellung des D-Ribosephosphates **89** haben. Darüber hinaus sollte dadurch eine individuell anwendbare Syntheseroute erreicht werden. Zum einen wurde das kommerziell erwerbliche Phosphoramidit **105**, welches zwei Benzyl (Bn)-Gruppen trägt, verwendet. Diese

Gruppen können durch hydrogenolytische Spaltung sowohl in Gegenwart von Acetylschutzgruppen als auch je nach Reaktionsbedingungen gleichzeitig mit Acetylschutzgruppen gespalten werden.^[197] Zum anderen wurde das Phosphoramidit **106**, welches zwei 9-Fluorenylmethyl (Fm)-Gruppen trägt, eingesetzt. Diese Gruppen können durch β -Eliminierung unter trockenen und milden basischen Bedingungen in verschiedenen Lösungsmitteln auch neben Acetylschutzgruppen gespalten werden.^[198-200] Durch Verwendung nicht trockener Bedingungen ist es möglich, die Fm-Gruppen und die Acetylgruppen in einem Schritt zu spalten. Die Abspaltung kann sowohl mit Triethylamin als auch mit Piperidin erfolgen.^[201]

Die Darstellung des Bis(flourenylmethyl)phosphoramidites **106** (Abb. 85 rechts) basierte auf dem Syntheseprotokoll von *Bialy et al.*^[199] Es erfolgt eine Umsetzung des Dichloro-*N,N*-(diisopropyl)phosphoramidites **107**, welches freundlicherweise von *M. Winkler* zur Verfügung gestellt wurde, mit 9-Fluorenylmethanol **108**. Durch Änderung der Zugabereihenfolge, der verwendeten Base, der Reaktionszeit und der Pufferkonzentration gelang die Darstellung des Fm-Phosphoramidites **106** in quantitativer Ausbeute. Nach wässriger Aufarbeitung zeigten sowohl das ^1H -NMR-Spektrum als auch das ^{31}P -NMR-Spektrum eine sehr hohe Reinheit, so dass auf eine weitere Reinigung verzichtet wurde.

Die Darstellung der vollständig blockierten Ribosephosphate **103** und **104** (Abb. 85) erfolgte, wie in Abschnitt 4.2.1.2 beschrieben, angelehnt an das Protokoll zur Darstellung der CMP-Neu5Ac-Derivate **58** bzw. **59**. Die Ribosephosphate **105** und **106** wurden durch DCI-vermittelte Kupplung durch Umsetzung von 1,2,3-Triacetyl- α - bzw. - β -D-ribose α - bzw. β -**92** mit dem entsprechenden Phosphoramidit **105** bzw. **106** und anschließender Oxidation mit *tert*-Butylhydroperoxid synthetisiert. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur und nicht bei 0 °C durchgeführt und die Zugabe der DCI-Lösung (0.25 M in Acetonitril) erfolgte nicht portionsweise. Bereits nach einer Reaktionszeit von 5 Minuten war ein vollständiger Umsatz erreicht. Das vollständig blockierte Bn-Ribosephosphat **103** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 89% und das Fm-Ribosephosphat **104** konnte in einer Ausbeute von 78% erhalten werden.

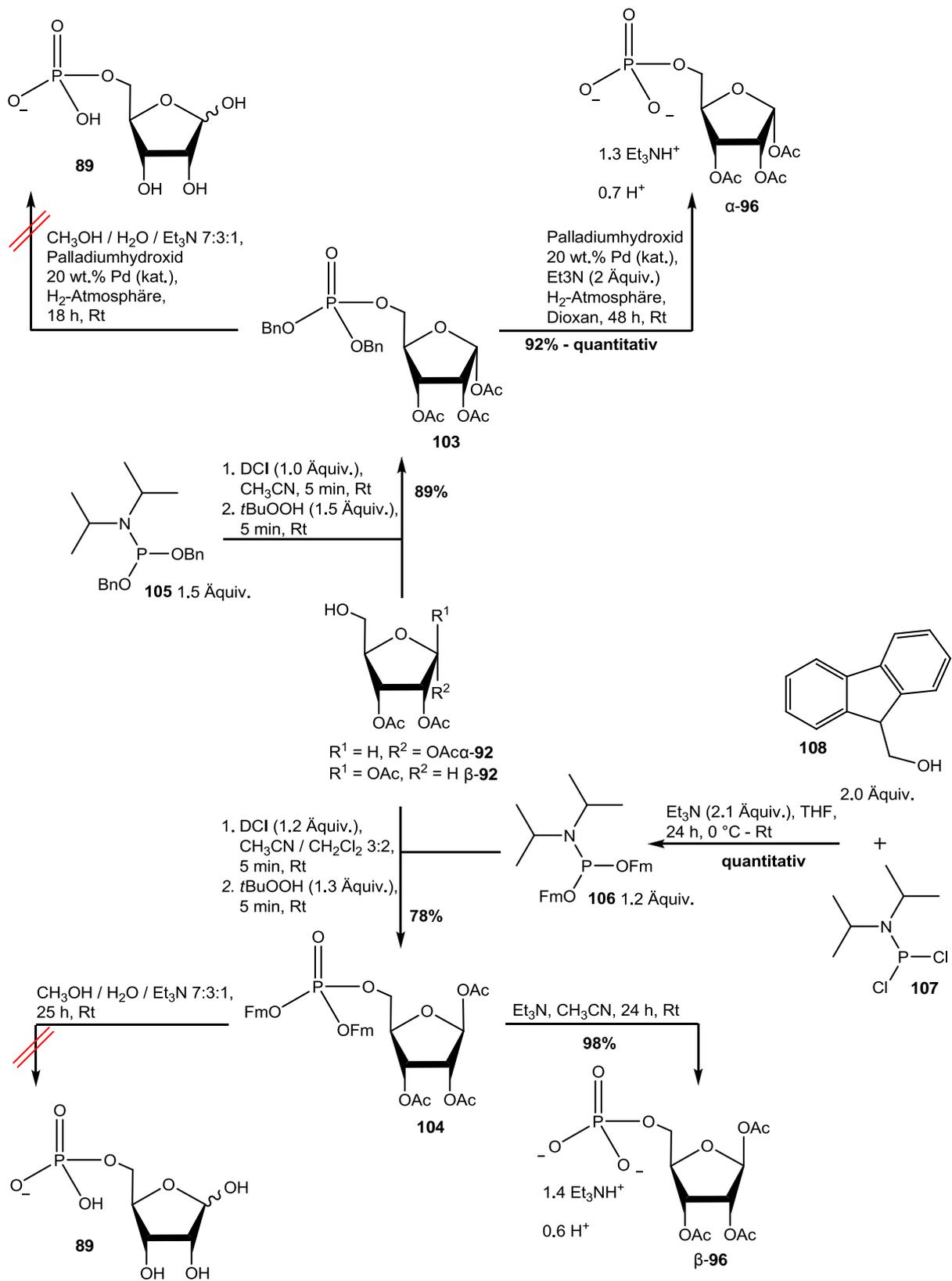


Abb. 85: Synthese von 1,2,3-Tri-O-acetyl- α - und - β -D-ribose-5-monophosphat α - und β -96 sowie Versuch der Synthese von D-Ribose-5-monophosphat 89.

Die Synthese des D-Ribosyl-5-monophosphates **89** sollte aus den komplett geschützten Ribosephosphaten **103** bzw. **104** erfolgen (Abb. 85 links). Zur Entfernung der Benzyl- und Acetylgruppen wurde das Bn-Phosphoramidit **103** in einem Gemisch aus CH₃OH/H₂O/Et₃N gelöst, mit einer katalytischen Menge Palladiumhydroxid versetzt und unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach 18 Stunden Reaktionszeit war kein Edukt mehr detektierbar. Allerdings wurden bereits mehrere Produkte mittels Dünnschichtchromatographie detektiert. Das nach der ersten automatisierten RP-18 säulenchromatographischen Reinigung erhaltene ³¹P-NMR-Spektrum (Abb. 86) zeigte noch eine Vielzahl an Signalen. Auch nach mehrfacher automatisierter RP-18 Säulenchromatographie konnte aus noch ungeklärten Gründen kein sauberes Produkt **89** erhalten werden. Es stellte sich die Frage, ob das Problem bei der basischen Abspaltung der Schutzgruppen lag oder ob ein generelles Stabilitätsproblem bei dem D-Ribosyl-5-monophosphat **89** vorliegt. Durch die Verwendung anderer Schutzgruppen, wie beispielsweise O-Benzyl, könnte überprüft werden, ob das Problem bei der basischen Abspaltung der Schutzgruppen liegt.

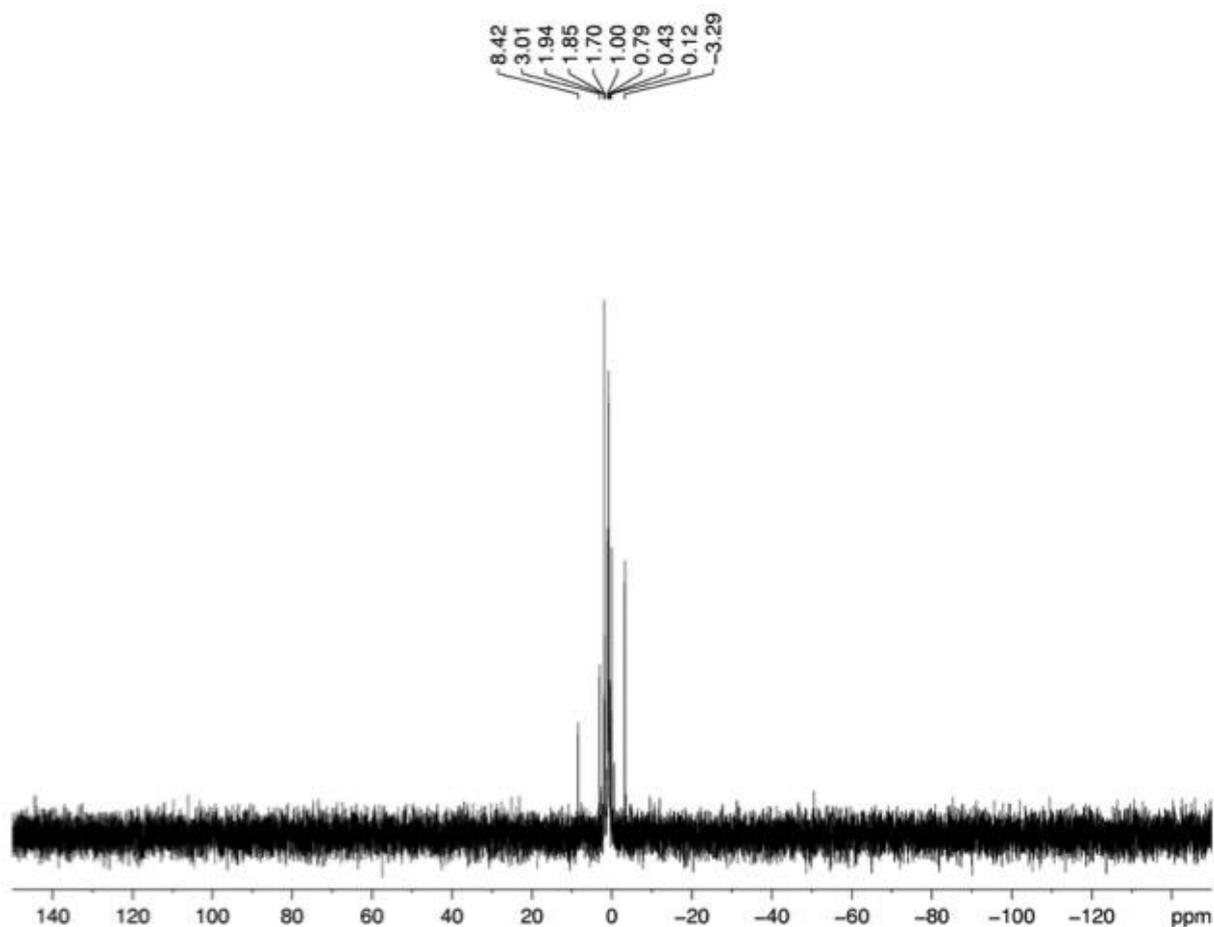


Abb. 86: ³¹P-NMR-Spektrum nach der ersten säulenchromatographischen Reinigung der Synthese zur Darstellung von D-Ribosyl-5-monophosphat **89** ausgehend von dem Bn-Ribosephosphat **103**.

Die Entfernung aller Schutzgruppen des Fm-Ribosephosphates **104** zur Darstellung von D-Ribosyl-5-monophosphat **89** sollte nur durch Zugabe von CH₃OH/H₂O/Et₃N 7:3:1 erfolgen. Durch die Verwendung dieses Gemisches ist die basische Abspaltung sowohl der Fm-Gruppen als auch der Acetylschutzgruppen in einem Schritt möglich. Nach einer Reaktionszeit von 25 Stunden bei Raumtemperatur wurde das Volumen der Lösung im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde über Watte filtriert und das restliche Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt.

Das ³¹P-NMR-Spektrum des Rohproduktes zeigte auch hier bereits eine Vielzahl von Signalen (Abb. 87). Auch nach zweifacher automatisierter RP-18 Säulenchromatographie konnte kein Produkt isoliert werden. Alle phosphathaltigen Fraktionen zeigten in den ³¹P-NMR-Spektren eine Vielzahl von Signalen. Eine Verkürzung der Reaktionszeit brachte ebenfalls keinen Erfolg. Es blieb weiterhin unklar, ob es sich hier um ein Problem bei der basischen Abspaltung der Schutzgruppen handelt oder um ein Stabilitätsproblem des Ribosephosphates **89**.

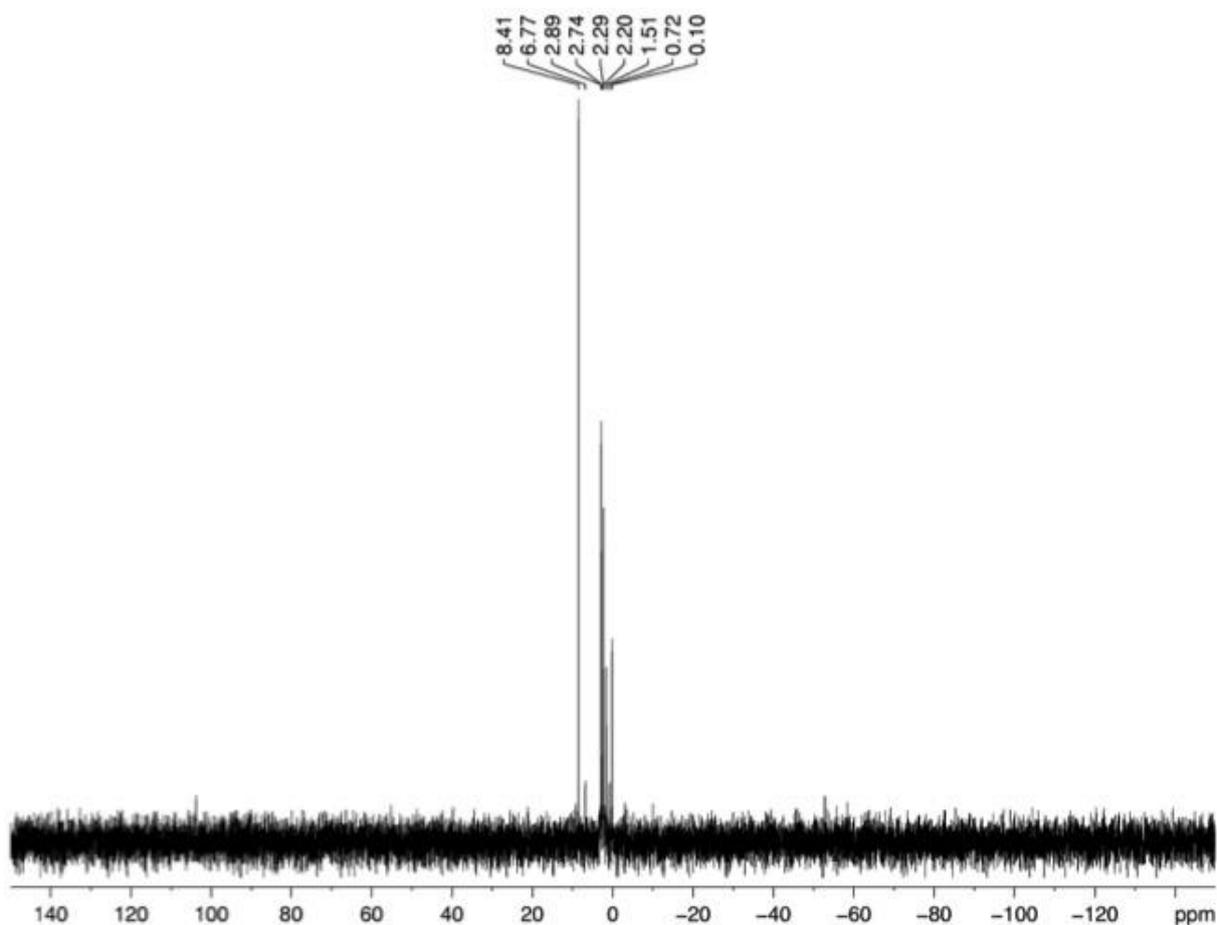


Abb. 87: Roh-³¹P-NMR-Spektrum der Synthese zur Darstellung von D-Ribosyl-5-monophosphat **89** ausgehend von dem Fm-Ribosephosphat **103**.

Über diese beiden Wege war eine Darstellung des D-Ribosyl-5-monophosphates **89** nicht möglich. Vermutlich kam es entweder bei der basischen Abspaltung der Acetylschutzgruppen zur Bildung von Zersetzungsprodukten oder das Monophosphat **89** ist unter den gewählten Reaktionsbedingungen generell zu labil.

Für die Darstellung des ^{C5}AB-ADPR-Derivates **87** war sowohl die Darstellung des ^{C5}AB-(5'-O-adenosin^{Ac})phosphoramidites **88** als auch die Synthese des D-Ribosyl-5-monophosphates **89** notwendig. Es zeigte sich jedoch, dass Probleme bei der Synthese beider Bausteine auftraten. Da die Reinigung des ^{C5}AB-(5'-O-adenosin^{Ac})phosphoramidites **88** aufgrund der Bildung mehrerer Nebenprodukte problematisch war und auch die Synthese des D-Ribosyl-5-monophosphates **89** nicht erfolgreich war, wurde die Synthese des ^{C5}AB-ADPR-Derivates **87** nicht weiter verfolgt. Zudem sollte die enzymatische Freisetzung von ADPR **21** auch aus den vollständig blockierten ^{C5}AB-ADP α - und - β -R^{Ac} α - und β -**94** erfolgen. Die Entfernung der Bn-Gruppe zur Darstellung des O-Acetyl-blockierten α -D-Ribosyl-5-monophosphates α -**96** (Abb. 85 oben rechts) erfolgte hydrogenolytisch in 1,4-Dioxan und durch Zusatz von Triethylamin. Als Katalysator wurde ebenfalls Palladiumhydroxid verwendet. Nach einer Reaktionszeit von 48 Stunden konnte das Produkt α -**96** nach Abtrennung des Katalysators ohne weitere Reinigung in quantitativer Ausbeute erhalten werden. Das ³¹P-NMR-Spektrum der Verbindung α -**96** (Abb. 88) zeigte, dass das Produkt in hoher Reinheit erhalten werden konnte.

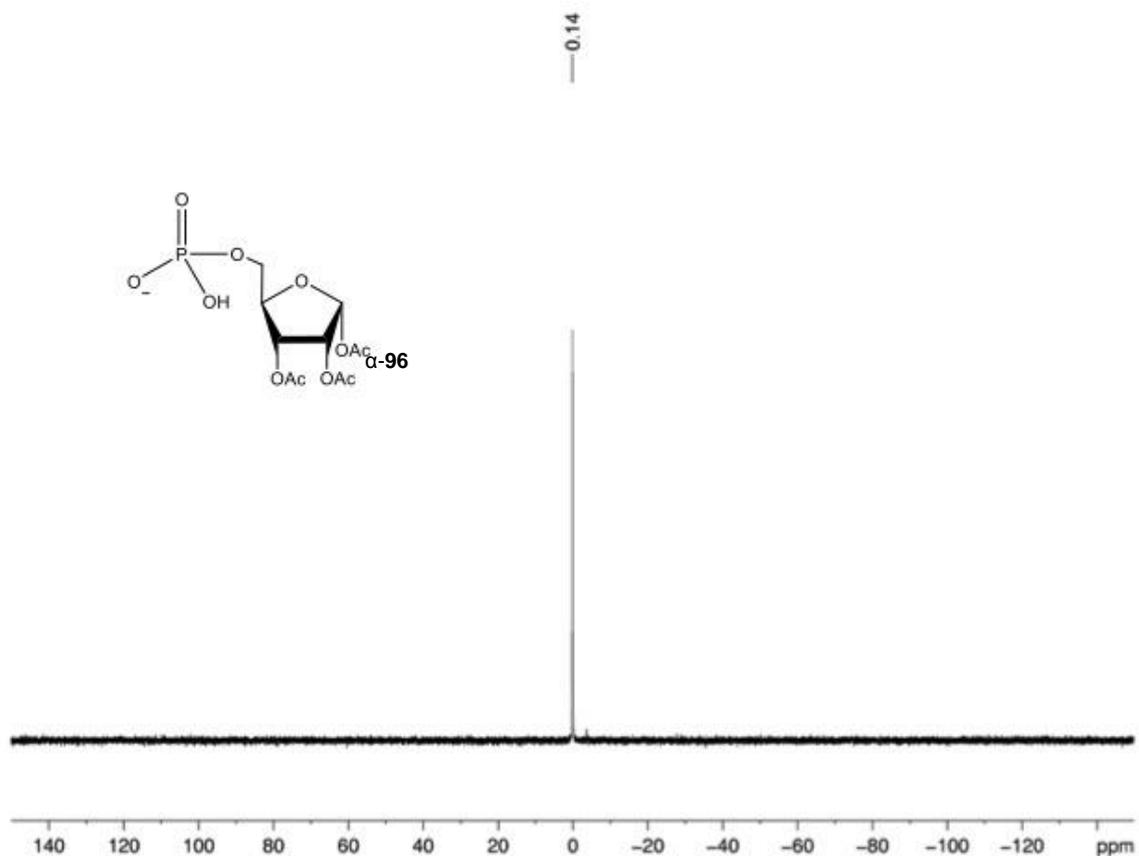


Abb. 88: ³¹P-NMR-Spektrum von 1,2,3-Tri-O-acetyl- α -D-ribose-5-monophosphat α -**96**.

Die Abtrennung des Katalysators erwies sich als sehr schwierig, da mehrere Filtrationen zur vollständigen Entfernung nötig waren. Im Vergleich zu der vollständigen Entfernung der Bn- und Acetyl-Schutzgruppen verlief diese Reaktion sehr gut. Das Problem schien somit entweder bei der basisch induzierten Deacetylierung zu liegen oder generell in der Stabilität des Ribosephosphates **89**. Der Versuch einer sauren Spaltung der Acetylgruppen oder der Einsatz anderer Schutzgruppen wie zum Beispiel OBn scheint hier sinnvoll zu sein. Die Spaltung der Bn-Gruppe unter hydrogenolytischen Bedingungen muss nicht durch Zusatz einer Base oder einer Säure erfolgen.

Zur Darstellung des O-Acetyl-blockierten β -D-Ribosyl-5-monophosphates **β -96** (Abb. 85 unten rechts) wurden die Fm-Gruppen unter Ausschluss von Feuchtigkeit mit Triethylamin in Acetonitril unter β -Eliminierung gespalten. Die erste Fm-Gruppe war bereits nach 30 Minuten abgespalten, wohingegen die zweite Gruppe 24 Stunden benötigte. Die Reinigung des Produktes **β -96** erfolgte mittels automatisierter RP-18 Säulenchromatographie. Das Produkt **β -96** wurde in einer sehr guten Ausbeute von 98% erhalten. Das ^{31}P -NMR-Spektrum des Produktes **β -96** (Abb. 89) zeigte, wie auch schon das Spektrum des Produktes α -**96**, dass dieses in hoher Reinheit erhalten wurde.

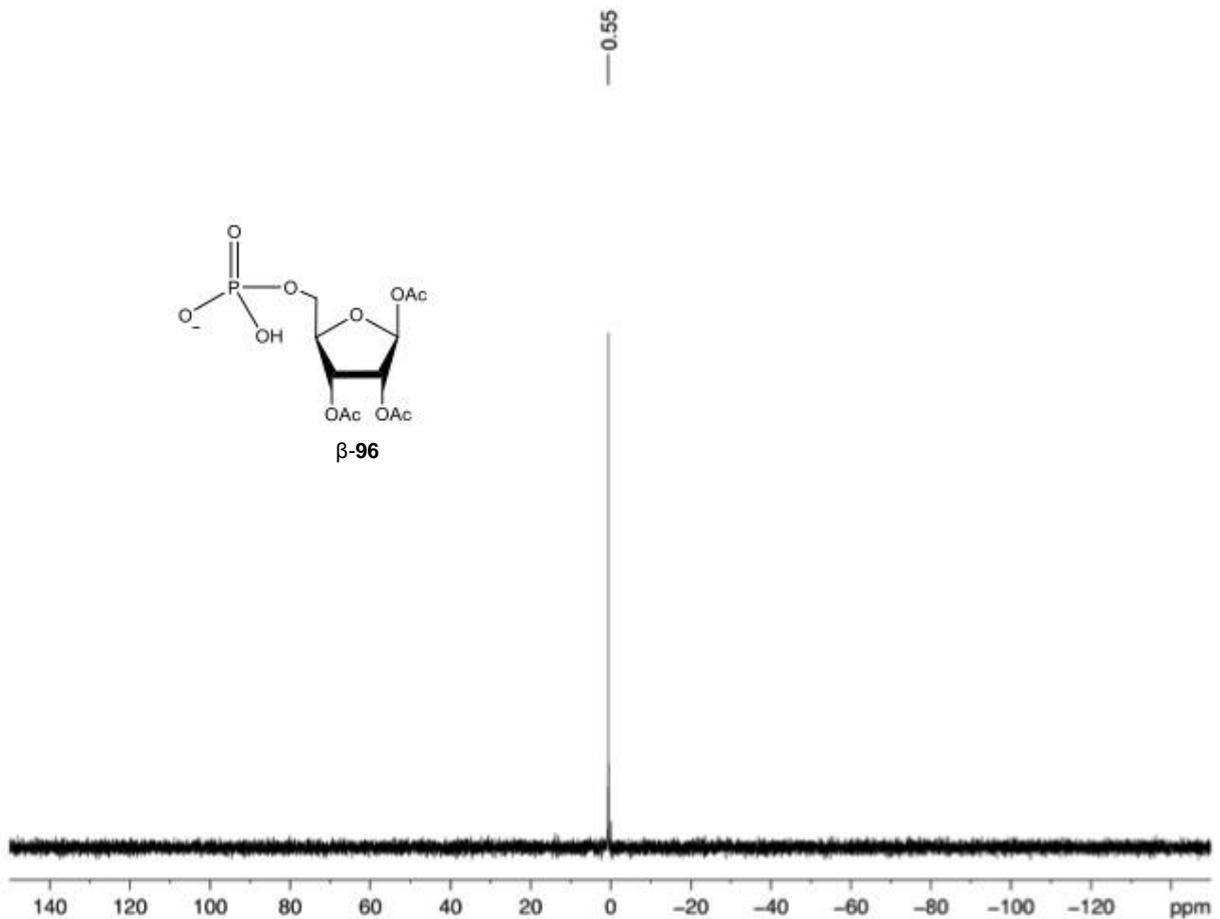


Abb. 89: ^{31}P -NMR-Spektrum von 1,2,3-Tri-O-acetyl- β -D-ribosyl-5-monophosphat **β -96**.

Im Vergleich zu der zuvor durchgeführten Synthese zur Darstellung des acetylierten Ribosephosphates α -**96** gelang auch die Synthese zur Darstellung des acetylierten β -Ribosephosphates β -**96** ohne Probleme. Die Darstellung der benötigten vollständig acetylierten, anomenreinen Zucker-5-phosphate α - und β -**96** gelang somit ausgehend von D-Ribose **93** über vier Stufen in guten bis sehr guten Ausbeuten. Nach der erfolgreichen Darstellung der benötigten Bausteine α - und β -**96** sowie des Phosphoramidites **95** konnte die Zielsynthese zur Darstellung von ^{C5}AB -ADP α - und β -R^{Ac} α - und β -**94** erfolgen.

4.4.1.5 Synthese von ^{C5}AB -ADP α - und β -R^{Ac} α - und β -**94**

In dem letzten Syntheseschritt erfolgten die Darstellungen von ^{C5}AB -ADP α - und β -R^{Ac} α - und β -**94** (Abb. 90) analog der Darstellung der vollständig blockierten Zuckerphosphate **103** und **104** (Abschnitt 4.4.1.4). Da die Verwendung eines Überschusses des Diamidites **90** bei der Darstellung des Amidites **88** zu großen Problemen bei der Reinigung führte (Abschnitt 4.4.1.2), wurde hier ein Überschuss des entsprechenden Zuckerphosphates α - oder β -**96** (1.1-1.3 Äquiv.) eingesetzt. Die vollständige Umsetzung des Phosphoramidites **95** war nach fünf bis zehn Minuten erreicht. Anschließend erfolgte die Oxidation des korrespondierenden Phosphits mit *tert*-Butylhydroperoxid. Die Reaktion war ebenfalls nach fünf Minuten abgeschlossen. Die Reinigung der Produkte α - und β -**94** erfolgte mittels automatisierter RP-18 Säulenchromatographie. ^{C5}AB -ADP α -R^{Ac} α -**94** wurde nach zweimaliger Reinigung in einer Ausbeute von 43% erhalten. Die Verbindung α -**94** lag als Diastereomerengemisch (1:1), bezogen auf die Konfiguration des Phosphates, welches die Pentanoyloxybenzyl-Gruppe trägt, vor.

Bei den folgenden Hydrolysestudien sollte für die Gewinnung erster Informationen zunächst nur eines der beiden Anomere untersucht werden. Die chemische Stabilität sowie die Hydrolyseprodukte sollten sich nicht unterscheiden. In den Hydrolysestudien wurde zunächst die Verbindung ^{C5}AB -ADP β -R^{Ac} β -**94** untersucht. Da sowohl eine chemische als auch eine enzymatische Hydrolysestudie durchgeführt werden sollte, ist anzumerken, dass die Konfiguration des anomeren Zentrums bei Verwendung eines Enzyms jedoch eventuell einen Einfluss auf die Substrateigenschaften der Verbindung α -**94** bzw. β -**94** hat.

Da aufgrund der Reaktionsbedingungen sowohl Triethylammonium als auch Diisopropylammonium als Gegenionen vorlagen, wurde ein Ionenaustausch auf Natriumionen bei dem Produkt ^{C5}AB -ADP β -R^{Ac} β -**94** durchgeführt. Das Produkt β -**94** wurde in einer Ausbeute von 56% erhalten. Die Verbindung β -**94** lag ebenfalls als Diastereomerengemisch (1:1), bezogen auf die Konfiguration des Phosphates, welches die Pentanoyloxybenzyl-Gruppe trägt, vor. Bei der folgenden enzymatischen Hydrolysestudie konnte aufgrund des eingesetzten Massendetektors kein Laufpuffer verwendet werden. Durch den Austausch der Gegenionen bei dem Produkt β -**94** (Na⁺-Ionen) sollte das Einbringen weiterer Gegenionen und eine daraus resultierende mögliche Verbreiterung der Signale verhindert werden.

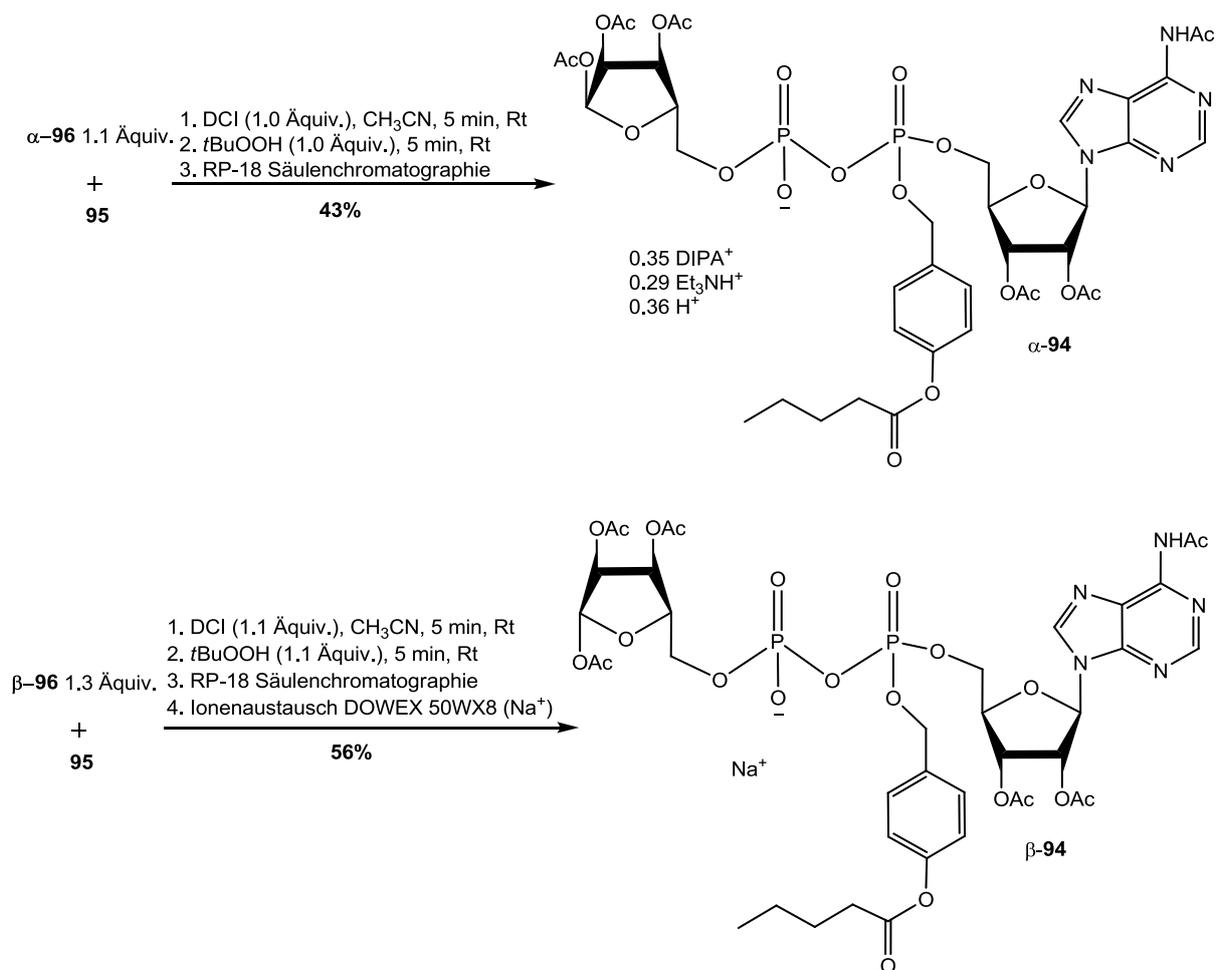


Abb. 90: Synthese von ^{C5}AB-ADP α - und - β -R^{Ac} α -94 (oben) und β -94 (unten).

Als Nebenprodukt wurde in beiden Fällen hauptsächlich eine Verbindung mit einer chemischen Verschiebung von 0.03 ppm im ³¹P-NMR-Spektrum isoliert. Anhand des dazugehörige ¹H-NMR-Spektrums konnte dieses Nebenprodukt als monomaskiertes, peracetyliertes AMP-Derivat **109** identifiziert werden.

Das ¹H-NMR- und das ³¹P-NMR-Spektrum der Verbindung ^{C5}AB-ADP α -R^{Ac} α -94 sind in der Abbildung 91 gezeigt. Anhand der Spektren ist zu erkennen, dass die Verbindung in hoher Reinheit und anomenrein erhalten werden konnte. Auch das ¹H-NMR- und das ³¹P-NMR-Spektrum des β -Derivates β -94 (Abb. 92) zeigen, dass diese Verbindung ebenfalls in hoher Reinheit und anomenrein dargestellt werden konnte. Die Signale der Gegenionen Triethylammonium und Diisopropylammonium wurden nicht mehr detektiert. Es wird daher davon ausgegangen, dass der Austausch der Gegenionen gegen Natriumionen erfolgreich war.

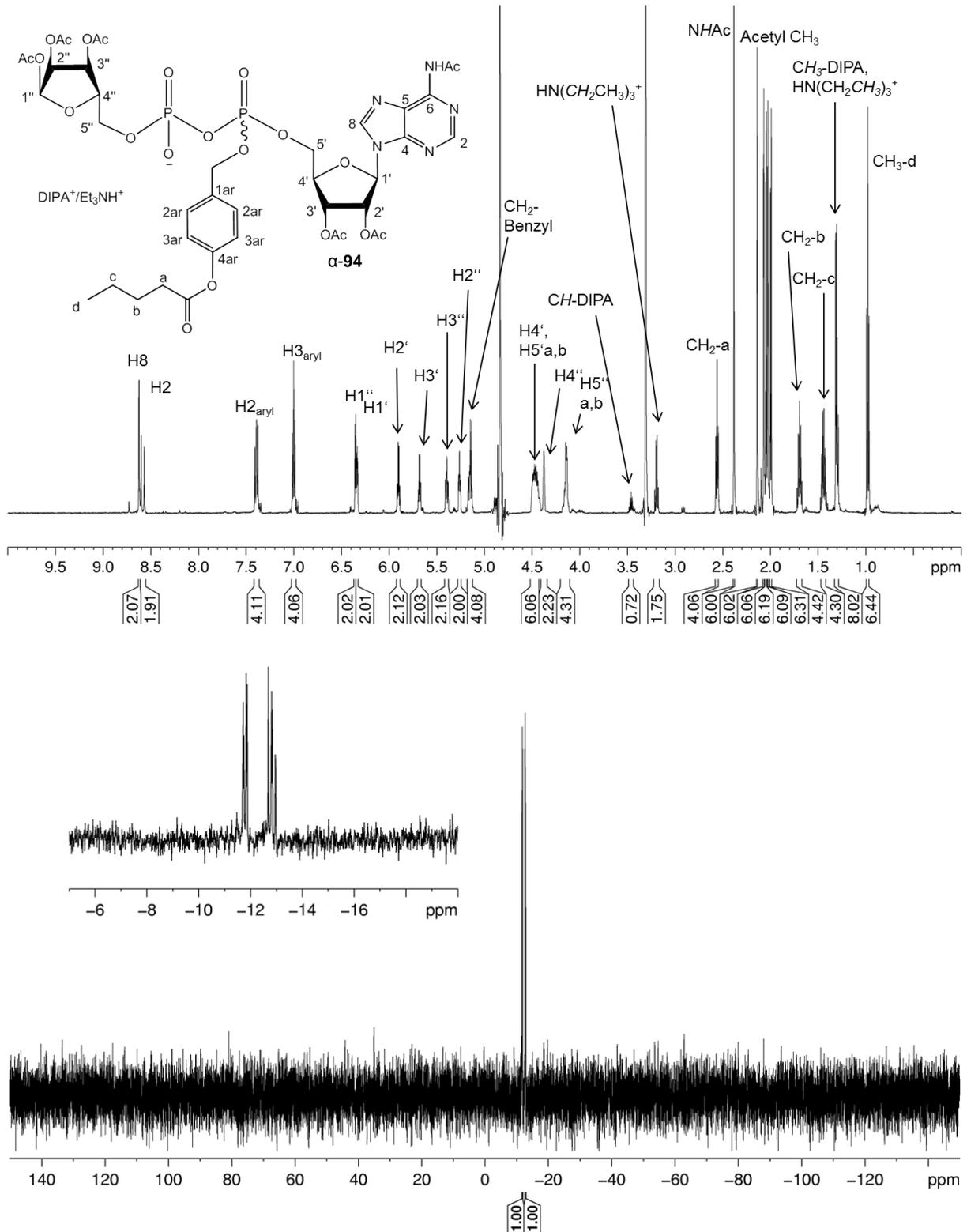


Abb. 91: ¹H-NMR-Spektrum (oben) und ³¹P-NMR-Spektrum (unten) von C_5 AB-ADP α -R^{Ac} α -94.

Resultate und Diskussion

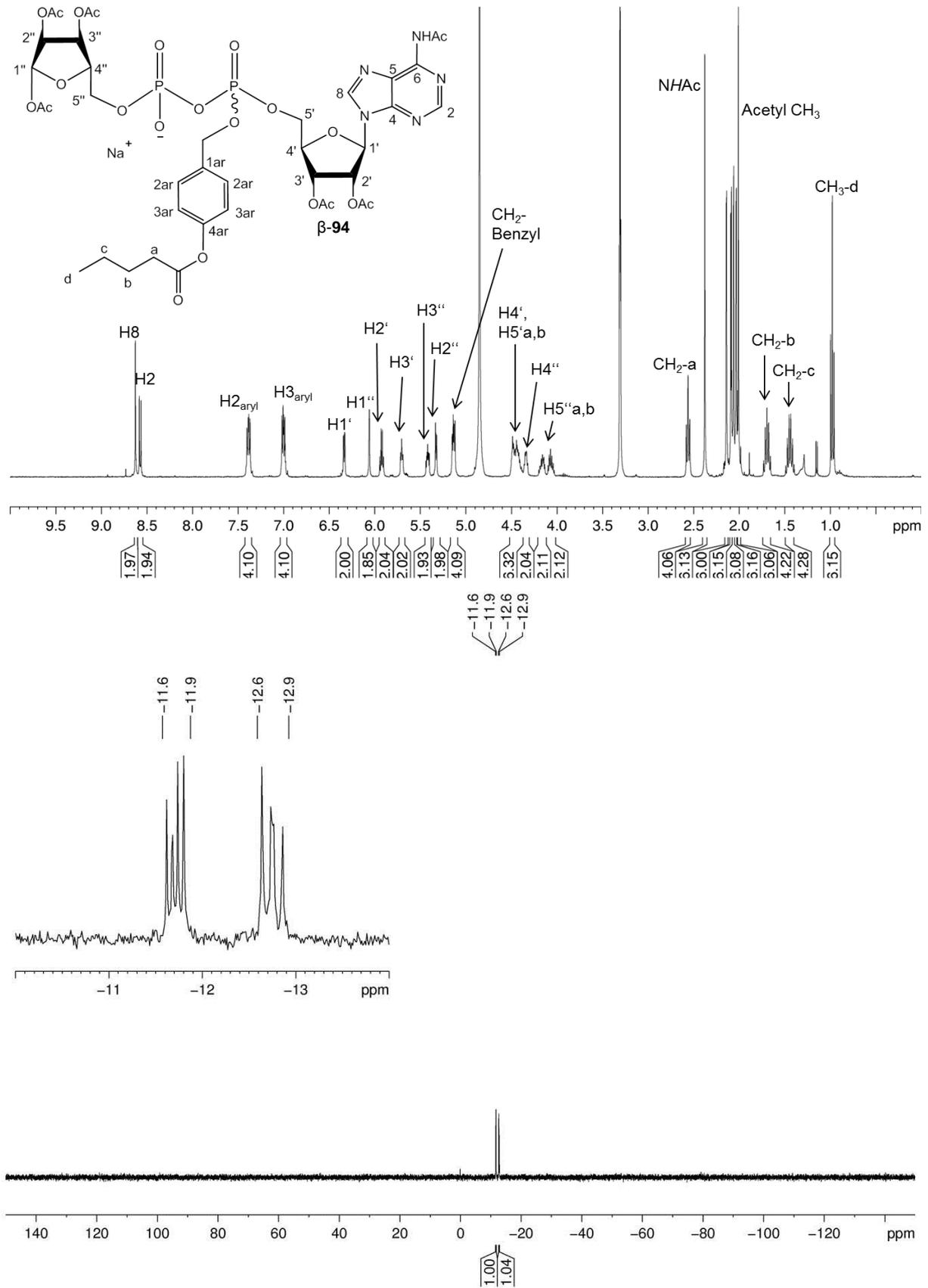


Abb. 92: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (oben) und $^{31}\text{P-NMR}$ -Spektrum (unten) von $\text{C}^5\text{AB-ADP}\beta\text{-R}^{\text{Ac}} \beta$ -94.

4.4.1.6 Fazit der entwickelten Syntheserouten

Für die Synthese des ^{C5}AB-ADPR-Derivates **87** war die Darstellung des Ribose-5-phosphates **89** nötig. Diese Synthese war jedoch aus noch nicht geklärten Gründen nicht möglich und somit auch nicht die Darstellung des Derivates **87**. Es besteht folglich noch Optimierungsbedarf bei der Entfernung der O-Acetylgruppen. Auch die Verwendung anders spaltbarer Gruppen, wie beispielsweise O-Benzyl, scheint sinnvoll. Zur Erhöhung der Stabilität könnte eventuell die Schützung der anomeren Position mit einer enzymatisch spaltbaren Gruppe sinnvoll sein. Dadurch würde möglicherweise ebenfalls die Darstellung anomerenreiner Verbindungen gelingen. Darüber hinaus war die Reinigung des Phosphoramidites **88** problematisch. Aus diesen Gründen wurde die Synthese des nicht-acetylierten ^{C5}AB-ADPR-Derivates **87** in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

Erfolgreich verlief hingegen auf dem entwickelten Syntheseweg die erstmalige Darstellung von anomerenreinen, lipophilen ADPR-Derivaten (^{C5}AB-ADP α - und - β -R^{Ac} α - und β -**94**). Die Verwendung einer konvergenten Syntheseroute unter Nutzung der Phosphoramiditchemie ermöglichte eine Synthese der Derivate α - und β -**94** aus dem nicht-symmetrischen Phosphoramidit **95** und dem entsprechenden 1,2,3-Tri-O-acetyl- α - bzw. - β -D-ribosyl-5-monophosphat α - bzw. β -**96** in einer guten Ausbeute von 43% beziehungsweise 56% in dem letzten Syntheseschritt. Hierbei wurde als Nebenprodukt hauptsächlich das monmaskierte peracetylierte AMP-Derivat **109** erhalten. Darüber hinaus ist anzunehmen, dass diese Syntheseroute auch zur Darstellung anderer lipophiler NDP-Zucker durch Austausch der Nucleobase und/oder des Zuckerrestes verwendet werden kann.

4.4.2 Hydrolysestudien des ^{C5}AB-ADP β -R^{Ac} β -**94**

Wie bereits in dem Abschnitt 4.4.1.5 erläutert, sollte zunächst nur eines der beiden Anomere untersucht werden. Das dargestellte ^{C5}AB-ADP β -R^{Ac} β -**94** wurde mit Hinblick auf die chemische Stabilität bei pH 7.3 in Phosphatpuffer und die Bildung von Hydrolyseprodukten in chemischen und enzymatischen Hydrolysestudien analysiert. Als Enzym wurde auch wie bei den CMP-Neu5Ac-Derivaten **27** und **74** (Abschnitt 4.2.4) PLE verwendet. Aufgrund der eingesetzten O- und N-Acetylschutzgruppen wurde sowohl eine Esterase als auch eine Amidase zur Spaltung aller Gruppen benötigt. Die verschiedenen Isoenzyme der PLE können, wie bereits in dem Abschnitt 4.2.4 erläutert, mit unterschiedlichem Grad an Substratselektivität sowohl als Esterasen als auch Amidasen fungieren. Eine zentrale Frage der enzymatischen Hydrolysestudie war somit, ob die ^{C5}AB-Maskeneinheit an dem α -Phosphat und auch alle Acetylschutzgruppen durch das Enzym gespalten werden würden.

4.4.2.1 Chemische Hydrolyse in phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline, PBS*)

Um Informationen über die chemische Stabilität des ADPR-Derivates $C^5AB-ADP\beta-R^{Ac} \beta-94$ zu erhalten, wurde eine ^{31}P -NMR-Hydrolysestudie in 50 mM Phosphatpuffer (PBS) bei physiologischem pH-Wert (pH 7.3) durchgeführt. Die zentrale Frage hier war, ob die Phosphatanhydridbindung unter diesen Bedingungen stabil ist. Für die chemische Hydrolysestudie wurde $C^5AB-ADP\beta-R^{Ac} \beta-94$ in $DMSO-d_6$ gelöst und die Hydrolyse durch Zugabe des Puffers gestartet. Die Hydrolyse wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen verfolgt. Die Proben wurden während der Hydrolyse bei Raumtemperatur gelagert. Die Hydrolysestudie zeigte, dass $C^5AB-ADP\beta-R^{Ac} \beta-94$ unter den gewählten Bedingungen sehr stabil war (Abb. 93). Auch nach sieben Tagen wurden noch 20% $C^5AB-ADP\beta-R^{Ac} \beta-94$ bezogen auf das Verhältnis von $C^5AB-ADP\beta-R^{Ac} \beta-94$ zu den gebildeten Hydrolyseprodukten detektiert.

Aus den erhaltenen Daten kann daher geschlossen werden, dass die zentrale Voraussetzung für weitere Studien erfüllt war, da $C^5AB-ADP\beta-R^{Ac} \beta-94$ bei pH 7.3 sehr stabil ist.

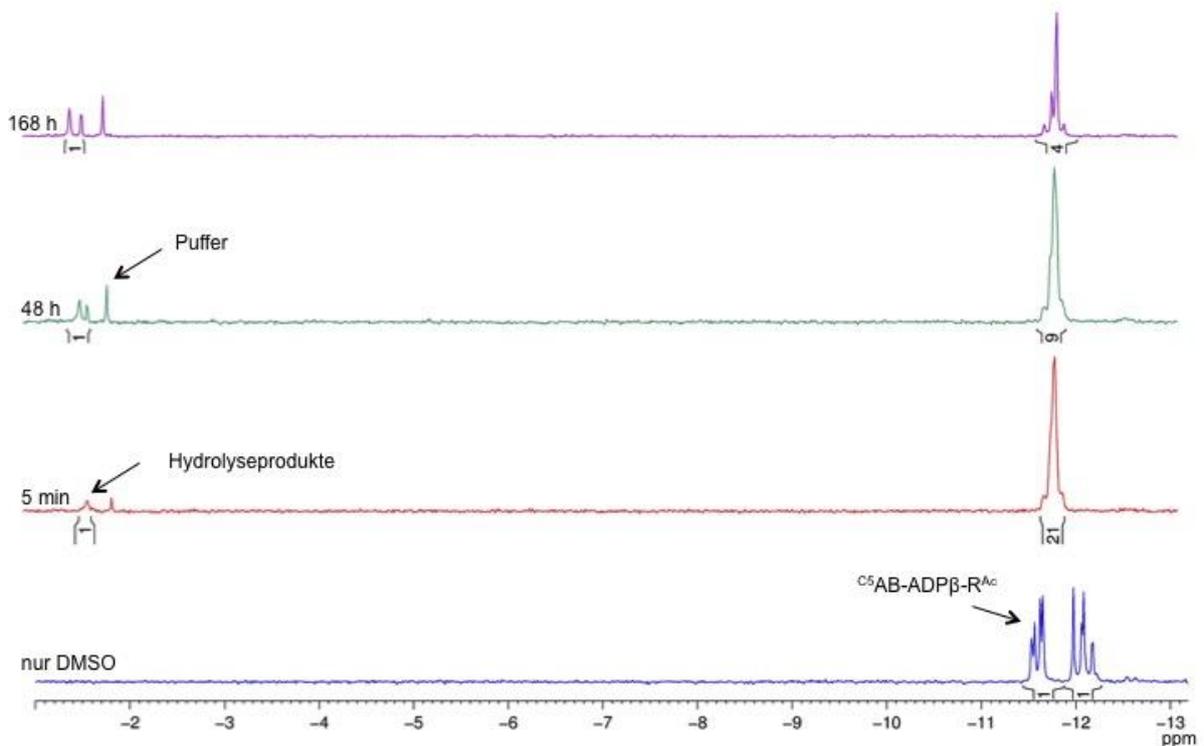


Abb. 93: ^{31}P -NMR Hydrolysestudie in PBS mit $C^5AB-ADP\beta-R^{Ac} \beta-94$.

4.4.2.2 Enzymatische Hydrolysestudien

Durch die enzymatische Hydrolysestudie mit PLE sollte herausgefunden werden, ob ADPR **21** aus dem Derivat C^5AB -ADP β -R Ac β -**94** freigesetzt werden würde. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die C^5AB -Maske an dem α -Phosphat relativ schnell durch das Enzym gespalten werden würde. Diese Untersuchung wurde analog zu der enzymatischen Hydrolyse der Verbindungen ^{Ac}CMP -Neu5Ac COOMe **27** und ^{Ac}CMP -Neu5Ac COOAM **74** (Abschnitt 4.2.4) durchgeführt. Es wurden auch hier ESI⁺- und auch ESI⁻-Messungen durchgeführt. Allerdings enthielten die ESI⁺ Daten mehr relevante Informationen bezogen auf die Detektion von gebildeten Intermediaten. Zusätzlich wurden auch hier extrahierte Ionenchromatogramme zur Identifikation von Intermediaten herangezogen. Da bei dem verwendeten System ein *single quad detector* verwendet wurde, wurde bei Bedarf hochauflösende Massenspektrometrie eingesetzt. Diese Messungen wurden in Zusammenarbeit mit M. Riedner, Massenspektrometrie-Abteilung der MIN-Fakultät der Universität Hamburg, durchgeführt. Die Hydrolyse wurde über einen Zeitraum von sieben Tage verfolgt. Die erste Messung wurde nach 30 Minuten durchgeführt. Weitere Messungen erfolgten nach 1, 2, 4, 6 und 24 Stunden. Anschließend erfolgte alle 24 Stunden eine weitere Messung. Es wurde erwartet, dass die C^5AB -Maske und nach und nach auch die sechs Acetylenschutzgruppen abgespalten werden würden, so dass ADPR **21** freigesetzt werden würde. In Tabelle 2 (Seite 122) sind die Ausgangsverbindung C^5AB -ADP β -R Ac β -**94** sowie erwartete Intermediate und ADPR **21** aufgelistet.

Die Analyse bei t_0 zeigte, dass C^5AB -ADP β -R Ac β -**94** mittels UV-Detektion (HPLC-Chromatogramm Abb. 94 oben) analysiert werden konnte und eine Detektion mittels Massenspektrometrie (Massenspektrum Abb. 94 unten) möglich war. Die erhaltenen Massenspektren wurden immer aus der entsprechenden gesamten Peakfläche (UV-Chromatogramm) generiert. C^5AB -ADP β -R Ac β -**94** hat eine Retentionszeit von 8.3 Minuten. Die detektierten Massen $m/z = 1001.9, 1024.0, 1039.9, 1045.9$ konnten als $[M+H]^+, [M+Na]^+, [M+K]^+$ und $[M-H+2Na]^+$ der Verbindung β -**94** zugeordnet werden.

Es wurden bereits in dieser Probe in sehr geringem Maße erste Hydrolyseprodukte detektiert, die vermutlich bereits während der Probenaufarbeitung entstanden waren. Es konnten das Intermediat II (gespalten: C^5AB -Maske + 2 Acetylgruppen) und das Intermediat III (gespalten: C^5AB -Maske + 3 Acetylgruppen) in dieser Probe detektiert werden (Abb. 94 extrahiertes Ionenchromatogramm bei $m/z = 728.1$ bzw. bei $m/z = 686.1$). Des Weiteren bestätigen diese extrahierten Ionenchromatogramme die chemischen Formeln und die berechneten Massen der Intermediate II und III. Erstaunlicherweise war die Retentionszeit des Intermediates II fast identisch mit der der Ausgangsverbindung C^5AB -ADP β -R Ac β -**94**. Aus diesem Grund konnte diesem Intermediat keine Retentionszeit zugeordnet werden. Das erwartete Intermediat I (gespalten: C^5AB -Maske + 1 Acetylgruppe) wurde

mit dieser Methode nicht eindeutig detektiert (Abb. 94 extrahiertes Ionenchromatogramm bei $m/z = 770.1$), da ein schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis erhalten wurde. Der kleine Peak mit einer Retentionszeit von 7.5 Minuten (HPLC-Chromatogramm) konnte dem Intermediat III zugeordnet werden. Der zweite kleine Peak mit einer Retentionszeit von 5.0 Minuten enthält keine relevanten Massen und wurde, wie bereits in dem Abschnitt 4.2.4.2 beschrieben, ebenfalls in einer Referenzprobe detektiert, welche nur PBS, PLE und DMSO enthielt.

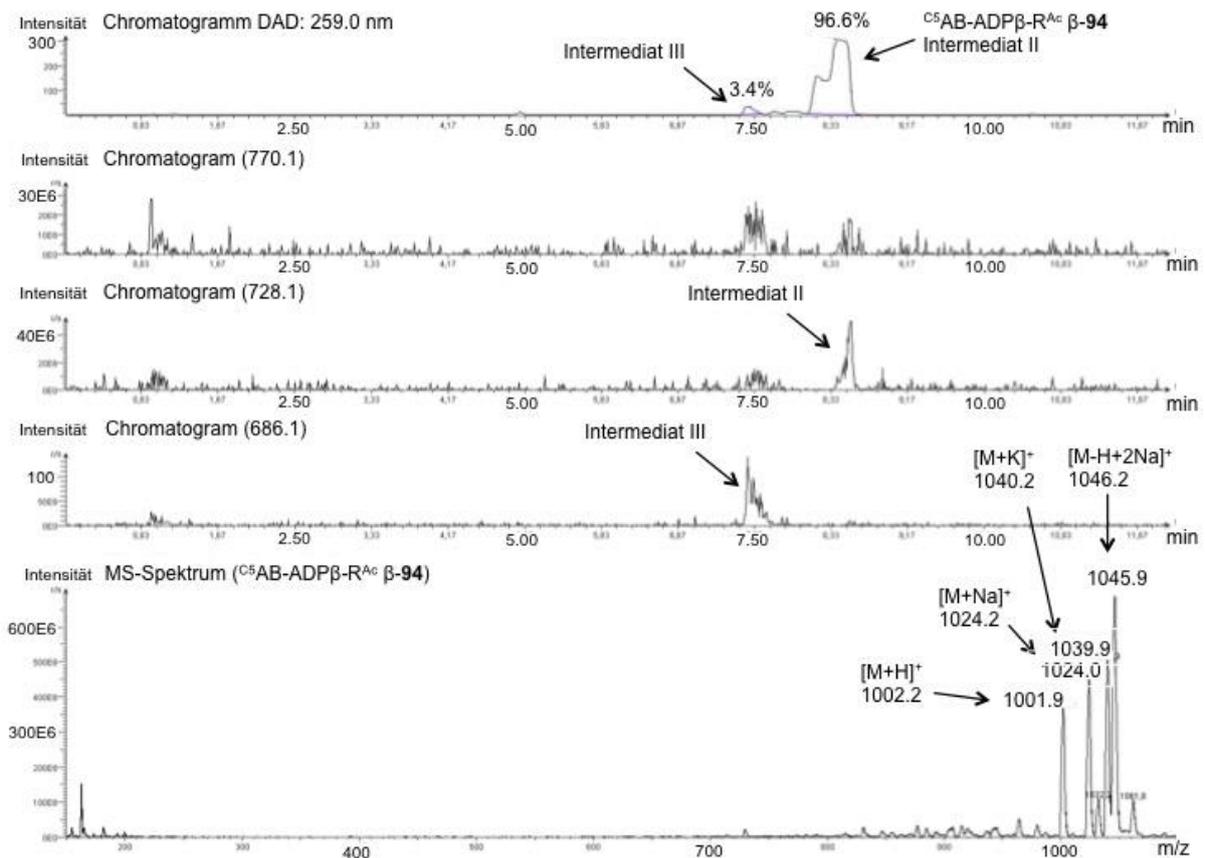


Abb. 94: Analyse von $C^5AB-ADP\beta-R^{Ac} \beta-94$ bei t_0 ; HPLC-Chromatogramm (oben), extrahierte Ionenchromatogramme bei $m/z = 770.1$, bei $m/z = 728.1$ und bei $m/z = 686.1$ (mittig) und ESI⁺-MS-Spektrum (unten), (HPLC-Methode C, 259 nm).

Nach einer Inkubationszeit mit PLE von 30 Minuten zeigte sich (Abb. 95), dass weiterhin die Intermediate II und III detektiert wurden. Das Intermediat I wurde auch hier nicht eindeutig detektiert, da ebenfalls ein schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis (Abb. 95 extrahiertes Ionenchromatogramm bei $m/z = 770.1$) erhalten wurde. Die Intermediate II und III (Abb. 95 extrahiertes Ionenchromatogramm bei $m/z = 728.1$ bzw. bei $m/z = 686.1$) konnten mit einer besseren Intensität als bei der Analyse bei t_0 detektiert werden. Zusätzlich wurde eine prozentuale Zunahme der Peakfläche des Intermediates III ermittelt. Dies lässt auf eine gesteigerte Bildung dieser Intermediate schließen. Das ESI⁺-MS-Spektrum der gesamten Peakfläche des Intermediates III (Abb. 95 MS-Spektrum unten) zeigt, dass verschiedene

Addukte erhalten wurden. Die detektierten Massen $m/z = 685.6$, 707.6 und 724.1 konnten als $[\text{Int. III}+\text{H}]^+$, $[\text{Int. III}+\text{Na}]^+$ und $[\text{Int. III}+\text{K}]^+$ dem Intermediat III zugeordnet werden. Die Masse mit $m/z = 961.8$ konnte keinem Intermediat zugeordnet werden. Diese Analyse zeigte, dass zu diesem Zeitpunkt zu einem geringen Teil die C^5AB -Maske und drei Acetylschutzgruppen gespalten worden waren. Allerdings wurde immer noch hauptsächlich $\text{C}^5\text{AB-ADP}\beta\text{-R}^{\text{Ac}}\beta\text{-94}$ detektiert.

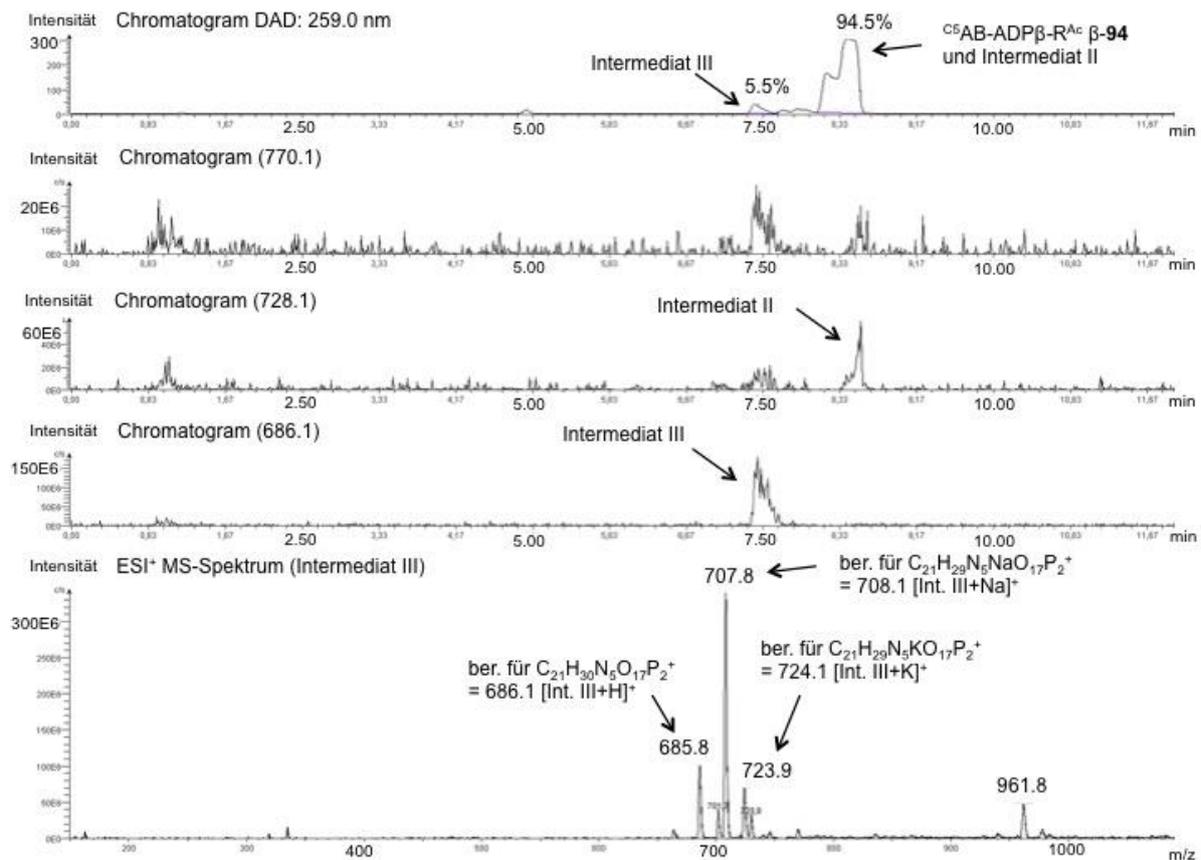


Abb. 95: Enzymatische Hydrolysestudie von $\text{C}^5\text{AB-ADP}\beta\text{-R}^{\text{Ac}}\beta\text{-94}$ nach 30 Minuten; HPLC-Chromatogramm (oben), extrahierte Ionenchromatogramme bei $m/z = 770.1$, bei $m/z = 728.1$ und bei $m/z = 686.1$ (mittig) und ESI⁺-MS-Spektrum des Intermediates III (unten), (HPLC-Methode C, 259 nm).

Die Analyse nach 2 Stunden zeigte, dass das Intermediat I (Abb. 96 extrahiertes Ionenchromatogramm $m/z = 770.1$) weiterhin nicht detektiert werden konnte. Es wurden auch hier die Intermediate II und III und hauptsächlich $\text{C}^5\text{AB-ADP}\beta\text{-R}^{\text{Ac}}\beta\text{-94}$ (Abb. 96) detektiert. Weitere Intermediate, wie beispielsweise das Intermediat IV (gespalten: C^5AB -Maske + 4 Acetylgruppen), wurden nicht detektiert (Abb. 96 extrahiertes Ionenchromatogramm bei $m/z = 644.1$).

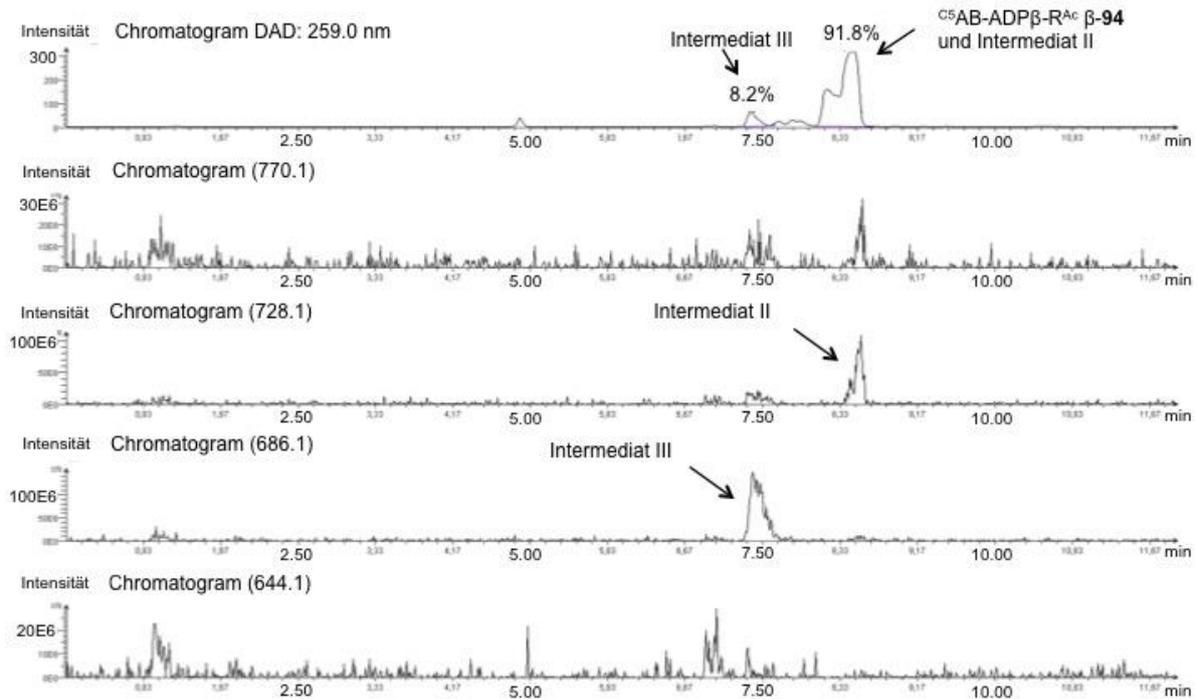


Abb. 96: Enzymatische Hydrolysestudie von $C^5AB-ADP\beta-R^{Ac} \beta-94$ nach 2 Stunden; HPLC-Chromatogramm (oben), extrahierte Ionenchromatogramme bei $m/z = 770.1$, bei $m/z = 728.1$, bei $m/z = 686.1$ und bei $m/z = 644.1$, (HPLC-Methode C, 259 nm).

Die folgenden Analysen nach 4 und 6 Stunden zeigten keine signifikanten Veränderungen. Lediglich die prozentuale Verteilung der Peakflächen veränderte sich nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden bei $C^5AB-ADP\beta-R^{Ac} \beta-94$ und dem Intermediat II von 94.5% auf 85.3% und die des Intermediates III von 5.5% auf 14.7%.

Das HPLC-Chromatogramm, welches nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden erhalten wurde (Abb. 97 oben), zeigte, dass zwei weitere Verbindungen gebildet worden waren: Intermediat IV mit einer Retentionszeit von 6.9 Minuten und Intermediat V (gespalten: C^5AB -Maske + 5 Acetylgruppen) mit einer Retentionszeit von 6.5 Minuten. Die drei extrahierten Ionenchromatogramme (Abb. 97, extrahierte Ionenchromatogramme bei $m/z = 686.1$, bei $m/z = 644.1$ und bei $m/z = 602.1$) zeigen, dass die berechneten Massen für die Intermediate III-V als $[Int.+H]^+$ des entsprechenden Intermediates gefunden wurden. Das Intermediate I konnte weiterhin nicht detektiert werden. Erstaunlicherweise wurde auch das Intermediat II nicht mehr detektiert, obwohl die Ausgangsverbindung $\beta-94$ noch in der Lösung vorhanden war.

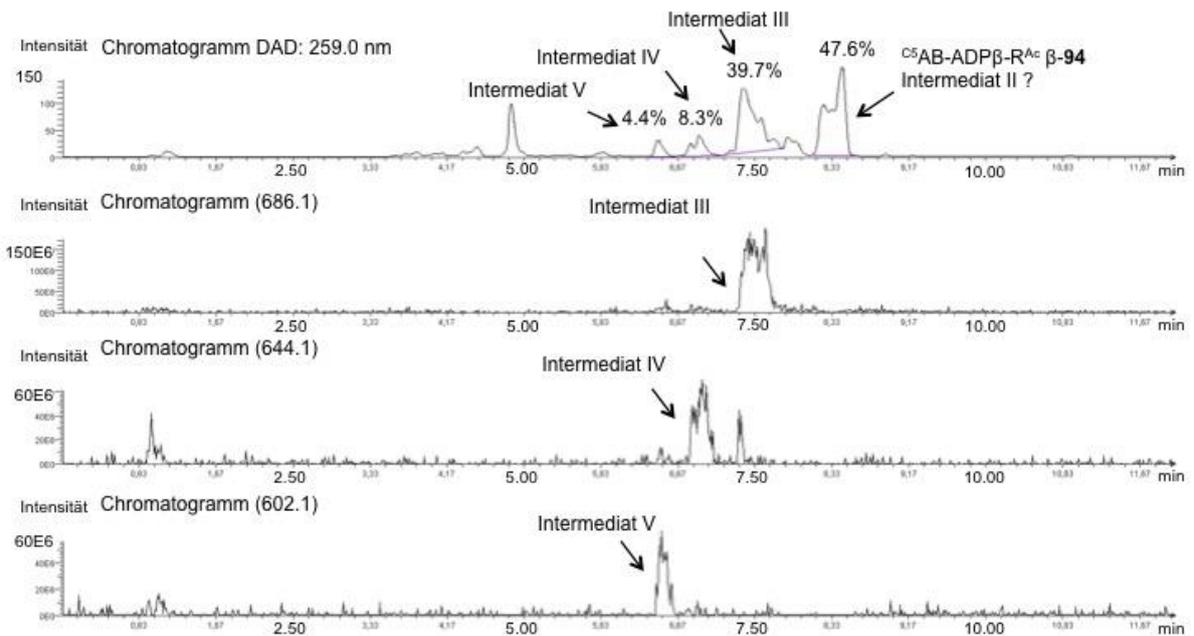


Abb. 97: Enzymatische Hydrolysestudie von $C^5AB-ADP\beta-R^{Ac} \beta-94$ nach 24 Stunden; HPLC-Chromatogramm (oben), extrahierte Ionenchromatogramme bei $m/z = 686.1$, bei $m/z = 644.1$ und bei $m/z = 602.1$, (HPLC-Methode C, 259 nm).

Das HPLC-Chromatogramm nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden mit PLE zeigte (Abb. 98 oben), dass ein sehr kleiner fünfter Peak bei 6.2 Minuten detektiert wurde. Dieser konnte ADPR **21** zugeordnet werden. Die extrahierten Ionenchromatogramme bei $m/z = 602.1$ und bei $m/z = 560.1$ entsprachen den berechneten Massen des Intermediat V als $[Int\ V.+H]^+$ und ADPR **21** als $[M+H]^+$. Das Massenspektrum (Abb. 98 unten) wurde sowohl über den gesamten Bereich der Peakfläche des Intermediates V als auch über den gesamten Bereich der Peakfläche von ADPR **21** generiert. Somit konnten beide Verbindungen in diesem Spektrum detektiert werden. Dies ermöglichte für das Intermediat V die Zuordnung mehrerer Adduktionen. Die detektierten Massen bei $m/z = 602.1$, 623.5 und 639.5 konnten als $[Int. V+H]^+$, $[Int. V+Na]^+$ und $[Int. V+K]^+$ dem Intermediat V zugeordnet werden. Des Weiteren konnte die gefundene Masse bei $m/z = 560.3$ als $[M+H]^+$ dem vollständig entschützten ADPR **21** zugeordnet werden. In diesem Fall wurden keine Addukte detektiert. Die Intermediate I und II konnten weiterhin nicht bzw. nicht mehr mittels Massenspektrometrie detektiert werden. Allerdings wurde immer noch das Startmaterial $C^5AB-ADP\beta-R^{Ac} \beta-94$ mittels ESI⁺-Massenspektrometrie detektiert. Warum die Intermediate I und II nicht bzw. nicht mehr detektiert wurden, obwohl weiterhin $C^5AB-ADP\beta-R^{Ac} \beta-94$ in der Lösung vorhanden war, konnte nicht geklärt werden. Eine Möglichkeit wäre, dass diese Intermediate schnell von dem Enzym zu dem Intermediat III umgesetzt werden.

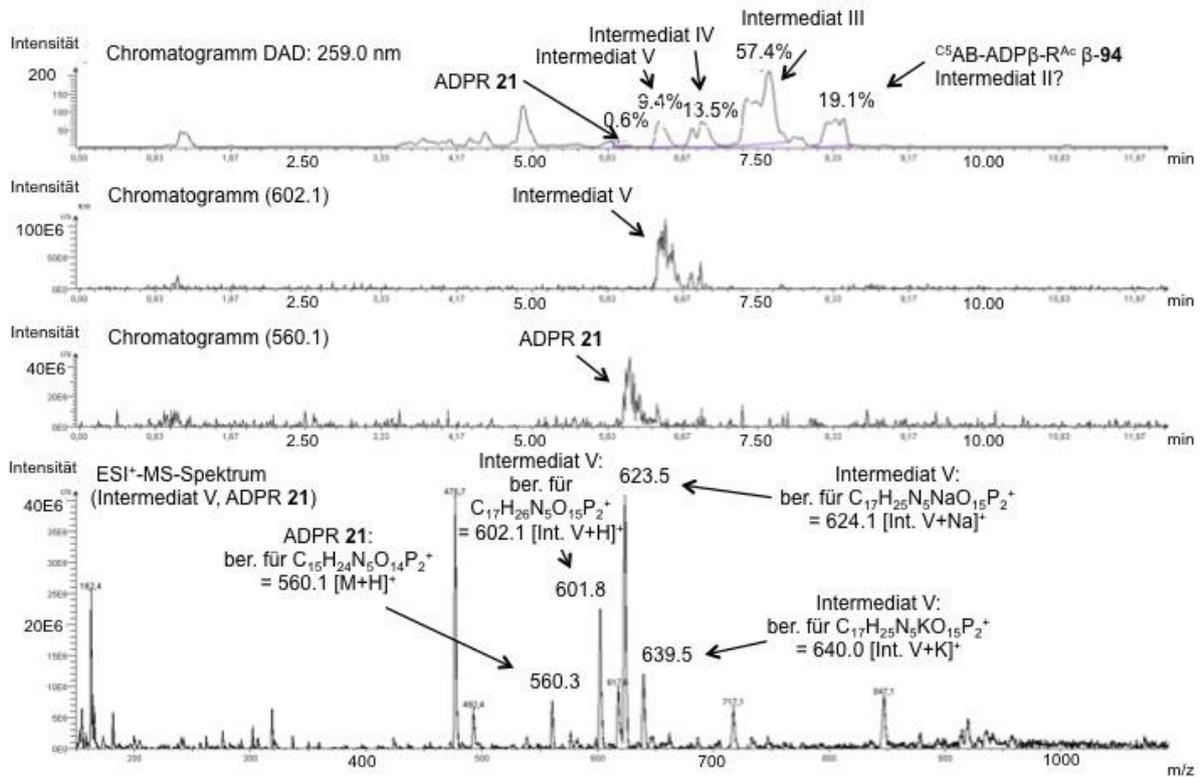


Abb. 98: Enzymatische Hydrolysestudie von C⁵AB-ADPβ-R^{Ac} β-94 nach 72 Stunden; HPLC-Chromatogramm (oben), extrahierte Ionenchromatogramme bei m/z = 602.1 und bei m/z = 560.1 (mittig) und ESI⁺-MS-Spektrum des Intermediates V und ADPR 21 (unten), (HPLC-Methode C, 259 nm).

Auch nach einer Inkubationszeit von 120 Stunden mit PLE wurden immer noch C⁵AB-ADPβ-R^{Ac} β-94 sowie die Intermediate III-V und ADPR 21 detektiert (HPLC-Chromatogramm Abb. 99). Die Intermediate I und II wurden auch in dieser Probe nicht bzw. nicht mehr detektiert. Im Verhältnis konnte ADPR 21 weiterhin nur mit einer geringen Intensität detektiert werden. Jedoch lässt die prozentuale Zunahme der Peakfläche auf eine fortlaufende Bildung von ADPR 21 schließen.

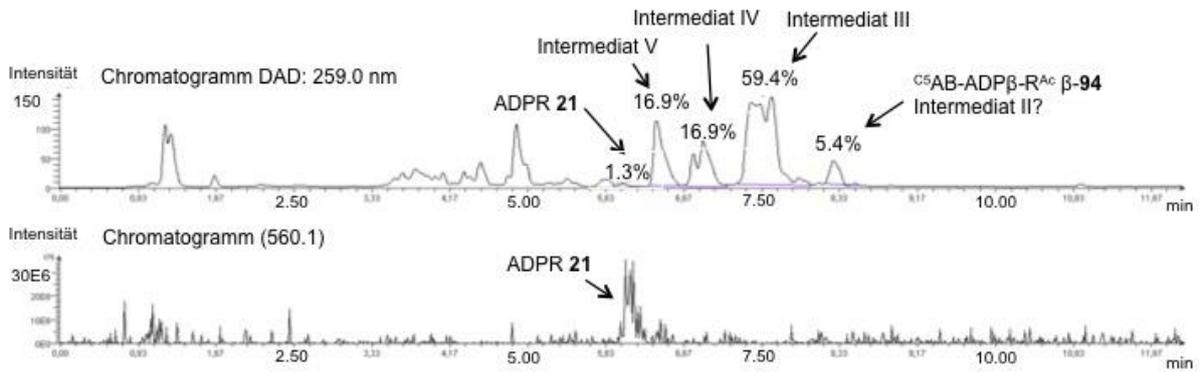


Abb. 99: Enzymatische Hydrolysestudie von $C^5AB-ADP\beta-R^{Ac} \beta-94$ nach 120 Stunden; HPLC-Chromatogramm (oben), extrahiertes Ionenchromatogramme bei $m/z = 560.1$ (unten), (HPLC-Methode C, 259 nm).

$C^5AB-ADP\beta-R^{Ac} \beta-94$ war nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen mit PLE schließlich nahezu vollständig umgesetzt. Es konnte zudem eine weitere leichte Zunahme der Peakfläche von ADPR 21 auf 1.5% beobachtet werden (Abb. 100).

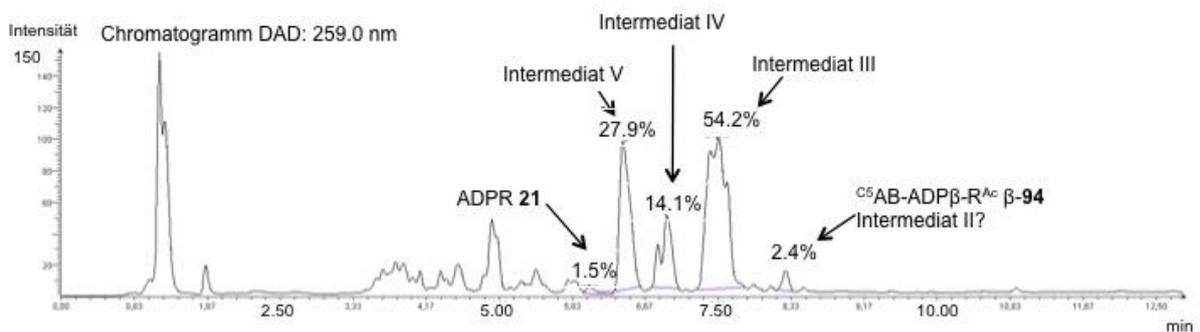


Abb. 100: Enzymatische Hydrolysestudie von $C^5AB-ADP\beta-R^{Ac} \beta-94$ nach 7 Tagen; HPLC-Chromatogramm, (HPLC-Methode C, 259 nm).

Da bei dieser Methode ein *single quad detector* zur Generierung der Massenspektren verwendet wurde, erfolgte eine weitere Analyse der Inkubationslösungen mittels hochauflösender Massenspektrometrie. Die erhaltenen hochauflösenden Massen von $C^5AB-ADP\beta-R^{Ac} \beta-94$, von den Intermediaten I-V und von ADPR 21 sind in der Tabelle 2 aufgelistet. Mit dieser Methode war auch die Detektion des Intermediates I möglich.

Tab. 2: Erhaltene hochauflösende Massen von $^{C5}AB\text{-ADP}\beta\text{-R}^{Ac}\beta\text{-94}$ sowie der erwarteten Intermediate I-V und ADPR **21** aus den Hydrolyselösungen.

Startmaterial und Hydrolyseprodukte	berechnet	gefunden (HRMS)
$^{C5}AB\text{-ADP}\beta\text{-R}^{Ac}\beta\text{-94}$	$C_{39}H_{50}N_5O_{22}P_2^+$ 1002.2417 [M+H] ⁺	1002.2429 [M+H] ⁺
Intermediat I (gespalten: $^{C5}AB\text{-Maske} + 1$ Acetylgruppe)	$C_{25}H_{34}N_5O_{19}P_2^+$ 770.1318 [Int. I+H] ⁺	770.1315 [Int. I+H] ⁺
Intermediat II (gespalten: $^{C5}AB\text{-Maske} + 2$ Acetylgruppen)	$C_{23}H_{32}N_5O_{18}P_2^+$ 728.1212 [Int. II+H] ⁺	728.1212 [Int. II +H] ⁺
Intermediat III (gespalten: $^{C5}AB\text{-Maske} + 3$ Acetylgruppen)	$C_{21}H_{30}N_5O_{17}P_2^+$: 686.1106 [Int. III+H] ⁺	686.1103 [Int. III +H] ⁺
Intermediat IV (gespalten: $^{C5}AB\text{-Maske} + 4$ Acetylgruppen)	$C_{19}H_{28}N_5O_{16}P_2^+$: 644.1001 [Int. IV +H] ⁺	644.0998 [Int. IV +H] ⁺
Intermediat V (gespalten: $^{C5}AB\text{-Maske} + 5$ Acetylgruppen)	$C_{17}H_{26}N_5O_{15}P_2^+$: 602.0895 [Int. V +H] ⁺	602.1595 [Int. V +H] ⁺
ADPR 21	$C_{15}H_{24}N_5O_{14}P_2^+$: 560.0789 [M+H] ⁺	560.1113 [M+H] ⁺

Die enzymatische Hydrolysestudie wurde zur Untersuchung der Bildung von ADPR **21** aus dem Derivat $^{C5}AB\text{-ADP}\beta\text{-R}^{Ac}\beta\text{-94}$ durchgeführt. Des Weiteren wurde überprüft, ob die $^{C5}AB\text{-Maske}$ relativ schnell durch das Enzym PLE gespalten wurde. Die erhaltenen Daten zeigen, dass beide Punkte erfüllt wurden. Es wurden sowohl ADPR **21** gebildet, als auch eine relativ schnelle Spaltung der $^{C5}AB\text{-Maske}$ beobachtet. Es wurden keine Intermediate detektiert, bei denen die Maske nach den Acetylgruppen gespalten wurde. Da nach einer Inkubationszeit von sieben Tagen mit PLE $^{C5}AB\text{-ADP}\beta\text{-R}^{Ac}\beta\text{-94}$ fast vollständig umgesetzt war, kann davon ausgegangen werden, dass die Maske vollständig von dem Ausgangsmaterial gespalten wurde. Die Hydrolyserate der Abspaltung der Acetylgruppen war langsamer als angenommen. Es wurde daher eine zweite Hydrolysestudie mit einer höheren Konzentration an PLE durchgeführt. In diesem Fall wurde die Hydrolysestudie mit 2 μL einer PLE-Lösung (3 mg/mL mit 27 u/mg) in PBS (pH 7.3) durchgeführt. Die Proben wurden nach 5, 7 und 10 Tagen analysiert. Es wurde festgestellt, dass die höhere Konzentration an PLE

kaum einen Einfluss auf die Hydrolyserate hatte. Als Konsequenz sollten eventuell ein anderes Enzym oder auch andere Estergruppen getestet werden. Beispielsweise wurden bereits erfolgreich *Isopropylester*, *Pivalinsäureester* oder *Pivaloyloxymethylester* als lipophile Gruppen eingesetzt. Es ist berichtet, dass diese ebenfalls (schnell) durch Esterasen gespalten werden.^[88] Dennoch wurde anhand der durchgeführten Hydrolyse gezeigt, dass erfolgreich ADPR **21** aus der Verbindung C^5AB -ADP β -R^{Ac} β -**94** freigesetzt wurde.

4.4.2.3 Fazit der Hydrolysestudien und Ausblick

Die chemische Stabilitätsstudie in PBS bei physiologischem pH-Wert zeigte, dass 20% der Verbindung C^5AB -ADP β -R^{Ac} β -**94** auch nach sieben Tagen noch detektiert werden konnten. Anhand der durchgeführten enzymatischen Hydrolysestudie konnte gezeigt werden, dass ADPR **21** erfolgreich aus der Verbindung C^5AB -ADP β -R^{Ac} β -**94** freigesetzt wurde. Diese Ergebnisse bestätigten, dass die enzymlabile Pentanoyloxybenzyl-Gruppe relativ schnell von der Ausgangsverbindung β -**94** gespalten wurde, da keine Intermediate detektiert wurden, bei denen die C^5AB -Maske nach den Acetylgruppen gespalten wurde. Die Acetylgruppen erwiesen sich überraschenderweise im Vergleich zu der Pentanoyloxybenzyl-Gruppe als stabiler (Abb. 101). Alle gebildeten Hydrolyseprodukte wurden zusätzlich mittels HR-MS detektiert.

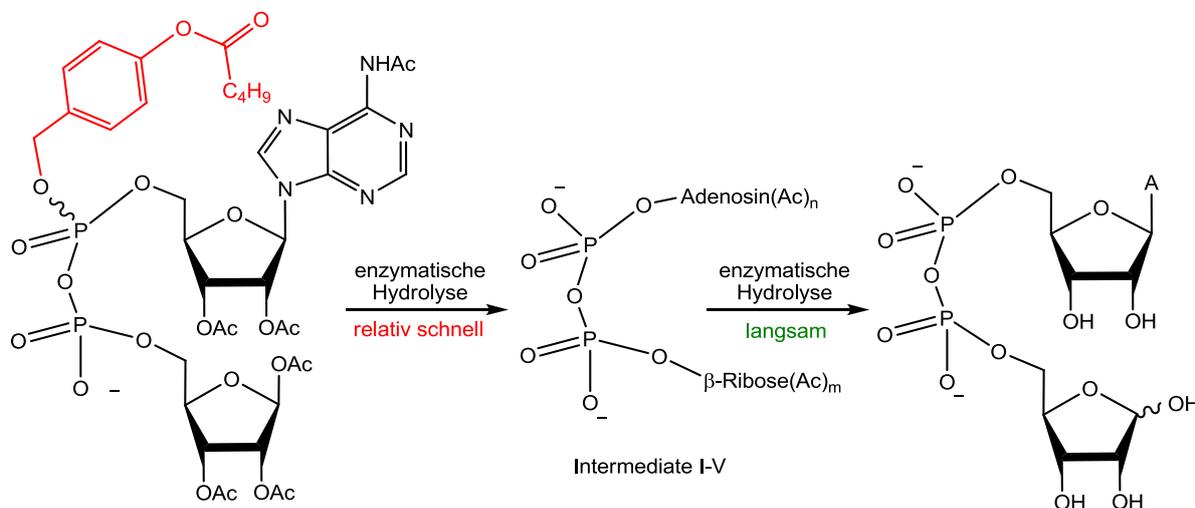


Abb. 101: Schematische Zusammenfassung des Hydrolyseverlaufes der Verbindung C^5AB -ADP β -R^{Ac} β -**94**.

Insgesamt kann gesagt werden, dass C^5AB -ADP α - und - β -R^{Ac} α - und β -**94**, welche jeweils die Maskeneinheit nur an dem α -Phosphat tragen, erfolgreich dargestellt werden konnten. Des Weiteren wurde ADPR **21** aus der Verbindung C^5AB -ADP β -R^{Ac} β -**94** durch enzymatische Hydrolyse freigesetzt. Die relativ schnelle Abspaltung der C^5AB -Maskeneinheit und die Bildung von ADPR **21** (wenn auch langsam) durch PLE lassen die Schlussfolgerung zu, dass

sowohl die Erweiterung der DiPPro/TriPPro-Konzepte als auch die Darstellung einer lipophilen Verbindung für potentielle TRPM2-Studien erfolgreich waren.

In weiterführenden Arbeiten sollte zunächst getestet werden, ob eventuell die α -Verbindung α -**94** besser umgesetzt wird als die β -Verbindung β -**94**. Nach der Spaltung der ^{C5}AB-Maske sowie der Acetylgruppen sollte, wie einleitend bereits erwähnt, die gleiche Verbindung entstehen. Eventuell hat die Konfiguration des anomeren Zentrums jedoch einen Einfluss auf die Substrateigenschaften der Verbindung α -**94** bzw. β -**94**. Des Weiteren sollte getestet werden, ob die Verwendung einer anderen Esterase eine schnellere Hydrolyserate ergibt. Möglicherweise sind auch andere Esterfunktionen besser als Acetylschutzgruppen geeignet. Darüber hinaus sollten Hydrolysestudien in Zellextrakten durchgeführt werden. Eventuell sind bei solch einer Hydrolysestudie die Acetylschutzgruppen unproblematisch, da im Zellextrakt eine Vielzahl von Esterasen vorliegen. Um als potentielles neues Tool für TRPM2-Studien genutzt werden zu können, sollten ebenfalls Zellaufnahmestudien durchgeführt werden. Auch die Weiterentwicklung der Syntheseroute zur Darstellung von ^{C5}AB-ADPR **87** sollte fortgesetzt werden, da erfolgreich ADPR **21** aus dem Derivat β -**94** freigesetzt wurde.

5. Experimenteller Teil

5.1 Allgemeines

5.1.1 Edukte und Reagenzien

Die Edukte und Reagenzien wurden von den Firmen Acros Organics, Alfa Aesar, Fluka, Glen Research, Grüssing GmbH, Link Technologies, Molekula, Proligo, Sigma-Aldrich, TCI, Tenova Pharmaceuticals und VWR in Synthesequalität bezogen und, ausgenommen der folgenden Chemikalien, ohne weitere Reinigung in den Synthesen eingesetzt.

N,N-Diisopropylethylamin: $C_8H_{19}N$; Sdp: 127 °C; mehrere Tage unter Rückfluss über Calciumhydrid getrocknet und bei Normaldruck unter Stickstoff destilliert.

Phosphor(III)-chlorid: Sdp: 76 °C; unter Stickstoff destilliert.

Triethylamin: $C_6H_{15}N$; Sdp: 89 °C, mehrere Tage unter Rückfluss über Calciumhydrid getrocknet und bei Normaldruck unter Stickstoff destilliert.

5.1.2 Lösungsmittel

Die folgenden Lösungsmittel Ethylacetat, Petrolether 50-70, Methanol und Dichlormethan wurden in technischer Qualität bezogen und vor der Verwendung unter Normaldruck destilliert. Diethylether wurde ebenfalls in technischer Qualität erhalten und vor der Verwendung bei 900 mbar destilliert und über KOH gelagert.

Für die NMR-Spektroskopie wurden deuterierte Lösungsmittel von euriso-top und Deutero verwendet und bei hydrolyselabilen und oxidationsempfindlichen Substanzen über Molsieb gelagertes deuteriertes Chloroform. Im Fall von säurelabilen Substanzen wurde das Chloroform zuvor über basisches Aluminiumoxid filtriert.

5.1.2.1 Absolute Lösungsmittel

Acetonitril: C_2H_3N ; Sdp: 81 °C; wurde i) mehrere Tage unter Rückfluss über Calciumhydrid erhitzt, bei Normaldruck unter Stickstoff destilliert und über Molsieb (0.3 nm) gelagert oder ii) über eine Lösungsmitteltrocknungsanlage, SPS-800 der Firma mBraun Inertgas-Systeme GmbH, absolutiert und über Molsieb (0.3 nm) aufbewahrt. Hierbei wurde Acetonitril - CHROMASOLV® von Sigma-Aldrich verwendet.

- Dichlormethan:* CH_2Cl_2 ; Sdp: 40 °C; i) mehrere Tage unter Rückfluss über Calciumhydrid erhitzt, bei Normaldruck unter Stickstoff destilliert und über Molsieb (0.4 nm) gelagert oder ii) über eine Lösungsmitteltrocknungsanlage, SPS-800 der Firma mBraun Inertgas-Systeme GmbH, absolutiert und über Molsieb (0.4 nm) aufbewahrt. Hierbei wurde Dichlormethan - CHROMASOLV[®] mit Amylen als Stabilisator von Sigma-Aldrich verwendet.
- Diethylether:* $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$; Sdp: 34 °C; i) mehrere Tage unter Rückfluss über Natrium erhitzt, bei Normaldruck unter Stickstoff destilliert und über Molsieb (0.4 nm) gelagert oder ii) über eine Lösungsmitteltrocknungsanlage, SPS-800 der Firma mBraun Inertgas-Systeme GmbH, absolutiert und über Molsieb (0.4 nm) aufbewahrt. Hierbei wurde Diethylether, ACS reagent, von Sigma-Aldrich verwendet.
- N,N-Dimethylformamid:* wurde von VWR (max. 0.005% H_2O) über Molsieb bezogen.
- Methanol:* wurde von Acros (max. 0.005% H_2O) über Molsieb bezogen.
- Pyridin:* wurde i) von Sigma-Aldrich (max. 0.005% H_2O) über Molsieb bezogen oder
ii) über eine Lösungsmitteltrocknungsanlage, SPS-800 der Firma mBraun Inertgas-Systeme GmbH, absolutiert und über Molsieb (0.4 nm) aufbewahrt. Hierbei wurde Pyridin, ACS reagent, von Sigma-Aldrich verwendet.
- Tetrahydrofuran:* wurde i) mehrere Tage unter Rückfluss über Kalium erhitzt, bei Normaldruck unter Stickstoff destilliert und über Molsieb (0.4 nm) gelagert oder
ii) über eine Lösungsmitteltrocknungsanlage, SPS-800 der Firma mBraun Inertgas-Systeme GmbH, absolutiert und über Molsieb (0.4 nm) aufbewahrt. Hierbei wurde Tetrahydrofuran - CHROMASOLV[®] Plus, von Sigma-Aldrich verwendet.
- Toluol:* wurde von Acros (max. 0.005% H_2O) über Molsieb bezogen.

5.1.3 Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie:

Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator (ALUGRAM Xtra SIL G/UV254; Schichtdicke 0.2 mm) der Firma Merck oder der Firma Macherey-Nagel (DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄) verwendet. Alle R_f -Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt. Die Detektion der UV-aktiven Substanzen erfolgte mit einer UV-Lampe der Firma Konrad Benda bei einer Wellenlänge von 254 nm. Ebenfalls erfolgte eine Detektion aller Substanzen durch Eintauchen in ein Färbereagens (10%ige Schwefelsäure) und anschließender Wärmebehandlung. Freie Amine wurden durch Besprühen mit einer Ninhydrin-Lösung (100 mg Ninhydrin gelöst 10 mL Ethanol) visualisiert.

Zirkuläre präparative Dünnschichtchromatographie (Chromatotron):

Um Rohausbeuten von maximal 4 g zu trennen, wurde ein Chromatotron der Firma Harrison Research, Modell 7924 T verwendet. 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 Substanzen erfolgte mit einer UV-Lampe der Firma Konrad Benda bei einer Wellenlänge von 254 nm. Zur Herstellung der Kieselgel-beschichteten Platten wurde eine Suspension des gipshaltigen Kieselgels in 4 °C-kaltem demineralisiertem Wasser (1 mm-Platten: 45 g und 100 mL, 2 mm-Platten: 70 g und 140 mL, 4 mm-Platten: 120 g und 240 mL) hergestellt. Diese wurde auf die Platten gegossen und durch Wellenbewegungen gleichmäßig verteilt. Nach dem Aushärten (drei Tage an einem kühlen, dunklen Ort) wurde das überschüssige Kieselgel mit entsprechendem Werkzeug abgetragen bis die gewünschte Schichtdicke erreicht war. Die Platten wurden mehrfach verwendet. Nach jeder Benutzung erfolgte ein Spülen mit Methanol.

Präparative Säulenchromatographie:

Die säulenchromatographischen Reinigungen wurden an MN Kieselgel 60 (230-400 mesh, 0.040-0.063 nm) der Firma Macherey-Nagel durchgeführt.

Umkehrphasenchromatographie:

Für die Umkehrphasenchromatographie wurde LiChroprep RP-18 (40-63 µm, Merck) eingesetzt.

Ionenaustausch an DOWEX-Na⁺

Das Ionenaustauscherharz Dowex 50W-X8 H⁺, 50-100 mesh, der Firma Sigma-Aldrich wurde zum Austausch der Kationen auf Natriumionen mit dem 5-fachen Säulenvolumen

einer 1 M Natronlauge gespült. Nachfolgend wurde mit Reinstwasser gespült bis ein neutraler pH-Wert erreicht war. Die entsprechende Verbindung wurde in Reinstwasser oder Reinstwasser/Acetonitril 7:3 v/v aufgetragen und mit dem entsprechenden Laufmittel von der Säule eluiert. Zur Regeneration wurde wieder mit Natronlauge gespült.

Automatisierte reversed phase- (RP-)Chromatographie

Für automatisierte Umkehrphasenchromatographie (RP-18) wurde der automatisierte puriFlash[®]430 der Firma Interchim mit UV-Detektor und RP-Säulen von Macherey-Nagel (Chromabond[®] Flash RS 40 C₁₈ ec) verwendet.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC)

Die analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde an einer HPLC der Firma VWR-Hitachi (Pumpe L-2130, Autosampler L-2260, Säulenofen L-2300, DAD 2455, Software EZChrom Elite) durchgeführt. Es wurde Acetonitril von VWR (HPLC grade) sowie Milli-Q-Wasser (s. S. 132 Wasseraufbereitungsanlage) verwendet.

Methode A:

Von 0-20 min: Wasser mit einem Acetonitril-Gradienten (5-100%), von 20-26 min: isokratisch (100% CH₃CN), von 26-30 min: Wasser mit einem Acetonitril-Gradienten (100-5%), von 30-35 min: isokratisch (95% H₂O). Flussrate 1.0 mL/min, Säulenofentemperatur 25 °C, UV Detektion bei 272 nm. Es wurde eine Säule der Firma Macherey-Nagel (Nucleodur 100-5 C₁₈ ec) verwendet.

HPLC gekoppelt mit Massenspektrometrie

Die HPLC-MS Analysen wurden an einer Agilent 1260 Infinity (Pumpe G1311B, Autosampler G1329B, Säulenfach G1316A, DAD G4221B) gekoppelt mit einem single-quad MS der Firma Advion expression^l CMS (Software Advion Data Express) und an einer Dionex Ultimate 3000 UPLC (UHPLC) gekoppelt mit einem Bruker maXis ESI-Q-TOF (Software Bruker DataAnalysis 4.2) durchgeführt. Es wurde eine Säule der Firma Agilent Poroshell (120 EC-C18 2.7 µm, 4.6 x 50 mm) verwendet. Als Laufmittel wurde Acetonitril von VWR (HPLC grade) sowie Milli-Q-Wasser (s. S. 132 Wasseraufbereitungsanlage) eingesetzt.

Methode B:

Von 0-15 min: Wasser mit einem Acetonitril-Gradienten (0-100%), von 15-20 min: isokratisch (100% CH₃CN), von 20-22 min: Wasser mit einem Acetonitril-Gradienten (100-0%), von 22-27 min: isokratisch (100% H₂O). Flussrate 0.5 mL/min, Säulenofentemperatur 20 °C, UV

Detektion bei 272 nm, MS-Scans 150-1100 m/z, Scanzeit 271, Scangeschwindigkeit 3506 m/z/sec.

Methode C:

Von 0-15 min: Wasser mit einem Acetonitril-Gradienten (2-98%), von 15-20 min: isokratisch (98% CH₃CN), von 20-22 min: Wasser mit einem Acetonitril-Gradienten (98-2%), von 22-27 min: isokratisch (98% H₂O). Flussrate 0.5 mL/min, Säulenofentemperatur 20 °C, UV Detektion bei 259 nm, MS-Scans 150-1100 m/z, Scanzeit 271, Scangeschwindigkeit 3506 m/z/sec.

5.1.4 Spektroskopie

Kernresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance NMR-Spektroskopie)

Die NMR-Spektren wurden in der NMR-Abteilung des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg unter der Leitung von Dr. Thomas Hackl und Dr. Young-Joo Lee aufgenommen.

Die Messung erfolgte an den folgenden Spektrometern der Firma Bruker: Avance I 400 MHz, Avance II 400 MHz, DMX 500 MHz, Avance III 600 MHz.

Die Kalibrierung zur Ermittlung der chemischen Verschiebungen der Signale (¹H/¹³C) erfolgte anhand der Lösungsmittelsignale [CHCl₃ 7.26/77.16 (in CDCl₃); DMSO 2.50/39.52 (in DMSO-*d*₆), MeOH 3.31/49.00 (in CD₃OD), H₂O 4.79 (in D₂O)]. Die Verschiebungen der ³¹P-NMR-Signale wurden gegen einen externen Standard (85%ige Phosphorsäure) angegeben.

Für die Zuordnung der Signale wurden ¹H,¹H- sowie ¹H,¹³C-Korrelationsspektren (H,H-COSY, HSQC und HMBC) aufgenommen. Die NMR-Spektren wurden soweit möglich als Spektren 1. Ordnung ausgewertet.

Infrarotspektroskopie (IR):

An einem ALPHA Platinum ATR-IR-Spektrometer der Firma Bruker wurden die IR-Spektren aufgenommen. Die Messungen erfolgten in einem Messbereich von 400 - 4000 cm⁻¹.

5.1.5 Spektrometrie

Massenspektrometrie (MS):

Die Massenspektren wurden in der Massenspektrometrie-Abteilung des Fachbereiches Chemie der MIN-Fakultät der Universität Hamburg unter der Leitung von Dr. Maria Riedner aufgenommen.

An einem Agilent 6224 Accurate-Mass TOF-Spektrometer der Firma Agilent Technologies wurden die hochaufgelösten ESI-Massenspektren im positiven bzw. negativen Modus gemessen.

Polarimetrie

Die Drehwerte der anomerenreinen Zucker wurden an einem Optronic Polarimeter der Firma Krüss gemessen. Die Messung erfolgte bei 25 °C, einer Wellenlänge von 589 nm und einer Küvettenlänge von 1 dm.

5.1.6 Weitere Geräte

Gefriertrocknungsanlage

Zur Trocknung von wässrigen Lösungen wurde eine Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 LDplus mit einem vertikalen Trockenrechen (121224) der Firma Christ verwendet.

Mikrowelle

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

Wasseraufbereitungsanlage

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

Schmelzpunktbestimmung:

Für die Ermittlung der Schmelzpunkte wurde ein Schmelzpunkt-Messgerät IA 9200 Schmelzpunktbestimmungsgerät der Firma Electrothermal verwendet.

pH-Messgerät

Zur pH-Wert Kontrolle während Reaktionen wurde das pH-Messgerät ProLab 3000 der Firma Schott eingesetzt.

Thermomixer

Zur Inkubation der Hydrolyselösungen wurde ein Thermomixer comfort der Firma Eppendorf verwendet.

Zentrifuge

Es wurde eine Zentrifuge Heraeus Primo R Centrifuge der Firma Thermo Scientific bei Raumtemperatur und 8000 u/min verwendet.

5.2 Synthesen

5.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

AAV 1: Synthese von vollständig geschützten Nucleosiden bzw. Glycopyranosen

Unter Inertgasatmosphäre wurden 1.0 Äquiv. des Nucleosids/Zuckers zunächst dreimal mit abs. Pyridin coevaporiert und anschließend in abs. Pyridin (4.5 mL pro mmol Nucleosid/Zucker) gelöst bzw. suspendiert. Zu der Lösung wurden 1.3 Äquiv. *tert*-Butyldimethylsilylchlorid gegeben und der Reaktionsansatz wurde 11-20 h bei Rt gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Im Fall von Nucleosiden mit einem Elutionsgemisch aus CH₂Cl₂/CH₃OH 7:4 v/v und im Fall von Zuckern mit CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1 v/v. Nach vollständiger Umsetzung des Eduktes wurde Essigsäureanhydrid (3 Äquiv. pro Hydroxyl- / Aminofunktion) dazugegeben und der Reaktionsansatz weitere 3-20 h bei Rt gerührt. Die vollständige Umsetzung wurde ebenfalls dünnschichtchromatographisch mit EE bei Nucleosiden und mit PE/EE 2:1 v/v bei Zuckern überprüft. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand 3x mit Toluol und mehrere Male mit CH₂Cl₂ coevaporiert. Der Rückstand wurde in EE aufgenommen und 2x mit H₂O und ebenfalls 2x mit einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel mit EE als Eluent bei den Nucleosiden. Die erste säulenchromatographische Reinigung der Zucker erfolgte mit PE/EE 2:1 v/v und die zweite Reinigung mit PE/EE 3:1 v/v.

AAV 2: Spaltung von *tert*-Butyldimethylsilylethern

Es wurden 1.0 Äquiv. des zu spaltenden Silylethers in CH₂Cl₂ gelöst und die Lösung mit 6.0 Äquiv. Et₃N*3HF versetzt. Der Reaktionsansatz wurde ca. 20 h bei Rt gerührt. Die Reaktionsverfolgung erfolgte dünnschichtchromatographisch mit CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1 v/v oder EE bei Nucleosiden und mit PE/EE 1:1 v/v oder EE bei Zuckern. Nach der vollständigen Umsetzung des Eduktes wurde zum Abbruch der Reaktion etwas Kieselgel zu dem Reaktionsansatz gegeben. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel, im Fall von Nucleosiden mit EE/CH₃OH (9:1 v/v bzw. 4:1 v/v) und im Fall von Zuckern mit EE als Eluent gereinigt.

AAV 3: Darstellung von *cycloSal*-Triestern

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurde 1.0 Äquiv. des zu veresternden Nucleosids zunächst 2 h im Ölpumpenvakuum getrocknet und dann in abs. CH₃CN gelöst. Die Lösung wurde auf -20 °C gekühlt und bei dieser Temperatur wurde DIPEA (2.0 Äquiv.) dazugegeben. Anschließend wurden 2.0 Äquiv. 5-Nitro-*cycloSal*igenylchlorphosphit **53** gelöst in abs. CH₃CN zu dem Reaktionsansatz getropft. Dieser wurde bei Rt bis zur vollständigen Umsetzung des Nucleosids gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch mit CH₂Cl₂/CH₃OH (9:1 v/v). Der Reaktionsansatz wurde erneut auf -20 °C gekühlt und mit Oxone® (4.0 Äquiv.) gelöst in wenig kaltem H₂O versetzt. Nach vollständigem Umsatz wurde der Rückstand in EE aufgenommen und zweimal mit kaltem H₂O gewaschen. Die organische Phase wurde sofort über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in CH₂Cl₂ aufgenommen und unlösliche Bestandteile wurden durch Filtration entfernt. Das Lösungsmittel wurde erneut unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wurde in CH₃CN/H₂O aufgenommen und gefriergetrocknet. Die Reinigung erfolgte dünnschichtchromatographisch mit CH₂Cl₂/CH₃OH (9:1 v/v) + 0.3% Essigsäure als Eluent.

AAV 4: Acetylierung von Glycopyranosen

Die zu acetylierende Verbindung (1.0 Äquiv.) wurde in Pyridin gelöst und bei 0 °C langsam mit 3.0 Äquiv. Essigsäureanhydrid (pro Hydroxylgruppe) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde für ca. 20 h bei Rt gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch mit PE/EE (1:1 v/v) bei Galactose-Derivaten und mit EE bei Neuraminsäure-Derivaten. Nach der vollständigen Umsetzung des Eduktes wurde das Lösungsmittel entfernt und mehrere Male mit Toluol coevaporiert. Anschließend wurde der Rückstand in EE aufgenommen und zweimal mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und H₂O gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch.

AAV 5: Darstellung von 2-Chlor-*N*-Acetylneuraminsäurederivaten

Bei 0 °C wurden 1.0 Äquiv. des entsprechenden *N*-Acetylneuraminsäurederivates in Acetylchlorid (8.5 mL pro mmol Zucker) gelöst und mit abs. CH₃OH (170 µL pro mmol Zucker) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde bei Rt für 20-70 h in einer geschlossenen Reaktionsapparatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt und der erhaltene farblose Rückstand dreimal mit Toluol, fünfmal mit CH₂Cl₂ coevaporiert und anschließend gründlich im Vakuum getrocknet.

AAV 6: Substitution von Chlor gegen Hydroxyl am anomeren Zentrum von *N*-Acetylneuraminsäurederivaten

Die Reaktion wurde in einem mit Aluminiumfolie abgedunkeltem Reaktionsgefäß durchgeführt. Es wurden 1.0 Äquiv. des entsprechenden Chlor-*N*-AcetylneuraminsäureDerivates in einem Gemisch aus Aceton und demineralisiertem H₂O (4:1 v/v) gelöst. Zu der Reaktionslösung wurden 3.0 Äquiv. Silbercarbonat gegeben und diese für 1-3 h bei Rt gerührt (DC: PE/Aceton 1:1 v/v). Die Suspension wurde über Celite filtriert, mit Aceton gewaschen und das Lösungsmittel im Membranpumpenvakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel entweder mit PE/Aceton 1:1 v/v oder EE/CH₃OH 98:2 v/v als Eluent.

AAV 7: Darstellung von 5-*N*-Acyl modifizierten Neuraminsäure-Derivaten

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 1.0 Äquiv. des Thioglycosids **83** zunächst einmal mit abs. CH₃OH coevaporiert und anschließend in abs. CH₃OH gelöst. Zu der Lösung wurden 9.0 Äquiv. Methansulfonsäure gegeben und der Reaktionsansatz wurde für 24 h bei 60 °C gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch mit CH₂Cl₂/CH₃OH 5:3 v/v. Die Detektion des freien Amins erfolgte durch Besprühen mit einer Ninhydrinlösung. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurde diese mit abs. Et₃N neutralisiert und dann ins basische überführt. Anschließend wurden bei 0 °C 1.8 Äquiv. des entsprechenden Carbonsäureanhydrids dazugegeben und der Reaktionsansatz wurde für 2 h bei dieser Temperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte ebenfalls dünnschichtchromatographisch mit CH₂Cl₂/CH₃OH 5:3 v/v. Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand 1 h getrocknet. Abschließend wurde dieser in abs. Pyridin gelöst und mit 12 Äquiv. Essigsäureanhydrid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 20 h bei Rt gerührt und dünnschichtchromatographisch verfolgt (EE). Nach vollständiger Umsetzung des Eduktes wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand dreimal mit Toluol coevaporiert. Anschließend wurde das Rohprodukt in EE aufgenommen und einmal mit 1 M HCl und zweimal mit H₂O gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Membranpumpenvakuum entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung erfolgte an Kieselgel mit EE als Eluent.

AAV 8: Spaltung des Thioglycosids von modifizierten Neuraminsäurederivaten

Es wurden 1.0 Äquiv. des entsprechenden Thioglycosids in einem Gemisch aus Aceton/H₂O (70:1) gelöst und mit 2.3 Äquiv. NBS versetzt. Nach 2.5 h Reaktionszeit bei Rt war kein Edukt mehr detektierbar (EE). Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum entfernt, der Rückstand in CH₂Cl₂ aufgenommen und je zweimal mit einer ges. NaHCO₃-Lösung und H₂O

gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Membranpumpenvakuum entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung erfolgte an Kieselgel mit EE als Eluent. Um Reste von Glycal im Produkt abzutrennen, erfolgte eine weitere Reinigung an RP-18 Kieselgel mit CH₃CN/H₂O 1:1 v/v als Eluent.

AAV 9: Selektive Phosphorylierung von Monosacchariden nach der Phosphoramidit-Methode

Unter Inertgasatmosphäre wurden 1.0 Äquiv. der zu phosphorylierenden Verbindung dreimal mit abs. CH₃CN coevaporiert und anschließend in abs. CH₃CN gelöst. Zu der Lösung wurden 1.0-1.5 Äquiv. DCI-Aktivatorlösung (0.25 M in CH₃CN) und langsam 1.2-1.5 Äquiv. des entsprechenden Phosphoramidits gegeben und der Reaktionsansatz wurde bei Rt für 5 Minuten gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch mit PE/EE (1:1 v/v). Anschließend wurden 1.2-1.5 Äquiv. *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) zu dem Reaktionsansatz gegeben und ebenfalls 5 Minuten bei Rt gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem PE/EE-Gradienten 1:1 (v/v) → EE als Eluent gereinigt.

AAV 10: Darstellung von nicht-symmetrischen Phosphoramiditen

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 1.0 Äquiv. des 5'OH-freien Nucleosids sowie 1.1-1.5 Äquiv. des entsprechenden 4-Acyloxybenzyl-bis-(diisopropylamino)phosphoramidits zunächst je dreimal mit absoluten CH₃CN coevaporiert. Anschließend wurden beide Ausgangsverbindungen in abs. CH₃CN gelöst. Zu dem Nucleosid wurden 1.0 Äquiv. DCI-Aktivatorlösung (0.25 M in CH₃CN) bei 0 °C oder Rt gegeben und dann das Phosphordiamidit zum Reaktionsansatz getropft. Der Reaktionsansatz wurde 10-60 Minuten bei Rt gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch mit EE/Et₃N 9:1 v/v mit zuvor konditionierten DC-Platten. Nach vollständigem Umsatz des Eduktes wurde das Lösungsmittel entfernt. Bei der Verwendung des selektiv blockierten Cytidins wurde der Rückstand in CH₂Cl₂ aufgenommen und einmal mit ges. Natriumhydrogencarbonat gewaschen. Die wässrige Phase wurde anschließend dreimal mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden abschließend einmal mit H₂O gewaschen und dann über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Membranpumpenvakuum entfernt. Bei Verwendung des selektiv blockierten Adenosins wurde auf diesen Schritt verzichtet. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron mit EE/Et₃N 9:1 v/v als Elutionsmittel, ebenfalls mit zuvor konditionierter Platte.

AAV 11: Darstellung von Nucleosiddiphosphat-Pyranosen -nach der *cycloSal*-Methode

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden sowohl 2.0 Äquiv. des entsprechenden acetylgeschützten Glycosylphosphates als auch 1.0 Äquiv. des *cycloSal*-Nucleosidmonophosphates für ca. 3 h im Ölpumpenvakuum getrocknet. Anschließend wurden beide Ausgangsverbindungen je in wenig abs. DMF gelöst und für ca. 1 h über aktiviertem Molsieb stehen gelassen. Das gelöste *cycloSal*-Nucleosidmonophosphat wurde langsam zu der Lösung des Zuckerphosphates dazu getropft, wobei sich der Reaktionsansatz gelb färbte. Das Reaktionsgemisch wurde 48 h bei Rt gerührt und dünnschichtchromatographisch verfolgt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 9:1 v/v). Nach vollständiger Umsetzung des Triesters wurde das Lösungsmittel vollständig entfernt, der Rückstand wurde in H_2O aufgenommen und zweimal mit EE gewaschen. Die wässrige Phase wurde gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde zur Abspaltung der Acetylschutzgruppen in $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{Et}_3\text{N}$ 7:3:1 aufgenommen und 24 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in H_2O aufgenommen. Nach erneuter Gefrier- trocknung erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes an RP-18 Kieselgel mit H_2O als Eluent. Die Detektion erfolgte dünnschichtchromatographisch mit *iso*Propanol/1 N Ammoniumacetatlösung 2:1 v/v.

AAV 12: Darstellung von fluoreszenzmarkierten NDP-Zuckern mittels Alkin-Azid- Cycloaddition (CuAAC)

Die Reaktion erfolgte unter Lichtausschluss. Es wurden 1.0 Äquiv. des entsprechenden NDP-Zuckers in 0.5 mL dest. H_2O gelöst und zu dem NDP-Zucker wurden 1.3-1.4 Äquiv. 5-Fam-Alkin gelöst in 1.5 mL DMF gegeben. Anschließend wurden sowohl 0.5 mL einer 5%igen wässrigen Kupfersulfatpentahydratlösung als auch 0.5 mL einer 10%igen wässrigen Natriumascorbatlösung zu dem Reaktionsansatz gegeben. Die klare gelbe Lösung färbte sich blutrot und wurde zur Suspension. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschicht- chromatographisch mit *iso*Propanol/1 N Ammoniumacetatlösung 2:1 v/v. Nach 20 h Reaktionszeit hatte sich eine grüne Suspension gebildet und das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum entfernt. Der Rückstand wurde in H_2O aufgenommen und gefriergetrocknet, ebenfalls mit einem abgedunkelten Kolben. Die Reinigung erfolgte abgedunkelt mit Sephadex[®] LH 20 mit H_2O als Eluent. Die Produktfraktionen wurden vereinigt und erneut unter Lichtausschluss gefriergetrocknet. Anschließend erfolgte ein Austausch der Kupferionen gegen Natriumionen über einen Ionentauschauer (Dowex 50WX8 (Na^+)).

AAV 13: Darstellung von lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivaten mittels der Phosphoramidchemie

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 1.0 Äquiv. ^OAcNeuN5Ac^{COOMe} **22**, sowie 1.2 Äquiv. des entsprechenden Phosphoramidits zunächst je dreimal mit abs. CH₃CN coevaporiert. Anschließend wurden beide Ausgangsverbindungen in abs. CH₃CN gelöst. Der Zucker wurde zu dem Phosphoramidit gegeben und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurden 1.2 Äquiv. DCI-Aktivatorlösung (0.25 M in CH₃CN) zu dem Reaktionsansatz getropft. Dieser wurde 30-60 Minuten bei Rt gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch mit EE/Et₃N 9:1 v/v mit zuvor konditionierten DC-Platten. Nach vollständigem Umsatz des Eduktes erfolgte die Oxidation mit 1.2 Äquiv. *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) für 20 Minuten bei Rt. Nach vollständiger Umsetzung des Eduktes wurde das Lösungsmittel entfernt und die Reinigung wurde mit Sephadex[®] LH20 mit CH₂Cl₂ als Eluent durchgeführt.

AAV 14: Darstellung von lipophilen CMP-Neu5Ac-Derivaten nach der *cycloSal*-Methode

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. 1.0 Äquiv. des *cycloSal*-Cytidinmonophosphates **75** und 1.5 Äquiv. des entsprechenden Neuraminsäure-Derivates wurden jeweils 30 Minuten im Ölpumpenvakuum getrocknet. Der Zucker wurde in 2.5 mL CH₂Cl₂ und 0.5 mL DMF gelöst und bei -50 °C mit 1.1 Äquiv. Natriumhydrid versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurde der Triester **75** zu dem Reaktionsansatz gegeben. Nach weiteren 20 Minuten bei -50 °C wurde der Reaktionsansatz auf Rt erwärmt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch mit (CH₂C₂/CH₃OH 9:1 v/v). Nach einer Reaktionszeit von 4 h wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Der gelbliche Rückstand wurde in H₂O aufgenommen und gefriergetrocknet. Die Reinigung erfolgte mittels automatisierter RP-18 Säulenchromatographie (0-4:30 min H₂O 100% Vol., 4:30-10:20 H₂O/CH₃CN 90-10% Vol., 10:20-25:50 min H₂O/CH₃CN 85-15% Vol., 25:50-37:00 min H₂O/CH₃CN 85-15% Vol., 37:00-41:20 min H₂O/CH₃CN 75-25vol%., 41:20-48:10 min CH₃CN 100vol%, Flussrate 10 mL/min).

AAV 15: Darstellung von Adenosindiphosphat-Ribose-Derivaten mittels der Phosphoramidchemie

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden sowohl 1.0 Äquiv. des Phosphoramidites **96** als auch 1.1-1.3 Äquiv. des entsprechenden Zuckerphosphates dreimal mit abs. CH₃CN coevaporiert und anschließend für 30 Minuten im Ölpumpenvakuum getrocknet. Beide Verbindungen wurden in abs. CH₃CN gelöst und das Zuckerphosphat wurde zu dem Phosphoramidit gegeben. Anschließend wurden 1.0 Äquiv. DCI-

Aktivatorlösung (0.25 M in CH₃CN) zu dem Reaktionsansatz gegeben. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch mit EE/CH₃OH/Et₃N 8:1:1 v/v/v. Nach 5-10 Minuten Reaktionszeit war ein vollständiger Umsatz erreicht. Abschließend erfolgte die Oxidation mit 1.0 Äquiv. *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan). Die Reaktion war nach 5-10 Minuten beendet. Die Rohprodukte wurden mittels automatisierter RP-18 Säulenchromatographie gereinigt (H₂O/CH₃CN 10-100% Vol., 0-15 min, Flussrate 20 mL/min).

5.2.2 Darstellung selektiv blockierter Nucleoside

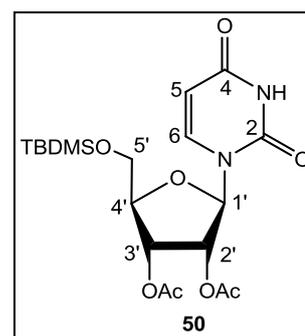
5.2.2.1 Synthese von 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-O-acetyluridin **50**

Die Reaktion wurde nach **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 3.02 g (12.4 mmol, 1.0 Äquiv.) Uridin **49**, 50 mL abs. Pyridin und 2.38 g (15.8 mmol, 1.3 Äquiv.) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 20 h. Nach vollständiger Umsetzung des Eduktes wurden 7.00 mL (74.1 mmol, 6.0 Äquiv.) Essigsäureanhydrid dazugegeben und der Reaktionsansatz weitere 20 h bei Rt gerührt.

Ausbeute: 5.10 g (11.5 mmol, 93%) eines farblosen Feststoffes;

Summenformel: C₁₉H₃₀N₂O₈Si; **Molekulargewicht:** 442.54 g/mol;

DC: R_F-Wert: (EE) 0.56; **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25}$: +15° (c = 0.99, CH₃OH); **Schmelzpunkt:** 63.6 °C.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.79 (s, 1H, **NH**), 7.86 (d, ³J_{H,H} = 8.3 Hz, 1H, **H6**), 6.29 (d, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, 1H, **H1'**), 5.73 (dd, ³J_{H,H} = 8.2 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.8 Hz, **1H, H5**), 5.36-5.30 (m, 2H, **H2', H3'**), 4.22-4.21 (m, 1H, **H4'**), 3.92 (dd, ²J_{H,H} = 11.7 Hz, ³J_{H,H} = 2.0 Hz, 1H, **H5'a**), 3.83 (dd, ²J_{H,H} = 11.5 Hz, ³J_{H,H} = 1.7 Hz, 1H, **H5'b**), 2.13, 2.07 (2x s, 2x 3H, **Acetyl-CH₃**), 0.94 (s, 9H, **Bu-CH₃**), 0.15, 0.13 (2x s, 2x 3H, **Silyl-CH₃**).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 170.0, 169.7 (2x **C_q-Acetyl**), 162.8 (**C4**), 150.6 (**C2**), 139.6 (**C6**), 103.3 (**C5**), 85.4 (**C1'**), 83.9 (**C4'**), 73.5 (**C2'**), 71.9 (**C3'**), 63.3 (**C5'**), 26.0 (**Bu-CH₃**), 20.8, 20.5 (2x **Acetyl-CH₃**), 18.4 (**C_q-Bu**), -5.4, -5.5 (2x **Silyl-CH₃**).

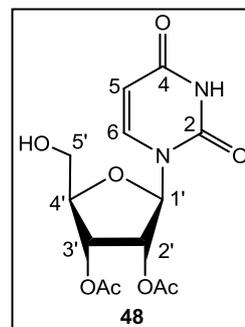
IR: [cm⁻¹] = 3196, 3067, 2929, 2857, 1747, 1713, 1698, 1458, 1376, 1308, 1233, 1123, 1089, 1041, 927, 884, 829.

MS(ESI⁺): m/z (%): ber.: 443,1844 [M+H]⁺, gef.: 465.1664 [M+H]⁺.

5.2.2.2 Synthese von 2',3'-Di-O-Acetyluridin 48

Die Reaktion wurde nach **AVV 2** durchgeführt. Es wurden 4.75 g (10.7 mmol, 1.0 Äquiv.) 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-2',3'-O-acetyluridin **50**, 40 mL CH₂Cl₂ und 10.4 mL (63.9 mmol, 6.0 Äquiv.) Et₃N⁺3HF verwendet. Die Reaktionszeit betrug 20 h. Die säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit EE/CH₃OH (9:1 v/v) als Elutionsmittel.

Ausbeute: 3.52 g (10.7 mmol, quantitativ) eines farblosen Feststoffes;
Summenformel: C₁₃H₁₆N₂O₈; **Molekulargewicht:** 328.27 g/mol; **DC:**
R_F-Wert: (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1 v/v) 0.35; **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25}$: +20° (c = 1.01, CH₃OH); **Schmelzpunkt:** 55.5 °C.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.94 (s, 1H, **NH**), 7.73 (d, ³J_{H,H} = 8.3 Hz, 1H, **H6**), 6.07-6.04 (m, 1H, **H1'**), 5.78 (dd, ³J_{H,H} = 8.3 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.1 Hz, 1H, **H5**), 5.49-5.46 (m, 2H, **H2'**, **H3'**), 4.22-4.20 (m, 1H, **H4'**), 3.95 (dd, ²J_{H,H} = 12.2 Hz, ³J_{H,H} = 2.3 Hz, 1H, **H5'a**), 3.86 (dd, ²J_{H,H} = 12.0 Hz, ³J_{H,H} = 2.3 Hz, 1H, **H5'b**), 2.13, 2.08 (2x s, 2x 3H, **Acetyl-CH₃**).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 170.2, 169.9 (2x **C_q-Acetyl**), 163.1 (**C4**), 150.6 (**C2**), 140.8 (**C6**), 103.4 (**C5**), 87.7 (**C1'**), 83.6 (**C4'**), 73.1 (**C2'**), 71.4 (**C3'**), 62.0 (**C5'**), 20.8, 20.6 (2x **Acetyl-CH₃**).

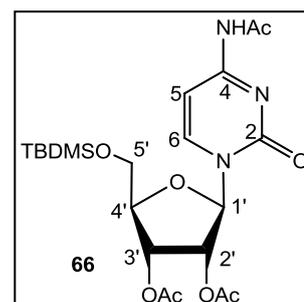
IR: [cm⁻¹] = 3444, 3213, 3065, 2937, 2880, 2821, 1744, 1674, 1459, 1374, 1212, 1103, 1077, 1043, 953, 812.

MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 351.0799 [M+Na]⁺, gef.: 351.0805 [M+Na]⁺.

5.2.2.3 Synthese von 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-*N*⁴-acetyl-2',3'-di-O-acetylcytidin 66

Die Reaktion wurde nach **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 5.07 g (20.8 mmol, 1.0 Äquiv.) Cytidin **65**, 92 mL abs. Pyridin und 3.54 mg (23.5 mmol, 1.1 Äquiv.) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 25 h. Nach vollständiger Umsetzung des Eduktes wurden 19.5 mL (21.1 g, 206 mmol, 10 Äquiv.) Essigsäureanhydrid dazugegeben und der Reaktionsansatz weitere 20 h bei Rt gerührt.

Ausbeute: 7.16 g (14.8 mmol, 72%) eines farblosen Feststoffes ;
Summenformel: C₂₁H₃₃N₃O₈Si; **Molekulargewicht:** 483.59 g/mol;
DC: **R_F-Wert:** (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1 v/v) 0.68; **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25}$: +31° (c = 1.05, CH₃OH); **Schmelzpunkt:** 80 °C.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 10.18 (s, 1H, **NHAc**), 8.27 (d, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, 1H, **H6**), 7.42 (d, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, 1H, **H5**), 6.36-6.32 (m, 1H, **H1'**), 5.37-5.32 (m, 2H, **H2'**, **H3'**), 4.27-4.23 (m, 1H, **H4'**), 3.98 (dd, ²J_{H,H} = 11.7 Hz, ³J_{H,H} = 2.0 Hz, 1H, **H5'a**), 3.82 (dd, ²J_{H,H} = 11.7 Hz, ³J_{H,H} = 1.7 Hz, 1H, **H5'b**), 2.27, 2.08, 2.05 (3x s, 3x 3H, **Acetyl-CH₃**), 0.93 (s, 9H, **^tBu-CH₃**), 0.13 (s, 6H, 2x **Silyl-CH₃**).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 171.3, 169.9, 169.6 (3x **C_q-Acetyl**), 163.3 (**C2**), 155.1 (**C4**), 144.4 (**C6**), 97.4 (**C5**), 87.1 (**C1'**), 83.6 (**C4'**), 74.7 (**C2'**), 71.1 (**C3'**), 62.6 (**C5'**), 26.0 (**^tBu-CH₃**), 25.0 (**N-Acetyl-CH₃**), 20.7, 20.6 (2x **O-Acetyl-CH₃**), 18.4 (**C_q-^tBu**), -5.5, -5.5 (2x **Silyl-CH₃**).

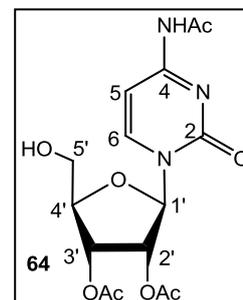
IR: [cm⁻¹] = 2930, 2857, 1748, 1669, 1556, 1488, 1371, 1003, 999, 830, 810, 781.

MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 484.2115 [M+H]⁺, gef.: 484.2118 [M+H]⁺.

5.2.2.4 Synthese von **N^t-Acetyl-2',3'-di-O-acetylcytidin 64**

Die Durchführung erfolgte nach **AVV 2**. Es wurden 6.95 g (14.4 mmol, 1.0 Äquiv.) 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-**N^t-acetyl-2',3'-di-O-acetylcytidin 66**, 50 mL CH₂Cl₂ und 9.0 mL (55 mmol, 4 Äquiv.) Et₃N*3HF verwendet. Die Reaktionszeit betrug 22 h. Die säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit EE/CH₃OH (4:1 v/v) als Elutionsmittel.

Ausbeute: 5.34 mg (144 μmol, quantitativ) eines farblosen Feststoffes;
Summenformel: C₁₅H₁₉N₃O₈; **Molekulargewicht:** 369.33 g/mol; **DC:** R_F Wert: (EE/CH₃OH 4:1 v/v) 0.50; **Drehwert:** [α]_{589nm}²⁵: +43° (c = 1.02, CH₃OH); **Schmelzpunkt:** 166 °C.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 10.93 (s, 1H, **NHAc**), 8.22 (d, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, 1H, **H6**), 7.23 (d, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, 1H, **H5**), 6.02 (d, ³J_{H,H} = 5.1 Hz, 1H, **H1'**), 5.40 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 5.4 Hz, ³J_{H,H} = 5.4 Hz, **H2'**), 5.37-5.30 (m, 2H, **H3'**, **-OH**), 4.20-4.16 (m, 1H, **H4'**), 3.72 (ddd, ²J_{H,H} = 12.4 Hz, ³J_{H,H} = 5.0 Hz, ³J_{H,H} = 2.9 Hz, 1H, **H5'a**), 3.62 (ddd, ²J_{H,H} = 12.3 Hz, ³J_{H,H} = 5.2 Hz, ³J_{H,H} = 3.3 Hz, 1H, **H5'b**), 2.11, 2.08, 2.04 (3x s, 3x 3H, **Acetyl-CH₃**).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 171.1, 169.4, 169.3 (3x **C_q-Acetyl**), 162.7 (**C2**), 154.5 (**C4**), 145.5 (**C6**), 96.0 (**C5**), 88.0 (**C1'**), 82.9 (**C4'**), 73.3 (**C2'**), 70.3 (**C3'**), 62.3 (**C5'**), 24.4, 20.8, 20.6 (3x **Acetyl-CH₃**).

IR: [cm⁻¹] = 3452, 3284, 3136, 2933, 1742, 1652, 1554, 1494, 1431, 1371, 1238, 1064, 1041, 812.

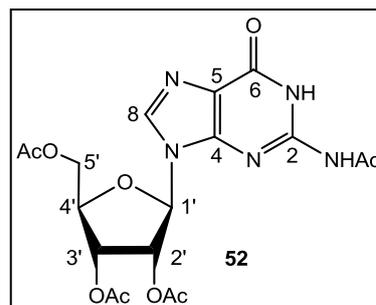
MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 392.1070 [M+Na]⁺, gef.: 392.1062 [M+Na]⁺.

5.2.2.5 Synthese von *N*²-Acetyl-2',3',5'-tri-*O*-acetylguanosin **52**

Es wurden 5.01 g (17.7 mmol, 1.0 Äquiv.) Guanosin **51** in 100 mL CH₃CN suspendiert und mit 24.5 mL (177 mmol, 10 Äquiv.) Et₃N und 30.1 mL (318 mmol, 18 Äquiv.) Essigsäureanhydrid versetzt. Der Reaktionsansatz wurde bei Rt gerührt. Nach kurzer Zeit war der Feststoff gelöst. Nach 26 h war kein Edukt mehr detektierbar (DC: EE/CH₃OH 9:1). Während der Reaktionszeit hatte sich die Lösung dunkelrot gefärbt. Der Reaktionsansatz wurde in EE aufgenommen und dreimal mit H₂O und zweimal mit ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden ebenfalls zweimal mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit EE/CH₃OH (9:1 v/v) als Eluent gereinigt.

Anmerkung: Es wurde festgestellt, dass das Produkt beim Waschen ebenfalls in die wässrige Phase übergeht. Es konnte nicht vollständig extrahiert werden.

Ausbeute: 3.97 g (8.80 mmol, 50%) eines orangefarbenen Feststoffes; **Summenformel:** C₁₈H₂₁N₅O₉; **Molekulargewicht:** 451.39 g/mol; **DC:** R_F-Wert: (EE/CH₃OH 9:1 v/v) 0.34; **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25}$: +4.8° (c = 1.00, CH₃OH); **Schmelzpunkt:** 70.5 °C.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 11.99 (s, 1H, **NH**), 9.36 (s, 1H, **NHAc**), 7.73 (s, 1H, **H8**), 5.95 (d, ³J_{H,H} = 5.0 Hz, 1H, **H1'**), 5.91 (dd, ³J_{H,H} = 5.0 Hz, ³J_{H,H} = 5.0 Hz, 1H, **H2'**), 5.71 (dd, ³J_{H,H} = 4.6 Hz, ³J_{H,H} = 4.6 Hz, 1H, **H3'**), 4.65 (dd, ²J_{H,H} = 10.8 Hz, ³J_{H,H} = 3.8 Hz, 1H, **H5'a**), 4.50-4.40 (m, 2H, **H4'**, **H5'b**), 2.32 2.14 (2x s, 2x 3H, **Acetyl-CH₃**), 2.08 (s, 6H, **Acetyl-CH₃**).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.4, 171.5, 169.8, 169.5, (4x **C_q-Acetyl**), 155.6 (**C6**), 174.8 (**C4**), 147.7 (**C2**), 138.5 (**C8**), 122.5 (**C5**), 87.6 (**C1'**), 80.2 (**C4'**), 72.9 (**C2'**), 71.1 (**C3'**), 63.3 (**C5'**), 24.4 (**N-Acetyl-CH₃**) 21.0, 20.7, 20.5 (3x **O-Acetyl-CH₃**).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3151, 2941, 1744, 1674, 1608, 1557, 1480, 1403, 1369, 1216, 1090, 1037, 900, 784, 640, 599, 530.

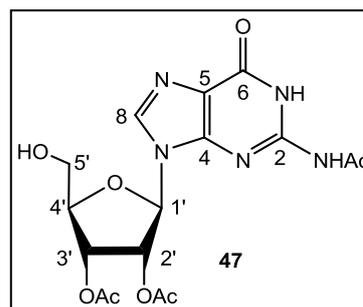
MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 452.1412 [M+H]⁺, gef.: 452.1429 [M+H]⁺.

5.2.2.6 Synthese von *N*²-Acetyl-2',3'-di-*O*-acetylguanosin **47**

In 7 Ansätzen à 400 mg wurden insgesamt 2.87 g (6.36 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*²-Acetyl-2',3',5'-tri-*O*-acetylguanosin **52** in je 1 mL DMF gelöst und mit je 4 mL Phosphatpuffer pH 7 und je 0.9 mL des in Propylenglykol gelösten Enzyms Subtilisin (91.0 mg/mL) versetzt. Die

Reaktionsansätze wurden 4 Tage bei 37 °C gerührt und anschließend auf Rt abgekühlt. Es wurden je 4 mL CH₃OH zu den Reaktionslösungen gegeben und 30 Minuten bei Rt gerührt. Der dabei entstandene farblose Niederschlag wurde durch Zentrifugation und anschließendes Dekantieren abgetrennt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der braune, ölige Rückstand wurde in 15 mL EE und 15 mL CH₃OH aufgenommen und erneut zentrifugiert. Das Lösungsmittel wurde wiederum unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde mehrfach säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem CH₂Cl₂/CH₃OH-Gradienten (1:0 → 19:1 v/v) als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 679 mg (1.66 mmol, 26%) eines farblosen Feststoffes (Reisolation von 1.10g (2.44 mmol) des Eduktes als weißer Feststoff); **Summenformel:** C₁₆H₁₉N₅O₈; **Molekulargewicht:** 409.35 g/mol; **DC:** R_F-Wert: (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1 v/v) 0.46; **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25}$: +0.50° (c = 0.995, CH₃OH); **Schmelzpunkt:** 52.8 °C.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 12.2 (s, 1H, **NH**), 9.34 (bs, 1H, **NHAc**), 7.90 (s, 1H, **H8**), 5.97-5.86 (m, 2H, **H1'**, **H2'**), 5.67 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 5.2 Hz, ³J_{H,H} = 2.7 Hz, **H3'**), 4.32 (d, 1H, ³J_{H,H} = 2.0 Hz **H4'**), 4.00 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.4 Hz, ³J_{H,H} = 1.6 Hz, **H5'a**), 3.83 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.6 Hz, ³J_{H,H} = 1.6 Hz, **H5'b**), 2.36, 2.16, 2.04 (3x s, 3x 3H, **Acetyl-CH₃**).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 173.2, 170.1, 169.6, (3x **C_q-Acetyl**), 155.4 (**C6**), 148.2 (**C2**), 147.7 (**C4**), 122.4 (**C5**), 87.6 (**C1'**), 84.3 (**C4'**), 72.4 (**C2'**), 71.4 (**C3'**), 61.9 (**C5'**), 24.5 (s, **N-Acetyl-CH₃**), 20.8, 20.5 (2x s, 2x **O-Acetyl-CH₃**).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3116, 2934, 2857, 1747, 1675, 1608, 1558, 1402, 1371, 1220, 1048, 998.

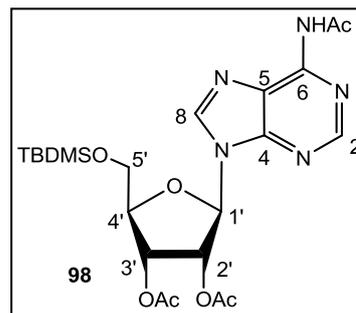
MS(ESI⁺): m/z (%): ber.: 410.1306 [M+H]⁺, gef.: 410.1313 [M+H]⁺.

5.2.2.7 Synthese von 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-N⁴-acetyl-2',3'-diacetyladenosin 98 und 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-N⁴,N⁴-diacetyl-2',3'-diacetyladenosin 99

Die Reaktion wurde nach **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 2.05 g (7.67 mmol, 1.0 Äquiv.) Adenosin **91**, 35.0 mL abs. Pyridin und 1.40 g (9.29 mmol, 1.2 Äquiv.) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 11 h. Nach vollständiger Umsetzung des Eduktes wurden 6.50 mL (68.8 mmol, 9.0 Äquiv.) Essigsäureanhydrid dazugegeben und der Reaktionsansatz 60 h bei Rt gerührt.

5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-*N*⁴-acetyl-2',3'-diacetyladenosin **98**:

Ausbeute: 1.54 g (3.03 mmol, 44%) eines farblosen Feststoffes; **Summenformel:** C₂₂H₃₃N₅O₇Si; **Molekulargewicht:** 507.61 g/mol; **DC:** R_F-Wert: (EE) 0.38; **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25}$: -26.1° (c = 1.00, CH₂Cl₂); **Schmelzpunkt:** 52.8 °C.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.69 (s, 1H, **H2**), 8.58 (s, 1H, **NHAc**), 8.37 (s, 1H, **H8**), 6.39 (d, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 1H, **H1'**), 5.77 (dd, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, ³J_{H,H} = 5.3 Hz, 1H, **H2'**), 5.54 (dd, ³J_{H,H} = 5.3 Hz, ³J_{H,H} = 2.6 Hz, 1H, **H3'**), 4.35-4.31 (m, 1H, **H4'**), 3.97 (dd, ²J_{H,H} = 11.5 Hz, ³J_{H,H} = 2.7 Hz, 1H, **H5'a**), 3.89 (dd, ²J_{H,H} = 11.5 Hz, ³J_{H,H} = 2.4 Hz, 1H, **H5'b**), 2.61 (s, 3H, **N-Acetyl-CH₃**), 2.15, 2.03 (2x s, 2x 3H, **O-Acetyl-CH₃**), 0.95 (s, 9H, **tBu-CH₃**), 0.15 (s, 6H, 2x **Silyl-CH₃**).

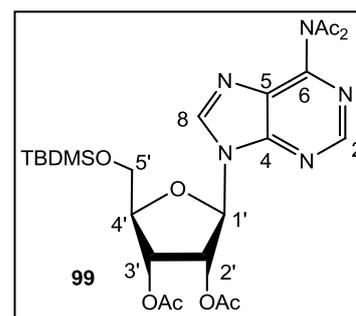
¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 170.4, (**N-Acetyl-C_q**), 169.9, 169.5 (2x **O-Acetyl-C_q**), 152.8 (**C2**), 151.5 (**C4**), 149.4 (**C6**), 140.8 (**C8**), 121.9 (**C5**), 85.2 (**C1'**), 84.3 (**C4'**), 74.4 (**C2'**), 72.0 (**C3'**), 63.2 (**C5'**), 26.1 (**tBu-CH₃**), 25.8 (**N-Acetyl-CH₃**), 20.8, 20.5 (2x **O-Acetyl-CH₃**), 18.5 (**tBu-C_q**), -5.3, -5.4 (2x **Silyl-CH₃**).

IR: [cm⁻¹] = 2953, 2930 2857, 1748, 1703, 1606, 1585, 1465, 1371, 1210, 1089, 1031, 831, 778, 643, 571.

MS(ESI⁺): m/z (%): ber.: 508.2222 [M+H]⁺, gef.: 508.2271 [M+H]⁺.

5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-*N*⁴,*N*⁶-diacetyl-2',3'-diacetyladenosin **99**:

Ausbeute: 2.34 g (4.26 mmol, 55%) eines farblosen Feststoffes; **Summenformel:** C₂₄H₃₅N₅O₈Si; **Molekulargewicht:** 549.65 g/mol; **DC:** R_F-Wert: (EE) 0.72; **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25}$: -20.3° (c = 1.00, CH₂Cl₂); **Schmelzpunkt:** 50.9 °C.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.96 (s, 1H, **H2**), 8.53 (s, 1H, **H8**), 6.46 (d, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, 1H, **H1'**), 5.79 (dd, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, ³J_{H,H} = 5.3 Hz, 1H, **H2'**), 5.55 (dd, ³J_{H,H} = 5.2 Hz, ³J_{H,H} = 2.3 Hz, 1H, **H3'**), 4.37-4.33 (m, 1H, **H4'**), 3.97 (dd, ²J_{H,H} = 11.6 Hz, ³J_{H,H} = 2.2 Hz, 1H, **H5'a**), 3.91 (dd, ²J_{H,H} = 11.6 Hz, ³J_{H,H} = 2.3 Hz, 1H, **H5'b**), 2.36 (s, 6H, 2x **N-Acetyl-CH₃**), 2.17, 2.06 (2x s, 2x 3H, 2xs **O-Acetyl-CH₃**), 0.94 (s, 9H, **tBu-CH₃**), 0.15, 0.15 (2x s, 2x 3H, 2x **Silyl-CH₃**).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.0, (**N-Acetyl-C_q**), 170.0, 169.5 (2x **O-Acetyl-C_q**), 154.0 (**C₄**), 153.1 (**C₂**), 151.0 (**C₆**), 144.1 (**C₈**), 130.8 (**C₅**), 85.3 (**C_{1'}**), 84.7 (**C_{4'}**), 74.4 (**C_{2'}**), 72.0 (**C_{3'}**), 63.3 (**C_{5'}**), 26.5 (**N-Acetyl-CH₃**), 26.1 (**^tBu-CH₃**), 20.8, 20.5 (2x **O-Acetyl-CH₃**), 18.6 (**^tBu-C_q**), -5.3, -5.4 (2x **Silyl-CH₃**).

IR: [cm⁻¹] = 2952, 2931, 2858, 1749, 1721, 1601, 1577, 1337, 1206, 1129, 1086, 1045, 831, 778, 645, 589.

MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 550.2328 [M+H]⁺, gef.: 550.2385 [M+H]⁺.

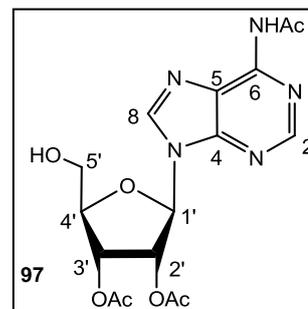
5.2.2.8 Synthese von **N^t-Acetyl-2',3'-di-O-acetyladenosin 97**

Die Reaktion wurde nach **AAV 2** durchgeführt. Es wurden 1.48 g (2.92 mmol, 1.0 Äquiv.) 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-**N^t-acetyl-2',3'-di-O-acetyladenosin 98**, 20.0 mL CH₂Cl₂ und 3.00 mL (18.4 mmol, 6.3 Äquiv.) Et₃N·3HF verwendet. Die Reaktionszeit betrug 22 h und die Reaktionsverfolgung erfolgte mit EE. Die säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit EE/CH₃OH (9:1 v/v) als Elutionsmittel.

Ausbeute: 1.15 g (2.92 mmol, quantitativ) eines farblosen Feststoffes; **Summenformel:** C₁₆H₁₉N₅O₇;

Molekulargewicht: 393.35 g/mol; **DC:** R_F-Wert: (EE/CH₃OH) 0.38;

Drehwert: [α]_{589nm}²⁵: -43.2° (c = 1.00, CH₃OH); **Schmelzpunkt:** 67.2 °C.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 10.75 (s, 1H, **NHAc**), 8.71 (s, 1H, **H₈**), 8.67 (s, 1H, **H₂**), 6.30 (d, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, 1H, **H_{1'}**), 5.77 (dd, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, ³J_{H,H} = 5.8 Hz, 1H, **H_{2'}**), 5.54 (dd, ³J_{H,H} = 5.5 Hz, ³J_{H,H} = 3.0 Hz, 1H, **H_{3'}**), 5.43 (t, ³J_{H,H} = 5.2 Hz, 1H, **-OH**), 4.28-4.23 (m, 1H, **H_{4'}**), 3.78-3.71 (m, 1H, **H_{5'a}**), 3.69-3.62 (m, 1H, **H_{5'b}**), 2.25 (s, 3H, **N-Acetyl-CH₃**), 2.14, 1.99 (2x s, 2x 3H, 2x **O-Acetyl-CH₃**).

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 169.6, 169.3 (2x **O-Acetyl C_q**), 168.9 (**N-Acetyl C_q**), 151.9 (**C₂**), 151.6 (**C₄**), 149.8 (**C₆**), 142.6 (**C₈**), 123.7 (**C₅**), 85.2 (**C_{1'}**), 83.8 (**C_{4'}**), 72.6 (**C_{2'}**), 71.1 (**C_{3'}**), 60.9 (**C_{5'}**), 24.3 (**N-Acetyl CH₃**), 20.5, 20.2 (2x **O-Acetyl-CH₃**).

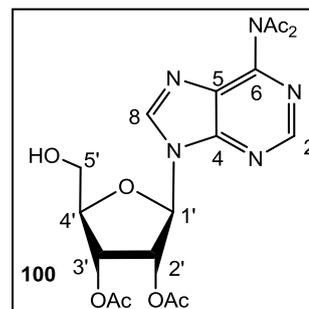
IR: [cm⁻¹] = 3337, 3118, 2937, 1719, 1602, 1579, 1422, 1367, 1292, 1042, 984, 897, 624, 590.

MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 394.1357 [M+H]⁺, gef.: 394.1389 [M+H]⁺.

5.2.2.9 Synthese von *N*⁴,*N*⁴-Diacetyl-2',3'-di-*O*-acetyladenosin **100**

Die Reaktion wurde nach **AAV 2** durchgeführt. Es wurden 2.18 g (3.97 mmol, 1.0 Äquiv.) 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-*N*⁴,*N*⁴-diacetyl-2',3'-diacetyladenosin **99**, 20.0 mL CH₂Cl₂ und 4.00 mL (24.6 mmol, 6.2 Äquiv.) Et₃N*3HF verwendet. Die Reaktionszeit betrug 20 h und die Reaktionsverfolgung erfolgte mit EE. Die säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit EE/CH₃OH (9:1 v/v) als Elutionsmittel.

Ausbeute: 1.46 g (3.35 mmol, 84%) eines farblosen Feststoffes; **Summenformel:** C₁₈H₂₁N₅O₈; **Molekulargewicht:** 435.39 g/mol; **DC:** R_F-Wert: (EE/CH₃OH) 0.63; **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25}$: -30.5° (c = 1.00, CH₃OH); **Schmelzpunkt:** 55.6 °C.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 9.02 (s, 1H, **H8**), 8.94 (s, 1H, **H2**), 6.39 (d, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, 1H, **H1'**), 5.99 (dd, ³J_{H,H} = 5.6 Hz, ³J_{H,H} = 5.6 Hz, 1H, **H2'**), 5.59 (dd, ³J_{H,H} = 5.3 Hz, ³J_{H,H} = 3.5 Hz, 1H, **H3'**), 5.39-5.33 (m, 1H, **-OH**), 4.30-4.26 (m, 1H, **H4'**), 3.79-3.72 (m, 1H, **H5'a**), 3.71-3.63 (m, 1H, **H5'b**), 2.27 (s, 6H, 2x **N-Acetyl-CH₃**), 2.14, 2.02 (2x s, 2x 3H, 2x **O-Acetyl-CH₃**).

¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 171.7, 171.7 (2x **O-Acetyl C_q**), 169.5, 169.3 (2x **N-Acetyl C_q**), 153.2 (**C2**), 152.5 (**C4**), 149.9 (**C6**), 146.2 (**C8**), 130.1 (**C5**), 85.6 (**C1'**), 83.8 (**C4'**), 72.8 (**C2'**), 71.8 (**C3'**), 60.7 (**C5'**), 25.8 (**N-Acetyl CH₃**), 20.4, 20.2 (2x **O-Acetyl-CH₃**).

IR: [cm⁻¹] = 3270, 3120, 2938, 1743, 1608, 1586, 1458, 1428, 1370, 1296, 1211, 1036, 917, 640, 539.

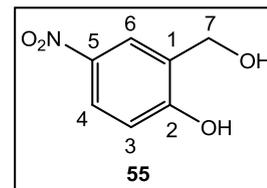
MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 458.1288 [M+Na]⁺, gef.: 458.1202 [M+Na]⁺.

5.2.3 Darstellung des *cycloSal*-Chlorphosphits **53**

5.2.3.1 Synthese von 5-Nitrosalicylalkohol **55**

Es wurden 5.05 g (30.2 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Nitrosalicylaldehyd **54** in 150 mL reinst Ethanol gelöst und unter Wasserkühlung portionsweise 1.10 g (29.0 mmol, 0.96 Äquiv.) Natriumborhydrid dazugegeben, wobei sich die Lösung von gelb nach orange färbte. Der Reaktionsansatz wurde 20 h bei Rt gerührt. Nach vollständiger Umsetzung des Eduktes (DC-Kontrolle CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1 v/v) wurde die Lösung mit 4.5 mL H₂O versetzt und bis zum Farbumschlag nach gelb tropfenweise mit konz. Salzsäure versetzt. Der dabei entstandene Niederschlag wurde filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde dreimal mit CH₃OH coevaporiert und anschließend aus H₂O umkristallisiert.

Ausbeute: 3.96 g (23.4 mmol, 80%) eines gelben, kristallinen Feststoffes; **Summenformel:** C₇H₇NO₄; **Molekulargewicht:** 169.13 g/mol; **DC:** R_F-Wert: (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1 v/v) 0.79; **Schmelzpunkt:** 127.9 °C.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 11.10 (bs, 1H, **OH-Phenol**), 8.21 (d, ⁴J_{H,H} = 3.1 Hz, 1H, **H6**), 8.02 (dd, ³J_{H,H} = 8.9 Hz, ⁴J_{H,H} = 2.8 Hz, 1H, **H4**), 6.94 (d, ³J_{H,H} = 8.9 Hz, 1H, **H3**), 5.35 (s, 1H, **OH-Benzyl**), 4.51 (s, 2H, **H7a,b**).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 160.4 (**C5**), 139.6 (**C2**), 130.3 (**C1**), 124.0 (**C4**), 122.7 (**C6**), 114.7 (**C3**), 57.4 (**C7**).

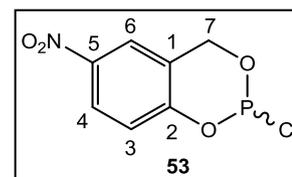
IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3457, 3072, 2997, 2953, 2892, 2810, 2754, 2617, 2564, 1923, 1617, 1591, 1484 1331, 1289, 1194, 1085, 987, 905, 843, 734, 491.

MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 152.0348 [M-OH]⁺, gef.: 152.0343 [M-OH]⁺.

5.2.3.2 Synthese von 5-Nitro-cycloSaligenylchlorphosphit 53

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt, um Feuchtigkeit und Sauerstoff auszuschließen. Es wurden 1.00 g (5.93 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Nitrosalicylalkohol **55** zunächst 1 h im Ölpumpenvakuum getrocknet und anschließend in 60 mL abs. Diethylether gelöst. Die Lösung wurde auf -20 °C gekühlt und bei dieser Temperatur wurden 650 µL (7.19 mmol, 1.2 Äquiv.) frisch destilliertes Phosphor(III)-chlorid zu dem Reaktionsansatz getropft und 10 Minuten gerührt. Anschließend wurden über einen Zeitraum von 2 h 1.05 mL (13.0 mmol, 2.2 Äquiv.) abs. Pyridin in 20 mL abs. Diethylether ebenfalls bei -20 °C dazu getropft. Nach Beendigung der Zugabe wurde die Reaktionslösung weitere 60 Minuten bei Rt gerührt und anschließend über Nacht bei -18 °C gelagert, um ein möglichst vollständiges Ausfallen des Pyridiniumchlorids zu gewährleisten. Es wurde unter Inertgas filtriert und das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Aufgrund der Instabilität des Produktes wurde das erhaltene Öl in der folgenden Reaktion ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Ausbeute: 799 mg (3.42 mmol, 57%) eines gelblichen Öls als Gemisch zweier Enantiomere (Rohprodukt) **Summenformel:** C₇H₅ClNO₄P; **Molekulargewicht:** 233.55 g/mol; **DC:** R_F-Wert: (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1 v/v) 0.55.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.18 (dd, ³J_{H,H} = 8.9 Hz, ⁴J_{H,H} = 2.8 Hz, 1H, **H4**), 7.98 (d, ⁴J_{H,H} = 2.8 Hz, 1H, **H6**), 7.13 (d, ³J_{H,H} = 9.1 Hz, 1H, **H3**), 5.52 (dd, ²J_{H,H} = 14.6 Hz, ³J_{H,P} = 2.7 Hz, 1H, **H7a**), 5.14 (dd, ²J_{H,H} = 14.6 Hz, ³J_{H,P} = 9.8 Hz, 1H, **H7b**).

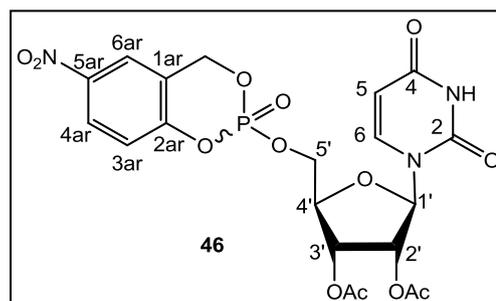
³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃ entkoppelt): δ [ppm] = 139.2.

5.2.4 Darstellung von *cycloSal*-Triestern

5.2.4.1 Synthese von 5-Nitro-*cycloSal*-2',3'-di-O-acetyluridinmonophosphat **46**

Die Reaktion wurde gemäß **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 228 mg (0.695 mmol, 1.0 Äquiv.) 2',3'-O-Acetyluridin **48** gelöst in 20 mL abs. CH₃CN, 240 µL (1.38 mmol, 2.0 Äquiv.) DIPEA und 350 mg (1.50 mmol, 2.2 Äquiv.) 5-Nitro-*cycloSal*igenylchlorphosphit **53** gelöst in 10 mL abs. CH₃CN verwendet. Die Reaktionszeit betrug 4.5 h. Es wurden 1.71 g (2.79 mmol, 4.0 Äquiv.) Oxone® für die Oxidation eingesetzt. Nach 10 Minuten konnte ein vollständiger Umsatz festgestellt werden. Auf eine säulenchromatographische Reinigung wurde aufgrund der hohen Reinheit des Rohproduktes verzichtet.

Ausbeute: 334 mg (0.618 mmol, (89%)) einer farblosen Warte; **Summenformel:** C₂₀H₂₀N₃O₁₃P; **Molekulargewicht:** 541.36; **DC:** R_F-Wert: (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1 v/v) 0.35; **Diastereomerenverhältnis:** 1:1.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.37 (s, 2H, 2x **NH**), 8.28-8.25 (m, 1H, **H4_{ar}**), 8.25-8.23 (m, 1H, **H4_{ar}**), 8.10-8.08 (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} = 9.2 Hz, 1H, **H3_{ar}**), 7.23 (d, ³J_{HH} = 9.2 Hz, 1H, **H3_{ar}**), 5.95 (d, ³J_{HH} = 5.9 Hz, 1H, **H1'**), 5.93 (d, ³J_{HH} = 5.9 Hz, 1H, **H1'**), 5.74 (d, ³J_{HH} = 8.4 Hz, 1H, **H5**), 5.72 (d, ³J_{HH} = 8.4 Hz, 1H, **H5**), 5.54-5.46 (m, 4H, 2x **CH₂-Bn**), 5.39 (dd, ³J_{HH} = 5.6 Hz, ³J_{HH} = 4.4 Hz, 1H, **H3'**), 5.33 (dd, ³J_{HH} = 5.6 Hz, ³J_{HH} = 4.4 Hz, 1H, **H3'**), 5.30-5.25 (m, 2H, 2x **H2'**), 4.63-4.54 (m, 2H, **H5'a**), 4.52-4.42 (m, 2H, **H5'b**), 4.35-4.30 (m, 2H, 2x **H4'**), 2.13, 2.11 (2x s, 2x 3H, **Acetyl-CH₃**), 2.09 (s, 6H, **Acetyl-CH₃**).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 169.8 (4x **C_q-Acetyl**), 162.7 (2x **C4**), 154.7 (2x **C2_{ar}**), 150.1 (2x **C2**), 140.3, 140.2 (2x **C6**), 139.2 (2x **C5_{ar}**), 126.0, 125.9 (2x **C4_{ar}**), 121.9 (2x **C6_{ar}**), 120.0 (d, ³J_{C,P} = 8.9 Hz, **C3_{ar}**), 119.8 (d, ³J_{C,P} = 8.9 Hz, **C3_{ar}**), 103.5, 103.5 (2x **C5**), 88.7, 88.4 (2x **C1'**), 80.6, 80.5 (2x **C4'**), 72.8, 72.7 (2x **C2'**), 69.7 (2x **C3'**), 68.4 (d, ²J_{C,P} = 7.0 Hz, **CH₂-Bn**), 68.1 (d, ²J_{C,P} = 7.0 Hz, **CH₂-Bn**), 67.7, 67.7 (2x **C5'**), 20.6, 20.6, 20.5, 20.5 (4x **Acetyl-CH₃**).

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃) δ/ppm: -10.3, -10.7.

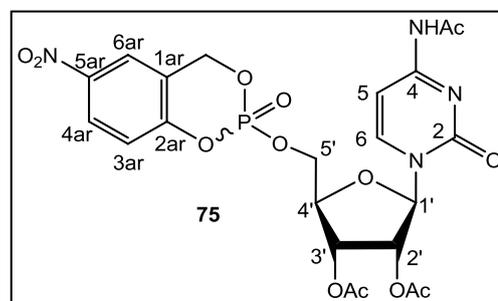
IR: [cm⁻¹] = 3460, 3069, 2985, 2953, 2893, 2753, 2617, 2413, 1744, 1590, 1484 1332, 1244, 1085, 905.

MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 542.0807 [M+H]⁺, 546.0626 [M+Na]⁺, gef.: 542.0809 [M+H]⁺, 564.0631 [M+Na]⁺.

5.2.4.2 Synthese von 5-Nitro-cycloSal-N⁴-acetyl-2',3'-di-O-acetycytidinmonophosphat **75**

Die Darstellung erfolgte nach **AAV 3**. Es wurden 250 mg (0.677 mmol, 1.0 Äquiv.) N⁴-Acetyl-2',3'-di-O-acetycytidin **64** gelöst in 10 mL abs. CH₃CN, 240 µL (1.38 mmol, 2.0 Äquiv.) DIPEA und 316 mg (1.35 mmol, 2.0 Äquiv.) 5-Nitro-cycloSaligenylchlorphosphit **53** gelöst in 10 mL abs. CH₃CN verwendet. Die Reaktionszeit betrug 5 h. Es wurden 1.67 g (2.72 mmol, 4.0 Äquiv.) Oxone® für die Oxidation eingesetzt. Nach 20 Minuten konnte ein vollständiger Umsatz festgestellt werden.

Ausbeute: 260 mg (0.446 mmol, 59%) einer farblosen Watte; **Summenformel:** C₂₂H₂₃N₄O₁₃P; **Molekulargewicht:** 582.41; **DC:** R_f-Wert: (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1 v/v) 0.80; **Diastereomerenverhältnis:** 1:1.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.91 (s, 2H, 2x **NHAc**), 8.26-8.19 (m, 2H, **H4_{ar}**), 8.08-8.05 (m, 2H, **H6_{ar}**), 7.78 (d, ³J_{HH} = 7.5 Hz, 1H, **H6**), 7.74 (d, ³J_{HH} = 7.5 Hz, 1H, **H6**), 7.29-7.26 (m, 2H, **H5**), 7.25-7.20 (m, 2H, **H3_{ar}**), 5.94 (d, ³J_{HH} = 3.8 Hz, 1H, **H1'**), 5.84 (d, ³J_{HH} = 3.6 Hz, 1H, **H1'**), 5.60 (dd, ²J_{HH} = 14.5 Hz, ³J_{HH} = 9.0 Hz, 1H, **CH₂-Bn**), 5.53-5.39 (m, 6H, 3H **CH₂-Bn**, 2x **H2'**, 1x **H3'**), 5.54-5.46 (m, 4H, 2x **CH₂-Bn**), 5.38-5.34 (m, 1H, **H3'**), 4.68-4.61 (m, 2H, **H5'a**), 4.54-4.46 (m, 2H, **H5'b**), 4.41-4.34 (m, 2H, 2x **H4'**), 2.23 (s, 2x 3H, 2x **Acetyl-CH₃**), 2.11-2.09 (m, 9H, 3x **Acetyl-CH₃**), 2.08 (s, 3H, **Acetyl-CH₃**).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 169.7, 169.7, 169.6 (6x **C_q-Acetyl**), 144.4, 144.3 (2x **C6**), 126.0, 125.9 (2x **C4_{ar}**), 122.0, 121.9 (2x **H6_{ar}**), 119.9, 199.8 (2x **H3_{ar}**) 96.9, 96.8 (2x **H5**), 91.5 (**C1'**), 90.9 (**C1'**), 80.5 (d, ³J_{C,P} = 6.4 Hz, **C4'**), 80.3 (d, ³J_{C,P} = 7.5 Hz, **C4'**), 73.8, 73.7 (2x **C2'**), 69.4, 69.1 (2x **C3'**), 68.4 (d, ²J_{C,P} = 7.1 Hz, **CH₂-Bn**), 67.2 (d, ²J_{C,P} = 5.3 Hz, **CH₂-Bn**), 25.1 (s, 3H, **N-Acetyl-CH₃**), 20.6, 20.6, 20.6 (3x s, je 3H, 3x **O-Acetyl-CH₃**).

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃) δ/ppm: -10.6, -10.7.

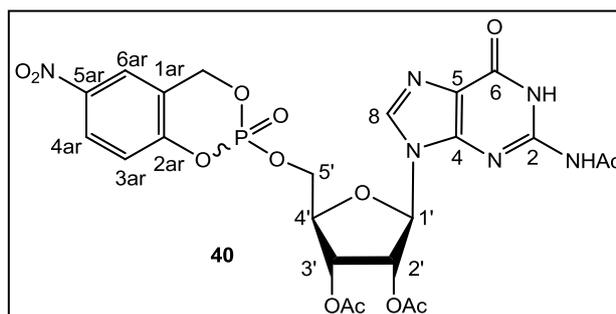
IR: [cm⁻¹] = 2923, 1749, 1626, 1487 1317, 1233, 1032, 909.

MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 583.1072 [M+H]⁺, gef.: 583.1093 [M+H]⁺.

5.2.4.3 Synthese von 5-Nitro-cycloSal-*N*²-acetyl-2',3'-di-*O*-acetylguanosinmonophosphat **40**

Die Reaktion wurde gemäß **AAV 3** durchgeführt. Es wurden 215 mg (0.525 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*²-Acetyl-2',3'-di-*O*-acetylguanosin **47** gelöst in 20 mL abs. CH₃CN, 182 µL (0.105 mmol, 2.0 Äquiv.) DIPEA und 250 mg (1.07 mmol, 2.0 Äquiv.) 5-Nitro-cycloSaligenylchlorphosphit **53** gelöst in 4 mL abs. CH₃CN verwendet. Die Reaktionszeit betrug 5 h gerührt. Es wurden 1.34 g (2.18 mmol, 4.2 Äquiv.) Oxone® für die Oxidation eingesetzt. Nach 10 Minuten konnte ein vollständiger Umsatz festgestellt werden.

Ausbeute: 167 mg (0.267 mmol, 60%) einer farblosen Watte; **Summenformel:** C₂₃H₂₃N₆O₈P; **Molekulargewicht:** 622.43 g/mol; **DC:** R_F-Wert: (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1 v/v) 0.67; **Diastereomerenverhältnis:** 1:1.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 12.3 (s, 2H, 2x **NH**), 10.7 (2x s, 2x 1H, 2x **NHAc**), 8.45-8.37 (m, 2H, 2x **H4_{ar}**), 8.31-8.22 (m, 2H, 2x **H6_{ar}**), 8.12-8.07 (m, 2H, 2x **H8**), 7.32 (d, ³J_{H,H} = 9.1 Hz, 1H, **H3_{ar}**), 7.17 (d, ³J_{H,H} = 9.1 Hz, 1H, **H3_{ar}**), 6.17-6.09 (m, 2H, 2x **H2'**), 6.07-5.98 (m, 2H, 2x **H1'**), 5.75-5.68 (m, 2H, 2x **H3'**), 5.61-5.53 (m, 2H, **CH₂-Bn**), 5.48 (d, ³J_{H,H} = 14.0 Hz, 2H, **CH₂-Bn**), 4.84-4.75 (m, 2H, 2x **H5'a**), 4.68-4.59 (m, 1H, 1x **H5'b**), 4.58-4.50 (m, 1H, 1x **H5'b**), 4.48-4.40 (m, 2H, 2x **H4'**), 2.28, 2.16, 2.08 (je s, je 6H, je 2x **Acetyl-CH₃**).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 173.1, 173.1 170.0, 169.9, 169.6, 169.5 (6x **C_q-Acetyl**), 155.4 (2x **C6**), 154.4 (2x **C5_{ar}**), 148.2 (2x **C2**), 147.9 (2x **C4**), 144.4 (2x **C2_{ar}**), 140.4 (2x **C8**), 126.1 (2x **C4_{ar}**), 122.5 (2x **C5**), 121.9 (2x **C6_{ar}**), 121.6, 121.5 (2x **C1_{ar}**), 120.1 (d, ³J_{C,P} = 9.3 Hz, **C3_{ar}**), 120.0 (d, ³J_{C,P} = 9.3 Hz, **C3_{ar}**), 88.0 (2x **C1'**), 81.3 (d, ³J_{C,P} = 8.5 Hz, **C4'**), 81.2 (d, ³J_{C,P} = 8.5 Hz, **C4'**), 72.0 (2x **C2'**), 71.1 (2x **C3'**), 68.3 (d, ²J_{C,P} = 7.2 Hz, **CH₂-Bn**), 68.2 (d, ²J_{C,P} = 7.2 Hz, **CH₂-Bn**), 67.9 (2x **C5'**), 24.2 (**NHAc**), 20.7, 20.5 (2x **Acetyl-CH₃**).

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: -10.3, -10.7.

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3143, 2944, 1749, 1681, 1610, 1560, 1484, 1236, 1030, 906, 748, 436.

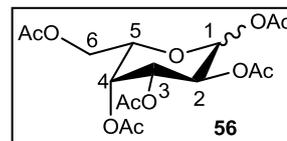
MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 623.1133 [M+H]⁺, 645.0953 [M+Na]⁺ gef.: 623.1146 [M+H]⁺, 645.0960 [M+Na]⁺.

5.2.5 Darstellung des modifizierten β -L-Galactopyranosylphosphates 31

5.2.5.1 Synthese von 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-L-galactopyranose 56

Es wurden 13.0 g (73.0 mmol, 1.0 Äquiv.) umkristallisiertes L-Galactono-1,4-lacton **32** in 340 mL H₂O und 80 mL CH₃OH gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit Amberlite® IR 120 (H⁺) versetzt bis ein pH-Wert von 3 erreicht war. Anschließend wurden portionsweise 2.78 g (73.4 mmol, 1.0 Äquiv.) Natriumborhydrid dazu gegeben. Der pH-Wert wurde während der Zugabe zwischen 3-5 gehalten. Der Reaktionsansatz wurde nach Beendigung der Zugabe 48 h bei Rt gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (CH₂Cl₂/CH₃OH 7:3 v/v). Auch nach 48 h Reaktionszeit konnte kein vollständiger Umsatz festgestellt werden. Der Reaktionsansatz wurde filtriert und das Lösungsmittel im Membranpumpenvakuum entfernt. Anschließend wurde der Rückstand fünfmal mit CH₃OH coevaporiert, um die bei der Reaktion entstandene Boronsäure vollständig zu entfernen. Die anschließende Peracetylierung erfolgte nach **AVV 4**. Es wurden 105 mL (113 g, 1.11 mol, 15 Äquiv.) Essigsäureanhydrid und 100 mL Pyridin verwendet. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch mit PE/EE 1:1 v/v als Elutionsmittel.

Ausbeute: 15.9 g (0.0272 mol, 56% über zwei Stufen) eines farblosen Öls; **Summenformel:** C₁₆H₂₂O₁₁; **Molekulargewicht:** 390.34 g/mol; **DC:** R_F-Wert: (PE/EE 1:1 v/v) 0.64; **Anomerenverhältnis:** $\alpha/\beta \sim 2/1$.



α,β -¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.38 (d, 1H, ³J_{H,H} = 1.5 Hz, **H1 α**), 5.70 (d, 1H, ³J_{H,H} = 8.4 Hz, **H1 β**), 5.51-5.48 (m, 1H, **H3 α**), 5.43-5.41 (m, 1H, **H3 β**), 5.36-5.33 (m, 3H, **H2 α** , **H2 β** , **H5 β**), 5.08 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 11.7 Hz, ³J_{H,H} = 10.5 Hz, ³J_{H,H} = 3.3 Hz, **H6a, β**), 4.37-4.31 (m, 1H, **H4 α**), 4.27 (ddd, 1H, ²J_{H,H} = 11.7 Hz, ³J_{H,H} = 5.1 Hz, ³J_{H,H} = 2.9 Hz, **H6a- β**), 4.17-4.03 (m, 3H, **H5 α** , **H6a,b- α**), 3.86 (ddd, 1H, ²J_{H,H} = 11.7 Hz, ³J_{H,H} = 7.2 Hz, ³J_{H,H} = 7.2 Hz, **H6b- β**), 2.16, 2.16 2.12, 2.04, 2.02, 2.00, 1.99 (7x s, 10x 3H, 10x **Acetyl-CH₃**).

α,β -¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 100.1 (**C1 β**), 89.9 (**C1 α**), 74.5 (**C5 α**), 73.7 (**C5 β**), 68.9 (**C4 β**), 67.7 (**C4 α**), 67.5, 67.5, 66.6, (**C2 α,β** , **C3 α,β**), 62.3 (**C6 β**), 61.4 (**C6 α**).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2980, 1741, 1434, 1369, 1205, 1042, 930, 600.

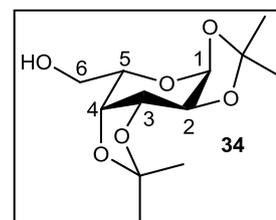
MS(ESI⁺): m/z (%):ber.: 413.1054 [M+Na]⁺, gef.: 413.1063 [M+Na]⁺.

5.2.5.2 Synthese von 1,2:3,4-Di-O-isopropyliden-L-galactopyranose 34

Zur Entfernung aller Acetylschutzgruppen wurden 5.94 g (15.2 mmol, 1.0 Äquiv.) 1,2,3,4,6-Penta-O-acetyl-L-galactopyranose **56** in 44 mL CH₃OH/H₂O/Et₃N 7:3:1 gelöst und bei Rt über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde weitestgehend im Membranpumpenvakuum entfernt. Der Rückstand wurde in H₂O aufgenommen und gefriergetrocknet. Der erhaltene

Rückstand wurde in wenig CH₃OH suspendiert und mit CH₂Cl₂ versetzt. Der erhaltene farblose Feststoff wurde filtriert und der orangefarbene Rückstand erneut in H₂O gelöst und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde wie zuvor suspendiert und der farblose Feststoff filtriert. Der erhaltene farblose Rückstand wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt und hierzu in 40 mL Aceton suspendiert, mit 14.0 mL (11.9 g, 114 mmol, 7.5 Äquiv.) 2,2-Dimethoxypropan und einer katalytischen Menge *p*-Toluolsulfonsäure versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 20 h (DC-Kontrolle PE/EE 1:1 v/v) wurde die Lösung mit ges. NaHCO₃-Lösung neutralisiert, wobei ein farbloser Feststoff ausfiel. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand wurde in EE aufgenommen und zweimal mit H₂O gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und wiederum das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde zweimal säulenchromatographisch an Kieselgel mit PE/EE (1:1 v/v) und 0.1% Et₃N als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 2.34 g (8.99 mol, 59% über zwei Stufen) eines farblosen Öls; **Summenformel:** C₁₂H₂₀O₆; **Molekulargewicht:** 260.28 g/mol; **DC:** R_F-Wert: (PE/EE 1:1 v/v) 0.40; **Anomerenverhältnis:** α-anomerenrein; **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25} : +52.3^\circ$ (c = 1.00, CH₂Cl₂).



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.57 (d, 1H, ³J_{H,H} = 5.0 Hz, **H1**), 4.62 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 7.9 Hz, ³J_{H,H} = 2.4 Hz, **H3**), 4.34 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 5.0 Hz, ³J_{H,H} = 2.4 Hz, **H2**), 4.28 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 7.9 Hz, ³J_{H,H} = 1.5 Hz, **H4**), 3.89-3.85 (m, 2H, **H5**, **H6a**), 3.77-3.72 (m, 1H, **H6b**), 1.54, 1.46, 1.34, 1.34 (4x s, 4x 3H, **isoProp-CH₃**).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 109.6, 108.8, (2x **C_q-isoProp**), 96.4 (**C1**), 71.5 (**C4**), 70.9 (**C3**), 70.7 (**C2**), 68.2 (**C5**), 62.5 (**C6**), 26.2, 26.1, 25.1, 24.4 (**isoProp-CH₃**).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3480, 2986, 2936, 1457, 1372, 1253, 1063, 998, 852, 510.

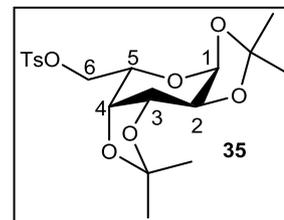
MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 283.1152 [M+Na]⁺, gef.: 283.1156 [M+Na]⁺.

5.2.5.3 Synthese von 1,2:3,4-Di-O-isopropyliden-6-O-*para*-toluolsulfonyl-L-galactopyranose 35

Es wurden 318 mg (1.22 mmol, 1.0 Äquiv.) 1,2:3,4-Di-O-isopropyliden-L-galactopyranose **34** in 3.0 mL Pyridin gelöst und mit 304 mg (2.49 mmol, 2.0 Äquiv.) 4-(Dimethylamino)-pyridin versetzt. Zu dieser Lösung wurden 354 mg (1.86 mmol, 1.5 Äquiv.) *p*-Toluolsulfonylchlorid gelöst in 1.0 mL CH₂Cl₂ getropft. Der Reaktionsansatz wurde 20 h bei Rt gerührt. Nach vollständiger Umsetzung des Eduktes (DC-Kontrolle PE/EE 2:1 v/v) wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde zunächst zweimal mit Toluol coevaporiert und

anschließend in EE und H₂O aufgenommen. Die organische Phase wurde mit einer 0.5 M Schwefelsäure, ges. NaHCO₃-Lösung, NaCl-Lösung und zweimal mit H₂O gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit PE/EE (2:1 v/v) als Eluent gereinigt.

Ausbeute: 400 mg (0.965 mmol, 79%) eines farblosen Wachses;
Summenformel: C₁₉H₂₆O₈; **S** **Molekulargewicht:** 414.47 g/mol; **DC:**
R_f-Wert: (PE/EE 2:1 v/v) 0.31; **Anomerenverhältnis:** α-anomeren-
 rein; **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25}$: +61.4° (c = 1.00, CH₂Cl₂).



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.81 (d, 2H, ³J_{H,H} = 8.3 Hz, **H_{Ar}**), 7.33 (d, 2H, ³J_{H,H} = 8.3 Hz, **H_{Ar}**), 5.45 (d, 1H, ³J_{H,H} = 5.1 Hz, **H1**), 4.58 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 7.9 Hz, ³J_{H,H} = 2.6 Hz, **H3**), 4.29 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 5.0 Hz, ³J_{H,H} = 2.6 Hz, **H2**), 4.23-4.17 (m, 2H, H4, **H6a**), 4.14-4.02 (m, 2H, **H5**, **H6b**), 2.44 (s, 3H, **Ts-CH₃**), 1.50, 1.34, 1.31, 1.28 (4x s, 4x 3H, **isoProp-CH₃**).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 144.9 (**C_q-Ts**), 129.9, 128.3, (**C_{Ar}**), 96.3 (**C1**), 70.7 (**C3**), 70.6 (**C2**), 70.5 (**C4**), 68.3 (**C6**), 66.0 (**C5**), 26.1, 26.0, 25.1, 24.5 (**isoProp-CH₃**), 21.8 (**CH₃-Ts**).

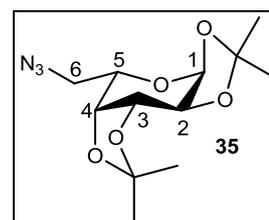
IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2992, 2958, 2936, 1739, 1598, 1457, 1359, 1190, 1095, 1012, 969, 552.

MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 437.1241 [M+Na]⁺, gef.: 437.1244 [M+Na]⁺.

5.2.5.4 Synthese von 6-Azido-1,2:3,4-di-O-isopropyliden-α-L-galactopyranose 36

Es wurden 1.20 g (2.90 mmol, 1.0 Äquiv.) 1,2:3,4-Di-O-isopropyliden-6-O-*para*toluolsulfonyl-L-galactopyranose **35** in 20 mL abs. DMF gelöst und mit 1.05 g (16.2 mmol, 5.6 Äquiv.) Natriumazid versetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit Hilfe eines Mikrowellenreaktors bei 150 W und 110 °C zum Sieden erhitzt und 3 h gerührt. Nach vollständiger Umsetzung des Eduktes (DC: PE/EE 2:1 v/v) wurde die Reaktionslösung mit EE versetzt und je zweimal mit H₂O und mit einer ges. Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch mit PE/EE 2:1 v/v als Eluent.

Ausbeute: 763 mg (2.67 mmol, 93%) eines farblosen Öls;
Summenformel: C₁₂H₁₉N₃O₅; **Molekulargewicht:** 285.30 g/mol; **DC:**
R_f-Wert: (PE/EE 2:1 v/v) 0.67; **Anomerenverhältnis:** α-anomerenrein;
Drehwert: $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25}$: +104° (c = 1.00, CH₂Cl₂).



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.55 (d, 1H, ³J_{H,H} = 5.1 Hz, **H1**), 4.63 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 7.9 Hz, ³J_{H,H} = 2.5 Hz, **H3**), 4.33 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 5.0 Hz, ³J_{H,H} = 2.5 Hz, **H2**), 4.20 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 7.9 Hz, ³J_{H,H} = 2.0 Hz, **H4**), 3.92 (ddd, 1H, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, ³J_{H,H} = 5.4 Hz, ³J_{H,H} = 1.9 Hz, **H5**), 3.51 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.7 Hz, ³J_{H,H} = 7.8 Hz, **H6a**), 3.36 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.7 Hz, ³J_{H,H} = 5.4 Hz, **H6b**), 1.55, 1.46, 1.35, 1.34 (4x s, 4x 3H, **isoProp-CH₃**).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 109.8, 109.0, (2x **C_q-isoProp**), 96.5 (**C1**), 71.3 (**C4**), 71.0 (**C3**), 70.6 (**C2**), 67.1 (**C5**), 50.8 (**C6**), 26.2, 26.1, 25.0, 24.6 (**isoProp-CH₃**).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2988, 2936, 2874, 2099, 1738, 1455, 1373, 1209, 1166, 1065, 1003, 889, 510.

MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 308.1217 [M+Na]⁺, gef.: 308.1224 [M+Na]⁺.

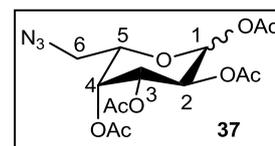
5.2.5.5 Synthese von 1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-6-azido-L-galactopyranose 37

Es wurden 248 mg (0.869 mmol, 1.0 Äquiv.) 6-Azido-1,2:3,4-di-O-isopropyliden-L-galactopyranose **36** in 4 mL CH₃CN/H₂O (1/1 v/v) gelöst und mit einer katalytischen Menge konz. Schwefelsäure versetzt. Der Reaktionsansatz wurde zum starken Sieden erhitzt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch mit PE/EE 2:1 (v/v). Nach 2 h war ein vollständiger Umsatz des Eduktes zu erkennen. Die Reaktionslösung wurde mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung umgesetzt. Die Acetylierung erfolgte nach **AAV 4**. Es wurden 8 mL Pyridin und 1.01 mL (10.4 mmol, 12 Äquiv.) Essigsäureanhydrid verwendet. Die Reaktionszeit betrug 18 h. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch mit PE/EE 1:1 (v/v) als Eluent.

Ausbeute: 323 mg (0.865 mmol, 99%) eines farblosen Öls;

Summenformel: C₁₄H₁₉N₃O₉; **Molekulargewicht:** 373.32 g/mol; **DC:**

R_f-Wert: (PE/EE 1:1 v/v) 0.55; **Anomerenverhältnis:** α/β 1:2.



α-¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.41-6.38 (m, 1H, **H1**), 5.48-5.47 (m, 1H, **H4**), 5.37-5.29 (m, 2H, **H2**, **H3**), 4.23 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, **H5**), 3.44 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.8 Hz, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, **H6a**), 3.22 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.8 Hz, ³J_{H,H} = 5.5 Hz, **H6b**), 2.17, 2.17, 2.02, 2.00 (4x s, 4x 3H, **Acetyl-CH₃**).

β-¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.71 (d, 1H, ³J_{H,H} = 8.2 Hz, **H1**), 5.41 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 3.5 Hz, ³J_{H,H} = 3.5 Hz, **H4**), 5.37-5.29 (m, 1H, **H2**), 5.08 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 10.3 Hz, ³J_{H,H} = 3.4 Hz, **H3**), 3.94 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 6.4 Hz, ³J_{H,H} = 6.4 Hz, **H5**), 3.52 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 13.0 Hz, ³J_{H,H} = 13.0 Hz, **H6a**), 3.22 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 13.0 Hz, ³J_{H,H} = 5.5 Hz, **H6b**), 2.18, 2.12, 2.05, 1.99 (4x s, 4x 3H, **Acetyl-CH₃**).

α,β-¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 170.2, 170.2, 169.5, 169.0 (4x **C_q-Acetyl**), 92.3 (**C1β**), 89.8 (**C1α**), 73.3 (**C5β**), 71.0 (**C3β**), 70.3 (**C5α**), 68.3 (**C4α**), 67.8 (**C4β**), 67.6 (**C2β**),

67.5 (**C2 α**), 66.5 (**C3 α**), 50.4 (**C6 α**), 50.2 (**C6 β**), 21.0, 20.9, 20.8, 20.8, 20.8, 20.8, 20.8, 20.7 (3x **Acetyl-CH₃**).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2980, 2940, 2103, 1743, 1433, 1369, 1205, 1050, 934.

MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 396.1014 [M+Na]⁺, gef.: 396.1018 [M+Na]⁺.

5.2.5.6 Synthese von 2,3,4-Tri-O-acetyl-6-azido-6-desoxy- α -L-galactopyranosylbromid **38**

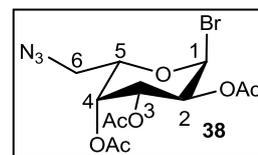
Es wurden 317 mg (0.849 mmol, 1.0 Äquiv.) 1,2,3,4-Tetra-O-acetyl-6-azido-L-galactopyranose **37** in 10 mL CH₃Cl/EE 9:1 (v/v) gelöst und bei 0 °C portionsweise mit 976 mg (2.66 mmol, 3.1 Äquiv.) Titan(IV)-bromid versetzt. Der Reaktionsansatz wurde bis zur vollständigen Umsetzung des Eduktes bei Rt gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch mit PE/EE 1:1 (v/v). Nach 6 h wurde der Reaktionsansatz in CH₂Cl₂ aufgenommen und einmal mit H₂O, einmal mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und wiederum einmal mit H₂O gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch mit PE/EE 1:1 v/v + 0.5% Et₃N als Eluent.

Ausbeute: 187 mg (0.474 mmol, 56%) eines farblosen Öls;

Summenformel: C₁₂H₁₆N₃O₇; **Molekulargewicht:** 394.18 g/mol; **DC:**

R_F-Wert: (PE/EE 1:1 v/v) 0.79; **Anomerenverhältnis:** α -anomerenrein;

Drehwert: [α]_{589nm}²⁵: -190° (c = 1.01, CH₂Cl₂).



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.71 (d, 1H, ³J_{H,H} = 4.1 Hz, **H1**), 5.49 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 3.3 Hz, ³J_{H,H} = 1.0 Hz, **H4**), 5.39 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 10.7 Hz, ³J_{H,H} = 3.3 Hz, **H3**), 5.04 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 10.7 Hz, ³J_{H,H} = 4.0 Hz, **H2**), 4.39 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, **H5**), 3.49 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.9 Hz, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, **H6a**), 3.28 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.9 Hz, ³J_{H,H} = 5.2 Hz, **H6b**), 2.16, 2.11, 2.01 (3x s, 3x 3H, **Acetyl-CH₃**).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 170.2, 170.0, 169.8, (3x **C_q-Acetyl**), 87.0 (**C1**), 72.4 (**C5**), 68.1 (**C3**), 67.8 (**C2**), 67.8 (**C4**), 50.1 (**C6**), 20.8, 20.7, 20.7 (3x **Acetyl-CH₃**).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2945, 2103, 1745, 1434, 1391, 1214, 1076, 544, 443, 421.

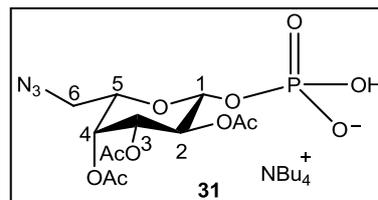
MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 416.0064 [M+Na]⁺, gef.: 416.0065 [M+Na]⁺.

5.2.5.7 Synthese von 2,3,4-Tri-O-acetyl-6-azido-6-desoxy- β -L-galactopyranosylphosphat **31**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 153 mg (0.388 mmol, 1.0 Äquiv.) 2,3,4-Tri-O-acetyl-6-azido-6-desoxy- α -L-galactopyranosylbromid **38** in 0.8 mL abs. Toluol gelöst. Des Weiteren wurden 260 mg (0.766 mmol, 2.0 Äquiv.)

Tetrabutylammoniumphosphat in 2.5 mL abs. CH₃CN über aktiviertem Molsieb gelöst. Das Glycosylbromid **38** wurde zu der Phosphatlösung langsam dazu getropft und der Reaktionsansatz wurde bis zur vollständigen Umsetzung des Eduktes bei 80 °C gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch mit PE/EE 1:1 (v/v). Nach 4 h wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in H₂O aufgenommen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit EE gewaschen und anschließend gefriergetrocknet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch mit CH₃CN/H₂O 5:1 v/v als Eluent.

Ausbeute: 208 mg (0.237 mmol, 61%) eines farblosen Wachses; **Summenformel:** C₂₈H₅₃N₄O₁₁P; **Molekulargewicht:** 652.71 g/mol; **DC:** R_F-Wert: (CH₃CN/H₂O 5:1 v/v) 0.62; **Anomerenverhältnis:** β-anomerenrein; **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25}$: -4.5° (c = 0.990, CH₃OH).



¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm] = 5.51 (d, 1H, ³J_{H,H} = 3.2 Hz, **H4**), 5.34-5.26 (m, 2H, **H1**, **H3**), 5.17 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 10.3 Hz, ³J_{H,H} = 7.9 Hz, **H2**), 4.21 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, **H5**), 3.65 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 13.2 Hz, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, **H6a**), 3.49 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 13.1 Hz, ³J_{H,H} = 5.6 Hz, **H6b**), 3.27-3.19 (m, 8H, (**N((CH₂)₃CH₃)₄**)⁺), 2.28, 2.18, 2.06 (3x s, 3x 3H, **Acetyl-CH₃**), 1.74-1.63 (m, 8H, (**N((CH₂)₃CH₃)₄**)⁺), 1.40 (sx, 8H, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, (**N((CH₂)₃CH₃)₄**)⁺), 0.98 (t, 12H, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, (**N((CH₂)₃CH₃)₄**)⁺).

¹³C-NMR (101 MHz, D₂O): δ [ppm] = 95.4 (**C1**), 72.1 (**C5**), 71.9 (**C3**), 71.3 (**C2**), 68.4 (**C4**), 58.2 ((**N((CH₂)₃CH₃)₄**)⁺), 49.8 (**C6**), 23.1 ((**N((CH₂)₃CH₃)₄**)⁺), 19.2 ((**N((CH₂)₃CH₃)₄**)⁺), 12.8 ((**N((CH₂)₃CH₃)₄**)⁺).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O, entkoppelt): δ [ppm] = -1.48.

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2960, 2874, 2106, 1746, 1368, 1221, 1064, 820, 496.

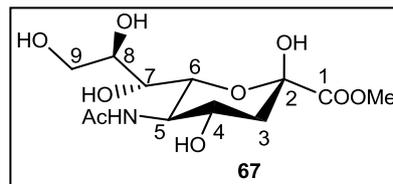
MS(ESI): m/z (%): ber.: 410.0606 [M-H]⁻, gef.: 410.0615 [M-H]⁻.

5.2.6 Darstellung von Neuraminsäure-Derivaten

5.2.6.1 Synthese von Methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy-β-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylat **67**

Es wurden 3.04 g (9.83 mmol, 1.0 Äquiv) *N*-Acetylneuraminsäure **14** in 405 mL abs. CH₃OH suspendiert und mit 3.03 g gewaschenem Ionentauscher (Amberlite® IR 120 (H⁺)) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 24 h bei Rt gerührt. Nach vollständiger Umsetzung des Eduktes (DC-Kontrolle EtOH/AcOH/H₂O 4:1:1 v/v) wurde der Ionentauscher durch Filtration abgetrennt und anschließend das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt.

Ausbeute: 3.01 mg (9.31 mmol, 95%) eines farblosen Feststoffes; **Summenformel:** C₁₂H₂₁NO₉; **Molekulargewicht:** 323.30 g/mol; **DC:** R_F-Wert: 0.77 (EtOH/AcOH/H₂O 4:1:1 v/v); **Anomerenverhältnis:** β-anomerenrein;



Drehwert: $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25}$: -25° (c = 1.00, CH₃OH); **Schmelzpunkt:** 179 °C.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 4.08-3.97 (m, 2H, **H4**, **H6**), 3.85-3.79 (m, 2H, **H5**, **H9a**), 3.78 (s, 3H, **OCH₃**), 3.73-3.67 (m, 1H, **H8**), 3.62 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 11.0 Hz, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, **H9b**), 3.48 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 9.2 Hz, ³J_{H,H} = 1.4 Hz, **H7**), 2.22 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.9 Hz, ³J_{H,H} = 4.9 Hz, **H3eq**), 2.01 (s, 3H, **Acetyl-CH₃**), 1.89 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.9 Hz, ³J_{H,H} = 11.3 Hz, **H3ax**).

¹³C-NMR (101 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 175.1 (**C_q-Acetyl**), 171.8 (**C1**), 96.7 (**C2**), 72.1 (**C6**), 71.7 (**C8**), 70.2 (**C7**), 67.9 (**C4**), 64.9 (**C9**), 54.4 (**C5**), 53.1 (**OCH₃**), 40.7 (**C3**), 22.6 (**Acetyl-CH₃**).

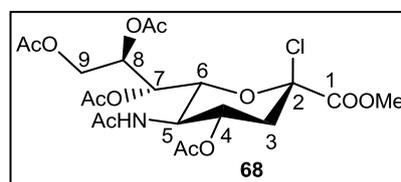
IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3273, 2951, 1738, 1632, 1553, 1435, 1375, 1272, 1024, 941, 892, 581.

MS(ESI⁺): m/z (%): ber.: 346.1109 [M+Na]⁺, gef.: 346.1111 [M+Na]⁺.

5.2.6.2 Synthese von Methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-2-chlor-3,5-dideoxy-β-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylat **68**

Es wurden 8.38 g (25.9 mmol, 1.0 Äquiv) *N*-Acetylneuraminsäuremethylester **67** bei 0 °C in 210 mL Acetylchlorid suspendiert und für 48 h bei Rt in einer geschlossenen Reaktionsapparatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1 v/v). Zum Abbruch der Reaktion wurde das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Der farblose Rückstand wurde anschließend ohne weitere Reinigung nach **AAV 5** zum Zuckerchlorid **68** umgesetzt. Es wurden 100 mL Acetylchlorid und 2.40 mL abs. CH₃OH verwendet. Die Reaktionszeit betrug 20 h.

Ausbeute: 12.8 g (25.1 mmol, 97%) eines farblosen Feststoffes; **Summenformel:** C₂₀H₂₈ClNO₁₂; **Molekulargewicht:** 509.89 g/mol; **DC:** R_F-Wert: 0.55 (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1 v/v); **Anomerenverhältnis:** β-anomerenrein; **Drehwert:**



$[\alpha]_{589\text{nm}}^{25}$: -40 ° (c = 1.04, CH₃OH); **Schmelzpunkt:** 63 °C.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.54-5.43 (m, 2H, **NHAc**, **H7**), 5.39 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 10.8 Hz, ³J_{H,H} = 4.5 Hz, **H4**), 5.18 (ddd, 1H, ³J_{H,H} = 6.1 Hz, ³J_{H,H} = 6.1 Hz, ³J_{H,H} = 2.7 Hz, **H8**), 4.44 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.6 Hz, ³J_{H,H} = 2.7 Hz, **H9a**), 4.37 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 10.9 Hz, ³J_{H,H} = 1.8 Hz, **H6**), 4.28-4.16 (m, 1H, **H5**), 4.07 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.6 Hz, ³J_{H,H} = 5.9 Hz, **H9b**), 3.88 (s, 3H, **OCH₃**), 2.79 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 13.9 Hz, ³J_{H,H} = 4.8 Hz, **H3eq**), 2.29 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 13.8 Hz, ³J_{H,H} = 11.2 Hz, **H3ax**), 2.13, 2.08, 2.06, 2.06, 1.92 (5x s, 5x, 3H, 5x **Acetyl-CH₃**).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 171.1, 170.5, 170.1, 170.1, 169.7, (5x **C_q-Acetyl**), 165.4 (**C1**), 96.7 (**C2**), 74.0 (**C6**), 70.0 (**C8**), 68.9 (**C7**), 67.0 (**C4**), 62.2 (**C9**), 53.9 (**OCH₃**), 49.0 (**C5**), 40.8 (**C3**), 23.3, 21.1, 20.9, 20.9, 20.9 (5x **Acetyl-CH₃**).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2959, 1743, 1661, 1546, 1436, 1369, 1208, 1032, 596.

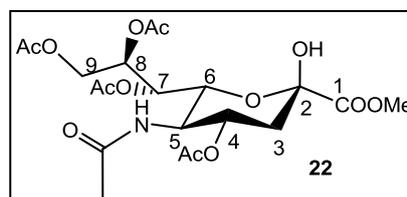
MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 532.1192 [M+Na]⁺, gef.: 532.1188 [M+Na]⁺.

5.2.6.3 Synthese von ^{OAc}NeuN5Ac^{COOMe} **22**

Die Synthese erfolgte nach **AAV 6**. Es wurden 2.00 g (3.92 mmol, 1.0 Äquiv) des Zuckerchlorids **68** gelöst in 100 mL Aceton und 24 mL H₂O und 3.24 g (11.8 mmol, 3.0 Äquiv.) verwendet. Die Reaktionszeit betrug 1 h. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel mit PE/Aceton 1:1 v/v als Eluent.

Ausbeute: 1.17 g (2.38 mmol, 61%) eines farblosen Feststoffes; **Summenformel:** C₂₀H₂₉NO₁₃; **Molekulargewicht:** 491.44 g/mol; **DC:** R_F-Wert: 0.48 (PE/Aceton 1:1 v/v); **Anomerenverhältnis:** β-anomerenrein; **Drehwert:**

[α]_{589nm}²⁵: -6 ° (c = 1.04, CH₃OH) **Schmelzpunkt:** 172 °C.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.61 (d, 1H, ³J_{H,H} = 9.3 Hz, **NHAc**), 5.28 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 5.6 Hz, ³J_{H,H} = 1.5 Hz, **H7**), 5.21-5.10 (m, 2H, **H4**, **H8**), 4.43 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.2 Hz, ³J_{H,H} = 2.5 Hz, **H9a**), 4.15-4.04 (m, 2H, **H5**, **H6**), 3.96 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.3 Hz, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, **H9b**), 3.79 (s, 3H, **OCH₃**), 2.25-2.11 (m, 2H, **H3ax**, **H3eq**), 2.07, 2.03, 1.96, 1.95, 1.83 (5x s, 5x, 3H, 5x **Acetyl-CH₃**).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 171.1, 171.1, 171.0, 170.4, 170.4 (5x **C_q-Acetyl**), 169.1 (**C1**), 95.0 (**C2**), 71.4 (**C8**), 71.2 (**C6**), 69.4 (**C4**), 68.1 (**C7**), 62.8 (**C9**), 53.6 (**OCH₃**), 49.7 (**C5**), 36.2 (**C3**), 23.3, 21.2, 21.0, 20.9, 20.9 (5x **Acetyl-CH₃**).

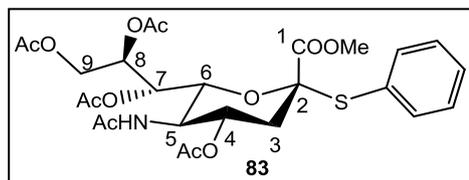
IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3252, 1735, 1650, 1568, 1433, 1366, 1211, 1159, 1129, 1071, 1032, 941, 609.

MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 541.1537 [M+Na]⁺, gef.: 541.1532 [M+Na]⁺.

5.2.6.4 Synthese von Thiophenyl-(methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylat) **83**

Es wurden 202 mg (0.396 mmol, 1.0 Äquiv) des Zuckerchlorids **68** und 155 mg (0.457 mmol, 1.2 Äquiv) TBA-HSO₄ in je 2.5 mL EE und einer 1 M Na₂CO₃-Lösung gelöst. Zu dieser Lösung wurden 300 μ L (2.19 mmol, 7.3 Äquiv.) Thiophenol gegeben. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch (EE) verfolgt. Nach 3 h erfolgte der Abbruch der Reaktion durch Zugabe von EE. Der Reaktionsansatz wurde dreimal mit einer ges. NaCl-Lösung und zweimal mit H₂O gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die erste säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit Diethylether zur Abtrennung des überschüssigen Thiophenols. Nach vollständiger Abtrennung wurde das Produkt mit EE eluiert. Anschließend wurde das Produkt erneut säulenchromatographisch mit CH₂Cl₂/CH₃OH (15:1 v/v) als Elutionsmittel gereinigt.

Ausbeute: 177 mg (0.303 mmol, 77%) eines farblosen Feststoffes; **Summenformel:** C₂₆H₃₃NO₁₂S;
Molekulargewicht: 583.60 g/mol; **DC:** R_F-Wert: 0.60 (CH₂Cl₂/CH₃OH 15:1 v/v); **Anomerenverhältnis:**



α -anomerenrein; **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25}$: +18.5° (c = 1.00, CH₂Cl₂); **Schmelzpunkt:** 143 °C.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.53-7.49 (m, 2H, **H_{ortho}**), 7.42-7.37 (m, 1H, **H_{para}**), 7.36-7.30 (m, 2H, **H_{meta}**), 5.31-5.24 (m, 2H, **H7**, **H8**), 5.22 (d, 1H, ³J_{H,H} = 10.1 Hz, **NHAc**), 4.84 (ddd, 1H, ³J_{H,H} = 11.0 Hz, ³J_{H,H} = 11.0 Hz, ³J_{H,H} = 4.6 Hz, **H4**), 4.39 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.4 Hz, ³J_{H,H} = 2.3 Hz, **H9a**), 4.19 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.4 Hz, ³J_{H,H} = 5.4 Hz, **H9b**), 4.02-3.94 (m, 1H, **H5**), 3.89 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 10.8 Hz, ³J_{H,H} = 1.2 Hz, **H6**), 3.56 (s, 3H, **OCH₃**), 2.81 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.9 Hz, ³J_{H,H} = 4.7 Hz, **H3eq**), 2.13, 2.05, 2.04 (3x s, 3x 3H, 3x **Acetyl-CH₃**), 2.03-1.98 (m, 4H, **H3ax**, **Acetyl-CH₃**), 1.85 (s, 3H, **Acetyl-CH₃**).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 171.1, 170.8, 170.3, 170.2, 170.2 (5x **C_q-Acetyl**), 168.1 (**C1**), 136.6, 130.0, 129.0 (**C_{Ar}**), 128.8 (**C_{q-Ar}**), 87.6 (**C2**), 74.9 (**C6**), 70.1 (**C8**), 69.8 (**C4**), 67.9 (**C7**), 62.2 (**C9**), 52.9 (**OCH₃**), 49.5 (**C5**), 38.3 (**C3**), 23.3, 21.1, 21.0, 20.9, 20.9 (5x **Acetyl-CH₃**).

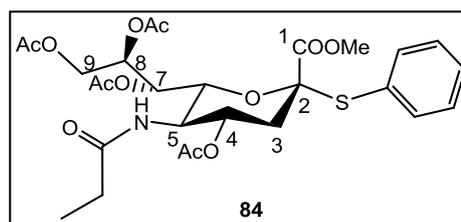
IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3033, 2962, 1738, 1367, 1217, 1034, 752, 693, 594.

MS(ESI⁺): m/z (%): ber.: 584.1796 [M+H]⁺, 606.1616 [M+Na]⁺, gef.: 584.1802 [M+H]⁺, 606.1620 [M+Na]⁺.

5.2.6.5 Synthese von Thiophenyl-(methyl-5-*N*-propanoyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylat) **84**

Die Durchführung erfolgte nach **AVV 7**. Es wurden 402 mg (0.689 mmol, 1.0 Äquiv.) Thioglycosid **83** in 3.2 mL abs. CH₃OH gelöst und mit 410 μ L (6.31 mmol, 9.2 Äquiv.) Methansulfonsäure versetzt. Die Reaktionszeit betrug 18 h. Anschließend wurden 160 μ L (1.25 mmol, 1.8 Äquiv.) Propionsäureanhydrid eingesetzt. Die abschließende Acetylierung erfolgte in 5.0 mL abs. Pyridin mit 800 μ L (8.46 mmol, 12 Äquiv.) Essigsäureanhydrid. Die Reaktionszeit betrug 20 h.

Ausbeute: 91.6 mg (0.153 mmol, 22%) eines farblosen Feststoffes; **Summenformel:** C₂₇H₃₅NO₁₂S; **Molekulargewicht:** 597.63 g/mol; **DC:** R_F-Wert: 0.51 (EE); **Anomerenverhältnis:** α -anomerenrein; **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25}$: +9.5° (c = 1.00, CH₂Cl₂); **Schmelzpunkt:** 61.8 °C.



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.55-7.49 (m, 2H, **H_{ortho}**), 7.43-7.38 (m, 1H, **H_{para}**), 7.36-7.31 (m, 2H, **H_{meta}**), 5.30-5.24 (m, 2H, **H7**, **H8**), 5.08 (d, 1H, ³J_{H,H} = 10.5 Hz, **NHAc**), 4.87 (ddd, 1H, ³J_{H,H} = 11.6 Hz, ³J_{H,H} = 10.6 Hz, ³J_{H,H} = 4.7 Hz, **H4**), 4.39 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.6 Hz, ³J_{H,H} = 2.5 Hz, **H9a**), 4.19 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.6 Hz, ³J_{H,H} = 5.2 Hz, **H9b**), 4.05-3.96 (m, 1H, **H5**), 3.90 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 10.7 Hz, ³J_{H,H} = 1.3 Hz, **H6**), 3.57 (s, 3H, **OCH₃**), 2.82 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.9 Hz, ³J_{H,H} = 4.7 Hz, **H3eq**), 2.14 (s, 3H, **Acetyl-CH₃**), 2.12-1.95 (m, 12H, **H3ax**, 3x **Acetyl-CH₃**, **Propanoyl-CH₂**), 1.06 (t, 3H, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, **Propanoyl-CH₃**).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 174.0 (**C_q-Propanoyl**) 171.1, 170.9, 170.2, 170.1 (4x **C_q-Acetyl**) 168.1, (**C1**), 136.6, 130.0, 129.0 (**C_{Ar}**) 128.8 (**C_{q-Ar}**), 87.7 (**C2**), 75.0 (**C6**), 70.1 (**C8**), 69.7 (**C4**), 67.8 (**C7**), 62.2 (**C9**), 52.9 (**OCH₃**), 49.4 (**C5**), 38.6 (**C3**), 30.0 (**Propanoyl-CH₂**), 21.1, 21.0, 21.0, 20.9 (4x **Acetyl-CH₃**), 9.77 (**Propanoyl-CH₃**).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3350, 3285, 2962, 1737, 1656, 1535, 1368, 1216, 1033, 946, 753, 603, 403.

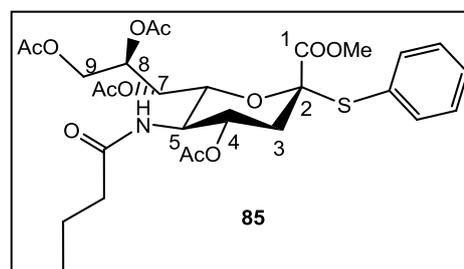
MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 620.1772 [M+Na]⁺, gef.: 610.1781 [M+Na]⁺.

7.2.6.6 Synthese von Thiophenyl-(methyl-5-*N*-butanoyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylat) **85**

Die Synthese erfolgte nach **AVV 7**. Es wurden 423 mg (0.725 mmol, 1.0 Äquiv.) Thioglycosid **83** in 3.2 mL abs. CH₃OH gelöst und mit 430 μ L (6.62 mmol, 9.1 Äquiv.) Methansulfonsäure versetzt. Die Reaktionszeit betrug 18 h. Anschließend wurden 220 μ L (1.33 mmol, 1.8 Äquiv.) Butansäureanhydrid eingesetzt. Die abschließende Acetylierung

erfolgte in 5.0 mL abs. Pyridin mit 830 μL (8.46 mmol, 12 Äquiv.) Essigsäureanhydrid. Die Reaktionszeit betrug 20 h.

Ausbeute: 90.9 mg (0.149 mmol, 21%) eines farblosen Feststoffes; **Summenformel:** $\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{NO}_{12}\text{S}$; **Molekulargewicht:** 611.66 g/mol; **DC:** R_F-Wert: 0.68 (EE); **Anomerenverhältnis:** α -anomerenrein; **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25}$: +30° (c = 0.100, CH_2Cl_2); **Schmelzpunkt:** 62.2 °C.



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.53-7.50 (m, 2H, **H_{ortho}**), 7.42-7.38 (m, 1H, **H_{para}**), 7.36-7.31 (m, 2H, **H_{meta}**), 5.28-5.25 (m, 2H, **H7**, **H8**), 5.10 (d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 9.8$ Hz, **NHAc**), 4.88 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 11.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 10.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.8$ Hz, **H4**), 4.41-4.36 (m, 1H, **H9a**), 4.22-4.17 (m, 1H, **H9b**), 4.01-3.95 (m, 1H, **H5**), 3.93-3.89 (m, 1H, **H6**), 3.58 (s, 3H, **OCH₃**), 2.82 (dd, 1H, $^2J_{\text{H,H}} = 12.8$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.7$ Hz, **H3eq**), 2.14 (s, 3H, **Acetyl-CH₃**), 2.10-2.07 (m, 2H, **Butanoyl-CH₂**), 2.05, 2.04 (2x s, 2x 3H, 2x **Acetyl-CH₃**), 2.03-2.02 (m, 1H, **H3ax**), 2.00 (s, 3H, **Acetyl-CH₃**), 1.58-1.53 (**Butanoyl-CH₂**), 0.89 (t, 3H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, **Butanoyl-CH₃**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 173.1 (**C_q-Butanoyl**) 171.0, 170.8, 170.8, 170.2 (4x **C_q-Acetyl**) 168.1, (**C1**), 136.6 (**C_{ortho}**), 130.0 (**C_{meta}**), 129.0 (**C_{para}**), 128.8 (**C_{q-Ar}**), 87.6 (**C2**), 74.9 (**C6**), 70.1 (**C8**), 69.7 (**C4**), 67.9 (**C7**), 62.1 (**C9**), 52.9 (**OCH₃**), 49.3 (**C5**), 38.8 (**C3**), 38.4 (**Butanoyl-CH₂**), 21.1, 21.0, 21.0, 21.0 (4x **Butanoyl-CH₂**), 19.0 (**Butanoyl-CH₂**), 13.8 (**Butanoyl-CH₃**).

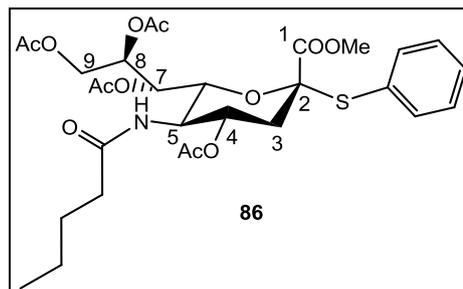
IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3350, 3285, 2964, 1737, 1657, 1533, 1368, 1217, 1034, 947, 752, 602, 403.

MS(ESI⁺): m/z (%): ber.: 612.2109 $[\text{M}+\text{H}]^+$, gef.: 612.2121 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

5.2.6.7 Synthese von Thiophenyl-(methyl-5-N-pentanoyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylat) **86**

Die Synthese erfolgte gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift **AVV 7**. Es wurden 556 mg (0.953 mmol, 1.0 Äquiv.) Thioglycosid **83** in 4.0 mL abs. CH_3OH gelöst und mit 560 μL (8.62 mmol, 9.0 Äquiv.) Methansulfonsäure versetzt. Die Reaktionszeit betrug 22 h. Anschließend wurden 340 μL (1.72 mmol, 1.8 Äquiv.) Pentansäureanhydrid eingesetzt. Die abschließende Acetylierung erfolgte in 6.0 mL abs. Pyridin mit 1.20 mL (12.7 mmol, 13 Äquiv.) Essigsäureanhydrid. Die Reaktionszeit betrug 20 h.

Ausbeute: 296 mg (0.473 mmol, 50%) eines farblosen Feststoffes; **Summenformel:** C₂₉H₃₉NO₁₂S; **Molekulargewicht:** 625.68 g/mol; **DC:** R_F-Wert: 0.77 (EE); **Anomerenverhältnis:** α -anomerenrein; **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25}$: +9.0° (c = 1.00, CH₂Cl₂); **Schmelzpunkt:** 52.7 °C.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.54-7.49 (m, 2H, **H_{ortho}**), 7.42-7.37 (m, 1H, **H_{para}**), 7.37-7.30 (m, 2H, **H_{meta}**), 5.28-5.24 (m, 2H, **H7**, **H8**), 5.08 (d, 1H, ³J_{H,H} = 10.1 Hz, **NHAc**), 4.88 (ddd, 1H, ³J_{H,H} = 11.6 Hz, ³J_{H,H} = 10.1 Hz, ³J_{H,H} = 4.9 Hz, **H4**), 4.39 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 13.3 Hz, ³J_{H,H} = 1.8 Hz, **H9a**), 4.22-4.16 (m, 1H, **H9b**), 4.03-3.87 (m, 2H, **H5**, **H6**), 3.58 (s, 3H, **OCH₃**), 2.82 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.7 Hz, ³J_{H,H} = 4.5 Hz, **H3eq**), 2.14 (s, 3H, **Acetyl-CH₃**), 2.12-2.05 (m, 5H, **Acetyl-CH₃**, **Pentanoyl-CH₂**), 2.04 (s, 3H, **Acetyl-CH₃**), 2.01-1.95 (m, 4H, **Acetyl-CH₃**, **H3ax**), 1.56-1.46 (m, 2H, **Pentanoyl-CH₂**), 1.34-1.23 (m, 2H, **Pentanoyl-CH₂**), 0.88 (t, 3H, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, **Pentanoyl-CH₃**).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 173.3 (**C_q-Pentanoyl**) 171.0, 170.8, 170.1, 170.1 (4x **C_q-Acetyl**) 168.1, (**C1**), 136.6, 130.0, 129.0 (**C_{Ar}**) 128.8 (**C_{q-Ar}**), 87.6 (**C2**), 74.9 (**C6**), 70.1 (**C8**), 69.6 (**C4**), 67.9 (**C7**), 62.2 (**C9**), 52.9 (**OCH₃**), 49.3 (**C5**), 38.4 (**C3**), 36.7, 27.6, 22.5 (3x **Pentanoyl-CH₂**), 21.1, 21.0, 21.0, 20.9 (4x **Acetyl-CH₃**), 13.9 (**Pentanoyl-CH₃**).

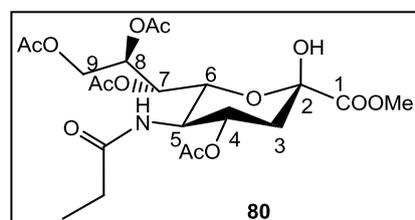
IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2958, 2872, 1737, 1658, 1532, 1367, 1216, 1033, 946, 752, 602, 404.

MS(ESI⁺): m/z (%): ber.: 626.2266 [M+H]⁺, gef.: 626.2272 [M+H]⁺.

5.2.6.8 Synthese von Methyl-5-N-propanoyl-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy-β-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylat **80**

Die Reaktion erfolgte nach **AAV 8**. Es wurden 38.0 mg (63.6 μmol, 1.0 Äquiv) Thioglycosid **84** gelöst in 1.5 mL Aceton und 21 μL H₂O sowie 28.2 mg (158 μmol, 2.5 Äquiv.) NBS verwendet. Die Reaktionszeit betrug 2.5 h.

Ausbeute: 20.0 mg (39.6 μmol, 62%) einer farblosen Warte; **Summenformel:** C₂₁H₃₁NO₁₃; **Molekulargewicht:** 505.47 g/mol; **DC:** R_F-Wert: 0.41 (EE); **Anomerenverhältnis:** β -anomerenrein; **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25}$: -5° (c = 0.98, CH₂Cl₂).



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.38 (d, 1H, ³J_{H,H} = 9.4 Hz, **NHAc**), 5.31 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, ³J_{H,H} = 1.5 Hz, **H7**), 5.28-5.21 (m, 2H, **H4**, **H8**), 4.44 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.4 Hz, ³J_{H,H} = 2.2 Hz, **H9a**), 4.25-4.24 (m, 1H, **-OH**), 4.22-4.13 (m, 2H, **H5**, **H6**), 4.02 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.5 Hz, ³J_{H,H} = 7.2 Hz, **H9b**), 3.87 (s, 3H, **OCH₃**), 2.31-2.26 (m, 1H, **H3eq**), 2.19-2.06 (m, 9H, 2x **Acetyl-CH₃**, **H3ax**, **Propanoyl-CH₂**), 2.03, 2.01 (2x s, 2x, 3H, 2x **Acetyl-CH₃**), 1.09 (t, 3H, ³J_{H,H} = 7.7 Hz, **Propanoyl-CH₃**).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 174.1 (**C_q-Propanoyl**) 171.2, 170.9, 170.7, 170.3 (4x **C_q-Acetyl**), 169.3 (**C1**), 95.0 (**C2**), 71.1 (**C6**), 70.9 (**C8**), 69.4 (**C4**), 67.9 (**C7**), 62.8 (**C9**), 53.7 (**OCH₃**), 49.6 (**C5**), 36.2 (**C3**), 30.0 (**Propanoyl-CH₂**), 21.1, 21.0, 20.9, 20.9 (4x **Acetyl-CH₃**), 9.81 (**Propanoyl-CH₃**).

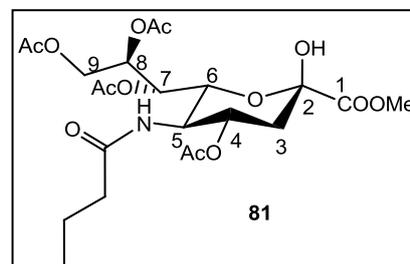
IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3338, 2970, 2923, 1738, 1656, 1535, 1370, 1212, 1037, 945, 645, 401.

MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 528.1688 [M+Na]⁺, gef.: 528.1698 [M+Na]⁺.

5.2.6.9 Synthese von Methyl-5-*N*-butanoyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-β-*D*-glycero-*D*-galacto-2-nonulopyranosylat **81**

Die Durchführung erfolgte nach **AAV 8**. Es wurden 33.0 mg (54.0 μmol, 1.0 Äquiv) Thioglycosid **85** gelöst in 1.3 mL Aceton und 17 μL H₂O sowie 22.2 mg (0.742 mmol, 2.3 Äquiv.) NBS eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 2.5 h.

Ausbeute: 18.3 mg (35.2 μmol, 64%) einer farblosen Watte; **Summenformel:** C₂₂H₃₃NO₁₃; **Molekulargewicht:** 519.50 g/mol; **DC:** R_r-Wert: 0.62 (EE); **Anomerenverhältnis:** β -anomerenrein; **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25}$: -50° (c = 0.100, CH₃OH).



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.32 (d, 1H, ³J_{H,H} = 9.6 Hz, **NHAc**), 5.29 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 6.4 Hz, ³J_{H,H} = 1.6 Hz, **H7**), 5.27-5.21 (m, 2H, **H4**, **H8**), 4.42 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.4 Hz, ³J_{H,H} = 2.3 Hz, **H9a**), 4.21-4.12 (m, 3H, **-OH**, **H5**, **H6**), 4.02 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.4 Hz, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, **H9b**), 3.87 (s, 3H, **OCH₃**), 2.30-2.25 (m, 1H, **H3eq**), 2.17 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.8 Hz, ³J_{H,H} = 5.0 Hz, **H3ax**), 2.14 (s, 3H, **Acetyl-CH₃**), 2.12-2.02 (m, 8H, 2x **Acetyl-CH₃**, **Butanoyl-CH₂**), 2.00 (s, 3H, **Acetyl-CH₃**), 1.62-1.58 (m, 2H, **Butanoyl-CH₂**), 0.91 (t, 3H, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, **Butanoyl-CH₃**).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 173.2 (**C_q-Butanoyl**) 171.2, 170.9, 170.6, 170.3 (4x **C_q-Acetyl**), 169.3 (**C1**), 94.9 (**C2**), 71.0 (**C6**), 70.8 (**C8**), 69.4 (**C4**), 67.9 (**C7**), 62.8 (**C9**), 53.7 (**OCH₃**), 49.6 (**C5**), 38.9 (**Butanoyl-CH₂**), 36.2 (**C3**), 21.1, 21.1, 21.0, 20.9 (4x **Acetyl-CH₃**), 19.0 (**Butanoyl-CH₂**), 13.9 (**Butanoyl-CH₃**).

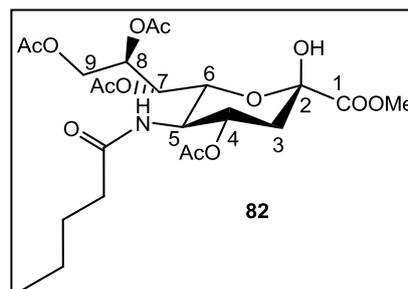
IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3662, 2970, 2923, 1737, 1656, 1536, 1371, 1222, 1039, 945, 605.

MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 542.1844 [M+Na]⁺, gef.: 542.1846 [M+Na]⁺.

5.2.6.10 Synthese von Methyl-5-*N*-pentanoyl-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-β-*D*-glycero-*D*-galacto-2-nonulopyranosylat **82**

Die Durchführung erfolgte nach **AAV 8**. Es wurden 203 mg (0.324 mmol, 1.0 Äquiv) Thioglycosid **86** gelöst in 7.0 mL Aceton und 420 μL H₂O sowie 132 mg (0.742 mmol, 2.3 Äquiv.) NBS verwendet. Die Reaktionszeit betrug 1 h.

Ausbeute: 83.9 mg (0.157 mmol, 48%) einer farblosen Watte; **Summenformel:** C₂₃H₃₅NO₁₃; **Molekulargewicht:** 533.52 g/mol; **DC:** R_F-Wert: 0.66 (EE); **Anomerenverhältnis:** β -anomerenrein; **Drehwert:** [α]_{589nm}²⁵: -6.6° (c = 1.00, CH₂Cl₂).



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.41 (d, 1H, ³J_{H,H} = 8.9 Hz, **NHAc**), 5.30 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, ³J_{H,H} = 1.7 Hz, **H7**), 5.28-5.21 (m, 2H, **H4**, **H8**), 4.44 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.4 Hz, ³J_{H,H} = 2.4 Hz, **H9a**), 4.28 (s, 1H, **-OH**), 4.21-4.13 (m, 2H, **H5**, **H6**), 4.02 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.4 Hz, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, **H9b**), 3.87 (s, 3H, **OCH₃**), 2.27 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.5 Hz, ³J_{H,H} = 11.8 Hz, **H3eq**), 2.20-2.13 (m, 4H, **Acetyl-CH₃**, **H3ax**), 2.12-2.04 (m, 5H, **Acetyl-CH₃**, **Pentanoyl-CH₂**), 2.03, 2.00 (2x s, 2x, 3H, 2x **Acetyl-CH₃**), 1.57-1.50 (m, 2H, **Pentanoyl-CH₂**), 1.34-1.27 (m, 2H, **Pentanoyl-CH₂**), 0.90 (t, 3H, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, **Pentanoyl-CH₃**).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 173.4 (**C_q-Pentanoyl**) 171.1, 171.0, 170.7, 170.3 (4x **C_q-Acetyl**), 169.2 (**C1**), 94.9 (**C2**), 71.1 (**C6**), 71.0 (**C8**), 69.4 (**C4**), 68.0 (**C7**), 62.8 (**C9**), 53.7 (**OCH₃**), 49.5 (**C5**), 36.7 (**Pentanoyl-CH₂**), 36.2 (**C3**), 27.7, 22.5 (2x **Pentanoyl-CH₂**), 21.1, 21.1, 21.0, 20.9 (4x **Acetyl-CH₃**), 13.9 (**Pentanoyl-CH₃**).

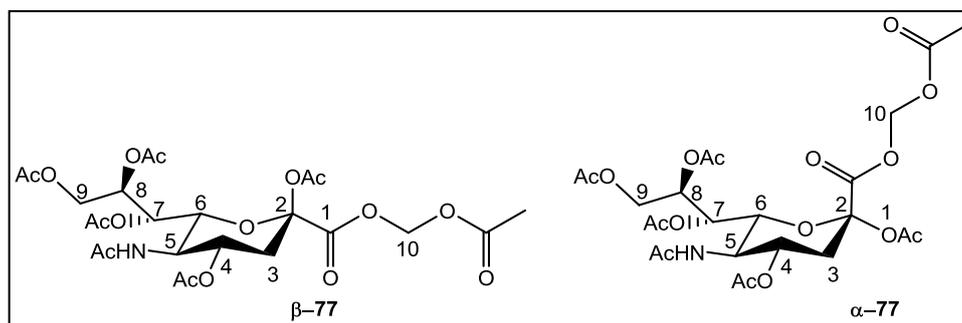
IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3304, 2961, 1744, 1656, 1371, 1225, 1036, 601.

MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 556.2001 [M+Na]⁺, gef.: 556.2008 [M+Na]⁺.

5.2.6.11 Synthese von Acetoxymethyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3,5-dideoxy-*D*-glycero-*D*-galacto-2-nonulopyranosylat α/β-**77**

Es wurden 1.03 g (3.32 mmol, 1.0 Äquiv.) *N*-Acetylneuraminsäure **14** in 8.0 mL abs. DMF suspendiert und mit 540 μL (3.62 mmol, 1.1 Äquiv.) DBU versetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 10 Minuten bei Rt gerührt. Nachdem eine klare Lösung entstanden war, wurden 390 μL (3.98 mmol, 1.2 Äquiv.) Acetoxymethylbromid zu dem Reaktionsansatz gegeben und dieser bei Rt gerührt. Nach 4 h Reaktionszeit war kein Edukt mehr detektierbar (DC-Kontrolle EtOH/AcOH/H₂O 4:1:1 v/v). Die folgende Peracetylierung erfolgte gemäß **AAV 4**. Hierfür wurden 8.0 mL abs. Pyridin und 4.70 mL (49.7 mmol, 15 Äquiv.) Essigsäureanhydrid

verwendet. Die Reaktionszeit betrug 20 h. Die säulenchromatographische Reinigung erfolgte mit EE als Elutionsmittel.



Ausbeute: 1.05 g (2.68 mmol, 54% über zwei Stufen) eines farblosen Feststoffes; **Summenformel:** $C_{24}H_{33}NO_{16}$; **Molekulargewicht:** 591.52 g/mol; **DC:** R_f -Wert: 0.46 (EE); **Anomerenverhältnis** Es wurde ein Anomerenverhältnis von 2/1 erhalten, **Schmelzpunkt:** 49.9 °C.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 5.82-5.69 (m, 4H, 4x **H10**), 5.40-5.34 (m, 2H, 2x **H7**), 5.32-5.30 (m, 1H, **NHAc**), 5.29-5.27 (m, 1H, **NHAc**), 5.26-5.20 (m, 1H, **H4**), 5.19-5.14 (m, 1H, **H8**), 5.07 (ddd, 1H, $^3J_{H,H} = 6.3$ Hz, $^3J_{H,H} = 6.3$ Hz, $^3J_{H,H} = 2.6$ Hz, **H8**), 4.95 (ddd, 1H, $^3J_{H,H} = 11.9$ Hz, $^3J_{H,H} = 10.4$ Hz, $^3J_{H,H} = 4.7$ Hz, **H4**), 4.72 (dd, 1H, $^3J_{H,H} = 10.8$ Hz, $^3J_{H,H} = 2.5$ Hz, **H6**), 4.42 (dd, 1H, $^2J_{H,H} = 12.5$ Hz, $^3J_{H,H} = 2.6$ Hz, **H9a**), 4.34 (dd, 1H, $^2J_{H,H} = 12.5$ Hz, $^3J_{H,H} = 2.6$ Hz, **H9a**), 4.18-4.08 (m, 4H, 2x **H5**, **H6**, **H9b**), 4.04 (dd, 1H, $^2J_{H,H} = 12.6$ Hz, $^3J_{H,H} = 6.0$ Hz, **H9b**), 2.60-2.48 (m, 2H, 2x **H3eq**), 2.29 (dd, 1H, $^2J_{H,H} = 13.8$ Hz, $^3J_{H,H} = 11.3$ Hz, **H3ax**), 2.14, 2.13, 2.12, (4x s, 4x, 3H, 4x **Acetyl-CH₃**), 2.11-2.05 (m, 9H, 2x **H3eq**, 4x **Acetyl-CH₃**), 2.03, 2.03, 2.03, 2.02, 1.89, 1.89 (6x s, 6x, 3H, 6x **Acetyl-CH₃**).

^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 171.1, 170.8, 170.8, 170.7, 170.4, 170.4, 170.4, 170.4, 170.2, 170.1, 170.1, 169.6, 168.5, 168.4 (14x **C_q-Acetyl**, 164.6 (2x **C1**), 97.5, 95.1 (**C2**), 80.0, 79.7 (**C10**), 74.2, 73.1 (**C6**), 71.1, 70.1 (**C8**), 68.3, 68.3 (**C4**), 67.9, 67.5 (**C7**), 62.3, 62.1 (**C9**), 49.5, 48.9 (**C5**), 36.8, 35.7 (**C3**), 23.3, 21.0, 20.9, 20.7, 20.7, 20.7 (14x **Acetyl-CH₃**).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2972, 2941, 2902, 2890, 1743, 1370, 1159, 1102, 1068.

MS(ESI): m/z (%): ber.: 614.1692 [$M+Na$]⁺, gef.: 614.1705 [$M+Na$]⁺.

5.2.6.12 Synthese von Acetoxymethyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-2-chlor-3,5-dideoxy-β-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylat **78**

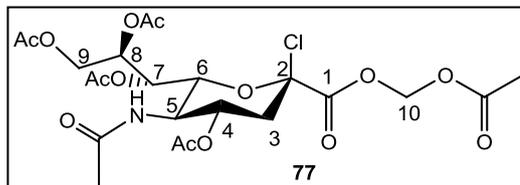
Die Synthese erfolgte nach **AAV 5**. Es wurden 1.01 g (1.78 mmol, 1.0 Äquiv.) des peracetylierten Neuraminsäure-Derivates α/β-**77**, 15.0 mL Acetylchlorid und 300 μL abs. CH₃OH verwendet. Die Reaktionszeit betrug 70 h.

Ausbeute: 973 mg (1.71 mmol, quantitativ) eines farblosen Waxes;

Summenformel: C₂₂H₃₀ClNO₁₄;

Molekulargewicht: 567.92 g/mol;

DC: R_F-Wert: 0.61 (EE/CH₃OH 98:2 v/v);



Anomerenverhältnis: β-anomerenrein; **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25} : -43^\circ$ (c = 0.100, CH₂Cl₂).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.89 (d, 1H, ²J_{H,H} = 5.4 Hz, **H10a**), 5.83 (d, 1H, ²J_{H,H} = 5.4 Hz, **H10b**), 5.47 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, ³J_{H,H} = 2.4 Hz, **H7**), 5.44-5.32 (m, 2H, H4, **NHAc**), 5.18-5.12 (m, 1H, **H8**), 4.42-4.33 (m, 2H, **H6**, **H9a**), 4.23 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 10.3 Hz, ³J_{H,H} = 10.3 Hz, **H5**), 4.06 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.6 Hz, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, **H9b**), 2.77 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 13.9 Hz, ³J_{H,H} = 4.8 Hz, **H3eq**), 2.29 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 13.9 Hz, ³J_{H,H} = 11.3 Hz, **H3ax**), 2.16, 2.12, 2.06, 2.06, 2.05, 1.91 (6x s, 6x, 3H, 6x **Acetyl-CH₃**).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 171.1, 170.8, 170.5, 170.1, 169.7, 169.3 (6x **C_q-Acetyl**), 163.8 (**C1**), 96.2 (**C2**), 80.9 (**C10**), 74.2 (**C6**), 70.2 (**C8**), 68.9 (**C4**), 68.7 (**C7**), 62.1 (**C9**), 48.9 (**C5**), 40.5 (**C3**), 23.3, 21.0, 20.9, 20.9, 20.9, 20.7 (6x **Acetyl-CH₃**).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2972, 1741, 1662, 1537, 1434, 1368, 1202, 1159, 1022, 985.

MS(ESI⁺): m/z (%): ber.: 568.1428 [M+H]⁺, gef.: 568.1435 [M+H]⁺.

5.2.6.13 Synthese von ^{OAc}Neu5NAc^{COOAM} **76**

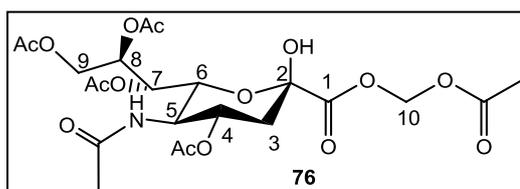
Die Durchführung erfolgte nach **AAV 6**. Es wurden 938 mg (1.65 mmol, 1.0 Äquiv.) des Zuckerchlorids **77** gelöst in 40 mL Aceton und 10 mL H₂O und 1.64 g (5.95 mmol, 3.6 Äquiv.) verwendet. Die Reaktionszeit betrug 3 h. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel mit EE/CH₃OH 98:2 v/v als Eluent. Zur Abtrennung von entstandenem Glycal erfolgten zwei weitere Reinigungen an RP-18 Kieselgel mit CH₃CN/H₂O 1:1 v/v als Eluent.

Ausbeute: 677 mg (1.23 mmol, 75%) einer farblosen Watte;

Summenformel: C₂₂H₃₁NO₁₅;

Molekulargewicht: 549.48 g/mol; **DC:** R_F-Wert:

0.57 (EE/CH₃OH 98:2 v/v); **Anomerenverhältnis:**



β-anomerenrein; **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25} : +1.8^\circ$ (c = 1.01, CH₂Cl₂).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.87 (d, 1H, ²J_{H,H} = 5.6 Hz, **H10a**), 5.82 (d, 1H, ²J_{H,H} = 5.6 Hz, **H10b**), 5.74 (d, 1H, ³J_{H,H} = 9.8 Hz, **NHAc**), 5.36 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 4.9 Hz, ³J_{H,H} = 1.9 Hz, **H7**), 5.25-5.18 (m, 2H, **H4**, **H8**), 4.72 (bs, 1H, **-OH**), 4.55 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.4 Hz, ³J_{H,H} = 2.2 Hz, **H9a**), 4.20 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 10.6 Hz, ³J_{H,H} = 1.9 Hz, **H6**), 4.18-4.11 (m, 1H, **H5**), 4.02 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 12.4 Hz, ³J_{H,H} = 8.0 Hz, **H9b**), 2.26-2.21 (m, 2H, **H3ax**, **H3eq**), 2.14, 2.14, 2.10, 2.03, 2.02, 1.90 (6x s, 6x, 3H, 6x **Acetyl-CH₃**).

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 171.3, 171.2, 171.1, 170.4, 170.4, 169.6 (6x **C_q-Acetyl**), 167.2 (**C1**), 95.1 (**C2**), 80.6 (**C10**), 71.8 (**C8**), 71.4 (**C6**), 69.2 (**C4**), 68.2 (**C7**), 62.9 (**C9**), 48.6 (**C5**), 36.0 (**C3**), 23.3, 21.2, 21.0, 20.9, 20.9, 20.7 (6x **Acetyl-CH₃**).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3265, 2976, 1741, 1661, 1540, 1431, 1370, 1213, 1037, 599.

MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 550.1766 [M+H]⁺, gef.: 550.1776 [M+H]⁺.

5.2.7 Darstellung von 1,2,3-Tri-O-acetyl- α - und - β -D-ribose-5-monophosphat α - und β -96

5.2.7.1 Synthese von 5-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-1,2,3-triacetyl- α - und - β -D-ribose α - und β -102

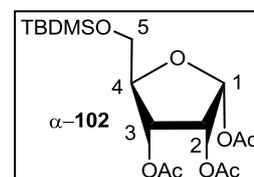
Die Reaktion wurde nach **AAV 1** durchgeführt. Es wurden 3.01 g (20.0 mmol, 1.0 Äquiv.) D-Ribose **93**, 50.0 mL abs. Pyridin und 3.86 g (25.6 mmol, 1.3 Äquiv.) *tert*-Butyldimethylsilylchlorid eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 20 h. Nach vollständiger Umsetzung des Eduktes wurden 17.0 mL (180 mmol, 9.0 Äquiv.) Essigsäureanhydrid dazugegeben und der Reaktionsansatz 3.5 h bei Rt gerührt.

Summenformel: C₁₇H₃₀O₈Si; **Molekulargewicht:** 390.50 g/mol.

α -Anomer:

Ausbeute: 1.84 g (4.71 mmol, 23%) eines farblosen Öls; **DC:** R_F-Wert:

(PE/EE 3:1 v/v) 0.48; **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25}$: +52.2° (c = 1.00, CH₂Cl₂).



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.40 (d, ³J_{H,H} = 4.7 Hz, 1H, **H1**), 5.35 (dd, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, ³J_{H,H} = 1.9 Hz, 1H, **H3**), 5.26 (dd, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, ³J_{H,H} = 4.7 Hz, 1H, **H2**), 4.31-4.28 (m, 1H, **H4**), 3.82 (dd, ²J_{H,H} = 11.4 Hz, ³J_{H,H} = 2.4 Hz, 1H, **H5a**), 3.74 (dd, ²J_{H,H} = 11.4 Hz, ³J_{H,H} = 2.7 Hz, 1H, **H5b**), 2.12, 2.11, 2.06 (3x s, 3x 3H, **Acetyl-CH₃**), 0.90 (s, 9H, ***t*Bu-CH₃**), 0.08, 0.07 (2x s, 2x 3H, 2x **Silyl-CH₃**).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 170.5, 170.1, 169.5 (3x C_q-Acetyl), 94.6 (C1), 85.4 (C4), 70.7, 70.7 (C2, C3), 63.0 (C5), 26.0 (^tBu-CH₃), 21.3, 20.9, 20.5 (3x Acetyl-CH₃), 18.4 (^tBu-C_q), -5.3, -5.4 (2x Silyl-CH₃).

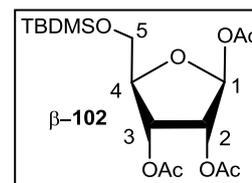
IR: [cm⁻¹] = 2956, 2931, 2859, 1738, 1461, 1365, 1212, 1070, 1005, 963, 828, 775, 602.

MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 413.1608 [M+Na]⁺, gef.: 413.1616 [M+Na]⁺.

β-Anomer:

Ausbeute: 1.79 g (4.58 mmol, 23%) eines farblosen Öls; **DC:** R_F-Wert:

(PE/EE 3:1 v/v) 0.71; **Drehwert:** [α]_{589nm}²⁵: -17.9° (c = 1.01, CH₂Cl₂).



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.15 (d, ³J_{H,H} = 1.9 Hz, 1H, H1), 5.41 (dd, ³J_{H,H} = 5.3 Hz, ³J_{H,H} = 5.1 Hz, 1H, H3), 5.37 (dd, ³J_{H,H} = 4.9 Hz, ³J_{H,H} = 1.9 Hz, 1H, H2), 4.23-4.19 (m, 1H, H4), 3.77-3.74 (m, 2H, H5a,b), 2.10, 2.08, 2.06 (3x s, 3x 3H, Acetyl-CH₃), 0.90 (s, 9H, ^tBu-CH₃), 0.06, 0.06 (2x s, 2x 3H, 2x Silyl-CH₃).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 169.9, 169.6, 169.6 (3x C_q-Acetyl), 98.5 (C1), 82.8 (C4), 74.7 (C2), 71.2 (C3), 63.1 (C5), 26.0 (^tBu-CH₃), 21.2, 21.0, 20.7 (3x Acetyl-CH₃), 18.4 (^tBu-C_q), -5.3, -5.4 (2x Silyl-CH₃).

IR: [cm⁻¹] = 2955, 2931, 2859, 1747, 1464, 1370, 1211, 1075, 1005, 965, 834, 777, 600.

MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 413.1608 [M+Na]⁺, gef.: 413.1749 [M+Na]⁺.

Weitere 18% lagen noch als Mischfraktion vor.

5.2.7.2 Synthese von 1,2,3-Triacetyl-α-D-ribose α-92

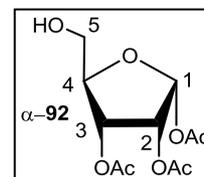
Die Reaktion wurde nach **AAV 2** durchgeführt. Es wurden 1.69 g (4.33 mmol, 1.0 Äquiv.) 5'-O-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-1,2,3-triacetyl-α-D-ribose α-102, 20.0 mL CH₂Cl₂ und 4.20 mL (26.0 mmol, 6.0 Äquiv.) Et₃N·3HF verwendet. Die Reaktionszeit betrug 21 h.

Ausbeute: 1.08 g (3.91 mmol, 90%) eines farblosen Öls;

Summenformel: C₁₁H₁₆O₈; **Molekulargewicht:** 276.24 g/mol; **DC:** R_F-Wert:

(PE/EE 1:1 v/v) 0.35; **Anomerenverhältnis:** α-anomerenrein; **Drehwert:**

[α]_{589nm}²⁵: +79.1° (c = 1.00, CH₃OH).



¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 6.28 (d, ³J_{H,H} = 4.5 Hz, 1H, H1), 5.24-5.13 (m, 2H, H2, H3), 5.09 (dd, ³J_{H,H} = 5.6 Hz, ³J_{H,H} = 5.4 Hz, 1H, -OH), 4.23-4.19 (m, 1H, H4), 3.55-3.50 (m, 2H, H5a,b), 2.07, 2.06, 2.01 (3x s, 3x 3H, Acetyl-CH₃).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 169.9, 169.6, 169.2 (3x **C_q-Acetyl**), 93.7 (**C1**), 84.5 (**C4**), 69.9, 69.7 (**C2, C3**), 60.7 (**C5**), 20.9, 20.5, 20.2 (3x **Acetyl-CH₃**).

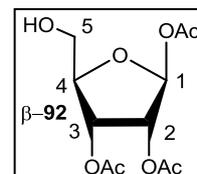
IR: [cm⁻¹] = 3471, 2939, 1737, 1432, 1371, 1214, 1096, 1043, 1008, 942, 896, 601.

MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 299.0743 [M+Na]⁺, gef.: 299.0750 [M+Na]⁺.

5.2.7.3 Synthese von 1,2,3-Triacetyl-β-D-ribose β-92

Die Reaktion wurde nach **AAV 2** durchgeführt. Es wurden 1.68 g (4.30 mmol, 1.0 Äquiv.) 5'-*O*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)-1,2,3-triacetyl-β-D-ribose β-**102**, 20.0 mL CH₂Cl₂ und 4.20 mL (26.0 mmol, 6.0 Äquiv.) Et₃N·3HF verwendet. Die Reaktionszeit betrug 22 h.

Ausbeute: 1.06 g (3.84 mmol, 89%) eines farblosen Öls; **Summenformel:** C₁₁H₁₆O₈; **Molekulargewicht:** 276.24 g/mol; **DC:** R_F-Wert: (EE) 0.57; **Anomerenverhältnis:** β-anomerenrein; **Drehwert:** [α]_{589nm}²⁵: +16.8° (c = 1.00, CH₃OH).



¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 6.00 (d, ³J_{H,H} = 1.3 Hz, 1H, **H1**), 5.25-5.20 (m, 2H, **H2, H3**), 5.01 (dd, ³J_{H,H} = 5.9 Hz, ³J_{H,H} = 5.6 Hz, 1H, **-OH**), 4.13-4.09 (m, 1H, **H4**), 3.56 (ddd, ²J_{H,H} = 12.2 Hz, ³J_{H,H} = 5.2 Hz, dd, ³J_{H,H} = 4.0 Hz, 1H, **H5a**), 3.46 (ddd, ²J_{H,H} = 12.2 Hz, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, dd, ³J_{H,H} = 4.5 Hz, 1H, **H5b**), 2.08, 2.05, 2.03 (3x s, 3x 3H, **Acetyl-CH₃**).

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 169.6, 169.4, 169.1 (3x **C_q-Acetyl**), 97.5 (**C1**), 82.3 (**C4**), 73.7 (**C2**), 70.2 (**C3**), 60.8 (**C5**), 20.9, 20.3, 20.3 (3x **Acetyl-CH₃**).

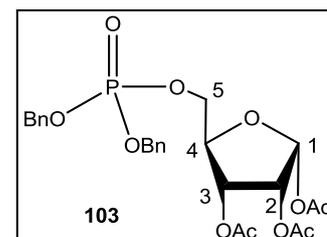
IR: [cm⁻¹] = 3493, 2939, 1741, 1432, 1370, 1210, 1066, 1020, 957, 893, 600.

MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 299.0737 [M+Na]⁺, gef.: 299.0759 [M+Na]⁺.

5.2.7.4 Synthese von Di-O-benzyl-(1,2,3-tri-O-acetyl-α-D-ribosyl)-5-monophosphat 103

Die Reaktion wurde nach **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 436 mg (1.58 mmol, 1.0 Äquiv.) 1,2,3-Triacetyl-α-D-ribose α-**92** gelöst in 10.0 mL abs. CH₃CN sowie 780 μL (819 mg, 2.37 mmol, 1.5 Äquiv.) Dibenzyl-*N,N*-(diisopropyl)phosphoramidit **105** verwendet. Des Weiteren wurden 6.35 mL DCI-Aktivatorlösung (0.25 M in CH₃CN, 1.0 Äquiv.) und 435 μL *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan, 1.5 Äquiv.) eingesetzt.

Ausbeute: 753 mg (1.40 mmol, 89%) eines farblosen Öls; **Summenformel:** C₂₅H₂₉O₁₁P; **Molekulargewicht:** 536.46 g/mol; **DC:** R_F-Wert: (PE/EE 1:1 v/v) 0.21; **Anomerenverhältnis:** α-anomerenrein; **Drehwert:** [α]_{589nm}²⁵: +46.3° (c = 1.00, CH₂Cl₂).



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.37-7.33 (m, 10H, **H-Aryl**) 6.34 (d, ³J_{H,H} = 4.6 Hz, 1H, **H1**), 5.24 (dd, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, ³J_{H,H} = 2.9 Hz 1H, **H3**), 5.11-5.03 (m, 5H, **H2**, **CH₂-Bn**) 4.35-4.31 (m, 1H, **H4**), 4.19-4.14 (m, 2H, **H5a,b**), 2.10 (s, 6H, 2x **O-Acetyl-CH₃**), 2.07, (s, 3H, **O-Acetyl-CH₃**).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 170.2, 169.7, 169.3 (3x **C_q-Acetyl**), 135.7 (d, ²J_{C,P} = 1.5 Hz, **C_q-Ar**), 135.6 135.7 (d, ²J_{C,P} = 1.5 Hz, **C_q-Ar**), 128.8, 128.2, 128.2 (**C_{Ar}**), 94.2 (**C1**), 82.5 (d, ³J_{C,P} = 7.9 Hz, **C4**), 70.2 (**C2**), 69,8 (d, ²J_{C,P} = 5.6 Hz, 2x **CH₂-Bn**), 69.6 (**C3**), 66.5 (d, ²J_{C,P} = 6.0 Hz, **C5**), 21.2, 20.8, 20.4 (3x **Acetyl-CH₃**).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O, entkoppelt): δ [ppm] = -1.17.

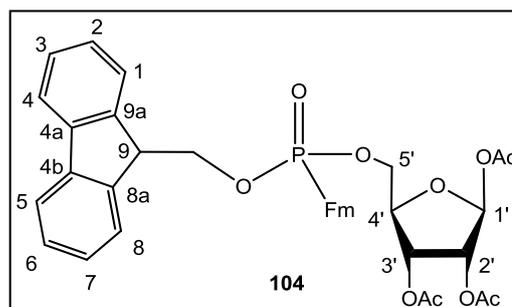
IR: [cm⁻¹] = 3035, 2953, 1742, 1498, 1456, 1433, 1370, 1250, 1213, 1112, 994, 939, 880, 737, 696, 600, 495.

MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 559.1345 [M+Na]⁺, gef.: 559.1332 [M+Na]⁺.

5.2.7.5 Synthese von Bis-O-(9H-fluoren-9-ylmethyl)-(1,2,3-tri-O-acetyl-β-D-ribose)-5-monophosphat **104**

Die Reaktion wurde gemäß **AAV 9** durchgeführt. Es wurden 319 mg (1.15 mmol, 1.0 Äquiv.) 1,2,3-Triacetyl-β-D-ribose **β-92** gelöst in 6.0 mL abs. CH₃CN sowie 726 mg (1.39 mmol, 1.2 Äquiv.) Bis-O-(9H-fluoren-9-ylmethyl)-*N,N*-(diisopropylamino)phosphoramidit **106** gelöst in 4.0 mL CH₂Cl₂ verwendet. Des Weiteren wurden 5.60 mL DCI-Aktivatorlösung (0.25 M in CH₃CN, 1.2 Äquiv.) und 260 μL (5.5 M in *n*-Decan, 1.2 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 24 h.

Ausbeute: 639 mg (0.897 mmol, 78%) eines farblosen Öls; **Summenformel:** C₃₉H₃₇O₁₁P; **Molekulargewicht:** 712.68 g/mol; **DC:** R_F-Wert: (PE/EE 1:1 v/v) 0.36; **Anomerenverhältnis:** β-anomerenrein; **Drehwert:** [α]_{589nm}²⁵: -3.6° (c = 1.04, CH₂Cl₂).



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.75-7.67 (m, 4H, **H1**, **H8**), 7.57-7.46 (m, 4H, **H-4**, **H-5**), 7.41-7.33 (m, 4H, **H2**, **H7**), 7.28 (dq, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.0 Hz, 2H, **H3**, **H6**), 7.26-7.22 (m, 2H, **H3**, **H6**), 6.11 (d, ³J_{H,H} = 0.5 Hz, 1H, **H1'**), 5.33 (dd, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, ³J_{H,H} = 4.9 Hz, 1H, **H3'**), 5.29 (dd, ³J_{H,H} = 4.8 Hz, ³J_{H,H} = 0.5 Hz, 1H, **H2'**), 4.34-4.22 (m, 5H, **H4'**, 2x **-CH₂**), 4.16-4.10 (m, 2H, 2x **H9**), 4.06-3.95 (m, 2H, **H5'a,b**), 2.12, 2.02, 1.90 (3x s, 3x 3H, **Acetyl-CH₃**).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 169.8, 169.5, 169.3 (3x **C_q-Acetyl**), 143.1, 143.0 (**C_q-8a**, **C_q-9a**), 141.5, 141.5 (**C_q-4a**, **C_q-4b**), 128.1 (**C2**, **C7**), 127.3 (**C3**, **C6**), 125.2, 125.2 (**C4**, **C5**), 120.2, 120.2 (**C1**, **C8**), 98.1 (**C1'**), 79.9 (**C4'**), 74.2 (**C2'**) 70.1 (**C3'**), 69.6 (d, ²J_{C,P} =

6.4 Hz, **-CH₂**), 60.6 (**C5'**), 48.0 (d, $^3J_{C,P} = 5.7$ Hz, **C9**), 47.9 (d, $^3J_{C,P} = 5.2$ Hz, **C9**), 21.0, 20.6, 20.6 (3x **Acetyl-CH₃**).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D₂O, entkoppelt): δ [ppm] = -1.69.

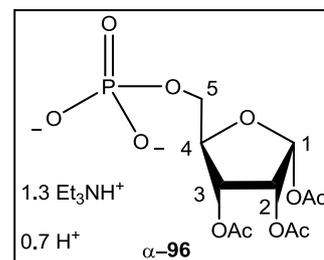
IR: [cm⁻¹] = 3066, 3041, 3017, 2943, 2893, 1747, 1449, 1371, 1211, 1013, 987, 739, 505.

MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 735.1971 [M+Na]⁺, gef.: 753.2032 [M+Na]⁺.

5.2.7.6 Synthese von 1,2,3-Tri-O-acetyl- α -D-ribosyl-5-monophosphat α -96 als Triethylammoniumsalz

Unter Inertgasatmosphäre wurden 53.9 mg (0.100 mmol, 1.0 Äquiv.) Di-O-benzyl-(1,2,3-tri-O-acetyl- α -D-ribosyl)-5-monophosphat **103** in 1,4-Dioxan gelöst und mit 28.0 μL (20.4 mg, 0.202 mmol, 2.0 Äquiv.) Et₃N versetzt. Anschließend wurde eine Spatelspitze Palladiumhydroxid zu der Reaktionslösung gegeben und diese unter Wasserstoffatmosphäre bei Rt für 20 h gerührt. Der Reaktionsumsatz wurde dünnschichtchromatographisch mit CH₃CN/H₂O 7:3 (v/v) verfolgt. Nach vollständiger Umsetzung des Eduktes wurde der Reaktionsansatz über Watte und Celite in einer Pasteurpipette filtriert und mit EE nachgespült. Das Lösungsmittel wurde im Membranpumpenvakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 49.0 mg (1.40 mmol, 89%) eines leicht bräunlichen Öls; **Summenformel:** C₂₃H₄₇N₂O₁₁P; **Molekulargewicht:** 487.76 g/mol; **DC:** R_F-Wert: (CH₃CN/H₂O 7:3 v/v) 0.53; **Anomerenverhältnis:** α -anomerenrein; **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25} : +63.5^\circ$ (*c* = 1.02, CH₃OH).



Anmerkung: Zur Vereinfachung wurde die Summenformel für 2 Triethylammonium-Gegenionen berechnet. Für die Berechnung des Molekulargewichts wurde beachtet, dass tatsächlich 1.3 vorliegen. Für die fehlenden 0.7 Gegenionen wurden Protonen angenommen.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D₂O): δ [ppm] = 6.47 (d, 1H, $^3J_{H,H} = 4.0$ Hz, **H1**), 5.44 (dd, 1H, $^3J_{H,H} = 6.5$ Hz, $^3J_{H,H} = 2.0$ Hz, **H3**), 5.40 (dd, 1H, $^3J_{H,H} = 6.4$ Hz, $^3J_{H,H} = 4.4$ Hz, **H2**), 4.61-4.57 (m, 1H, **H4**), 4.09-3.98 (m, 2H, **H5a,b**), 3.21 (q, $^3J_{H,H} = 7.3$ Hz, 8H, (**HN(CH₂CH₃)₃⁺**), 2.20, 2.19, 2.13 (3x s, 3x 3H, **Acetyl-CH₃**), 1.29 (t, $^3J_{H,H} = 7.3$ Hz, 12H, (**HN(CH₂CH₃)₃⁺**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D₂O): δ [ppm] = 173.1, 172.9, 172.1, (3x **C_q-Acetyl**) 94.6 (**C1**), 83.7 (d, $^3J_{C,P} = 8.3$ Hz, **C4**), 70.6, 70.4 (**C2**, **C3**), 64.2 (d, $^2J_{C,P} = 4.5$ Hz, **C5**), 46.7 (**HN(CH₂CH₃)₃⁺**), 20.4, 20.1, 19.7 (3x **Acetyl-CH₃**), 8.21 (**HN(CH₂CH₃)₃⁺**).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, D₂O, entkoppelt): δ [ppm] = 0.14.

IR: [cm⁻¹] = 2985, 2943, 2642, 1738, 1371, 1216, 1070, 1007, 913, 809, 509.

MS(ESI): m/z (%): ber.: 355.0436 [M-H]⁻, gef.: 355.0424 [M-H]⁻.

5.2.7.7 Synthese von 1,2,3-Tri-O-acetyl- β -D-ribosyl-5-monophosphat β -96 als Triethylammoniumsalz

Unter Inertgasatmosphäre wurden 593 mg (0.683 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis-O-(9H-fluoren-9-ylmethyl)-(1,2,3-tri-O-acetyl- β -D-ribosyl)-5-monophosphat **104** in 20.0 mL abs. CH₃CN gelöst und mit 5.0 mL Et₃N (3.7 g, 36.1 mmol, 53 Äquiv.) versetzt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch mit EE und CH₃CN/H₂O (7:3 v/v). Nach 30 Minuten war die erste Schutzgruppe entfernt. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei Rt gerührt. Nach 24 h wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in CH₂Cl₂ und H₂O aufgenommen. Das Gemisch wurde in vier 50 mL Tubes gefüllt, geschüttelt und bei 8000 u/min für 3 Minuten zentrifugiert. Die organische Phase wurde mit einer Kanüle abgenommen und die wässrige Phase erneut mit CH₂Cl₂ versetzt und erneut geschüttelt und zentrifugiert. Nach erneuter Entfernung der organischen Phase wurde die wässrige Phase mit PE 50-70 versetzt und wieder geschüttelt und zentrifugiert. Abschließend wurde die wässrige Phase mit einer Kanüle abgenommen und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde mittels automatisierter Säulenchromatographie an RP-18-Kieselgel gereinigt (H₂O 100% Vol., 0-15 min, H₂O/CH₃CN 0-100% Vol., 15-21 min, CH₃CN 100%, 21-25 min, Flussrate 20 mL/min).

Ausbeute: 334 mg (0.671 mmol, 96%) eines farblosen Öls;

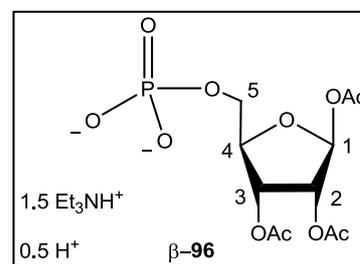
Summenformel: C₂₃H₄₇N₂O₁₁P;

Molekulargewicht:

507.91 g/mol; **DC:** R_F-Wert: (CH₃CN/H₂O 7:3 v/v) 0.55;

Anomerenverhältnis: β -anomerenrein; **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25}$: -

9.0° (c = 1.03, CH₃OH).



Anmerkung: Zur Vereinfachung wurde die Summenformel für 2 Triethylammonium-Gegenionen berechnet. Für die Berechnung des Molekulargewichts wurde beachtet, dass tatsächlich 1.5 vorliegen. Für die fehlenden 0.5 Gegenionen wurden Protonen angenommen.

¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ [ppm] = 6.17 (d, 1H, ³J_{H,H} = 0.6 Hz, **H1**), 5.49-5.45 (m, 2H, **H2**, **H3**), 4.52-4.48 (m, 1H, **H4**), 4.06 (ddd, 1H, ³J_{H,H} = 3.4 Hz, ³J_{H,P} = 5.6 Hz, ²J_{H,H} = 11.8 Hz, **H5a**), 3.96 (ddd, 1H, ³J_{H,H} = 5.5 Hz, ³J_{H,P} = 11.3 Hz, ²J_{H,H} = 11.6 Hz, **H5b**), 3.20 (q, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 9H, (**HN(CH₂CH₃)₃⁺**), 2.18, 2.16, 2.12 (3x s, 3x 3H, **Acetyl-CH₃**), 1.28 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 14H, (**HN(CH₂CH₃)₃⁺**).

¹³C-NMR (151 MHz, D₂O): δ [ppm] = 172.8, 172.6 (3x **C_q-Acetyl**) 98.4 (**C1**), 81.0 (d, ³J_{C,P} = 8.4 Hz, **C4**), 74.4 (**C2**), 70.7 (**C3**), 64.2 (d, ²J_{C,P} = 5.5 Hz **C5**), 46.7 (**HN(CH₂CH₃)₃⁺**), 20.5, 19.9, 19.9 (3x **Acetyl-CH₃**), 8.22 (**HN(CH₂CH₃)₃⁺**).

$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, D_2O , entkoppelt): δ [ppm] = 0.55.

IR: [cm^{-1}] = 2987, 2944, 2887, 2217, 1744, 1371, 1213, 1162, 1068, 1027, 964, 898, 811, 524.

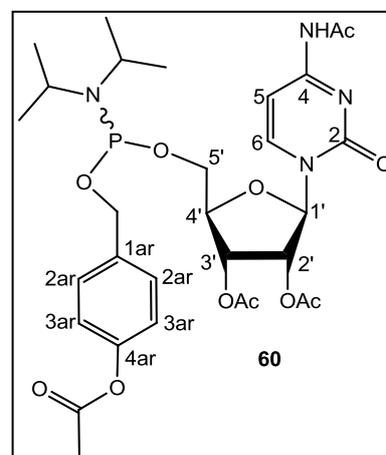
MS(ESI): m/z (%): ber.: 355.0436 [M-H] $^-$, gef.: 355.0409 [M-H] $^-$.

5.2.8 Darstellung von Phosphoramiditen

5.2.8.1 Synthese von Acetoxybenzyl-(5'-O-cytidin^{Ac})phosphoramidit **60**

Die Darstellung erfolgte nach **AAV 10**. Es wurden 200 mg (0.542 mmol, 1.0 Äquiv.) des selektiv geschützten Cytidins **64** gelöst in 2.7 mL abs. CH_3CN sowie 276 mg (0.811 mmol, 1.5 Äquiv.) des Phosphordiamidits **62** gelöst in 4.0 mL abs. CH_3CN verwendet. Des Weiteren wurden 220 μL DCI-Aktivatorlösung (0.25 M in CH_3CN , 1.0 Äquiv.) eingesetzt.

Ausbeute: 266 mg (0.400 mmol, 74%) eines farblosen Feststoffes; **Summenformel:** $\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_{11}\text{P}$;
Molekulargewicht: 664.64 g/mol; **DC:** R_f -Wert: 0.38 (EE/ Et_3N 9:1 v/v); **Diastereomerenverhältnis:** 1:1;
Schmelzpunkt: 149 °C.



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 9.02 (s, 1H, **NHAc**), 8.93 (s, 1H, **NHAc**), 8.28 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.7 Hz, 1H, **H6**), 8.22 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.6 Hz, 1H, **H6**), 7.39-7.30 (m, 5H, 4x **H2_{ar}**, **H5**), 7.18 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.7 Hz, 1H, **H5**), 7.10-7.02 (m, 4H, 2x **H3_{ar}**), 6.39-6.33 (m, 2H, 2x **H1'**), 5.46 (dd, $^3J_{\text{H,H}}$ = 5.3 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 3.7 Hz, 1H, **H3'**), 5.42-5.36 (m, 3H, 2x **H2'**, **H3'**), 4.80-4.73 (m, 2H, **CH₂-Bn**), 4.71-4.63 (m, 2H, **CH₂-Bn**), 4.36-4.31 (m, 2H, 2x **H4'**), 3.98 (dd, $^2J_{\text{H,H}}$ = 12.0 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 5.8 Hz, 1H, **H5'**), 3.92-3.82 (m, **3H**, 3x **H5'**), 3.71-3.60 (m, 4H, 4x **iPr-CH**), 2.29, 2.28, 2.23, 2.22, 2.10, 2.10, 2.06, 2.06 (8x s, je 3H, 8x **Acetyl-CH₃**), 1.23-1.18 (m, 24H, 8x **iPr-CH₃**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 170.1, 169.7, 169.7, 169.5, 169.5, 169.4, 169.4 (8x **C_q-Acetyl**), 162.5, 162.5 (**C2**), 155.2, 155.1 (**C4**), 149.9, 149.9 (**C4_{ar}**), 144.2, 144.2 (**C6**), 136.4, 136.4 (**C1_{ar}**), 128.9, 128.2 (**C3_{ar}**), 121.8, 121.6 (**C2_{ar}**), 96.8, 96.7 (**C5**), 87.2, 87.1 (**C1'**), 83.0, 82.9 (**C4'**), 74.4, 74.4 (**C2'**), 71.6, 71.4 (**C3'**), 65.4, 65.2 (**CH₂-Bn**), 62.7, 62.2 (**C5'**), 43.5, 43.4, 43.3, 43.3 (**iPr-CH**), 25.0, 24.9, 24.8, 24.8 (4x **iPr-CH₃**, 2x **Acetyl-CH₃**), 21.3, 20.8, 20.6, 20.6 (4x **Acetyl-CH₃**).

$^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 149.2, 149.1.

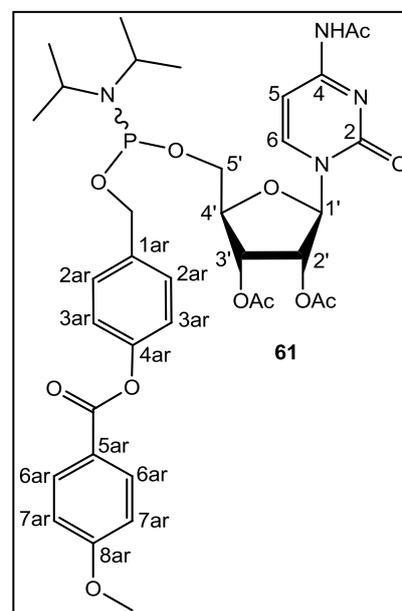
IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2967, 2931, 2869, 1748, 1668, 1625, 1557, 1489, 1367, 1311, 1212, 12291, 1103, 1008, 973.

MS(ESI⁺): m/z (%): ber.: 665.2582 [M+H]⁺, gef.: 665.2636 [M+H]⁺.

5.2.8.2 Synthese von 4-Methoxybenzoyloxybenzyl-(5'-O-cytidin^{Ac})phosphoramidit **61**

Die Reaktion wurde gemäß **AAV 10** durchgeführt. Es wurden 60.3 mg (0.163 mmol, 1.0 Äquiv.) des selektiv geschützten Cytidins **64** gelöst in 1.3 mL abs. CH₃CN sowie 120.4 mg (0.246 mmol, 1.5 Äquiv.) des Phosphordiamidits **63** gelöst in 2.6 mL abs. CH₃CN verwendet. Des Weiteren wurden 650 μ L DCI-Aktivatorlösung (0.25 M in CH₃CN, 1.0 Äquiv.) eingesetzt.

Ausbeute: 97.0 mg (0.128 mmol, 78%) eines farblosen Feststoffes; **Summenformel:** C₃₆H₄₅N₄O₁₂P;
Molekulargewicht: 756.74 g/mol; **DC:** R_f-Wert: 0.44 (EE/Et₃N 9:1 v/v); **Diastereomerenverhältnis:** 1:1;
Schmelzpunkt: 82.9 °C.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.37 (s, 2H, **NHAc**), 8.29 (d, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, 1H, **H6**), 8.20 (d, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, 1H, **H6**), 8.18-8.13 (m, 4H, 2x **H6_{ar}**), 7.43-7.37 (m, 4H, 4x **H2_{ar}**), 7.29-7.27 (m, 1H, **H5**), 7.21-7.14 (m, 4H, 2x **H3_{ar}**), 7.03 (d, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, 1H, **H5**), 7.01-6.96 (m, 4H, 2x **H7_{ar}**), 6.40-6.36 (m, 2H, 2x **H1'**), 5.48 (dd, ³J_{H,H} = 5.3 Hz, ³J_{H,H} = 3.7 Hz, 1H, **H3'**), 5.43-5.39 (m, 3H, 2x **H2'**, **H3'**), 4.84-4.76 (m, 2H, **CH₂-Bn**), 4.74-4.65 (m, 2H, **CH₂-Bn**), 4.36-4.32 (m, 2H, 2x **H4'**), 4.04-3.97 (m, 1H, **H5'**), 3.91-3.82 (m, 9H, 2x **OCH₃**, 3x **H5'**), 3.73-3.62 (m, 4H, 4x **iPr-CH**), 2.21, 2.20, 2x s, je 3H, 2x **Acetyl-CH₃**), 2.11, 2.07, (2x s, je 6H, 4x **Acetyl-CH₃**), 1.27-1.19 (m, 24H, 8x **iPr-CH₃**).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 169.5, 163.8 (**C_q-Acetyl**), 163.8 (**C8_{ar}**), 132.5, 132.4 (**C6_{ar}**), 128.3 (**C2_{ar}**), 122.1, 121.9 (**C3_{ar}**), 114.0 (**C7_{ar}**), 96.0 (**C5**), 86.3 (**C1'**), 82.9 (**C4'**), 74.4 (**C2'**), 71.4 (**C3'**), 64.9, 64.4 (**CH₂-Bn**), 61.7 (**C5'**), 55.7 (**OCH₃**) 43.3, 42.9 (**iPr-CH**), 24.9, 24.9, 24.8, 24.8 (**iPr-CH₃**, **Acetyl-CH₃**), 20.9, 20.6 (**Acetyl-CH₃**).

³¹P-NMR (243 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 149.1, 149.0.

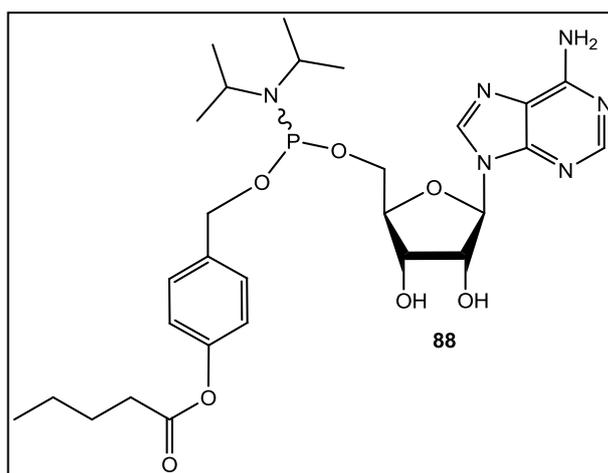
IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3649, 2969, 2929, 1731, 1628, 1604, 1558, 1489, 1370, 1313, 1229, 1164, 1026, 978.

MS(ESI⁺): m/z (%): ber.: 757.2844 [M+H]⁺, gef.: 757.2914 [M+H]⁺.

Anmerkung: Ein Teil der angegebenen ¹³C-Signale wurde anhand des HSQC und HMBC ermittelt.

5.2.8.3 Versuch der Synthese von 4-Pentanoyloxybenzyl-(5'-O-adenosin)phosphoramidit **88**

Die Reaktion wurde unter Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Es wurden 49.6 mg (0.186 mmol, 1.0 Äquiv.) Adenosin **91** zunächst dreimal mit abs. DMF coevaporiert und anschließend in 2.0 mL gelöst. Es wurden 94.6 mg (0.216 mmol, 1.2 Äquiv.) 4-Pentanoyloxybenzyl-bis-(diisopropylamino)phosphoramidit **90** 30 Minuten im Ölpumpenvakuum getrocknet, einmal mit abs. CH₃CN coevaporiert und anschließend in 2.0 mL abs. CH₃CN gelöst. Das Phosphoramidit wurde zu dem Nucleosid gegeben und dann wurden alle fünf Minuten 0.25 Äquiv. DCI (0.25 M in CH₃CN) zu dem Reaktionsansatz gegeben. Nach der Zugabe von 1.0 Äquiv. und einer Reaktionszeit von 20 Minuten war ein vollständiger Umsatz erreicht (DC: CH₂Cl₂/CH₃OH/Et₃N 6:2:1 v/v/v mit zuvor konditionierten DC-Platten). Das Lösungsmittel wurde im Membranpumpenvakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte am Chromatotron mit einem Methanol-Gradienten EE/Et₃N 9:1 → EE/Et₃N 9:1 + 2% CH₃OH → EE/Et₃N/CH₃OH 8:1:1 als Elutionsmittel, ebenfalls mit zuvor konditionierter Platte. Es war nicht möglich das Produkt vollständig zu reinigen.

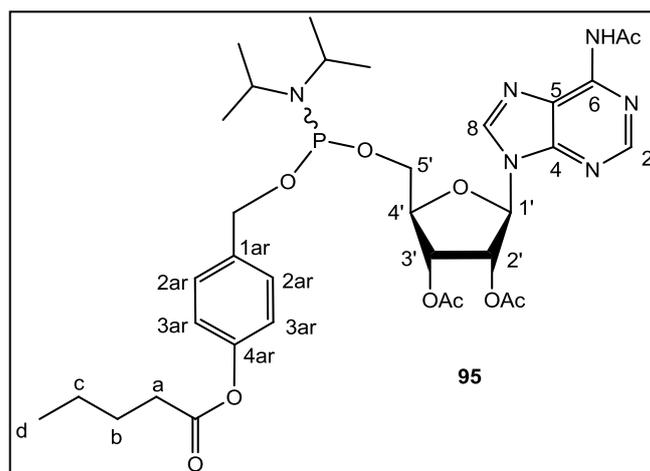


Summenformel: C₂₈H₄₁N₆O₇P; **Molekulargewicht:** 604.63 g/mol; **DC:** R_F-Wert: (EE/Et₃N/CH₃OH 8:1:1 v/v/v) 0.65.

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃, entkoppelt): δ [ppm] = 149.4, 148.8.

5.2.8.4 Synthese von 4-Pentanoyloxybenzyl-(5'-O-adenosin^{Ac})-phosphoramidit **95**

Die Darstellung erfolgte nach **AAV 10**. Es wurden 42.1 mg (0.107 mmol, 1.0 Äquiv.) des *N*⁴-Acetyl-2',3'-di-*O*-acetyladenosenin **97** gelöst in 1.0 mL abs. CH₃CN sowie 51.8 mg (0.118 mmol, 1.1 Äquiv.) 4-Pentanoyloxybenzyl-bis-(diisopropylamino)phosphoramidit **90** gelöst in 1.8 mL abs. CH₃CN verwendet. Des Weiteren wurden 428 µL DCI-Aktivatorlösung (0.25 M in CH₃CN, 1.0 Äquiv.) eingesetzt. Die Zugabe des Diamidites **90** erfolgte bei Rt und die Reaktionszeit betrug 10 Minuten.



Ausbeute: 54.2 g (74.2 µmol, 69%) eines farblosen Öls; **Summenformel:** C₃₄H₄₇N₆O₁₀P; **Molekulargewicht:** 730.74 g/mol; **DC:** R_F-Wert: (EE/Et₃N 9:1 v/v) 0.62.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.79 (s, 1H, **NHAc**), 8.71-8.62 (m, 3H, **NHAc**, 2x **H8**), 8.50 (s, 1H, **H2**), 8.47 (s, 1H, **H2**), 7.41-7.34 (m, 4H, **H_{ar}**), 7.06-7.01 (m, 4H, **H_{ar}**), 6.41 (d, ³J_{H,H} = 4.3 Hz, 1H, **H1'**), 6.39 (d, ³J_{H,H} = 4.3 Hz, 1H, **H1'**), 5.86-5.80 (m, 2H, 2x **H2'**), 5.62 (dd, ³J_{H,H} = 5.2 Hz, ³J_{H,H} = 2.2 Hz, 1H, **H3'**), 5.58 (dd, ³J_{H,H} = 5.2 Hz, ³J_{H,H} = 2.2 Hz, 1H, **H3'**), 4.84-4.77 (m, 2H, **CH₂-Bn**), 4.74-4.66 (m, 2H, **CH₂-Bn**), 4.43-4.39 (m, 1H, **H4'**), 3.9 (ddd, ²J_{H,H} = 11.6 Hz, ³J_{H,H} = 2.8 Hz, ³J_{H,P} = 5.5 Hz, 1H, **H5'a**), 3.95-3.82 (m, 3H, **H5'a**, 2x **H5'b**), 3.74-3.62 (m, 4H, 4x **iPr-CH**), 2.60, 2.58 (2x s, 2x 3H, 2x **N-Acetyl-CH₃**), 2.57-2.52 (m, 4H, 2x **-CH₂-a**), 2.15, (s, 6H, 2x **O-Acetyl-CH₃**), 2.02, 2.01 (2x s, 2x 3H, 2x **O-Acetyl-CH₃**), 1.77-1.71 (m, 4H, 2x **-CH₂-b**), 1.49-1.39 (m, 4H, 2x **-CH₂-c**), 1.23 (m, 24H, 4x **iPr-CH₃**), 0.99-0.94 (m, 6H, 2x **-CH₃-d**).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 128.2 (**C_{ar}**), 121.7, 121.6 (**C_{ar}**), 85.0 (**C1'**), 83.5 (**C4'**), 74.3 (**C2'**), 72.5, 72.4 (**C3'**), 65.0 (**CH₂-Bn**), 60.0 (**C5'**), 43.3 (**iPr-CH**), 34.3 (**-CH₂-a**), 27.1 (**-CH₂-b**), 25.8 (**N-Acetyl CH₃**), 24.9 (**iPr-CH₃**), 22.4 (**-CH₂-c**), 20.8, 20.5 (**O-Acetyl-CH₃**), 13.9 (**-CH₃-d**).

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃, entkoppelt): δ [ppm] = 149.1, 148.9.

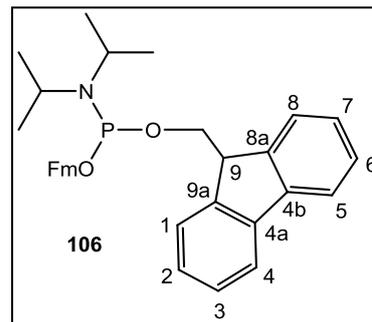
IR: [cm⁻¹] = 2965, 2932, 2871, 1751, 1704, 1606, 1586, 1465, 1371, 1279, 1210, 1027, 974, 725, 503.

MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 731.3161 [M+H]⁺, gef.: 731.3238 [M+H]⁺.

5.2.8.5 Synthese von Bis-O-(9H-fluoren-9-ylmethyl)-N,N-diisopropylaminophosphoramidit **106**

Unter Inertgasatmosphäre wurden 2.24 g (11.1 mmol, 1.0 Äquiv.) Dichloro-N,N-(diisopropyl)phosphoramidit **107** in 40 mL abs. THF gelöst. Zu dieser Lösung wurden bei 0 °C 4.35 g (22.2 mmol, 2.0 Äquiv.) 9-Fluorenylmethanol **108** und 3.23 mL (2.36 g, 23.3 mmol, 2.1 Äquiv.) Et₃N gelöst in 50 mL abs. THF getropft. Nach der vollständigen Zugabe wurde auf Rt erwärmt und der Reaktionsansatz über Nacht gerührt. Nach 24 h wurde die erhaltene Suspension filtriert. Das Filtrat wurde in je 200 mL 0.5 M Phosphatpuffer pH 7.0 und EE aufgenommen. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase erneut mit EE extrahiert. Anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Membranpumpenvakuum entfernt. Der Rückstand wurde mehrere Male mit CH₂Cl₂ coevaporiert. Eine säulenchromatographische Reinigung war nicht erforderlich.

Ausbeute: 5.76 g (11.0 mmol, quantitativ) eines leicht gelblichen Öls; **Summenformel:** C₃₄H₃₆NO₂P; **Molekulargewicht:** 521.63 g/mol.



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.76-7.72 (m, 4H, **H1**, **H8**), 7.67-7.61 (m, 4H, **H4**, **H5**), 7.40-7.34 (m, 4H, **H2**, **H7**), 7.28 (dq, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.1 Hz, 4H, **H3**, **H6**), 4.17 (dd, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, 2H, 2x **H9**), 4.00 (dt, ²J_{H,H} = 9.9 Hz, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 2H, **-CH₂-a**), 3.80 (dt, ²J_{H,H} = 9.9 Hz, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, **-CH₂-b**), 3.69-3.61 (m, 2H, 2x **iPr-CH**), 1.15 (d, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 12H, **iPr-CH₃**).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 145.1, 144.8 (**C_q-8a**, **C_q-9a**), 141.5, 141.4 (**C_q-4a**, **C_q-4b**), 127.5, 127.5 (**C2**, **C7**), 127.0, 126.9 (**C3**, **C6**), 125.6, 125.3 (**C4**, **C5**), 120.0, 119.9 (**C1**, **C8**), 66.0 (d, ²J_{C,P} = 17.4 Hz, **-CH₂**), 49.3 (d, ³J_{C,P} = 7.4 Hz, **C9**), 43.2 (d, ²J_{C,P} = 12.3 Hz, **iPr-CH**), 24.6 (d, ³J_{C,P} = 7.8 Hz, **iPr-CH₃**).

³¹P-NMR (162 MHz, CDCl₃, entkoppelt): δ [ppm] = 146.12.

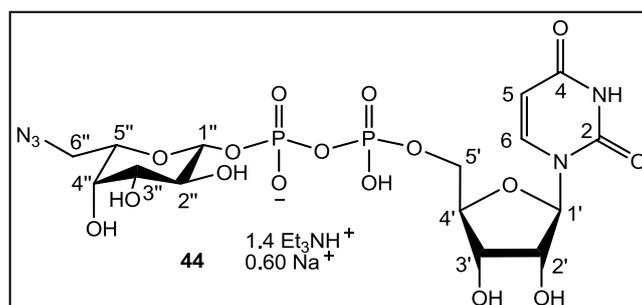
IR: [cm⁻¹] = 3065, 3039, 3018, 2964, 2928, 2864, 1448, 1363, 1183, 1126, 1066, 1007, 972, 883, 734, 517, 425.

MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 522.2556 [M+H]⁺, gef.: 522.2533 [M+H]⁺.

5.2.9 Darstellung von Guanosindiphosphat-Fucose-Derivaten

5.2.9.1 Synthese von Uridindiphosphat-6-azido-6-desoxy- β -L-galactose **44** als Tetra-butylammoniumsalz

Die Synthese wurde gemäß **AAV 11** durchgeführt. Es wurden 24.4 mg (45.1 μ mol, 1.0 Äquiv.) 5-Nitro-*cycloSal*-2',3'-di-O-acetyluridinmonophosphat **46**, 48.4 mg (78.1 μ mol, 1.7 Äquiv.) 2,3,4-Tri-O-acetyl-6-azido-6-desoxy- β -L-galactopyranosylphosphat **31** als Tetra-butylammoniumsalz und 2.5 mL abs. DMF verwendet.



Ausbeute: 24.6 mg (33.0 μ mol, 73%) eines farblosen, kristallinen Feststoffes;
Summenformel: $C_{27}H_{53}N_7O_{16}P_2$; **Molekulargewicht:** 746.17; **DC:** R_f -Wert: (*iso*-Propanol/1N Ammoniumacetatlösung 2:1 v/v) 0.47; **Drehwert:** $[\alpha]_{589nm}^{25}$: -12° ($c = 0.10$, H_2O).

Anmerkung: Zur Vereinfachung wurde die Summenformel für 2 Triethylammonium-Gegenionen berechnet. Für die Berechnung des Molekulargewichts wurde beachtet, dass tatsächlich 1.4 vorliegen. Für die fehlenden 0.6 Gegenionen wurde Natrium angenommen.

1H -NMR (400 MHz, D_2O): δ [ppm] = 8.00 (d, $^3J_{H,H} = 8.2$ Hz, 1H, **H6**), 6.06-6.00 (m, 2H, **H5**, **H1'**), 5.01 (dd, $^3J_{H,P} = 8.3$ Hz, $^3J_{H,H} = 8.3$ Hz, 1H, **H1''**), 4.46-4.39 (m, 2H, **H2'**, **H3'**), 4.35-4.20 (m, 3H, **H4'**, **H5'a,b**), 3.95 (dd, $^3J_{H,H} = 3.4$ Hz, $^3J_{H,H} = 0.7$ Hz, 1H, **H4''**), 3.88 (dd, $^3J_{H,H} = 6.0$ Hz, $^3J_{H,H} = 7.3$ Hz, 1H, **H5''**), 3.74 (dd, $^3J_{H,H} = 10.1$ Hz, $^3J_{H,H} = 3.5$ Hz, 1H, **H3''**), 3.71-3.61 (m, 2H, **H2''**, **H6'a**), 3.53 (dd, $^2J_{H,H} = 12.9$ Hz, $^3J_{H,H} = 5.4$ Hz, 1H, **H6'b**), 3.24 (q, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 8H, (**HN(CH₂CH₃)₃⁺**)), 1.31 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 13H, (**HN(CH₂CH₃)₃⁺**)).

^{13}C -NMR (151 MHz, D_2O): δ [ppm] = 141.6 (**C6**), 102.7 (**C5**), 98.5 (d, $^2J_{C,P} = 2.4$ Hz, **C1''**), 88.2 (**C1'**), 83.4 (d, $^3J_{C,P} = 9.3$ Hz, **C4'**), 73.8 (**C5''**), 73.7 (**C2'**), 72.2 (**C3''**), 71.1 (d, $^3J_{C,P} = 8.3$ Hz, **C2''**), 69.7 (**C3'**), 68.6 (**C4''**), 65.0 (d, $^2J_{C,P} = 5.5$ Hz, **C5'**), 50.4 (**C6''**), 46.7 (**HN(CH₂CH₃)₃⁺**), 8.2 (**HN(CH₂CH₃)₃⁺**).

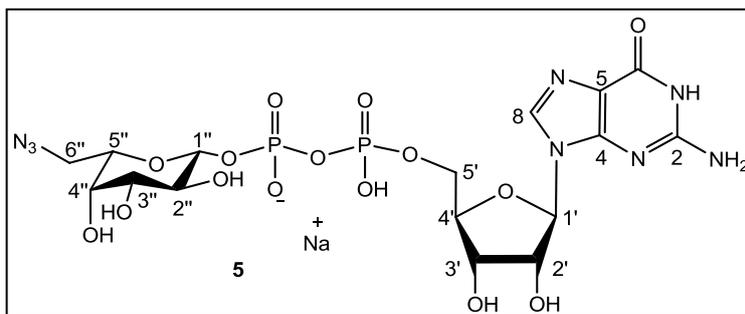
^{31}P -NMR (202 MHz, D_2O , entkoppelt): δ [ppm] = -11.2 (d, $^2J_{PP} = 20.7$ Hz, **P β**), -13.2 (d, $^2J_{PP} = 20.7$ Hz, **P α**).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3193, 2100, 1676, 1229, 1052, 937, 815, 767, 501.

MS(ESI): m/z (%): ber.: 590.0542 [M-H]⁻, gef.: 590.0487 [M-H]⁻.

5.2.9.2 Synthese von Guanosindiphosphat-6-azido-6-desoxy- β -L-galactose 5 als Natriumsalz

Die Synthese wurde gemäß **AAV 11** durchgeführt. Es wurden 59.7 mg (105 μ mol, 1.3 Äquiv.) 2,3,4-Tri-*O*-acetyl-6-azido-6-desoxy- β -L-galactopyranosylphosphat **31** als Tetra-butylammoniumsalz, 50.7 mg (81.5 μ mol, 1.0 Äquiv.) 5-Nitro-*cycloSal-N*²-acetyl-2',3'-di-*O*-acetylguanosinmonophosphat **40** und 2.5 mL abs. DMF verwendet.



Ausbeute: 17.1 mg (26.2 μ mol, 32%) eines farblosen, kristallinen Feststoffes;
Summenformel: C₁₆H₂₃N₈NaO₁₅P₂; **Molekulargewicht:** 652.34 g/mol; **DC:** R_F-Wert: (*iso*-Propanol/1N Ammoniumacetatlösung 2:1 v/v) 0.52, **Drehwert:** $[\alpha]_{589\text{nm}}^{25}$: -6° (c = 0.10, H₂O).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm] = 8.15 (s, 1H, **H8**), 5.97 (d, ³J_{H,H} = 6.4 Hz, 1H, **H1'**), 4.99 (dd, ³J_{H,P} = 8.0 Hz, ³J_{H,H} = 8.0 Hz, 1H, **H1''**), 4.86 (dd, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, ³J_{H,H} = 5.4 Hz, 1H, **H2'**), 4.57 (dd, ³J_{H,H} = 5.1 Hz, ³J_{H,H} = 3.1 Hz, 1H, **H3'**), 4.41-4.36 (m, 1H, **H4'**), 4.25 (dd, ³J_{H,H} = 5.3 Hz, ³J_{H,H} = 3.6 Hz, 2H, **H5'a,b**), 3.92 (dd, ³J_{H,H} = 3.2 Hz, ³J_{H,H} = 0.7 Hz, 1H, **H4''**), 3.81 (dd, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, 1H, **H5''**), 3.71 (dd, ³J_{H,H} = 10.1 Hz, ³J_{H,H} = 3.4 Hz, 1H, **H3''**), 3.67-3.59 (m, 2H, H2'', **H6'a**), 3.50 (dd, ²J_{H,H} = 12.8 Hz, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, 1H, **H6'b**).

¹³C-NMR (151 MHz, D₂O): δ [ppm] = 137.6 (**C8**) 98.5 (d, ²J_{C,P} = 5.9 Hz, **C1''**), 86.7 (**C1'**), 83.9 (d, ³J_{C,P} = 9.2 Hz, **C4'**), 73.6 (**C5''**), 73.4 (**C2'**), 72.1 (**C3''**), 71.1 (d, ³J_{C,P} = 8.3 Hz, **C2''**), 70.5 (**C3'**), 68.5 (**C4''**), 65.3 (d, ²J_{C,P} = 5.5 Hz, **C5'**), 50.2 (**C6''**).

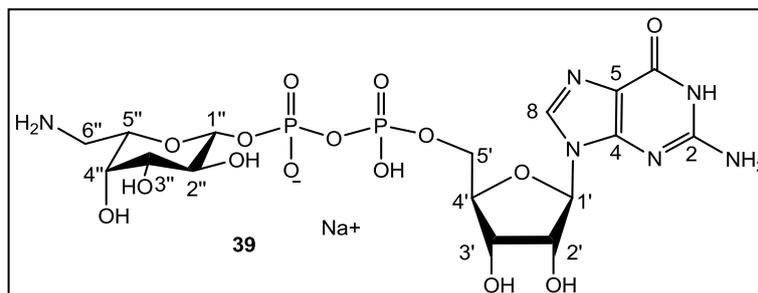
³¹P-NMR (202 MHz, D₂O, entkoppelt): δ [ppm] = -11.2 (d, ²J_{PP} = 19.6 Hz, **P_β**), -12.9 bis -13.5 (m, **P_α**).

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3137, 2116, 1241, 1059, 951, 824, 778, 508.

MS(ESI): *m/z* (%): ber.: 629.0764 [M-H]⁻, gef.: 629.0756 [M-H]⁻.

5.2.9.3 Synthese von Guanosindiphosphat-6-amino-6-desoxy- β -L-galactose **39** als Natriumsalz

Es wurden 12.2 mg (18.7 μ mol, 1.0 Äquiv.) Guanosindiphosphat-6-azido-6-desoxy- β -L-galactose **5** als Natriumsalz in 1.7 mL H₂O gelöst und mit 5.2 μ L (38 μ mol, 2.0 Äquiv.) Et₃N sowie einer Spatelspitze Pd/C (10% ig) versetzt. Bei leichtem Wasserstoffüberdruck wurde der Reaktionsansatz bei Rt reduziert. Nach 24 h war kein Edukt mehr detektierbar. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch mit *iso*-Propanol/1 N Ammoniumacetatlösung 2:1 v/v. Die Palladiumreste wurden mit einer sehr kurzen RP-Säule filtriert. Das farblose Filtrat wurde gefriertrocknet. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung eingesetzt.



Ausbeute: 10.5 mg (16.8 μ mol, 90%) eines kristallinen Feststoffes; **Summenformel:** C₁₆H₂₅N₆NaO₁₅P₂; **Molekulargewicht:** 626.34 g/mol; **DC:** R_F-Wert: (*iso*-Propanol/1N Ammoniumacetatlösung 2:1 v/v) 0.31.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm] = 8.07 (s, 1H, **H8**), 5.89 (d, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, 1H, **H1'**), 4.92 (dd, ³J_{H,P} = 7.7 Hz, ³J_{H,H} = 7.7 Hz, 1H, **H1''**), 4.71-4.69 (m, 1H, **H2'**), 4.50 (dd, ³J_{H,H} = 5.1 Hz, ³J_{H,H} = 3.5 Hz, 1H, **H3'**), 4.33-4.28 (m, 1H, **H4'**), 4.17 (dd, ³J_{H,H} = 5.4 Hz, ³J_{H,H} = 3.6 Hz, 2H, **H5'a,b**), 3.92 (dd, ³J_{H,H} = 9.9 Hz, ³J_{H,H} = 3.2 Hz, 1H, **H5''**), 3.87 (dd, ³J_{H,H} = 3.4 Hz, ³J_{H,H} = 0.8 Hz, 1H, **H4''**), 3.66 (dd, ³J_{H,H} = 10.0 Hz, ³J_{H,H} = 3.2 Hz, 1H, **H3''**), 3.59 (dd, ³J_{H,H} = 9.8 Hz, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 1H, **H2''**), 3.28 (dd, ²J_{H,H} = 13.3 Hz, ³J_{H,H} = 9.5 Hz, 1H, **H6'a**), 3.20 (dd, ²J_{H,H} = 13.4 Hz, ³J_{H,H} = 3.0 Hz, 1H, **H6'b**).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ [ppm] = 98.4 (d, ²J_{C,P} = 6.7 Hz, **C1''**), 86.8 (**C1'**), 83.9 (d, ³J_{C,P} = 9.1 Hz, **C4'**), 73.7 (**C2'**), 72.0 (**C3''**), 71.5 (**C5''**), 70.7 (d, ³J_{C,P} = 8.6 Hz, **C2''**), 70.5 (**C3'**), 68.9 (**C4''**), 65.3 (d, ²J_{C,P} = 6.2 Hz, **C5'**), 40.1 (**C6''**).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O, entkoppelt): δ [ppm] = -11.5 (d, ²J_{P,P} = 21.0 Hz, **P β**), -13.2 (d, ²J_{P,P} = 21.0 Hz, **P α**).

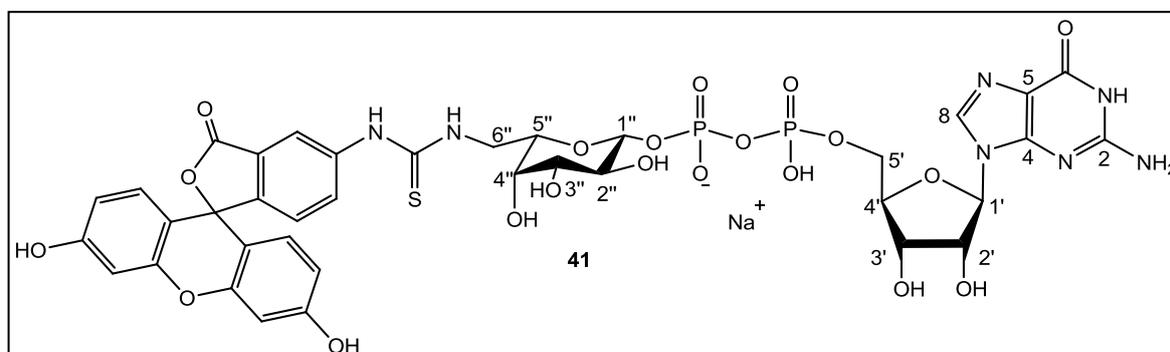
IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3139, 1693, 1563, 1247, 1066, 951, 776, 501.

MS(ESI): *m/z* (%): ber.: 603.0859 [M-H]⁻, gef.: 603.0884 [M-H]⁻.

5.2.10 Darstellung von fluoreszenzmarkierten Guanosindiphosphat-Fucose-Derivaten

5.2.10.1 Synthese von FITC-markierter Guanosindiphosphat-6-amino-6-desoxy- β -L-galactose **41** als Natriumsalz

Zu einer Lösung aus 6.0 mg (8.0 μ mol, 1.0 Äquiv.) Guanosindiphosphat-6-amino-6-desoxy- β -L-galactose **39** als Natriumsalz in 1.0 mL 0.1 M NaHCO₃/NaCO₃ Puffer (pH 9.3) wurden unter Lichtausschluss 5.0 mg (13 μ mol, 1.6 Äquiv.) Fluoresceinisothiocyanat **29** gelöst in 0.2 mL DMSO dazu gegeben. Der Reaktionsansatz wurde bei Rt gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte dünnschichtchromatographisch mit *iso*-Propanol/1N Ammoniumacetatlösung 2:1 v/v. Nach 2 h Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt und der erhaltene gelbe Rückstand wurde dreimal mittels Größenausschlusschromatographie an Sephadex[®] LH20 mit H₂O als Eluent gereinigt.



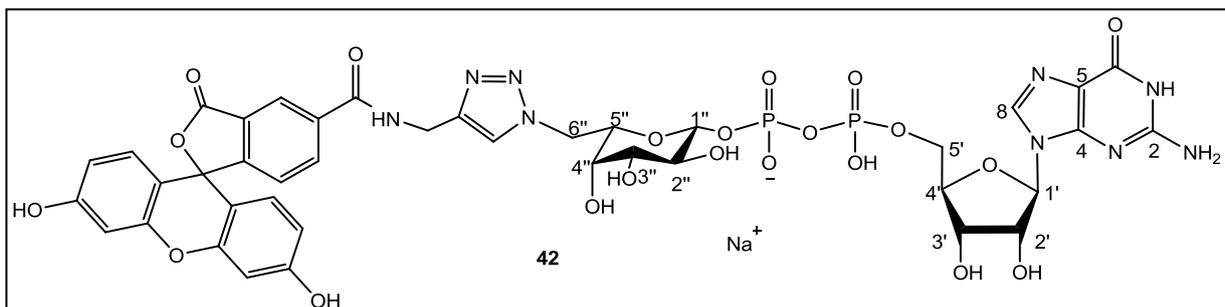
Ausbeute: 5.8 mg (5.7 μ mol, 71%) einer gelben Watte; **Summenformel:** C₃₇H₃₆N₇NaO₂₀P₂S; **Molekulargewicht:** 1015.71 g/mol; **DC:** R_F-Wert: (*iso*-Propanol/1N Ammoniumacetatlösung 2:1 v/v) 0.31.

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O, entkoppelt): δ [ppm] = -10.94 bis -11.74 (m, P _{β}), -12.83 bis -13.59 (m, P _{α}).

LC-HRMS (ESI): *m/z* (%): ber.: 992.1217 [M-H]⁻, gef.: 992.1196 [M-H]⁻.

5.2.10.2 Synthese von FAM-Triazol markierter Guanosindiphosphat-6-azido-6-desoxy- β -L-galactose **42** als Natriumsalz

Die Reaktion wurde gemäß **AAV 12** durchgeführt. Es wurden 7.1 mg (8.0 μ mol, 1.0 Äquiv.) Guanosindiphosphat-6-azido-6-desoxy- β -L-galactose **5** als Triethylammoniumsalz und 4.9 mg (12 μ mol, 1.4 Äquiv.) 5-Fam-Alkin **45** verwendet.



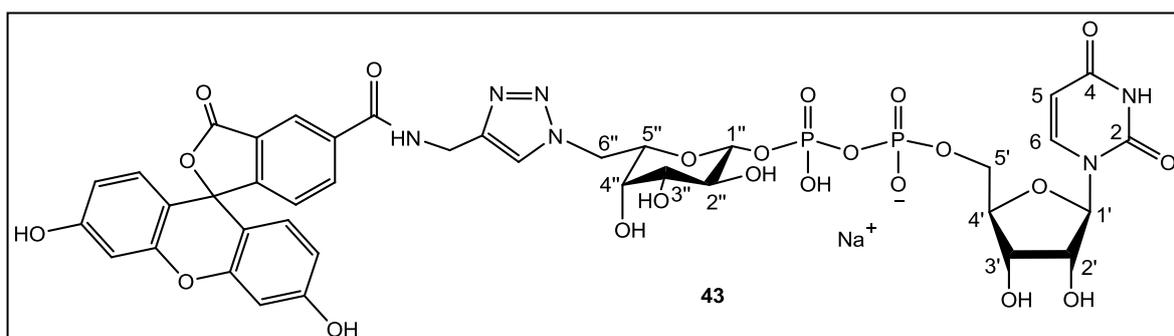
Ausbeute: 7.1 mg (6.7 μmol , 75%) eines orangefarbenen, kristallinen Feststoffes;
Summenformel: $\text{C}_{40}\text{H}_{38}\text{N}_9\text{NaO}_{21}\text{P}_2$; **Molekulargewicht:** 1065.71; **DC:** R_f -Wert: (*iso*-Propanol/1N Ammoniumacetatlösung 2:1 v/v) 0.45.

^{31}P -NMR (243 MHz, D_2O , entkoppelt): δ [ppm] = -10.70 bis -11.90 (m, **P β**), -12.86 bis -13.76 (m, **P α**).

MS(ESI): m/z (%): ber.: 1042.1663 [M-H] $^-$, gef.: 1042.1434 [M-H] $^-$.

5.2.10.3 Synthese von FAM-Triazol markierter Uridindiphosphat-6-azido-6-desoxy- β -L-galactose **43** als Natriumsalz

Die Synthese wurde gemäß **AAV 12** durchgeführt. Es wurden 5.3 mg (7.1 μmol , 1.0 Äquiv.) Uridindiphosphat-6-azido-6-desoxy- β -L-galactose **44** als Triethylammoniumsalz und 4.1 mg (9.9 μmol , 1.4 Äquiv.) 5-Fam-Alkin **45** eingesetzt.



Ausbeute: 4.2 mg (3.8 μmol , 58%) eines orangefarbenen, kristallinen Feststoffes;
Summenformel: $\text{C}_{39}\text{H}_{37}\text{N}_6\text{NaO}_{22}\text{P}_2$; **Molekulargewicht:** 1026.68; **DC:** R_f -Wert: (*iso*-Propanol/1N Ammoniumacetatlösung 2:1 v/v) 0.44.

^1H -NMR (600 MHz, D_2O): δ [ppm] = 8.30 (s, 1H, **H $_{ar}$**), 8.22 (s, 1H, **H $_{ar}$**), 8.17 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.8 Hz, 1H, **H $_{ar}$**), 7.81 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.2 Hz, 1H, **H6**), 7.47 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 7.8 Hz, 1H, **H $_{ar}$**), 7.31-7.24 (m, 2H, **H $_{ar}$**), 6.85-6.71 (m, 4H, **H $_{ar}$**), 5.79 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 8.3 Hz, 1H, **H5**), 5.75-5.72 (m, 1H, **H1'**), 4.96-4.91 (m, 1H, **H1''**).

¹³C-NMR (151 MHz, D₂O): δ [ppm] = 141.2 (C₆), 131.6 (C_{ar}), 130.3 (C_{ar}), 128.4 (C_{ar}), 127.5 (C_{ar}), 125.4 (C_{ar}), 103.2 (C_{ar}), 102.3 (C₅), 98.1 (C_{1''}), 87.9 (C_{1'}).

³¹P-NMR (243 MHz, D₂O, entkoppelt): δ [ppm] = -10.89 bis -11.86 (m, P_β), -13.22 bis -13.83 (m, P_α).

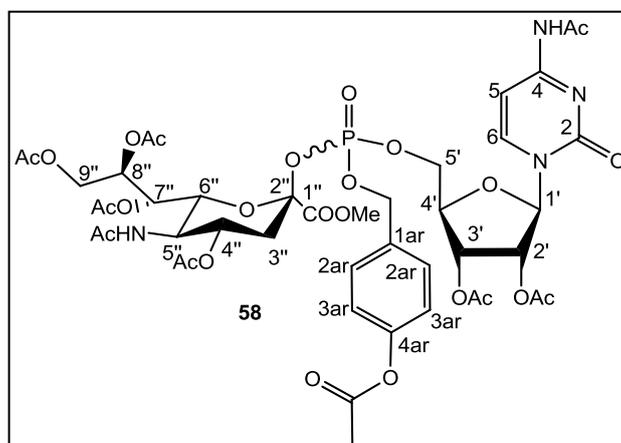
MS(ESI): *m/z* (%): ber.: 1003.1442 [M-H]⁻, gef.: 1003.1460 [M-H]⁻.

Anmerkung: Die angegebenen ¹³C-Signale wurden anhand des HSQC ermittelt.

5.2.11 Darstellung lipophiler CMP-Neu5Ac-Derivate

5.2.11.1 Synthese von C²AB-CMP-Neu5Ac^{Ac} 58

Die Synthese erfolgte gemäß **AAV 13**. Es wurden 70.0 mg (0.142 mmol, 1.0 Äquiv.) AcNeu5Ac^{COOMe} **22** gelöst in 0.70 mL abs. CH₃CN sowie 123 mg (0.185 mmol, 1.3 Äquiv.) C²AB-(5'-O-cytidin^{Ac})phosphoramidit **60** gelöst in 1.0 mL abs. CH₃CN verwendet. Des Weiteren wurden 740 µL DCI-Aktivatorlösung (0.25 M in CH₃CN, 1.3 Äquiv.) eingesetzt. Für die Oxidation wurden 33.0 µL *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan, 1.3 Äquiv.) verwendet. Nach Größenausschlusschromatographie an Sephadex[®] LH20 konnte kein sauberes Produkt erhalten werden.



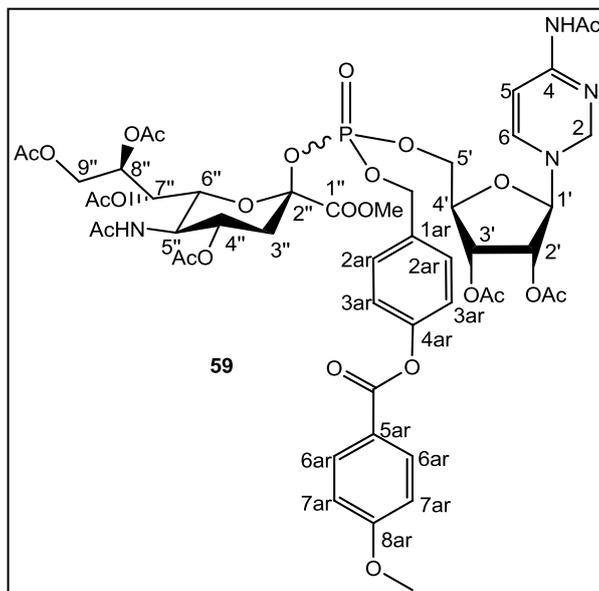
Summenformel: C₄₄H₅₅N₄O₂₅P; **Molekulargewicht:** 1070.89 g/mol; **DC:** R_f-Wert: 0.75 (EE/Et₃N 9:1 v/v).

MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 1071.2971 [M+H]⁺, gef.: 1071.2972 [M+H]⁺.

5.2.11.2 Synthese von p^{MPH}AB-CMP-Neu5Ac^{Ac} 59

Die Darstellung erfolgte nach **AAV 13**. Es wurden 20.1 mg (40.9 µmol, 1.0 Äquiv.) AcNeu5Ac^{COOMe} **22** gelöst in 0.70 mL abs. CH₃CN sowie 37.7 mg (49.8 µmol, 1.2 Äquiv.) p^{MPH}AB-(5'-O-cytidin^{Ac})phosphoramidit **61** gelöst in 1.0 mL abs. CH₃CN verwendet. Des Weiteren wurden 200 µL DCI-Aktivatorlösung (0.25 M in CH₃CN, 1.2 Äquiv.) eingesetzt. Für

die Oxidation wurden 9.0 μL *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan, 1.2 Äquiv.) verwendet.



Ausbeute: 14.1 mg (12.1 μmol , 30%) eines farblosen Feststoffes; **Summenformel:** $\text{C}_{50}\text{H}_{59}\text{N}_4\text{O}_{26}\text{P}$; **Molekulargewicht:** 1162.99 g/mol; **DC:** R_f -Wert: 0.44 (EE/ Et_3N 9:1 v/v) **Diastereomerenverhältnis:**1:0.4.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.17-8.11 (m, 2.8H, **H6_{ar}**), 7.69-7.66 (m, 1H, **H6**), 7.59-7.56 (m, 0.4H, **H6**), 7.50-7.46 (m, 2.8H, **H2_{ar}**), 7.43-7.38 (m, 1H, **H5**), 7.24-7.18 (m, 3.2H, **H3_{ar}**, **H5**), 7.01-6.95 (m, 2.8H, **H7_{ar}**), 5.81-5.77, 5.75-5.73, 5.68-5.59 (je m, **H1'**, **H2'**, **H3'**, **H7''**), 5.30-5.41 (m, 5.6H, **H4''**, **H8''**, **CH₂-Bn**), 4.50-4.95 (m, 0.4H, **H9''**), 4.64 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 11.9$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.5$ Hz, 1H, **H5'**), 4.55-4.51 (m, 1H, **H9''**), 4.47-4.43 (m, 0.4H, **H5''**), 4.40-4.26 (m, 5.6H, **H4''**, **H6''**, **H5''**, **H9''**), 4.20 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 11.9$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 8.5$ Hz, 1H, **H5'**), 4.09-4.01 (m, 0.4H, **H5'**), 3.90, 3.83, 3.81 (je s, **OCH₃**), 3.04-3.01 (m, 0.4H, **H3eq''**), 2.68 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 13.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.9$ Hz, 1H, **H3eq''**), 2.24-2.20 (m, 4.8H, **Acetyl-CH₃**, **CH_{3ax}**), 2.19-2.17, 2.11-2.10, 2.08-2.06, 2.03-2.02 (je m, je 4.4H, **Acetyl-CH₃**), 1.99-1.97 (m, 5.6H, **Acetyl-CH₃**, **CH_{3ax}**), 1.94-1.92, 1.88-1.85 (je m, je 4.4H, **Acetyl-CH₃**).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 170.8, 170.5 (**C_q-Acetyl**), 142.7 (**C6**) 132.5 (**C6_{ar}**), 129.7 (**C2_{ar}**), 122.3 (**C3_{ar}**), 114.1 (**C7_{ar}**), 97.1 (**C5**), 83.3, 80.9, 73.6, 73.4, 72.1, 69.3 (**C1'**, **C2'**, **C3'**, **C4'**, **C4''**, **C5''**, **C6''**, **C7''**, **C8''**), 68.8 (**CH₂-Bn**), 65.7 (**C9''**), 62.9 (**C5'**), 55.7, 53.7 (**OCH₃**), 47.5 (**C5''**), 37.6 (**C3''**), 29.8, 24.9, 23.4, 21.3, 20.1, 21.0, 20.7, 20.6 (**Acetyl-CH₃**).

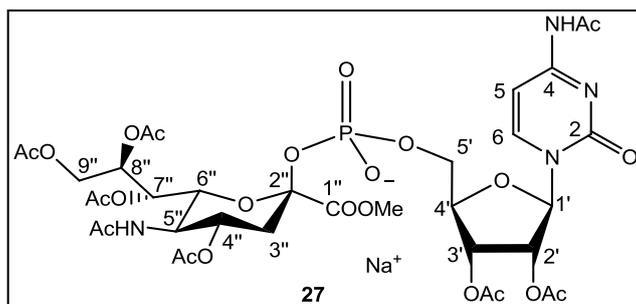
$^{31}\text{P-NMR}$ (243 MHz, CDCl_3) δ /ppm: -7.50, -7.65.

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3665, 2988, 2971, 2901, 1732, 1668, 1605, 1487, 1371, 1218, 1165, 1066, 1028, 941.

MS(ESI⁺): m/z (%): ber.: 1184.3047 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺, gef.: 1184.3050 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺.

5.2.11.3 Synthese von ^{Ac}CMP-Neu5Ac^{COOMe} 27

Die Reaktion erfolgte gemäß **AAV 14**. Es wurden 76.4 mg (0.155 mmol, 1.5 Äquiv.) ^{OAc}Neu5Ac^{COOMe} **22** und 2.7 mg (0.11 mmol, 1.1 Äquiv.) Natriumhydrid gelöst in 0.5 mL abs. DMF und 2.5 mL abs. CH₂Cl₂ eingesetzt. Zu dieser Lösung wurden bei -50 °C 60.1 mg (0.103 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Nitro-cycloSal-N⁴-acetyl-2',3'-di-O-acetycytidinmonophosphat **75** gelöst in 2.5 mL abs. CH₂Cl₂ getropft. Die Reaktionszeit betrug 4 h.



Ausbeute: 38.2 mg (40.4 μmol, 39%) einer farblosen Watte; **Summenformel:** C₃₅H₄₆N₄NaO₂₃P; **Molekulargewicht:** 944.72 g/mol; **DC:** R_F-Wert: 0.14 (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1 v/v).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm] = 8.37 (d, ³J_{H,H} = 7.7 Hz, 1H, **H6**), 7.38 (d, ³J_{H,H} = 7.7 Hz, 1H, **H5**), 6.19 (d, ³J_{H,H} = 4.6 Hz, 1H, **H1'**), 5.50-5.43 (m, 2H, **H2'**, **H3'**), 5.41-5.40 (m, 1H, **H7''**), 5.22-5.15 (m, 2H, **H4''**, **H8''**), 4.55-4.51 (m, 1H, **H4'**), 4.47 (dd, ²J_{H,H} = 12.7 Hz, ³J_{H,H} = 2.9 Hz, 1H, **H9a''**), 4.40 (dd, ³J_{H,H} = 10.7 Hz, ³J_{H,H} = 1.8 Hz, 1H, **H6''**), 4.33 (dd, ²J_{H,H} = 12.6 Hz, ³J_{H,H} = 5.9 Hz, 1H, **H9b''**), 4.29-4.22 (m, 1H, **H5'a**), 4.20-4.13 (m, 1H, **H5'b**), 3.90 (dd, ³J_{H,H} = 10.5 Hz, ³J_{H,H} = 10.5 Hz, 1H, **H5''**), 3.79 (s, 3H, **OCH₃**), 2.61 (dd, ²J_{H,H} = 13.6 Hz, ³J_{H,H} = 5.1 Hz, 1H, **H3eq''**), 2.20 (s, 3H, **Acetyl-CH₃**), 2.13-2.09 (m, 9H, 3x **Acetyl-CH₃**), 2.09-2.07 (m, 1H, **H3ax''**), 2.04, 2.03, 1.96, 1.86 (4x s, je 3H, 4x **Acetyl-CH₃**).

¹³C-NMR (151 MHz, D₂O): δ [ppm] = 174.2, 174.1, 173.8, 173.0, 172.8, 172.7, 172.5 (7x **C_q-Acetyl**), 163.0 (**C1''**), 145.5 (**C6**), 98.6 (**C5**), 88.2 (**C1'**), 81.7 (**C4'**), 74.3 (**C2'/C3'**), 71.3 (**C6''**), 71.0 (**C4''/C8''**), 70.4 (**C2'/C3'**), 69.1 (**C4''/C8''**), 68.3 (**C7''**), 64.2 (**C5'**), 62.4 (**C9''**), 53.5 (**OCH₃**), 49.0 (**C5''**), 36.7 (**C3''**), 24.1 (**N-Acetyl-CH₃**) 23.3, 21.1, 20.9, 20.9, 20.9 (5x **O-Acetyl-CH₃**).

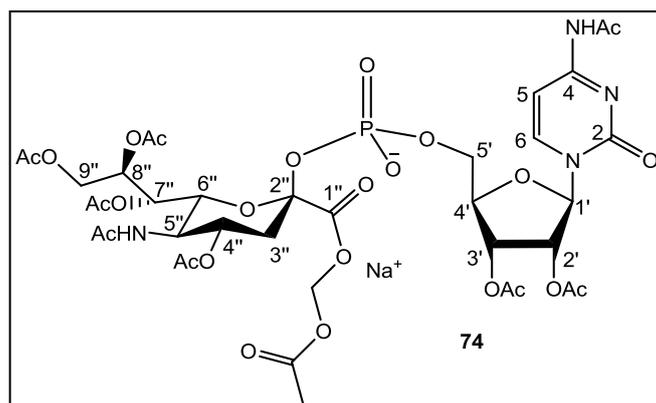
³¹P-NMR (162 MHz, D₂O) δ/ppm: -5.66.

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2988, 2901, 1737, 1661, 1492, 1372, 1228, 1076, 1066, 1045, 943, 893.

MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 923.2441 [M+H]⁺, gef.: 923.2489 [M+H]⁺.

5.2.11.4 Synthese von ^{Ac}CMP-Neu5Ac^{COOAM} **74**

Die Reaktion erfolgte gemäß **AAV 14**. Es wurden 85.3 mg (0.155 mmol, 1.5 Äquiv.) ^{OAc}Neu5NAc^{COOAM} **76** und 2.7 mg (0.11 mmol, 1.1 Äquiv.) Natriumhydrid gelöst in 0.5 mL abs. DMF und 2.5 mL abs. CH₂Cl₂ eingesetzt. Zu dieser Lösung wurden bei -50 °C 60.1 mg (0.103 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Nitro-cycloSal-N⁴-acetyl-2',3'-di-O-acetycytidinmonophosphat **75** gelöst in 2.5 mL abs. CH₂Cl₂ getropft. Die Reaktionszeit betrug 3.5 h.



Ausbeute: 20.0 mg (19.9 μmol, 20%) einer farblosen Watte; **Summenformel:** C₃₅H₄₆N₄NaO₂₃P; **Molekulargewicht:** 944.72 g/mol 0.15 (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1 v/v).

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm] = 8.43 (d, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, 1H, **H6**), 7.45 (d, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, 1H, **H5**), 6.27 (d, ³J_{H,H} = 4.6 Hz, 1H, **H1'**), 5.90-5.85 (m, 2H, **-O-CH₂-O**), 5.56-5.50 (m, 2H, **H2'**, **H3'**), 5.46 (dd, ³J_{H,H} = 5.1 Hz, ³J_{H,H} = 2.0 Hz, 1H, **H7''**), 5.29-5.21 (m, 2H, **H4''**, **H8''**), 4.62-4.58 (m, 1H, **H4'**), 4.55-4.46 (m, 2H, **H6''**, **H9a''**), 4.40 (dd, ³J_{H,H} = 12.6 Hz, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, 1H, **H9b''**), 4.34-4.28 (m, 1H, **H5a'**), 4.27-4.20 (m, 1H, **H5b'**), 3.97 (dd, ³J_{H,H} = 10.5 Hz, ³J_{H,H} = 10.5 Hz, 1H, **H5''**), 2.67 (dd, ²J_{H,H} = 13.6 Hz, ³J_{H,H} = 5.1 Hz, 1H, **H3eq''**), 2.26, 2.19, 2.18, 2.17, 2.16 (5x s, 5x 3H, **Acetyl-CH₃**), 2.15-2.11 (m, 1H, **H3ax''**), 2.10, 2.10, 2.02, 1.93 (4x s, je 3H, 4x **Acetyl-CH₃**).

¹³C-NMR (151 MHz, D₂O): δ [ppm] = 173.9, 173.4, 172.2 (**C_q-Acetyl**), 145.5 (**C6**), 98.4 (**C5**), 88.0 (**C1'**), 81.7 (**C4'**), 80.3 (**-O-CH₂-O**), 74.2 (**C2'/C3'**), 71.4 (**C6''**), 71.0 (**C4''/C8''**), 70.5 (**C2'/C3'**), 69.4 (**C4''/C8''**), 68.2 (**C7''**), 64.1 (**C5'**), 62.2 (**C9''**), 49.0 (**C5''**), 36.6 (**C3''**), 24.1 (**N-Acetyl-CH₃**) 21.8, 20.3, 20.2, 20.0, 19.9 (5x **O-Acetyl-CH₃**).

³¹P-NMR (162 MHz, D₂O) δ/ppm: -5.47.

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3270, 2937, 1737, 1652, 1491, 1370, 1216, 1036, 941, 810, 788, 597, 511, 403.

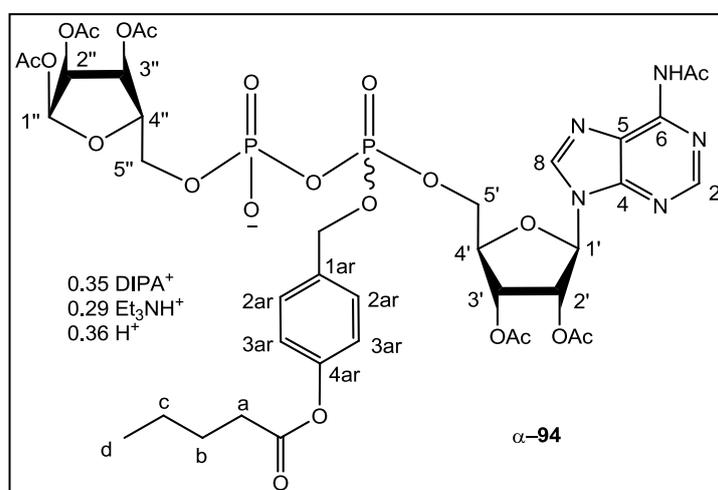
MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 981.2496 [M+H]⁺, gef.: 981.2506 [M+H]⁺.

Anmerkung: Die angegebenen ¹³C-Signale wurden anhand des HSQC und HMBC ermittelt.

5.2.12 Darstellung lipophiler ADPR-Derivate

5.2.12.1 Synthese von ^{C5}AB -ADPR- R^{Ac} α -94 als Diisopropyl-/Triethylammoniumsalz

Die Reaktion erfolgte gemäß **AAV 15**. Es wurden 36.5 mg (49.9 μ mol, 1.0 Äquiv.) ^{C5}AB -(5'-O-adenosin Ac)phosphoramidit **95** gelöst in 0.5 mL CH_3CN und 26.6 mg (54.5 μ mol, 1.1 Äquiv.) 1,2,3-Tri-O-acetyl- α -D-ribose-5-monophosphat α -**96** gelöst in 0.5 mL CH_3CN eingesetzt. Des Weiteren wurden 200 μ L DCI-Aktivatorlösung (0.25 M in CH_3CN , 1.0 Äquiv.) und 9.0 μ L *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan, 1.0 Äquiv.) eingesetzt. Die Reaktionszeit für den ersten Schritt betrug 5 Minuten und für den zweiten Schritt 10 Minuten.



Ausbeute: 23.0 mg (21.6 μ mol, 43%) einer farblosen Watte; **Summenformel:** C₄₅H₆₄N₆O₂₂P₂; **Molekulargewicht:** 1066.5 g/mol; **Diastereomerenverhältnis:** 1:1.

Anmerkung: Zur Vereinfachung wurde die Summenformel für 1 Diisopropylammonium Gegenionen berechnet. Für die Berechnung des Molekulargewichts wurde beachtet, dass tatsächlich 0.64 DIPA⁺/Et₃NH⁺ vorlagen. DIPA und Triethylammonium haben das gleiche Molekulargewicht. Für die fehlenden 0.36 Gegenionen wurden Protonen angenommen.

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD-*d*₄): δ [ppm] = 8.63-8.61 (m, 2H, 2x **H8**), 8.60-8.57 (m, 2H, **H2**), 7.40-7.38 (m, 4H, **H2_{ar}**), 7.01-6.99 (m, 4H, **H3_{ar}**), 6.36-6.35 (m, 2H, **H1''**), 6.35-6.33 (m, 2H, 2x **H1'**), 5.92-5.88 (m, 2H, 2x **H2'**), 5.70-5.66 (m, 2H, 2x **H3'**), 5.42-5.38 (m, 2H, **H3''**), 5.28-5.25 (m, 2H, **H2''**), 5.18-5.12 (m, 4H, 2x **CH₂-Bn**), 4.52-4.41 (m, 6H, 2x **H4'**, 4x **H5'ab**), 4.39-4.36 (m, 2H, **H4''**), 4.19-4.11 (m, 4H, 4x **H5''ab**), 3.49-3.43 (m, 0.7 H, **CH-DIPA**) 3.20 (q, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 1.7 H, **HN(CH₂CH₃)₃⁺**), 2.58-2.54 (m, 4H, 2x **-CH₂-a**), 2.38 (s, 6H, 2x **N-Acetyl-CH₃**), 2.14, 2.14, 2.07, 2.07, 2.05, 2.04, 2.03, 2.03, 2.00, 1.99 (10s, 5x 6H, 10x **O-**

Acetyl-CH₃), 1.73-1.67 (m, 4H, 2x **-CH₂-b**), 1.48-1.41 (m, 4H, 2x **-CH₂-c**), 1.32-1.28 (m, 8 H, **CH₃-DIPA**, **HN(CH₂CH₃)₃⁺**), 1.00-0.96 (m, 6H, 2x **-CH₃-d**).

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD-*d*₄): δ [ppm] = 171.3 (**C_q-Acetyl**), 153.4 (**C8**), 143.2 (**C2**), 130.3, 130.2 (**C2_{ar}**), 122.9, 122.8 (**C3_{ar}**), 95.7 (**C1''**), 87.5 (**C1'**), 84.0 (**C4''**), 82.2 (**C4'**), 74.7 (**C2'**), 71.9 (**C3'**), 71.8 (**C2''**), 71.3 (**C3''**), 70.1 (**CH₂-Bn**), 67.8 (**C5'**), 66.4 (**C5''**), 34.7 (**-CH₂-a**), 28.0 (**-CH₂-b**), 24.8 (**N-Acetyl-CH₃**), 23.2 (**-CH₂-c**), 20.9, 20.6, 20.5, 20.2, 20.2 (**O-Acetyl-CH₃**), 19.3 (**CH₃-DIPA** bzw. **HN(CH₂CH₃)₃⁺**), 14.1 (**-CH₃-d**), 9.2 (**CH₃-DIPA**, bzw. **HN(CH₂CH₃)₃⁺**).

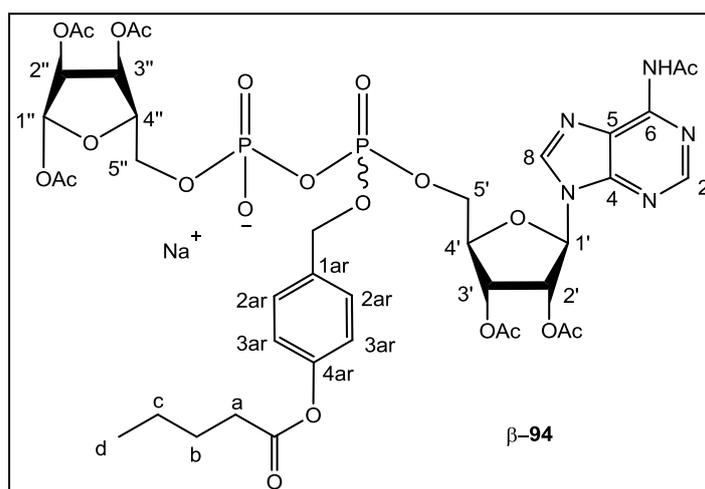
³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD-*d*₄, entkoppelt): δ [ppm] = 11.7 bis -11.9 (m, **Pβ**), -12.6 bis -13.1 (m, **Pα**).

IR: [cm⁻¹] = 2960, 2937, 1745, 1609, 1588, 1510, 1458, 1371, 1217, 1101, 1008, 820, 501.

MS(ESI): *m/z* (%): ber.: 1000.2272 [M-H]⁺, gef.: 1000.2227 [M-H]⁻.

5.2.12.2 Synthese von ^{C5}AB-ADPβ-R^{Ac} β-94 als Natriumsalz

Die Reaktion erfolgte gemäß **AAV 15**. Es wurden 51.9 mg (71.0 μmol, 1.0 Äquiv.) ^{C5}AB-(5'-O-adenosin^{Ac})phosphoramidit **95** gelöst in 0.7 mL CH₃CN und 45.7 mg (90.0 μmol, 1.3 Äquiv.) 1,2,3-Tri-O-acetyl-β-D-ribosyl-5-monophosphat β-**96** gelöst in 0.5 mL CH₃CN eingesetzt. Des Weiteren wurden 324 μL DCI-Aktivatorlösung (0.25 M in CH₃CN, 1.0 Äquiv.) und 14.7 μL *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan, 1.1 Äquiv.) eingesetzt. Die Reaktionszeit für den ersten Schritt betrug 10 Minuten und für den zweiten Schritt 5 Minuten. Nach der automatisierten Säulenchromatographie erfolgte ein Austausch der Gegenionen gegen Natriumionen über eine Ionentauschensäule (Dowex 50WX8 (Na⁺)).



Ausbeute: 40.5 mg (39.6 μmol, 56%) einer farblosen Warte; **Summenformel:** C₃₉H₄₈N₅NaO₂₂P₂; **Molekulargewicht:** 1023.8 g/mol; **Diastereomerenverhältnis:** 1:1.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD-*d*₄): δ [ppm] = 8.63-8.62 (m, 2H, 2x **H8**), 8.59-8.56 (m, 2H, 2x **H2**), 7.42-7.35 (m, 4H, 4x **H2_{aryl}**), 7.04-7.00 (m, 4H, **H3_{aryl}**), 6.35-6.32 (m, 2H, 2x **H1'**), 6.08-6.04 (m, 2H, 2x **H1''**), 5.95-5.89 (m, 2H, 2x **H2'**), 5.73-5.68 (m, 2H, 2x **H3'**), 5.44-5.39 (m, 2H, 2x **H3''**), 5.35-5.30 (m, 2H, 2x **H2''**), 5.17-5.09 (m, 4H, 2x **CH₂-benzyl**), 4.52-4.37 (m, 6H, 2x **H4'**, 2x **H5'a,b**), 4.37-4.31 (m, 2H, 2x **H4''**), 4.21-4.12 (m, 2H, 2x **H5''a**), 4.11-4.02 (m, 2H, 2x **H5''b**), 2.59-2.53 (m, 4H, 2x **-CH₂-a**), 2.38 (s, 6H, 2x **N-Acetyl CH₃**), 2.14, 2.14, 2.10, 2.09, 2.07, 2.06, 2.04, 2.03, 2.01, 2.01 (10x s, 10x 3H, 10x **O-Acetyl-CH₃**), 1.74-1.65 (m, 4H, 2x **-CH₂-b**), 1.50-1.39 (m, 4H, 2x **-CH₂-c**), 0.99-0.95 (m, 6H, 2x **-CH₃-d**).

¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD-*d*₄): 153.0 (**C8**), 143.6 (**C2**), 129.9 (**C_{aryl}**), 122.5, 99.1 (**C1''**), 87.3 (**C1'**), 82.2 (**C4'**), 81.5 (**C4''**), 75.3 (**C2''**), 74.4 (**C2'**), 71.7, (**C3''**), 71.5 (**C3'**), 71.1 (**CH₂-Bn**), 67.8 (**C5'**), 66.7 (**C5''**), 34.5 (**-CH₂-a**), 27.7 (**-CH₂-b**), 24.4 (**N-Acetyl-CH₃**), 22.9 (**-CH₂-c**), 20.8, 20.2, 20.1, 19.9 (**O-Acetyl-CH₃**), 13.7 (**-CH₃-d**).

³¹P-NMR (162 MHz, CD₃OD-*d*₄ entkoppelt): δ [ppm] = -11.6 bis -11.9 (m, **Pβ**), -12.6 bis -12.9 (m, **Pα**).

IR: [cm⁻¹] = 2958, 2937, 1747, 1610, 1588, 1510, 1460, 1371, 1216, 1028, 965, 822, 501.

MS(ESI⁺): *m/z* (%): ber.: 1002.2417 [M+H]⁺, gef.: 1002.2428 [M+H]⁺.

5.3 Hydrolysestudien

5.3.1 Chemische Hydrolysestudien in Phosphatpuffer bei pH 7.3

50 mM Phosphatpuffer (PBS)

547 mg (3.85 mol) Dinatriumhydrogenphosphat und 155 mg (0.890 mol) Kaliumdihydrogenphosphat wurden mit Reinstwasser auf ein Volumen von 100 mL aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mit NaOH bzw. Phosphorsäure auf pH 7.3 eingestellt.

Analyse mittels ³¹P-NMR-Spektroskopie

Es wurden 5.0 μmol der lipophilen Verbindung in 0.6 mL DMSO-*d*₆ gelöst. Die Hydrolyse wurde durch Zugabe von 0.1 mL PBS gestartet. Die Hydrolyse wurde ³¹P-NMR-spektroskopisch auf einem Bruker AV 400 mit 256 Scans oder AV 600 mit 128 Scans verfolgt. Der Startpunkt (*t*₀) wurde vor der Zugabe von PBS gemessen.

Analyse mittels HPLC

Für die Analyse wurden 55 μL einer 10 mM Stammlösung, gelöst in DMSO, mit 145 μL Reinstwasser und 200 μL DMSO versetzt. Die Hydrolyse wurde durch Zugabe von 300 μL PBS gestartet und mittels HPLC (Methode A) analysiert.

5.3.2 Enzymatische Hydrolysestudien mit PLE bei pH 7.3

Für die Hydrolysestudien wurde eine 6 mM Stammlösung der lipophilen Verbindung hergestellt. Im Fall der ADPR-Derivate wurde DMSO und bei den CMP-Meu5Ac-Derivaten Reinstwasser als Lösungsmittel zu Herstellung verwendet. Für jeden Messpunkt wurde eine eigene Hydrolyselösung angesetzt. 20 µL der Stammlösung wurden mit 20 µL PBS versetzt und die Hydrolyse durch Zugabe von 2 µL einer PLE-Lösung (1 mg/mL in PBS, 27 units/mg) gestartet. Die Proben wurden bei 37 °C im Thermomixer für die entsprechende Zeit inkubiert. Durch Zugabe von 50 µL CH₃OH wurde die Hydrolyse gestoppt. Es folgte eine fünfminütige Behandlung auf Eis und die Filtration der Hydrolyselösung durch Verwendung eines A0-Filters (Macherey und Nagel). Die Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren, wenn diese nicht sofort analysiert wurden. Die Analyse erfolgte durch Injektion von 5 µL in ein HPLS-MS-System. Für die CMP-Neu5Ac-Derivate wurde die HPLC-Methode B und für das ADPR-Derivat die HPLC-Methode C verwendet.

6 Literaturverzeichnis

- [1] N. Lunau, K. Seelhorst, S. Kahl, K. Tscherch, C. Stacke, S. Rohn, J. Thiem, U. Hahn, C. Meier, Fluorescently labeled substrates for monitoring alpha1,3-fucosyltransferase IX activity, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 17379-17390.
- [2] S. Wolf, S. Warnecke, J. Ehrit, F. Freiburger, R. Gerardy-Schahn, C. Meier, Chemical synthesis and enzymatic testing of CMP-sialic acid derivatives, *ChemBioChem.* **2012**, *13*, 2605-2615.
- [3] A. Varki, H. H. Freeze, P. Gagneux, in *Essentials of Glycobiology, Vol.* (Eds.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **2009**, S. 281-689.
- [4] L. Deng, X. Chen, A. Varki, Exploration of sialic Acid diversity and biology using sialoglycan microarrays, *Biopolymers* **2013**, *99*, 650-665.
- [5] J. C. Paulson, O. Blixt, B. E. Collins, Sweet spots in functional glycomics, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 238-248.
- [6] D. H. Dube, C. R. Bertozzi, Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 477-488.
- [7] N. Sharon, H. Lis, Kohlenhydrate und Zellerkennung, *Spektrum Wiss.* **1993**, *3*, 66-74.
- [8] M. N. Christiansen, J. Chik, L. Lee, M. Anugraham, J. L. Abrahams, N. H. Packer, Cell surface protein glycosylation in cancer, *Proteomics* **2014**, *14*, 525-546.
- [9] C.-H. Wong, R. L. Halcomb, Y. Ichikawa, T. Kajimoto, Enzymes in Organic Synthesis: Application to the Problems of Carbohydrate Recognition (Part I), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 412-432.
- [10] M. Mohamed, A. Ashikov, M. Guillard, J. H. Robben, S. Schmidt, B. van den Heuvel, A. P. de Brouwer, R. Gerardy-Schahn, P. M. Deen, R. A. Wevers, D. J. Lefeber, E. Morava, Intellectual disability and bleeding diathesis due to deficient CMP-sialic acid transport, *Neurology* **2013**, *81*, 681-687.
- [11] S. S. Pinho, C. A. Reis, Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications, *Nat. Rev. Cancer.* **2015**, *15*, 540-555.
- [12] C.-H. Wong, R. L. Halcomb, Y. Ichikawa, T. Kajimoto, Enzymes in Organic Synthesis: Application to the Problems of Carbohydrate Recognition (Part 2), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 521-546.
- [13] P. Stanley, What Have We Learned from Glycosyltransferase Knockouts in Mice?, *J. Mol. Biol.* **2016**, *428*, 3166-3182.
- [14] G. K. Wagner, T. Pesnot, R. A. Field, A survey of chemical methods for sugarnucleotide synthesis, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1172-1194.

- [15] L. F. Leloir, Two Decades of Research on the Biosynthesis of Saccharides, *Science* **1971**, *172*, 1299-1303.
- [16] S. Wendicke, S. Warnecke, C. Meier, Efficient synthesis of nucleoside diphosphate glycopyranoses, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 1500-1502.
- [17] C. Breton, L. Snajdrova, C. Jeanneau, J. Koca, A. Imberty, Structures and mechanisms of glycosyltransferases, *Glycobiology* **2006**, *16*, 29R-37R.
- [18] J. C. Paulson, K. J. Colley, Glycosyltransferases, *J. Biol. Chem.* **1989**, *164*, 17615-17618.
- [19] T. Pesnot, M. M. Palcic, G. K. Wagner, A novel fluorescent probe for retaining galactosyltransferases, *ChemBioChem.* **2010**, *11*, 1392-1398.
- [20] M. M. Muthana, J. Qu, Y. Li, L. Zhang, H. Yu, L. Ding, H. Malekan, X. Chen, Efficient one-pot multienzyme synthesis of UDP-sugars using a promiscuous UDP-sugar pyrophosphorylase from *Bifidobacterium longum* (BLUSP), *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2728-2730.
- [21] K. Ohtsubo, J. D. Marth, Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease, *Cell* **2006**, *126*, 855-867.
- [22] J. D. Marth, P. K. Grewal, Mammalian glycosylation in immunity, *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8*, 874-887.
- [23] A. Imberty, A. Varrot, Microbial recognition of human cell surface glycoconjugates, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, *18*, 567-576.
- [24] S. Nakamori, M. Kameyama, S. Imaoka, H. Furukawa, O. Ishikawa, Y. Sasaki, Y. Izumi, T. Irimura, Involvement of Carbohydrate Antigen Sialyl Lewis^x in Colorectal Cancer Metastasis, *Dis. Colon. Rectum.* **1997**, *40*, 420-431.
- [25] T. Jørgensen, A. Berner, O. Kaalhus, K. J. Tveter, H. E. Danielsen, M. Bryne, Up-Regulation of the Oligosaccharide Sialyl Lewis^x: A New Prognostic Parameter in Metastatic Prostate Cancer, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 1817-1819.
- [26] R. P. McEver, L-selectin expressed by lymphocytes interacts with specialized glycans on endothelium to mediate lymphocyte rolling. Two sulfotransferases that act cooperatively to add sulfate esters to a specific sugar residue on glycans are critical for this process., *Nature Immunol.* **2005**, 1067-1069.
- [27] T. Hada, K. Fukui, M. Ohno, S. Akamatsu, S. Yazawa, K. Enomoto, K. Yamaguchi, Y. Matsuda, Y. Amuro, N. Yamanaka, E. Okamoto, K. Higashino, Increased plasma alpha (1 - 3)-L-fucosyltransferase activities in patients with hepatocellular carcinoma, *Glycoconj. J.* **1995**, *12*, 627-631.
- [28] R. Kannagi, Molecular mechanism for cancer-associated induction of sialyl Lewis X and sialyl Lewis A expression - The Warburg effect revisited, *Glycoconj. J.* **2004**, *20*, 353-364.

- [29] M. Martín-Satué, R. Marrugat, J. A. Cancelas, J. Blanco, Enhanced Expression of alpha(1,3)-Fucosyltransferase Genes Correlates with E-selectin-mediated Adhesion and Metastatic Potential of Human Lung Adenocarcinoma Cells, *Cancer Res.* **1998**, *58*, 1544-1550.
- [30] N. Yamada, Y.-S. Chung, S. Takatsukal, Y. Arimoto, T. Sawada, T. Dohi, M. Sowa, Increased sialyl Lewis A expression and fucosyltransferase activity with acquisition of a high metastatic capacity in a colon cancer cell line, *Br. J. Cancer* **1997**, *76*, 582-587.
- [31] M. Schwarzkopf, K. P. Knobloch, E. Rohde, S. Hinderlich, N. Wiechens, L. Lucka, I. Horak, W. Reutter, R. Horstkorte, Sialylation is essential for early development in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5267-5270.
- [32] I. M. Ernst, R. Fliegert, A. H. Guse, Adenine Dinucleotide Second Messengers and T-lymphocyte Calcium Signaling, *Front. Immunol.* **2013**, *4*, 259.
- [33] S. A. Syed Mortadza, L. Wang, D. Li, L. H. Jiang, TRPM2 Channel-Mediated ROS-Sensitive Ca(2+) Signaling Mechanisms in Immune Cells, *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 407.
- [34] A. Sumoza-Toledo, R. Penner, TRPM2: a multifunctional ion channel for calcium signalling, *J. Physiol.* **2011**, *589*, 1515-1525.
- [35] C. M. Hecquet, A. B. Malik, Role of H₂O₂-activated TRPM2 calcium channel in oxidant-induced endothelial injury, *Thromb. Haemost.* **2009**, *101*, 619-625.
- [36] B. Langley, R. R. Ratan, Oxidative stress-induced death in the nervous system: cell cycle dependent or independent?, *J. Neurosci. Res.* **2004**, *77*, 621-629.
- [37] K. T. Yang, W. L. Chang, P. C. Yang, C. L. Chien, M. S. Lai, M. J. Su, M. L. Wu, Activation of the transient receptor potential M2 channel and poly(ADP-ribose) polymerase is involved in oxidative stress-induced cardiomyocyte death, *Cell. Death Differ.* **2006**, *13*, 1815-1826.
- [38] P. Yu, Q. Wang, L.-H. Zhang, H.-C. Lee, L. Zhang, J. Yue, A Cell Permeable NPE Caged ADP-Ribose for Studying TRPM2, *PLOS* **2012**, *7*, e51028.
- [39] G. Pazynina, V. Nasonov, I. Belyanchikov, R. Brossmer, M. Maisel, A. Tuzikov, N. Bovin, Koenigs-Knorr Glycosylation with Neuraminic Acid Derivatives, *International Journal of Carbohydrate Chemistry* **2010**, *2010*, 1-8.
- [40] 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.

- [41] M. Sawa, T. L. Hsu, T. Itoh, M. Sugiyama, S. R. Hanson, P. K. Vogt, C. H. Wong, Glycoproteomic probes for fluorescent imaging of fucosylated glycans in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 12371-12376.
- [42] B. Ma, J. L. Simala-Grant, D. E. Taylor, Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes, *Glycobiology* **2006**, *16*, 158R-184R.
- [43] T. Maeda, S. Nishimura, FRET-based direct and continuous monitoring of human fucosyltransferases activity: an efficient synthesis of versatile GDP-L-fucose derivatives from abundant D-galactose, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 478-487.
- [44] R. Mollicone, S. E. Moore, N. Bovin, M. Garcia-Rosasco, J. J. Candelier, I. Martinez-Duncker, R. Oriol, Activity, splice variants, conserved peptide motifs, and phylogeny of two new alpha1,3-fucosyltransferase families (FUT10 and FUT11), *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 4723-4738.
- [45] M. Li, X. W. Liu, J. Shao, J. Shen, Q. Jia, W. Yi, J. K. Song, R. Woodward, C. S. Chow, P. G. Wang, Characterization of a Novel R1,2-Fucosyltransferase of *Escherichia coli* O128:B12 and Functional Investigation of Its Common Motif, *Biochemistry* **2008**, *47*, 378-387.
- [46] R. Oriol, B. E. Samuelsson, L. Messeter, ABO antibodies - serological behaviour and immuno-chemical characterization, *J. Immunogenet.* **1990**, *17*, 279-299.
- [47] H. L. Chen, Lewis glyco-epitopes: structure, biosynthesis, and functions, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2011**, *705*, 53-80.
- [48] B. J. Appelmelk, R. Negrini, A. P. Moran, E. J. Kuipers, Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* and the host, *Trends Microbiol.* **1997**, *5*, 70-73.
- [49] S. L. Martin, M. R. Edbrooke, T. C. Hodgman, D. H. v. d. Eijndeni, M. I. Bird, Lewis X Biosynthesis in *Helicobacter pylori*, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 21349-21356.
- [50] S. Toivonen, S. Nishihara, H. Narimatsu, O. Renkonen, R. Renkonen, Fuc-TIX: a versatile α 1,3-fucosyltransferase with a distinct acceptor- and site-specificity profile, *Glycobiology* **2002**, *12*, 368-2002.
- [51] T. d. Vries, R. M. A. Knegt, E. H. Holmes, B. A. Macher, Fucosyltransferases: structure/function studies, *Glycobiology* **2001**, *11*, 119R-128R.
- [52] C. J. Britten, D. H. v. d. Eijnden, W. McDowell, V. A. Kelly, S. J. Witham, M. R. Edbrooke, M. I. Bird, T. d. Vries, N. Smithers, Acceptor specificity of the human leukocyte α 3 fucosyltransferase: role of FucT-VII in the generation of selectin ligand, *Glycobiology* **1998**, *8*, 321-327.
- [53] C. D. Rillahan, S. J. Brown, A. C. Register, H. Rosen, J. C. Paulson, High-throughput screening for inhibitors of sialyl- and fucosyltransferases, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 12534-12537.

- [54] P. Gribbon, A. Sewing, Fluorescence readouts in HTS: no gain without pain?, *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 1035-1043.
- [55] E. R. Vimr, K. A. Kalivoda, E. L. Deszo, S. M. Steenbergen, Diversity of Microbial Sialic Acid Metabolism, *Microbiol.Mol. Biol. Rev.* **2004**, *68*, 132-153.
- [56] T. Angata, A. Varki, Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-Keto acids An evolutionary perspective, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 439-469.
- [57] S. S. Park, J. Gervay-Hague, Synthesis of partially o-acetylated N-acetylneuraminic Acid using regioselective silyl exchange technology, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 5044-5047.
- [58] K. Okamoto, T. Goto, Glycosylation of Sialic Acid, *Tetrahedron Asymmetr.* **1990**, *46*, 5835-5857.
- [59] R. Schauer, Achievements and challenges of sialic acid research, *Glycoconjugate J.* **2000**, *17*, 485-499.
- [60] R. Schauer, Sialic acids and their role as biological masks, *TIBS* **1985**, *10*, 357-360.
- [61] R. Jäckh, Chemie und Biologie der Sialinsäuren, *Chem. unserer Zeit* **1976**, 139-146.
- [62] A. Harduin-Lepers, V. Vallejo-Ruiz, M.-A. Krzewinski-Recchi, B. Samyn-Petit, S. Julien, P. Delannoy, The human sialyltransferase family, *Biochimie* **2001**, *83*, 727-737.
- [63] R. L. Schnaar, R. Gerardy-Schahn, H. Hildebrandt, Sialic Acids in the Brain: Gangliosides and Polysialic Acid in Nervous System Development, Stability, Disease, and Regeneration, *Physiol. Rev.* **2014**, *94*, 461-518.
- [64] G. Taylor, Sialidases: structures, biological significance and therapeutic potential, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 830-837.
- [65] A. Varki, Diversity in the sialic acids, *Glycobiology* **1992**, *2*, 22-40.
- [66] R. Schauer, J. P. Kamerling, Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids, *Glycoproteins II (Montreuil J, Vliegenthart JFG and Schachter H, eds.)*. Elsevier; Amsterdam **1997**, 243-402.
- [67] K. Bork, W. Reutter, W. Weidemann, R. Horstkorte, Enhanced sialylation of EPO by overexpression of UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManAc kinase containing a sialuria mutation in CHO cells, *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 4195-4198.
- [68] A. Castilho, M. Pabst, R. Leonard, C. Veit, F. Altmann, L. Mach, J. Glossl, R. Strasser, H. Steinkellner, Construction of a functional CMP-sialic acid biosynthesis pathway in Arabidopsis, *Plant Physiol.* **2008**, *147*, 331-339.
- [69] K. Bork, R. Horstkorte, W. Weidemann, Increasing the sialylation of therapeutic glycoproteins: the potential of the sialic acid biosynthetic pathway, *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 3499-3508.
- [70] S. Hinderlich, R. Stasche, R. Zeitler, W. Reutter, A Bifunctional Enzyme Catalyzes the First Two Steps in N-Acetylneuraminic Acid Biosynthesis of Rat Liver: Purification and

- Characterization of UDP-*N*-Acetylglucosamine 2-Epimerase/*N*-Acetylmannoseamine Kinase, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 24313-24318.
- [71] R. Horstkorte, S. Nöhring, N. Wiechens, M. Schwarzkopf, K. Danker, W. Reutter, L. Lucka, Tissue expression and amino acid sequence of murine UDP-*N*-acetylglucosamine-2-epimerase/*N*-acetylmannosamine kinase, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *260*, 923-927.
- [72] L. Lucka, M. Krause, K. Danker, W. Reutter, R. Horstkorte, Primary structure and expression analysis of human UDP-*N*-acetyl-glucosamine-2-epimerase/*N*-acetylmannosamine kinase, the bifunctional enzyme in neuraminic acid biosynthesis, *FEBS Lett.* **1999**, *454*, 341-344.
- [73] R. Stäsche, S. Hinderlich, C. Weise, K. Effertz, L. Lucka, P. Moomann, W. Reutter, A Bifunctional Enzyme Catalyzes the First Two Steps in *N*-Acetylneuraminic Acid Biosynthesis of Rat Liver, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 24319-24324.
- [74] L. Warren, H. Felsenfeld, The Biosynthesis of Sialic Acids, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 1421-1431.
- [75] J. v. Rinsum, W. v. Dijk, G. J. M. Hooghwinkel, W. Ferwerda, Subcellular localization and tissue distribution of sialic acid-forming enzymes, *Biochem. J.* **1884**, *223*, 323-328.
- [76] G. W. Jourdian, A. L. Swanson, D. Watson, S. Roseman, Isolation of sialic acid 9-phosphatase from human erythrocytes, *J. Biol. Chem.* **1964**, *239*, 2714-2716.
- [77] E. L. Kean, Sialic acid activation, *Glycobiology* **1991**, *1*, 441-447.
- [78] A. K. Munster-Kuhnel, J. Tiralongo, S. Krapp, B. Weinhold, V. Ritz-Sedlacek, U. Jacob, R. Gerardy-Schahn, Structure and function of vertebrate CMP-sialic acid synthetases, *Glycobiology* **2004**, *14*, 43R-51R.
- [79] E. L. Kean, Sialic Acid Activating Enzyme in Ocular Tissue, *Exp. Eye Res.* **1969**, *8*, 44-51.
- [80] M. Eckhardt, M. Mühlenhoff, A. Bethe, R. Gerardy-Schahn, Expression cloning of the Golgi CMP-sialic acid transporter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 7572-7576.
- [81] R. Gerardy-Schahn, S. Oelmann, H. Bakker, Nucleotide sugar transporters: Biological and functional aspects, *Biochimie* **2001**, *83*, 775-782.
- [82] S. Kornfeld, R. Kornfeld, E. F. Neufeld, P. J. O'Brien, The feedback control of sugar nucleotide biosynthesis in liver, *Biochemistry* **1964**, *52*, 371-379.
- [83] P. Chefalo, Y. Pan, N. Nagy, C. Harding, Z. Guo, Preparation and immunological studies of protein conjugates of *N*-acylneuraminic acids, *Glycoconjugate J.* **2004**, *20*, 407-414.
- [84] L. M. Krug, G. Ragupathi, K. K. Ng, C. Hood, H. J. Jennings, Z. Guo, M. G. Kris, V. Miller, B. Pizzo, L. Tyson, V. Baez, P. O. Livingston, Vaccination of small cell lung

- cancer patients with polysialic acid or *N*-propionylated polysialic acid conjugated to keyhole limpet hemocyanin, *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 916-923.
- [85] O. T. Keppler, M. Herrmann, C. W. v. d. Lieth, P. Stehling, W. Reutter, M. Pawlita, Elongation of the N-Acyl Side Chain of Sialic Acids in MDCK II Cells Inhibits Influenza A Virus Infection, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1998**, *253*, 437-442.
- [86] T. Lieke, D. Grobe, V. Blanchard, D. Grunow, R. Tauber, M. Zimmermann-Kordmann, T. Jacobs, W. Reutter, Invasion of *Trypanosoma cruzi* into host cells is impaired by *N*-propionylmannosamine and other *N*-acylmannosamines, *Glycoconj. J.* **2011**, *28*, 31-37.
- [87] J. Ehrit, T. G. Keys, M. Sutherland, S. Wolf, C. Meier, R. A. Falconer, R. Gerardy-Schahn, Exploring and Exploiting Acceptor Preferences of the Human Polysialyltransferases as a Basis for an Inhibitor Screen, *ChemBioChem.* **2017**,
- [88] J. Rautio, H. Kumpulainen, T. Heimbach, R. Oliyai, D. Oh, T. Jarvinen, J. Savolainen, Prodrugs: design and clinical applications, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 255-270.
- [89] W. Thomson, D. Nicholls, W. J. Irwin, J. S. Al-Mushadani, S. Freeman, A. Karpas, J. Petrik, N. Mahmood, A. J. Hayd, Synthesis, Bioactivation and Anti-HIV Activity of the Bis(4-acyloxybenzyl) and Mono(4-acyloxybenzyl) Esters of the 5'-Monophosphate of AZT, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1993**, 1239-1245.
- [90] T. S. Raju, J. B. Briggs, S. M. Chamow, M. E. Winkler, A. J. S. Jones, Glycoengineering of Therapeutic Glycoproteins: In Vitro Galactosylation and Sialylation of Glycoproteins with Terminal *N*-Acetylglucosamine and Galactose Residues, *Biochemistry* **2001**, *40*, 8868-8876.
- [91] A. Varki, Sialic acids in human health and disease, *Trends. Mol. Med.* **2008**, *14*, 351-360.
- [92] A.-L. Perraud, A. Fleig, C. A. Dunn, L. A. Bagley, P. Launay, C. Schmitz, A. J. Stokes, Q. Zhu, M. J. Bessman, R. Penner, J.-P. Kinet, A. M. Scharenberg, ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudixmotif homology, *Nature* **2001**, *411*, 595-599.
- [93] Y. Sano, K. Inamura, A. Miyake, S. Mochizuki, H. Yikoi, H. Matsushime, K. Furuichi, Immunocyte Ca^{2+} Influx System Mediated by LTRPC2, *Science* **2001**, *293*, 1327-1330.
- [94] B. Toth, I. Iordanov, L. Csanady, Putative channel activity of TRPM2 cation channel is unrelated to pore gating, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 16949-16954.
- [95] K. Van derpoorten, M. E. Migaud, Isopolar Phosphate Analogue of Adenosine Diphosphate Ribose, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3461-3464.
- [96] H. Yang, M. M. Slupska, Y.-F. Wei, J. H. Tai, W. M. Luther, Y.-R. Xia, D. M. Shih, J.-H. Chiang, C. Baikalov, S. Fitz-Gibbon, I. T. Phan, A. Conrad, J. H. Miller, Cloning

- and Characterization of a New Member of the Nudix Hydrolases from Human and Mouse, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 8844-8853.
- [97] D. Bernet, R. M. Pinto, M. J. Costas, J. Canales, J. C. Cameselle, Rat liver mitochondrial ADP-ribose pyrophosphatase in the matrix space with low K_m for free ADP-ribose, *Biochem. J.* **1994**, *299*, 679-682.
- [98] A. L. Perraud, B. Shen, C. A. Dunn, K. Rippe, M. K. Smith, M. J. Bessman, B. L. Stoddard, A. M. Scharenberg, NUDT9, a member of the Nudix hydrolase family, is an evolutionarily conserved mitochondrial ADP-ribose pyrophosphatase, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 1794-1801.
- [99] J. Canales, A. Fernandez, J. M. Ribeiro, A. Cabezas, J. R. Rodrigues, J. C. Cameselle, M. J. Costas, Mn^{2+} -dependent ADP-ribose/CDP-alcohol pyrophosphatase: a novel metallophosphoesterase family preferentially expressed in rodent immune cells, *Biochem. J.* **2008**, *413*, 103-113.
- [100] F. Lund, N. Solvason, J. C. Grimaldi, R. M. E. Parkhouse, M. Howard, Murine CD38: an immunoregulatory ectoenzyme, *Immunol. Today* **1995**, *16*, 469-473.
- [101] R. Aarhus, R. M. Graeff, D. M. Dickey, T. F. Walseth, H. C. Lee, ADP-ribosyl Cyclase and CD38 Catalyze the Synthesis of a Calcium-mobilizing Metabolite from $NADP^+$, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 30327-30333.
- [102] F. E. Lund, D. A. Cockayne, T. D. Randall, S. N. F. Schuber, M. C. Howard, CD38: a new paradigm in lymphocyte activation and signal transduction, *Immunol. Rev.* **1998**, *161*, 79-93.
- [103] C. Huang, J. Hu, K. P. Subedi, A. H. Lin, O. Paudel, P. Ran, J. S. Sham, Extracellular Adenosine Diphosphate Ribose Mobilizes Intracellular Ca^{2+} via Purinergic-Dependent Ca^{2+} Pathways in Rat Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells, *Cell. Physiol. Biochem.* **2015**, *37*, 2043-2059.
- [104] Y. J. Zhao, C. M. C. Lam, H. C. Lee, The Membrane-Bound Enzyme CD38 Exists in Two Opposing Orientations, *Sci. Signal.* **2012**, *5*, ra67.
- [105] F. Malavasi, S. Deaglio, E. Ferrero, A. Funaro, J. Sancho, C. M. Ausiello, E. Ortolan, T. Vaisitti, M. Zubiaur, G. Fedele, S. Aydin, E. V. Tibaldi, I. Durelli, R. Lusso, F. Cozno, A. L. Horenstein, CD38 and CD157 as receptors of the immune system: a bridge between innate and adaptive immunity, *Mol. Med.* **2006**, *12*, 334-341.
- [106] E. Fonfria, I. C. Marshall, C. D. Benham, I. Boyfield, J. D. Brown, K. Hill, J. P. Hughes, S. D. Skaper, S. McNulty, TRPM2 channel opening in response to oxidative stress is dependent on activation of poly(ADP-ribose) polymerase, *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *143*, 186-192.
- [107] T. Rosenbaum, Activators of TRPM2: Getting it right, *J. Gen. Physiol.* **2015**, *145*, 485-487.

- [108] A. Gasser, G. Glassmeier, R. Fliegert, M. F. Langhorst, S. Meinke, D. Hein, S. Kruger, K. Weber, I. Heiner, N. Oppenheimer, J. R. Schwarz, A. H. Guse, Activation of T cell calcium influx by the second messenger ADP-ribose, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 2489-2896.
- [109] B. Toth, L. Csanady, Identification of direct and indirect effectors of the transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) cation channel, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 30091-30102.
- [110] O. P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F. J. Sigworth, Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches, *Pflügers Arch.* **1981**, *391*, 85-100.
- [111] E. Neher, B. Sakmann, Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers, *Nature* **1976**, *260*, 799-801.
- [112] S. Yuan, H. C. S. Chan, H. Vogel, S. Filipek, R. C. Stevens, K. Palczewski, The Molecular Mechanism of P2Y₁ Receptor Activation, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 10331-10335.
- [113] M. Arlt, O. Hindsgaul, Rapid Chemical Synthesis of Sugar Nucleotides in a Form Suitable for Enzymatic Oligosaccharide Synthesis, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 14-15.
- [114] P. Peltier, R. Daniellou, C. Nugier-Chauvin, V. Ferrières, Versatile Synthesis of Rare Nucleotide Furanoses, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5227-5230.
- [115] S. C. Timmons, D. L. Jakeman, Stereoselective Chemical Synthesis of Sugar Nucleotides via Direct Displacement of Acylated Glycosyl Bromides, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1227-1230.
- [116] J. G. Moffatt, H. G. Khorana, Nucleoside Polyphosphates. VIII.1 New and Improved Syntheses of Uridine Diphosphate Glucose and Flavin Adenine Dinucleotide Using Nucleoside-5' Phosphoramidates², *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 3756-3761.
- [117] V. Wittmann, C.-H. Wong, 1H-Tetrazole as Catalyst in Phosphomorpholidate Coupling Reactions: Efficient Synthesis of GDP-Fucose, GDP-Mannose, and UDP-Galactose, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2144 – 2147.
- [118] H. Gold, P. van Delft, N. Meeuwenoord, J. Codée, D. Filippov, G. Eggink, H. Overkleeft, G. van der Marel, Synthesis of Sugar Nucleotides by Application of Phosphoramidites, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 9458–9460.
- [119] R. Stiller, J. Thiem, Enzymatic Synthesis of β -L-Fucose-1-phosphate and GDP-fucose, *Liebigs Ann. Chem.* **1992**, 467-471.
- [120] S. Wolf, T. Zismann, N. Lunau, C. Meier, Reliable synthesis of various nucleoside diphosphate glycopyranoses, *Chemistry* **2009**, *15*, 7656-7664.
- [121] S. Wolf, R. M. Berrio, C. Meier, Synthesis of Nonnatural Nucleoside Diphosphate Sugars, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 6304-6313.

- [122] S. Wolf, T. Zismann, N. Lunau, S. Warnecke, S. Wendicke, C. Meier, A convenient synthesis of nucleoside diphosphate glycopyranoses and other polyphosphorylated bioconjugates, *Eur. J. Cell. Biol.* **2010**, *89*, 63-75.
- [123] M.-C. Chapeau, P. A. Frey, Synthesis of UDP-4-deoxy-4-fluoroglucose and UDP-4-deoxy-4-fluorogalactose and their Interactions with Enzymes of Nucleotide Sugar Metabolism, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6994-6998.
- [124] D. Lazarevic, J. Thiem, Syntheses of unnatural N-substituted UDP-galactosamines as alternative substrates for N-acetylgalactosaminyl transferases, *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 2187-2194.
- [125] J. G. Moffat, H. G. Khorana, Nucleoside Polyphosphates. X. The Synthesis and Some Reactions of Nucleoside-5' Phosphomorpholidates and Related Compounds. Improved Methods for Preparation of Nucleoside-5' Polyphosphates, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 649-658.
- [126] F. Reck, S. Marmor, S. Fisher, M. A. Wuonola, Inhibitors of the bacterial cell wall biosynthesis enzyme MurC, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1451-1454.
- [127] 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.
- [128] A. Miyagawa, S. Takeuchi, S. Itoda, S. Toyama, K. Kurimoto, H. Yamamura, Y. Ito, Chemical synthesis and isolation of UDP-2-deoxy glucose and galactose, *Synth. Commun.* **2016**, *46*, 1790-1795.
- [129] C. Meier, 2-Nucleos-5'-O-yl-4H-1,3,2-benzodioxaphosphinin-2-oxides - A New Concept for Lipophilic, Potential Prodrugs of Biologically Active Nucleoside Monophosphates, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 70-72.
- [130] S. Warnecke, C. Meier, Synthesis of Nucleoside Di- and Triphosphates and Dinucleoside Polyphosphates with *cycloSal*-Nucleotides, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3024-3030.
- [131] T. E. Y. Kajihara, K. Koseki, H. Kodama, H. Matsushita, H. Hashimoto, Efficient Chemical Synthesis of CMP-Neu5Ac and CMP-(Neu5Ac α 2 - 8Neu5Ac), *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5732-5735.
- [132] M. D. Chappell, R. L. Halcomb, Synthesis of CMP-sialic acid conjugates: substrates for the enzymic synthesis of natural and designed sialyl oligosaccharides, *Tetrahedron Asymmetr.* **1997**, *53*, 11109-11112.
- [133] S. Hashimoto, T. Honda, S. Ikegami, A rapid and efficient synthesis of 1,2-trans-beta-linked glycosides via benzyl- or benzoyl-protected glycopyranosyl phosphates, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, *11*, 685-687.

- [134] T. Gollnest, T. D. de Oliveira, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier, Lipophilic prodrugs of nucleoside triphosphates as biochemical probes and potential antivirals, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8716.
- [135] T. Gollnest, T. D. d. Oliveira, A. Rath, I. Hauber, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier, Membrane-permeable Triphosphate Prodrugs of Nucleoside Analogues, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 5255-5258.
- [136] H. J. Jessen, T. Schulz, J. Balzarini, C. Meier, Bioreversible Protection of Nucleoside Diphosphates, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8719-8722.
- [137] T. Schulz, J. Balzarini, C. Meier, The DiPPro approach: synthesis, hydrolysis, and antiviral activity of lipophilic d4T diphosphate prodrugs, *ChemMedChem* **2014**, *9*, 762-775.
- [138] L. Weinschenk, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier, Nucleoside Diphosphate Prodrugs: Nonsymmetric DiPPro-Nucleotides, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 6114-6130.
- [139] C. Meier, H. J. Jessen, T. Schulz, L. Weinschenk, F. Pertenbreiter, J. Balzarini, Rotational Development of Nucleoside Diphosphate Prodrugs: DiPPro-Compounds, *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 3933-3950.
- [140] L. Weinschenk, T. Gollnest, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier, Bis(benzoyloxybenzyl)-DiPPro nucleoside diphosphates of anti-HIV active nucleoside analogues, *ChemMedChem* **2015**, *10*, 891-900.
- [141] www.atto-tec.com, letzter Zugriff am 11.04.2017.
- [142] N. Panchuk-Voloshina, R. P. Haugland, J. Bishop-Stewart, M. K. Bhalgat, P. J. Millard, F. Mao, W.-Y. Leung, R. P. Haugland, 1999, *47*, .pdf>, *J. Histochem. Cytochem.* **1999**, *47*, 1179-1188.
- [143] G. Lukinavicius, K. Umezawa, N. Olivier, A. Honigmann, G. Yang, T. Plass, V. Mueller, L. Reymond, I. R. C. Jr, Z.-G. Luo, C. Schultz, E. A. Lemke, P. Heppenstall, C. Eggeling, S. Manley, K. Johnsson, A near-infrared fluorophore for live-cell super-resolution microscopy of cellular proteins, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 132-139.
- [144] www.dianova.com, letzter Zugriff am 11.14.2017.
- [145] W.-C. Sun, K. R. Gee, D. H. Klauber, R. P. Haugland, Synthesis of fluorinated fluoresceins, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6469-6475.
- [146] N. Lunau, Synthese seltener und funktionalisierter Nucleosiddiphosphat-Zucker, *Dissertation* **2012**, Universität Hamburg.
- [147] C. Meier, *cycloSal* Phosphates as Chemical Trojan Horses for Intracellular Nucleotide and Glycosylmonophosphate Delivery — Chemistry Meets Biology, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2006*, 1081-1102.
- [148] K. K. Ogilvie, D. J. Iwacha, Use of the *tert*-butyldimethyl group for protecting the hydroxyl functions of nucleosides, *Tetrahedron Lett.* **1973**, *14*, 317-319.

- [149] 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*, 1345-1346.
- [150] E. J. Corey, A. Venkateswarlu, Protection of hydroxyl groups as *tert*-butyldimethylsilyl derivatives, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6190-6191.
- [151] T. Zismann, Synthese von Nucleosiddiphosphatglycosiden basierend auf acceptorsubstituierten *cycloSal*-Nucleosidmonophosphateestern, *Dissertation* **2011**, Universität Hamburg.
- [152] J. Panero, J. Trelles, V. Rodano, J. M. Montserrat, L. E. Iglesias, E. S. Lewkowicz, A. M. Iribarren, Microbial hydrolysis of acetylated nucleosides, *Biotechnol. Lett.* **2006**, *28*, 1077-1081.
- [153] H. K. Singh, G. L. Cote, R. S. Sikorski, Enzymatic regioselective deacylation of 2',3',5'-tri-*O*-acylribo-nucleosides: Enzymatic synthesis of 2', 3'-di-*O*-acylribonucleosides, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 5201-5204.
- [154] H. Binch, K. Stangier, J. Thiem, Chemical synthesis of GDP-L-galactose and analogues, *Carbohydr. Res.* **1998**, *306*, 409-419.
- [155] R. Schmidt, New Methods of Glycoside and Oligosaccharide Syntheses - Are There Alternatives to the Koenigs-Knorr Method, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, *25*, 212-235.
- [156] G. Srivastava, K. J. Kaur, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, Enzymatic transfer of a preassembled trisaccharide antigen to cell surfaces using a fucosyltransferase, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 22356-22361.
- [157] T. Horrobin, C. H. Tran, D. Crout, Esterase-catalysed regioselective 6-deacylation of hexopyranose per-acetates, acid-catalysed rearrangement to the 4-deprotected products and conversions of these into hexose 4- and 6-sulfates, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, *6*, 1069-1080.
- [158] www.thermofisher.com, letzter Zugriff am 08.05.2017.
- [159] F. Amblard, J. H. Cho, R. F. Schinazi, Cu(I)-Catalyzed Huisgen Azide-Alkyne 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction in Nucleoside, Nucleotide, and Oligonucleotide Chemistry, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4207-4220.
- [160] K. Seelhorst, K. Pahnke, C. Meier, U. Hahn, Tagging Glycoproteins with Fluorescently Labeled GDP-Fucoses by Using α 1,3-Fucosyltransferases, *ChemBioChem.* **2015**,
- [161] R. G. Spiro, Studies on Fetuin, a Glycoprotein of Fetal Serum, *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 2860-2869.
- [162] R. G. Spiro, Studies on the Monosaccharide Sequence of the Serum Glycoprotein Fetuin, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 646-652.

- [163] R. G. Spiro, V. D. Bhojroo, Structure of the O-Glycosidically Linked Carbohydrate Units of Fetuin, *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 5704-5717.
- [164] C.-F. Chang, Carbohydrates – Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology, *InTech* **2012**, *1. Auflage*, S. 17.
- [165] G. H. Waetzig, A. Chalaris, P. Rosenstiel, J. Suthaus, C. Holland, N. Karl, L. Valles Uriarte, A. Till, J. Scheller, J. Grotzinger, S. Schreiber, S. Rose-John, D. Seeger, N-linked glycosylation is essential for the stability but not the signaling function of the interleukin-6 signal transducer glycoprotein 130, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 1781-1789.
- [166] J. R. Lakowicz, Principles in Fluorescence Spectroscopy, *Springer* **2006**, *3. Auflage*, S. 13-14.
- [167] J. H. Zhang, A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays, *J. Biomol. Screen.* **1999**, *4*, 67-73.
- [168] R. Kuhn, P. Lutz, D. L. MacDonald, Synthese anomerer Sialinsäure-methylketoside, *Chem. Ber.* **1966**, *99*, 611-617.
- [169] 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-nonulopyranosylonic acid)-xanthene-9-spiro-1'-isobenzofuran-3'-one, a new substrate for neuraminidase assay, *Carbohydr. Res.* **1990**, *1996*, 29-40.
- [170] J. M. Haberman, D. Y. Gin, Dehydrative Sialylation with C2-Hemi-Ketal Sialyl Donors, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2539-2541.
- [171] S. Wolf, Synthese von Zuckernucleotiden, *Dissertation* **2012**, Universität Hamburg.
- [172] R. M. Bock, N.-S. Ling, Ultraviolet Absorption Spectra of Adenosine-5'-Triphosphate and Related 5'-Ribonucleotides S-Ribonucleotides', *Arch. Biochem. Biophys.* **1956**, *62*, 253-264.
- [173] C. Schultz, Prodrugs of biologically active phosphate esters, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 885-898.
- [174] A. B. A. Jansen, T. J. Russell, Some Novel Penicillin Derivatives, *J. Chem. Soc.* **1965**, *379*, 2127-2132.
- [175] L. D. Lavis, Ester Bonds in Prodrugs, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 203-206.
- [176] D. Rennison, O. Laita, S. Bova, M. Cavalli, B. Hopkins, D. S. Linthicum, M. A. Brimble, Design and synthesis of prodrugs of the rat selective toxicant norbormide, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 3997-4011.
- [177] D. R. Klein, *Wiley Schnellkurs Organische Chemie Synthese* 1. Aufl., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2014**, S. 2118.

- [178] S. Lange, A. Musidlowska, C. Schmidt-Dannert, J. Schmitt, U. T. Bornscheuer, Cloning, Functional Expression, and Characterization of Recombinant Pig Liver Esterase, *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* **2001**, *2*, 576-582.
- [179] W. Gielen, Beitrag zur Chemie der Neuraminsäuren, *Z. Physiol. Chem.* **1967**, *348*, 329-333.
- [180] R. Schneider, C. C. Freyhardt, R. R. Schmidt, 5-Azido Derivatives of Neuraminic Acid - Synthesis and Structure, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1655-1661.
- [181] K. C. Nicolaou, S. P. Seitz, D. P. Papahatjis, A mild and general method for the synthesis of O-glycosides, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2430-2434.
- [182] R. Meza, B. Gordillo, M. Galván, Local HSAB principle in the conjugate addition of p-substituted thiophenols to cyclohexenone, *Int. J. Quantum Chem.* **2005**, *104*, 29-37.
- [183] S. Cao, S. J. Meunier, F. O. Andersson, M. Letellier, R. Roy, Mild Stereoselective Syntheses of Thioglycosides Under PTC Conditions and their Use as Active and Latent Glycosyl Donors, *Tetrahedron Asymmetr.* **1994**, 2303-2312.
- [184] H. Paulsen, H. Tietz, Synthesis of trisaccharide units from N-acetylneuraminic acid and N-acetyllactosamine, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 927-928.
- [185] E. Erikson, P. R. Wratil, M. Frank, I. Ambiel, K. Pahnke, M. Pino, P. Azadi, N. Izquierdo-Useros, J. Martinez-Picado, C. Meier, R. L. Schnaar, P. R. Crocker, W. Reutter, O. T. Keppler, Mouse Siglec-1 Mediates trans-Infection of Surface-bound Murine Leukemia Virus in a Sialic Acid N-Acyl Side Chain-dependent Manner, *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 27345-27359.
- [186] J. Balzarini, P. Herdewijn, E. D. Clercq, 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.
- [187] J. R. Burton, Jr., G. T. Everson, HCV NS5B polymerase inhibitors, *Clin. Liver Dis.* **2009**, *13*, 453-465.
- [188] T. Cihlar, A. S. Ray, Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine, *Antiviral Res.* **2010**, *85*, 39-58.
- [189] E. De Clercq, Antiviral drugs in current clinical use, *J. Clin. Virol.* **2004**, *30*, 115-133.
- [190] Y. El Safadi, V. Vivet-Boudou, R. Marquet, HIV-1 reverse transcriptase inhibitors, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *75*, 723-737.
- [191] L. P. Jordheim, D. Durantel, F. Zoulim, C. Dumontet, Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 447-464.

- [192] L. Beigelman, S. N. Mikhailov, Transient protection in nucleoside synthesis using trityl groups: is it necessary to block hydroxyl groups?, *Carbohydr. Res.* **1990**, *203*, 324-329.
- [193] L. J. Gao, S. Jonghe, P. Herdewijn, Synthesis of a Nucleobase-Modified ProTide Library, *Org Lett* **2016**, *18*, 5816-5819.
- [194] J. L. Wahlstrom, R. C. Ronald, Detritylation of Ethers Using Iodine-Alcohol Reagents: An Acid-Catalyzed Reaction, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6021-6022.
- [195] M. Smith, D. H. Rammle, I. H. Goldberg, H. G. J. Khorana, Studies on Polynucleotides. XIV.1 Specific Synthesis of the C3"-C5" Interribonucleotide Linkage. Syntheses of Uridylyl-(3'→5')-Uridine and Uridylyl-(3'→5')-Adenosine, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *84*, 430-440.
- [196] M. Smith, D. H. Rammle, I. H. Goldberg, H. G. Khorana, Studies on Polynucleotides. XIV. Specific Synthesis of the C3'-C5' Inter-ribonucleotide Linkage. Syntheses of Uridylyl-(3' - 5')-Uridine and Uridylyl-(3' - 5')-Adenosine, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 430-440.
- [197] G. Baisch, R. Öhrlein, Convenient chemoenzymatic synthesis of β-Purinediphosphate Sugars (GDP-fucose-analogues), *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 383-391.
- [198] L. Bialy, H. Waldmann, Synthesis of the Protein Phosphatase 2A Inhibitor (4S,5S,6S,10S,11S,12S)-Cytostatin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1748-1751.
- [199] L. Bialy, H. Waldmann, Total synthesis and biological evaluation of the protein phosphatase 2A inhibitor cytostatin and analogues, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 2759-2780.
- [200] Y. Watanabe, T. Nakamura, H. Mitsumoto, Protection of phosphate with the 9-fluorenylmethyl group. Synthesis of unsaturated-acyl phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7407-7474.
- [201] G. S. Cremosnik, A. Hofer, H. J. Jessen, Iterative synthesis of nucleoside oligophosphates with phosphoramidites, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 286-289.

Anhang

Gefahrstoffverzeichnis

Das folgende Verzeichnis umfasst Verbindungen, Reagenzien und Lösungsmittel, die im Rahmen dieser Promotion verwendet wurden. Diese Gefahrstoffe sind nach GHS (CLP Verordnung 1272/2008/EG) eingestuft und die entsprechenden Gefahrensymbole sowie die H- und P-Sätze angegeben. Die Stoffe, für die keine bekannte Einstufung existiert, sind als gefährlich einzustufen. Eine Kontamination mit diesen Substanzen oder das Einbringen in die Umwelt sind unbedingt zu vermeiden.

Substanz	Signalwort	Gefahrenpiktogramme	Gefahrenhinweise H-Sätze	Sicherheitshinweise P-Sätze
Aceton	Gefahr	 	EU066-225-319-336	210-240-305+351+338-403+233
Acetonitril	Gefahr	 	225-302-312-319-332	210-240-302+352-305+351+338-403+233
Acetylchlorid	Gefahr	  	225-302-314-EU014	210-280-305+351+338-310
<i>N</i> -Acetylneuraminsäure		Kein gefährliches Produkt im Sinne der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Adenosin		Kein gefährliches Produkt im Sinne der CLP Verordnung 1272/2008/EG		
Amberlite IR-120 Plus	-	-	-	260
Ammoniumacetat		Kein gefährliches Produkt im Sinne der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Brommethylacetat	Gefahr	 	226-300+310+330	210-280-302+352+310-304+340+310-370+378
<i>N</i> -Bromsuccinimid	Gefahr	 	302-314	280-305+351+338-310

Anhang

Substanz	Signalwort	Gefahrenpiktogramme	Gefahrenhinweise H-Sätze	Sicherheitshinweise P-Sätze
Butansäureanhydrid	Gefahr		314-EU014	280-305+351+338-310
<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid	Gefahr	 	228-314	210-280-305+351+338-310
<i>tert</i> -Butylhydroperoxid (5.5 M in <i>n</i> -Decan)	Gefahr	    	226-242-302-304-311+331-314-317-341-411	201-210-234-261-280-305+351+338
Chloroform- <i>d</i>	Gefahr	 	302-315-319-331-336-351-361d-372	260-280-301+312+330-304+340+312-305+351+338-403+233
Cytosin	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008			
DBU	Gefahr	 	290-301-314-412	273-280-301+310-305+351+338-310
Dichlormethan	Achtung	 	315-319-335-336-351-371	260-280-305+351+338
4,5-Dicyanoimidazol (0.25 M in CH ₃ CN)	Gefahr	  	225-302-312-315-318-332-335	210-261-280-305+351+338
Diethylether	Gefahr	 	224-302-336-EU019-EU066	210-240-403+235
<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin	Gefahr	  	225-302-331-314-335	210-260-280-310-303+361+353-305+351+338-403+235

Anhang

Substanz	Signalwort	Gefahrenpiktogramme	Gefahrenhinweise H-Sätze	Sicherheitshinweise P-Sätze
2,2-Dimethoxypropan	Gefahr	 	225-319	210-305+351-338
4,4'-Dimethoxytritylchlorid	Achtung		315-319-335	261-280-304+340-305+351+338
<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin	Gefahr		301-310-315-319-335	280-301+310+330-302+352+310-304+340+312-305+351+338-337+313
<i>N,N</i> -Dimethylformamid	Gefahr	  	360D-226-332-312-319	201-302+352-305+351+338-308+313
Dimethylsulfoxid	Kein gefährliches Produkt im Sinne der CLP Verordnung 1272/2008/EG			
Dimethylsulfoxid- <i>d</i> ₆	Kein gefährliches Produkt im Sinne der CLP Verordnung 1272/2008/EG			
Dioxan		  	EU019-EU066-225-319-335-351	201-202-210-240-241-242-243-261-264-280-303+361+353-304+340-305+351+338-308+313-312-337+313
Dowex 50W-X8	Achtung		319	305+351+338
Essigsäure	Gefahr	 	226-314	210-260-280-303+361+353-305+351+P338-370+378

Anhang

Substanz	Signalwort	Gefahrenpiktogramme	Gefahrenhinweise H-Sätze	Sicherheitshinweise P-Sätze
Essigsäureanhydrid	Gefahr		226-302-314-332	280-301+312- 301+330+331- 303+361+353- 304+340- 305+351+338- 309+310
Ethanol	Gefahr		225-319	210-240- 305+351+338- 403+233
Ethylacetat			225-319-336- EUH066	210-233-240- 305+351+338- 403+235
9-Fluorenyl- methanol		Kein gefährliches Produkt im Sinne der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Fluorescein- isothiocyanat	Gefahr		317-334	261-280-342+311
Guanosin	Gefahr		301	301+310
4-Hydroxybenzyl- alkohol	Achtung		319	305+351+338
Isopropanol			225-319-336	210-233-240-241- 242-243-264-280- 303+361+353- 305+351+338- 337+313
Kieselgel		-	-	260
Kupfersulfat	Gefahr		302-315-318-410	280-273-302+352- 305+351+338- 309+311

Anhang

Substanz	Signalwort	Gefahrenpiktogramme	Gefahrenhinweise H-Sätze	Sicherheitshinweise P-Sätze
Methanol	Gefahr		225-331-311-301- 370	210-233-280- 302+352-309+310
Methansulfonsäure			290-302-312-314- 335	301+312+330- 303+361+353- 304+340+310- 305+351+338
Natriumascorbat		Kein gefährliches Produkt im Sinne der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Natriumazid	Gefahr		300-310-373-410	273-280- 301+310+330- 302+352+310-391- 501
Natriumborhydrid	Gefahr		260-301-311-330- 314	231+232-301+310- 303+361+353-320- 330
Natriumcarbonat	Achtung		319	260-305+351+338
Natriumchlorid		Kein gefährliches Produkt im Sinne der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Natriumhydrid	Gefahr		260	223-231+232-280- 335+334-370+378
Natriumhydrogen- carbonat		Kein gefährliches Produkt im Sinne der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Natriumhydroxid	Gefahr		290-314	280-301+330+331- 305+351+338- 308+310
Natriumsulfat		Kein gefährliches Produkt im Sinne der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		

Anhang

Substanz	Signalwort	Gefahrenpiktogramme	Gefahrenhinweise H-Sätze	Sicherheitshinweise P-Sätze
Oxone®	Gefahr		314	260-280- 303+361+353- 304+340+310- 305+351+338
Palladiumhydroxid	Achtung		315-319-335	261-271-280
Palladium/Kohle	Achtung		228	210-240-241-280
Pentansäureanhydrid	Gefahr		314	280-301+330+331- 305+351+338- 309+310
Petrolether 50-70	Gefahr	   	225-304-315-336- 361f-373-411	201-210-301+310- 331-370+378-501
Phosphortrichlorid	Gefahr	   	EU014-EU029- 300-314-330-373	260-264-280-284- 301+310- 301+330+331- 303+361+353- 304+340- 305+351+338-314- 320
Propionsäureanhydrid	Gefahr		314	301+330+331- 305+351+338- 309+310-280
Pyridin	Gefahr	 	225-302-312-315- 319-332	210-280- 305+351+338
Ribose		Kein gefährliches Produkt im Sinne der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Salzsäure (37%)	Gefahr	 	290-314-335	260-280- 303+361+353- 304+340+310- 305+351+338

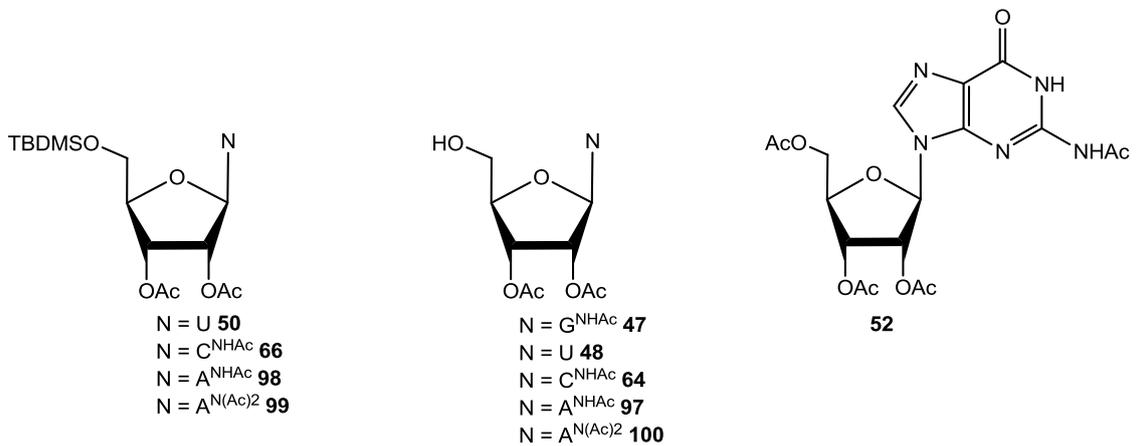
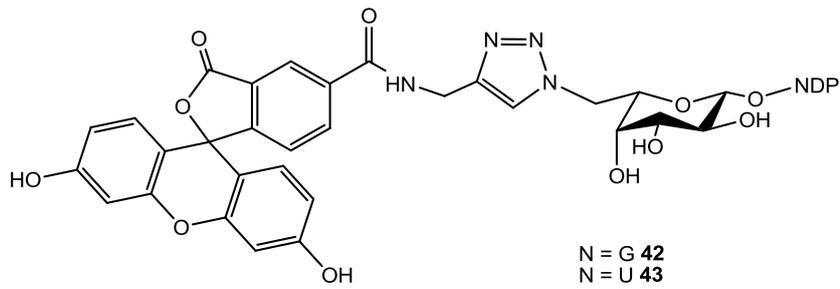
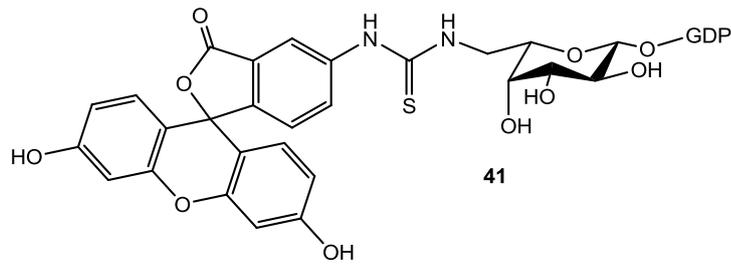
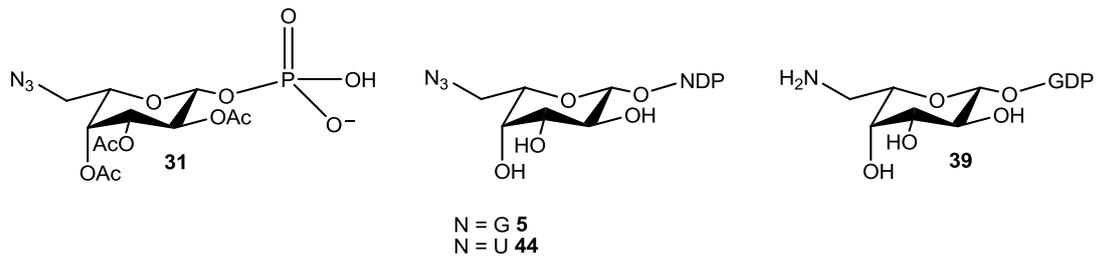
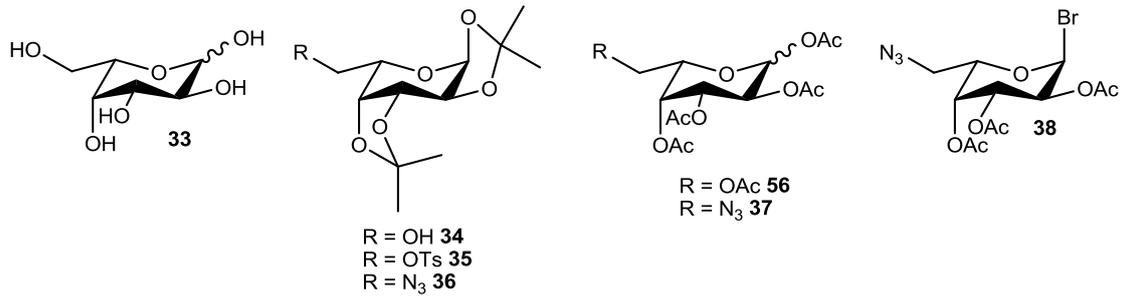
Anhang

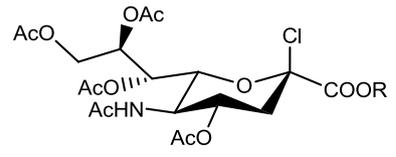
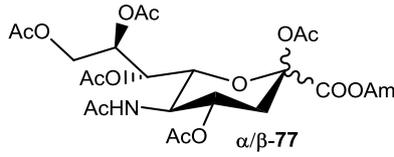
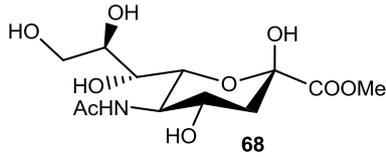
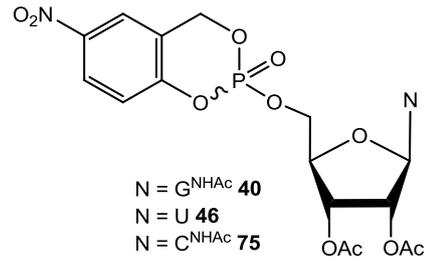
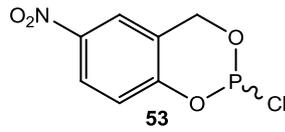
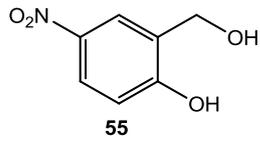
Substanz	Signalwort	Gefahrenpiktogramme	Gefahrenhinweise H-Sätze	Sicherheitshinweise P-Sätze
Schwefelsäure (konz.)	Gefahr		290-314	260-280- 303+361+353- 304+340+310- 305+351+338
Silbercarbonat	Gefahr		318	260-280- 305+351+338-313
TBA-HSO ₄	Achtung		302-315-319-335	261-305+351+338
Tetrahydrofuran	Gefahr		225-302-319-335- 351	210-280- 301+312+330- 305+351+338- 370+378-403+235
Thiophenol	Gefahr		226-330+310+330- 315-318-335-361- 371-373-410	210-260-280- 301+310+330- 302+352-304+340- 305+351+338-310- 403+233
Titantetrabromid	Gefahr		314	280-305+351+338- 310
Toluol	Gefahr		225-304-315-336- 361d-373	210-260-280- 301+310-370+378- 403+235
<i>p</i> -Toluolsulfonsäure	Achtung		315-319-335	302+352- 305+351+338
<i>p</i> -Toluolsulfon- säurechlorid	Gefahr		314	260-301+330+331- 303+361+353- 305+351+338

Anhang

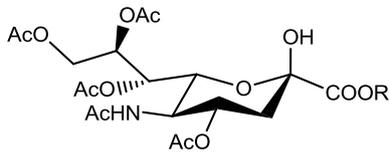
Substanz	Signalwort	Gefahrenpiktogramme	Gefahrenhinweise H-Sätze	Sicherheitshinweise P-Sätze
Triethylamin	Gefahr		225-302-312-314-332	210-280-303+361+353-304+340-305+351+338-310-403+233
Triethylamin-Trihydrofluorid	Gefahr		300-310-330-314	260-280-303+361+353-304+340+310-305+351+338
5-Nitrosalicylaldehyd	Achtung		302-315-319	305+351+338
Subtilisin (Propylenglycol-Lösung)	Gefahr		315-318-334-335-410	261-273-280-305+351+338-342+311
Uridin	Kein gefährliches Produkt im Sinne der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008			
Wasserstoff	Gefahr		220-280	210-377-381-403

Verbindungsübersicht

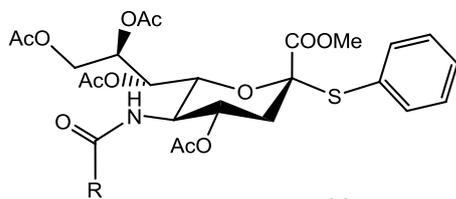
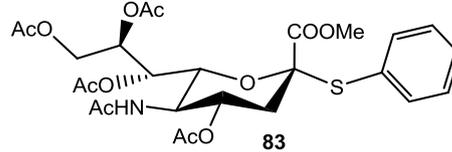




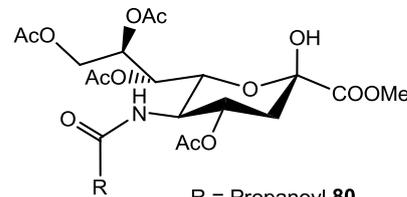
R = Me **68**
 R = Am **78**



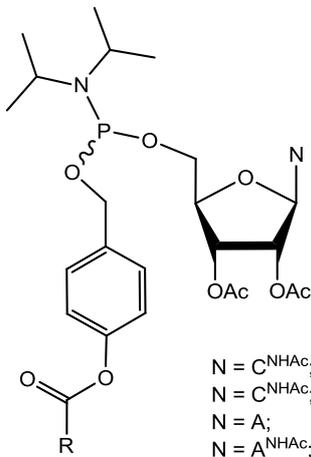
R = Me **22**
 R = Am **76**



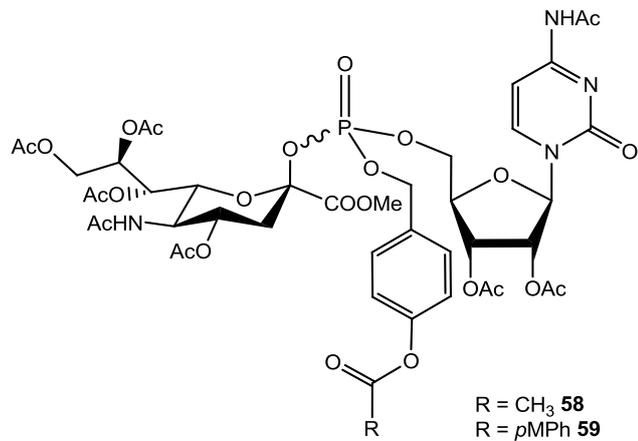
R = Propanoyl **84**
 R = Butanoyl **85**
 R = Pentanoyl **86**



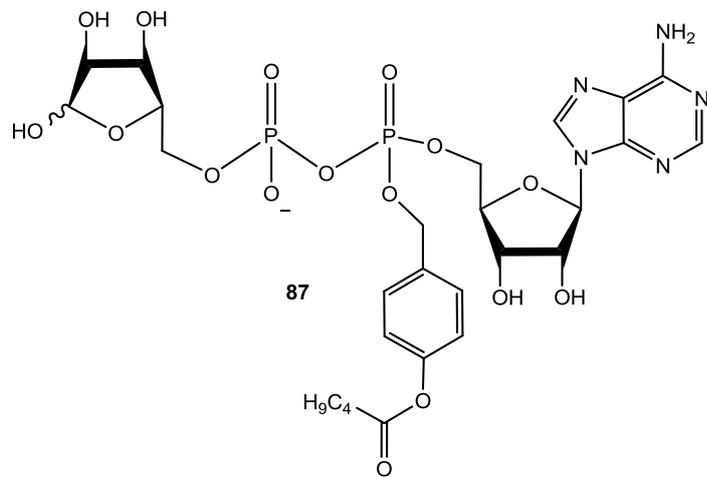
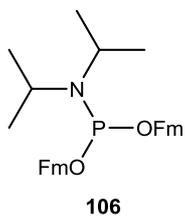
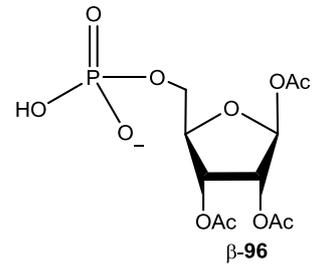
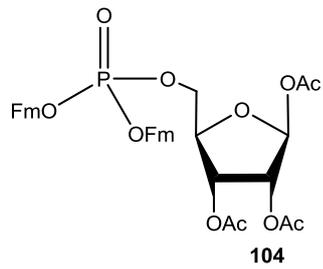
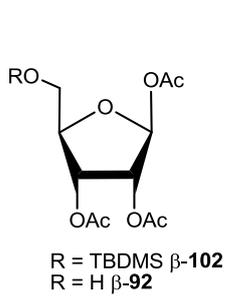
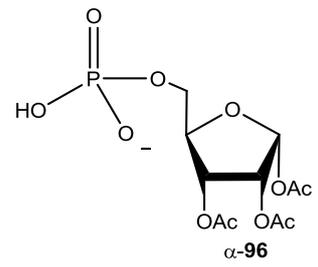
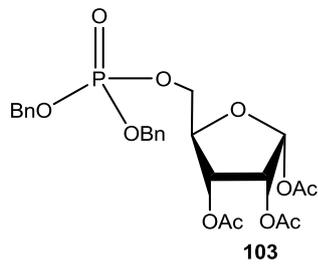
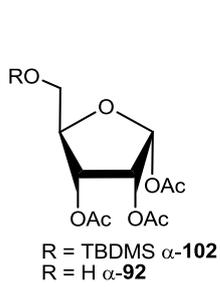
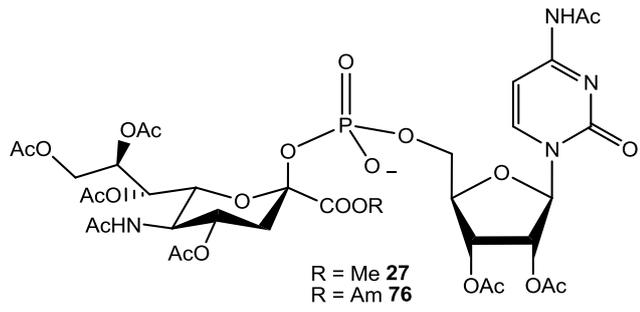
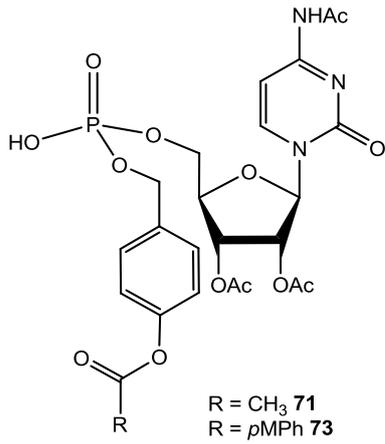
R = Propanoyl **80**
 R = Butanoyl **81**
 R = Pentanoyl **82**

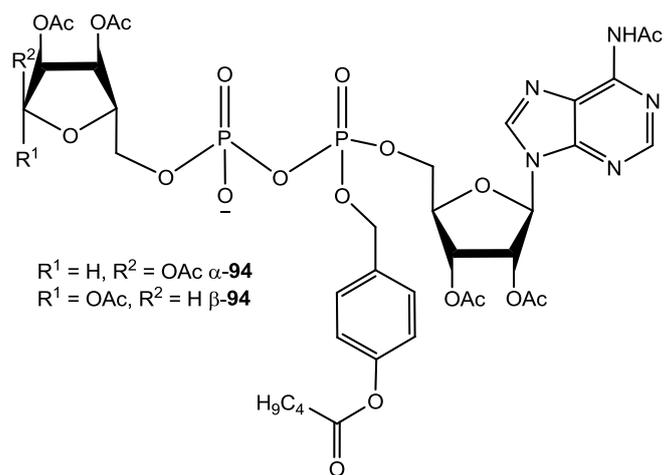


N = C^{NHAc}, R = CH₃ **60**
 N = C^{NHAc}, R = pMPh **61**
 N = A; R = C₄H₉ **88**
 N = A^{NHAc}, R = C₄H₉ **95**



R = CH₃ **58**
 R = pMPh **59**





Danksagung

Herrn Prof. Dr. Chris Meier gilt mein besonderer Dank für die interessante Themenstellung und den wissenschaftlichen Freiraum bei der praktischen Durchführung. Zudem danke ich für die stete Unterstützung durch konstruktive Diskussionen, die hervorragenden experimentellen Bedingungen sowie für die Ermöglichung an internationalen Fachkonferenzen Teilzunehmen.

Herrn Prof. Dr. Joachim Thiem danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens. Herrn Prof. Dr. Wolfgang Maison und Herrn Prof. Dr. Ralph Holl danke ich für die Teilnahme am Disputationskolloquium.

Allen Mitgliedern der NMR- und MS-Abteilung danke ich für die Durchführung unzähliger Experimente. Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Maria Riedner für die freundliche Unterstützung bei den HPLC-MS-Messungen und das Beantworten vieler Fragen bedanken.

Dem Arbeitskreis Meier -allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern- danke für die tolle Arbeitsatmosphäre, den regen wissenschaftlichen Austausch und für eine unvergessliche Zeit. Mein besonderer Dank geht an meine Laborpartnerin Dr. Inga Reimer sowie Dr. Johanna Huchting für die fachlichen Diskussionen, die stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung in allen Belangen. Dem Labor 525 und den Freundinnen aus dem Computerraum gilt auch mein besonderer Dank für eine super Zusammenarbeit, das Fachsimpeln und den großen Spaß den die Zeit mit euch gemacht hat.

Für die Unterstützung bei den praktischen Arbeiten danke ich den ISP-Praktikanten und den Forschungspraktikantinnen Sarah Chandralingam und Eva Schendera.

Bei Lena, Thiago und Roberto möchte ich mich für eine exzellente und grandiose Studienzeit bedanken. Es war einfach toll mit euch und ihr habt das Studium und auch die Zeit danach zu etwas ganz besonderem gemacht.

Für die fachliche und kritische Durchsicht dieser Arbeit möchte ich Dr. Inga Reimer danken.

Meinen Eltern danke für die bedingungslose Unterstützung und den Zuspruch während der gesamten Zeit hat.

Mein besonderer Dank geht an meinen Mann Joachim. Danke, dass du immer für mich da bist und mir bindungslos zur Seite stehst.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation „Synthese funktionalisierter Zuckernucleotide und deren Anwendbarkeit als biologische Tools“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Ort, Datum

Katharina Pahnke, M. Sc.