



Universität Hamburg

DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG

# **Synthese und Untersuchung diverser *photocaged* Adenosinverbindungen**

Synthesis and investigation of various photocaged  
adenosine derivatives

## **Dissertation**

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

von

**Nils Jeschik**

vorgelegt dem Fachbereich Chemie  
der Universität Hamburg

Hamburg 2020



Die vorliegende Arbeit wurde an der Universität Hamburg im Institut für Organische Chemie am Fachbereich Chemie im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Chris Meier im Zeitraum vom November 2016 bis November 2020 angefertigt.

**Erstgutachter:** Prof. Dr. Chris Meier

**Zweitgutachter:** Prof. Dr. Ralph Holl

Datum der Disputation: 15.01.2021

Druckfreigabe: 12.02.2021

Was ist das?  
Das ist blaues Licht.  
Und was tut es?  
Es leuchtet blau!  
...und spaltet Moleküle

**Rambo III**

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>VII</b>
<b>Abstract</b>	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Theoretischer Teil</b>	<b>6</b>
2.1 Adenin-Nucleotide im biologischen Kontext . . . . .	6
2.1.1 Kommunikation auf zellulärer Ebene . . . . .	6
2.2 Bioreservible Schützung bioaktiver Substanzen - Das Prodrug-Konzept .	11
2.3 Nucleotid-Prodrugkonzepte . . . . .	14
2.3.1 Das <i>cycloSal</i> -Konzept . . . . .	17
2.3.2 Das BAB-Konzept . . . . .	19
2.4 Photolabile Schutzgruppen . . . . .	22
2.4.1 2-Nitrobenzyl Photoschutzgruppen . . . . .	26
2.4.2 <i>p</i> -Hydroxyphenylacyl-Photoschutzgruppe . . . . .	29
2.5 Photolabile Schutzgruppen zur Maskierung von Adenosinderivaten . . . .	30
<b>3 Aufgabenstellung</b>	<b>34</b>
<b>4 Resultate und Diskussion</b>	<b>38</b>
4.1 Synthese von Schutzgruppen basierend auf dem 2-Nitrobenzyl-Grundgerüst	38
4.1.1 Synthese von 2-Nitrobenzylalkohol <b>23</b> (NB) . . . . .	40
4.1.2 Synthese von 5-Methoxy-2-nitrobenzylalkohol <b>48</b> (OMeNB) . . . .	40
4.1.3 Synthese von 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzylalkohol <b>24</b> (NV) . . . .	41
4.1.4 Synthese von 5-Methoxy-2-nitro-4-octanoxybenzylalkohol <b>43</b> ( <i>lipNV</i> )	42
4.1.5 Synthese von 1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)ethan-1-ol <b>25</b> (MeNV)	44
4.1.6 Synthese von 1-(4-Methoxy-2-nitro-5-octanoxyphenyl)ethan-1-ol <b>44</b>	
( <i>lipMeNV</i> ) . . . . .	47

4.2	Synthese von phosphorhaltigen <i>caged</i> -Verbindungen als Kupplungsbausteine für die Synthese von $\gamma$ -Bis- <i>caged</i> -ATP . . . . .	48
4.2.1	Synthese von <i>caged</i> -Phosphoramiditen . . . . .	49
4.2.2	Synthese von <i>caged-H</i> -Phosphonaten . . . . .	53
4.3	Synthese der symmetrischen <i>caged</i> -ATP Derivate . . . . .	56
4.4	Photolyse der hergestellten <i>caged</i> -ATP Derivate . . . . .	63
4.4.1	Allgemeiner Versuchsaufbau der Photolyse . . . . .	63
4.4.2	Photolyse der symmetrischen <i>caged</i> -ATP Derivate . . . . .	64
4.5	Synthese von orthogonal geschützten MeNV-AB-ATP <b>82</b> . . . . .	72
4.5.1	Retrosynthese . . . . .	72
4.5.2	Synthese von MeNV-AB-ATP <b>82</b> . . . . .	74
4.5.3	Photolyse und enzymatische Hydrolyse des MeNV-AB-ATP <b>82</b> . . . . .	78
4.6	$\gamma$ -Alkyl-MeNV-ATP als Testsubstrat zur Untersuchung der Photolyse von MeNV-Derivaten . . . . .	83
4.6.1	Synthese von $\gamma$ -Alkyl-MeNV-ATP <b>86</b> . . . . .	84
4.6.2	Photolyseuntersuchungen am Beispiel des $\gamma$ -Alkyl-MeNV-ATP <b>86</b> . . . . .	86
4.6.2.1	Einfluss des Lösungsmittel . . . . .	86
4.6.2.2	Einfluss des pH-Werts . . . . .	88
4.6.2.3	Einfluss des Abstands . . . . .	90
4.6.2.4	Einfluss der Wellenlänge . . . . .	92
4.7	Synthese und Untersuchung des NV- <i>caged</i> -d4T-Triphosphats <b>96</b> . . . . .	93
4.7.1	Synthese des symmetrischen NV- <i>caged</i> -d4T-Triphosphats <b>96</b> . . . . .	94
4.7.2	Photolyse des symmetrischen NV- <i>caged</i> -d4TTP <b>96</b> . . . . .	98
4.8	Symmetrisches <i>p</i> -Hydroxyphenylacyl-ATP . . . . .	101
4.8.1	Retrosynthese des Bis-pHP-ATPs <b>42</b> . . . . .	103
4.8.2	Synthese des Bis-pHP-ATPs <b>42</b> . . . . .	105
4.8.3	Photolytische Untersuchung der veresterten pHP-Maske . . . . .	124
4.9	Synthese von photocaged-cyclischem Adenosinmonophosphat . . . . .	134
4.9.1	Bekannte Retrosyntheseansätze zur Darstellung von <i>caged</i> -cAMP . . . . .	135
4.9.2	Synthese von <i>caged</i> -cAMP über die Syntheserouten A und B . . . . .	137
4.9.3	Photolyse des MeNV-cAMPs <b>46</b> . . . . .	151
4.10	Synthese und Untersuchung von 5'-NB- <i>N</i> <sup>6</sup> -cyclopentyladenosin <b>40</b> . . . . .	153
4.10.1	Retrosynthese . . . . .	154

## Inhaltsverzeichnis

---

4.10.2	Synthese des 5'-NB- <i>N</i> <sup>6</sup> -cyclopentyladenosin <b>40</b> . . . . .	157
4.10.2.1	Syntheseroute A . . . . .	159
4.10.2.2	Syntheseroute B . . . . .	164
4.10.2.3	Syntheseroute C . . . . .	166
4.10.2.4	Syntheseroute D . . . . .	168
4.10.3	Photolyse des erhaltenen NB-geschützten Adenosinderivats <b>160</b> .	176
<b>5</b>	<b>Fazit</b>	<b>179</b>
<b>6</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>185</b>
6.1	Verwendete Geräte und Chemikalien . . . . .	185
6.2	Allgemeine Arbeitsanweisung (AAV) . . . . .	190
6.3	Synthesen . . . . .	192
6.3.1	Synthesen von Reagenzien . . . . .	192
6.3.2	Synthesen der Photogruppen mit <i>ortho</i> -Nitro-Funktionalität . . . .	195
6.3.3	Synthesen im Rahmen von <i>caged</i> cAMP . . . . .	226
6.3.4	Synthese von Bis-NV- <i>caged</i> -d4T-Triphosphat <b>96</b> . . . . .	238
6.3.5	Synthesen im Rahmen der pHP-Photoschutzgruppe . . . . .	244
6.3.6	Synthesen im Rahmen des 5'- <i>caged</i> -Adenosins . . . . .	253
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>269</b>
<b>Anhang</b>		<b>I</b>
	Gefahrstoffverzeichnis . . . . .	I
	Danksagung . . . . .	XI
	Betreute Praktika und Abschlussarbeiten . . . . .	XII
	Eidesstattliche Erklärung . . . . .	XIII

## Abkürzungsverzeichnis

$\delta$	chemische Verschiebung (NMR)
$\lambda$	Wellenlänge
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AC	Adenylcyclase
Ado	Adenosin
ADP	Adenosindiphosphat
AIDS	erworbenes Immunschwächesyndrom ( <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> )
AMP	Adenosinmonophosphat
Äquiv.	Moläquivalente
ATP	Adenosintriphosphat
AZT	3'-Azido-3'-desoxythymidin, Zidovudin
BAB	Bis(4-acyloxybenzyl)
ber.	berechnet
brs	breites Singulett
bzw.	beziehungsweise
<i>caged</i>	photolabil geschützt
cAMP	cyclisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
CDCl <sub>3</sub>	deutertes Chloroform
<i>cycloSal</i>	<i>cycloSaligeny</i>
d4T	3'-Desoxy-2',3'-didehydrothymidin, Stavudin
d	Dublett, NMR
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCI	4,4-Dicyanoimidazol
DCM	Dichlormethan
dd	Dublett vom Dublett, NMR
ddt	Dublett vom Dublett vom Triplett, NMR
dest.	destilliert
DIPA	<i>Diisopropylamin</i>
DIPEA	<i>Diisopropylethylamin</i>
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DPP	Diphenylphosphit
ds	Diastereomere, NMR

## Abkürzungsverzeichnis

---

EE	Ethylacetat
ESI	Elektronenspray-Ionisation
Et <sub>3</sub> N	Triethylamin
EtOH	Ethanol
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
gef.	gefunden
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus ( <i>human immunodeficiency virus</i> )
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
HRMS	Hochauflösende Massenspektrometrie ( <i>high resolution mass spectrometry</i> )
IR	Infrarotspektroskopie
<i>J</i>	skalare Kern-Kern-Kopplungskonstante (NMR)
LDA	Lithiumdiisopropylamin
<i>m</i>	Multipllett (NMR)
MeNV	Methyl-Nitroveratryl
MeOH	Methanol
MS	Massenspektroskopie
Ms	Mesyl
NB	2-Nitrobenzyl
NCS	<i>N</i> -Chlorsuccinimid
NV	Nitroveratryl
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance)
OMeNV	5-Methoxynitroveratryl
PE	Petrolether
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pHP	<i>p</i> -Hydroxyphenylacyl
PLE	Schweineleberesterase ( <i>pig liver esterase</i> )
ppm	parts per million (NMR)
PPTS	Pyridinium- <i>p</i> -Toluolsulfonat
PTSA	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure
PyTFA	Pyridinium-Trifluoracetat
<i>q</i>	quartett, NMR
quin	quintett, NMR
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
<i>rac</i>	racemisch
RP	Umkehrphase ( <i>reversed phase</i> )
Rt	Raumtemperatur
<i>s</i>	Singulett (NMR)
<i>sec</i>	sekundär
TMS	Trimethylsilyl

## Abkürzungsverzeichnis

---

t	Triplett (NMR)
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
Tab.	Tabelle
TBAA	Tetra- <i>n</i> -butylammoniumacetat
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyran
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenverhältnis
vgl.	Vergleich

## Zusammenfassung

Purinverbindungen wie Adenosin triphosphat (ATP), Adenosin und cyclisches 3,5-Adenosinmonophosphat (cAMP) spielen bei der zellulären Signaltransduktion und der Regulierung von Entzündungen eine entscheidende Rolle. Ein Anstieg der extrazellulären ATP-Konzentration kann eine Entzündungsreaktion der Zelle auslösen, während das extrazellulär aus ATP gebildete Adenosin dieser Reaktion entgegenwirkt. Viele Immunkrankheiten und auch chronische Entzündungen stehen in einem Zusammenhang mit einer Störung dieses sensiblen und komplexen Gleichgewichts aus ATP und Adenosin, sodass das Ziel dieser Arbeit in der Synthese und Untersuchung von verschiedenen photolabil maskierten Adenosinverbindungen lag. Diese Verbindungen sollen in zellulären Assays genutzt werden, um die maskierte Purinverbindung durch Bestrahlung sowohl zeitlich als auch ortskontrolliert freizusetzen. Die entsprechende ausgelöste Immunreaktion der Zelle sollte im Anschluss gezielt beobachtet werden können. Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurden dafür verschiedene photolabile Gruppen basierend auf dem 2-Nitrobenzyl (NB) Grundgerüst dargestellt und anschließend wurden diese Gruppen verwendet, um das  $\gamma$ -Phosphat des ATPs zu maskieren. Es wurden lipophile und hydrophile lichtspaltbare Schutzgruppen hergestellt, als auch Schutzgruppen, welche in der Benzylposition methyliert sind. Durch diese Modifikationen wird die für die Spaltung notwendige Strahlung in einen für Zellen nicht schädlichen Bereich verschoben, die Abspaltungsgeschwindigkeit erhöht und als unvermeidbares Nebenprodukt ein weniger reaktives Keton statt eines Aldehyds erhalten. Nach erfolgreicher Synthese dieser Derivate wurden alle Verbindungen unter standardisierten Bedingungen photolytisch mit einer Wellenlänge von 365 nm gespalten und die Photolyse wurde per HPLC-Analyse verfolgt. Es zeigte sich, dass die photolabilen Gruppen wie erwartet in Abhängigkeit zum Modifizierungsgrad unterschiedliche Halbwertszeiten aufwiesen. Im nächsten Schritt wurde, um die beobachtete schlechte Wasserlöslichkeit der abgespaltenen lipophilen Maske zu umgehen, ein asymmetrisches ATP-Derivat mit einer Acyloxybenzyl Gruppe (AB) und einer photolabilen Maske hergestellt. In zwei anschließenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass die beiden Masken orthogonal zueinander durch Enzyme oder durch Bestrahlung mit UV-Licht gespalten werden konnten und dass das jeweilige gebildete monomaskierte ATP-Derivat eine hohe Stabilität unter den experimentellen Bedingungen aufwies. Als Alternative zu den in der Literatur häufig verwendeten photolabilen Masken basierend

auf dem NB-Grundgerüst wurde auch versucht, ein lipophiles ATP-Derivat mit der nicht toxischen und nach Spaltung wasserlöslichen *p*-Hydroxyphenylacyl Gruppe (pHP) herzustellen, welche in Anlehnung an die AB-Gruppe am Phenol verestert sein soll. Die Herstellung eines solchen symmetrischen pHP-ATPs konnte jedoch nicht realisiert werden. Die stufenweise Abspaltung der pHP-Maske durch die zuerst notwendige enzymatische Spaltung des phenolischen Esters und der anschließenden Spaltung der pHP-Gruppe durch Licht konnte jedoch an einem isolierten symmetrischen pHP-Monophosphat erfolgreich gezeigt werden.

Ein weiterer wichtiger Botenstoff für die zelluläre Immunregulierung ist cAMP, welches ebenfalls für potentielle Assays mit einer photolabilen Maskierung hergestellt werden sollte. Die Darstellung eines entsprechenden photolabilen Derivats gelang auf zwei verschiedenen Syntheserouten, indem in der ersten Route die photolabile Schutzgruppe in Form einer Diazoverbindung direkt an das Phosphoratom des cAMPs gekuppelt wurde. In einer zweiten Route wurde der phosphorhaltige Sechsring des cAMPs durch die Umsetzung von Adenosin mit einem Bis-Amidit stufenweise in einer Synthesesequenz aufgebaut. Im letzten Abschnitt dieser Arbeit wurde zunächst *N*<sup>6</sup>-Cyclopentyladenosin dargestellt, welches anschließend an der 5'-Hydroxygruppe der Ribose mit einer NB-Gruppe in Form eines Ethers geschützt werden sollte. Es zeigte sich jedoch, dass der Ether nur in schlechten Ausbeuten erhalten werden konnte, da dominant ein Stilbenderivat als Nebenprodukt gebildet wurde. Bei der anschließenden finalen säurekatalysierten Abspaltung der vorhandenen Acetalschutzgruppe zeigte sich zudem, dass die Etherbindung extrem säurelabil ist, wodurch das NB-geschützte Derivat nicht erhalten werden konnte. Ausgehend von dem acetalgeschützten NB-Derivat konnte jedoch in einer Photolyse gezeigt werden, dass die NB-Gruppe extrem schnell mit einer Halbwertszeit von nur einer Sekunde von der 5'-Position abgespalten wird.

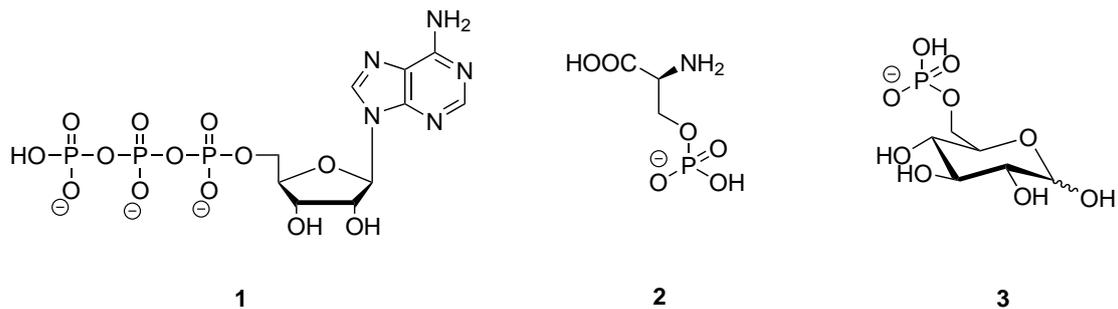
## Abstract

Purine compounds like adenosine triphosphate, adenosine or cyclic 3',5'-adenosine monophosphate play an important role in cell signalling and inflammation. After injuries or in the presence of pathogens an increase in extracellular ATP concentration was observed, which is related to the initiation of inflammation. The extracellular ATP gets degraded to adenosine, which is the natural counterpart of ATP and counteracts the inflammation. Many autoimmune diseases and chronic inflammations are related to a disturbance of this natural sensitive equilibrium between ATP and adenosine. The aim of this thesis was the synthesis and investigation of different photolabile protected purine compounds based on the 2-nitro benzyl (NB) scaffold to get a better understanding of this complex equilibrium in cellular assays. With such compounds a controlled time and spatial release of this purine compounds is possible, thus allowing a direct investigation of the triggered immune reactions. In the first part of this work different photolabile groups based on the 2-nitrobenzyl (NB) scaffold were synthesized and then coupled to the  $\gamma$ -phosphate of ATP. To avoid cellular damage due to high energetic UV-light a bathochromic shift in the absorption spectra was achieved by modification of the aromatic system with lipophilic and non-lipophilic alkyl ethers. By methylation of the benzyl position a reactive cleavage product in form of an aldehyde is avoided. After successful synthesis of all protected ATP derivatives the photolytic cleavage of these prepared photolabile groups was investigated under standardized conditions. The photolysis experiments were monitored via HPLC and half-lives for all masks could be determined from the received chromatograms. As expected, an influence of the substitution pattern and the methylation on the determined half-lives could be observed. To avoid the observed poor water-solubility of the cleaved lipophilic nitroso by-product an asymmetric ATP derivative with one lipophilic acyloxy benzyl group (AB) and one non-lipophilic photocleavable group was synthesized. In two subsequent experiments it was demonstrated that both masks could be cleaved orthogonally by enzymes or irradiation and that the respective formed monoprotected ATP derivatives showed high stability under the applied experimental conditions. As an alternative to the so far used 2-nitro benzyl scaffold the lesser well-known *p*-hydroxyphenylacyl mask (pHP), which was esterified at the phenol to improve the lipophilicity, should also be used for photolabile protection of ATP. But the symmetrically pHP protected ATP could not be obtained, instead a symmetrically protec-

ted pHP-monophosphate was obtained. However, the stepwise cleavage of the esterified pHP masks by enzymatic cleavage of the ester and the subsequent cleavage of the pHP group by light could be shown on an isolated symmetrical pHP monophosphate. Another important messenger for cellular immune regulation and cell signalling is cAMP, which should also be synthesized in a photolabile form. The synthesis of caged-cAMP could be achieved via two independent synthetic approaches; first via the coupling of a diazo derivative to the phosphorus atom of cAMP and second via the reaction of adenosine with a diamidite to build up the phosphor containing six membered ring. The last section of this work was about the synthesis of  $N^6$ -cyclopentyladenosine and after successful preparation of this compound the 5'-position should be protected with a NB-group. The desired NB-ether could only be obtained in poor yields, since the formation of a side-product was favoured. Also, different other ether synthesis protocols like the formation of the ether bond via trichloroacetimidates or diazo compounds failed. In the next synthesis step it was observed that the ether bond is also quite acid labile, since the acetal protection group on the 2'- and 3'-position could not be cleaved without cleavage of the ether bond. The desired 5'-NB- $N^6$ -cyclopentyladenosine could not be obtained, but the photolytic cleavage of the NB-group could be conducted with the precursor compound. It could be determined that the NB-group was cleaved rapidly with a half-life of one second.

## 1 Einleitung

Phosphorylierte Substanzen spielen im zellulären Kontext eine außerordentliche und unglaublich vielseitige Rolle. So dient zum Beispiel der Bruch der Phosphoranhydridbindungen in Adenosintriphosphat **1** (ATP) als universelle Energiequelle für zelluläre Prozesse, indem enzymkatalysiert eine oder mehrere Phosphatgruppen auf verschiedene Substrate übertragen werden.<sup>[1]</sup> Auch zeigen die vielfältigen Phosphorylierungen bei der posttranslatorischen Modifikation von unterschiedlichsten Proteinen die Wichtigkeit von Phosphatgruppen im zellulären Kontext auf, da durch die Modifikation häufig eine Konformationsänderung erzeugt wird und das Enzym dadurch zum Beispiel in eine aktive Form überführt wird oder aber auch deaktiviert werden kann.<sup>[2, 3]</sup> In Abbildung 1 ist neben dem bereits erwähnten ATP beispielhaft für diese posttranslatorischen Modifikationen auch L-Serin-3-phosphat **2** gezeigt, welches die am häufigsten phosphorylierte Aminosäure in Enzymen darstellt.<sup>[4]</sup>

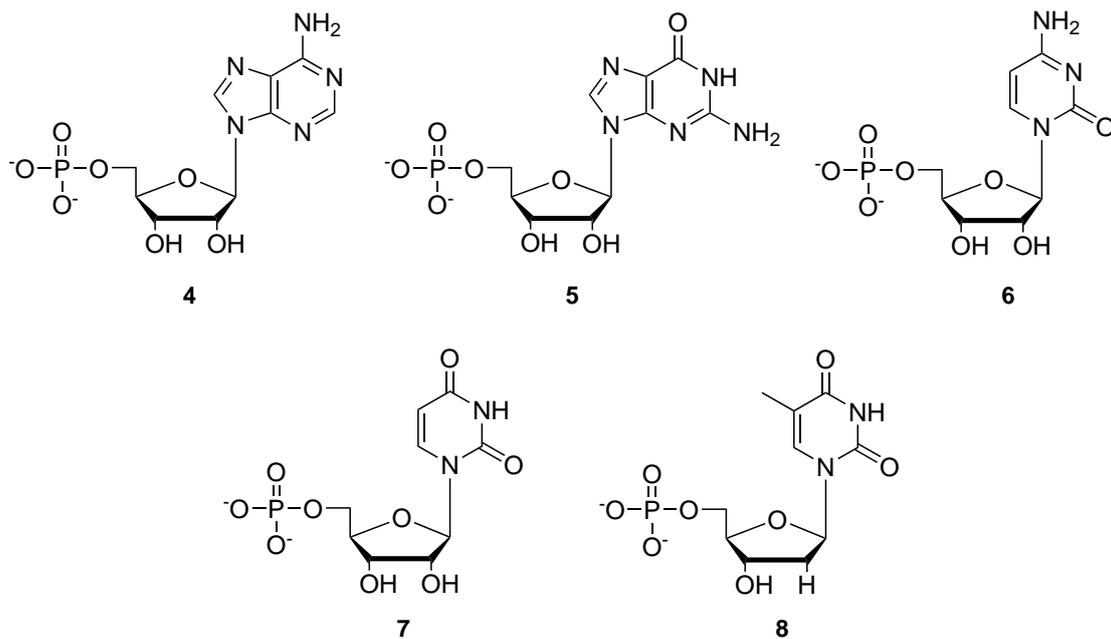


**Abbildung 1:** Abbildung von natürlich in Zellen vorkommenden phosphorylierten Verbindungen (Links: ATP, Mitte: L-Serin-3-phosphat, Rechts: Glucose-6-phosphat).

Das ebenfalls in Abbildung 1 dargestellte Glucose-6-phosphat **3** dient als wichtiges Intermediat in der Glykolyse, in welcher es im ersten Schritt, der sogenannten Vorbereitungsphase, durch die Übertragung der  $\gamma$ -Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat **1** auf D-Glucose erzeugt wird. Nachfolgend wird das Glucose-6-phosphat durch eine Isomerase in das entsprechende Fructoseisomer überführt, welches nochmals phosphoryliert wird und durch weitere Schritte abschließend in zwei Moleküle Pyruvat abgebaut wird. Neben dem Pyruvat, welches als Ausgangsstoff für weitere Biosynthesen dient, werden in der Glykolyse auch zwei Äquivalente des Cofaktors Nicotinamidadenindinucleotid (NAD) in seiner reduzierten Form (NADH) gebildet, wobei es sich ebenfalls um ein für

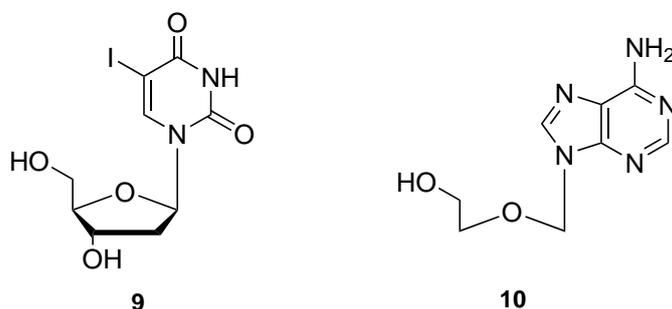
Zellen essentielles phosphoryliertes Biomolekül handelt.<sup>[5]</sup>

Neben den bereits erwähnten ATP und dem NADH liegen in Zellen noch weitere natürliche Nucleoside und Nucleotide vor. Beiden Substanzklassen ist gemeinsam, dass es sich um Verbindungen handelt, in welchen eine Nucleobase über eine *N*-glykosidische Bindung an die 1'-Position einer Pentose (Ribose oder Desoxyribose) gebunden ist. Bei Nucleotiden ist darüber hinaus noch mindestens eine Phosphateinheit an der 5'-Hydroxygruppe gebunden. Neben der in ATP und NADH auftretenden Nucleobase Adenin liegt als weitere natürlich vorkommende Purinbase noch Guanin in Zellen vor. Des Weiteren kommen in natürlichen Zellen noch die Pyrimidinbasen Cytosin, Uracil und Thymin vor. Während Adenin, Guanin und Cytosin sowohl an Ribose wie auch Desoxyribose gebunden vorliegen können, kommt Uracil nur in Kombination mit Ribose und Thymin nur in Kombination mit Desoxyribose vor. Eine Auswahl an natürlich vorkommenden Nucleosiden ist in Abbildung 2 dargestellt.<sup>[6]</sup>



**Abbildung 2:** Abbildung der natürlich vorkommenden Nucleotide: Adenosin (4), Guanosin (5), Cytidin (6), Uracil (7) und Thymin (8). Dargestellt ist das jeweilige Nucleosidmonophosphat.<sup>[6]</sup>

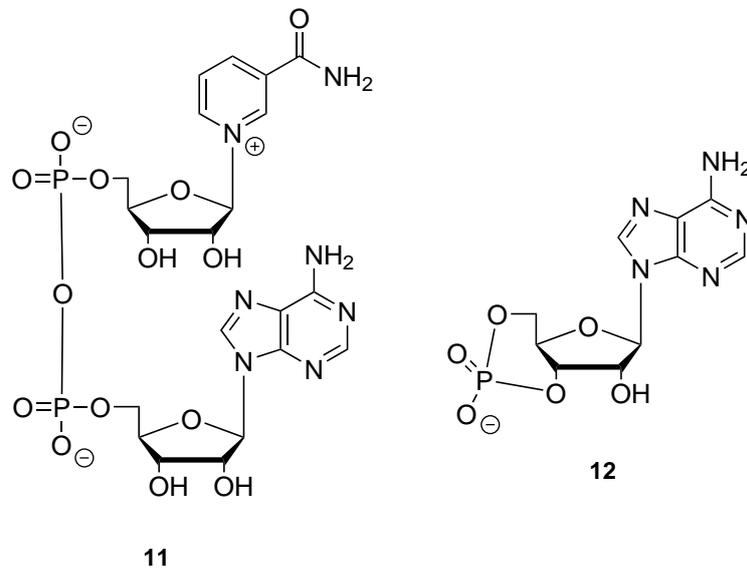
Die in Abbildung 2 dargestellten Nucleotide bilden, in Abhängigkeit des Vorhandenseins der Hydroxygruppe an der 2'-Position der Pentose, die Bausteine der Ribonucleinsäure (RNA, Ribose) und der Desoxyribonucleinsäure (DNA, Desoxyribose) und sind somit lebenswichtig für alle Lebewesen. Der Aufbau der DNA erfolgt durch zwei komplementäre Stränge in der Anordnung einer Doppelhelix. In der Doppelhelix liegen dabei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den gegenüberliegenden Nucleobasen der einzelnen Stränge vor. Es bilden sich dabei immer die Basenpaare Adenin und Thymin, sowie Cytosin und Guanin aus. Die verbrückenden Phosphatgruppen der einzelnen Stränge liegen währenddessen an der Außenseite der Doppelhelix, wodurch die DNA durch die negativen Ladungen der Phosphatgruppen hydrophil wird.<sup>[7]</sup> Nachdem der Aufbau der DNA durch die Arbeiten von WATSON und CRICK verstanden wurde, wurde ebenfalls erkannt, dass bestimmte durch Viren ausgelöste Krankheiten durch eine Manipulation der an der Bildung der DNA beteiligten Enzyme oder der DNA selber bekämpft werden können. Als eines der ersten Nucleosidanaloga wurde das von PRUSOFF synthetisierte Idoxuridin **9** zugelassen, welches sich als potenter Wirkstoff gegen *Herpes-simplex*-Viren herausgestellt hat.<sup>[8, 9]</sup>



**Abbildung 3:** Darstellung der Nucleosidanaloga Idoxuridin (**9**) und Aciclovir **10**.

Aufgrund von Nebenwirkungen und der nicht vorhandenen Wirkung gegen spezifische Herpesviren (z.B. Varicella-Zoster-Virus, VZV) wurde auch das in Abbildung 3 gezeigte Aciclovir **10** zur Behandlung von Herpeserkrankungen zugelassen. Es zeigte sich, dass Aciclovir ebenso potent wie Idoxuridin ist, jedoch vielfältiger verabreicht werden kann.<sup>[10-12]</sup> Auch in diesem Beispiel zeigt sich die Wichtigkeit vom Verständnis und der Forschung an phosphorylierten, synthetischen wie auch natürlichen in Zellen vorliegenden Substanzen.

Neben den natürlichen Nucleotiden, welche in Abbildung 2 dargestellt sind, liegen im zellulären System auch weitere spezifischere Nucleotide vor, welche zum Beispiel an weitere Zucker oder auch ein weiteres Nucleotid gekuppelt sein können. Die Verbindung der jeweiligen Nucleotide oder Zucker erfolgt dabei meistens über eine oder mehrere Phosphatesterbrücken, wie zum Beispiel im bereits erwähnten NAD. Auch treten in der Zelle cyclische Nucleotidmonophosphate, wie zum Beispiel 3',5'-Adenosinmonophosphat **12** auf. Die beiden erwähnten Beispiele gehören dabei zur Gruppe der *second messenger* und sind in Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 4:** Abbildung des Cofaktors Nicotinamidadenindinucleotid (NAD) **11** und des cyclischen 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) **12**, welches zur Klasse der *second messenger* gehört.

Bei *second messenger* handelt es sich um zelluläre Botenstoffe, welche ein von außerhalb der Zelle kommendes Signal durch verschiedene Mechanismen in die Zelle weiterleiten oder aber für eine intrazelluläre Weiterleitung von Signalen verantwortlich sind. Durch die *second messenger* werden in der Zelle weitere Signalkaskaden ausgelöst und eine Antwort der Zelle auf den äußeren Stimulus ausgelöst. Die Freisetzung des Cofaktors NAD bewirkt dabei zum Beispiel die Öffnung von Ionenkanälen, wodurch eine Calciumionen in die Zelle einströmen und weitere Aktionen, wie Muskelkontraktionen ausgelöst werden können.<sup>[4, 6]</sup> Auf den *second messenger* cAMP **12** und auf seine spe-

zifische Signaltransduktion wird im Abschnitt 2.1.1 genauer eingegangen.

Die Möglichkeit die hier im Abschnitt kurz umrissenen und beispielhaft vorgestellten zellulären Interaktionen und Vorgänge im Kontext der phosphorylierten Naturstoffe mit Hilfe speziell dafür modifizierter Moleküle weiter zu erforschen und zu verstehen ist die grundlegende Motivation dieser Arbeit. Im Besonderen liegt der Fokus dieser Arbeit auf dem Versuch, ausgewählte Adenosinverbindungen so zu modifizieren, dass sie gezielt durch Bestrahlung mit UV-Licht in möglichst definierten Bereichen der Zelle freigesetzt werden können, um die daraus resultierenden Reaktionen der Zelle beobachten zu können. Der theoretische Hintergrund für diese Arbeit soll im nächsten Abschnitt näher vorgestellt werden.

## 2 Theoretischer Teil

Das Ziel dieser Arbeit besteht in der Synthese von verschiedenen lipophilen maskierten *photocaged* Adenosinderivaten und der Untersuchung der lichtinduzierten Freisetzung der entsprechenden Adenosinverbindungen aus den sogenannten *caged*-geschützten Derivaten. In diesem Abschnitt soll der notwendige theoretische Hintergrund über die biologischen Eigenschaften und die zelluläre Bedeutung der verwendeten Adenosinverbindungen erläutert werden und weshalb eine lipophile Maskierung für die Untersuchung in einem biologischen Kontext notwendig ist. Darüber hinaus werden die in dieser Arbeit verwendeten lichtspaltbaren Schutzgruppen in ihren Eigenschaften und ihren potenziellen Einsatzmöglichkeiten in biologischen Medien vorgestellt und in diesem Rahmen der Begriff *caged* näher erläutert.

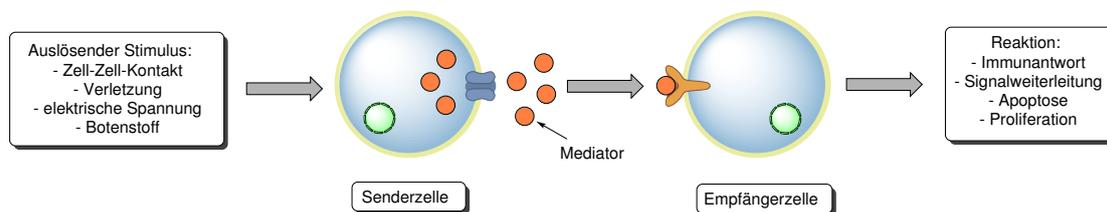
### 2.1 Adenin-Nucleotide im biologischen Kontext

Bei Adenin handelt es sich um eine Nucleobase aufbauend auf einem Puringrundgerüst, welches an der 6-Position eine Aminogruppe aufweist. In Kombination mit Ribose wird durch eine  $\beta$ -N-glycosidische Bindung zwischen dem  $N^9$ -Atom des Puringrundgerüsts und dem 1'-Kohlenstoffatom der Ribose das Nucleosid Adenosin gebildet. Adenosin ist, überwiegend in verschiedenen phosphorylierten Formen, an unterschiedlichen lebenswichtigen Prozessen in der Zelle beteiligt. Als wohl bekannteste Funktion von Adenosin kann hier auf die Funktion als Baustein der RNA und auf den universellen Energieüberträger Adenosintriphosphat verwiesen werden. Darüber hinaus dienen verschiedene phosphorylierte Adenosinderivate jedoch auch bei der Kommunikation von Zellen sowohl in einem extrazellulären, wie auch im intrazellulären Kontext als essentielle Verbindungen. Ebenso spielen bei chronischen Entzündungen Adenosinderivate, im Besonderen eine erhöhte extrazelluläre Konzentration an ATP, eine bis heute nicht gänzlich verstandene Rolle.

#### 2.1.1 Kommunikation auf zellulärer Ebene

Die Kommunikation von Zellen untereinander, zum Beispiel in einem komplexen Organismus, aber auch die Kommunikation von Einzellern, wie Bakterien und Amöben, mit ihrer Umgebung ist lebensnotwendig für diese Lebewesen. Nur durch die Kommunikati-

on mit der näheren Umgebung kann eine Zelle auf äußere Stimuli reagieren oder zum Beispiel im Fall einer Infektion Signale an das Immunsystem senden. Wie bei der Kommunikation zwischen Lebewesen gibt es dabei auch auf zellulärer Ebene den sogenannten Sender und den entsprechenden Empfänger. Die Kommunikation erfolgt dabei über den sogenannten Mediator. Der Mediator kann ein Botenstoff oder auch eine durch Ionenwanderung ausgelöste elektrische Spannung sein. Entscheidend ist jedoch, dass der Empfänger das gesendete Mediatorsignal durch entsprechende Rezeptoren auf der Zelloberfläche empfangen und intrazellulär weiterleiten kann. Dieser Vorgang ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Kommunikation zwischen einer Sender- und Empfängerzelle durch einen Mediator.

Die Freisetzung des Mediators kann dabei nicht nur wie dargestellt durch transmembranständige Enzyme erfolgen, sondern auch durch Exocytose von entsprechend beladenen Vesikeln. Im Extremfall kann die Freisetzung des Mediators auch nach einer Verletzung und der damit verbundenen partiellen Zerstörung der Zellmembran erfolgen. Die Signalübertragung kann, je nachdem wie der extrazelluläre Mediator übertragen wird, in verschiedene Arten eingeteilt werden. Die in Abbildung 5 dargestellte Signalübertragung wird als parakrine Signalübertragung bezeichnet, da der Mediator direkt im intrazellulären Raum zwischen zwei Zellen übertragen wird. Legt der Mediator einen weiteren Weg im Organismus, zum Beispiel durch den Blutkreislauf, zurück, handelt es sich um eine endokrine Übertragung. Ein Spezialfall der parakrinen und endokrinen Übertragung stellt die autokrine Übertragung dar. Bei dieser Signalweiterleitung aktiviert der Mediator nicht nur die Empfängerzelle sondern auch weitere Senderzellen. Dabei ist es irrelevant, ob die Übertragung im intrazellulären Bereich oder in anderen Bereichen des Organismus erfolgt. Des Weiteren kann die Signalübertragung durch die direkte Wechselwirkung von zwei komplementären Enzymen auf der Oberfläche der Sender und Empfängerzelle erfolgen. Der Mediator ist in diesem Fall das exprimierte membrangebundene Protein auf



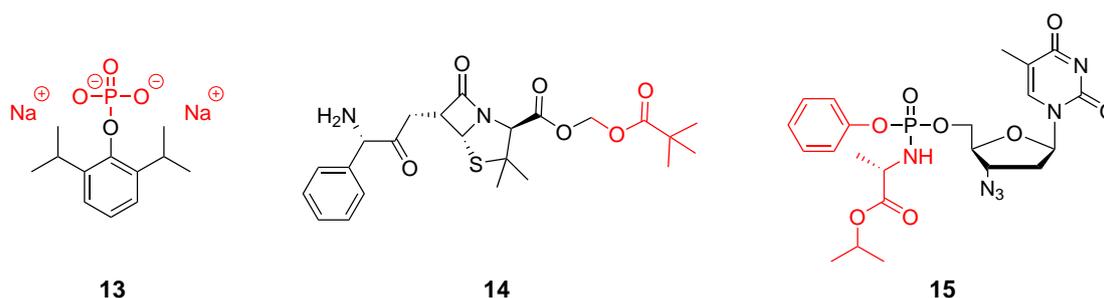
Die Konzentration von ATP unter normalen physiologischen Bedingungen schwankt im extrazellulären Raum bei gesunden Zellen zwischen 400 nM bis 700 nM und ist damit um ein Vielfaches geringer als die intrazelluläre Konzentration von 3 mM bis 10 mM.<sup>[16, 17]</sup> Es wurde beobachtet, dass äußere Einflüsse wie Verletzung, Krankheitserreger oder aber auch eine zu niedrige Sauerstoffkonzentration und dem damit verbundenen Stress für die Zelle zu einem rasanten Anstieg der ATP Konzentration im extrazellulären Raum führen kann.<sup>[18, 19]</sup> Aus dieser Beobachtung wurde geschlussfolgert, dass extrazelluläres ATP eine Entzündungsreaktion des Immunsystems anregen kann.<sup>[20, 21]</sup> Die Freisetzung des ATPs kann dabei, wie in Abbildung 6 dargestellt durch bestimmte Transportproteine erfolgen, jedoch auch durch Exocytose von entsprechenden ATP beladenen Vesikeln.<sup>[22]</sup> Das freigesetzte ATP aktiviert anschließend an der Zelloberfläche befindliche Enzyme, um ein entzündungsförderliches Milieu um die aktivierten Zellen zu generieren, sodass eine Immunantwort auf mögliche Pathogene ausgelöst werden kann. Aus diesem Grund kann ATP auch der Klasse der DAMP-Substanzen (*danger-associated molecular-pattern*) zugeordnet werden, da die Freisetzung des ATPs die erste Abwehrreaktion der Zellen darstellt.<sup>[18, 23]</sup> Eine der von ATP aktivierten Enzymfamilien ist die der transmembranständigen P2Y-Rezeptoren, welche in insgesamt acht verschiedene Unterarten unterteilt ist.<sup>[24]</sup> Diese Klasse von Rezeptoren wird auf fast jeder Zelle des Organismus exprimiert, jedoch können die unterschiedlichen P2Y-Rezeptoren verstärkt auf den verschiedenen Zellen des Immunsystems beobachtet werden.<sup>[25]</sup> Nach der Aktivierung des P2Y<sub>14</sub>-Rezeptors erfolgt innerhalb der Zelle zum Beispiel eine Desaktivierung der Adenylcyclase (AC). Dadurch steht der Zelle weniger cAMP zur Verfügung, welches einer Immunregulierung bzw. Immunsuppression entgegenwirken kann.<sup>[26]</sup> Andererseits führt die Aktivierung des P2Y<sub>11</sub>-Rezeptors zur Freisetzung von Substanzen, welche zur Steigerung der Immunantwort führen und somit im Gegensatz zum P2Y<sub>14</sub>-Rezeptor entzündungsfördernd wirken.<sup>[27]</sup> Von vielen P2Y-Rezeptoren ist die Wirkung dagegen noch völlig unbekannt, wodurch diese Rezeptoren im Fokus der immunregulatorischen Forschung liegen.<sup>[28, 29]</sup> Darüber hinaus wird von dem extrazellulären ATP auch die Klasse der P2X-Rezeptoren aktiviert (in Abbildung 6 nicht dargestellt). Bei dieser Enzymklasse handelt es sich im Gegensatz zu den P2Y-Rezeptoren nicht um membrangebundene G-Proteine, sondern um membrangebundene Kationenkanäle. Die Aktivierung dieser Kanäle führt zu einer Depolarisation der Zellmembran durch einströmende Natrium-, Kalium- und Calciumionen, wodurch nachfolgend Cytokine und Interleukine ausgesto-

ßen werden. Diese Peptidhormone dienen dazu, weitere Zellen des Immunsystems, wie T-Zellen und Makrophagen, zu aktivieren, wodurch die von ATP ursprünglich eingeleitete Entzündung schließlich ausgelöst werden kann.<sup>[30]</sup> Im extrazellulären Raum wird ATP jedoch auch durch das Ectoenzym CD39 zunächst zu AMP und anschließend durch CD73 zu Adenosin metabolisiert.<sup>[31, 32]</sup> Das gebildete Adenosin dient als immunsuppressiver Gegenspieler von ATP, indem es den von ATP ausgelösten entzündungsfördernden Effekten entgegenwirkt, womit die Aktivität des Ectoenzym-Paars CD39/73 entscheidend für die Immunantwort der Zelle ist und die durch ATP ausgelösten entzündungsfördernden Auswirkungen abgeschwächt werden können.<sup>[15, 32]</sup> Es konnte zudem festgestellt werden, dass bei einigen chronischen Entzündungen und bei der Immunkrankheit AIDS das Gleichgewicht in dem Ectoenzym-Paar und somit die gesamte endogene purigene Signal-, und Immunkaskade gestört ist.<sup>[33–35]</sup> Dies deutet auf die Wichtigkeit und Komplexität dieses endogenen Purinsignalsystems hin. Das gebildete Adenosin kann im Folgenden P1-Rezeptoren auf der Zelloberfläche aktivieren, wodurch verschiedene weitere Reaktionen in der Zelle ausgelöst werden. Die P1-Rezeptoren gehören, wie die P2Y-Rezeptoren, zu der Klasse der membrangebundenen G-Proteine und treten in Zellen in vier verschiedenen Gruppen auf, welche als A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> und A<sub>3</sub> spezifiziert sind.<sup>[36]</sup> Durch die Bindung von Guanosintriphosphat (GTP) aktivieren die P1-Rezeptoren, nach vorheriger Bindung von Adenosin, die Adenylylcyclase (AC), wodurch der *secondary messenger* cAMP aus intrazellulär vorliegenden ATP gebildet wird und das von außen eintreffende Signal in der Zelle um ein Vielfaches amplifiziert wird.<sup>[6, 37]</sup> Das gebildete cAMP aktiviert in der Zelle verschiedene weitere Prozesse, so zum Beispiel auch die Öffnung von Ionenkanälen in der Zellmembran (vgl. Abbildung 6). Bei den Ionenkanälen handelt es sich dabei meist um Calciumkanäle, welche mittels einer Phosphorylierung durch die cAMP abhängige Proteinkinasen des Typs A in eine geöffnete Konformation überführt werden.<sup>[6, 38]</sup> Darüber hinaus können auch CNG-Ionenkanäle (*cyclic-nucleotide-gated ion channel*) direkt durch die reversible Bindung von cAMP geöffnet werden.<sup>[39]</sup> Durch die Öffnung der Ionenkanäle und den damit verbundenen diffusionsgetriebenen Eintritt von Calciumionen kann das eingetroffene Signal nochmals amplifiziert werden und durch das ausgelöste Aktionspotential über eine vergleichsweise große Strecke verbreitet werden.<sup>[6]</sup> Es wird postuliert, dass das gebildete cAMP auch an Prozessen beteiligt ist, welche sich als entzündungshemmend auf die Zelle auswirken.<sup>[40, 41]</sup> So hat cAMP einen entscheidenden Einfluss auf die Funktion verschiedener T-Lymphozyt-

Zellen und steht somit im direkten Zusammenhang mit der Immunantwort des Körpers auf Pathogene. Die genaue Wirkweise des cAMPs auf die verschiedenen T-Zellen ist jedoch ungeklärt und steht weiterhin im Fokus verschiedener Untersuchungen.<sup>[42–44]</sup> Das gebildete cAMP wird anschließend durch eine Phosphodiesterase (PD-ase, in Abbildung 6) in AMP hydrolysiert, wodurch die Signalkaskade abgeschwächt wird. Das AMP steht daraufhin für die Neubildung des verbrauchten bzw. ausgeschiedenen ATPs zur Verfügung, wodurch die Zelle langsam den Ausgangszustand erreicht.<sup>[45]</sup>

## 2.2 Bioreservible Schätzung bioaktiver Substanzen - Das Prodrug-Konzept

Die Applikation von Wirkstoffen in ihrer biologisch aktiven Form ist häufig aufgrund verschiedenster Hindernisse nicht möglich. Die dabei am häufigsten zu beobachteten Probleme stehen in Zusammenhang mit einer zu schlechten Löslichkeit in Wasser, einer schlechten Bioverfügbarkeit, Toxizität, einer zu geringen Stabilität der Verbindung gegenüber einer chemischen oder enzymatischen Spaltung, einer ungenügenden Aufnahme des Wirkstoffs bei oraler Verabreichung oder einer Kombination aus mehreren dieser Punkte.<sup>[46]</sup> Um die genannten pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften der Wirkstoffe zu verbessern wurde von ALBERT bereits im Jahr 1951 das sogenannte Prodrug-Konzept vorgestellt.<sup>[47, 48]</sup> Per Definition ist ein Prodrug eine nicht biologisch aktive Vorläuferverbindung eines Wirkstoffs, welche den aktiven Wirkstoff nach gezielter Metabolisierung im Körper freisetzt.<sup>[46]</sup> In Abbildung 7 sind verschiedene Beispiele für Modifikationen im Rahmen des Prodrug-Konzepts dargestellt. Die gezeigte Modifikation



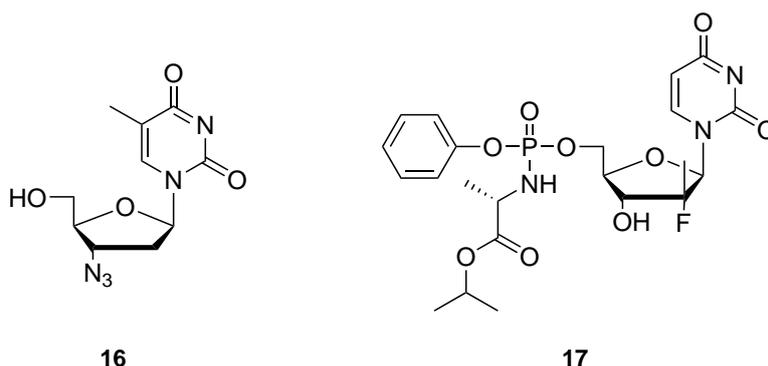
**Abbildung 7:** Abbildung von verschiedenen klinisch zugelassenen Prodrugs (Propofolmonophosphat **13**, Pivampicillin **14** und AZT-Protide **15**). Die Modifikation ist jeweils in rot hervorgehoben.

tion verbessert dabei die Eigenschaften des jeweiligen Wirkstoffs auf unterschiedliche Arten, welche im Folgenden näher erläutert werden. Bei der abgebildeten Struktur **13** handelt es sich um Propofolmonophosphat, ein Prodrug des weit verbreiteten Narkosemittels Propofol. Propofol hat hervorragende sedative Eigenschaften und wird von der überwiegenden Anzahl an Patienten ohne Nebenwirkungen vertragen.<sup>[49]</sup> Ein entscheidender Nachteil von Propofol ist jedoch die schlechte Wasserlöslichkeit, wodurch Propofol als Emulsion in 10 % Sojaöl, 2.25 % Glycerin und 1.2 % Phosphatidylcholin aus Eiern formuliert und intravenös verabreicht wird.<sup>[50]</sup> Aufgrund von Intoleranzen gegenüber den Formulierungsbestandteilen kann Propofol jedoch nicht jedem Patienten verabreicht werden, wodurch ein wasserlösliches Prodrug wünschenswert wäre. Als einfachste Hydrophilie steigernde Gruppe wurde von BANASZCZYK das abgebildete Propofolmonophosphat **13** entwickelt und erfolgreich in verschiedenen Tierstudien auf die Freisetzung von Propofol untersucht. Es zeigte sich, dass das Prodrug in Abhängigkeit von der entsprechenden untersuchten Spezies in spätestens 15 Minuten freigesetzt wird und keine Nebenwirkungen beobachtet werden konnten.<sup>[51]</sup>

Bei der in Abbildung 7 dargestellten mittleren Struktur handelt es sich um Pivampicillin **14**, welches ein zugelassenes Prodrug des Antibiotikums Ampicillin ist. Der Wirkstoff Ampicillin wird nur schlecht bei einer oralen Applikation vom Körper durch den Magen und Darmtrakt aufgenommen, da es nur gering durch die Darmwand resorbiert wird. Durch die Maskierung der Carbonsäure durch einen Pivaloyloxymethylester steigt die Lipophilie der Verbindung und die Resorption durch die Darmwand wird stark erhöht.<sup>[52]</sup> Der Pivaloyloxymethylester wird anschließend in der Zelle von Esterasen gespalten und die gebildete Pivalinsäure wird zu einem großen Teil glucuronisiert und anschließend über den Harn ausgeschieden. Der ebenfalls erhaltene Ampicillinhydroxymethylester zerfällt zum gewünschten Ampicillin und Formaldehyd, welches in der Leber oxidiert und anschließend in Form von Wasser und Kohlenstoffdioxid ausgeschieden wird.<sup>[53]</sup> Ampicillin gehört zur Klasse der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika und blockiert das bakterielle Enzym D-Alanin-Transpeptidase, welches für die essentielle Synthese der Mureinschicht der bakteriellen Zellwand zuständig ist. Durch die Hemmung des Zellwand-Aufbaus kann das Bakterium sich nicht mehr vermehren und die bakterielle Infektion wird effektiv bekämpft.<sup>[54]</sup>

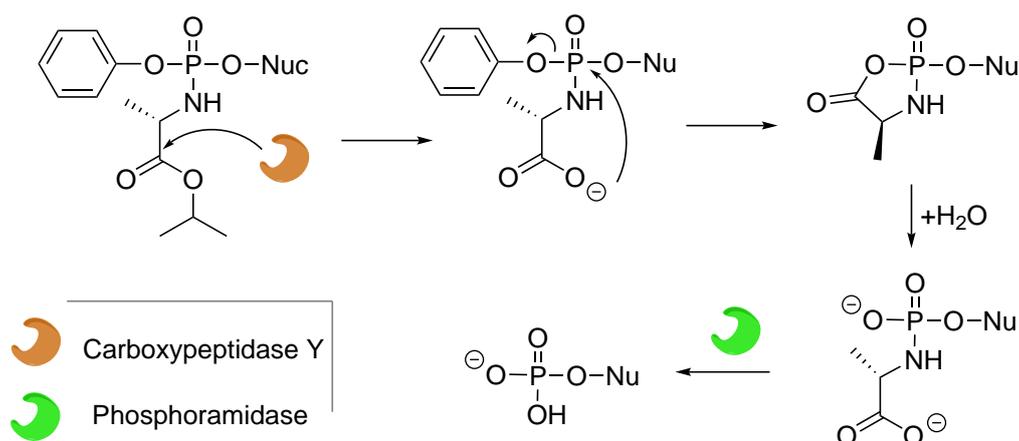
Bei der letzten abgebildeten Struktur handelt es sich um das Nucleosidanalogon 3'-Azidothymidin (AZT), welches in der Form eines ProTide-Prodrug abgebildet ist. Bei

AZT handelt es sich um Analogon von Thymidin, welches an der 3'-Position eine durch die Zelle nicht spaltbare Azidgruppe aufweist. AZT wurde erstmals 1964 als potentieller Wirkstoff gegen Krebs synthetisiert, stellte sich jedoch als unwirksam gegenüber Krebszellen heraus.<sup>[55, 56]</sup> Durch MITSUYA wurde 1985 jedoch eine Aktivität von AZT gegen das neu entdeckte HI-Virus entdeckt, was zu einer Zulassung von AZT als HIV-Medikament in den USA im Jahr 1987 führte.<sup>[56, 57]</sup>



**Abbildung 8:** Strukturformeln von 3'-Azidothymidin (AZT) **16** (links) und dem Hepatitis C Wirkstoff Sofosbuvir **17** (rechts).

Wie jedes Nucleosidanalogen muss auch AZT in der Zelle zunächst in das aktive Triphosphat überführt werden. Meistens ist jedoch mindestens einer der Phosphorylierungsschritte aufgrund der eingebauten Modifikationen der Verbindungen durch die entsprechenden Kinasen gehemmt. Um diesen Schritt zu umgehen, wurden Prodrugkonzepte erarbeitet, um das entsprechende Nucleosidmonophosphat so zu maskieren, dass das Monophosphat trotz der negativen Ladung der Phosphatgruppe in die Zelle aufgenommen werden kann (siehe Abschnitt:2.3), da die Phosphorylierung des Nucleosids zum Monophosphat in der Regel der limitierende Phosphorylierungsschritt ist. Das hier abgebildete ProTide Konzept wurde Anfang der 1990er von MCGUIGAN entwickelt und publiziert. Es konnte beobachtet werden, dass die in Abbildung 7 dargestellte Verbindung **15** Aktivität in HIV-1 infizierten Zellen zeigt, welche resistent gegen AZT sind.<sup>[58]</sup> Somit konnte die Wirksamkeit des ProTide-Konzepts bestätigt werden, sodass dieses mittlerweile in weiteren zugelassenen Nucleosidanaloga Wirkstoffen Anwendung findet. Das wohl prominenteste Beispiel ist der zugelassene Wirkstoff Sofosbuvir, welches eine Therapie und eine Heilung bei einer Hepatitis C Infektion ermöglicht.<sup>[59]</sup> Der postulierte Spaltmechanismus des ProTide-Konzepts ist in Abbildung 9 dargestellt.<sup>[60]</sup>



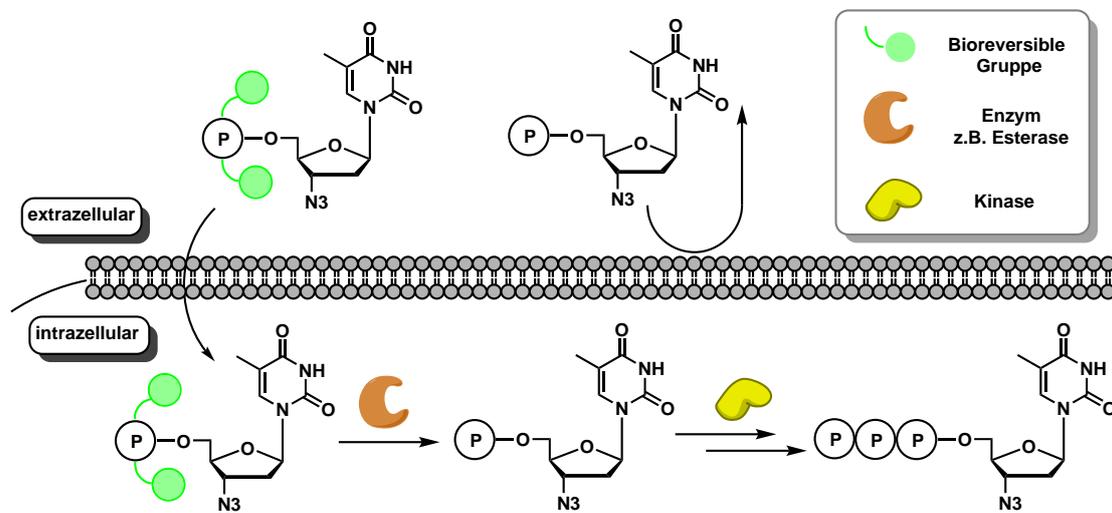
**Abbildung 9:** Postulierter Abspaltungsmechanismus des ProTide-Konzepts.<sup>[60]</sup>

Nach erfolgreicher Aufnahme der ProTide-Verbindung in der Zelle wird der Isopropylester durch eine Carboxypeptidase gespalten. Durch den nucleophilen Angriff des Carboxylats am Phosphoratom und der Abspaltung des Phenylsubstituenten wird ein fünfgliedriger Heterocyclus ausgebildet. Die Bildung des Heterocyclus ist aufgrund der sehr guten Abgangsgruppentendenz des Phenylsubstituenten als Phenolat und der schnellen kinetischen Bildung fünfgliedriger Ringsysteme begünstigt. Durch die hohe Oxophilie des Phosphoratoms ist der Angriff von Wasser und die damit verbundene Öffnung des Ringsystems favorisiert. Die entstandene negative Ladung am Phosphat wird durch Mesomerie stabilisiert und fördert somit ebenfalls die Öffnung des Ringsystems. Im abschließenden Schritt wird durch eine Phosphoramidase die Phosphor-Stickstoff-Bindung hydrolysiert, wodurch das Monophosphat innerhalb der Zelle freigesetzt wird. Im folgenden Abschnitt werden weitere exemplarische Beispiele für Nucleotid-Prodrugkonzepte vorgestellt, welche auch in dieser Arbeit Anwendung gefunden haben.

### 2.3 Nucleotid-Prodrugkonzepte

Wie bereits in Abschnitt 2.2 kurz erläutert, können Nucleotide aufgrund der negativen Ladung der Phosphatgruppe die Zellmembran nicht durch passive Diffusion überwinden. Bei den in Abschnitt 2.1.1 (vgl. Abbildung 5) erwähnten transmembranständigen Proteinen, welche ATP aus der Zelle in den extrazellulären Raum leiten, handelt es sich um Kanäle, welche nur in Abhängigkeit mit anderen Signalen in der Zelle, zum Bei-

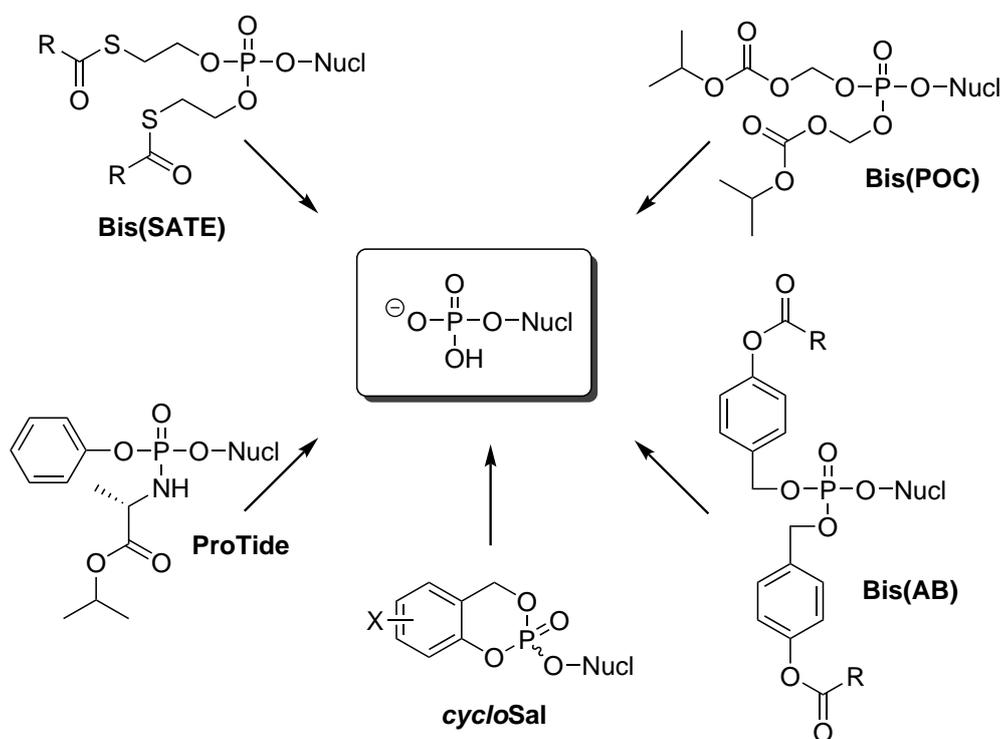
spiel einer Änderung des osmotischen Druckes, aktiviert werden und ATP anschließend austreten lassen. Der Austritt des ATPs erfolgt dabei meist durch den Konzentrationsunterschied diffusionsgetrieben und nicht durch einen aktiven Transport.<sup>[15, 61, 62]</sup> Aufgrund dieser Spezialisierung der Transportenzyme und Ionenkanäle auf zelleigene Substanzen, stehen diese Transportmöglichkeiten durch die Zellmembran für Nucleotidanaloga in der Regel nicht zur Verfügung. Die Aufnahme kann daher nur durch eine vorherige Maskierung der negativen Ladung und der damit verbundenen steigenden Lipophilie und der damit ermöglichten passiven Diffusion durch die Zellmembran erfolgen. Dieser Vorgang ist schematisch in Abbildung 10 dargestellt. Nach der passiven Diffusion der



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung der passiven Diffusion eines bioreversiblen AZT geschützten Derivats durch die Zellwand in das Zellinnere und die nachfolgende enzymatische Abspaltung der Maskierung in der Zelle, sowie die schrittweise Phosphorylierung zum AZT-Triphosphat durch entsprechende Kinasen.

maskierten Verbindung in die Zelle werden die Masken intrazellulär von entsprechenden Enzymen, wie zum Beispiel Esterasen, abgespalten und das Nucleosidmonophosphat freigesetzt. Dieses kann nachfolgend durch entsprechende zelleigene Kinasen in das Triphosphat überführt werden. Das in Abbildung 10 gezeigte AZT-Triphosphat kann die bei einer HIV-Infektion auftretende Translation der viralen einzelsträngigen RNA in eine virale doppelsträngige DNA durch die viruseigene Reverse Transkriptase (RT) hemmen. Dies geschieht zum einen durch eine kompetitive Hemmung der RT und zum anderen kann der wachsende virale DNA-Strang nach dem Einbau von AZT nicht weiter ver-

längert werden, da AZT keine passende Anknüpfstelle an dem 3'-Kohlenstoffatom des Zuckers bietet. Vor allem der Strangabbruch nach dem Einbau von AZT ist entscheidend in der Bekämpfung des Virus, da die Replikation enorm gestört wird.<sup>[63]</sup> Ein entscheidender Vorteil bei der Verwendung von RT-Inhibitoren liegt in der Tatsache, dass das Nucleosidanalogon, im Fall von AZT ungefähr um den Faktor 100, bevorzugt von der viralen RT in den wachsenden viralen DNA-Strang, statt von der humanen Polymerase in den zelleigenen DNA-Strang eingebaut wird.<sup>[64]</sup> Der seltenere Einbau von AZT in die humane DNA wird durch zelleigene DNA-Reparaturenzyme erklärt, welche den Einbau eines falschen Nucleosids erkennen und beheben.<sup>[65]</sup> Neben dem bereits vorgestellten ProTide-Konzept sind in der Vergangenheit mehrere Prodrug-Konzepte speziell für Nucleotide entwickelt worden. Eine Auswahl dieser Konzepte ist in Abbildung 11 dargestellt.



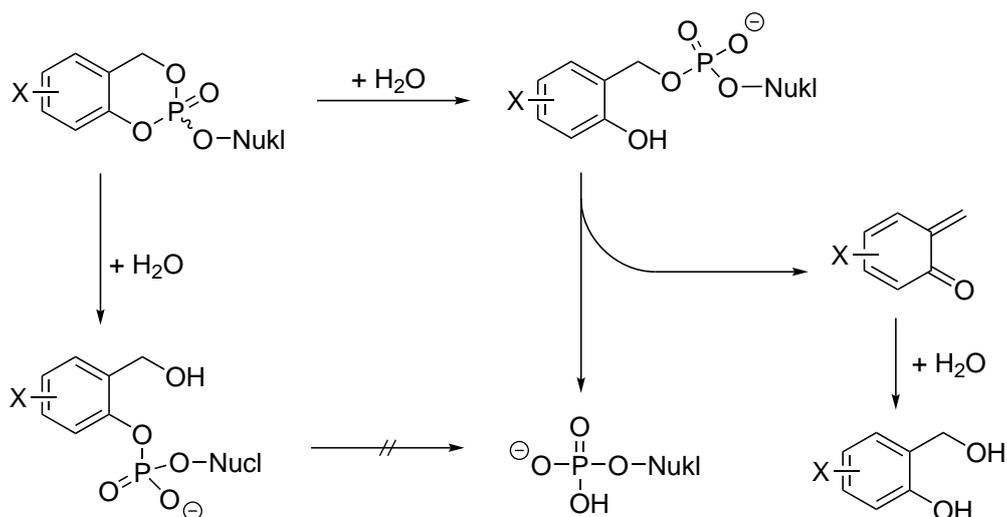
**Abbildung 11:** Darstellung einer Auswahl verschiedener Nucleotid-Prodrugkonzepte zur Maskierung von Nucleosidmonophosphaten.

In allen der in Abbildung 11 gezeigten Verbindungen sind die negativen Ladungen der Phosphatgruppe durch verschiedene Maskierungen geschützt. Im AB, SATE und

POC-Konzept erfolgt die Maskierung in der Regel durch zwei identische Gruppen. Es handelt sich dabei in allen drei Fällen um bioreversible Gruppe, deren Abspaltung durch die Spaltung des Esters (AB), des Thioesters (SATE) oder des Carbonats (POC) durch entsprechende Enzyme erfolgt. Nach der ersten initiierten Spaltung zerfallen die jeweiligen Gruppen weiter und das entsprechende Monophosphat wird freigesetzt. Die POC-Einheit zerfällt nach der Spaltung des Carbonats weiter in Kohlenstoffdioxid und Formaldehyd und der erhaltene *O*-2-Mercaptoethylphosphatester zerfällt nach einem intramolekularen Angriff des Thiolats zu Thiiran und dem entsprechenden Monophosphat.<sup>[66]</sup> Das abgebildete ProTide-Konzept wurde bereits im vorherigen Abschnitt detailliert vorgestellt und im Folgenden soll näher auf das von MEIER entwickelte *cycloSal*-Konzept und das von THOMSON entwickelte BAB-Konzept eingegangen werden, da diese Konzepte in der vorliegenden Arbeit Anwendung gefunden haben.

### 2.3.1 Das *cycloSal*-Konzept

Im Gegensatz zu den bereits vorgestellten Konzepten ist das *cycloSal*-Konzept eine in sofern einzigartige Strategie, da beide negativen Ladungen der Phosphatgruppe zeitgleich von nur einer Einheit maskiert werden und die Eigenschaften der *cycloSal*-Maske durch unterschiedliche Substituenten und Substitutionspositionen am aromatischen Ringsystem verhältnismäßig einfach beeinflusst werden können. Zudem ist hervorzuheben, dass die Abspaltung der *cycloSal*-Maske anders als bei den bisher vorgestellten Konzepten nicht durch Esterasen oder andere Enzyme ausgelöst wird, sondern durch eine pH-Wert abhängige chemische Hydrolyse.<sup>[67]</sup> Das Konzept fand bisher an verschiedenen Nucleosidanaloga Anwendung, so zum Beispiel auch am bereits vorgestellten AZT **16** (siehe Abb. 8).<sup>[68]</sup> Der Abspaltmechanismus der *cycloSal*-Maske ist in Abbildung 12 dargestellt.



**Abbildung 12:** Darstellung des chemisch induzierten Abspaltungsmechanismus der *cycloSal*-Maske.<sup>[67]</sup>

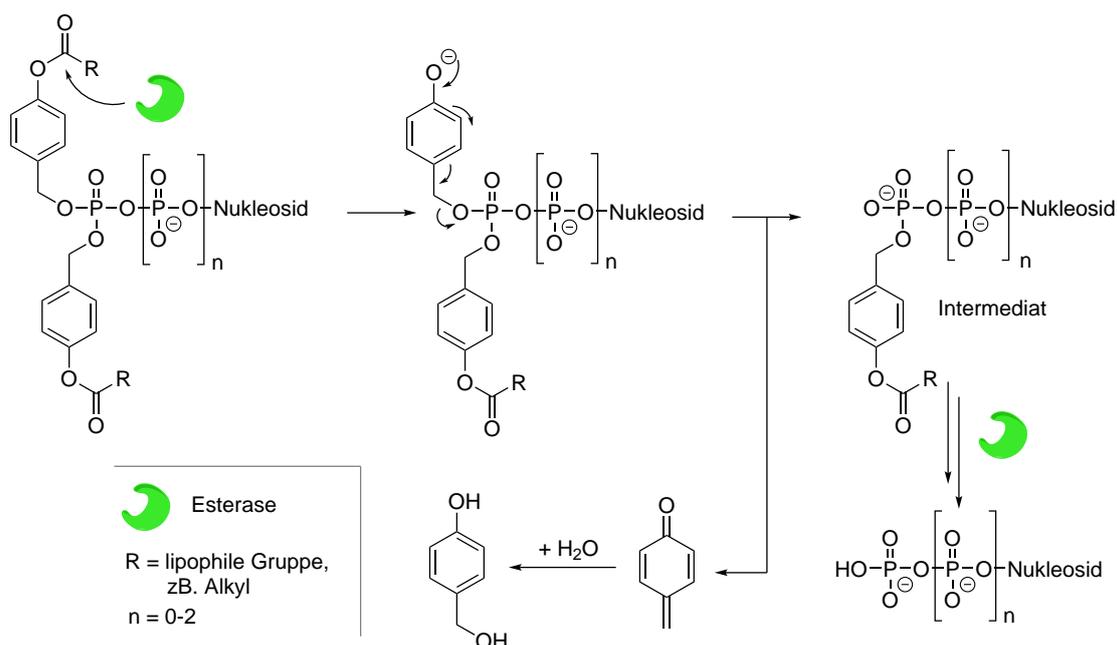
Die Abspaltung der *cycloSal*-Maske startet wie erläutert durch den pH-Wert abhängigen Angriff eines Nucleophils am Phosphoratom und der Spaltung der Phosphor-Sauerstoff-Bindung zwischen dem Phenolsauerstoff und dem Phosphoratom. Durch diese Spaltung wird der in 2'-Position lokalisierte Substituent von einem schwachen Donor zu einem starken Donor (Phenol) umgewandelt, wodurch eine spontane Abspaltung, unter Ausbildung eines Chinonmethids, der *cycloSal*-Maske erfolgt. Das reaktive Chinonmethid reagiert umgehend mit Wasser zum entsprechenden Saligenylalkohol, welcher metabolisiert und ausgeschieden wird. Zeitgleich zur Bildung des Chinonmethids erfolgt die Freisetzung des Nucleosidmonophosphats.<sup>[67]</sup> Es konnte in Einzelfällen auch beobachtet werden, dass der Angriff des Nucleophils am Phosphoratom zu einem Bindungsbruch zwischen dem Phosphoratom und dem benzyliischen Sauerstoffatom führen kann. Durch diese nicht gewollte Öffnung des *cycloSal*-Triesters ist eine vollständige Abspaltung der Maske nicht mehr möglich, da eine Umpolung des Substituenten nicht mehr möglich ist und das entsprechende Chinonmethid nicht mehr gebildet werden kann. Das Nucleosidmonophosphat wird somit nicht freigesetzt.

Durch eine Substitution an der 3'- oder 5'-Position des aromatischen Systems kann die Hydrolysegeschwindigkeit des Phosphatriesters entscheidend beeinflusst werden. Durch einen Donorsubstituenten (zB. -Me, -*tert*-Butyl) in der 3'-Position wird die Hydrolysegeschwindigkeit gesenkt. Ist hingegen in der 5'-Position ein starker Akzeptorsub-

stituent (zB. -Cl, -NO<sub>2</sub>) vorhanden, wirkt sich der elektronenziehende Effekt bis zum Phosphoratom aus und die Hydrolysegeschwindigkeit wird signifikant gesteigert, da ein nucleophiler Angriff erleichtert stattfinden kann.<sup>[67]</sup> Durch die gezielte Manipulation der Spaltungsgeschwindigkeit wurden entsprechende *cycloSal*-Masken nicht nur als Prodrugkonzept verwendet, sondern fanden auch als synthetische Methode bei der Herstellung von diversen phosphorhaltigen Verbindungen Anwendung. Es wurde dabei ausgenutzt, dass eine akzeptorsubstituierte *cycloSal*-Maske leicht von einem entsprechenden Nucleophil angegriffen werden konnte. Als Nucleophile dienten dabei Phosphatsalze, aber auch Glycoside oder Glycosidphosphate. Auf diesem Weg war die Darstellung von Nucleosidmono-, di-, und triphosphaten, sowie die Darstellung von Nucleosidmono-, und -diphosphatzuckern möglich.<sup>[69–71]</sup> Darüber hinaus gelang auch die Synthese von Oligonucleotid-5'-Triphosphaten per automatisierter Festphasensynthese mit entsprechenden *cycloSal*-Bausteinen.<sup>[72]</sup> In dieser Arbeit wurde die *cycloSal*-Methode ebenfalls als synthetische Methode eingesetzt, um entsprechende Nucleosiddiphosphate zu synthetisieren.

### 2.3.2 Das BAB-Konzept

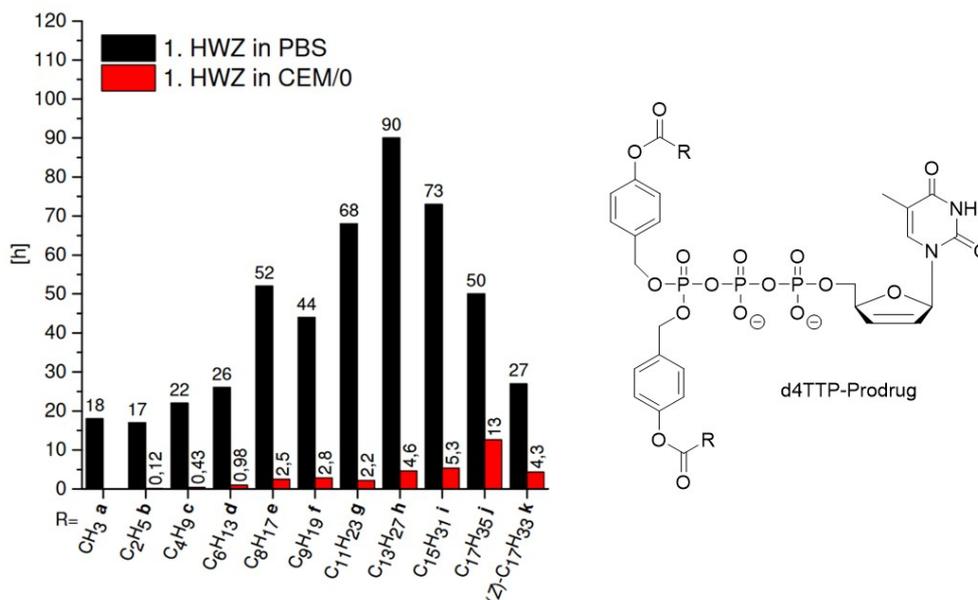
Das BAB-Konzept (BAB: Bis[Acyloxy-Benzyl]) wurde 1993 von THOMSON als Prodrugkonzept für Nucleosidmonophosphate, am Beispiel von AZT, erstmals publiziert.<sup>[73]</sup> Das Konzept beruht auf der enzymatischen Spaltung des phenolischen Esters durch eine Esterase und der dadurch bedingten Freisetzung des Phenolats. Wie bei dem *cycloSal*-Konzept hat die Freisetzung des Phenolats eine Umpolung des Substituenten zur Folge. Der Elektronenakzeptor wird durch die enzymatische Spaltung zum Phenolat zum starken Elektronendonator umgewandelt, wodurch eine spontane 1,6-Eliminierung erfolgen kann und das Phosphat unter Bildung des mesomeriestabilisierten 1,4-Chinonmethids eliminiert wird. Das gebildete reaktive 1,4-Chinonmethid reagiert anschließend mit Wasser zum ungiftigen 4-Hydroxybenzylalkohol und kann nach erfolgter Metabolisierung aus der Zelle ausgeschieden werden. Der Abspaltungsmechanismus ist in Abbildung 13 dargestellt.



**Abbildung 13:** Darstellung des Abspaltungsmechanismus der BAB-Masken.<sup>[73]</sup>

Das BAB-Konzept konnte erfolgreich von WEINSCHENK und JESSEN von Nucleosidmonophosphaten auf entsprechende Diphosphate und schließlich von SCHULZ und GOLLNEST erstmals auf Nucleosidtriphosphate übertragen werden.<sup>[74–77]</sup> Ein großer Vorteil des BAB-Konzepts ist die einfache Manipulation der Lipophilie der einzelnen BAB-Masken durch Variation der entsprechenden Alkylkette des Esters. Durch die Verwendung von langen Alkylketten gelang es sogar Nucleosidtriphosphate in ihrer Lipophilie so weit zu steigern, dass diese Verbindungen durch die Zellmembran diffundieren konnten. Dies konnte bei der Verwendung von Stavudin (d4T) als Nucleosidanalogen in Form des doppelt BAB-maskierten Triphosphats gezeigt werden, da die Substanzen als Inhibitoren in HIV-1 positiven Zellen getestet wurde und eine Inhibierung beobachtet wurde.<sup>[77]</sup> Die Zellaufnahme dieser neuartigen Substanzklasse konnte anschließend auch durch die Verwendung von fluoreszierenden Nucleosiden bestätigt werden, welche nach Aufschluss der Zelle detektiert werden konnten.<sup>[78]</sup> Diese neue Klasse an lipophil maskierten Nucleosidtriphosphaten erhielten als Abkürzung die Bezeichnung *TriPPP*ro. Darüber hinaus konnte von GOLLNEST ein Zusammenhang zwischen der Kettenlänge des Alkylesters und der Halbwertszeit in verschiedenen Stabilitätstests festgestellt werden.<sup>[79]</sup> Die Stabilität der Verbindung gegenüber einer Spaltung der Masken und der entsprechenden

Freisetzung des Triphosphats kann durch verschiedene Methoden erfolgen. Eine erste Abschätzung der Stabilität kann durch das Lösen der Verbindung in Phosphatpuffer bei einem definiertem pH-Wert erhalten werden, nachdem die Konzentration des Edukts und der entstandenen Spaltprodukte in definierten Abständen gemessen wird. Die Messung erfolgte dabei durch eine Trennung des Gemisches per *High-Performance-Liquid-Chromatography* (HPLC) und der Integration der erhaltenen Peakflächen. Die Stabilität der Verbindung kann jedoch auch nach dem selben Prinzip durch Zugabe von Zellextrakt oder isolierten Esterasen durchgeführt werden, um eine Einschätzung der Stabilität im zellulären Medium zu erhalten. In den Stabilitätstest zeigte sich, dass von der untersuchten TriPPP<sub>ro</sub>-Verbindung zunächst immer nur eine Maskeneinheit abgespalten wird und ein monomaskiertes Intermediat erhalten wird (vgl. Abbildung 13, auf Seite 20). Das gebildete Intermediat weist aufgrund der entstandenen negativen Ladung am  $\gamma$ -Phosphat eine höhere Stabilität auf, da durch die repulsive Wechselwirkung der negativen Ladung mit einem Nucleophil die Spaltung der zweiten Maskeneinheit erschwert ist. In Abbildung 14 ist die Halbwertszeit dieser ersten Maskenabspaltung in Abhängigkeit zur Kettenlänge der entsprechenden d4T-TriPPP<sub>ro</sub>-Verbindungen gezeigt.



**Abbildung 14:** Erste Hydrolysezeit verschiedener d4T-Triphosphatprodrugs gemessen in salzhaltigem Phosphatpuffer (PBS) und in Zellextrakten in Abhängigkeit der Länge der Alkylkette R.<sup>[79]</sup>

In Abbildung 14 kann ein Zusammenhang zwischen der Kettenlänge und der Stabilität der Verbindungen beobachtet werden. Es zeigt sich, dass die Stabilität in Phosphatpuffer (PBS) bis zu einer Kettenlänge von  $C_{15}H_{27}$  ansteigt und anschließend wieder abfällt. Dieser Trend kann durch die Ausbildung von Mizellen ab der Überschreitung einer gewissen Lipophilie erklärt werden, da die hydrophilen und reaktiven Phosphorsäureanhydridbindungen an der Außenseite der Mizelle liegen, um mit dem polaren Medium in Wechselwirkung zu treten. Die reaktiven Bindungen sind somit verstärkt nucleophilen Angriffen ausgesetzt und werden dadurch häufiger und schneller gespalten, als bei kürzeren Kettenlängen. Der in PBS beobachtete Trend kann jedoch nicht in dem Stabilitätstest mit dem Zellextrakt beobachtet werden. Stattdessen zeigt sich hier eine stark verkürzte Halbwertszeit im Vergleich zum PBS-Modell und eine Zunahme der Stabilität mit längeren Ketten. Diese Beobachtung kann damit erklärt werden, dass die Spaltung der Masken nicht mehr nur durch Nucleophile erfolgt, sondern vorwiegend durch Enzyme. Wenn die länger werdende Alkylkette die katalytische Aktivität des Enzyms hemmt, indem diese beispielsweise das aktive Zentrum blockiert oder einen Einlass des Esters in das aktive Zentrum verhindert, dann steigt die entsprechende Hydrolysezeit der Verbindung. Eine Ausnahme in diesem Trend zeigt der Eintrag "K", jedoch handelt es sich bei dieser untersuchten Verbindung um eine ungesättigte Alkylkette mit einer (Z)-Doppelbindung und ist somit nicht mit den vorherigen Einträgen vergleichbar.<sup>[79]</sup>

Es lässt sich aus diesen Ergebnissen festhalten, dass das BAB-Konzept ein effektives Mittel darstellt, um hydrophile Nucleosidtriphosphate ausreichend lipophil und reversibel zu maskieren, sodass eine Zellaufnahme und eine Freisetzung des Triphosphats in der Zelle möglich ist. Die Freisetzung erfolgt dabei unspezifisch durch Enzyme und ist zeitlich wie auch räumlich nicht zu kontrollieren. Im folgenden Abschnitt werden daher Schutzgruppen vorgestellt, welche eine Möglichkeit bieten den Zeitpunkt sowie den Ort der Freisetzung in der Zelle unabhängig von Enzymen zu kontrollieren.

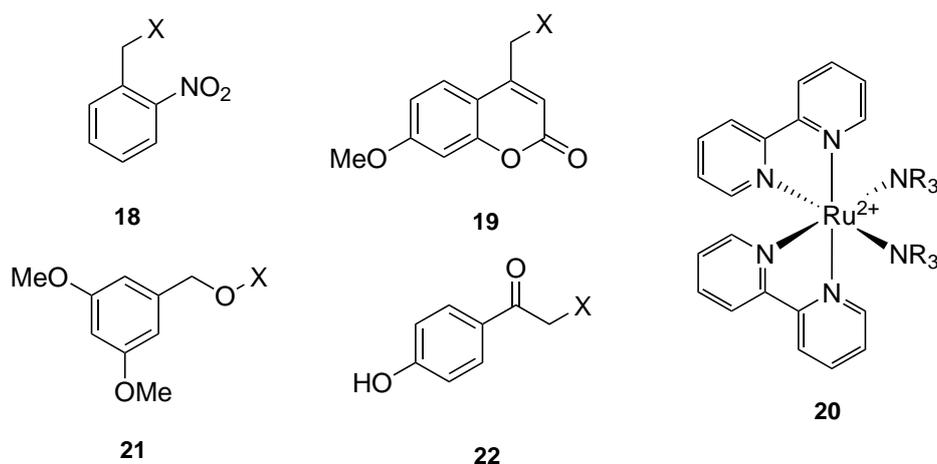
## 2.4 Photolabile Schutzgruppen

Im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Konzepten zur Schützung bzw. Maskierung von entsprechenden Verbindungen erfolgt die Spaltung von photolabilen Gruppen nicht durch eine chemische Hydrolyse oder durch spezifische Enzyme, sondern durch die Bestrahlung mit Licht einer definierten Wellenlänge. Durch die Verwendung von Licht als

*Spaltreagenz* bieten sich verschiedene Anwendungen von photolabilen Schutzgruppen in der Forschung und Technik an, da die Freisetzung der geschützten Verbindungen sowohl räumlich wie auch zeitlich definiert durch die entsprechende Bestrahlung erfolgen kann. Photoschutzgruppen sind aus diesen Gründen in vielen Teilgebieten der Chemie, Biologie und Physik anzutreffen.<sup>[80-82]</sup> Neben dem Einsatz in der organischen Chemie oder dem Einsatz im biologischen bzw. medizinischen Kontext (vgl. Abschnitt 2.5, S. 30) erfolgt der Einsatz von photospaltbaren Gruppen auch vermehrt in der makromolekularen Chemie, da durch den Einsatz dieser Schutzgruppen zum Beispiel die Polymerisation von Monomerbausteinen zeitlich kontrolliert gestartet werden kann.<sup>[83]</sup> Neben der zeitlichen Kontrolle bietet sich die Verwendung von lichtspaltbaren Gruppen im Besonderen jedoch auch im chemisch-medizinischen Bereich an, da diese Schutzgruppe durch Bestrahlung bioorthogonal abgespalten werden kann und der Freisetzungsort von entsprechenden bioaktiven Stoffen räumlich definiert durch die Wahl einer entsprechenden fokussierten Lichtquelle erfolgen kann.<sup>[84]</sup>

Seit der Entdeckung von lichtinduzierten Reaktionen durch CIAMICIAN und SILBER Anfang des 19. Jahrhunderts, welche die Farbänderung von aromatischen Nitroverbindungen durch Tageslicht untersucht haben, sind verschiedene weitere Stoffklassen und funktionelle Gruppen entdeckt und beschrieben worden, welche lichtinduzierte Reaktionen eingehen.<sup>[85]</sup> Eine Auswahl verschiedener photolabiler Gruppen ist in Abbildung 15 dargestellt. Die Auswahl der Verbindungsklassen ist dabei bewusst über verschiedene Verbindungsklassen gefasst und beinhaltet auch eine exemplarische anorganische Komplexverbindung um zu verdeutlichen, dass photolytische Spaltungen in unterschiedlichen strukturellen Motiven auftreten können.

Die in Abbildung 15 dargestellten Verbindungsklassen sind alle durch die Bestrahlung mit Licht spaltbar, jedoch erfordert jede Verbindung eine spezifische Wellenlänge. Die zu verwendende Wellenlänge ist dabei von dem jeweiligen Absorptionsmaximum der Verbindungen abhängig und wird durch dieses definiert. Häufig kann das Absorptionsmaximum durch die Einführung von entsprechenden Substituenten beeinflusst werden, wodurch die photolabilen Schutzgruppen bis zu einem gewissen Grad maßgeschneidert dargestellt werden können. Die Verbindungen **19** und **20** weisen Absorptionsmaxima im sichtbaren Bereich des Lichts auf und sind somit durch Wellenlängen >400 nm spaltbar, während die Verbindungen **18**, **21** und **22** durch verschiedene kurzwellige UV-Wellenlängen gespalten werden müssen.<sup>[80, 86-89]</sup> Allen dargestellten Verbindung ist je-



**Abbildung 15:** Auswahl verschiedener photolabiler Gruppen. Der Substituent X stellt die freier werdende Gruppe dar und kann, abhängig von der Photogruppe, verschiedener Natur (z.B. Alkohol, Amin, Phosphat, Sulfat, Sulfonat) sein. Im Falle des Bis(2,2'-bipyridin)-Rutheniumkomplexes **20** handelt es sich jedoch bei der freigesetzten Gruppe immer um ein Amin.

doch gemeinsam, dass die Verbindungen durch die Bestrahlung mit der entsprechenden Wellenlänge in einen angeregten Zustand übergehen und anschließend durch eine Hydrolyse oder Umlagerungsreaktion das entsprechend zuvor geschützte Derivat freisetzen und in den energetischen Normalzustand relaxieren, welcher sich meist jedoch strukturell von der Ausgangsverbindung unterscheidet. Dabei weist jede photolabile Gruppe einen spezifischen Abspaltmechanismus auf. Die Freisetzung der maskierten Verbindung ist jedoch nicht nur von der Wellenlänge, sondern auch von der Fähigkeit bzw. der Güte der Verbindung abhängig die Strahlung aufzunehmen und die aufgenommene Anregungsenergie durch die gewünschte Photoreaktion wieder abzugeben. Das Maß für diese Fähigkeit ist die Quantenausbeute  $Q$ . Die Quantenausbeute ist abhängig von der verwendeten Wellenlänge, weist in der Regel immer einen Wert kleiner Eins auf und wird durch folgendes Verhältnis definiert.<sup>[90]</sup>

$$Q(\lambda) = \frac{N^*}{N} \quad (1)$$

Dabei gibt  $N^*$  die Anzahl der Photonen an, welche für die Photoreaktion verwendet wurden und  $N$  die Anzahl aller durch die Verbindung absorbierten Photonen. Die aufgenommene Energie der Strahlung kann, falls sie nicht für die Photoreaktion genutzt wird, durch

Translation, Rotation oder Vibration abgegeben werden. Neben einer möglichst hohen Quantenausbeute sind jedoch noch weitere Anforderungen an potentielle photolabile Gruppen gestellt. Eine Auswahl dieser verschiedenen Anforderungen ist nachfolgend aufgelistet.<sup>[91]</sup>

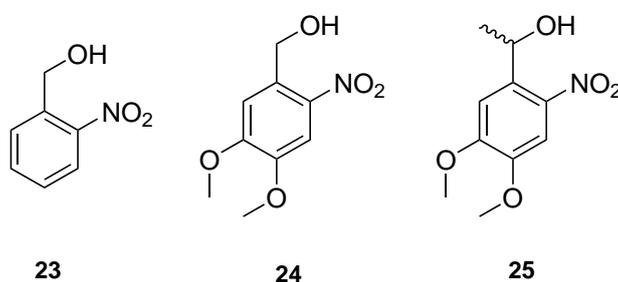
- Im zellulären Kontext sollte das Absorptionsmaximum der photolabilen Gruppe über 350 nm liegen, um die Absorption durch zelleigene Verbindungen wie zum Beispiel aromatische Aminosäuren oder Nucleobasen ausschließen zu können. Darüber hinaus werden Strahlungsschäden in diesem Absorptionsbereich vermieden. Eine hohe Quantenausbeute der Photogruppe unterstützt durch die Aufnahme der Strahlung ebenfalls Strahlungsschäden in biologischen Systemen.
- Das verwendete photolabil geschützte Derivat und alle Spaltprodukte sollten im entsprechendem Medium löslich sein und eine ausreichende Stabilität und Lipophilie besitzen, um das Zielgewebe zu erreichen.
- Die gebildeten Spaltprodukte sollten andere Absorptionsmaxima als die photolabile Gruppe aufweisen und gegenüber dem Medium und zellulären Verbindungen inert sein.
- Die photolytische Spaltreaktion sollte möglichst schnell ablaufen und keine anderweitig spaltbaren reaktiven Intermediate oder Übergangszustände aufweisen, welche Nebenreaktionen eingehen, sodass die eigentliche Freisetzung der Zielverbindung verhindert wird.

Im Zusammenhang mit den gestellten Anforderungen ist jedoch anzumerken, dass bis dato keine Photogruppe alle diese Punkte simultan erfüllt. Es muss daher bei der Auswahl der photolabilen Gruppe abgewogen werden, welche Punkte essentiell und welche Punkte zu vernachlässigen sind oder nur eine untergeordnete Rolle im gewünschten Einsatzgebiet spielen.

Die photolabilen Gruppen, welche auf dem 2-Nitrobenzyl-Grundgerüst basieren, sind die am häufigsten in der Literatur eingesetzten Gruppen und wurden bereits in verschiedenen Forschungsthemen verwendet.<sup>[91]</sup> Aufgrund ihrer Vielseitigkeit und ihrer verhältnismäßigen leichten Modifizierbarkeit wurde die 2-Nitrobenzylgruppe auch in der vorliegenden Arbeit intensiv verwendet und soll in ihren Eigenschaften sowie spezifischer Vor-, und Nachteile im nächsten Abschnitt näher vorgestellt werden.

### 2.4.1 2-Nitrobenzyl Photoschutzgruppen

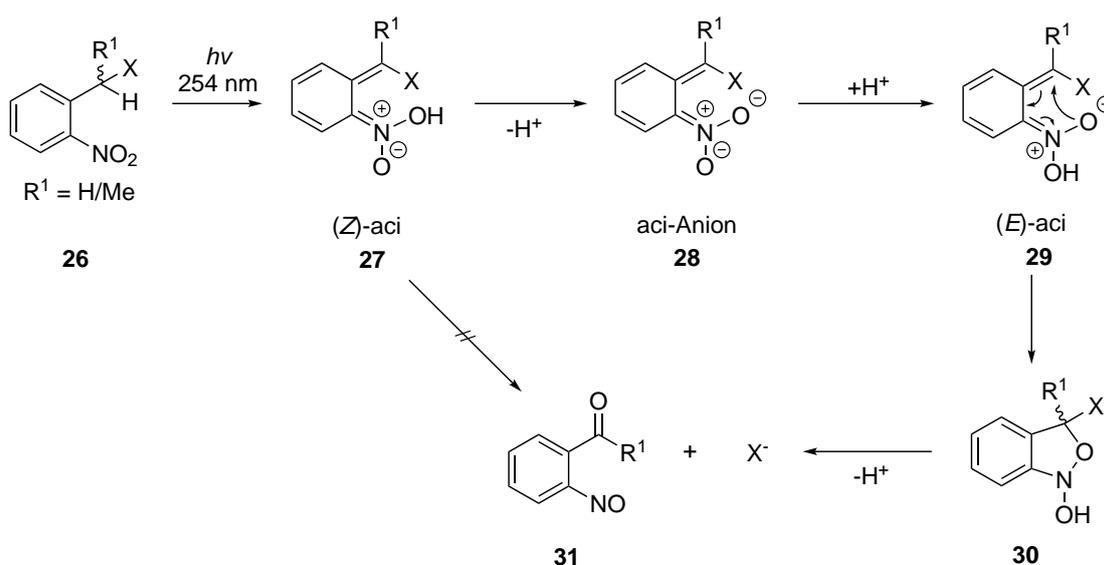
Die Reaktionen von Nitroaromaten und deren lichtinduzierte Umlagerungen wurden, wie bereits kurz erwähnt, von CIAMICIAN und SILBER Anfang des 19. Jahrhunderts beobachtet.<sup>[85]</sup> Der erste Einsatz dieser Verbindungsklasse als Schutzgruppe erfolgte jedoch erst deutlich später in den 70er Jahren durch PATCHORNIK, welcher verschiedene photospaltbare Gruppen basierend auf dem 2-Nitrobenzyl Gerüst nutzte, um Aminosäuren an der Aminofunktion entsprechend zu schützen.<sup>[92]</sup> In Abbildung 16 sind verschiedene photolabile Schutzgruppen abgebildet, welche sich vom 2-Nitrobenzylalkohol ableiten.



**Abbildung 16:** Abbildung der vom 2-Nitrobenzylalkohol **23** abgeleiteten Verbindungen 6-Nitroveratrylalkohol **24** (NV) und *rac*-1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)ethanol **25** (MeNV).

Die einfachste der abgebildeten Gruppen, der 2-Nitrobenzylalkohol **23**, setzt eine potentielle Austrittsgruppe, welche an der Hydroxygruppe gebunden wäre, nach einer Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von circa 250 nm frei. Bei dieser Wellenlänge werden jedoch alle aromatischen Systeme, auch die von nicht lichtspaltbaren Gruppen, angeregt, was zu ungewünschten Nebenreaktionen und Absorptionen führen kann.<sup>[93]</sup> Aus diesem Grund wurde begonnen das Grundgerüst entsprechend zu modifizieren um eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums zu erreichen. Die Modifikation des aromatischen Systems mit Donorsubstituenten führt dabei zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums in einen Bereich um 350 nm, wodurch kaum weitere aromatische Systeme angeregt werden und in einem zellulären Kontext von keinen nennenswerten Strahlungsschäden ausgegangen werden muss.<sup>[91, 93]</sup> Durch die Modifikation mit zwei Methoxygruppen, wird zudem die Hydrophilie der Schutzgruppe und des entstandenen Spaltprodukts erhöht, wodurch der Einsatz im zellulären Kontext ebenfalls möglich

wird. Einen weiteren Modifikationsansatz bietet die Substitution der Benzylposition mit verschiedenen Substituenten. Wie in Verbindung **25** dargestellt kann in dieser Position zum Beispiel eine Methylgruppe eingefügt werden, wodurch die Quantenausbeute der Reaktion signifikant verbessert werden kann.<sup>[94]</sup> Zudem ist das gebildete Spaltprodukt der Photomaske in diesem Fall ein Keton und kein Aldehyd, wodurch ungewollte Nebenreaktionen wie Iminbildungen unterbunden werden. Ein entscheidender Nachteil bei der Substitution der Benzylposition besteht in der Bildung eines Stereozentrums. Falls in der freizusetzenden Gruppe ebenfalls Stereozentren vorhanden sind, kann dies zu komplizierten Diastereomergemischen führen, welche in Synthesen eine unterschiedliche Reaktivität aufweisen können oder die Reinigung und Analytik der Verbindung erschweren. Die Modifikation der benzylichen Position oder des aromatischen Systems hat jedoch trotz des Einflusses auf die Quantenausbeute und die Spaltwellenlänge keinen Einfluss auf den postulierten Spaltmechanismus, welcher in Abbildung 17 dargestellt ist.



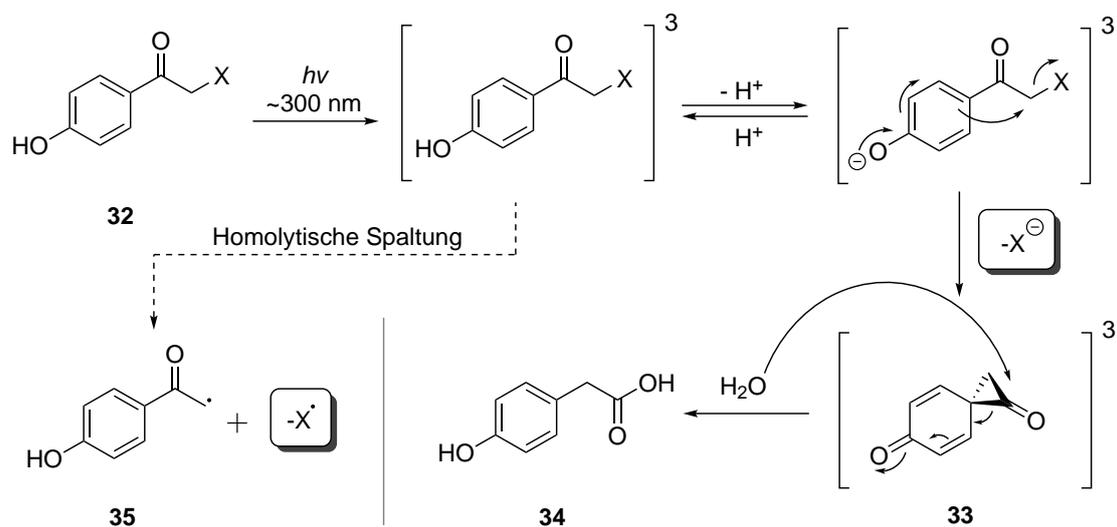
**Abbildung 17:** Postulierter Mechanismus der photoinduzierten Spaltung der 2-Nitrobenzylgruppe und der freiwerdenden Gruppe X. Zur verbesserten Übersicht wurden optionale Donorsubstituenten am aromatischen System nicht dargestellt.<sup>[80, 91, 95, 96]</sup>

Bei dem dargestellten Mechanismus muss angemerkt werden, dass mehrere Umlagerungen, Übergangszustände und Intermediate nicht ausreichend charakterisiert sind und daher in der Abbildung 17 nicht dargestellt sind. Die abgebildeten Schritte des Mechanis-

mus sind jedoch durch Femtosekunden Spektroskopie, Tieftemperatur Infrarot-, und Raman-spektroskopie ausreichend belegt, um den Mechanismus darzustellen.<sup>[80, 91, 95, 96]</sup> Die Abspaltung der Gruppe X erfolgt durch die Anregung der Ausgangsverbindung **26** durch eine entsprechende Strahlung der passenden Wellenlänge. Nach der Anregung in einen höheren Energiezustand erfolgt ein *Intersystem Crossing* (ISC) von dem angeregten Singulettzustand in einen Triplettzustand. In dem Triplettzustand ist eine radikalische Übertragung des Protons der Benzylgruppe auf ein Sauerstoffatom der Nitrogruppe möglich und die (*Z*)-*aci* Verbindung **27** bildet sich aus, welche in einem Protolysegleichgewicht mit dem *aci*-Anion **28** steht. Durch die ausgebildete Doppelbindung zwischen dem ehemaligen aromatischen Kohlenstoffatom und dem Stickstoffatom ist eine freie Drehbarkeit der Bindung nicht mehr möglich, wodurch eine Reprotonierung des *aci*-Anions **28** auch zur Bildung der (*E*)-*aci*-Verbindung **29** führen kann. In dem Protolysegleichgewicht liegt jedoch keine Favorisierung zwischen dem *E* oder *Z*-Isomer vor, sondern beide Verbindungen werden äquivalent gebildet. Ausgehend vom (*E*)-*aci*-Isomer **29** kann jedoch aufgrund der räumlichen Nähe zwischen dem negativen Sauerstoffatom und der Benzylposition das cyclische *N*-Hydroxybenzisoxazolin **30** erhalten werden. Ausgehend vom erhaltenen Halbacetal **30** erfolgt anschließend durch die Abgabe eines Protons und der Ausbildung einer Carbonyl-, und Nitrosogruppe die Abspaltung des Restes X. In der Literatur wird die Gruppe X als Phosphatrest, Methoxygruppe, Tosylat oder auch als Nucleotid beschrieben.<sup>[97–99]</sup> Die Freisetzung der Nitrosoverbindung **31** ist jedoch im zellulären Kontext bedenklich, da Nitrosogruppen eine hohe Reaktivität aufweisen und nach Reaktionen mit zellulären Verbindungen spezifische Vorgänge in der Zelle behindern könnten. So sind zum Beispiel Reaktionen von Arylnitrosoverbindungen mit aromatischen Systemen bekannt, wodurch denkbare Schäden an Enzymen oder der DNA möglich wären.<sup>[100, 101]</sup> Des Weiteren wird ebenfalls, bei Abwesenheit der Methylgruppe in der Benzylposition, ein reaktiver Aldehyd gebildet. Dieser kann zum Beispiel durch die Reaktion mit Aminogruppen Imine bilden und somit ebenfalls Schäden auslösen. Aufgrund der Bildung dieses reaktiven Spaltproduktes wurde in dieser Arbeit eine weitere photolabile Schutzgruppe verwendet, welche im folgendem Abschnitt vorgestellt wird und ein weniger reaktives Spaltprodukt bildet. Auf den Einsatz von 2-Nitrobenzyl Schutzgruppen im Rahmen von Nucleotiden wird im Abschnitt 2.5 näher eingegangen.

### 2.4.2 *p*-Hydroxyphenylacyl-Photoschutzgruppe

Neben den photolabilen Schutzgruppen aufbauend auf dem 2-Nitrobenzyl-Grundgerüst wurde in der vorliegende Arbeit auch die *p*-Hydroxyphenylacyl (pHP) Schutzgruppe verwendet. Diese photolabile Schutzgruppe wurde erstmals 1996 von GIVENS als photolabile Schutzgruppe publiziert und diente in der entsprechenden Arbeit dazu, ATP am  $\gamma$ -Phosphat einfach photolabil zu maskieren (vgl. Abschnitt 2.5).<sup>[102]</sup> Des Weiteren fand die Schutzgruppe Anwendung im Bereich der Neurobiologie, Enzymkatalyse und in der organischen Synthese.<sup>[103–105]</sup> In der vorliegenden Arbeit sollte diese Schutzgruppe aufgrund ihres nicht toxischen Spaltprodukts als Alternative zu der in der Literatur etablierten 2-Nitrobenzylgruppe verwendet werden, welche ein potentiell zelltoxisches Spaltprodukt freisetzt. Der Abspaltmechanismus der pHP-Schutzgruppe ist in Abbildung 18 dargestellt.



**Abbildung 18:** Postulierter Mechanismus der photoinduzierten Spaltung der pHP-Schutzgruppe über einen angeregten Tripletzustand.<sup>[104]</sup>

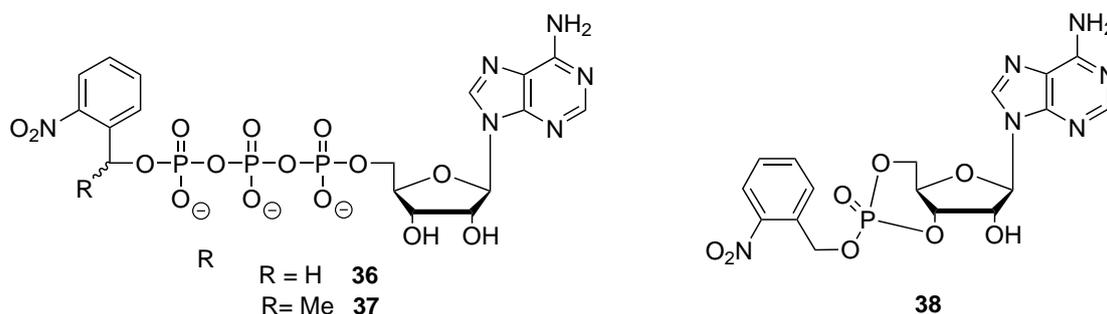
Durch die Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von circa 300 nm wird die Verbindung **32** zunächst in einen angeregten Singulettzustand überführt und relaxiert durch ein *Intersystem Crossing* (ISC) in einen angeregten Tripletzustand. In diesem Tripletzustand erfolgt nach der Deprotonierung des Phenols eine Umlagerung in das Spiro-dienon **33**, welche auch als FAVORSKII-Intermediat bezeichnet wird. Bei der Bildung des FAVORSKII-Intermediats erfolgt zudem die Freisetzung der Gruppe X. Durch einen

nucleophilen Angriff eines Wassermoleküls an dem Carbonylkohlenstoffatom wird der gespannte Dreiring geöffnet und durch Rearomatisierung das nicht toxische Spaltprodukt **34** erhalten. Es wurde jedoch auch zu einem geringen Teil die Bildung des Radikals **35** beobachtet, welches nur durch einen homolytischen Bindungsbruch im angeregten Triplettzustand erklärt werden kann. Die Freisetzung der Gruppe X erfolgt in diesem Fall jedoch auch nur als Radikal.<sup>[104]</sup> Der Mechanismus wurde von GIVENS wie abgebildet publiziert, nachdem von WIRZ und GIVENS das Phenolat im Triplettzustand per Laser-Blitzlicht-Photolyse detektiert und analysiert werden konnte.<sup>[106]</sup> Die Bildung der Verbindung **35** als Spaltprodukt ist nicht nur wegen der geringen Cytotoxizität dem Spaltprodukt der 2-Nitrobenzylgruppe vorzuziehen, sondern auch wegen der sehr guten Wasserlöslichkeit der Verbindung. Durch diese beiden Faktoren ist der Einsatz der pHP-Gruppe gegenüber der 2-Nitrobenzylgruppe im zellulären Bereich vorzuziehen. Aufgrund der kürzeren Abspaltungswellenlänge (300 nm) ist die pHP-Maske jedoch im Kontext von möglichen störenden zellulären Absorptionen und Zellschäden der 2-Nitrobenzylmaske (350 nm) unterlegen. Auch ist die leichte Modifizierbarkeit der pHP-Maske nicht gegeben, da für die Abspaltung die Chinonmethid-Struktur **33** ausgebildet werden muss, wodurch die phenolische Hydroxygruppe nicht modifiziert werden sollte. So wurde zum Beispiel von GIVENS gezeigt, dass durch eine Methoxygruppe in *para*-Position der homolytische Bindungsbruch verstärkt stattfindet und die Gruppe X als Radikal freigesetzt wird, da der homolytische Bindungsbruch in diesem Fall schneller stattfindet als die Ausbildung des FAVORSKII-Intermediats.<sup>[80]</sup> Daher lässt sich auf die Aussage aus Abschnitt 2.4 verweisen, dass eine perfekte Photoschutzgruppe bis dato nicht existent ist und der Einsatz der verschiedenen photolabilen Gruppen nach der Abwägung der Vor-, und Nachteile vollzogen werden muss.

## 2.5 Photolabile Schutzgruppen zur Maskierung von Adenosinderivaten

Die ersten Anwendungen von photolabilen Schutzgruppen an Adenosinderivaten erfolgte Ende der 70er Jahre durch KAPLAN, welcher monogeschütztes Nitrobenzyl-ATP darstellte, sowie durch ENGELS, welcher NB-geschütztes cAMP synthetisierte.<sup>[107, 108]</sup> In der Arbeit von KAPLAN wurde auch der bis heute in der Literatur verwendete Begriff *caged* für die Schützung mit photolabilen Schutzgruppen geprägt. Die dargestellten *ca-*

*ged*-Adenosinderivate sind in Abbildung 19 abgebildet.<sup>[107]</sup>

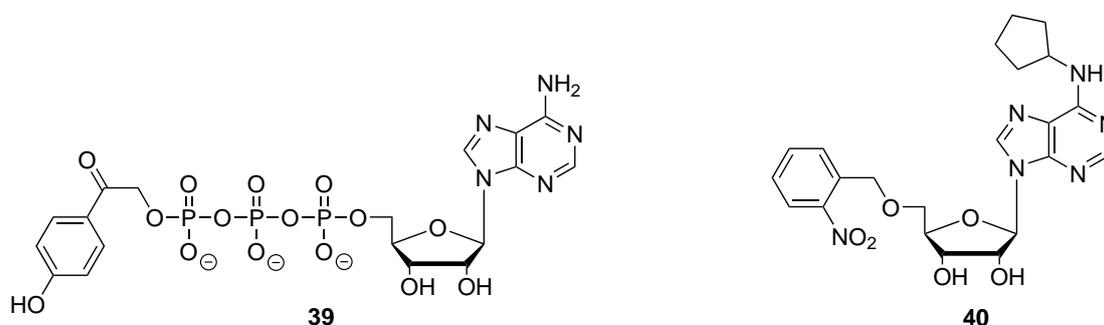


**Abbildung 19:** Abbildung der von KAPLAN und ENGELS erstmalig synthetisierten *caged*-Adenosinderivate.<sup>[107, 108]</sup>

Bei beiden in Abbildung 19 gezeigten Verbindungen konnten nach erfolgter Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge von circa 250 nm die Freisetzung der entsprechenden Adenosinverbindung beobachtet werden. ENGELS konnte in seiner Arbeit sogar zeigen, dass das NB-geschützte cAMP durch die Zellmembran in die Zelle gelangte und die Freisetzung in der Zelle stattfand. Das NB-ATP Derivat konnte dagegen nur in einer wässrigen Pufferlösung photolysiert werden und es wurden auch keine Zellaufnahmestudien durchgeführt. Es ist jedoch davon auszugehen, dass eine NB-Maske die Lipophilie nicht ausreichend steigert, um eine passive Diffusion des ATP-Derivats durch die Zellwand zu ermöglichen. Es konnte jedoch von KAPLAN beobachtet werden, dass die Freisetzung von ATP durch die Bestrahlung der methyl-modifizierten Verbindung **37** deutlich schneller erfolgte und das auch die Ausbeute des erhaltenen ATPs bis zu 60 % höher lag als im direkten Vergleich zur benzylischen Verbindung **36**. Als Grund hierfür wird die Bildung des reaktiven Aldehyds, bei der Bestrahlung der nicht methylsubstituierten Verbindung **36**, als Spaltprodukt angeführt, welcher mit der exocyclischen Aminogruppe zum Imin kondensieren kann und somit die Ausbeute an ATP senkt. Des Weiteren kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass die Methylgruppe in der benzylischen Position die Abspaltungsgeschwindigkeit erhöht. Es wurde in beiden Arbeiten auch festgestellt, dass die *caged*-Derivate keine Substrate für die jeweils untersuchten Enzyme darstellen und dass eine entsprechende Aktivität der Enzyme erst nach erfolgter Bestrahlung beobachtet werden konnte. So konnte ENGELS die Aktivierung der cAMP abhängigen Proteinkinase und die von dieser Kinase aktivierten Effekte beobachtet werden und KALPLAN konnte die Aktivität einer ATP-abhängigen Natrium-Kalium-Pumpe,

durch die Messung des durch den ATP Verbrauch freiwerdenden anorganischen Phosphats, beobachten.

Die im vorherigen Abschnitt vorgestellte pHP-Schutzgruppe wurde ebenfalls bereits als photolabile Schutzgruppe für ATP von GIVENS im Jahr 1996 publiziert.<sup>[102]</sup> In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine schnelle und vergleichbar effiziente Freisetzung von ATP auch durch die photolabile Maskierung mit der pHP-Maske möglich ist. Die Untersuchung zur Freisetzung des ATPs erfolgte dabei jedoch ähnlich zu den Arbeiten von KAPLAN nur in wässrigen Puffermedien und es wurden keine Zellaufnahmestudien durchgeführt. Auch hier ist nicht von einer ausreichenden Steigerung der Lipophilie durch das Maskieren einer Ladung am  $\gamma$ -Phosphat auszugehen. Die von GIVENS publizierte Verbindung ist in Abbildung 20 dargestellt.



**Abbildung 20:** Abbildung der von GIVENS und JACOBS dargestellten photolabil maskierten Adenosinderivate.<sup>[102, 109]</sup>

Ebenfalls in Abbildung 20 dargestellt ist die Verbindung **40**, welche von JACOBS im Jahr 1991 publiziert wurde.<sup>[109]</sup> Das an der 5'-Position photolabil geschützte  $N^6$ -Cyclopentyladenosin ist ein  $A_1$ -Adenosin-Rezeptor Antagonist, welcher in der *caged*-Form synthetisiert wurde um die Aktivität des Rezeptors durch die *in situ* Freisetzung des Antagonisten zu untersuchen. Der  $A_1$ -Rezeptor gehört dabei zu der im Abschnitt 2.1.1 erläuterten P1-Rezeptoren. Die Schützung einer 5'-Hydroxygruppe von Zuckern mit photolabilen Schutzgruppen ist in der Literatur eher selten zu finden, da primäre Alkohole keine guten Abgangsgruppen bei der photoinduzierten Freisetzung bilden.<sup>[91]</sup> Es konnte jedoch in der publizierten Arbeit die Aktivierung des entsprechenden Enzyms nach Bestrahlung der Verbindung **40** beobachtet werden, wodurch die Vielseitigkeit und Anwendbarkeit von photolabilen Gruppen nochmals aufgezeigt werden konnte.<sup>[109]</sup>

Es ist jedoch bei den hier im Abschnitt vorgestellten Arbeiten festzuhalten, dass es bei der photolabilen Schützung von Nucleosid-Triphosphaten bisher nicht gelang, die Lipophilie ausreichend für eine passive Aufnahme durch die Zellmembran zu erhöhen. Vor allem um die in Abschnitt 2.1.1 erläuterten purigenen immunregulatorischen Reaktionen im Ruhezustand der Zelle zu untersuchen, wäre eine passive Aufnahme entsprechend maskierter Verbindungen wünschenswert, da alternative Methoden zur Einschleusung, wie Mikroinjektionen, bereits zu einem erhöhten Stresslevel der Zelle führen können und das Ergebnis der Messung somit verfälschen könnte. Die Entwicklung eines Konzepts für die Darstellung von photolabil maskierten Adenosinderivaten mit einer erhöhten Lipophilie steht somit im Fokus dieser Arbeit, damit zelluläre Prozesse orts-, und zeitunabhängig untersucht werden können.

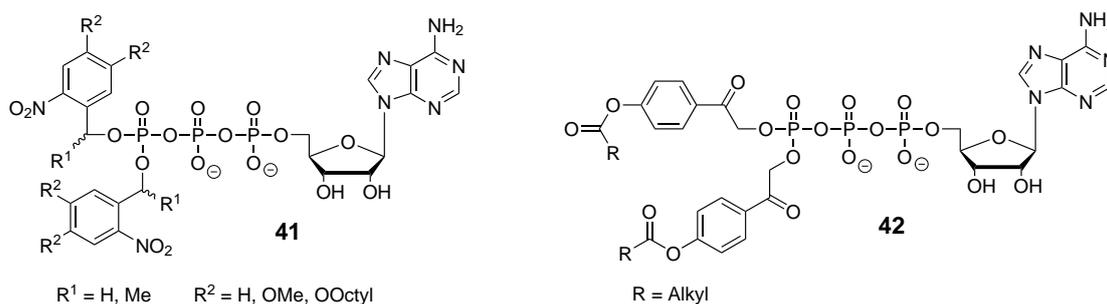
### 3 Aufgabenstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Synthese verschiedener photolabil geschützter Adenosinverbindungen und in der Untersuchung der lichtinduzierten Freisetzung dieser Adenosinverbindungen. Die vorliegende Arbeit ist in drei verschiedene Abschnitte unterteilt. Der erste Abschnitt behandelt die Synthese von verschiedenen photolabilen Schutzgruppen und die anschließende Synthese von verschiedenen photolabil maskierten ATP-Derivaten. Der zweite Abschnitt handelt von der Synthese und der Untersuchung von *caged*-cAMP und im letzten Abschnitt wird die Verwendung von *caged*-Gruppen als Schutzgruppe für die 5'-Position der Ribose an einem ausgesuchten Adenosinderivat untersucht. Bei dem Derivat handelt es sich um einen potenten Agonisten des adenosinabhängigen A1-Rezeptors, sodass durch die photolabile Maskierung dieses Derivats, wie auch des cAMPs und ATPs, die immunregulatorischen Eigenschaften der verschiedenen Purinverbindungen in entsprechenden Assays weiter untersucht werden können. Diese Assays sollten dabei mit der Prämisse gestaltet sein, dass die Freisetzung der Purinverbindungen kontrolliert durch Bestrahlung mit einer spezifischen Wellenlänge erfolgen kann, um die ausgelösten Effekte gezielt beobachten und untersuchen zu können.

#### **Synthese und Untersuchung von verschiedenen *caged*-ATP Derivaten**

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit sollen verschiedene photolabile und lipophile ATP-Derivate (Abb. 21) hergestellt und auf ihre Stabilität untersucht werden. Zur photolabilen Maskierung sollen verschiedene substituierte 2-Nitrobenzylgruppen (NB) und eine durch einen lipophilen Ester modifizierte *para*-Hydroxyphenacyl-Maske (pHP) verwendet werden. Die zu synthetisierenden symmetrischen *caged*-ATP Derivate sind in Abbildung 21 dargestellt.

## Aufgabenstellung

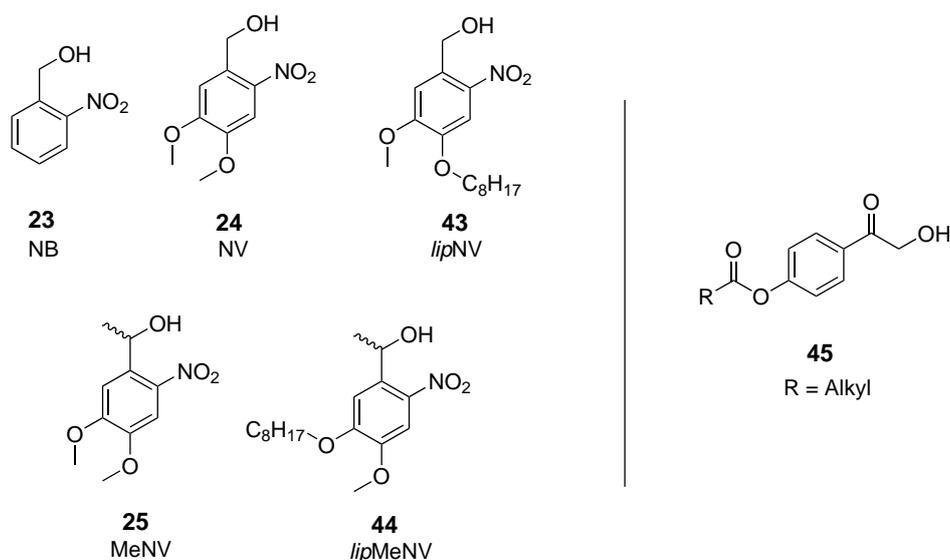


**Abbildung 21:** Schematische Darstellung der in der vorliegenden Arbeit herzustellenden photolabil geschützten ATP-Derivate.

Ein besonderer Schwerpunkt dieser Arbeit liegt, neben der photolabilen Schützung des ATPs, auch in der Steigerung der Lipophilie durch die verwendeten unterschiedlichen photolabilen Gruppen. Dafür sollte das 2-Nitrobenzyl-Grundgerüst am aromatischen Ringsystem synthetisch so modifiziert werden, dass eine Erhöhung der Lipophilie durch entsprechende Substituenten erreicht wird. Aufgrund der bathochromen Verschiebung des Absorptionsspektrums durch Donorsubstituenten sollte für die Erhöhung der Lipophilie auf langkettige aliphatische Ether zurückgegriffen werden, damit die Spaltwellenlänge in einen für Zellen ungefährlichen Bereich von 360 nm verschoben wird. Neben der Substitution des Ringsystems soll die neuartige lipophile Schutzgruppen auch in der Benzylposition methyliert werden, um den Einfluss der Methylgruppe auf die Abspaltungsgeschwindigkeit zu untersuchen. Anschließend sollen die synthetisierten, lipophilen Schutzgruppen mit verschiedenen literaturbekannten, lichtspaltbaren NB-Gruppen verglichen werden. Dazu sollen auch diese bekannten Verbindungen an das ATP gekuppelt werden, um die lipophile, n lichtspaltbaren Masken in ihren Spaltgeschwindigkeiten, nach entsprechenden Photolysen aller hergestellten ATP-Derivate, vergleichen zu können.

Wie bei den NB-Derivaten soll auch bei der pHP-Schutzgruppe die Lipophilie gesteigert werden. Im Gegensatz zu den NB-Gruppen muss diese Steigerung der Lipophilie jedoch durch eine Veresterung des Phenols erfolgen. Die Verwendung von Ethern ist in diesem Fall nicht möglich, da für die lichtinduzierte Spaltung der pHP-Maske das Phenol vorliegen muss und Ether im Gegensatz zu Estern nicht in der Zelle gespalten werden können. Die für diese Arbeit herzustellenden photolabilen NB und pHP-Schutzgruppen sind in Abbildung 22 dargestellt.

## Aufgabenstellung

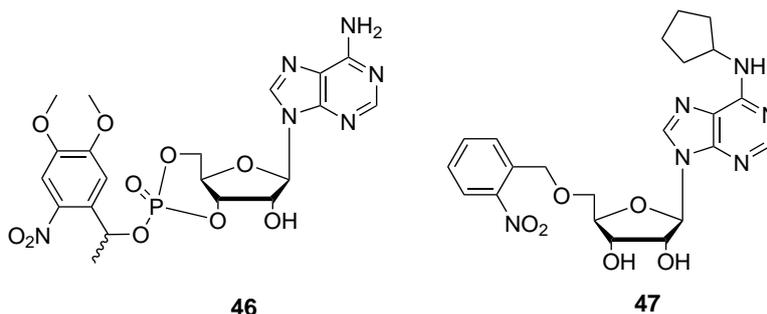


**Abbildung 22:** Abbildung der in dieser Arbeit herzustellenden photolablen Schutzgruppen basierend auf dem 2-Nitrobenzyl Grundgerüst (links) und ausgehend von der pHP-Maske (rechts). Unter den Strukturformeln ist die in der Arbeit verwendete Kurzbezeichnung für die jeweilige Schutzgruppe angeführt. (NB: Nitrobenzyl; NV: Nitroveratryl; MeNV: Methyl-Nitroveratryl; *lip*: lipophil).

Nach erfolgreicher Darstellung der verschiedenen Masken und der Kupplung dieser Masken an das  $\gamma$ -Phosphat des ATPs soll anschließend die lichtinduzierte Freisetzung von ATP untersucht werden. Die erhaltenen Ergebnisse sollen anschließend zwischen den verschiedenen Masken evaluiert werden, um zu ermitteln, ob die neuartigen lipophilen Masken **43**, **44** und **45** eine schnellere Freisetzung des ATPs ermöglichen als die literaturbekannten Masken **23**, **24** und **25**. Darüber hinaus sollen nicht nur symmetrisch maskierte *caged*-ATP Derivate synthetisiert werden, sondern auch ein asymmetrisches Derivat, welches eine bioreversible Acyloxybenzyl-Maske (AB) und eine *caged*-Maske trägt. Nach der erfolgreichen Synthese dieses Derivats soll die orthogonale Abspaltung der Masken untersucht werden. Durch die Verwendung einer bioreversiblen AB-Maske wird die Freisetzung des toxischen Spaltprodukts der NB-Maske halbiert und die Lipophilie des maskierten Nucleotids kann gezielt durch die gut untersuchte AB-Maske eingestellt werden.

### Synthese und Untersuchung von *caged*-cAMP und photolabil geschütztem *N*<sup>6</sup>-Cyclopentyladenosin

Nach der lipophilen und photolabilen Schützung von ATP sollen anschließend die Synthese des *caged*-cAMP **46** und des *caged*-Cyclopentyladenosin **47** sowie die anschließende Untersuchung der lichtinduzierten Freisetzung der maskierten Derivate erfolgen. Die dafür herzustellenden Verbindungen sind in Abbildung 23 abgebildet.



**Abbildung 23:** Abbildung des in dieser Arbeit herzustellenden *caged*-cAMPs **46** und *caged*-*N*<sup>6</sup>-Cyclopentyladenosins **47**.

Im Gegensatz zu den Arbeiten von ENGELS soll bei dem in dieser Arbeit hergestellten *caged*-cAMP die MeNV-Photomaske verwendet werden, um zum Einen die Abspaltungswellenlänge zu längerwelliger Strahlung zu verschieben und zum Anderen soll bedingt durch die Methylgruppe die Abspaltung schneller und unter Bildung eines weniger reaktiven Ketons erfolgen. Das Cyclopentyladenosin soll ebenso wie das cAMP photolabil geschützt werden, um durch die gezielte Freisetzung die purinabhängigen Immunreaktionen der Zelle zu untersuchen, da das Cyclopentyladenosin ein potenter Agonist des adenosinabhängigen A1-Rezeptors ist. Zudem soll die Synthese dieses Derivats als Model dafür dienen, ob photolabile Gruppen in der Synthese von Nucleosiden Alternativen zu bereits etablierten Syntheseprotokollen und Schutzgruppenstrategien für die 5'-Position von Pentosen bieten, welche in spezifischen Fällen gegebenenfalls nicht anwendbar sind.

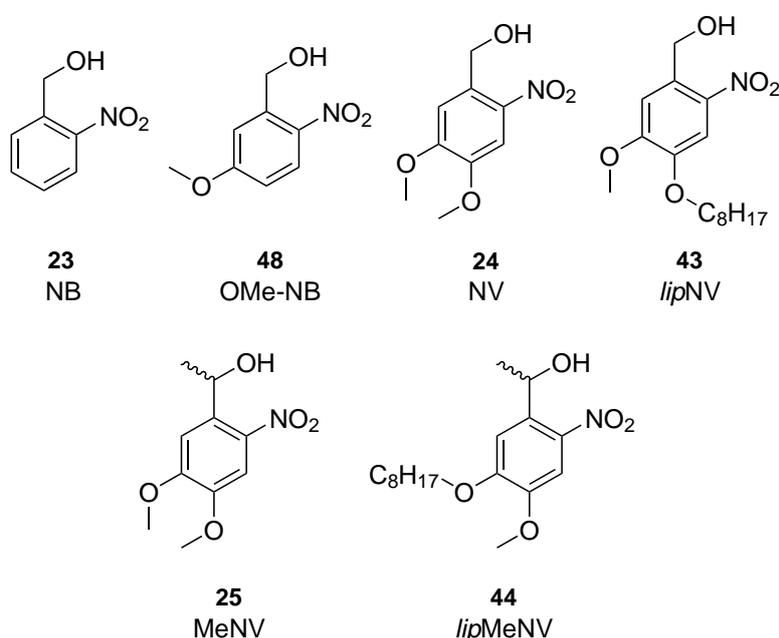
## 4 Resultate und Diskussion

In folgendem Abschnitt soll auf die unterschiedlichen Synthesen und experimentellen Untersuchungen, welche im Rahmen dieser Arbeit getätigt wurden, eingegangen werden. Die Reihenfolge der vorgestellten Themenfelder folgt dabei der in der Aufgabenstellung erläuterten Reihenfolge. Im ersten Themenbereich wird die Darstellung von symmetrischen  $\gamma$ -*caged* geschützten ATP Derivaten sowie die Freisetzung von ATP aus diesen Derivaten nach Bestrahlung mit UV-Licht vorgestellt. Anschließend wird die Synthese von *caged*-cAMP und *caged*-N<sup>6</sup>-Cyclopentyladenosin und die lichtinduzierte Freisetzung der jeweiligen geschützten Verbindungen vorgestellt.

### 4.1 Synthese von Schutzgruppen basierend auf dem 2-Nitrobenzyl-Grundgerüst

Die 2-Nitrobenzylschutzgruppe ist die in der Literatur am häufigsten beschriebene und verwendete photolabile Schutzgruppe.<sup>[91]</sup> Diese, bezogen auf ihre Struktur, einfach aufgebaute Schutzgruppe zeichnet sich durch die leichte Modifizierbarkeit des Substitutionsmusters am aromatischen Ringsystem sowie der Benzylposition aus, wodurch bisher verschiedene Derivate mit unterschiedlichen Eigenschaften und Anwendungen beschrieben worden sind.<sup>[110]</sup> Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt zum Einen darauf, das simple Grundgerüst so zu modifizieren, dass die lichtspaltbare Schutzgruppe die Lipophilie der geschützten Verbindung um ein Vielfaches erhöht und zum Anderen das Absorptionsmaximum der Maske und somit die Spaltwellenlänge in einen für Zellen nicht schädlichen Bereich von über 350 nm zu verschieben. Diese beiden Voraussetzungen an die herzustellende lipophile photolabile Schutzgruppe sollten durch die Substitution am aromatischen Systems mit langkettigen Ethern erfüllt werden. Um die anschließende lichtinduzierte Freisetzung des ATPs mit dieser neuartigen photolabilen Maske einzuordnen und zu vergleichen, sollten auch verschiedene bekannte und etablierte lichtspaltbare Gruppen zur Maskierung des  $\gamma$ -Phosphat von ATP verwendet werden. Als einfachster Vergleich sollte dabei die 2-Nitrobenzylgruppe verwendet werden, sowie das entsprechende Derivat mit einer bzw. mit zwei Methoxygruppen. Darüber hinaus soll jedoch nicht nur verschiedene substituierte aromatische Ringsysteme hergestellt werden, sondern auch entsprechende Vergleichsverbindungen ausgehend von Acetophenonderiva-

ten dargestellt werden. Durch die in Acetophenonderivaten vorhandene Methylgruppe in der Benzylposition sollte die lichtinduzierte Abspaltung beschleunigt und die Bildung des dabei freiwerdenden reaktiven Nitrosobenzaldehyds vermieden werden, da ein weniger reaktives Keton gebildet wird (vgl. Abschnitt 2.4, S. 22).<sup>[91]</sup> Durch die Modifikation der Benzylposition mit der Methylgruppe wird jedoch ein neues Stereozentrum generiert, welches die Analytik und Reinigung der entsprechenden Derivate durch die Bildung komplexer Diastereomerengemische erschweren kann. Die verschiedenen durch Licht spaltbaren Masken, welche für diese Arbeit dargestellt werden sollen, sind in Abbildung 24 dargestellt.



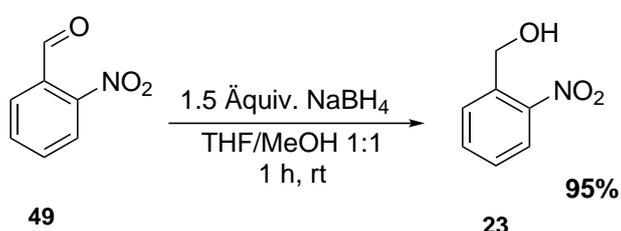
**Abbildung 24:** Strukturformeln der in dieser Arbeit herzustellenden photolabilen Schutzgruppen basierend auf dem 2-Nitrobenzyl-Grundgerüst. Unter den Strukturformeln ist die in der Arbeit verwendete Kurzbezeichnung für die jeweilige Schutzgruppe angeführt. (NB: Nitrobenzyl; NV: Nitroveratryl; MeNV: Methyl-nitroveratryl; lip: lipophil)

Die Synthese der unterschiedlichen photolabilen Masken erfolgt ausgehend von verschiedenen kommerziell erhältlichen Ausgangsverbindungen, wodurch die jeweiligen Syntheseschritte zu den in Abbildung 24 dargestellten Alkoholen nicht einheitlich sind. Generell kann jedoch festgehalten werden, dass der letzte Syntheseschritt immer die Reduktion der Carbonylfunktion zum entsprechenden Alkohol ist. In den vorherigen Schritten

wird dagegen, abhängig von der Startverbindung, die Ethergruppen durch eine klassische WILLIAMSON-Ethersynthese und/oder die Nitrogruppe durch eine Nitrierung eingeführt. Die Synthesen der jeweiligen Alkohole werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

#### 4.1.1 Synthese von 2-Nitrobenzylalkohol **23** (NB)

Die Darstellung des 2-Nitrobenzylalkohols **23** erfolgte ausgehend von 2-Nitrobenzaldehyd durch die Reduktion mit Natriumborhydrid in einem protischen Lösungsmittelgemisch.



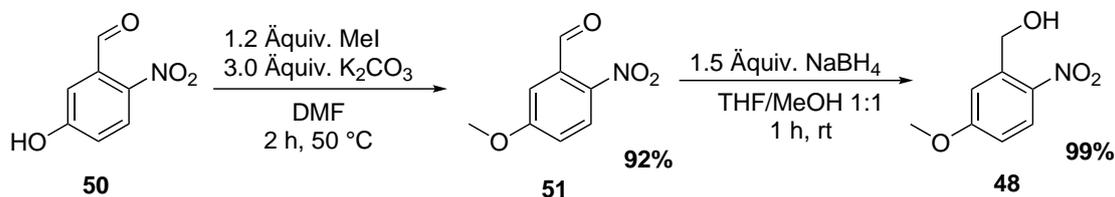
**Abbildung 25:** Synthese von 2-Nitrobenzylalkohol **23**.

Der gewünschte Alkohol konnte in einer annähernd quantitativen Ausbeute von 95 % erhalten werden. Eine weitere Reinigung neben dem Waschen mit Wasser zur Entfernung der Borsalze war nicht notwendig. Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass alle in dieser Arbeit hergestellten 2-Nitrobenzylalkohole unabhängig von den Substituenten in der Benzylposition oder am aromatischen Ringsystems empfindlich auf Licht reagieren und sich langsam durch die in Abschnitt 2.4.1 (Seite 26) angesprochene photoinduzierte Umlagerung in das Nitrosoderivat umwandeln. Es ist daher unbedingt zu empfehlen, die entsprechenden Alkohole unter Lichtausschluss zu lagern und dem Tageslicht nicht länger als unbedingt nötig auszusetzen. Aus diesem Grund wurden die unterschiedlichen 2-Nitrobenzylalkohole auch stets aus den entsprechenden Carbonylverbindungen durch eine Reduktion dargestellt und nicht etwa auf kommerzielle Derivate zurückgegriffen, welche bereits länger lagerten.

#### 4.1.2 Synthese von 5-Methoxy-2-nitrobenzylalkohol **48** (OMeNB)

Die Synthese von 5-Methoxy-2-nitrobenzylalkohol **48** war ausgehend vom kommerziell erhältlichen 5-Hydroxy-2-nitrobenzaldehyd **50** durch die Veretherung der phenolischen

Hydroxygruppe mit Methyljodid und der anschließenden Reduktion der Aldehydfunktion möglich.

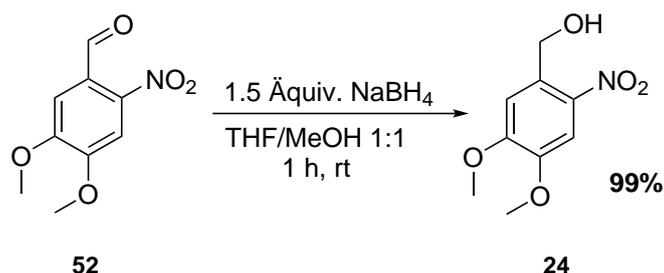


**Abbildung 26:** Synthese von 5-Methoxy-2-nitrobenzylalkohol **48** durch Veretherung und Reduktion der kommerziell erhältlichen Ausgangsverbindung **50**.

Die Ethersynthese zur Verbindung **51** erfolgte in einer sehr guten Ausbeute von 90%. Im Vergleich zu später in dieser Arbeit durchgeführten Ethersynthesen konnte in diesem Fall ein vollständiger Umsatz bereits nach zwei Stunden beobachtet werden. Die kurze Reaktionszeit ist auf die hohe Reaktivität des verwendeten Methyljodids sowie auf die hohe Acidität des verwendeten Phenols zurückzuführen. Durch die vorhandene Nitrogruppe in *para*-Position und der ebenfalls vorhandenen Aldehydfunktion in *meta*-Position zur phenolischen Hydroxygruppe kann diese entsprechend leicht deprotoniert werden, da die entstehende negative Ladung sehr gut stabilisiert wird. Die im Anschluss durchgeführte Reduktion des Aldehyds mit Natriumborhydrid zum Alkohol **48** konnte mit quantitativen Ausbeuten durchgeführt werden.

#### 4.1.3 Synthese von 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzylalkohol **24** (NV)

Die Synthese von 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzylalkohol **24** erfolgte durch die Reduktion der kommerziell erhältlichen Verbindung 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzaldehyd **52**. Die Synthese ist in Abbildung 27 dargestellt.



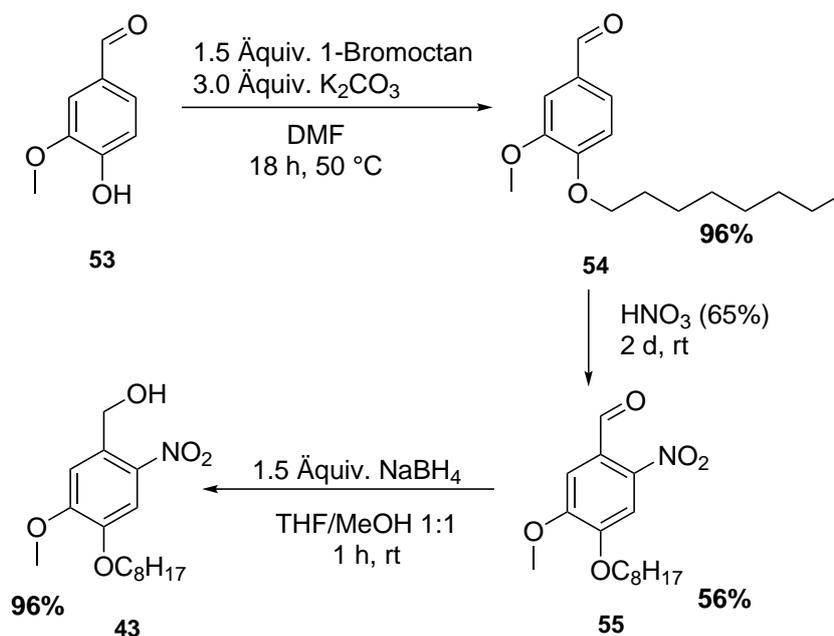
**Abbildung 27:** Synthese von 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzylalkohol **24**.

Der gewünschte Alkohol konnte in einer quantitativen Ausbeute erhalten werden. Die in Abschnitt 4.1.1 erläuterte Lichtempfindlichkeit konnte bei dieser Verbindung sogar verstärkt beobachtet werden. Durch die Substitution des aromatischen Systems durch die beiden Donorsubstituenten und der damit verbundenen bathochromen Verschiebung des Absorptionsspektrums ist die erhöhte Lichtempfindlichkeit der Verbindung **24** im Vergleich zum NB-Alkohol **23** zu erklären. Trotz der erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Tageslicht konnten Synthesen mit der Verbindung **24** ohne Ausschluss von Licht erfolgen. Der Feststoff sollte jedoch wie in Abschnitt 4.1.1 erwähnt, strikt unter Lichtausschluss gelagert werden, um eine Zersetzung zu vermeiden.

#### 4.1.4 Synthese von 5-Methoxy-2-nitro-4-octanoxybenzylalkohol **43** (*lipNV*)

Die Darstellung der lipophilen, lichtspaltbaren Schutzgruppe erfolgte ausgehend von Vanillin **53**, welches in größeren Mengen kostengünstig kommerziell erhältlich ist. Die Syntheseschritte zur Darstellung des photolabilen und lipophilen Benzylalkohols **43** sind in Abbildung 28 dargestellt. Um die Lipophilie der photolabilen Schutzgruppe zu steigern wurde im ersten Syntheseschritt die phenolische Hydroxygruppe des Vanillins **53** mit 1-Bromooctan verethert. Das entsprechend lipophile Produkt konnte in einer fast quantitativen Ausbeute erhalten werden. Im Vergleich zur Synthese des Ethers **51** (vgl. Abbildung 26) musste die hier durchgeführte Veretherung bis zu einem vollständigen Umsatz signifikant länger gerührt werden, da das Phenol durch den Methoxysubstituenten und der nicht vorhandenen Nitrogruppe weniger acide als das zuvor verwendete 5-Hydroxy-2-nitrobenzaldehyd **50** ist. Zudem wurde in dieser Synthese auch das weniger reaktive Alkylbromid statt dem Alkyljodid eingesetzt.

Im nächsten Syntheseschritt sollte das lipophile Vanillinderivat **54** in der *ortho*-Position



**Abbildung 28:** Synthese von 5-Methoxy-2-nitro-4-octanoyloxybenzylalkohol **43** ausgehend von kommerziell erhältlichem Vanillin **53**.

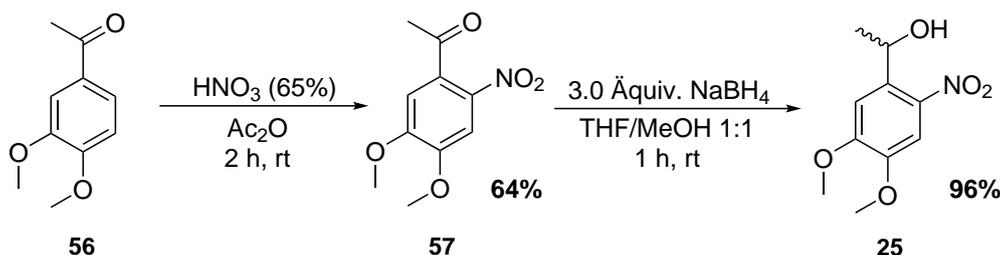
nitriert werden. Die Schwierigkeit bei dieser Reaktion lag zunächst dabei, die richtige Nitrierungsbedingung zu ermitteln, um das Produkt in möglichst guten Ausbeuten zu erhalten. Es galt dabei Nitrierungen mehrerer oder anderer Positionen zu vermeiden. Zunächst wurde versucht das Etherderivat **54** mit klassischer Nitriersäure zu nitrieren, dass gewünschte Produkt konnte auf diesem Wege jedoch nicht erhalten werden. Stattdessen konnte nach säulenchromatographischen Reinigung eine Verbindung erhalten werden, welche im  $^1H$ -NMR kein Aldehydsignal aufwies und darüber hinaus nur zwei Singulets im aromatischen Signalbereich aufwies. Daraus kann geschlossen werden, dass vermutlich zunächst eine Nitrierung in der gewünschten *ortho*-Position erfolgte und anschließend, begünstigt durch die erste Nitrogruppe, der Aldehyd vermutlich durch die stark oxidierende Wirkung der Nitriersäure oxidiert wurde und in eine *ipso*-Substitution unter Substitution einer Nitrogruppe decarboxylierte, sodass ein zweifach nitriertes Produkt erhalten wurde, welches das Substitutionsmuster mit zwei nicht miteinander kopelnden Protonen erklären würde. Für die Decarboxylierung spricht ebenso die Abwesenheit eines Carbonylkohlenstoffatoms im  $^{13}C$ -NMR Spektrum. Dasselbe Ergebnis konnte auch bei der Nitrierung von Vanillin **53** in Nitriersäure beobachtet werden. Bei

diesem Versuch konnte jedoch die sofortige Bildung nitroser Gase beobachtet werden, welche bei der Nitrierung des Etherderivats erst später beobachtet werden konnten. Dieser Umstand ist vermutlich auf die höhere Elektronendichte durch das Phenol im Vergleich zum Ether zurückzuführen. Nachdem das gewünschte Produkt somit nicht durch die Nitrierung mit Nitriersäure isoliert werden konnte, wurde die Nitrierung in verdünnter Salpetersäure ohne die Zugabe von Schwefelsäure versucht. Bei diesem Reaktionsansatz konnte jedoch keinerlei Umsatz beobachtet werden, da die Konzentration an Nitroniumionen vermutlich zu gering war. Die Umsetzung zum gewünschten Produkt gelang anschließend jedoch durch die Umsetzung mit konzentrierter Salpetersäure und einer Reaktionszeit von zwei Tagen. Das Produkt konnte unter diesen Bedingungen in Ausbeuten von bis zu 56 % isoliert werden. Als Nebenprodukt konnte jedoch wieder zu einem großen Teil die zweifach nitrierte Verbindung isoliert werden. Ein Verkürzen der Reaktionszeit hat jedoch vermutlich keinen signifikant positiven Einfluss auf die Ausbeute, da erst nach zwei Tagen ein vollständiger Umsatz des Edukts beobachtet werden konnte. Die Charakterisierung des gewünschten Regioisomers erfolgte dabei durch das  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum, da auch hier zwei nicht koppelnde aromatische Protonen beobachtet werden konnten. Im Gegensatz zum Nebenprodukt konnte jedoch die Aldehydfunktion sowohl im  $^1\text{H-NMR}$  als auch im  $^{13}\text{C-NMR}$  beobachtet werden.

Als abschließender Syntheseschritt zur Darstellung der lipophilen, photospaltbaren Maske wurde der Aldehyd **55** mit Natriumborhydrid zum Alkohol **43** reduziert. Wie in den vorherigen Reduktionen konnte auch hier eine annähernd quantitative Ausbeute erreicht werden.

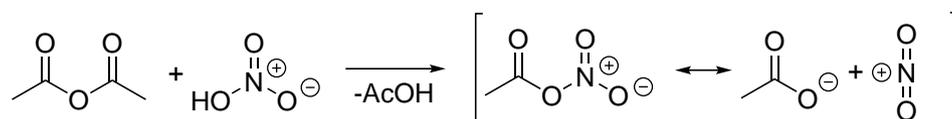
### 4.1.5 Synthese von 1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)ethan-1-ol **25** (MeNV)

Die Darstellung der Verbindung **25** erfolgte durch Nitrierung und anschließender Reduktion des Ketons mit Natriumborhydrid ausgehend vom kommerziell erhältlichen 3,4-Dimethoxyacetophenon **56**.



**Abbildung 29:** Synthese von *rac*-1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)ethan-1-ol **25** ausgehend von dem kommerziell erhältlichen Acetophenonderivat **56**.

Bei der Nitrierung des Vanillinderivats **54** zeigte sich, dass die verwendeten aromatischen Verbindungen trotz der deaktivierenden Carbonylfunktion relativ elektronenreich sind und bei der Nitrierung daher auch verstärkt das zweifach nitrierte Produkt erhalten wird. Aus diesem Grund sollte bei dem hier verwendeten Acetophenonderivat **56** eine mildere Nitrierungsmethode angewendet werden. Dazu wurde bei 0 °C konz. Salpetersäure mit Essigsäureanhydrid gemischt und das Edukt gelöst in Essigsäureanhydrid langsam unter Eiskühlung zugetropft. Durch das Mischen von Salpetersäure mit Essigsäureanhydrid entsteht Acetylnitrat, welches formell als gemischtes Anhydrid aus Essigsäure und Salpetersäure aufgefasst werden kann. In Lösung kann Acetylnitrat jedoch eher als dissoziiertes Ionenpaar in der Form des Acetations und dem Nitroniumkation aufgefasst werden (Abb. 30).<sup>[111, 112]</sup>

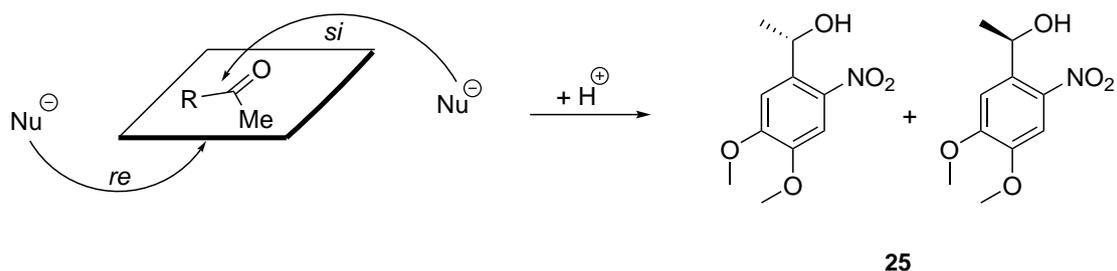


**Abbildung 30:** Darstellung der *in situ* Bildung von Acetylnitrat durch die Reaktion von Salpetersäure mit Essigsäureanhydrid.

Durch die vergleichsweise hohe Konzentration an Nitroniumionen im Vergleich zur konzentrierten Salpetersäure konnte ein vollständiger Umsatz der Ausgangsverbindung **56** bereits nach zwei Stunden beobachtet werden, statt wie beim Vanillinderivat **54** erst nach zwei Tagen. Es konnte jedoch auch bei dieser Reaktion die Bildung des nicht gewünschten *meta*-Regioisomers sowie die Bildung eines zweifach nitrierten Produkts beobachtet werden. Die Bildung des zweifach nitrierten Produkts konnte jedoch durch die konsequente Kühlung auf maximal 5 °C und einer noch langsameren Zugabe des gelös-

ten Edukts minimiert werden. Es gelang zudem das gewünschte Regioisomer **57** selektiv durch eine Umkristallisierung aus Wasser und Ethanol in Form von gelben Nadeln und in Ausbeuten von 60-70 % zu isolieren, wodurch auf eine aufwendige säulenchromatographische Reinigung der gebildeten Regioisomere verzichtet werden konnte. Darüber hinaus konnte die Reaktion auch im größeren Maßstab mit bis zu 12 g des Acetophenons **56** erfolgreich durchgeführt werden, wodurch die Synthese der MeNV-Maske auch im größeren Maßstab effektiv erfolgen kann.

Im zweiten Syntheseschritt musste das Keton zum entsprechenden sekundären Alkohol reduziert werden. Im Vergleich zu den bisher reduzierten Aldehyden ist das Keton deutlich unreaktiver, wodurch die Äquivalente an Natriumborhydrid verdoppelt wurden. Die Reaktionszeit war trotz des deutlichen Überschusses an Reduktionsmittel etwa doppelt solange wie bei dem vergleichbaren Aldehyd **52**. Der gewünschte Alkohol konnte jedoch trotzdem in einer quantitativen Ausbeuten isoliert werden. Wie in Abbildung 31 dargestellt kann die Reduktion des Ketons jedoch sowohl von der *re*- als auch von der *si*-Seite erfolgen, wodurch ein racemisches Gemisch erhalten wird.



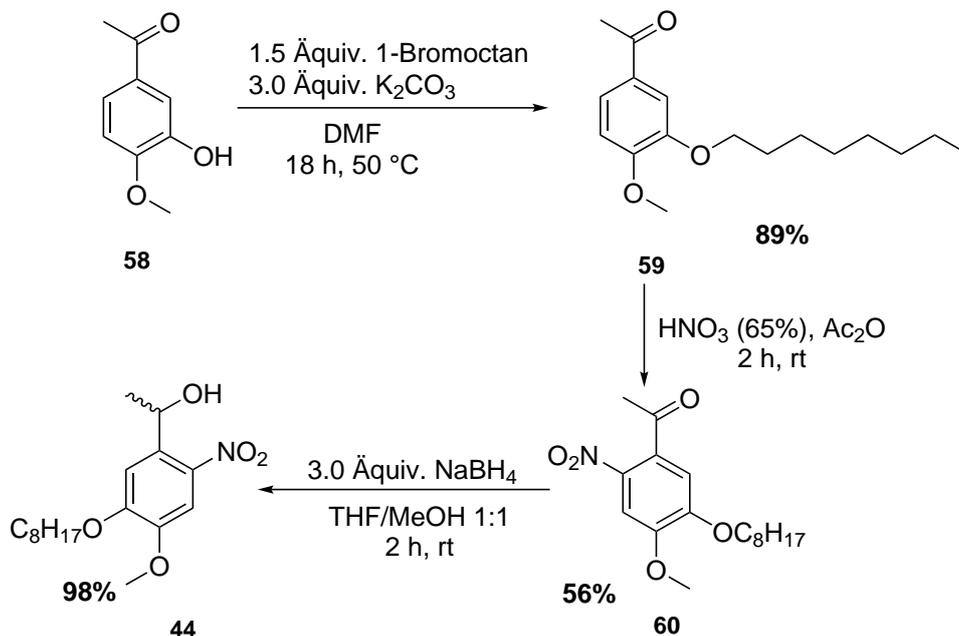
**Abbildung 31:** Bildung des racemischen Gemisches von Verbindung **25** durch die nicht enantioselektive Reduktion mit Natriumborhydrid.

Eine Trennung der Enantiomere oder eine enantioselektive Reduktion des Ketons wurde nicht durchgeführt, weswegen das Enantiomergemisch in dieser Arbeit als eine Verbindung aufgeführt wird. Eine enantioselektive Reduktion wäre jedoch theoretisch mit der Corey-Bakshi-Shibata Reduktion realisierbar, bei welcher eine katalytische Menge eines Bor-haltigen chirales Auxiliars auf Basis der Aminosäure Prolin verwendet wird, um die Stereoselektivität der Reduktion zu steuern.<sup>[113]</sup> Diese Reaktionen wurden hier jedoch nicht angewendet, da die entsprechenden Katalysatoren verhältnismäßig teuer sind und die Konfiguration des Stereozentrums keinen Einfluss auf die lichtinduzierte

Abspaltung der Schutzgruppe haben sollte.<sup>[91]</sup> Der einzige nennenswerte Nachteil dieses Stereozentrums ist die spätere Bildung von komplexen Diastereomergemischen nach Kupplung an das ADP bzw. bereits bei der Kupplung von zwei MeNV-Masken an ein Phosphoratom zur Bildung des entsprechenden Amidits oder *H*-Phosphonats. Durch diese Diastereomergemische wird die Reinigung und Analytik zum Teil deutlich erschwert, da die Retentionszeiten der einzelnen Diastereomere leicht verschieden sind und die Charakterisierung durch NMR-Spektroskopie durch die zum Teil überlagernden Signale im <sup>1</sup>H- und <sup>31</sup>P-NMR erschwert wird.

#### 4.1.6 Synthese von 1-(4-Methoxy-2-nitro-5-octanoxyphenyl)ethan-1-ol **44** (*lipMeNV*)

Angelehnt an die lipophile Schutzgruppe **43** basierend auf dem Vanillin Grundgerüst sollte zudem eine äquivalente lipophile Schutzgruppe mit einer Methylgruppe in der Benzylposition dargestellt werden. Die Synthese konnte ausgehend von 3-Hydroxy-4-methoxyacetophenon **58** realisiert werden.

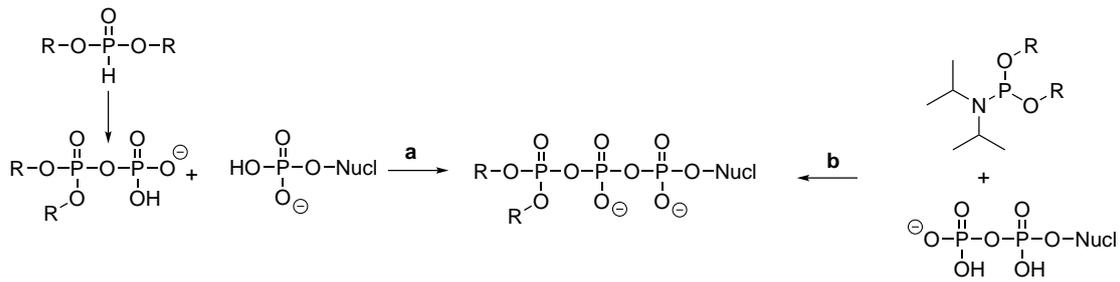


**Abbildung 32:** Synthese von *rac*-1-(4-Methoxy-2-nitro-5-octanoxyphenyl)ethan-1-ol **44** ausgehend von kommerziell erhältlichen 3-Hydroxy-4-methoxyacetophenon **58**.

Die Darstellung der lipophilen Schutzgruppe ausgehend vom Acetophenonderivat **58** ist stark an die Synthese der lipophilen Schutzgruppe ausgehend von Vanillin angelehnt. Zunächst wurde die freie phenolische Hydroxygruppe in einer sehr guten Ausbeute von 89% mit *n*-Bromoctan verethert und anschließend nitriert. Nachdem die MeNV-Maske **25** durch die Nitrierung mit dem *in situ* erzeugten Acetylnitrat effektiv dargestellt werden konnte, wurde diese Nitrierungsvariante auch in dieser Syntheseroute verwendet. Aufgrund der hohen Lipophilie des Ethers **59** konnte dieser jedoch nur in einem deutlichen Überschuss Essigsäureanhydrid gelöst werden. Das nitrierte Produkt **57** konnte jedoch in vergleichbaren Ausbeuten und Reaktionszeiten wie die Verbindung **55** erhalten werden. Die anschließende Reduktion zum racemischen, sekundären Alkohol konnte erneut in quantitativen Ausbeuten erreicht werden. Die Darstellung eines entsprechenden Derivats mit einer zusätzlichen Methylgruppe in der Benzylposition und dem Octylether in der *para*-Position, wie bei dem Vanillinderivat **43**, war aufgrund der nicht vorhandenen kommerziellen Verfügbarkeit des entsprechenden Acetophenonderivats nicht möglich. Daher wurde auf das kommerziell erhältliche 3-Hydroxy-4-methoxyacetophenon **58** zurückgegriffen, da es für die anschließende photolytische Spaltung der Schutzgruppe keinen Unterschied machen sollte in welcher Position der Octylether substituiert ist.

### **4.2 Synthese von phosphorhaltigen *caged*-Verbindungen als Kupplungsbausteine für die Synthese von $\gamma$ -Bis-*caged*-ATP**

Für die Darstellung von geschützten Nucleosidmono-, -di-, und -triphosphaten wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits mehrere Syntheseansätze entwickelt. Die Entwicklung startete dabei ausgehen von dem bereits erläuterten *cycloSal*-Konzept für die Darstellung von maskierten Nucleosidmonophosphaten und der anschließenden Entwicklung des DiPPro- und TriPPPro-Konzepts zur lipophilen Maskierung von Nucleosiddi- und triphosphaten.<sup>[67, 76, 114]</sup> Aufbauend auf diesen Entwicklungen lassen sich  $\gamma$ -maskierte Nucleosidtriphosphate effektiv durch die Kupplung von Nucleosiddiphosphaten mit Phosphoramiditen bzw. aus Nucleosidmonophosphaten mit Hilfe der *H*-Phosphonatroute darstellen.



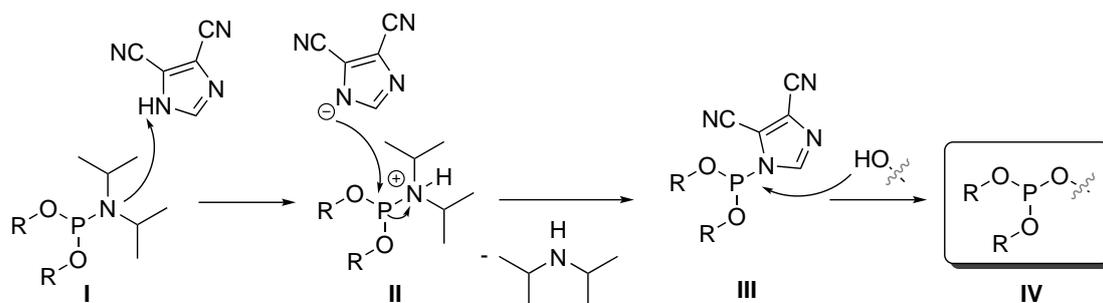
**Abbildung 33:** Schematische Abbildung der Synthesewege zur Darstellung von  $\gamma$ -maskierten Nucleosidtriphosphaten über die *H*-Phosphonatroute (a) und die Phosphoramiditroute (b).

Um den notwendigen Syntheseschritt vom *H*-Phosphonat zum entsprechenden Diphosphatreagenz zu umgehen, sollte in dieser Arbeit die Phosphoramidit-Route den Vorzug gegenüber der *H*-Phosphonatroute erhalten. Die Amiditroute hat jedoch gegenüber der *H*-Phosphonatroute tendenziell den entscheidenden Nachteil, dass das benötigte Nucleosiddiphosphat zunächst, abhängig vom Nucleosid, mehr oder weniger aufwendig synthetisiert werden muss. Adenosindiphosphat ist jedoch kommerziell erhältlich, wodurch die Vorteile der Amiditroute überwiegen und diese in der vorliegenden Arbeit Anwendung finden sollte. Im Folgenden wird die Synthese der entsprechenden Amidite näher erläutert.

#### 4.2.1 Synthese von *caged*-Phosphoramiditen

Phosphoramidite haben sich in der Vergangenheit als effektive, vielseitige und meist relativ einfach herzustellende Vorläuferverbindungen für die Synthese von phosphorhaltige Substanzen erwiesen. So werden Amidite zum Beispiel in der automatisierten Oligonucleotidsynthese oder auch in der asymmetrischen Katalyse als chirale Liganden in Übergangsmetallkomplexen zum enantioselektiven Aufbau von Stereozentren durch das Knüpfen neuer C-C-Bindungen eingesetzt.<sup>[115]</sup> Bei der Synthese von phosphorhaltigen Substanzen zeichnen sich Amidite durch ihre hohe Reaktivität, der damit verbundenen schnellen Reaktionsgeschwindigkeit sowie einer leichten Oxidierbarkeit zur Phosphor(V)spezies aus. Durch diese Eigenschaften werden Amidite zum Beispiel sehr effektiv bei der bereits erwähnten automatisierten Festphasensynthese von Oligonucleotiden verwendet, da hier schnelle Kupplungsraten und quantitative Ausbeuten essentiell sind, um das Oligonucleotid in guten Ausbeuten zu erhalten.<sup>[116, 117]</sup> Der große Vorteil von

Phosphoramiditen ist es, dass die Verbindungen erst nach entsprechender Zugabe eines Aktivators Kupplungsreaktionen eingehen. Während andere P(III)-Verbindungen wie Phosphortrichlorid bereits ohne Aktivator mit Alkoholen reagieren, müssen Phosphoramidite zunächst mit einem aciden Aktivator protoniert werden, um eine gute Abgangsgruppe zu generieren. Der genaue Mechanismus der säurekatalysierten Amiditkupplung ist dabei nicht vollends aufgeklärt. In der Theorie sind verschiedene Mechanismen denkbar und verschiedene Intermediate konnten je nach Untersuchungsmethode und Abgangsgruppe beobachtet werden. Die Reaktion an Phosphor(III)spezies kann dabei theoretisch über einen dissoziativen  $S_N1$ -Mechanismus oder über einen pentavalenten  $S_N2$  Mechanismus erfolgen. Ein Additions-Eliminierungsmechanismus ist aufgrund der leeren d-Orbitale jedoch auch denkbar.<sup>[118]</sup> Der dabei für Phosphoramidite angenommene Mechanismus ist in Abbildung 34 dargestellt.

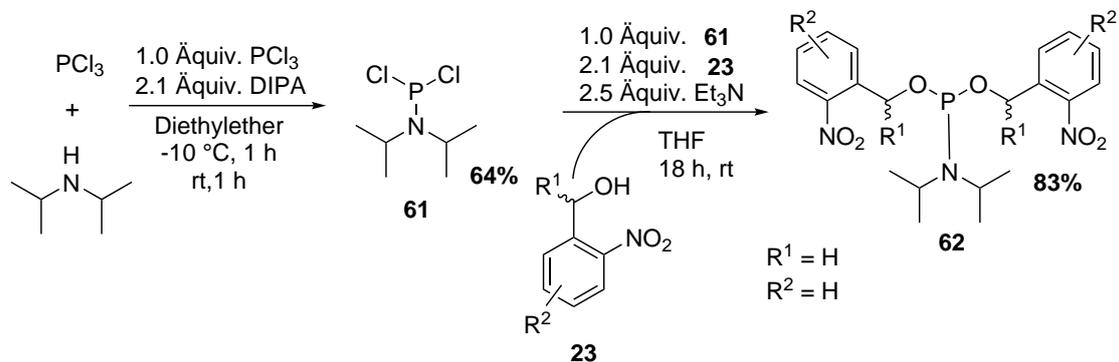


**Abbildung 34:** Postulierter Mechanismus der säurekatalysierten Kupplung von Phosphoramiditen mit einem Nucleophil.<sup>[118]</sup>

Das exemplarische Phosphoramidit **I** in Abbildung 34 wird im ersten Schritt durch eine schwach acide Verbindung protoniert. In dem gezeigten Beispiel dient Dicyanoimidazol (DCI) als Aktivator. Die Wahl des Aktivators erfolgt dabei je nach Anwendung, da die Anforderungen an den Aktivator entsprechend unterschiedlich sind. Im Idealfall ist der Aktivator kostengünstig, gut im jeweiligen Lösungsmittel löslich, ausreichend acide und nicht toxisch. Für die ersten Amiditkupplungen wurde als Aktivator Tetrazol verwendet, welches jedoch im ungelösten Zustand explosiv sein kann und für einige Anwendungen auch zu acide ist, wodurch zum Beispiel säurelabile Tritylgruppen ungewollt gespalten werden können.<sup>[119]</sup> Aus diesen Gründen wurden weitere Alternativen publiziert, darunter auch das in dieser Arbeit verwendete DCI und Pyridinium-Trifluoroacetat (PyTFA). Durch die Protonierung des Stickstoffatoms wird die *N,N*-Diisopropylamino-Gruppe in eine ex-

zellente Abgangsgruppe überführt, welche durch das DCI-Anion substituiert wird. Das kovalent gebundene DCI bildet im Vergleich zum vorherigen Aminsubstituenten eine bessere Abgangsgruppe, da die entstehende negative Ladung mesomeriestabilisiert ist. Das Derivat **III** kann somit leicht mit einem Nucleophil umgesetzt werden. Handelt es sich bei diesem Nucleophil um einen Alkohol, wird das Phosphit **IV** erhalten. Durch eine anschließende Oxidation des Phosphits durch geeignete Oxidationsmittel, wie elementarem Iod, Sauerstoff oder organischen Oxidationsmitteln wie *tert*-Butylhydroperoxid, kann dieses Phosphit in ein Phosphat überführt werden. Auf diesem Wege ist somit die Synthese von entsprechend geschützten Nucleosidtriphosphaten durch die Kupplung von Amiditen an das  $\beta$ -Phosphat eines Nucleosiddiphosphats möglich.

Die Synthese der für diese Kupplung benötigten symmetrischen Amidite ist ausgehend von Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **61** möglich, welches durch die Reaktion von Phosphortrichlorid mit *N,N*-Diisopropylamin erhalten wird. Die Reaktion zu den entsprechenden symmetrischen Amiditen ist beispielhaft für die Darstellung des Amidits **62** in Abbildung 35 dargestellt.



**Abbildung 35:** Synthese des symmetrischen Phosphoramidits **62** ausgehend vom 2-Nitrobenzylalkohol **23** und der Dichlorverbindung **61**. Die Reaktionsgleichung zum Amidit ist beispielhaft für das Derivat **62** dargestellt, gilt jedoch für alle symmetrischen Amidite, die entsprechenden Reste  $\text{R}^1$  und  $\text{R}^2$  sind für diese Fälle in Tabelle 1 auf Seite 52 aufgeführt.

Die erreichten Ausbeuten für die hergestellten symmetrischen Amidite, welche nach der in Abbildung 35 dargestellten Synthese hergestellt wurden, sind in Tabelle 1 auf Seite 52 aufgeführt.

**Tabelle 1:** Übersicht über die durchgeführten Synthesen zur Darstellung der symmetrischen Phosphoramidite.

#	2-Nitrobenzylderivat	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Amidit	Ausbeute [%]
1	<b>23</b>	H	H	<b>62</b>	83
2	<b>50</b>	H	5-OMe	<b>63</b>	90
3	<b>24</b>	H	4,5-OMe	<b>69</b>	92
5	<b>43</b>	H	4-OC <sub>8</sub> H <sub>17</sub> , 5-OMe	<b>70</b>	88
6	<b>25</b>	CH <sub>3</sub>	4,5-OMe	<b>64</b>	- *
7	<b>45</b>	CH <sub>3</sub>	4-OMe, 5-OC <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	<b>65</b>	- *

\* Das gewünschte Produkt konnte nicht isoliert werden.

Die Darstellung der symmetrischen Amidite ausgehend von den entsprechenden 2-Nitrobenzylalkoholen konnte in guten bis sehr guten Ausbeuten zwischen 83-92 % realisiert werden. Es zeigte sich jedoch, dass die erhaltenen Phosphoramidite nur bedingt lagerbar sind. Während das unsubstituierte Derivat **62** sich auch nach längerer Lagerung von über zwei Jahren bei –20 °C als stabil zeigte, zeigten die substituierten Derivate, im besonderen das lipophile Derivat **70**, eine deutlich geringere Stabilität. Darüber hinaus konnte auch eine Zersetzung aller hergestellter Amidite bei längerer Lagerung im Tageslicht, sowohl in Form des Feststoffs als auch in Lösung, beobachtet werden. Im Feststoff konnte diese Zersetzung durch eine Färbung von Gelb über Orange beobachtet werden, während in Lösung eine Verdunklung bis zur gänzlichen Schwarzfärbung beobachtet werden konnte. Eine Charakterisierung der entstandenen Zerfallsprodukte durch <sup>1</sup>H-, <sup>31</sup>P-NMR oder Massenspektrometrie gelang in keinem der hier beschriebenen Fälle.

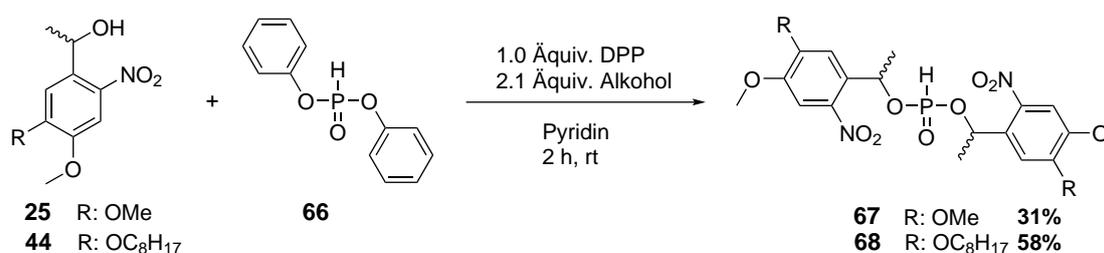
Die Darstellung der methylsubstituierten Amidite ausgehend von den sekundären Alkoholen **25** und **44** gelang auch nach mehreren Darstellungsversuchen nicht (Vgl. Tab. 1, Eintrag 6+7). Vermutlich war die Darstellung dieser Derivate nicht möglich, da die sekundären Alkohole bedingt durch die Methylgruppe sterische anspruchsvoller sind, als die vergleichbaren Benzylalkoholderivate **24** und **43**. In Kombination mit dem ebenfalls sterisch sehr anspruchsvollen *N,N*-Diisopropylaminosubstituenten könnte aufgrund von unvorteilhaften sterischen Wechselwirkungen die entsprechende Substitutionsreaktion des Chlorsubstituenten durch den sekundären Alkohol gehindert sein, da zum Beispiel der entsprechende Angriffswinkel des Nucleophils blockiert ist. Da die Darstellung dieser

Amidite nicht realisiert werden konnte, wurde die Synthese von entsprechenden *H*-Phosphonat-Derivaten ausgehend von den Alkoholen **25** und **44** versucht.

#### 4.2.2 Synthese von *caged-H*-Phosphonaten

Die *H*-Phosphonatroute ist neben der Amidiroute ein weiterer effektiver Syntheseweg zur Darstellung von  $\gamma$ -maskierten Nucleosidtriphosphaten. In vorherigen Arbeiten wurde dabei stets das *H*-Phosphonat mit *N*-Chlorsuccinimid oxidativ chloriert und zunächst mit einem Monophosphatsalz zum entsprechend maskierten Diphosphonatbaustein gekuppelt. Dieses instabile Intermediat wurde anschließend durch die schrittweise Zugabe von Trifluoressigsäureanhydrid und Methylimidazol aktiviert und abschließend mit dem Nucleosidmonophosphat umgesetzt. Diese Vielzahl an Aktivierungsschritten ist notwendig, um die meist aufwendige Synthese und Reinigung des Nucleosiddiphosphats zu vermeiden. Adenosindiphosphat ist jedoch kommerziell erhältlich, wodurch in dieser Arbeit das *H*-Phosphonat nur mit *N*-Chlorsuccinimid oxidativ chloriert werden musste und anschließend direkt mit ADP gekuppelt wurde, um das entsprechend geschützte *caged*-ATP zu erhalten.

Die Darstellung der entsprechenden *H*-Phosphonate erfolgt dabei ausgehend von Diphenylphosphit (DPP). Im basischen Milieu werden die beiden Phenylsubstituenten durch den entsprechenden zugegeben sekundären Alkohol substituiert und das gewünschte *H*-Phosphonat wird gebildet.



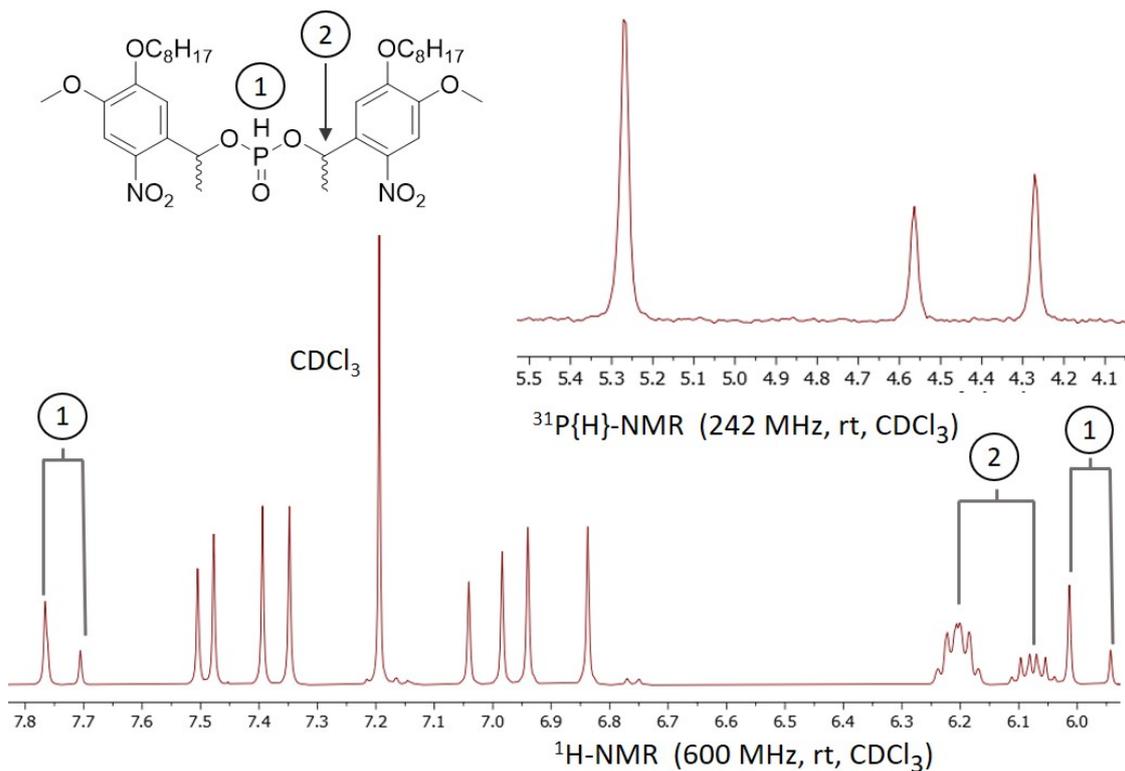
**Abbildung 36:** Darstellung der *H*-Phosphonate **67** und **68** ausgehend von den entsprechenden sekundären Alkoholen durch die Umsetzung mit DPP.

Im Gegensatz zu der Darstellung der entsprechenden Amidite, ausgehend von den sekundären Alkoholen **25** und **44**, konnten die entsprechenden *H*-Phosphonate dargestellt werden. Das MeNV-Derivat **67** konnte in einer Ausbeute von 31 % und das lipophile

MeNV-Derivat **68** in einer Ausbeute von 58 % erhalten werden. In vorangegangenen Arbeiten konnten ebenfalls Ausbeuten zwischen 20 % bis 70 % abhängig vom eingesetzten Alkohol und dessen Lipophilie erreicht werden.<sup>[78, 120]</sup> Im Gegensatz zu den hier dargestellten Verbindungen wurden in den vorangegangenen Arbeiten *H*-Phosphonate überwiegend ausgehend von Benzylalkoholderivaten dargestellt. Es wurden Acyloxybenzylgruppen, die davon abgeleiteten Carbonatverbindungen oder langkettige aliphatische Alkohole verwendet, um symmetrische und asymmetrische Derivate darzustellen.<sup>[121, 122]</sup> Symmetrische *H*-Phosphonate konnten dabei in guten Ausbeuten durch Umkristallisation aus *iso*-Propanol gewonnen werden und asymmetrische Derivate durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit einem Zusatz von Essigsäure, um ein *tailing* der polaren *H*-Phosphonate zu vermeiden und um eine bessere Trennung zu erzielen. Es zeigte sich jedoch, dass diese Reinigungsmethoden bei den hier synthetisierten *caged-H*-Phosphonaten nicht angewendet werden konnten. Das allgemein gute Kristallisationsverhalten von aromatischen Nitroverbindungen konnte während der Darstellung verschiedenster Verbindungen beobachtet werden und wurde zum Beispiel auch bei der Umkristallisation des nitrierten Ketons **57** zur Reinigung nach der Nitrierung ausgenutzt (Vgl. Abs. 4.1.5). Eine Umkristallisation des MeNV-*H*-Phosphonats aus *iso*-Propanol führte jedoch zu einer Zersetzung des Rohprodukts, da in der Siedehitze die MeNV-Gruppen vermutlich durch das *iso*-Propanol substituiert wurden. Bei den bisher in vorangegangenen Arbeiten dargestellten *H*-Phosphonaten handelte es sich stets um Verbindungen ausgehend von primären Alkoholen, welche tendenziell schlechte Abgangsgruppen sind und daher nicht vom *iso*-Propanol substituiert werden können. Die Reaktivität des hier verwendeten sekundären MeNV-Alkohols und des *iso*-Propanols sollten jedoch vermutlich relativ ähnlich sein, wodurch die Zersetzung des Rohprodukts durch eine mögliche Substitution der MeNV Gruppen erklärt werden könnte. Ebenso führte eine säulenchromatographische Reinigung mit einem Zusatz von Essigsäure im Eluentengemisch zur Zersetzung des gewünschten Produkts. Die Zersetzung konnte dabei durch den Farbwechsel von hellgelb nach schwarz beim Entfernen des Lösungsmittels nach der durchgeführten säulenchromatographischen Reinigung beobachtet werden. Durch das Entfernen der leicht flüchtigen Lösungsmittel steigt die Konzentration an Essigsäure, sodass das Produkt am Ende gelöst in Essigsäure vorlag und zu diesem Zeitpunkt der erwähnte Farbumschlag beobachtet werden konnte. Aus diesem Grund wurde die Reinigung an Kieselgel, nach Wiederholung der Reaktion, ohne Essigsäurezusatz und

mit einem Gradienten eines Petrolether/Ethylacetat-Gemisches nach Ethylacetat durchgeführt, um die entsprechenden *caged-H*-Phosphonate zu erhalten. Auf die Wahl von Methanol als polarer Eluent wurde dabei auch aufgrund der zuvor erwähnten potentiellen Substitutionsreaktion verzichtet. Es konnte jedoch auch bei der Verwendung von Petrolether und Ethylacetat eine geringe Zersetzung des *H*-Phosphonats per Dünnschichtchromatographie und auch optisch während der Durchführung der Säulenchromatographie beobachtet werden. Aus diesem Grund konnte das *lipMeNV*-Derivat **68** vermutlich auch in einer besseren Ausbeute isoliert werden, da es aufgrund der höheren Lipophilie schneller gereinigt werden konnte, da die Abtrennung des entstehenden Phenols und des Überschusses an Alkohol leichter durchgeführt werden konnte.

Durch den Einsatz der Racemate der sekundären Alkohole **25** und **44** wurden die jeweiligen *H*-Phosphonate **67** und **68** als ein Gemisch aus jeweils vier Diastereomeren erhalten, welche jeweils zu gleichen Teilen vorliegen müssten.



**Abbildung 37:** Ausschnitte des gemessenen  $^1\text{H}$ - und  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektrum des *lipMeNV* H Phosphonats **68**.

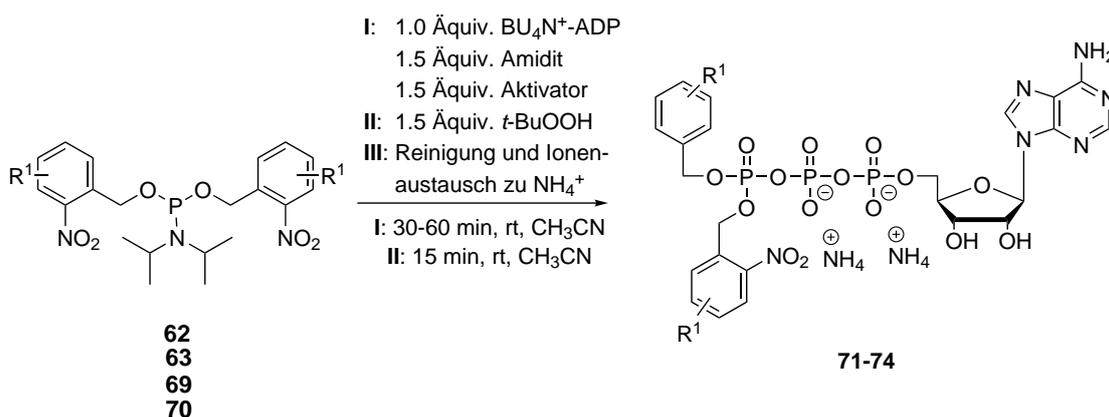
Für die vier möglichen Diastereomere konnten im  $^{31}\text{P}$ -Spektrum drei Signale beobachtet werden. Es ist dabei jedoch anzumerken, dass das Integral des Signal bei 5.3 ppm etwa doppelt so groß ist wie die Integrale der beiden verbleibenden Signale, während diese etwa gleich groß sind. Das könnte darauf deuten, dass sich zwei Diastereomere im  $^{31}\text{P}$ -Spektrum überlagern und somit das größere Signal erklärt werden könnte. Im  $^1\text{H}$ -NMR dagegen konnten sogar nur zwei getrennte Signalsätze beobachtet werden. Durch den Vergleich der Integrale für die in Abbildung 37 mit "1" markierten Dubletts für das Wasserstoffatom, welches direkt am Phosphoratom gebunden ist, zeigt sich wiederum ein Verhältnis von 3:1. Dieses Verhältnis konnte auch für die Signale des Protons der Benzylposition (mit der Zahl 2 markiert) beobachtet werden, welches direkt am Stereozentrum lokalisiert ist. Das Verhältnis von 3:1 spricht erneut für die theoretisch vier möglichen Diastereomere, von denen sich vermutlich drei im  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum überlagern. Dieselbe Aufspaltung und vermutliche Überlagerung der Signale konnte auch für das MeNV-*H*-Phosphonat **67** im  $^1\text{H}$ - und  $^{31}\text{P}$ -NMR beobachtet werden.

### 4.3 Synthese der symmetrischen *caged*-ATP Derivate

Nachdem die dargestellten photolabilen Schutzgruppen erfolgreich in Form eines symmetrischen Amidits oder *H*-Phosphonats an ein Phosphoratom gekuppelt werden konnten, sollte daraufhin die entsprechende Kupplung mit ADP zum *caged*-ATP durchgeführt werden. Dazu wurde das kommerziell erhältliche ADP-Natriumsalz zunächst durch Ionenaustauschchromatographie protoniert und anschließend durch die Zugabe von Tetrabutylammoniumhydroxid-Lösung in das entsprechende Tetrabutylammoniumsalz überführt. Durch den Austausch des Kations von Natrium auf Tetrabutylammonium wird die Lipophilie des ADPs stark erhöht, wodurch dieses in organischen Lösungsmitteln wie Acetonitril oder *N,N*-Dimethylformamid löslich wird. Zudem wird durch den Austausch des Gegenions die Nucleophilie der Phosphatgruppen stark erhöht, da die negativen Ladungen durch den größeren Abstand zwischen der negativen und positiven Ladung, bedingt durch den größeren Ionenradius des Tetrabutylammoniumionen im Vergleich zum kleineren Natriumion, weniger abgeschirmt sind. ADP wird somit durch den Ionenaustausch von einem klassischen Kontaktionenpaar in ein eher solvatgetrenntes Ionenpaar überführt. Die Kupplung erfolgte anschließend durch die Reaktion des ADPs mit dem entsprechend aktivierten Amidit bzw. *H*-Phosphonat. Im Folgenden wird zunächst auf

die Kupplungen mit den Amiditen eingegangen.

Der Mechanismus zur Aktivierung der Amidite und der anschließenden Kupplung ist bereits in Abbildung 34 auf Seite 50 dargestellt. Durch die Zugabe eines geeigneten schwach aciden Aktivators erfolgt die Protonierung des Stickstoffatoms der Diisopropylaminogruppe, welche anschließend vom entsprechenden Anion des Aktivators verdrängt wird. Der nur schwach gebundene Aktivator kann anschließend leicht durch den nucleophilen Angriff des  $\beta$ -Phosphats des ADPs substituiert werden. Das gebildete Phosphit wird daraufhin durch die Zugabe eines Oxidationsmittels zum Phosphat oxidiert. Die Amiditroute zeichnet sich dabei vor allem durch ihre schnellen Reaktionszeiten und potentiellen hohen Ausbeuten aus. Eine allgemeine Darstellung der Synthesebedingungen ist in Abbildung 38 gezeigt. Zur besseren Übersicht ist der gezeigte Rest  $R^1$  sowie die erreichten Ausbeuten in Tabelle 2 aufgeführt.



**Abbildung 38:** Darstellung der symmetrischen *caged*-ATP-Derivate ausgehend von den entsprechenden Amiditen. Die verschiedenen Reste  $R^1$  werden in Tabelle 2 erläutert.

Die in Tabelle 2 angegeben erreichten Ausbeuten sind vergleichbar mit den erzielten Ausbeuten bei vorangegangenen Synthesen von symmetrisch geschützten Nucleosidtriphosphaten.<sup>[79]</sup> Die erreichten Ausbeuten sind dabei durchgehend gut. Besonders zufriedenstellend gelang die Darstellung des simpelsten *caged*-Derivats **71** mit 72 % (Eintrag 1 in Tab. 2). Mit dagegen nur 38 % gelang die Darstellung des lipophilen *caged*-Derivats am schlechtesten. Dass die Darstellung der lipophilen Derivate meist mit vergleichsweise geringeren Ausbeuten gelingt, konnte bereits in den Arbeiten von GOLLNEST beob-

**Tabelle 2:** Übersicht über die durchgeführten Kupplungen zum *caged*-ATP ausgehend von den entsprechenden Amiditen. Die Ausbeute ist immer auf die Annahme bezogen, dass nach dem Ionenaustausch zwei Ammonium-Gegenionen vorliegen.

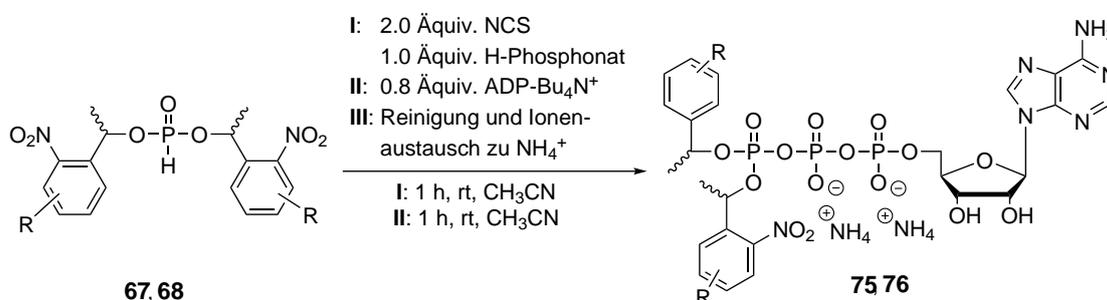
#	Amidit	R <sup>1</sup>	<i>caged</i> -ATP	Ausbeute [%]
1	<b>62</b>	H	<b>71</b>	72
2	<b>63</b>	5-OMe	<b>72</b>	52*
3	<b>69</b>	4,5-OMe	<b>73</b>	60
4	<b>70</b>	4-OC <sub>8</sub> H <sub>17</sub> , 5-OMe	<b>74</b>	38

\* Berechnet mit zwei Triethylammonium Gegenionen.

achtet werden.<sup>[79]</sup> Es wird dabei vermutet, dass bedingt durch die höhere Amphiphilie die Reinigung dieser Derivate erschwert ist und das Löslichkeitsverhalten der Edukte zu unterschiedlich ist, um eine optimale Löslichkeit im verwendeten Lösungsmittel zu garantieren. Durch die hohe Lipophilie der Masken und der hohen Hydrophilie der Phosphatgruppen können sich im Besonderen in wässrigen Medien Mizellen und/oder andere komplexe Aggregate ausbilden. Diese Aggregate erschweren die notwendige Reinigung durch Umkehrphasen-Chromatographie, da die Mizellen anders mit dem Wasser Acetonitril-Gradienten wechselwirken als die separierten bzw. solvatisierten Moleküle. Dadurch ist die Bildung größerer Mischfraktionen möglich und eine scharfe Trennung der einzelnen Substanzen ist während der Reinigung erschwert. Im Kontext dieser Problematik ist die erreichte Ausbeute von 38% ebenfalls als gut aufzufassen. Es zeigte sich jedoch bei allen Synthesen, dass ein quantitativer Umsatz des eingesetzten ADPs trotz eines 1.5-fachen Überschusses an Amidit und Aktivator nicht erfolgte, da ein Teil des ADPs stets reisoliert werden konnte. Es konnte jedoch in den meisten der hier durchgeführten Kupplungen zunächst eine Trübung und die anschließende Bildung eines farblosen Niederschlags beobachtet werden, nachdem der Aktivator zur klaren Lösung des ADP und Amidits in trockenem Acetonitril gegeben wurde. Die Bildung des Niederschlags konnte dabei unabhängig davon beobachtet werden, ob der Aktivator als Feststoff oder als Lösung zugegeben worden ist. Zudem konnte bei der durchgeführten Reinigung durch C<sub>18</sub>-Umkehrphasen-Chromatographie direkt im Anschluss der Reaktion immer ADP reisoliert werden. Eine exakte Angabe über die Menge des isolierten ADPs kann dabei nicht angegeben werden, da das ADP mit einer nicht näher definierbaren

Anzahl verschiedener Gegenionen vorlag und somit die entsprechende Molmasse nicht genau berechnet werden konnte. Die Menge des isolierten ADPs ist jedoch auf circa 10-20 Molprozent schätzbar. Die Trübung der Lösung und das isolierte ADP sprechen dafür, dass durch die Zugabe des Aktivators die Gegenionen des ADPs austauschen und dieses dadurch unlöslich im verwendeten Acetonitril wurde. Durch das Ausfallen steht das ADP nicht mehr für die gewünschte Kupplungsreaktion zur Verfügung, wodurch der nicht vollständige Umsatz erklärt werden könnte. Es wäre denkbar, dass nach der Abspaltung der DIPA-Gruppe dieses protoniert werden könnte und dieses Salz anschließend ebenfalls als Gegenion fungieren könnte. Der Austausch des Gegenions konnte dabei auch bei der Reinigung direkt im Anschluss nach der Reaktion beobachtet werden, da das gewünschte Produktsignal häufig noch kleinere Schultern mit ähnlichen Retentionszeiten aufwies. Diese minimale Änderung der Retentionszeit erfolgt durch die unterschiedlichen Gegenionen oder durch die nicht homogene Anzahl an selben Gegenionen, wodurch die gewünschte Verbindung minimal verschieden eluiert. Darüber hinaus ist zudem auch ein nucleophiler Angriff der exocyclischen Aminofunktion der Nucleobase, der beiden sekundären Hydroxygruppe der Ribose oder des  $\alpha$ -Phosphats am Amidit theoretisch denkbar. Entsprechende Produkte konnten jedoch nicht isoliert werden. Es konnten jedoch in der Regel während der Reinigung mehrere kleine Signale mit zum Produkt abweichenden Retentionszeiten beobachtet werden, welche die charakteristische Absorption des Nitroaromaten aufwiesen. Durch diese Vielzahl an Gründen würde sich erklären lassen, warum die Kupplungen nur in einer durchschnittlichen Ausbeute von 50 % erfolgen konnten. Als Aktivatoren dienten zum Einen zunächst das bereits in vorangegangenen Arbeiten bewährte 4,5-Dicyanoimidazol (DCI, Tab. 2, Eintrag 3-5) und bei später in dieser Arbeit durchgeführten Kupplungen das Pyridinium-Trifluoroacetat (PyTFA, Tab. 2, Eintrag 1-2), welches bei der Darstellung von *caged*-cAMP sehr gute Ergebnisse lieferte (Vgl. Abs. 4.9).<sup>[123]</sup> Zunächst wurde vermutet, dass die bei der Darstellung des NB-ATP **71** erzielte hohe Ausbeute von 72 % durch die Verwendung von PyTFA zu begründen ist, jedoch konnte die Verbindung **72** trotz der Verwendung dieses Aktivators in vergleichbaren Ausbeuten zu den Synthesen isoliert werden in welchen DCI Anwendung fand. PyTFA hat jedoch den entscheidenden Vorteil, dass es im Gegensatz zu DCI sehr gut wasserlöslich ist und bei der im Anschluss zur Reaktion durchgeführten Reinigung direkt mit Wasser eluiert und somit im Vergleich zu DCI leichter abzutrennen ist.

Nachdem die Kupplung der entsprechenden Amidite mit ADP realisiert werden konnte, sollten anschließend die zuvor dargestellten *H*-Phosphonate mit ADP zu den entsprechenden *caged*-ATP Derivaten mit einer Methylgruppe in der Benzylposition gekuppelt werden. Dazu wurde das entsprechende *H*-Phosphonat zunächst durch die Zugabe von zwei Äquivalenten *N*-Chlorsuccinimid oxidativ chloriert und anschließend mit ADP gekuppelt. Auch hier wurde erneut das zuvor hergestellte Tetrabutylammonium-Salz des ADPs verwendet, um das ADP in organischen Lösungsmitteln zu lösen und um die Reaktivität des ADP zu erhöhen. Eine allgemeine Darstellung der Synthesebedingungen ist in Abbildung 39 gezeigt. Der dort gezeigte Rest *R* sowie die erreichten Ausbeuten sind in Tabelle 3 auf Seite 61 zur besseren Übersichtlichkeit aufgeführt.



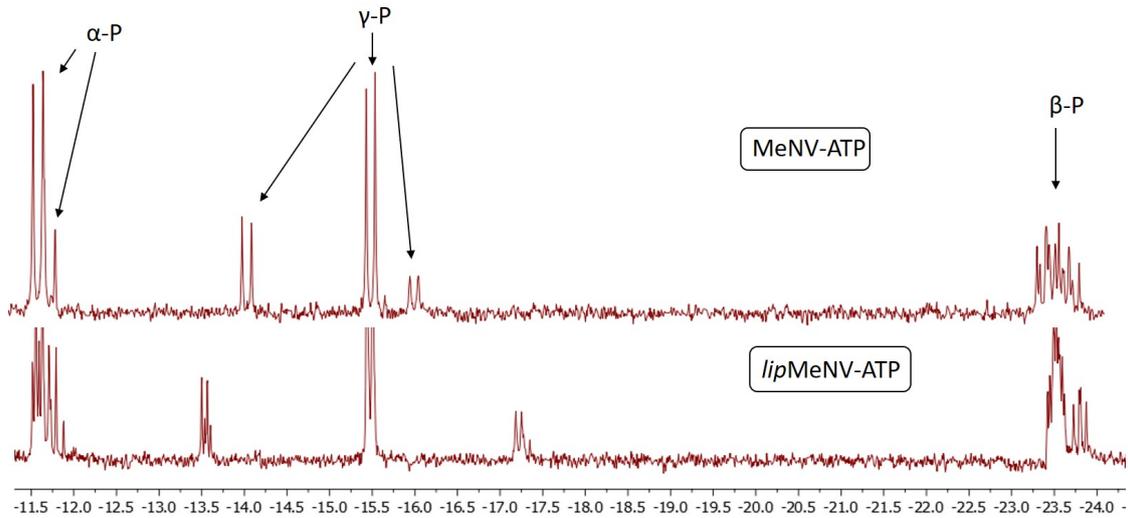
**Abbildung 39:** Darstellung der symmetrischen *caged*-ATP-Derivate ausgehend von den entsprechenden *H*-Phosphonaten.

Die über diesen Syntheseweg erreichten Ausbeuten sind vergleichbar mit den in der Amiditroute erreichten Ausbeuten. Für das weniger lipophile MeNV-ATP **75** wurde eine Ausbeute von 49 % erreicht. Dies entspricht in etwa der Durchschnittsausbeute aller durchgeführten Amiditkupplungen. Die Reaktion zum lipophilen *lip*MeNV-Derivat **76** erfolgte jedoch in einer deutlich geringeren Ausbeute von 23 % und ist vergleichbar mit der ebenfalls niedrigeren Ausbeute von 38 %, welche bei der Synthese des lipophilen *lip*NV-Derivats **74** erreicht wurde. Die erschwerte Reinigung bedingt durch den amphiphilen Charakter der lipophilen Verbindungen spiegelt sich somit auch bei dem Derivat **76** wieder. Im Gegensatz zu den zuvor durchgeführten Kupplungen konnten in keiner der hier durchgeführten Kupplungen ein Ausfallen des eingesetzten ADPs beobachtet werden. Es konnte auch kein überschüssiges ADP bei der Reinigung beobachtet werden. Diese Beobachtung deutet somit auf den bereits vermuteten Austausch des Gegenions bei der Amiditroute, verursacht durch die Zugabe des Aktivators, hin.

**Tabelle 3:** Übersicht über die durchgeführten Kupplungen zum *caged*-ATP ausgehend von den entsprechenden *H*-Phosphonaten. Die Ausbeute ist immer bezogen auf die Annahme, dass nach dem Ionenaustausch zwei Ammonium-Gegenionen vorliegen.

#	Amidit	<i>R</i>	<i>caged</i> -ATP	Ausbeute [%]
1	<b>67</b>	4,5-OMe	<b>75</b>	49
2	<b>68</b>	4-OMe, 5-OC <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	<b>76</b>	23

Weshalb jedoch trotzdem nur ein maximale Ausbeute von 49 % erreicht werden konnte ist unbekannt. Die Aktivierung des *H*-Phosphonats durch das zugegebene NCS erfolgt in der Regel quantitativ, wie in vorangegangenen Arbeiten gezeigt wurde.<sup>[79]</sup> Gegebenenfalls sind auch in diesem Fall ungewollte Nebenreaktionen mit den bereits erläuterten weiteren reaktiven Gruppen des zugegebenen ADPs ein Grund für die niedrige Ausbeute, da das *in situ* hergestellte Chloridat eine hohe Reaktivität gegenüber Nucleophilen aufweist. Während der Reinigung konnten mehrere kleine Signale beobachtet werden, welche jedoch aufgrund ihrer geringen Intensität nicht isoliert bzw. charakterisiert werden konnten. Des Weiteren konnte bei der automatisiert durchgeführten Reinigung der Verbindungen eine starke Verbreiterung des gewünschten Produktsignals, im Vergleich zu den zuvor hergestellten symmetrischen *caged*-ATP Derivaten, beobachtet werden. Diese Verbreiterung ist auf die Vielzahl an gebildeten Diastereomeren zurückzuführen, da die *H*-Phosphonate als Diastereomerengemisch eingesetzt wurden. Die Vielzahl der Diastereomere sowie die Tatsache, dass diese nicht in einem gleichmäßigen Verhältnis vorliegen, führte zu einer erschwerten Reinigung und Analytik. Exemplarisch für dieses Problematik sind in Abbildung 40 die <sup>31</sup>P-NMR Spektren des MeNV-ATP **75** und *lip*MeNV-ATP **76** gezeigt.



**Abbildung 40:** Aufgenommene  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren des MeNV-ATPs **75** und des *lip*MeNV-ATPs **76** nach zwei Reinigungsschritten und dem Ionenaustausch auf Ammonium (oben: 400 MHz, rt, Methanol- $d_4$ ; unten: 600 MHz, rt, Methanol- $d_4$ ).

Aus den gezeigten  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren wird ersichtlich, dass das MeNV-Derivat und das lipophile MeNV-Derivat jeweils als ein komplexes Gemisch an Diastereomeren in verschiedenen Verhältnissen vorliegen. Es können für das  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphoratom mehrere, zum Teil auch überlagernde, Signale beobachtet werden. Für das  $\gamma$ -Phosphoratom kann dabei die größte Streuung der Signale über einen ppm-Bereich von -13.5 bis -17.5 (für das *lip*MeNV-ATP) beobachtet werden. Diese Beobachtung kann durch die Nähe des Phosphoratoms zu den Stereozentren begründet werden und durch die Tatsache, dass das Phosphoratom durch die zwei benachbarten Stereozentren auch chiral ist. Für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphoratomen können dagegen nur überlagernde Signale beobachtet werden, da diese einen größeren Abstand zu den Stereozentren aufweisen und damit über einen kleinen ppm-Bereich streuen. Eine entsprechende Analyse und Auswertung der  $^1\text{H}$ -Spektren gestaltete sich aufgrund der komplexen und auch dort überlagernden Signale als sehr schwierig, wodurch die Identität dieser symmetrisch maskierten ATP-Derivate überwiegend via  $^{31}\text{P}$ -NMR und Massenspektrometrie ermittelt wurde. Durch Kombination dieser beiden Analyseverfahren konnte jedoch mit zufriedenstellender Aussagekraft die Identität der Produkte bestätigt werden. Aufgrund der überlappenden Signale in den NMR-Spektren konnte jedoch keine exakte Bestimmung des Diastereomerenverhältnisses erfolgen.

Schließlich konnten jedoch alle gewünschten *caged*-ATP Derivate entweder über die Amidit- oder die *H*-Phosphonatroute hergestellt und isoliert werden und sollten anschließend in Photolyseexperimenten auf ihre Stabilität und Eigenschaften untersucht werden.

## 4.4 Photolyse der hergestellten *caged*-ATP Derivate

### 4.4.1 Allgemeiner Versuchsaufbau der Photolyse

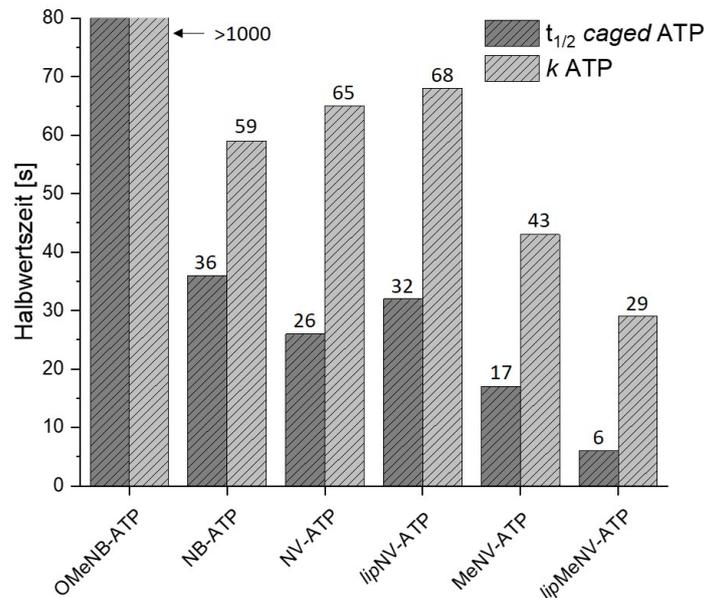
Die lichtinduzierte Freisetzung von ATP aus den jeweiligen *caged*-Derivaten sollte durch entsprechende Bestrahlungsexperimente untersucht werden. Dazu wurden jeweils Lösungen des entsprechenden Derivats in einem Gemisch aus gleichen Anteilen Phosphatbuffer und Acetonitril angefertigt (1 mg/mL) und für spezifische Zeitintervalle mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm bestrahlt. Nach entsprechenden Zeitintervallen wurden Aliquote entnommen und deren Zusammensetzung per HPLC-Analyse untersucht. Aus den erhaltenen Chromatogrammen und den entsprechenden Peakflächen konnte anschließend eine Zerfallskurve für das bestrahlte *caged*-Derivat erstellt werden und aus dieser Kurve mit Hilfe einer exponentiellen Annäherungsfunktion die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  bestimmt werden. Aus den Peakflächen für das entstehende ATP konnte eine entsprechende Wachstumskurve erstellt werden und aus dieser erneut mit Hilfe einer Annäherungsfunktion die entsprechende Bildungskonstante  $k$  bestimmt werden. Als Lichtquelle dienten für diese Untersuchungen drei UV-LEDs, welche auf einem passiven Kühler in einem kleinen Dreieck angeordnet sind. Jede LED weist eine Leistung von 1.3 W auf, wodurch eine kumulierte Leistung von 3.9 W erreicht wird. Die jeweilige präparierte Lösung wurde in einem kleinen Glasgefäß direkt vor den LEDs positioniert und der Inhalt mit Hilfe eines kleinen Teflon-Rührstabes homogenisiert. Die Verwendung von UV-Licht durchlässigem Glas, sogenanntem Quarzglas, ist bei der hier verwendeten Wellenlänge nicht nötig, da das hier verwendete Glas die eingestrahlte Wellenlänge nicht absorbiert. Es ist jedoch bei diesen Experimenten darauf zu achten, dass das Glas frei von Verunreinigungen und Kratzern ist, um ungewollte Absorptionen und Streuungen zu vermeiden. Des Weiteren sollte das Gefäß zudem möglichst klein sein, damit der entsprechende Strahlungsgang durch die Lösung minimiert wird und nur ein Minimum der Strahlung durch Lichtbrechung abgelenkt wird. Eine Absorption des verwendeten UV-Lichts durch den verwendeten Puffer bzw. dem verwendeten Acetonitril sind in diesem Versuchsaufbau zu vernachlässigen, da kein signifikanter Temperaturanstieg und somit keine Ab-

sorption bei einer Blindwertmessung zu detektieren war. Diese Beobachtung ist nicht unerwartet, da weder Acetonitril noch Wasser Absorptionsbanden bei 365 nm aufweisen. Durch die Wahl dieser Lösungsmittel, des kurzen Strahlenganges durch die Lösung und den kurzen Abstand der Probe zu den LEDs ist sichergestellt, dass die Probe ausreichend bestrahlt wird und die eingestrahlten Photonen für die gewünschte Photoreaktion zur Verfügung stehen. Auf eine externe Kühlung der Probe konnte verzichtet werden, da ein signifikanter Temperaturanstieg erst bei längeren Belichtungsdauern auftrat und die gewünschte Photoreaktion zu diesem Zeitpunkt bereits vollständig abgelaufen war. Zudem konnte selbst bei längeren Belichtungen keine Zersetzung des freigewordenen ATPs durch HPLC-Analysen beobachtet werden.

### 4.4.2 Photolyse der symmetrischen *caged*-ATP Derivate

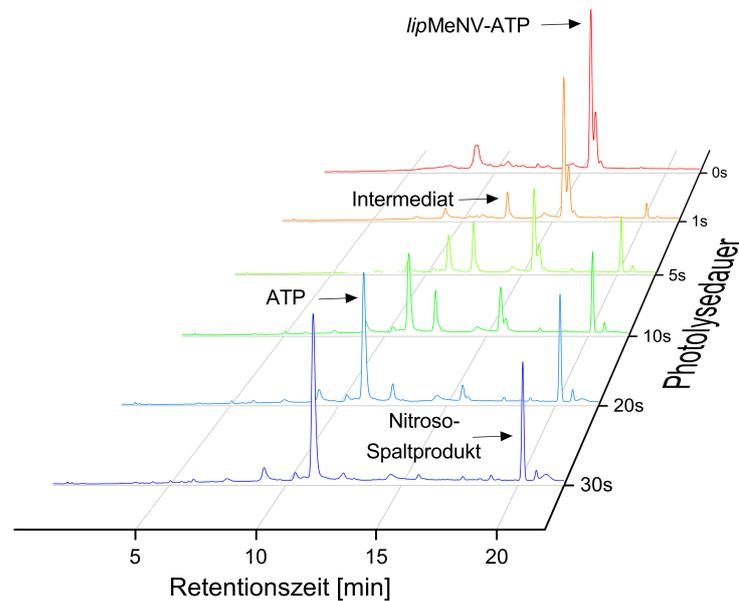
Die in den einzelnen Photolyseexperimenten mit dem zuvor vorgestellten Verfahren bestimmten Halbwertszeiten und Bildungskonstanten für die jeweiligen *caged*-Derivate und dem entsprechend freiwerdenden ATP sind in Abbildung 41 graphisch dargestellt. Es lässt sich direkt erkennen, dass die OMeNB-Maske unter den hier angewendeten Bedingungen nicht abgespalten werden konnten. Darüber hinaus konnte kein signifikanter Unterschied in der Spaltgeschwindigkeit zwischen der nicht substituierten NB-Maske und der donorsubstituierten NV-Masken beobachtet werden, welcher theoretisch aufgrund der verschiedenen Absorptionsmaxima bei 365 nm zu erwarten gewesen wäre. Sehr schnelle Spaltgeschwindigkeiten konnten nur für die donorsubstituierten, sekundären Gruppen MeNV und *lip*MeNV beobachtet werden.

Generell ließ sich bei allen Photolysen (Ausnahme: OMeNB-ATP **72**) eine schrittweise Abspaltung der photolabilen Masken beobachten. Aus den doppelt maskierten Verbindungen ließ sich zunächst die Bildung eines Intermediats beobachten, welches nur noch eine Maske aufwies. Aus diesem *in situ* gebildeten Intermediat wurde anschließend durch weitere Bestrahlung ATP gebildet. Dieser schrittweise Prozess konnte am Besten bei den lipophilen Derivaten **74** und **76** beobachtet werden, da die Verbindungen durch die hohe Lipophilie der Masken eine stark verschiedene Retentionszeit zu dem freiwerdenden Intermediat und ATP während der HPLC-Analyse aufwiesen. Die während der Photolyse des *lip*MeNV-ATP **76** aufgenommenen HPLC-Chromatogramme sind in Abbildung 42 als Wasserfalldiagramm dargestellt.



**Abbildung 41:** Ermittelte Halbwertszeiten und Bildungskonstanten der symmetrischen *caged*-ATP Derivate. An den einzelnen Balken ist die entsprechend berechnete Halbwertszeit angegeben.

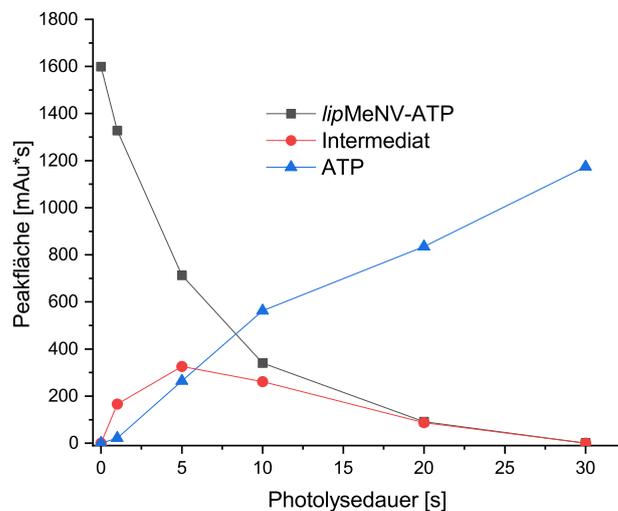
Bei den durchgeführten Photolysen der nicht lipophilen *caged*-ATP Derivate zeigte sich, dass diese Verbindungen in dem verwendeten Tetrabutylammoniumacetat (TBAA) Laufpuffer nur geringfügig später eluierten als das gebildete ATP. Zum Teil wies das Intermediat durch die Bildung des Tetrabutylammonium-Ionenpaars mit der neu entstandenen Ladung am  $\gamma$ -Phosphat die selbe Retentionszeit wie das Edukt oder ATP auf. Trotz dessen konnte die Bildung von ATP stets einwandfrei durch die fehlenden Absorptionsbanden der Nitrogruppe zwischen 300-370 nm festgestellt werden. Die bereits in Abschnitt 4.3 erörterte komplexe Zusammensetzung des Diastereomergemisches der sekundären *caged*-ATP Derivate führt auch zu der in Abbildung 42 gezeigten Aufspaltung des Edukts in zwei fast basislinien-getrennte Signale. Es kann jedoch beobachtet werden, dass beide Signale im gleichen Maße während der Photolyse abnehmen. Dies deutet darauf hin, dass es keine favorisierte Konfiguration des Edukts für die lichtinduzierte Abspaltung gibt. Weiterhin kann auch für das gebildete Intermediat keine Aufspaltung in zwei getrennte Signale mehr beobachtet werden, da durch die Abspaltung einer Maske sowohl das Stereozentrum der Maske verloren geht als auch das



**Abbildung 42:** Wasserfalldarstellung der aufgenommenen HPLC-Chromatogramme während der Photolyse des *lipMeNV-ATPs* **76**.

$\gamma$ -Phosphoratom nicht mehr chiral ist. Die Anzahl an Diastereomeren wird somit verringert, sodass keine Aufspaltung in mehrere Signale mehr erfolgt. Durch das Auftragen der ermittelten Peakflächen aus den einzelnen Chromatogrammen gegen die jeweilige Photolysedauer wurde das in Abbildung 43 gezeigte Diagramm mit der Zerfallskurve des *lipMeNV* **76** und der Bildungskurve des sich bildenden ATPs erhalten.

Durch die mathematische Berechnung der in Abbildung 43 gezeigten Datenpunkte als Exponentialfunktion konnten die in Abbildung 41 gezeigten Halbwertszeiten für die symmetrischen *caged-ATP-Derivate* berechnet werden, sowie die Bildungskonstante für die jeweilige Freisetzung des ATPs bestimmt werden. Aus der Abbildung wird zudem auch der zuvor beschriebene schrittweise Zerfall des Edukts ersichtlich, da zunächst die Konzentration des Intermediats (rote Linie) schnell steigt, ein Maximum durchläuft und anschließend auf Null absinkt. Die Bildung des ATPs kann entsprechend verzögert beobachtet werden, da dieses erst aus dem Intermediat gebildet wird. Auffällig hierbei ist jedoch, dass die Bildung des ATPs und die Bildung bzw. der Zerfall des Intermediats zunächst schnell erfolgen und die Raten mit zunehmender Photolysedauer geringer



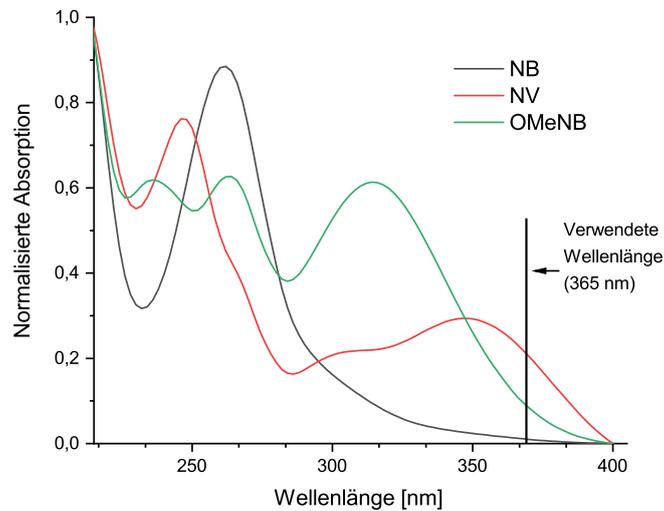
**Abbildung 43:** Darstellung der ermittelten Peakflächen gegen die jeweilige Photolysedauer. Die Peakflächen wurden während der Photolyse des *lipMeNV*-ATPs **76** erhalten.

werden. Dieser Trend konnte in allen Photolysen beobachtet werden und kann vermutlich durch Absorption der eingestrahlten Photonen durch das freiwerdende Nitrosoderivat erklärt werden. Das Nitroso-Spaltprodukt weist ebenfalls signifikante Absorptionsbanden im Bereich der eingestrahlten Strahlung von 365 nm auf, wie durch das aufgenommene UV-Vis Spektrum des *lipMeNV*-Spaltprodukts festgestellt werden konnte. Durch die immer höhere Konzentration dieses Spaltprodukts sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass das eingestrahlte Photon die gewünschte Abspaltungsreaktion initiiert, sondern stattdessen vom Spaltprodukt absorbiert wird und in Form von Wärmeenergie abgegeben wird. Diese freiwerdende Wärmeenergie konnte durch das starke Erhitzen der Lösung vor allem bei längere Bestrahlung mit dem UV-Licht beobachtet werden. Der Temperaturanstieg konnte dabei überwiegend festgestellt werden, nachdem die Freisetzung des ATPs bereits komplett abgeschlossen war und eine maximale Konzentration des Spaltprodukts vorlag. Dies deutet darauf hin, dass der beobachtete signifikante Temperaturanstieg nicht durch die gewünschte Photoreaktion hervorgerufen wird, sondern die Photonen durch das gebildete Spaltprodukt absorbiert werden. Das Spaltprodukt führte zudem dazu, dass dem für die Photolyse verwendeten Phosphatpuffer ein hoher Anteil Acetonitril

zugesetzt werden musste, da dieses nur bedingt löslich in wässrigen Medien ist. Während sich die weniger lipophilen Spaltprodukte der NB-, NV- und MeNV-Maske noch in wässrigen Medien lösten, konnte das Ausfallen der entsprechend lipophilen Spaltprodukte der *lipNV* und *lipMeNV* Maske während der Photolyse im wässrigen Puffer beobachtet werden. Die Bildung eines Niederschlages ist während der Photolyse problematisch, da dieser zunächst durch eine geeignete Filtration entfernt werden muss, um das HPLC-System vor Schäden zu bewahren. Durch eine durchgeführte Filtration könnten jedoch auch Anteile des ATPs, des Intermediats oder des Edukts mit abgetrennt werden, wodurch die anschließend berechnete Halbwertszeit durch das Auftragen der Peakflächen gegen die Zeit verfälscht wird. Ebenso störend an der Bildung von Niederschlägen ist die damit verbundene vermehrte Streuung des eingestrahlten Lichts, welche zu einer geringeren Quantenausbeute und somit ebenso zu einer größeren berechneten Halbwertszeit führt. Damit alle Photolysen jedoch untereinander vergleichbar bleiben und die Halbwertszeiten möglichst ohne systematische Fehler bestimmt werden können, wurde daher beschlossen, alle Photolysen in einem Gemisch aus gleichen Anteilen Acetonitril und Puffer durchzuführen.

Die so unter stets gleichen Bedingung ermittelten Halbwertszeiten sind in Abbildung 41 grafisch dargestellt. Die zuvor gestellte These, dass die donorsubstituierten photolabilen Gruppen deutlich schneller bei einer Wellenlänge von 365 nm gespalten werden, konnte nicht bewiesen werden. Es zeigte sich, dass das NB-ATP **71** mit einer Halbwertszeit von 36 s etwa 30 % langsamer gespalten wird als das donorsubstituierte NV-ATP **73** mit 26 s. Bei Betrachtung der in Abbildung 44 dargestellten UV-Vis-Spektren der jeweiligen *caged*-ATP-Derivate wirkt diese Beobachtung jedoch zunächst paradox, da das NB-Derivat **71** in diesem Strahlungsbereich eine sehr viel geringe Absorption aufweist als das entsprechende NV-Derivat **73**.

Das freiwerdende NV-Nitroso-Spaltprodukt weist jedoch vermutlich, wie das beobachtete *lipMeNV*-Nitroso-Spaltprodukt, eine starke Absorption bei der eingestrahlten Wellenlänge auf, wodurch die Quantenausbeute für die favorisierte Spaltreaktion sinkt. Das freiwerdende Nitroso-Spaltprodukt der NB-Maske weist dagegen, ähnlich wie das NB-ATP-Derivat selber, vermutlich keine oder nur eine schwache Absorption bei 365 nm auf. Dadurch wird die Quantenausbeute für die Spaltreaktion während der Photolyse nicht beeinflusst und die Reaktion läuft trotz der geringen Absorption bei 365 nm ähnlich schnell wie bei dem NV-Derivat **73** ab. Diese These kann jedoch nicht bewiesen wer-



**Abbildung 44:** Darstellung der gemessenen UV-Vis Spektren von ausgesuchten symmetrischen *caged*-ATP Derivaten.

den, da weder das Spaltprodukt der NB-Maske noch das Spaltprodukt der NV-Maske beobachtet werden konnte. Generell konnten während aller in dieser Arbeit durchgeführten Photolysen nur die lipophilen Nitroso-Spaltprodukte während der HPLC-Analyse beobachtet werden. Die Spaltprodukte der weniger lipophilen Masken konnten aus unbekanntem Gründen nie beobachtet werden. Dieser Umstand wird auch in Abschnitt 4.7 weiter untersucht.

Bei der Verwendung des sekundären MeNV-Alkohols als photolabile Schutzgruppe konnte jedoch im Vergleich zur unsubstituierten NB-Maske eine signifikante Steigerung der Spaltgeschwindigkeit festgestellt werden, da die berechnete Halbwertszeit für das MeNV-ATP **75** bei 17 s liegt. Eine noch schnellere Abspaltung konnte nur für die *lip*MeNV-Gruppe beobachtet werden, welche eine Halbwertszeit von 6 s aufweist. Zudem konnte unerwarteterweise festgestellt werden, dass die OMeNB-Maske nicht unter den gewählten Photolysebedingungen abgespalten werden konnte. Es wurde für dieses Derivat vermutet, dass die Abspaltungsgeschwindigkeit aufgrund des Substitutionsmusters zwischen der NB- und NV-Maske liegen müsste. Beim Vergleich der aufgenommenen UV-Vis-Spektren in Abbildung 44 ist ersichtlich, dass die Verbindung auch über entsprechende Absorptionsbanden zwischen dem kaum absorbierenden NB-, und dem stark

absorbierenden NV-Derivat verfügt. Das symmetrische OMeNB-ATP **72** weist jedoch auch starke Absorptionsbanden bei circa 310 nm und 230 nm auf, welche bei den anderen lichtspaltbaren Gruppen nicht vorhanden sind. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass das eingestrahelte Licht absorbiert wird, die aufgenommene Energie jedoch nicht die gewünschte Spaltungsreaktion auslöst. Es wäre denkbar, dass das Molekül zwar in einen höheren energetischen Zustand angeregt wird, jedoch durch andere Prozesse als die Spaltreaktion in einen Grundzustand relaxiert. Denkbar wäre dabei zum Beispiel eine *Innere Umwandlung* (engl. *internal conversion*, IC) in ein anderes tieferliegendes angeregtes Niveau von welchem ein strahlungsloser Übergang in das ursprüngliche Grundniveau denkbar wäre. Theoretisch wäre eine Energieabgabe aus dem angeregten Zustand zum Grundniveau auch über Fluoreszenz und nach einem *intersystem crossing* (ISC) in den angeregten Triplettzustand auch über Phosphoreszenz möglich. Jedoch konnte keiner dieser beiden Prozesse beobachtet werden. Phosphoreszenz hätte dabei aufgrund der lange Relaxation durch eine verbotene Spinumkehr mit dem bloßen Auge ersichtlich sein müssen und die Fluoreszenz hätte bei der Verwendung des Fluoreszenzdetektors der HPLC beobachtet werden müssen.

Abschließend wurde zudem geprüft, ob eine Abspaltung der *caged*-Gruppen auch bei 405 nm möglich wäre. Bei dieser Wellenlänge wären Fremddabsorptionen und Schäden an einem zellulären System vollständig ausgeschlossen. Die Photolyse bei dieser Wellenlänge sollte jedoch zunächst nur exemplarisch an dem NB- und NV-Derivat **71** bzw. **73** getestet werden. Die Abspaltung der MeNV-Gruppe durch die Bestrahlung bei 405 nm wird im Abschnitt 4.6 diskutiert. Die verwendete 405 nm UV-Quelle weist den selben Aufbau sowie die selbe Leistung wie die zuvor verwendete 365 nm UV-Quelle auf, wodurch die erhaltenen Ergebnisse vergleichbar sind. Es zeigte sich im anschließenden Photolyseexperiment bei 405 nm, dass die NB-Gruppe mit einer Halbwertszeit von 102 s gespalten wird und die NV-Gruppe eine Halbwertszeit von 106 s aufweist. Es lässt sich in damit in beiden Fällen eine signifikante Verlangsamung der Abspaltung beobachten, wodurch die Verwendung der 365 nm Strahlung vorzuziehen ist. Eine Spaltung der *caged*-Gruppen bei energieärmerer Strahlung wäre jedoch für spezielle Anwendungen auch möglich.

Zusammenfassend lässt sich aus den durchgeführten Photolysen festhalten, dass die

sekundären MeNV- und *lip*MeNV-Gruppen signifikant schneller gespalten werden als die in dieser Arbeit verwendeten primären Photogruppen. Es scheint zudem in den hier durchgeführten Experimenten keinen drastischen Unterschied zwischen der nicht substituierten NB-Gruppe und der donorstsubstituierten NV-Gruppe zu geben. Aus diesem Grund und der Tatsache, dass die Lösung sich während der Photolyse zum Teil stark erwärmt, ist davon auszugehen, dass das freiwerdende Nitroso-Spaltprodukt die eingestrahnten Photonen ebenfalls absorbiert und die Quantenausbeute für die gewünschte Reaktion dadurch gesenkt wird. Die Tatsache, dass die freiwerdende Menge an ATP in allen Photolysen mit der Zeit kleiner wird, spricht ebenfalls für die Absorption durch das Spaltprodukt. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass vor allem die lipophilen Spaltprodukte nicht im verwendeten Phosphatpuffer löslich sind, weswegen die Photolyse in einem Gemisch aus Wasser und Acetonitril durchgeführt werden musste. Für weitere Untersuchungen sollten im Folgenden asymmetrisch modifizierte ATP-Derivate hergestellt werden, welche nur noch eine MeNV-Maske am  $\gamma$ -Phosphat aufweisen.

Es sollte im speziellen ein asymmetrisches ATP-Derivat mit einer MeNV-Maske und einer AB-Maske dargestellt werden, um zu überprüfen, ob beide Gruppen orthogonal zu einander gespalten werden können. Anschließend sollte zudem noch ein *caged*- $\gamma$ -Alkyl-modifiziertes ATP-Derivat hergestellt werden, um die photolytische Abspaltung detaillierter, in Abhängigkeit verschiedener Faktoren wie dem pH-Wert und dem Lösungsmittel, zu untersuchen.

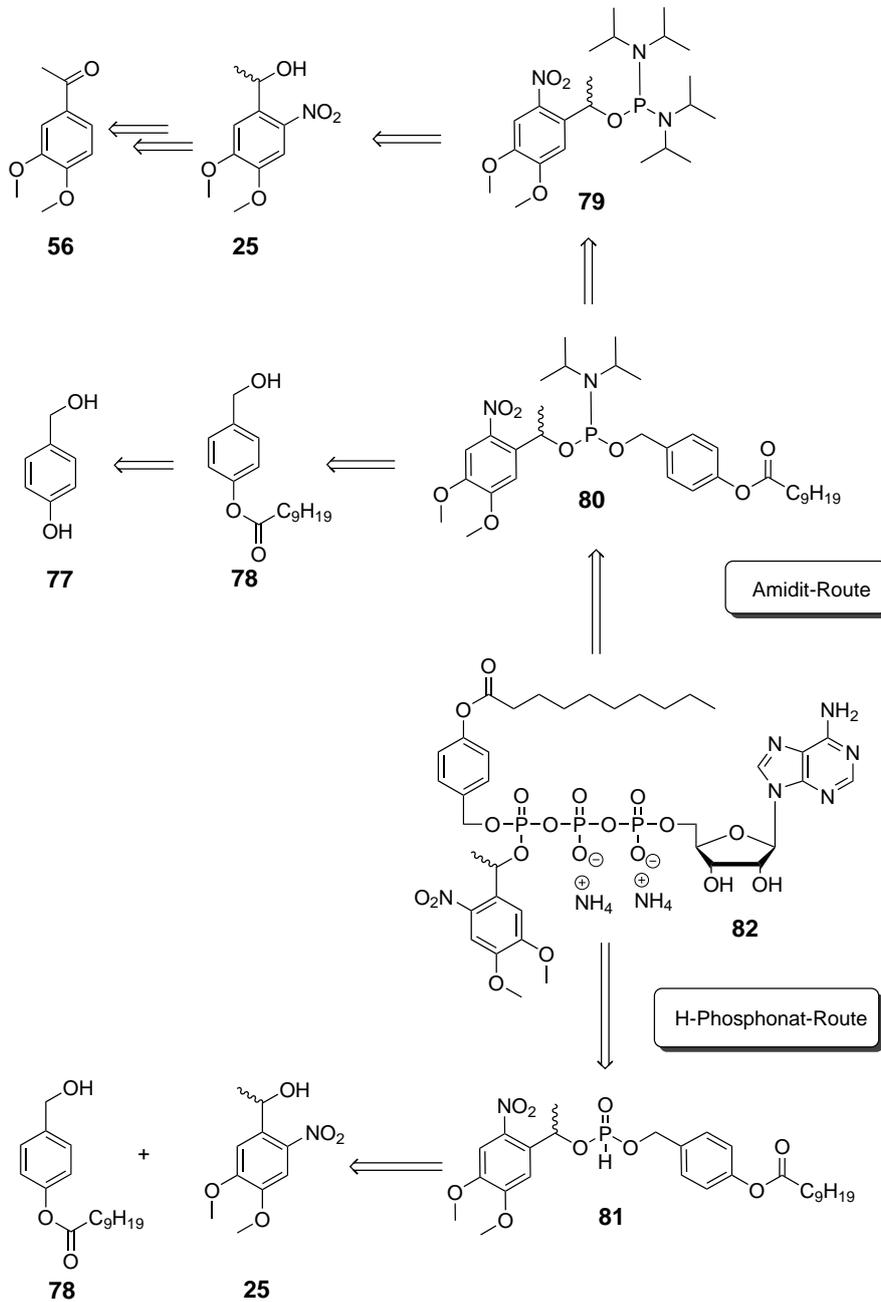
## 4.5 Synthese von orthogonal geschützten MeNV-AB-ATP 82

Durch die lipophile Maskierung sollten die entsprechenden ATP-Derivate soweit in ihrer Lipophilie erhöht werden, dass eine passive Diffusion durch die Zellmembran in das Zellinnere ermöglicht wird. Es zeigte sich jedoch, dass die zuvor synthetisierten, lipophilen photolabilen Masken zwei bedenkliche Nachteile für diesen Einsatz aufweisen. Zum Einen ist das freiwerdende Nitroso-Nebenprodukt durch seine Reaktivität potentiell toxisch und zum Anderen ist dieses auch nicht in wässrigen Medien löslich, wodurch es vermutlich während der Photolyse im Cytosol ausfallen würde. Um diese Probleme zu umgehen, sollte ein asymmetrisch geschütztes ATP-Derivat dargestellt werden, welches eine photospaltbare und eine enzymatisch-spaltbare Maskierung aufweist. Durch eine entsprechend lipophile Acyloxybenzyl-Gruppe (AB) sollte die notwendige Lipophilie erreicht werden, um die Permeabilität des ATP-Derivats durch Zellwände zu gewährleisten. Die abgespaltene AB-Maske ist dabei im Gegensatz zu den lipophilen *caged*-Gruppen wasserlöslich. Durch die photolabile Gruppe sollte die ATP-Freisetzung, nach der Aufnahme in die Zelle und der nicht steuerbaren enzymatischen Abspaltung der AB-Maske, gezielt gesteuert werden können. Als photolabile Gruppe wurde aufgrund der zuvor ermittelten Ergebnisse die MeNV-Gruppe gewählt. Diese Gruppe zeigte in den zuvor durchgeführten Photolysen eine deutlich schnellere lichtinduzierte Spaltung als die NB oder NV-Gruppe und hat somit einen entschiedenen Vorteil gegenüber diesen Gruppen. Bei der Photolyse dieser Verbindung wird zudem ein Nitrosoacetophenon gebildet, welches weniger reaktiv als der entsprechende freiwerdende Nitrosobenzaldehyd ist. Durch die Reduzierung auf nur noch eine photolabile Maske wird dabei zeitgleich auch die Menge an freiwerdendem, potentiell toxischem Spaltprodukt im Vergleich zu den zuvor hergestellten symmetrischen *caged*-ATP-Derivaten, halbiert und die vermutete Senkung der Quantenausbeute durch die Freisetzung von zwei Äquivalenten des Nitroso-Nebenprodukts vermieden. Durch die Kombination von biospaltbarer und photolabiler Maske könnten somit Derivate hergestellt werden, welche die Vorteile beider Gruppen aufweisen.

### 4.5.1 Retrosynthese

Das asymmetrisch-geschützte ATP-Derivat sollte sich in der Theorie sowohl über die bereits vorgestellte Amidit- als auch die *H*-Phosphonat-Route darstellen lassen. Ein ent-

sprechendes Retrosyntheschema ist in Abbildung 45 gezeigt.



**Abbildung 45:** Retrosyntheschema zur Darstellung des MeNV-AB-ATP-Derivats **82** über die Amidit- als auch die *H*-Phosphonat-Route.

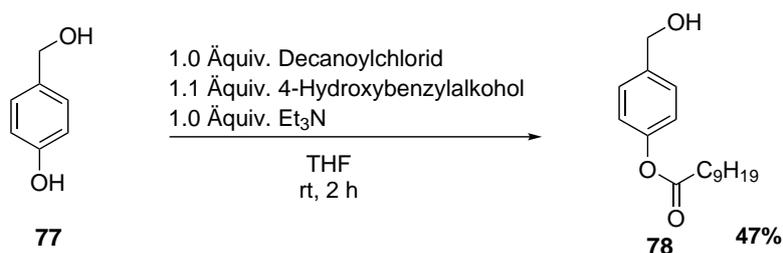
Für die Amidit-Route erfolgt die Darstellung des gewünschten MeNV-AB-ATPs **82**

ausgehend vom asymmetrischen Phosphoramidit **80** durch die Kupplung mit ADP. Das asymmetrische Phosphoramidit sollte dabei durch die schrittweise Kupplung der entsprechenden Alkohole **25** und **78** erfolgen. Es sollte zunächst der MeNV-Alkohol **25** an das kommerziell erhältliche Bis(*N,N*-diisopropylamino)chlorophosphoramidit gekuppelt werden, um das Bis-Amidit **78** zu erhalten. Anschließend sollte das Amidit **80** durch eine DCI-vermittelte Kupplung mit der AB-Maske **78** hergestellt werden können. Der Ester **78** sollte durch die Veresterung der phenolischen Hydroxygruppe des 4-Hydroxybenzylalkohols **77** mit Decansäurechlorid erhältlich sein. Die Synthese des MeNV-Alkohols **25** sollte wie bereits beschrieben ausgehend vom Keton **56** durch eine Nitrierung und Reduktion erhältlich sein.

Die Darstellung des gewünschten MeNV-AB-ATPs **82** über die *H*-Phosphonat-Route sollte ausgehend von dem asymmetrischen *H*-Phosphonat **81** erfolgen, indem dieses nach einer oxidativen Chlorierung mit ADP gekuppelt werden sollte. Das asymmetrische *H*-Phosphonat sollte dabei ausgehend von Diphenylphosphit durch eine stufenweise Substitution der Phenylgruppen durch die beiden Alkohole **25** und **78** erhalten werden.

### 4.5.2 Synthese von MeNV-AB-ATP **82**

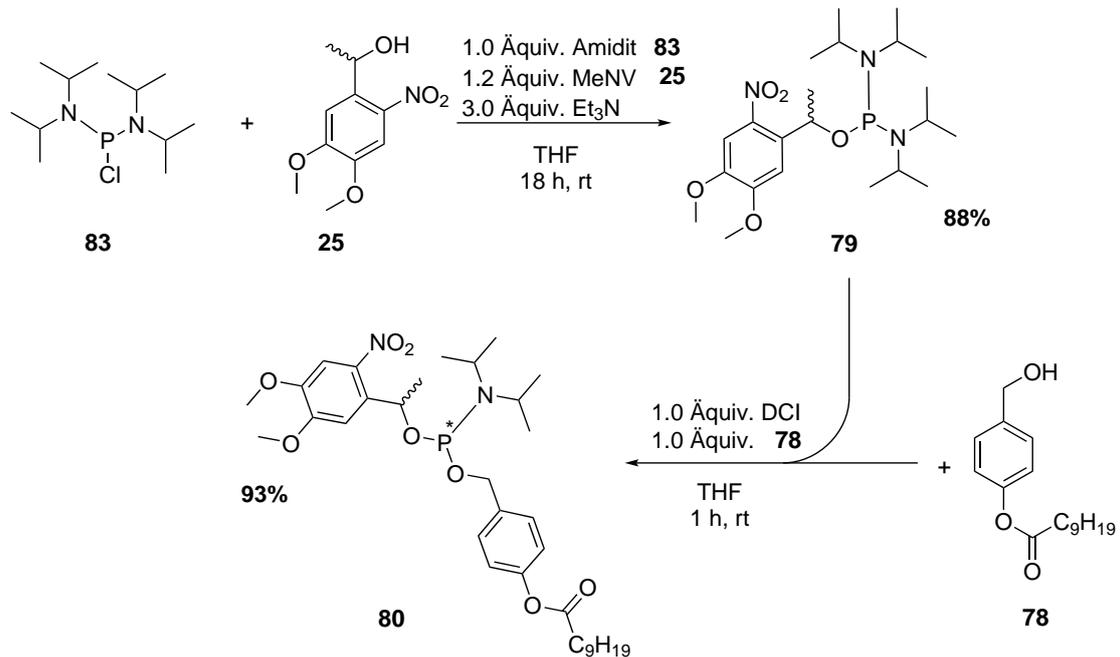
Die Synthese des orthogonal geschützten ATP-Derivats **82** sollte zunächst über die Amidit-Route versucht werden, da die Synthese der symmetrischen Amidite zuvor im Vergleich zur Darstellung der symmetrischen *H*-Phosphonate in besseren Ausbeuten gelang. Für die Darstellung des asymmetrischen Amidits mussten zunächst die entsprechenden Schutzgruppen in Form der Alkohole dargestellt werden. Die Synthese des MeNV-Alkohols wurde bereits in Abschnitt 4.1.5 beschrieben. Die Synthese der AB-Maske ist in Abbildung 46 dargestellt.



**Abbildung 46:** Synthese der lipophilen AB-Maske **78** ausgehend von 4-Hydroxybenzylalkohol **77** und Decanoylchlorid.

Die Synthese der lipophilen AB-Maske konnte in einer Ausbeute von 47 % ausgehend vom kommerziell erhältlichen 4-Hydroxybenzylalkohol realisiert werden. Neben dem gewünschten Ester konnte zudem auch das unerwünschte doppeltveresterte Derivat in einer Ausbeute von 30 % isoliert werden. Eine Optimierung der Ausbeute erfolgte nicht, da die Reaktion in einem großen Maßstab durchgeführt werden kann und die Edukte kommerziell günstig zu erwerben sind.

Nachdem die beiden Alkohole **25** und **78** dargestellt wurden, galt es das asymmetrische Amidit als essentiellen Kupplungsbaustein herzustellen. Dazu wurde beschlossen, zunächst die Photoschutzgruppe und anschließend den AB-Alkohol an das Amidit anzufügen. Ausgehend vom kommerziell erhältlichen Bis(*N,N*-diisopropylamino)chlorophosphoramidit **83** wurde zunächst das Chloratom durch den MeNV-Alkohol substituiert, wodurch das Bis-Amidit **79** in einer sehr guten Ausbeute von 88 % nach säulenchromatographischer Reinigung isoliert werden konnte. Es stellte sich heraus, dass das isolierte Produkt über eine für Amidite hohe Stabilität verfügt und über einen beliebigen Zeitraum bei -20 °C gelagert werden konnte. Selbst gelöst in Chloroform zeigte es nach einer Woche unter Lichteinwirkung keine nennenswerte Zersetzung durch lichtinduzierte Abspaltung der Maske, säureinduzierte Abspaltung der DIPA-Gruppen oder Oxidation zum Amidat. Ausgehend von diesem Bis-Amidit **79** konnte das Amidit **80** nach Aktivierung mit DCI und der Umsetzung mit der lipophilen AB-Maske **78** in einer sehr guten Ausbeute von 93 % isoliert werden. Es zeigte sich hier, dass die DCI-vermittelte Kupplung eines Amidits mit einem Nucleophil in schnellen Reaktionszeiten und sehr guten Ausbeuten durchgeführt werden konnte. Es zeigte sich jedoch auch der Nachteil der sekundären Photogruppe, da durch die Substitution einer DIPA-Gruppe durch den AB-Alkohol die Verbindung chiral



**Abbildung 47:** Synthese des Amidits **80** über zwei Stufen ausgehend vom MeNV-Alkohol **25** und der lipophilen AB-Maske **78**.

wird. Das Produkt konnte als ein 1:1 Gemisch von zwei Diastereomeren erhalten werden. Nachdem das Amidit **80** erfolgreich hergestellt werden konnte, sollte dieses durch die DCI-vermittelte Kupplung mit ADP zum gewünschten MeNV-AB-ATP **82** umgesetzt werden.

Es zeigte sich, trotz mehrfacher Syntheseveruche, dass die Bildung des gewünschten asymmetrischen ATP-Derivats nicht beobachtet werden konnte. Während der direkt nach der Synthese durchgeführten Reinigung durch Umkehrphasen-Chromatographie konnten stets große Mengen an ADP und Amidat reisoliert werden. Es konnte zudem in deutlich geringerer Menge eine unbekannte Substanz isoliert werden, welche jedoch weder durch Massenspektrometrie noch durch  $^1\text{H}$ - und  $^{31}\text{P}$ -NMR identifiziert werden konnte. Im aufgenommenen  $^{31}\text{P}$ -NMR konnte das charakteristische Signal für Triphosphate bei circa  $-24$  ppm nicht beobachtet werden, stattdessen konnten mehrere nicht eindeutig charakterisierbare Signale zwischen 0 und  $-10$  ppm beobachtet werden. Nachdem die Synthese mehrfach ohne Erfolg durchgeführt wurde, wurde versucht das Produkt über die *H*-Phosphonat-Route herzustellen. Dazu war es zunächst nötig, das entsprechende asymmetrische *H*-Phosphonat **81** darzustellen. Die Synthese dieses *H*-

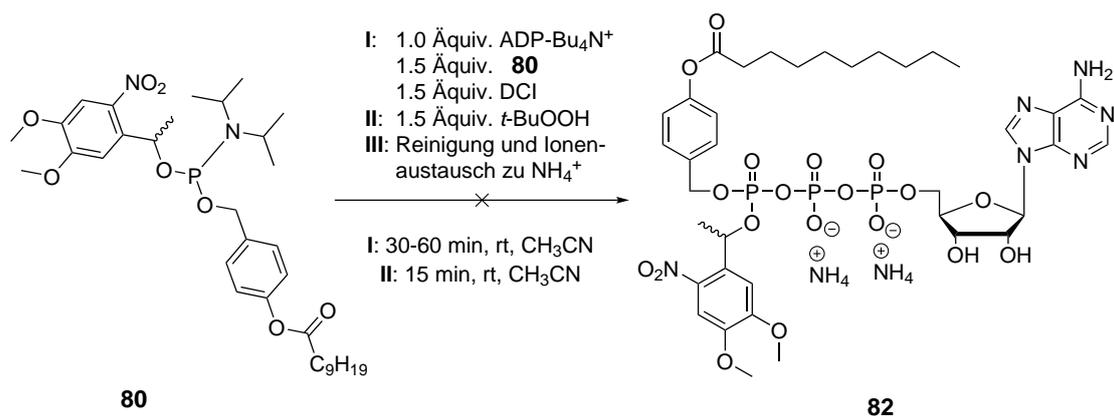


Abbildung 48: Synthese von MeNV-AB-ATP **82** über die Amidit-Route.

Phosphonats ist in Abbildung 49 gezeigt. Im Gegensatz zur Darstellung von symmetrischen *H*-Phosphonaten erfolgte die Zugabe der Alkohole bei der Synthese von asymmetrischen *H*-Phosphonaten schrittweise, um eine stufenweise Substitution der Phenolgruppen des DPPs zu erreichen. Es wurde zunächst der MeNV-Alkohol bei 0 °C zu einer Lösung von DPP in Pyridin zugegeben, sodass zunächst nur eine Phenol substituiert wird und nach einer Stunde Reaktionszeit erfolgte die Zugabe des AB-Alkohols **78**, um das zweite Phenol zu substituieren. Als ungewollte Nebenreaktion kann jedoch auch die Substitution der bereits vorhandenen MeNV-Gruppe durch den zugegebenen AB-Alkohol auftreten, wodurch ein symmetrisches Produkt gebildet werden kann. Nachdem die Reaktionslösung bis zum vollständigen Umsatz gerührt wurde, wurde das Lösungsmittel entfernt und der erhaltene Rückstand säulenchromatographisch gereinigt. Das gewünschte Produkt konnte in einer Ausbeute von 40% erhalten werden.

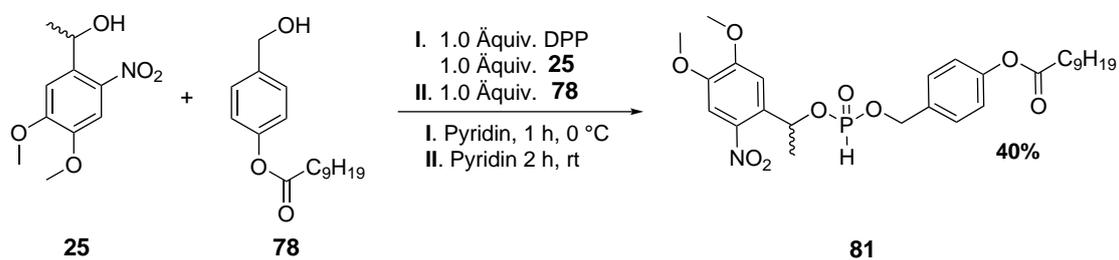
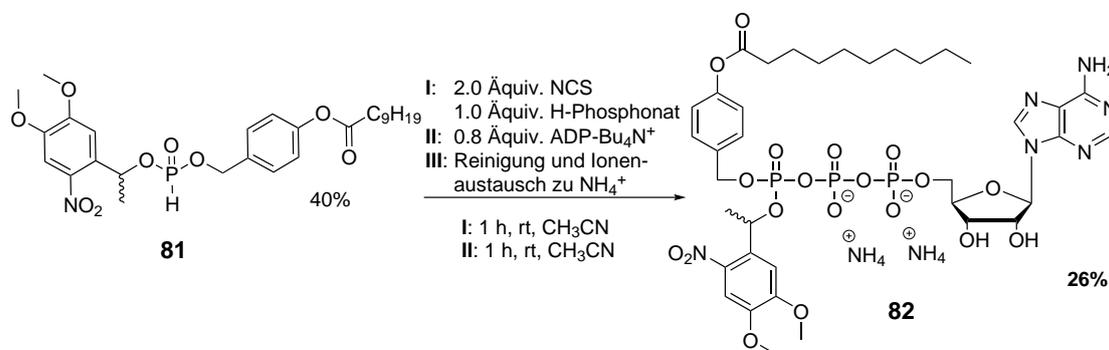


Abbildung 49: Synthese des asymmetrischen *H*-Phosphonats **81**.

Nachdem das asymmetrische *H*-Phosphonat **81** erfolgreich dargestellt werden konnte, wurde dieses mit *N*-Chlorsuccinimid oxidativ chloriert und anschließend mit ADP umgesetzt. Die Reaktionsbedingungen sind in Abbildung 50 dargestellt.



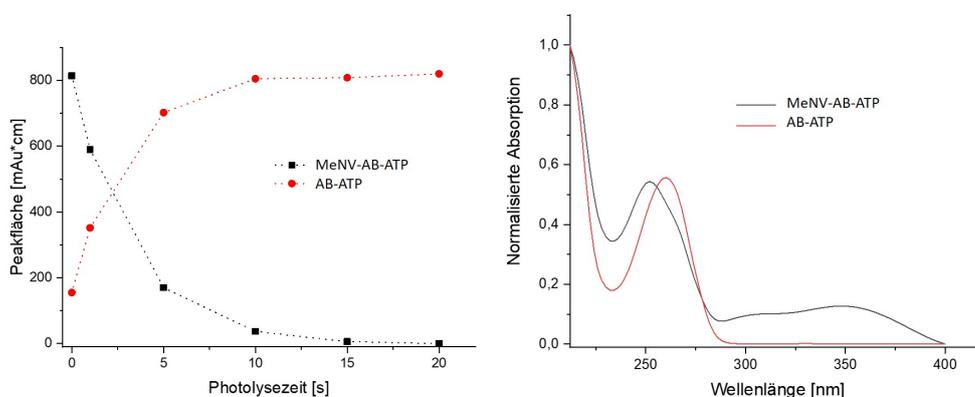
**Abbildung 50:** Synthese von MeNV-AB-ATP **82** über die *H*-Phosphonat-Route.

Das MeNV-AB-ATP **82** konnte in einer Ausbeute von 26 % erhalten werden. Die dabei erreichte Ausbeute liegt im vergleichbaren Bereich der Ausbeuten, welche auch für die symmetrischen lipophilen *caged*-ATP Derivate erreicht wurden. Ebenso wie bei den bisher hergestellten *caged*-ATP-Derivaten mit der MeNV bzw. *lip*MeNV-Gruppe gestaltete sich die Reinigung und Analytik durch NMR-Spektroskopie schwierig, da das Produkt ebenfalls als Gemisch aus verschiedenen Diastereomeren vorliegt. Das Produkt konnte jedoch via Massenspektrometrie eindeutig identifiziert werden und auch das charakteristische Muster der Phosphoratome des Triphosphats konnte im  $^{31}\text{P}$ -NMR beobachtet werden. Das  $^1\text{H}$ -Spektrum konnte jedoch aufgrund der sich überlagernden Signale nur sehr schwierig interpretiert werden.

#### 4.5.3 Photolyse und enzymatische Hydrolyse des MeNV-AB-ATP **82**

Nach erfolgreicher Synthese des asymmetrisch maskierten ATP-Derivats **82** sollte getestet werden, ob beide Schutzgruppen unabhängig von einander gespalten werden können und ob die freiwerdenden Intermediate stabil unter den jeweiligen Testbedingungen sind. Dafür sollte zum Einen eine Hydrolyse der Verbindung **82** mit Schweineleber Esterase (*pig liver esterase*, PLE) durchgeführt werden und zum Anderen das zuvor vorgestellte Photolyseexperiment mit dieser Substanz wiederholt werden. In beiden Experimenten sollte eine Inkubation des asymmetrischen ATP-Derivats im jeweiligen notwendigen Me-

dium erfolgen und nach spezifischen Zeitpunkten sollten Aliquote dieser Lösungen mit Hilfe eine HPLC-Analyse auf ihre Zusammensetzung untersucht werden. Im Idealfall sollte in der PLE-Hydrolyse nur die enzymatisch spaltbare AB-Maske abgespalten werden, während die MeNV-Maske nicht gespalten wird. Während der Photolyse sollte genau das Gegenteil beobachtet werden: Eine lichtinduzierte Spaltung der MeNV-Maske sollte beobachtbar sein, während die AB-Maske unter den gewählten Photolysebedingungen stabil sein sollte. Die Daten aus den erhaltenen Chromatogrammen aus dem Photolyseexperiment sind in Abbildung 51 dargestellt.



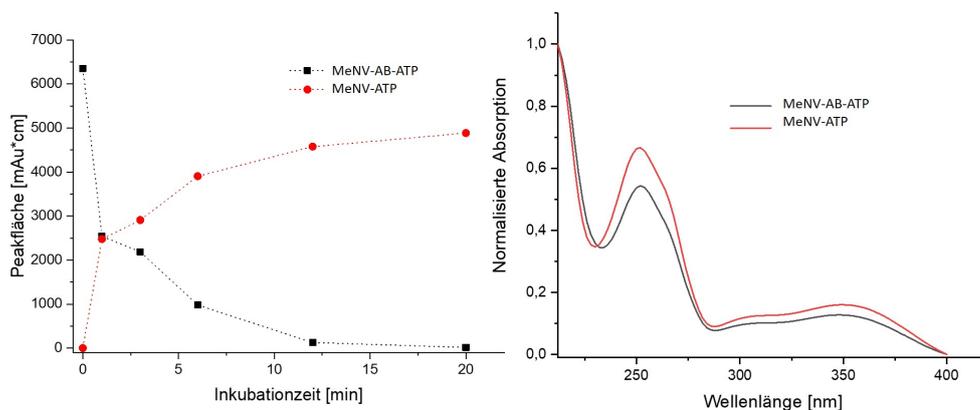
**Abbildung 51:** Bestimmte Zerfallskurve des MeNV-AB-ATPs **82** bei der Durchführung der Photolyse (links) und die überlagerten UV-Vis-Spektren des Edukts und der neu entstandenen Verbindung (rechts).

Die in Abbildung 51 auf der linken Seite abgebildeten Zerfalls- und Bildungskurven wurden durch das Auftragen der aus den Chromatogrammen entnommenen Peakflächen gegen die Photolysedauer erstellt. Es lässt sich direkt erkennen, dass das MeNV-AB-ATP **82** nach 15 s vollständig gespalten war. Im selben Maße wie die Konzentration des MeNV-AB-ATPs abnimmt kann die Bildung einer neuen Verbindung beobachtet werden. Die neue Verbindung eluiert dabei nur unwesentlich schneller als das verwendete Edukt. Beim direkten Vergleich der aufgenommenen UV-Vis-Spektren dieser beiden Verbindungen wird ersichtlich, dass die charakteristischen Absorptionsbanden der MeNV-Gruppe von 300 bis 400 nm in der neu gebildeten Verbindung nicht beobachtet werden können. Die gebildete Verbindung weist keine Absorption über 285 nm auf, was in Kombination mit der nur im Vergleich zum Edukt unwesentlich kürzeren und nicht zum coinji-

zierten ATP passenden Retentionszeit für die Bildung des AB-ATP-Intermediats spricht. Auch nach weiterer Bestrahlung der Probenlösung von einer Dauer von bis zu fünf Minuten zeigen die HPLC-Chromatogramme keine nennenswerte Änderung auf. Das gebildete AB-ATP-Intermediat ist somit über den gesamten Bestrahlungsvorgang stabil. Die berechnete Halbwertszeit für das asymmetrische-ATP-Derivat **82** liegt bei 3.2 s und ist im Vergleich zur Halbwertszeit des symmetrischen MeNV-Derivats **75** nochmals geringer. Diese Steigerung der Spaltgeschwindigkeit kann vermutlich darauf zurückgeführt werden, dass nur eine photolabile Maske in diesem Molekül verwendet wird und die AB-Maske das eingestrahlte Licht von 365 nm nicht absorbieren kann. Dadurch stehen alle eingestrahlten Photonen nun für die Abspaltung der einen MeNV-Maske zur Verfügung, wodurch das Produkt schneller gebildet wird.

Im Anschluss an das erfolgreiche Photolyseexperiment wurde eine unabhängige PLE-Hydrolyse durchgeführt. Für diese wurde das MeNV-AB-ATP **82** in einem Gemisch aus Phosphatpuffer (pH 7.4) und DMSO gelöst. Von dieser Lösung wurde bereits ein Aliquot als Nullwert der Hydrolyse abgenommen und anschließend wurde der Lösung ein entsprechender Anteil an PLE-Stammlösung zugegeben. Äquivalent zu dem Photolyseexperiment wurden nach spezifischen Zeitpunkten Aliquote abgenommen. Diese mussten jedoch, um die enzymatische Reaktion zu stoppen, zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren werden und wurden erst zur entsprechenden HPLC-Analyse aufgetaut, um die Messwerte zu erhalten. Die entsprechenden Peakflächen der HPLC-Chromatogramme wurden analog zur Photolyse in Abbildung 52 gegen die Inkubationszeit aufgetragen.

Ebenso wie bei der Photolysen-Kurve für das MeNV-AB-ATP **82** ist auch in der aufgenommenen Abbaukurve für die PLE-Hydrolyse die Abnahme des Edukts und die zeitgleiche Bildung einer neuen Verbindung zu beobachten. Ebenso wie im vorangegangenen Experiment wurde die Identität der neu gebildeten Verbindung durch die Änderung der Retentionszeit und durch den Vergleich der aufgenommenen UV-Vis Spektren durchgeführt. Das neu entstehende Signal weist dabei eine um 2.6 Minuten geringeren Retentionszeit als das Edukt auf. Diese Änderung deutet auf eine enorme Steigerung der Hydrophilie hin, welche nur durch die Abspaltung der AB-Maske und der Ausbildung des MeNV-Intermediats erklärt werden kann. Zudem können in dem aufgenommenem UV-Vis Spektrum die charakteristischen MeNV-Absorptionsbanden auch bei der neu entstandenen Verbindung beobachtet werden. Zeitgleich kann jedoch auch eine geringe



**Abbildung 52:** Bestimmte Zerfallskurve des MeNV-AB-ATPs **82** bei der Durchführung der PLE-Hydrolyse (links) und die überlagerten UV-Vis Spektren des Edukts und der neu entstandenen Verbindung (rechts).

Abnahme der Absorption im Bereich um 260 nm festgestellt werden. Diese Abnahme kann durch die Abspaltung der AB-Maske erklärt werden, da diese in diesem Bereich entsprechende Absorptionsbanden aufweist. Die berechnete Halbwertszeit bei enzymatischer Hydrolyse für das MeNV-AB-ATP liegt bei 66 Sekunden. Wie in Abbildung 52 zu erkennen erfolgt zunächst eine schnelle Spaltung des Edukts, welche jedoch mit der Zeit langsamer wird. Diese Tatsache hat dabei verschiedene Ursachen. Zum einen sind die aktiven Zentren der Enzyme bei der Zugabe des Enzyms nicht besetzt und können somit am Anfang schnell die Ester spalten. Zum Anderen nimmt die Konzentration des Edukts über die Zeit ab, wodurch eine Spaltung des Esters durch die Esterase statistisch gesehen unwahrscheinlicher wird und die Spaltgeschwindigkeit sinkt.

In beiden Experimenten konnten die gewünschten Ergebnisse beobachtet werden. Es zeigte sich, dass beide Masken orthogonal zu einander gespalten werden können und dass das gebildete monomaskierte Intermediat unter den angewendeten Spaltungsbedingungen stabil ist. Die hier unabhängig durchgeführten Experimente zur orthogonalen Abspaltung der beiden verschiedenen Masken wurden anschließend in einem Experiment wiederholt, um zum Einen das Prinzip der orthogonalen Schutzgruppen zu validieren und zum Anderen, um auszuschließen, dass das zugegebene Enzym die Photolyse stört. Dazu wurde zunächst wie bereits zuvor beschrieben die enzymatische Hydroly-

se mit PLE wiederholt und die Inkubationslösung, nach vollständiger Abspaltung der AB-Gruppe, in ein Glasvial überführt. Anschließend wurde die Photolyse wie bereits beschrieben durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse aus dem Kombinationsexperiment decken sich dabei mit den zuvor erhaltenen Ergebnissen aus den unabhängigen Experimenten. Diese festgestellten Eigenschaften lassen das Konzept der Kombination aus AB und *caged*-Maskierung zu einem geeigneten Werkzeug werden, um Nucleosid-Triphosphate lipophil zu maskieren und in der Zelle durch Bestrahlung lokal und zeitabhängig definiert freizusetzen.

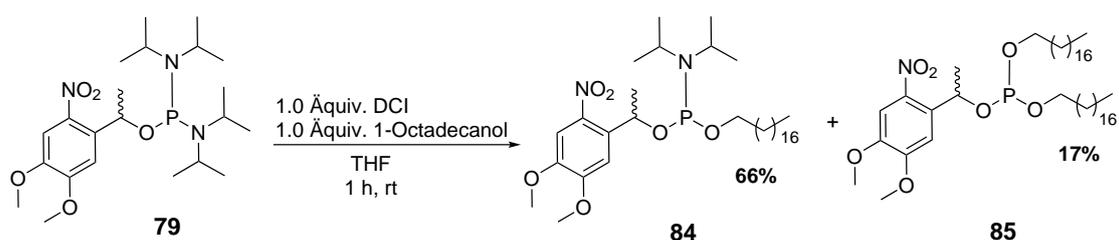
#### 4.6 $\gamma$ -Alkyl-MeNV-ATP als Testsubstrat zur Untersuchung der Photolyse von MeNV-Derivaten

Bei der Photolyse des asymmetrischen MeNV-AB-ATP Derivats **82** zeigte sich, dass die MeNV-Gruppe während der Photolyse schneller gespalten wurden als beim entsprechenden Bis-*caged*-MeNV-ATP **75**. Um die Abspaltung der photolabilen Maske in Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel, dem Abstand zur UV-Lampe oder zum Beispiel dem pH-Wert zu untersuchen und besser zu verstehen, sollte ein  $\gamma$ -Alkyl-MeNV-ATP-Derivat hergestellt werden. Die bisher hergestellten *caged*-Verbindungen sind aus verschiedenen Gründen für solche Untersuchungen nicht geeignet. Bei der Verwendung der symmetrischen Bis-*caged*-ATP-Derivate kann die einzelne Abspaltung einer Maske nur unzureichend untersucht werden, da die zweite Maske das eingestrahlte Licht ebenso absorbiert und somit die Quantenausbeute beeinflusst wird. Das dargestellte MeNV-AB-ATP **82** weist zwar nur eine photolabile Maske auf, ist jedoch durch die Präsenz der AB-Maske zu einem geringen Teil hydrolyseempfindlich. Dadurch ist es potentiell möglich, dass das gebildete AB-ATP in den verschiedenen Lösungsmitteln, Puffern oder pH-Werten unterschiedliche Stabilitäten aufweist und die Versuche untereinander nicht mehr vergleichbar sind. Um diese potentiellen Fehlerquellen zu vermeiden, wurde ein  $\gamma$ -Alkyl *caged*-modifiziertes Nucleosidtriphosphat als potentielle Testsubstanz in Betracht gezogen. In vorangegangenen Arbeiten haben sich  $\gamma$ -Alkyl-modifizierte Nucleosidtriphosphate als äußerst stabile Verbindungen herausgestellt, welche sich in entsprechenden Hydrolyseexperimenten als deutlich stabiler als entsprechend AB-maskierte Derivate herausgestellt haben.<sup>[121]</sup> Die  $\gamma$ -modifizierten Verbindungen zeigten dabei keine chemische Hydrolyse auf und in entsprechenden PLE-Hydrolysen konnte keine Spaltung der Alkylmodifikation durch die verwendeten Enzyme beobachtet werden. Darüber hinaus konnte zudem in Primer Extension Assays festgestellt werden, dass entsprechende  $\gamma$ -Alkyl-modifizierte d4T-Triphosphate als Substrate für die virale Reverse Transkriptase dienen und dadurch potente Inhibitoren gegen HIV-1 und HIV-2 sind. Die Inhibition konnte in entsprechenden Zelltest mit Thymidinkinase defizienten T-Zellen (CEM/TK<sup>-</sup>) beobachtet werden.<sup>[121]</sup> Durch diese Ergebnisse wäre es somit ebenfalls wünschenswert, entsprechende *caged*-Derivate der  $\gamma$ -Alkyl Nucleosidtriphosphate herzustellen, um eine gezielte Freisetzung dieser Verbindungen zu ermöglichen.

Die beobachtete Stabilität dieser Verbindungsklasse gegenüber chemischer und enzymatischer Hydrolyse sollte für die weiter oben genannten Untersuchungen der Abspaltung der photolabilen MeNV-Maske ausgenutzt werden. Durch die Verwendung eines entsprechenden  $\gamma$ -Alkyl-MeNV-ATP-Derivats sollte das zu untersuchende Derivat und das freigesetzte  $\gamma$ -Alkyl-modifizierte ATP eine ausreichende Stabilität gegenüber einer ungewollten weiteren Spaltung aufweisen. Durch die Substitution der AB-Maske oder zweiten photolabilen Maske durch eine nicht UV-aktive Alkylkette können keine ungewollten Absorptionen auftreten, welche die Quantenausbeute der gewünschten Spaltreaktion senken würden. Darüber hinaus wird durch die hohe Lipophilie der Verbindung sichergestellt, dass die Verbindungen während der HPLC-Analyse eine gute Trennung aufweisen und die Signale ohne Überlagerung integriert werden können, sodass die Halbwertszeit möglichst fehlerfrei bestimmt werden kann. Durch diese drei Eigenschaften wurde die Verbindungsklasse der  $\gamma$ -Alkyl-modifizierte Triphosphate als potentiell geeignetes Testsubstrat für die Untersuchungen der Photolyse ausgewählt.

#### 4.6.1 Synthese von $\gamma$ -Alkyl-MeNV-ATP 86

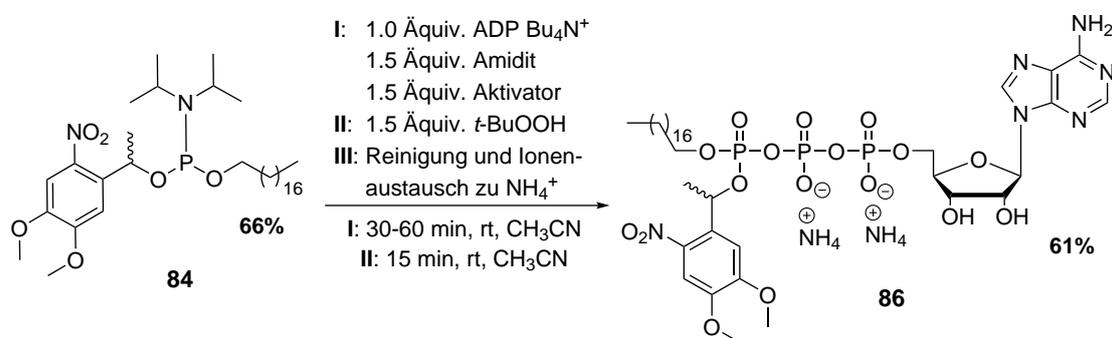
Als asymmetrische Verbindung sollte das gewünschte Testsubstrat, wie bereits in Abbildung 45 auf Seite 73 gezeigt, über die *H*-Phosphonat- wie auch Amiditroute darstellbar sein. Angelehnt an die zuvor erhaltenen Erkenntnisse, sollte auch in diesem Fall die Synthese des Produkts erneut zunächst über die Amiditroute getestet werden, da die erzielten Ausbeuten dort höher sind. Zudem kann für die Synthese des  $\gamma$ -Alkyl-MeNV-ATP-Derivats auf das zuvor hergestellte Bis-Amidit **79** als Ausgangsverbindung zurückgegriffen werden. Die Reaktion zum Amidit **84** ist in Abbildung 53 dargestellt.



**Abbildung 53:** Synthese des Amidits **84** ausgehend vom Bis-Amidit **79** durch DCI-vermittelte Kupplung mit 1-Octadecanol.

Das gewünschte Amidit konnte in einer Ausbeute von 66 % dargestellt werden. Im Vergleich zu anderen in dieser Arbeit durchgeführten DCI-vermittelten Kupplung ist die hier erreichte Ausbeute jedoch schlechter. Es konnte die zusätzliche Bildung des Phosphits **85** beobachtet werden, welches in einer Ausbeute von 17 % isoliert wurde. Das Produkt konnte dabei sehr gut daran charakterisiert werden, dass es zum einen keine Diastereomere gebildet hat und dass das erhaltene  $^{31}\text{P}$ -NMR Signal nicht wie zu erwarten bei einer chemischen Verschiebung von 149 ppm lag, sondern bei nur 130 ppm. Zudem konnten im  $^1\text{H}$ -NMR die doppelte Anzahl an Protonen für die Alkylgruppe beobachtet werden. Die Trennung des Amidits und des Phosphits durch Säulenchromatographie erwies sich darüber hinaus als nicht trivial, wodurch wegen der mehrfachen Durchführung der Reinigung von einem Ausbeuteverlust auszugehen ist, da Amidite bedingt durch ihre Labilität gegenüber Sauerstoff und Säuren zur Zersetzung während der säulenchromatographischen Reinigung neigen.

Nachdem das Amidit **84** isoliert werden konnte, wurde dieses mit ADP und DCI als Aktivator zum entsprechenden gewünschten Zielprodukt **86** umgesetzt. Die Synthese ist in Abbildung 54 beschrieben.



**Abbildung 54:** Synthese von  $\gamma$ -Alkyl-MeNV-ATP **86** ausgehend vom Amidit **84** durch DCI-vermittelte Kupplung mit ADP.

Die Kupplung zum gewünschten ATP-Derivat **86** konnte in einer guten Ausbeute von 61 % realisiert werden. Das Produkt konnte in Form einer gelben Watte isoliert werden und zeigte bereits im festen Zustand eine gewisse erwartete Stabilität, da selbst nach einem längeren Zeitraum keine signifikante Zersetzung beobachtet werden konnte. Während das MeNV-AB-ATP **82** zudem hygroskopisch war und sich auch bei Lagerung im

Tiefkühler bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durch langsame Hydrolyse zersetzt, konnte das synthetisierte  $\gamma$ -Alkyl-MeNV-ATP **86** beliebig lange bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden, ohne dass eine Zersetzung beobachtet werden konnte.

### 4.6.2 Photolyseuntersuchungen am Beispiel des $\gamma$ -Alkyl-MeNV-ATP **86**

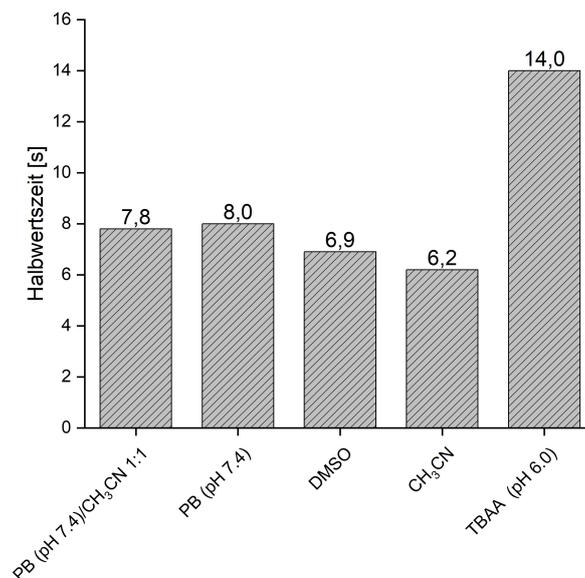
Nachdem das  $\gamma$ -Alkyl-MeNV-ATP **86** erfolgreich hergestellt werden konnte, sollte mit dieser Verbindung die lichtinduzierte Abspaltung der MeNV-Maske näher untersucht werden. Dazu sollte zeitgleich jeweils ein Parameter der Photolysebedingungen geändert werden und der entsprechende Einfluss auf die Spaltgeschwindigkeit bestimmt werden. Für diese Untersuchungen sollte jeweils der Einfluss des Lösungsmittel, des pH-Werts und der Abstand zur Lichtquelle untersucht werden. Im Folgenden werden die jeweils erhaltenen Ergebnisse dieser Untersuchungen vorgestellt.

#### 4.6.2.1 Einfluss des Lösungsmittel

Die Photolyse aller bisher hergestellten *caged*-ATP-Derivate erfolgte in einem 1:1 Gemisch von Phosphatpuffer (pH 7.4) und Acetonitril. Der Zusatz von Acetonitril war dabei, wie bereits in Abschnitt 4.4 erwähnt, notwendig, um die abgespaltenen lipophilen Masken des *lip*NV-ATPs **74** und *lip*MeNV-ATPs **76** zu lösen, da diese im reinen wässrigen Puffer ausfielen und die Photolyse daher stören beziehungsweise zu einer potentiellen Verfälschung der bestimmten Halbwertszeit führen würden. Der Zusatz von Acetonitril erfolgte anschließend bei allen Photolysen, um die erhaltenen Ergebnisse vergleichbar zu halten. Der Einfluss des Lösungsmittel und des pH-Werts auf die Photolyse wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Der Fokus dieser Arbeiten lag jedoch stets in der Aufklärung des Abspaltungsmechanismus der unsubstituierten 2-Nitrobenzylmaske (NB) bzw. dem entsprechenden methylsubstituierten Derivat (MeNB).<sup>[124, 125]</sup> Die Ergebnisse von WIRZ und SEED können jedoch aufgrund wesentlicher Unterschiede im Versuchsaufbau der Photolyse nicht mit den hier erzielten Arbeiten verglichen werden. Zum einen wurden als Lichtquelle in den erwähnten Arbeiten energiereiche Blitzlicht-Apparaturen sowie gezielte Laserpulse verwendet, während in der vorliegenden Arbeit, im Verhältnis zu einem Laser, schwache UV-LEDs und längere Bestrahlungsdauern verwendet wurden. Darüber hinaus wurde in den Arbeiten auch

nicht die hier verwendete MeNV-Gruppe verwendet, wodurch ein direkter Vergleich der Ergebnisse ebenfalls nicht möglich ist. Aus beiden Arbeiten lässt sich zusammenfassend jedoch festhalten, dass unter den dort gewählten Versuchsbedingungen eine Photolyse stets beobachtet werden konnte und der Einfluss des Lösungsmittels auf die jeweilige Freisetzung des Substrats nur von geringer Bedeutung war.

Wie bereits erwähnt, wurden in dieser Arbeit die Photolysen stets in einem 1:1 Gemisch aus Phosphatpuffer und Acetonitril durchgeführt. Diese Bedingungen sollten auch als Vergleichswert für die Untersuchungen der Abspaltgeschwindigkeit bei Variation des Lösungsmittels dienen. Der grundlegende Versuchsaufbau der Photolyse ist dabei jedoch unverändert zu den zuvor durchgeführten Hydrolysen. In Abbildung 55 sind die so ermittelten Halbwertszeiten für die Photolysen in verschiedenen Lösungsmitteln dargestellt.



**Abbildung 55:** Berechnete Halbwertszeiten für die Photolyse von  $\gamma$ -Alkyl-MeNV-ATP **86** in verschiedenen Lösungsmitteln. Die Halbwertszeiten sind jeweils an den entsprechenden Balken angegeben.

Wie in Abbildung 55 zu erkennen, konnte unter den in dieser Arbeit definierten Photolysestandardbedingungen eine Halbwertszeit von 7.8 Sekunden für das  $\gamma$ -Alkyl-MeNV-ATP **86** festgestellt werden. Das Alkyl-Derivat wird somit, trotz identischer MeNV-Maske,

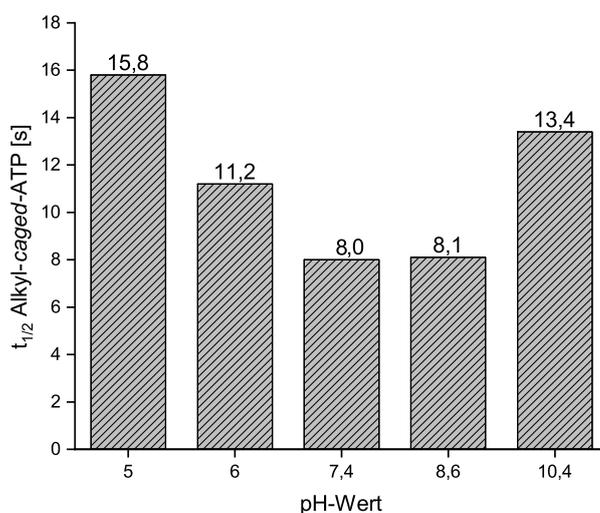
signifikant langsamer gespalten als beim AB-MeNV-ATP **82** (3.2 s), jedoch immer noch signifikant schneller als das Bis-MeNV-ATP **76** (17 s). Die Vermutung, dass die MeNV-Gruppe im Alkylderivat **86** schneller gespalten wird als im entsprechenden AB-Derivat **82** konnte nicht bestätigt werden. Dieser Umstand ist in sofern nicht zu erwarten gewesen, da die lipophile Alkylkette im Vergleich zur lipophilen AB-Maske keinerlei Absorption von UV-Licht aufweist. Warum das MeNV-AB-ATP **82** trotz dessen circa doppelt so schnell gespalten wird kann nicht beantwortet werden.

Beim Vergleich der ermittelten Halbwertszeiten in verschiedenen Lösungsmitteln zeigt sich zunächst keine signifikante Änderung. Die bestimmten Halbwertszeiten für die Photolyse in reinen Phosphatpuffer (pH 7.4), DMSO und Acetonitril sind vergleichbar zu der ermittelten Halbwertszeit unter Standardbedingungen. Bei der Verwendung von DMSO und Acetonitril ist jeweils eine etwas schnellere Spaltung der Maske zu beobachten, während die Photolyse in purem PB circa die selbe Halbwertszeit wie unter Standardbedingungen aufweist. Ein signifikanter Unterschied konnte nur in der Photolyse in TBAA-Puffer beobachtet werden, da in diesem die Halbwertszeit circa doppelt so hoch ist wie unter den definierten Standardbedingungen. Bei dieser Aussage muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass der verwendete TBAA-Puffer einen pH-Wert von 6.0 aufweist, da es aufgrund der starken Pufferwirkung nicht möglich war den Puffer auf einen pH-Wert von 7.4 einzustellen. Um zu bestimmen, ob der signifikante Unterschied in den bestimmten Halbwertszeiten vom Lösungsmittel oder vom pH-Wert abhängt, sollte im nächsten Experiment der Einfluss des pH-Wertes untersucht werden.

### 4.6.2.2 Einfluss des pH-Werts

Im Folgenden soll der Einfluss des pH-Werts auf die Abspaltungsgeschwindigkeit untersucht werden. Der pH-Wert sollte im Gegensatz zum verwendeten Lösungsmittel in der Theorie einen größeren Einfluss auf die Photolyse haben, da während der Abspaltung verschiedene Übergangszustände durchlaufen und Intermediate gebildet werden, welche protoniert und deprotoniert werden müssen. Die Lebensdauer und Stabilität der gebildeten Intermediate ist dabei stark vom pH-Wert abhängig. So konnte von WIRZ festgestellt werden, dass zum Beispiel das gebildete Hemiacetal **30** bei verschiedenen pH-Werten unterschiedlich langlebig ist (Abb. 17, S. 27).<sup>[124]</sup> Die eigentliche Freisetzung des entsprechend geschützten Substrats erfolgt durch die Umlagerung des Hemiacetals

**30.** Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die Stabilität des gebildeten Hemiacetals einen Einfluss auf die Spaltgeschwindigkeit haben sollte. Um den Einfluss des pH-Werts auf die Abspaltung der MeNV-Gruppe vom  $\gamma$ -Alkyl-MeNV-ATP **86** zu untersuchen, wurden Phosphatpuffer mit unterschiedlichen pH-Werten ausgehend vom bereits verwendeten Phosphatpuffer (pH 7.4) durch die Zugabe von verdünnter Natronlauge oder Phosphorsäure hergestellt. Die entsprechenden erhaltenen Halbwertszeiten für die durchgeführten Photolysen sind in Abbildung 56 dargestellt.



**Abbildung 56:** Berechnete Halbwertszeiten für die Photolyse von  $\gamma$ -Alkyl-MeNV-ATP **86** in Phosphatpuffer bei verschiedenen pH-Werten. Die Halbwertszeiten sind jeweils an den entsprechenden Balken angegeben.

Wie in Abbildung 56 zu erkennen, steigt die ermittelte Halbwertszeit in Abhängigkeit zum pH-Wert des verwendeten Phosphatpuffers. So konnte bei einem pH-Wert von 6.0 bereits eine Steigerung der Halbwertszeit um 44 % und bei einem pH-Wert von 5.0 eine Verdopplung der Halbwertszeit im Vergleich zu den zuvor definierten Standardbedingungen (pH = 7.4) festgestellt werden. Dieser Anstieg ist vermutlich auf die gehemmte, jedoch zwingend notwendige, Deprotonierung des Hemiacetals **30** zurückzuführen. Diese Beobachtung konnte bereits von WIRZ in seinen Studien beobachtet werden, welcher auch nachweisen konnte, dass das Hemiacetal bei einem pH-Wert von 3 für bis zu eine Minute per IR-Spektroskopie beobachtet werden kann.<sup>[124]</sup> In dieser Arbeit wurden,

bedingt durch das verwendete Triphosphat, jedoch keine weiteren Photolysen bei pH-Werten kleiner 5.0 durchgeführt, da bei niedrigen pH-Werten die Phosphatgruppen stufenweise protoniert werden. Durch die Protonierung sind die Anhydridbindungen nicht mehr durch die negativen Ladungen und den komplexierenden Kationen abgeschirmt, wodurch die reaktiven Anhydridbindungen schnell durch Nucleophile gespalten werden können. Durch die Protonierung der Phosphate werden die Verbindungen zudem unlöslicher in wässrigen Medien, da die hydrophilen Ladungen neutralisiert wurden.

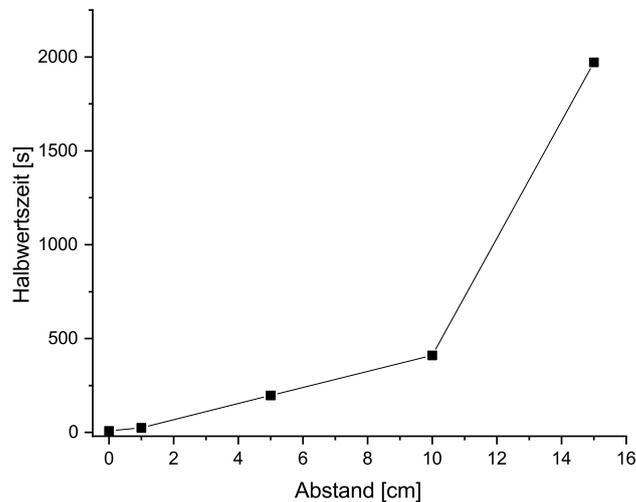
Ein Anstieg der Halbwertszeit um 68% konnte bei der Verwendung eines basischen Phosphatpuffers (pH = 10.4) im Vergleich zu den Standardbedingungen festgestellt werden. Dieser Anstieg kann vermutlich ebenfalls mit Hilfe des Spaltmechanismus und mit dem Hemiacetal **30** erklärt werden, da die Bildung dieses Hemiacetals von der Protonierung des aci-Anions **28** zur (*E*)-aci Verbindung **29** abhängig ist. Im basischen Milieu ist diese Protonierung gehemmt, wodurch die Spaltgeschwindigkeit sinkt.

Aus den erhaltenen Daten ist somit festzuhalten, dass die Abspaltung der MeNV-Gruppe unabhängig vom pH-Wert immer abläuft, jedoch bei einem neutralen bzw. minimal basischen pH-Wert von 7-8 am schnellsten abläuft.

### 4.6.2.3 Einfluss des Abstands

Der Abstand der Probe zur Lichtquelle sollte in dem hier verwendeten Versuchsaufbau vermutlich einen essentiellen Einfluss auf die Spaltgeschwindigkeit haben. Es ist natürlich davon auszugehen, dass die Intensität der Lampe mit einem größer werdenden Abstand zur Probe abnimmt und die Spaltgeschwindigkeit somit sinkt, da die Lichtstärke abhängig von der ausgeleuchteten Fläche ist. Befindet sich die Probe direkt vor der LED ist eine maximale Intensität gewährleistet, da die ausgeleuchtete Fläche auf das Probengefäß limitiert ist und nur wenig Strahlung an der Probe vorbei scheinen kann. Bei der Vergrößerung des Abstands steigt der Anteil des Lichts, welcher an der Probe vorbei scheint, da das Licht durch keine Linse auf die Probe fokussiert wird, sondern einen Kegel mit einem Winkel von circa 180° ausleuchtet. Durch die hier durchgeführten Abstandsuntersuchung soll daher festgestellt werden, ob die Intensität der Lampe ausreicht, um auch weiter entfernt befindliche Proben in angemessenen Spaltgeschwindigkeiten zu photolysieren oder ob die Probe für eine ideale Photolyse immer direkt vor der LED positioniert werden muss. Diese Fragestellung ist in sofern relevant, da bei zu

bestrahlenden Volumina >1 mL größere Probenbehältnisse verwendet werden müssen und diese weiter von der LED entfernt sein müssten, um eine Bestrahlung des ganzen Volumens sicherzustellen. In den bisher durchgeführten Photolysen konnten immer kleine Volumina verwendet werden, sodass die Probe immer direkt vor der LED platziert werden konnte. Jedoch könnte es abhängig vom Experiment und des notwendigen Volumens nötig sein größere Gefäße zu bestrahlen, weshalb die durchgeführte Abstandsunter-suchung wichtige Hinweise auf einen möglichen experimentellen Aufbau geben könnte. Die in diesem Experiment ermittelten Halbwertszeiten sind in Abbildung 57 gegen den entsprechenden Abstand aufgetragen.



**Abbildung 57:** Berechnete Halbwertszeiten für die Photolyse von  $\gamma$ -Alkyl-MeNV-ATP **86** in Abhängigkeit zum Abstand zwischen UV-LED und Probengefäß.

Die durchgeführte Photolyse für den Startwert mit 0 cm Abstand entspricht den bereits zuvor durchgeführten standardisierten Photolysen und die ermittelte Halbwertszeit liegt wie bereits in Abbildung 55 gezeigt bei 8.0 s. Es wurde jedoch festgestellt, dass die Halbwertszeit sich bereits bei einem Abstand von 1 cm auf 24 s verdreifacht und anschließend zunächst bei einem Abstand von 10 cm linear auf circa sieben Minuten ansteigt. Anschließend kann eine noch weitere Verlangsamung der Spaltreaktion auf über eine halbe Stunde bei einem Abstand von 15 cm beobachtet werden. Aufgrund dieser Erkenntnis ist es daher zwingend notwendig das Probengefäß so dicht wie möglich

an der UV-Quelle zu positionieren, da die Lichtintensität bei größeren Abständen nicht mehr ausreichend ist, um die lichtinduzierte Abspaltung in einer ausreichenden Rate zu ermöglichen.

### 4.6.2.4 Einfluss der Wellenlänge

Einen wesentlichen Einfluss auf die Spaltgeschwindigkeit sollte auch von der verwendeten Wellenlänge ausgehen, wie bereits kurz im Abschnitt 4.4.2 erläutert wurde. Eine Abspaltung der *caged*-Gruppen kann nur stattfinden, wenn die Gruppe durch die verwendete Strahlung vom Grundzustand in einen energetische höheren Singulettzustand angeregt wird. Ausgehend von diesem angeregten Zustand erfolgt durch mehrere Umlagerungen und elektronische Übergänge die Abspaltung des entsprechenden Substrats. Sollte die verwendete Wellenlänge folglich zu energiearm, ergo zu langwellig, sein um die Anregung aus dem elektronischen Grundzustand zu ermöglichen kann keine Abspaltung erfolgen. Dieser Fakt äußerte sich bereits beim Vergleich der Halbwertszeiten für das NB- und NV-Derivat **71** bzw. **73** in Abschnitt 4.4.2, in welchem beide Derivate jeweils bei 365 nm bzw. 405 nm photolysiert wurden und die Halbwertszeit bei 405 nm etwa den dreifachen Wert betrug. Wie im Absorptionsspektrum der MeNV-Maske zu erkennen weist die MeNV-Maske mehrere unterschiedliche Absorptionsmaxima auf, welche theoretisch angeregt werden können. Unter den Standardphotolysebedingungen wird unter Verwendung der 365 nm UV-LED das Absorptionsmaximum bei circa 350 nm angeregt. Im Folgenden soll getestet werden, ob eine schnelle Spaltung auch bei einer Photolyse mit 405 nm möglich ist. Die Verwendung von solch energieärmeren Licht wäre vorteilhaft für die zelluläre Verwendung der Verbindungen, da dieses Licht unter keinen Umständen die Zellbestandteile schädigen kann und auch keine zellulären Verbindungen diese Wellenlänge absorbieren. Es zeigte sich, dass die MeNV-Gruppe bei vergleichbaren Bedingungen (Lösungsmittel, Konzentration und Leistung) mit 41 s deutlich langsamer bei 405 nm gespalten wird als bei 365 nm (8 s). Der in Abschnitt 4.4.2 beobachtete Trend der langsameren Spaltung bei 405 nm zeigt sich somit auch bei der MeNV-Gruppe.

## 4.7 Synthese und Untersuchung des NV-*caged*-d4T-Triphosphats 96

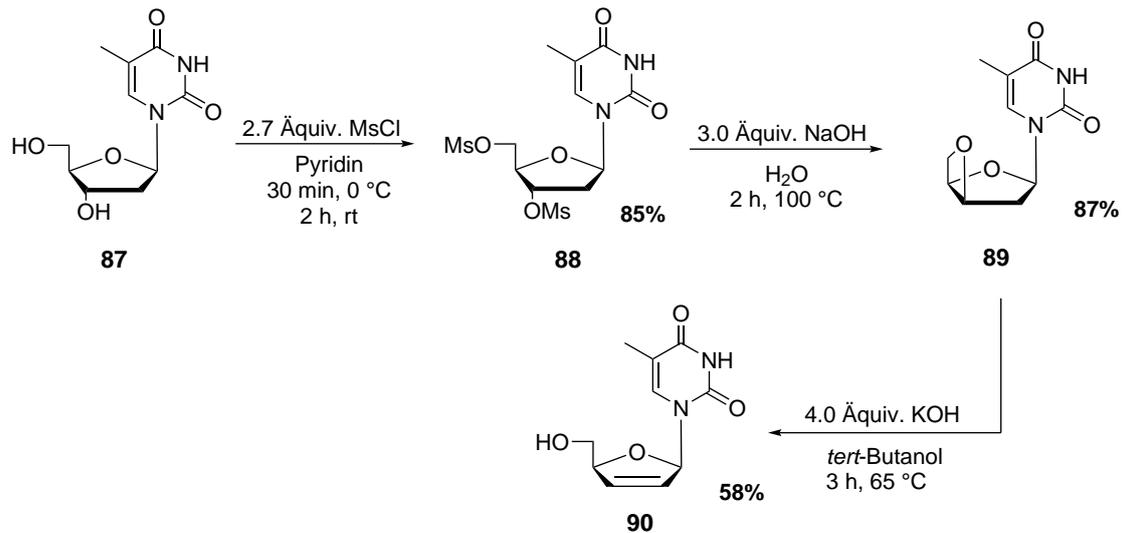
Im folgenden Abschnitt soll die Synthese und photolytische Untersuchung von symmetrischen NV-*caged*-d4T-Triphosphats (d4TTP) vorgestellt werden. Bei d4T handelt es sich wie bereits im Abschnitt 2.3.2 erläutert, um ein Nucleosidanalogon auf der Basis des natürlich vorkommenden Nucleosids Thymidin. Die Synthese von d4T wurde erstmals 1966 von HORWITZ publiziert und Ende der 80iger Jahre konnte eine antivirale Wirkung von d4T gegenüber des HI-Virus festgestellt werden.<sup>[126, 127]</sup> Nach der erfolgten Aufnahme von d4T in die Zelle wird dieses durch zelluläre Kinasen in das Nucleosidtriphosphat umgewandelt, welches die antiviral-aktive Form des d4Ts darstellt. Durch den Einbau des Nucleosidanalogons in den wachsenden viralen DNA-Strang durch die viruseigene Reverse Transkriptase erfolgt ein Strangabbruch, da die wachsende Kette nicht weiter verlängert werden kann. Dadurch wird eine Replikation des Virus unterbunden und die Viruslast in den infizierten Zellen effektiv gesenkt.<sup>[127]</sup>

Die Synthese der verschiedenen, bisher vorgestellten *caged*-ATP Derivate erfolgte zunächst zur Bereitstellung von maskierte ATP-Derivate, mit welchen die immunregulatorischen Funktionen des ATPs in entsprechenden Assays untersucht werden könnten. Darüber hinaus sollte das Konzept der *caged*-Maskierung jedoch auch auf weitere Nucleosidtriphosphate übertragen werden, welche zum Beispiel antivirale Eigenschaften aufweisen, um auch diese Prozesse zeit- und ortsabhängig durch die gezielte lichtinduzierte Freisetzung der maskierten Verbindungen untersuchen zu können. Aus dem *Pool* der verschiedenen antiviralen Verbindungen basierend auf Nucleosidanaloga wurde dabei bewusst das d4T-Triphosphat gewählt, da mit dieser Verbindung auch eine weitere Fragestellung geklärt werden sollte: Während der Photolyse der symmetrischen nicht lipophilen *caged*-ATP Derivate (NB, NV und MeNV) konnte das entsprechende Nitroso-Spaltprodukt nie während der durchgeführten HPLC-Analyse beobachtet werden. Bereits KAPLAN vermutete bei seinen Arbeiten mit dem monomaskierten NB-ATP, dass das freiwerdende Spaltprodukt mit dem freigesetzten ATP reagieren könnte.<sup>[107]</sup> Bei der Verwendung von d4TTP als maskierte Verbindung ist nach der photolytischen Spaltung der *caged*-Masken eine Reaktion mit dem Nucleotid ausgeschlossen, da d4T keine reaktiven Gruppen, wie zum Beispiel das exocyclische Amin oder die Hydroxygruppen des ATPs aufweist, welche mit dem gebildeten Nitrosobenzaldehyd reagieren könnten. Sollte es folglich möglich sein, das Nitroso-Spaltprodukt während der Photolyse eines symme-

trischen *caged*-d4TTP Derivats bei Verwendung der selben Photolysebedingungen und HPLC-Methode zu beobachten, kann angenommen werden, dass das gebildete ATP mit dem Spaltprodukt reagiert. Als *caged*-Gruppe wurde dabei auf die NV-Gruppe zurückgegriffen, da das Absorptionsspektrum dieser Verbindung im Vergleich zur NB-Gruppe durch die charakteristischen Banden zwischen 300 - 390 nm leichter zu detektieren ist und das Spaltprodukt dadurch leichter zu identifizieren sein sollte. Darüber hinaus zeigten die zuvor durchgeführten Untersuchungen, dass die NV-Gruppe im Vergleich zur NB-Gruppe schneller gespalten werden sollte. Auf die Verwendung der MeNV-Gruppe wurde auf Grund der Bildung des komplexen Diastereomerenmischungs verzichtet, welches die Reinigung und Analytik durch NMR-Spektroskopie erschweren würde.

### 4.7.1 Synthese des symmetrischen NV-*caged*-d4T-Triphosphats **96**

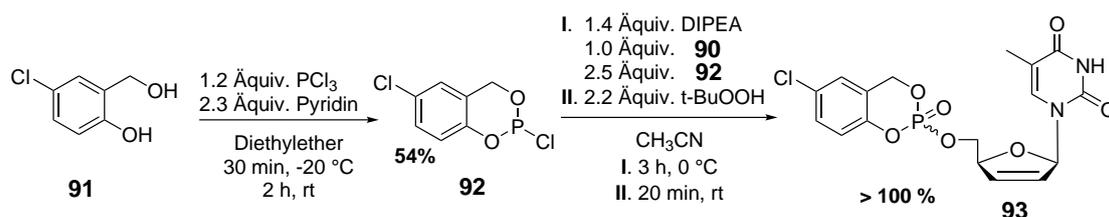
Die Synthese des NV-*caged*-d4TTPs **96** sollte durch die Kupplung des d4T-Diphosphats (d4TDP) mit dem bereits beschriebenen Bis-NV-Amidit **69** erfolgen. Die Synthese des d4TDP erfolgte dabei, angelehnt an die von HORWITZ publizierte Synthese von d4T, ausgehend von Thymidin und die weitere Synthese zum Diphosphat erfolgt anschließend angelehnt an die Arbeiten von GOLLNEST, welcher die Darstellung des d4TDPs durch die *cycloSal*-Methode beschrieb.<sup>[79, 126]</sup> Die Synthese von d4T ausgehend von kommerziell erhältlichen Thymidin ist in Abbildung 58 dargestellt. Im ersten Syntheseschritt erfolgte die Umsetzung von Thymidin mit einem Überschuss an Mesylchlorid, um die Hydroxygruppen durch die Modifikation mit Mesylgruppen in gute Abgangsgruppen zu überführen. Das Mesylderivat **88** konnte in einer guten Ausbeute von 85 % erhalten werden. Im nächsten Syntheseschritt wurde das erhaltene Mesylderivat **88** mit einem Überschuss an Natronlauge in der Siedehitze umgesetzt. Es wird dabei angenommen, dass durch den Angriff eines Hydroxidions an der 5'-Position zunächst in einem S<sub>N</sub>2-Mechanismus die Mesylgruppe abgespalten wird und ein entsprechendes Alkoholat erhalten wird. Dieses kann anschließend intramolekular nach einem S<sub>N</sub>2-Mechanismus an der Rückseite des 3'-Kohlenstoffatoms angreifen, wodurch zeitgleich die entsprechende 3'-Mesylgruppe abgespalten wird und das gewünschte 3',5'-Anhydrothymidin **89** erhalten wird. Die Darstellung des Derivats **89** gelang ebenfalls in einer guten Ausbeute von 87 %. Im letzten Syntheseschritt wurde das erhaltene 3',5'-Anhydrothymidin **89** in *tert*-Butanol gelöst und mit einem Überschuss Kaliumhydroxid in der Siedehitze umgesetzt. Durch



**Abbildung 58:** Synthese von d4T **90** ausgehend von Thymidin **87** nach dem Syntheseprotokoll von HORWITZ.<sup>[126]</sup>

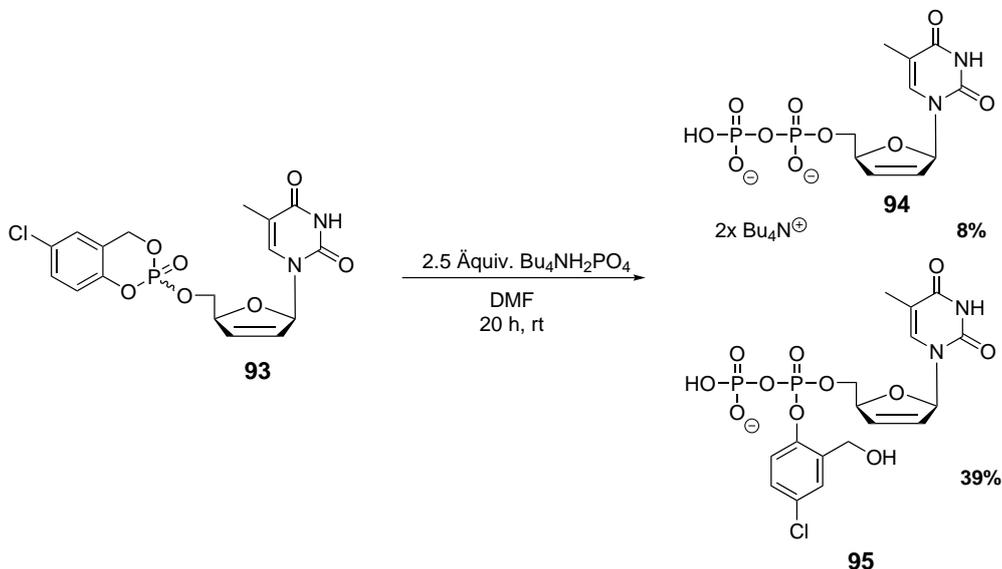
das gebildete *tert*-Butanolat erfolgt eine Deprotonierung an der 2'-Position, wodurch in einem nachfolgendem E2-Mechanismus am benachbarten 3'-Kohlenstoffatom das Sauerstoffatom abgespalten und zeitgleich eine Doppelbindung zwischen dem 2'- und 3'-Kohlenstoffatom ausgebildet wird. Durch die Abspaltung des Sauerstoffatoms wird an der 5'-Position der Alkohol zurückgebildet, wodurch die gewünschte Zielverbindung **90** erhalten wird, welche in einer Ausbeute von 58 % erhalten werden konnte. Neben dem gewünschten d4T **90** wurden zudem 20 % des eingesetzten Edukts **89** reisoliert, sodass die Reaktion bei erneuter Durchführung länger als die hier verwendeten drei Stunden erhitzt werden sollte.

Nachdem die Verbindung **90** erfolgreich dargestellt werden konnte, sollte als nächstes das d4TDP hergestellt werden. Die Synthesen wurden dabei an den Arbeiten von GOLL-NEST angelehnt, welcher zunächst den 5-Chlor-*cycloSal*-d4TMP-Triester **93** herstellte, um aus diesem anschließend das d4T-Diphosphat herzustellen. Die Synthese ist in Abbildung 59 dargestellt.



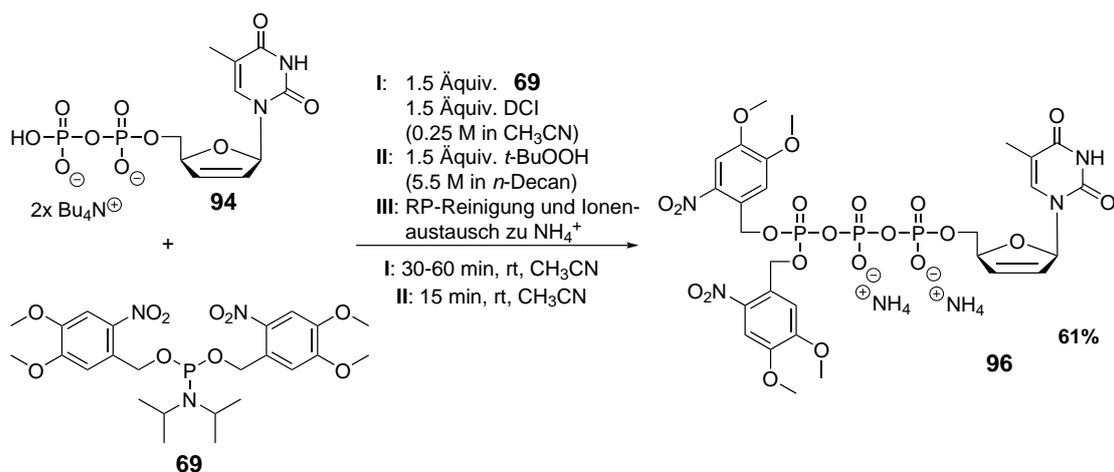
**Abbildung 59:** Synthese des 5-Chlor-*cycloSal*-d4TMP-Triesters **93** durch Kupplung der Verbindung **92** mit d4T **90**. Das Produkt konnte nur verunreinigt isoliert werden, da eine säulenchromatographische Reinigung aufgrund der Labilität des Triesters **93** nicht möglich war.

Das 5-Chlorsaligenylchlorphosphit **92** konnte als Gemisch von zwei Enantiomeren in einer Ausbeute von 54 % erhalten werden. Die erreichte Ausbeute ist dabei vergleichbar mit zuvor durchgeführten Arbeiten.<sup>[70, 79]</sup> Ausgehend von dem cyclischen Chlorphosphit konnte die Kupplung mit dem zuvor hergestellten d4T **90** realisiert werden. Eine Reinigung des Rohprodukts war jedoch aufgrund der beobachteten Labilität des Triesters **93** nicht möglich, da dieser bereits eine Zersetzung bei der dünnschichtchromatographischen Reaktionsverfolgung aufzeigte. Auf eine weitere Reinigung wurde somit verzichtet und das Rohprodukt wurde mit den vorhandenen Verunreinigungen in dem nächste Syntheseschritt verwendet. Die Synthese zum Diphosphat ist in Abbildung 60 dargestellt.



**Abbildung 60:** Synthese des d4T-Diphosphats **94** ausgehend von dem verunreinigten *cycloSal*-Triester **93**.

Die Synthese des Diphosphats **94** konnte nur in einer schlechten Ausbeute von 8 % realisiert werden. Die Darstellung des Diphosphats **94** erfolgt dabei durch einen nucleophilen Angriff des zugegebenen Monophosphatsalzes am Phosphoratom des *cycloSal*-Triesters **93**. Durch den Angriff erfolgt zunächst der Bindungsbruch zum phenolischen Sauerstoffatom und anschließend, bedingt durch die Umpolung des phenolischen Sauerstoffatoms zum starken Elektronendonator, erfolgt der Bindungsbruch zum benzyllischen Sauerstoffatom. Durch diesen Bindungsbruch erfolgt die vollständige Abspaltung der *cycloSal*-Maske und die Freisetzung des Diphosphats **94**. Der detaillierte Mechanismus der Abspaltung der *cycloSal*-Maske wurde bereits auf Seite 18 in Abbildung 12 vorgestellt. Während der Reinigung konnten als überwiegendes Produkt der Synthese in einer Ausbeute von 39 % das Derivat **95** isoliert werden. Die Bildung dieses Produktes erfolgt, wenn nach dem Angriff des Monophosphatsalzes zuerst die Bindung zur Benzylposition gespalten wird. Die Spaltung dieser Bindung ist nicht favorisiert, da die Bildung des Phenolats durch die bessere Stabilisierung der negativen Ladung bevorzugt ist. Es ist daher zu vermuten, dass der eigentlich nicht favorisierte Bindungsbruch zur Benzylposition durch den Einsatz des stark verunreinigten Triesters **93** begünstigt wurde. Aufgrund der hohen Verunreinigung des Rohprodukts durch die Bildung des Nebenprodukts **95** und den durch den Einsatz des verunreinigten Triesters **93** ebenfalls mit eingetragenen Verunreinigungen gestaltete sich die Reinigung des Diphosphats als nicht trivial und musste mehrfach wiederholt werden. Es ist davon auszugehen, dass die wiederholten Reinigungsschritte zu einer teilweisen Zersetzung des Diphosphats geführt haben, wodurch die Ausbeute noch weiter vermindert wurde. Ausgehend von der erhaltenen Menge des d4TDP **94** war es jedoch trotzdem möglich die Synthese zum entsprechenden symmetrischen NV-d4TTP **96** durchzuführen. Die Synthese ist in Abbildung 61 dargestellt. Das gewünschte symmetrische NV-geschützte d4TTP **96** konnte in einer guten Ausbeute von 61 % erhalten werden. Die erreichbare Ausbeute ist damit vergleichbar mit der Ausbeute für das symmetrisch NV-geschützte ATP **73**. Es zeigte sich auch in diesem Fall, dass die Darstellung von symmetrischen *caged*-Verbindungen basierend auf Benzylalkoholen in guten Ausbeuten über die Amidroute möglich ist und nicht auf die *H*-Phosphonatroute zurückgegriffen werden muss. Es zeigte sich jedoch auch, dass die Darstellung des notwendigen Nucleosiddiphosphats meist nur umständlich realisiert werden kann. Eine Alternative zu der in dieser Arbeit verwendeten Darstellung des Diphosphats wäre die Darstellung des d4TMP über die Synthesemethode von SOWA und



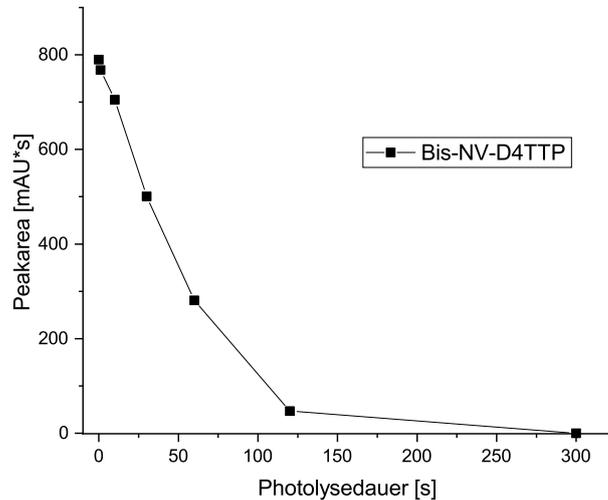
**Abbildung 61:** Synthese des symmetrischen NV-*caged*-d4TTPs **96** durch die Kupplung des Amidits **69** mit d4TDP **94**.

OUCHI.<sup>[128]</sup> Ausgehend vom Monophosphat wäre die Darstellung des Diphosphats durch die Umsetzung mit einem symmetrisch geschützten Amidit denkbar. Als Schutzgruppen würden sich in diesem Fall die Benzyl- oder Fluorenylmethylschutzgruppe anbieten. Die Darstellung des Diphosphats über die Syntheseroute mit der *cyclo*Sal-Maske gelang in den Arbeiten von GOLLNEST jedoch in guten Ausbeuten, weswegen die Synthesealternativen mit geschützten Amiditen nicht in Betracht gezogen worden. Es ist daher, im Vergleich zu den Arbeiten von GOLLNEST, davon auszugehen, dass die Darstellung des Diphosphats **94** nur aufgrund der vielen Verunreinigungen in einer schlechten Ausbeute von 8% realisiert werden konnte. Im Folgenden sollte anschließend die Photolyse des dargestellten symmetrischen NV-d4TTPs **96** untersucht werden, um zu überprüfen, ob die NV-Maske in einer zum ATP-Derivat **73** vergleichbaren Halbwertszeit abgespalten wird und ob das Nitroso-Spaltprodukt beobachtet werden kann.

#### 4.7.2 Photolyse des symmetrischen NV-*caged*-d4TTP **96**

Die Photolyse des symmetrischen NV-*caged*-d4TTP **96** erfolgte unter den zuvor definierten Standardbedingungen, um die erhaltenen Ergebnisse mit den Ergebnissen der Photolysen der *caged*-ATP Derivate zu vergleichen. Es wurde dabei eine 1 mg/mL Lösung der Verbindung **96** in einem 1:1 Gemisch aus Phosphatpuffer (pH 7.4) und Acetonitril hergestellt und mit der 365 nm UV Lampe bestrahlt. Die erhaltene Kurve für das

symmetrische NV-d4TTP **96** ist in Abbildung 62 dargestellt.



**Abbildung 62:** Zerfallskurve des symmetrischen NV-d4TTP **96**, welche durch das Auftragen der entsprechenden Peakflächen gegen die Belichtungszeit erhalten wurde.

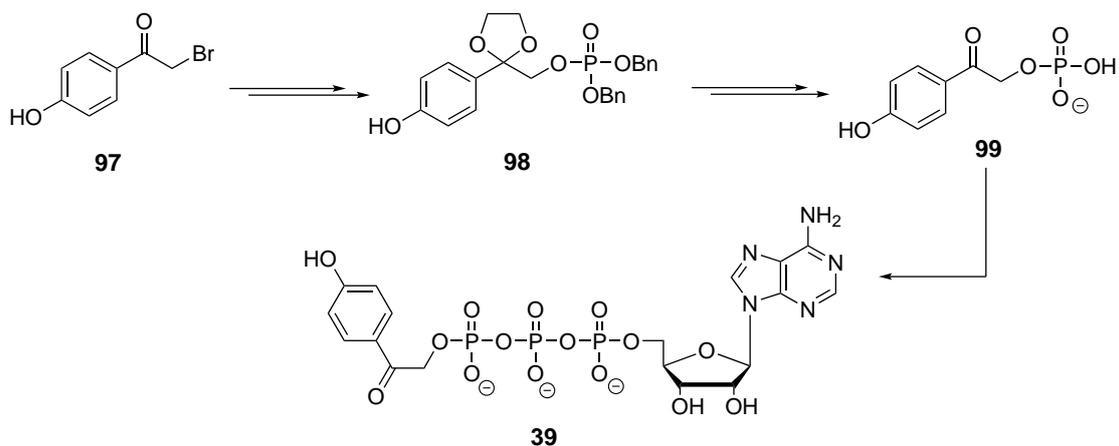
Aus den erhaltenen Chromatogrammen der HPLC-Analyse konnte die in Abbildung 62 dargestellte Kurve für das symmetrischen NV-d4TTP **96** erhalten werden. Eine Darstellung der Bildungskurve für das freiwerdende Intermediat mit nur noch einer NV-Maske oder dem daraus freiwerdenden d4TTP konnte nicht dargestellt werden, da beide Substanzen dieselbe Retentionszeit aufwiesen und somit nicht separiert integriert werden konnten, um die jeweilige Peakfläche zu bestimmen. Die beiden Substanzen konnten jedoch trotz derselben Retentionszeit an Hand ihrer UV-Spektren unterschieden werden, da im Laufe der Bestrahlungszeit die Intensität der charakteristischen Nitro-Absorptionsbande zwischen 300 nm bis 390 nm nicht mehr in dem überlagertem Signal festgestellt werden konnte. Die Halbwertszeit für das symmetrische NV-d4TTP **96** konnte durch einen exponentiellen Fit der dargestellten Kurve auf einen Wert von 42 s berechnet werden. Die Halbwertszeit ist somit circa zehn Sekunden höher als für das entsprechende NV-ATP Derivat **73**. Trotz der im Vergleich etwas langsameren Freisetzung kann jedoch trotzdem von einer zügigen Freisetzung des d4TTP gesprochen werden, da nach circa vier Minuten eine vollständige Abspaltung beider NV-Masken beobachtet werden konnte. Darüber hinaus konnte auch in dieser Photolyse bzw. bei der

durchgeführte HPLC-Analyse das Nitroso-Spaltprodukt nicht beobachtet werden. Es ist somit davon auszugehen, dass das Spaltprodukt nicht durch die HPLC-Säule eluiert werden kann, da es von der verwendeten stationären Phase immobilisiert wird. Es ist somit vermutlich auch unwahrscheinlich, dass das Nitroso-Nebenprodukt mit dem ATP reagiert und dadurch nicht detektiert wird.

Abschließend lässt sich somit festhalten, dass die Synthese des symmetrischen NV-d4TTP **96** in einer Ausbeute von 61 % gelang, die Darstellung des d4T-Diphosphats jedoch einer weiteren Optimierung bedarf, da dieses nur mit einer geringen Ausbeute von 8 % isoliert werden konnte. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Abspaltung der NV-Maske etwas langsamer erfolgte als bei dem entsprechenden NV-ATP-Derivat **73**, jedoch auch hier eine vollständige Abspaltung der Maske beobachtet werden konnte. Die Beobachtung des entstehenden Nitroso-Spaltprodukts gelang jedoch auch in der hier durchgeführten Photolyse des symmetrischen NV-d4TTP **96** nicht. Wodurch geschlossen werden kann, dass die Nitrosoverbindung nicht für die Detektion via RP-HPLC geeignet ist und im Fall der ATP-Derivate nicht von einer Reaktion mit dem ATP ausgegangen werden muss, wie von KAPLAN vermutet.<sup>[107]</sup>

#### 4.8 Symmetrisches *p*-Hydroxyphenylacyl-ATP

In der vorliegenden Arbeit sollte nicht nur die bereits intensiv untersuchte und in der Literatur breit verwendete 2-Nitrobenzyl-Schutzgruppe verwendet werden, sondern auch die weniger bekannte *p*-Hydroxyphenylacyl (pHP) Schutzgruppe. Die pHP-Gruppe hat gegenüber der 2-Nitrobenzyl-Gruppe den entscheidenden Vorteil, dass das freiwerdende Spaltprodukt (4-Hydroxyphenylelessigsäure) weder toxisch noch unlöslich in wässrigen Medien ist. Die notwendige Wellenlänge zur Spaltung der pHP-Maske liegt jedoch mit 300 nm in einem Bereich, in dem Schäden in einem zellulären Kontext nicht ausgeschlossen werden können. Jedoch sind weiterhin viele Fremdabsorptionen durch Aminosäuren und Nucleobasen bei dieser Wellenlänge ausgeschlossen. Die pHP-Schutzgruppe wurde erstmals 1996 von GIVENS als photolabile Schutzgruppe vorgestellt. GIVENS schützte das  $\gamma$ -Phosphat von ATP mit dieser Gruppe und zeigte anschließende die kontrollierte Freisetzung von ATP durch die Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 300 nm.<sup>[102]</sup> Das von GIVENS dargestellte monomaskierte pHP-ATP und die Schlüsselschritte zur Darstellung dieses Derivats sind in Abbildung 63 dargestellt.



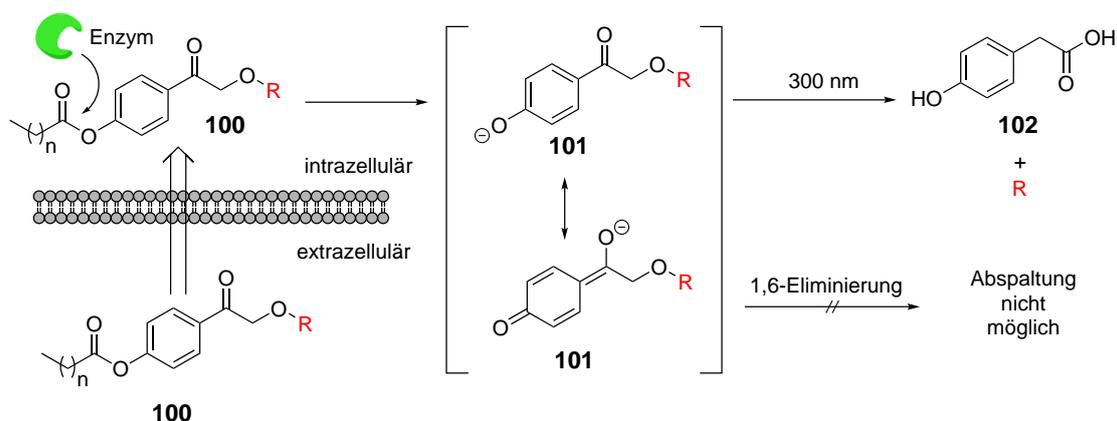
**Abbildung 63:** Synthesestrategie von GIVENS zur Darstellung des monogeschützten pHP-ATPs **39**.

Die Darstellung des pHP-ATPs **39** erfolgte ausgehend von der leicht herzustellenden, aber auch kommerziell erhältlichen, Verbindung **97**, welche zunächst durch ein Acetal geschützt wird und im Anschluss mit einem Bis-Benzylphosphat zum gezeigten Phosphat-Derivat **98** umgesetzt wurde. Dieses Phosphat wurde anschließend stufenweise entschützt, indem zunächst durch hydrogenolytische Spaltung die Benzylgruppen

entfernt und durch die Zugabe von Salzsäure das Keton **99** zurückgewonnen wurde. Im letzten Schritt wurde dieses Phosphat mit einem Imidazolium-ADP umgesetzt, um nach mehreren Reinigungsschritten das gewünschte Produkt **39** zu erhalten.

Zur Abgrenzung zu den Arbeiten von GIVENS sollte die in dieser Arbeit verwendete pHP-Maske jedoch modifiziert werden, um das bereits vorgestellte AB-Konzept mit dem der photospaltbaren Gruppen zu kombinieren und somit lipophile Verbindungen herzustellen. Durch diese lipophile Modifikation sollte das maskierte Substrat passiv in die Zelle gelangen können, jedoch erst nach entsprechender Beleuchtung und der damit verbundenen Abspaltung der pHP-Maske biologisch aktiv werden (vgl. Abschnitt 4.5). Dafür wäre zunächst die Veresterung der phenolische Hydroxygruppe im Sinne des AB-Konzepts notwendig, um eine entsprechende Erhöhung der Lipophilie zu erreichen. In vorangegangenen Arbeiten von GIVENS konnte jedoch gezeigt werden, dass die phenolische Hydroxygruppe für den Abspaltmechanismus essentiell ist und für die photolytische Spaltung nicht modifiziert sein darf, da diese während der Abspaltung eine Chinonmethid-Struktur ausbilden muss (vgl. Abschnitt 2.5). Jedoch ist dieser Umstand für die geplante Kombination aus AB-Konzept und photospaltbarer Gruppe nicht hinderlich, da ein lipophiler phenolischer Ester nach Aufnahme in die Zelle von entsprechenden Enzymen gespalten werden würde, wie bereits an einer Vielzahl an AB-maskierten Verbindungen in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte.<sup>[76, 114, 129]</sup> Die für das AB-Konzept notwendige 1,6-Eliminierung nach Spaltung des AB-Esters zur Freisetzung des AB-geschützten Substrats kann jedoch nach der enzymatischen Spaltung des pHP-Esters nicht erfolgen, da das Keton in *para*-Stellung zum Phenol diese Eliminierung verhindert. Die Kombination aus AB-Konzept und pHP-Gruppe ist zur besseren Übersicht in Abbildung 64 nochmals schematisch dargestellt.

Durch die Veresterung der pHP-Gruppe zu einem entsprechend langkettigen lipophilen Ester sollte es dem maskierten Substrat **100** möglich sein, durch passive Diffusion in die Zelle aufgenommen zu werden. In der Zelle sollte dieser Ester durch entsprechende Enzyme gespalten werden, um das nur noch pHP-geschützte Derivat **101** quantitativ freizusetzen. Nach einer ausreichend langen Inkubationszeit sollte es anschließend möglich sein, die pHP-Maske von Verbindung **101** abzuspalten und das Substrat *R* freizusetzen. Als Spaltprodukt würde *p*-Hydroxyphenylelessigsäure **102** gebildet, welche im Vergleich zum Nitrosospaltprodukt der NB-Gruppe weniger reaktiv sein sollte und zudem wasserlöslich sein sollte. Analog zu den zuvor in dieser Arbeit angefertigten maskierten ATP-

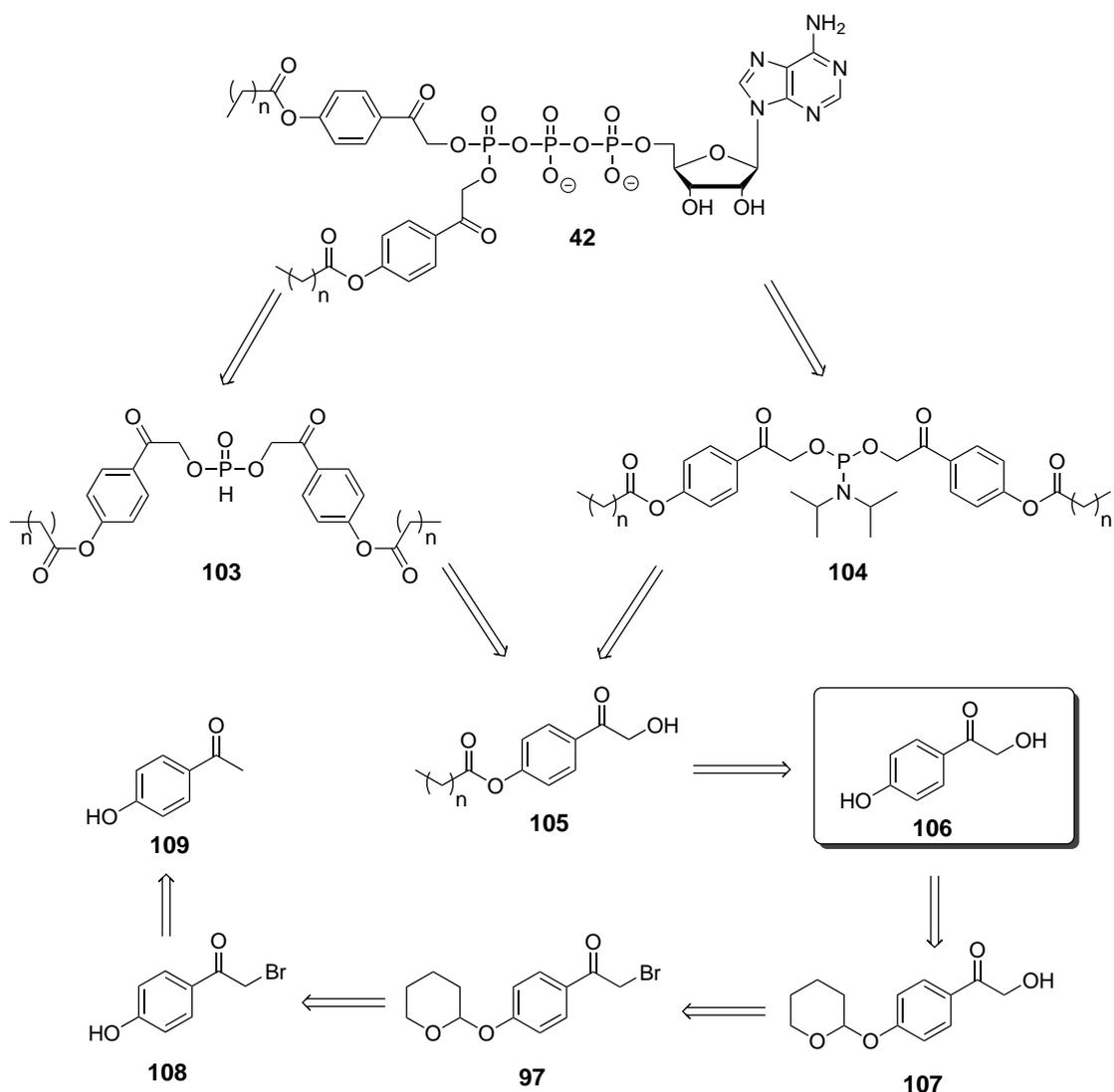


**Abbildung 64:** Schematische Darstellung der Kombination aus AB-Konzept mit der pHP-Schutzgruppe.

Derivaten wäre es erstrebenswert ein symmetrisches Bis-pHP-ATP zu synthetisieren, um die pHP-Gruppe bzw. die lichtinduzierte Freisetzung von ATP mit der zuvor ausgiebig untersuchten NB-Gruppe (und den entsprechenden Derivaten) vergleichen zu können. Zudem ist eine Erhöhung der Lipophilie für einen möglichen intrazellulären Einsatz durch die Verwendung von zwei Schutzgruppen leichter zu realisieren und es kann erneut auf die etablierten Syntheseprotokolle für TriPPP-Verbindungen zurückgegriffen werden.

#### 4.8.1 Retrosynthese des Bis-pHP-ATPs **42**

Das Retrosyntheschema zur Darstellung des Bis-pHP-ATPs **42** ist in Abbildung 65 abgebildet. Als Ziel galt es, zunächst aus der Ausgangsverbindung in vier Syntheseschritten die Verbindung **106** darzustellen, welche als Ausgangsverbindung für verschiedene lipophile Ester **105** dienen sollte. Ausgehend von den Estern sollte anschließend die Zielverbindung **42** über die *H*-Phosphonat- oder Amidroute darstellbar sein.



**Abbildung 65:** Retrosynthese des Bis-PHP-ATPs **42**.

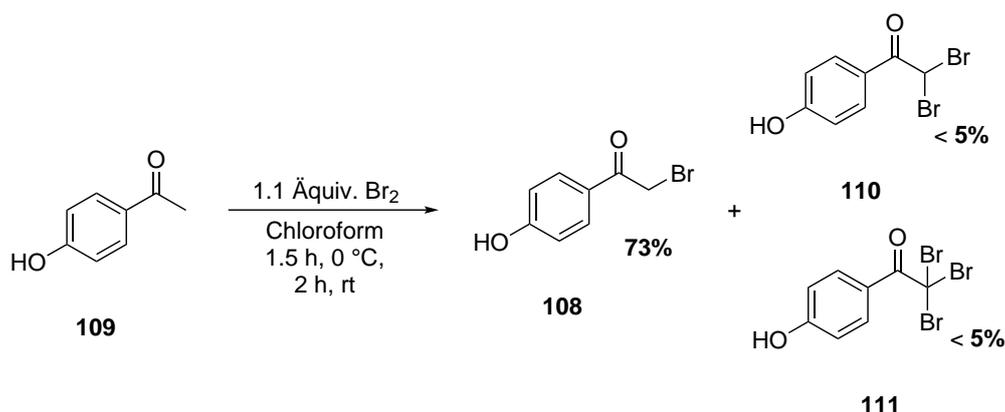
Das symmetrisch geschützte Bis-PHP-ATP **42** sollte durch eine der bekannten und etablierten Syntheserouten, angelehnt an die TriPPPro-Synthese, dargestellt werden können. Die Darstellung sollte dafür entweder ausgehend von dem *H*-Phosphonatediester **103**, durch die Aktivierung mit *N*-Chlorsuccinimid und der anschließenden Umsetzung mit ADP, oder aber ausgehend von dem Phosphoramidit **104** durch die Aktivator-vermittelte Kupplung mit ADP möglich sein. Der *H*-Phosphonatediester **103** sowie das Amidit **104** sollten ausgehend von entsprechenden Ester **105** durch die Kupplung an Diphenylphos-

phit **66** (*H*-Phosphonat) oder Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **61** (Amidit) darstellbar sein. Der Ester **105** sollte durch eine Veresterung des Phenols **106** erhältlich sein. Die Schlüsselverbindung **106** sollte durch die Abspaltung der THP-Schutzgruppe (Tetrahydropyran, THP) unter schwach aciden Bedingungen erhältlich sein. Der THP-geschützte Alkohol **107** sollte durch eine Hydroxylierung der Bromverbindung **97** darstellbar sein. Die Verbindung **97** sollte durch die THP-Schätzung des Phenols **108** erhältlich sein, welche wiederum aus dem kommerziell erhältlichen Acetophenon-Derivat **109** darstellbar sein sollte.

Die Darstellung der Schlüsselverbindung **106** erscheint in dem gezeigten Retrosyntheschema trivial, hat jedoch verschiedene Syntheseveruche benötigt, um eine verlässliche Synthese für dieses Molekül zu erarbeiten. Fehlgeschlagene Syntheseveruche bzw. Synthesestrategien, welche zu keinem positiven Ergebnis geführt haben, werden im Anschluss der erfolgreichen Synthese der Verbindung **106** kurz vorgestellt.

### 4.8.2 Synthese des Bis-pHP-ATPs **42**

Wie bereits in der Retrosynthese erläutert, soll im Folgenden zunächst die Darstellung der Schlüsselverbindung **106** vorgestellt werden und auch Syntheseveruche beschrieben werden, welche keine positiven Ergebnisse lieferten. Generell lässt sich festhalten, dass die Verbindung **106** trotz seiner simplen Struktur weder kommerziell erhältlich noch in der Literatur gut beschrieben ist. Als Ausgangsverbindung für die Darstellung der Verbindung **106** diente das kommerziell erhältliche 4-Hydroxyacetophenon **109**. Der erste Syntheseschritt ist in Abbildung 66 gezeigt.

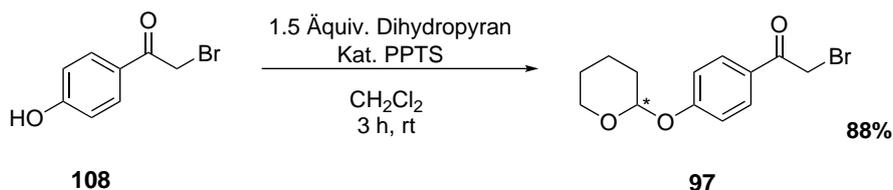


**Abbildung 66:** Bromierung des kommerziell erhältlichen 4-Hydroxyacetophenons **109** mit elementarem Brom. Neben dem gewünschten monobromierten Produkt **108** wurde auch die doppelt und dreifach bromierten Verbindungen **110** und **111** erhalten werden.

Das gewünschte Produkt konnte in einer Ausbeute von 73% erhalten werden. Es konnte darüber hinaus die Bildung der doppelt und dreifach bromierten Verbindungen **110** und **111** beobachtet werden. Beide Nebenprodukte konnten jedoch nicht rein isoliert werden, wodurch eine exakte Bestimmung der Ausbeute nicht möglich war. Die Produkte werden durch eine säurekatalysierte  $\alpha$ -Halogonierung erhalten. Die durch Zerfallprozesse des Chloroforms gebildete Säure verschiebt das Gleichgewicht der Keto-Enol-Tautomerie verstärkt auf die Seite des Enols, wodurch das Brom leicht in der  $\alpha$ -Position addiert werden kann. Die Zweit-, und Drittsubstitution ist jedoch im sauren Milieu aufgrund des Einflusses des ersten addierten Bromatoms auf das gebildete und notwendige Carbokation weniger favorisiert, wodurch diese Produkte auch nur in kleinen Mengen gebildet wurden.

Im nächsten Schritt sollte die phenolische Hydroxygruppe mit einer basenstabilen Schutzgruppe geschützt werden, da das Phenol einen störenden Einfluss auf die notwendige Hydroxylierung am bromierten Kohlenstoffatom hat.<sup>[130]</sup> Neben der Stabilität gegenüber Basen sollte die Schutzgruppe jedoch auch relativ milde wieder abgespalten werden können, da die Stabilität der Schlüsselverbindung **106** nicht eingeschätzt werden konnte. Somit wurde eine Vielzahl an Schutzgruppen basierend auf Ethern von Beginn an nicht in Betracht gezogen, da diese meist nur in stark aciden Bedingungen oder durch die Zugabe von Lewisäuren gespalten werden können. Auch auf einen Benzylether

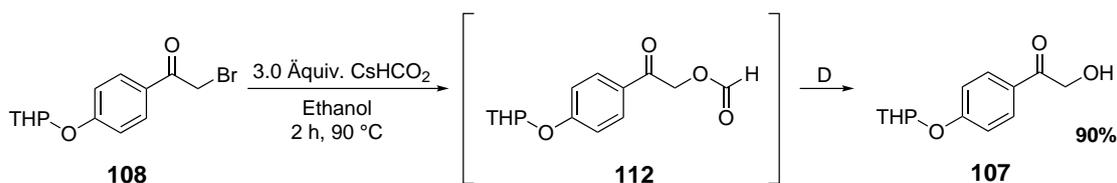
wurde verzichtet, da die Reaktivität des  $\alpha$ -Hydroxyketons in Verbindung **106** gegenüber reduktiven Bedingungen, wie Palladium auf Kohle in Kombination mit Wasserstoff, nicht eingeschätzt werden konnte. Als geeignete Schutzgruppe hat sich schließlich die THP-Gruppe herausgestellt, welche sowohl unter milden sauren Bedingungen in das Molekül eingebracht als auch abgespalten werden kann. Die Synthese der THP-geschützten Verbindung **97** ist in Abbildung 67 gezeigt.



**Abbildung 67:** Synthese des THP-geschützten Derivats **97** ausgehend von dem Phenol **108** (PPTS: Pyridinium-*p*-toluolsulfonat).

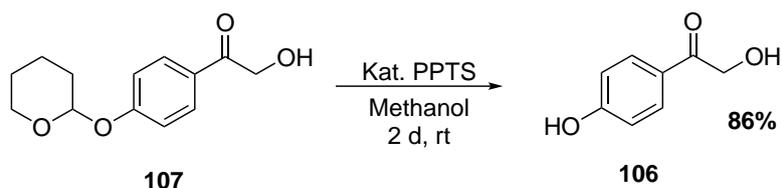
Das geschützte Derivat **97** konnte in einer guten Ausbeute von 88% erhalten werden. Durch die katalytische Menge Säure wird die Doppelbindung des zugegebenen Dihydropyrans protoniert, sodass ein stabiles Oxocarbeniumion gebildet wird. Dieses mesomeriestabilisierte Kation wird anschließend vom Phenol nucleophil angegriffen, wodurch nach Deprotonierung des phenolischen Sauerstoffatoms das gewünschte Acetal gebildet wird. Durch die Addition des Phenols an den Sechsring des Dihydropyrans wird jedoch ein neues Stereozentrum erhalten, wodurch das Produkt als Racemat erhalten wird.

Nachdem das basenstabil geschützte THP-Derivat **97** erhalten wurde, sollte die  $\alpha$ -Carbonylposition hydroxyliert werden. Während in der Literatur mehrere Wege beschrieben sind, um Alkohole in entsprechende Bromverbindungen zu überführen, wie zum Beispiel die Reaktion von Alkoholen mit Phosphortrihalogeniden oder der APPEL-Reaktion, so finden sich nur wenige synthetische Ansätze für den umgekehrten Fall.<sup>[131]</sup> Einer dieser Ansätze ist in Abbildung 68 dargestellt.



**Abbildung 68:** Hydroxylierung des Bromatoms durch Cäsiumformiat und der anschließenden Spaltung des intermediär gebildeten Ameisensäureesters zum Produkt **107**.

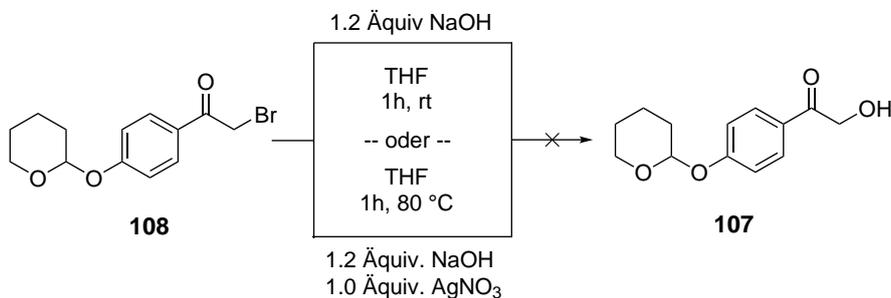
Das Produkt **107** konnte in einer sehr guten Ausbeute von 90 % erhalten werden. Als Nucleophil dient in dieser Synthese das Formiat, welches mit seinem negativen Sauerstoffatom in der  $\alpha$ -Position zum Keton angreift und das Bromatom substituiert. Das gebildete Bromid wird durch die Bildung von Cäsiumbromid aus der Reaktion entfernt, wodurch eine Rückreaktion nicht möglich ist. Der gebildete Ameisensäureester **112** ist jedoch unter den gewählten Synthesebedingungen nicht stabil, da dieser in der Siedehitze durch das Ethanol und die basischen Bedingungen gezielt gespalten wird, sodass aus dem Ester der gewünschte Alkohol **107** gebildet wird.<sup>[132]</sup> Unter geeigneten milderer Reaktionsbedingungen ist es darüber hinaus möglich den gebildeten Ester zu isolieren, sodass mit dieser Methode Bromide auch in Ester überführt werden können.<sup>[130]</sup> In späteren Reaktionen konnte zudem festgestellt werden, dass die THP-Schützung und die hier durchgeführte Hydroxylierung im sogenannten *one-pot*-Verfahren durchgeführt werden können. Dazu wird zunächst wie beschrieben die THP-Gruppe mit Dichlormethan als Lösungsmittel eingeführt und nach einem vollständigen Umsatz das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde anschließend in trockenem Ethanol aufgenommen und mit Cäsiumformiat versetzt, um die Hydroxylierung durchzuführen. Das Produkt **107** kann auf diesem Wege in einer vergleichbaren Ausbeute erhaltenen werden, es wird jedoch ein Reinigungsschritt eingespart. Nachdem das Bromatom durch die Hydroxygruppe substituiert wurde, musste im letzten Schritt die THP-Gruppe abgespalten werden. Die entsprechende Synthese ist in Abbildung 69 dargestellt.



**Abbildung 69:** Säurekatalysierte Abspaltung der THP-Schutzgruppe zur Darstellung des Phenols **106**.

Das Phenol konnte in einer guten Ausbeute von 86 % erhalten werden. Die Freisetzung des Phenols erfolgt dabei durch die Protonierung des phenolischen Sauerstoffatoms und dem anschließenden Angriff des Lösungsmittels Methanol am benachbarten stereogenen Kohlenstoffatom. Bei der Reaktion handelt es sich daher formal um eine Umacetalisierung.

Wie bereits am Anfang des Abschnitts erläutert wurde die Darstellung der Verbindung **106** auch über verschiedene weitere Synthesewege versucht. Dazu gehörte unter anderem der Versuch der Hydroxylierung der THP-geschützten Verbindung **97** mit Natronlauge mit und ohne den Zusatz von Silbersalzen, wie in Abbildung 70 dargestellt.

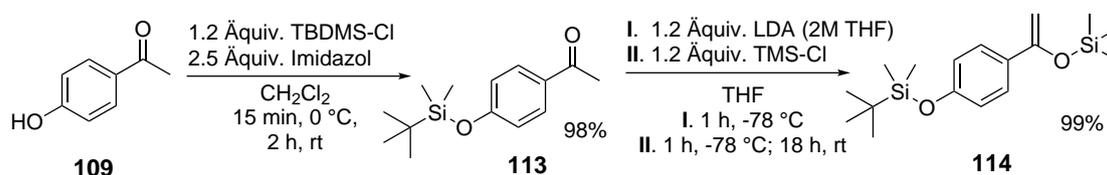


**Abbildung 70:** Versuch der Darstellung des Alkohols **107** durch die Umsetzung der Bromverbindung **108** mit Natronlauge.

Durch die Umsetzung der Bromverbindung **108** mit Natronlauge konnte das gewünschte Produkt nicht isoliert werden. Beim Rühren des Reaktionsgemisches bei Raumtemperatur konnte zunächst kein Umsatz beobachtet werden. Beim anschließenden Erhitzen der Reaktionslösung konnte eine Schwarzfärbung und per Dünnschichtchromatographie eine Zersetzung des Edukts in mehrere Verbindungen festgestellt werden. Eine Isolierung oder Identifizierung der entstandenen Verbindungen durch NMR-Spektroskopie

oder Massenspektrometrie gelang nicht. Im nächsten Schritt wurde die Reaktion in der Hoffnung wiederholt, dass die Abspaltung des Bromatoms durch die Zugabe von Silberionen vereinfacht verläuft, da sich das sehr stabile Silberbromid bilden würde, welches aufgrund seiner schlechten Löslichkeit ausfällt und das Reaktionsgleichgewicht verschieben würde. Es konnte jedoch erneut bei Raumtemperatur kein Umsatz und nach Erhitzen eine vollständige Zersetzung in verschiedene unbekannte Verbindungen beobachtet werden. Vermutlich erfolgte, unabhängig von der Zugabe von Silberionen, eine Deprotonierung an der vergleichsweise aciden  $\alpha$ -Carbonylposition. Das gebildete Anion wäre zum Einen durch das Carbonylsauerstoffatom mesomeriestabilisiert und zum Anderen verhindert die negative Ladung einen weiteren Angriff eines Nucleophils, wodurch das Bromatom nicht substituiert werden könnte. Theoretisch wäre zudem ein Angriff der negativen Ladung an einem noch nicht deprotonierten Eduktmolekül unter Substitution des Bromatoms oder eine Adolreaktion möglich, wodurch die Vielzahl an beobachteten Verbindungen erklärt werden würde.

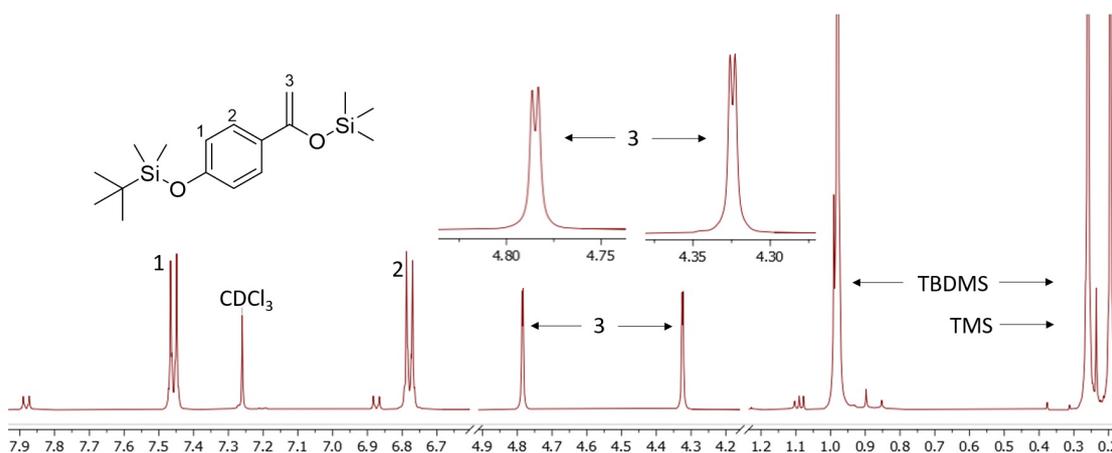
Ein weiterer Syntheseweg zur Darstellung von  $\alpha$ -Hydroxyketonen ist die Umsetzung eines entsprechenden Acetophenonderivats mit der sterisch anspruchsvollen, jedoch nicht nucleophilen, Base Lithiumdiisopropylamid (LDA) und einem anschließenden *trapping* des gebildeten Enols durch die Zugabe von TMS-Chlorid.<sup>[133, 134]</sup> Als Schutzgruppe für das Phenol wurde in diesem Syntheseansatz nicht die THP sondern eine TBDMS-Gruppe verwendet. Die Synthese ist in Abbildung 71 dargestellt.



**Abbildung 71:** Synthese des TMS-getrappten Enols **114** ausgehend von der TBDMS-geschützten Verbindung **113**.

Sowohl das TBDMS-geschützte Derivat **113** als auch das TMS-geschützte Derivat **114** konnten in fast quantitativen Ausbeuten erhalten werden. Die hohe Reaktivität des Phenols, bedingt durch das Keton in *para*-Stellung, zeigte sich durch die Tatsache, dass bereits nach einer Stunde ein vollständiger Umsatz der TBDMS-Schätzung beobachtet werden konnte. Die TBDMS-Gruppe wurde für diesen Syntheseansatz als Schutzgruppe

gewählt, da sich diese Gruppe theoretisch simultan mit der TMS-Gruppe durch die Zugabe eines Fluoridreagenzes abspalten lassen sollte. Die Bildung der TMS-geschützten Verbindung **114** erfolgte dabei durch die langsame Zugabe des Ketons **113** zu einer Lösung von LDA in Tetrahydrofuran bei  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Unter diesen Bedingungen wird ein Proton in der  $\alpha$ -Position zum Keton durch das LDA abstrahiert. Das gebildete Anion wird dabei durch die Carbonylgruppe stabilisiert und es bildet sich ein stabiles Enolat aus. Dieses Enolat greift im zweiten Schritt der Reaktion das zugegebene TMS-Chlorid nucleophil an, wodurch dieses schließlich TMS geschützt wird und die Verbindung **114** erhalten wird. Das Produkt konnte nach einer Filtration unter Schutzgas zur Abtrennung der entstandenen Salze ohne weitere Reinigungsschritte isoliert werden. Aufgrund der vermuteten hohen Reaktivität des TMS-Enolethers wurde das Produkt unter Stickstoff gelagert. In Abbildung 72 ist das aufgenommene  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Produkts dargestellt.

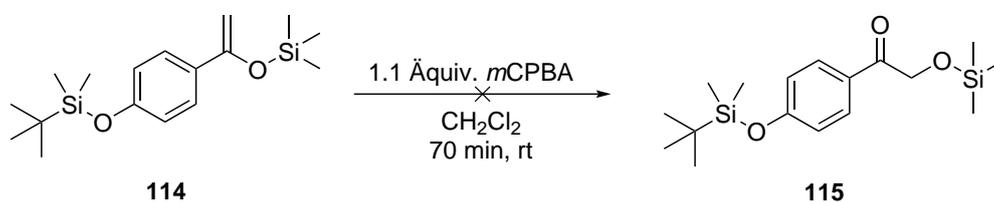


**Abbildung 72:** NMR-Spektrum des TMS-Enolethers **114**. Hervorgehoben und vergrößert sind die beiden vinylicen Protonen mit einer Verschiebung von 4.79 ppm und 4.33 ppm und der charakteristischen kleinen Kopplungskonstante (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , rt).

In dem gezeigten  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum können die beiden geminalen vinylicen Protonen mit einer Verschiebung von 4.79 ppm und 4.33 ppm zweifelsfrei in Form von zwei Dubletts mit einer typischen  $^2J$ -Kopplungskonstante von 1.7 Hz beobachtet werden.<sup>[135]</sup> Die ursprüngliche Methylgruppe des Acetophenons **113** konnte darüber hinaus nicht mehr beobachtet werden, stattdessen konnte ein Singulett bei einer Verschiebung von 0.20 ppm und einem Integral von Neun beobachtet werden, welches von der TMS-Gruppe

gebildet wird. Des Weiteren kann beobachtet werden, dass neben den dominanten Signalen für das Produkt alle Signale, bis auf die vinylischen und dem der TMS-Gruppe, doppelt auftauchen. Die zusätzlichen Signale weisen dabei circa eine relative Intensität von 5% auf und sind vermutlich auf das Edukt zurückzuführen. Es ist nicht auszuschließen, dass durch die schwach aciden Eigenschaften des Chloroforms die labile TMS-Gruppe gespalten wurde und das Edukt zurückgebildet wurde.

Im nächsten Schritt sollte aus dem TMS-Enolether durch eine Epoxidierung und anschließender Öffnung des Epoxids das TMS-geschützte Keton **115** erhalten werden. Die Synthese ist dabei angelegt an die Arbeit von HASSNER und die Synthesebedingungen sind in Abbildung 73 dargestellt.<sup>[133]</sup>

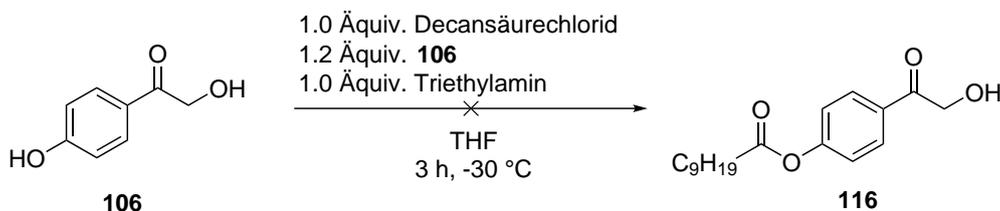


**Abbildung 73:** Syntheseversuch zur Darstellung des TMS-geschützten Ketons **115**. Das Produkt konnte nicht isoliert werden.

Das gewünschte Produkt konnte trotz mehrfacher Syntheseversuche und kleinen Variationen der Synthesebedingungen nicht isoliert werden. Es konnte in jedem Syntheseversuch die Bildung mehrerer nicht weiter identifizierbarer Verbindungen beobachtet werden. Diese Vielzahl an gebildeten Verbindungen konnte bereits während der dünn-schichtchromatographischen Reaktionsverfolgung beobachtet werden und eine Trennung dieses komplexen Gemisches war durch säulenchromatographische Methoden nicht möglich. Bei der Reaktion sollte durch die zugegebene *m*-Chlorperbenzoesäure in einer RUBOTTOM-Oxidation zunächst die Doppelbindung epoxidiert werden, indem diese nucleophil von der Persäure angegriffen wird. Durch die anschließende Abspaltung von *m*-Chlorbenzoesäure sollte das Epoxid erhalten werden. Das gebildete Epoxid ist jedoch relativ labil und wird von der abgespaltenen Säure protoniert und anschließend leicht geöffnet. Durch eine weitere Umlagerung der Silylgruppe und der damit verbundenen Stabilisierung des gebildeten Carbokations sollte anschließend das TMS-geschützte Keton **115** erhalten werden. Als mögliches Problem bei der Reaktion wurde der bereits durch Zerfallsprozesse in der Persäure enthaltene hohe Anteil an *m*-Chlorbenzoesäure

vermutet. Im Vergleich zur Persäure ist das entsprechende Benzoessäurederivat deutlich acider und kann somit den TMS-Enolether vor der eigentlichen Epoxidierung durch die Abspaltung der TMS-Gruppe spalten. Um dieses mögliche Problem auszuschließen, erfolgte bei einer Wiederholung der Synthese die Zugabe von festen Natriumhydrogencarbonat, welches nach Zugabe der Persäure die enthaltene *m*-Chlorbenzoessäure neutralisieren sollte. Es konnte jedoch auch in diesem Fall keine Isolierung des gewünschten Produkts **115** erfolgen, sondern wieder nur die Bildung verschiedener unbekannter Produkte beobachtet werden. Aufgrund der parallel erfolgreich durchgeführten Hydroxylierung der THP-geschützten Bromverbindung **108** zum  $\alpha$ -Hydroxyketon **107** mit Cäsiumumformiat wurde die RUBOTTOM-Oxidation nicht weiter verfolgt.

Nachdem die Schlüsselverbindung **106** erfolgreich synthetisiert werden konnte, sollten aus dieser Verbindung verschiedene lipophile Ester dargestellt werden, um eine spätere Membranpermeabilität des maskierten ATPs zu ermöglichen. Analog zum AB-Konzept sollte ausgehend von der Verbindung **106** ebenfalls die phenolische Hydroxygruppe verestert werden und nicht die Hydroxygruppe in  $\alpha$ -Stellung zum Keton. Die Darstellung des entsprechenden phenylischen Esters sollte daher zunächst analog zur Darstellung der AB-Ester erfolgen. Als einziger Unterschied zur Darstellung der AB-Ester wurde die Reaktion jedoch bei  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  durchgeführt, um eine möglichst selektive Reaktion am Phenol zu erreichen. Die Synthese ist in Abbildung 74 dargestellt.



**Abbildung 74:** Syntheserversuch zur Darstellung des lipophilen Esters **116** ausgehend vom Phenol **106** durch die Umsetzung mit Decanoylchlorid.

Weder der gewünschte Ester **116** noch das zu erwartende Nebenprodukt mit dem Ester an der  $\alpha$ -Hydroxygruppe konnte isoliert werden. Stattdessen konnte unter den gewählten Synthesebedingungen eine vollständige Zersetzung des Edukts bereits nach kurzer Syntheszeit via Dünnschichtchromatographie festgestellt werden. Eine gewisse Labilität des Edukts konnte bereits zuvor beobachtet werden, da zum Beispiel eine

Zersetzung der eingesetzten Verbindung **106** in DMSO- $d_6$  beobachtet werden konnte, weswegen entsprechende NMR-Untersuchungen stets in deuteriertem Acetonitril durchgeführt werden mussten. Weswegen jedoch in DMSO- $d_6$  und auch in dieser Reaktion eine Zersetzung beobachtet werden konnte ist unbekannt, da eine Identifizierung der gebildeten Produkte nicht gelang. Die Bildung eines entsprechenden lipophilen Esters ist jedoch für die Kombination der pHP-Gruppe mit AB-Konzept essentiell, weshalb die Synthese unter Variation verschiedener Parameter erneut erprobt wurde. Die entsprechenden Versuche sind in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4:** Übersicht über die durchgeführten Synthesversuche zur Darstellung des lipophilen Esters **116**.

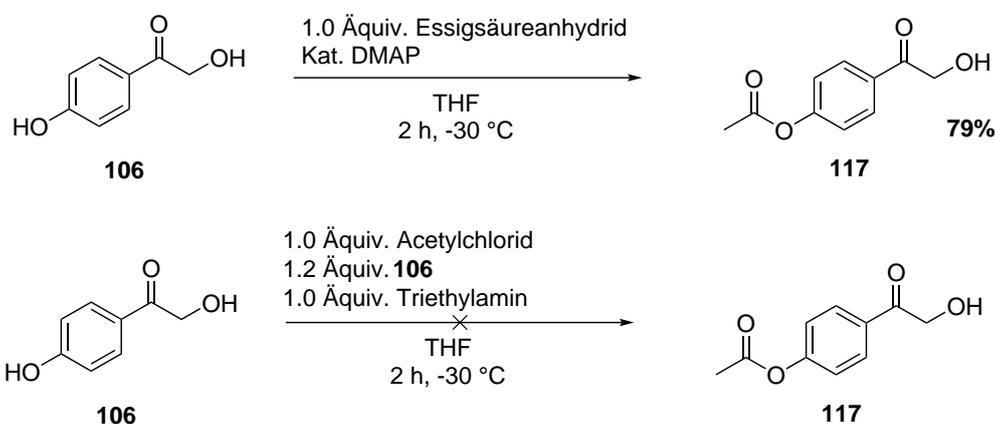
#	Lösungsmittel	Temperatur	Base	Zusatz	Ausbeute
1	THF	-30 °C	Triethylamin	-	Zersetzung
2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	-30 °C	Triethylamin	-	Zersetzung
3	THF	Raumtemperatur	Triethylamin	-	Zersetzung
4	THF	-30 °C	Pyridin	-	Zersetzung
5	THF	-30 °C	DMAP	-	Zersetzung
6	THF	-30 °C	Triethylamin	kat. DMAP	Zersetzung

Als Edukte diente immer Verbindung **106** (1.2 Äquiv.) und Decansäurechlorid (1.0 Äquiv.).

Als Ausgangs- und Vergleichssynthese für die durchgeführten Modifikationen wurde die in Abbildung 74 vorgestellte Synthese verwendet. Dieses ist auch zur besseren Vergleichbarkeit in Zeile 1 der Tabelle 4 mit dargestellt. Zunächst wurde versucht den gewünschte Ester **116** durch eine Variation des Lösungsmittels von Tetrahydrofuran zu Dichlormethan zu erhalten, jedoch zeigte sich auch in diesem Syntheseansatz eine Zersetzung des Edukts. Erneut wurde die Reaktion bei -30 °C durchgeführt, um auszunutzen, dass das Phenolat im Vergleich zur  $\alpha$ -Hydroxygruppe reaktiver ist. Um jedoch auszuschließen, dass die tiefen Temperaturen die Bildung des Esters verhindern, wurde die Reaktion im nächsten Versuch bei Raumtemperatur durchgeführt. Es zeigte sich jedoch erneut eine Zersetzung des Edukts. In den nächsten Versuchen wurde die Wahl der Base variiert und statt Triethylamin das weniger nucleophile und basische Pyridin verwendet. Zudem wurde Triethylamin auch in einem Syntheseansatz mit 4-(Dimethylamino)-pyridin

(DMAP) substituiert. In keinem Fall konnte jedoch das gewünschte Produkt **116** erhalten werden. Auch die Zugabe einer katalytischen Menge DMAP zu den definierten Standardbedingungen führte zu keiner Bildung des gewünschten Produkts, sodass durch keine der hier durchgeführten Modifikationen das Produkt erhalten werden konnte und stattdessen stets eine Zersetzung des Edukts beobachtet werden konnte. Die Zersetzung setzte dabei jedoch immer erst im Laufe der Reaktion ein, nachdem alle Reagenzien miteinander vermischt wurden und das Säurechlorid langsam zugegeben wurde. Es ist somit zu vermuten, dass die Zersetzung des Edukts **106** im Zusammenhang mit dem Säurechlorid beziehungsweise durch den vom Säurechlorid *in situ* gebildete Chlorwasserstoff erfolgt.

Um zu testen, ob die Zersetzung des Edukts **106** im Zusammenhang mit der Verwendung von Säurechloriden steht, sollte im nächsten Schritt die Synthese eines entsprechenden Esters mit einem Anhydrid erfolgen. Jedoch sind Säureanhydride von langkettigen Säuren, wie Decansäure, nicht kommerziell erhältlich und synthetisch nur aufwendig herzustellen und zu isolieren. Aus diesem Grund sollte die Synthese des Acetylesters **117** durch die Umsetzung des Phenols **106** mit Essigsäureanhydrid getestet werden. Zum Vergleich sollte dieselbe Verbindung auch durch die Umsetzung mit Acetylchlorid hergestellt werden, um die erhaltenen Resultate vergleichen zu können. Die Synthesen zum entsprechenden Acetylestern **117** sind in Abbildung 75 dargestellt.

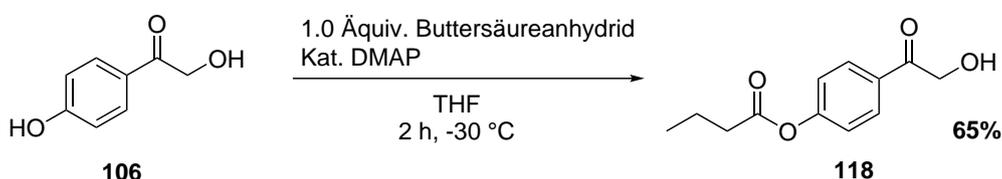


**Abbildung 75:** Versuchte Synthesen des Acetylestern **117** ausgehend vom Phenol **106** durch Umsetzung mit Essigsäureanhydrid oder Acetylchlorid.

Es konnte festgestellt werden, dass das gewünschte Produkt **117** durch die Umset-

zung mit dem Anhydrid erhalten werden konnte, während die Umsetzung mit dem Säurechlorid, wie zu erwarten, zu einer erneuten Zersetzung des Edukts geführt hat. Die Synthese konnte zudem, vermutlich durch die Durchführung bei tiefer Temperatur, wie gewünscht selektiv am Phenol mit einer Ausbeute von 79% durchgeführt werden. Das zweifach veresterte Produkt konnte in einer vernachlässigbaren Ausbeute von 9% isoliert werden. Die Bildung des entsprechenden  $\alpha$ -Hydroxyesters konnte nicht beobachtet werden. Es kann abschließend jedoch nicht vollständig geklärt werden, ob die Zersetzung des Edukts **106** durch das Säurechlorid, der zugesetzten Base, dem freiwerdenden Chlorwasserstoff oder der Kombination dieser Faktoren geschah, da die Zersetzung erst im Laufe der Reaktionszeit auftrat und noch nicht bei der Zugabe der einzelnen Reagenzien zu beobachten war. Festgehalten werden kann jedoch, dass die Synthese des Esters **117** mit Acetylchlorid eine Zersetzung wie bei dem Darstellungsversuche des lipophilen Esters **116** mit Decanoylchlorid zeigte.

Im Anschluss an die erfolgreiche Darstellung des Acetylesters **117** sollte zudem ein weiteres Derivat hergestellt werden, um die erfolgreiche Synthese des Esters basierend auf der Umsetzung mit Anhydriden zu validieren. Aufgrund der schlechten kommerziellen Verfügbarkeit von Anhydriden von langkettigen Fettsäuren konnte jedoch nur der Butylester **118** dargestellt werden, da Buttersäureanhydrid kommerziell erhältlich ist. Die Synthese ist in Abbildung 76 dargestellt.

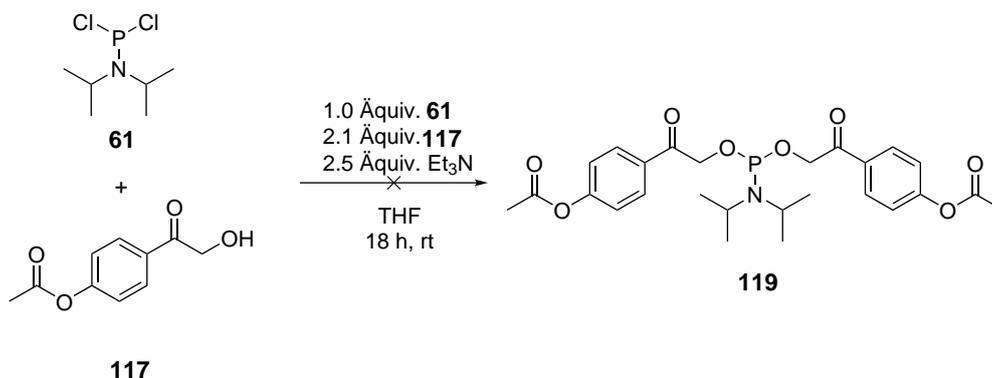


**Abbildung 76:** Synthese des Butylesters **118** ausgehend vom Phenol **106** durch Umsetzung mit Buttersäureanhydrid.

Der gewünschte Buttersäureester **118** konnte in einer Ausbeute von 65% isoliert werden. Die erreichte Ausbeute ist somit niedriger als beim vergleichbaren Acetylester **117**, jedoch immer noch aufgrund der potentiellen Nebenreaktionen als gut aufzufassen. Das doppelt veresterte Produkt konnte in diesem Fall zudem in einer leicht höheren Ausbeute von 11% erhalten werden. Die Bildung des  $\alpha$ -Hydroxyesters konnte jedoch erneut nicht beobachtet werden. Die schlechtere Ausbeute ist dabei vermutlich auf die geringere Re-

aktivität des verwendeten Anhydrids im Vergleich zum reaktiven Essigsäureanhydrid zurückzuführen. Auf eine längere Reaktionszeit wurde aufgrund der Bildung des doppelt veresterten Nebenprodukts verzichtet.

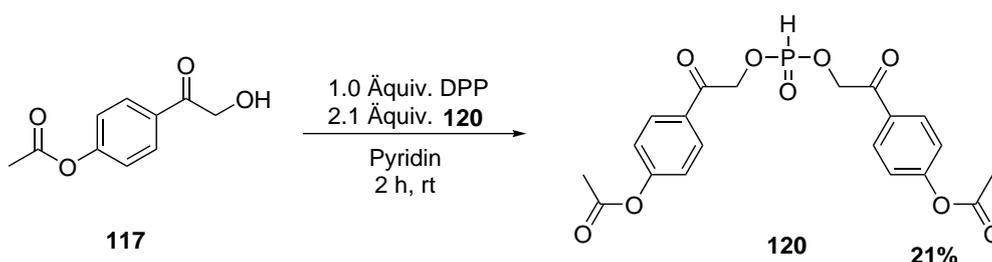
Ausgehend von den beiden hergestellten Estern **117** und **118** sollten im Folgenden zunächst die entsprechenden symmetrischen Phosphoramidite hergestellt werden, um anschließenden aus diesen die symmetrischen pHP-ATP Derivate zu erhalten. Aufgrund der kurzketigen Ester lag die Vermutung nahe, dass die Lipophilie der hergestellten ATP-Derivate nicht ausreichend gesteigert werden kann, um eine passive Diffusion durch Zellwände zu ermöglichen. Mit Hilfe der darzustellenden ATP-Derivate kann die Kombination aus pHP-Gruppe und AB-Konzept jedoch durch PLE-Hydrolyse und Photolyse getestet werden, um das Prinzip der Kombination aus AB- und pHP-Konzept zu validieren. Die Synthese der symmetrischen Phosphoramidite sollte dabei analog zur Darstellung der entsprechenden symmetrischen NB-Derivate erfolgen (Vgl. Abschnitt: 4.2.1, S. 49). Die Synthese wurde zunächst mit dem Acetylcster **117** durchgeführt und ist in Abbildung 77 dargestellt.



**Abbildung 77:** Syntheserversuch zur Darstellung des symmetrischen Amidits **119**. Das Produkt konnte nicht isoliert werden.

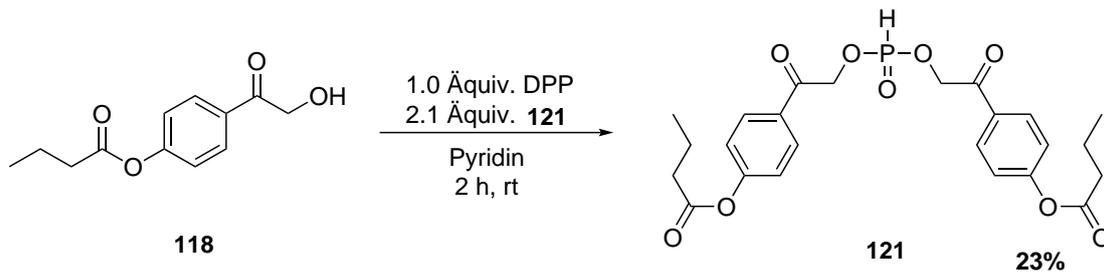
Das gewünschte Produkt konnte unter den bisher in dieser Arbeit erfolgreich angewendeten Synthesebedingungen für symmetrische Amidite nicht isoliert werden. Es konnte erneut eine Zersetzung, ähnlich zur beobachteten Zersetzung bei der Darstellung des Esters über das entsprechende Säurechlorid, festgestellt werden. Erneut misslang die Identifizierung der gebildeten Produkte. Im aufgenommenen <sup>31</sup>P-NMR konnten eine Viel-

zahl an Signalen beobachtet werden, welche aufgrund ihrer Verschiebung auf Phosphate (ca. 130 ppm), Amidate (ca. 8 ppm) oder Phosphate (ca. 0 ppm) zurückzuführen sein könnten. Eine Interpretation des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum war aufgrund der verschiedenen überlagernden Signale in unterschiedlichen Intensitäten nicht möglich. Wie bei dem Versuch der Darstellung des Esters **116** wurde auch in diesem Fall versucht durch die Variation der zugegeben Base das Produkt zu erhalten. Als Alternative zum bereits verwendeten Triethylamin wurden noch Pyridin und *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) als Basen verwendet. Die zugegebene Menge an Base wurde nicht variiert. Beide Basen wurden aufgrund ihrer geringen Nucleophilie verwendet, um Nebenreaktionen möglichst auszuschließen. Nachdem bei der Verwendung von Pyridin erneut eine Zersetzung beobachtet werden konnte, wurde im nächsten Versuch der Einsatz von DIPEA getestet, da dieses bedingt durch die hohe sterische Abschirmung des Stickstoffatoms noch weniger nucleophil als Pyridin ist. Es konnte jedoch auch in diesem Fall wieder nur eine Zersetzung beobachtet werden. Offensichtlich können zwischen der Reaktion zum symmetrischen Amidit und den Versuchen zur Darstellung des Esters über das Säurechlorid Parallelen gezogen werden, da in beiden Fällen mit reaktiven Verbindungen, mit schwachen kovalenten Chlorbindungen, in der Anwesenheit von Basen gearbeitet wurde. In beiden Fällen wurde zudem *in situ* Chlorwasserstoff gebildet und in keinem der Fälle konnte das Produkt isoliert werden. Es ist somit vermutlich nicht möglich entsprechende pHP-Amidite herzustellen, da diese oder die Edukte sich bereits während der Synthese zersetzen. Im Gegensatz zur Synthese eines Esters kann für die Bildung von symmetrischen Amiditen jedoch nicht auf andere Reagenzien zurückgegriffen werden, da diese Verbindungsklasse stets ausgehend von der Dichlorverbindung **61** hergestellt werden und die freiwerdende Säure aufgrund der Säurelabilität des Amidits immer direkt durch eine Base abgefangen werden muss. Als Alternative zum Amidit kann jedoch auf *H*-Phosphonate zurückgegriffen werden. Die Synthese des *H*-Phosphonatdiesters **120**, ausgehend vom Acetylcyster **117**, ist in Abbildung 78 dargestellt.



**Abbildung 78:** Synthese des symmetrischen *H*-Phosphonats **120** ausgehend vom Acetyl-ester **117** und Diphenylphosphit (DPP).

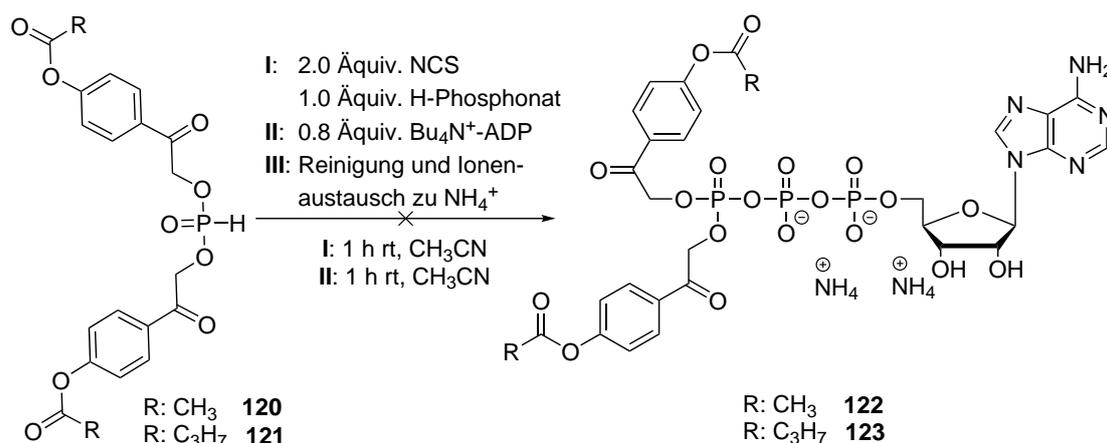
Der *H*-Phosphonatediester konnte in einer für diesen Reaktionstyp vergleichsweise schlechten Ausbeute von nur 21 % erhalten werden. Die zuvor hergestellten symmetrischen *H*-Phosphonate konnten in Ausbeuten von 31 % (MeNV-*H*-Phosphonat **67**) beziehungsweise 58 % (*lip*MeNV-*H*-Phosphonat **68**) dargestellt werden. Da die Synthese des entsprechenden Amidits **119** jedoch nicht gelang, sind die erreichten 21 % als ausreichend aufzufassen. Es zeigte sich, dass das Edukt **117** nicht basenlabil ist, da die Reaktion zur Darstellung des *H*-Phosphonats standardmäßig in Pyridin durchgeführt wurde. Dadurch kann die beobachtete Zersetzung bei der Darstellung zum Amidit und zum entsprechenden Ester vermutlich nicht auf die zugegebene Base sondern eher auf die Bildung des Chlorwasserstoffs zurückgeführt werden. Es ist jedoch zu beachten, dass das hier hergestellte *H*-Phosphonat **120** mit dem Zusatz von 0.5 % Essigsäure im Laufmittel säulenchromatographisch gereinigt wurde und am Ende der Chromatographie nach der Entfernung des Lösungsmittelgemisches von Ethylacetat und Petrolether in Essigsäure vorlag, bevor die Essigsäure im Ölpumpenvakuum entfernt wurde. Das Produkt konnte anschließend ohne Verunreinigungen isoliert werden, wodurch geschlossen werden kann, dass im sauren Milieu keine Zersetzung des *H*-Phosphonats stattfindet. Die vermutete Säurelabilität des Esters **117** beziehungsweise dessen Vorläuferverbindung **106** ist somit vermutlich auf das Strukturmotiv des  $\alpha$ -Hydroxyketons zurückzuführen, welches in dem *H*-Phosphonatediester nicht mehr vorhanden ist. Nachdem das *H*-Phosphonat **120** erfolgreich dargestellt werden konnte, sollte auch der Butylester **118** zum entsprechenden symmetrischen *H*-Phosphonatediester umgesetzt werden. Die Synthese ist in Abbildung 79 dargestellt.



**Abbildung 79:** Synthese des symmetrischen *H*-Phosphonats **121** ausgehend vom Butylester **118** und Diphenylphosphit (DPP).

Das symmetrische *H*-Phosphonat **121**, ausgehend vom Butylester **118**, konnte in einer Ausbeute von 23 % erhalten werden. Die erhaltene Ausbeute ist vergleichbar mit der erreichten Ausbeute für das zuvor hergestellte *H*-Phosphonat **120**. Während der säulenchromatographischen Reinigung konnte zudem der charakteristische Geruch von Buttersäure wahrgenommen werden, was auf eine Spaltung des Esters hindeutet. Die Spaltung des Esters scheint jedoch erst während der Reinigung einzusetzen, da der Geruch beim erhaltenen Rohprodukt noch nicht wahrgenommen werden konnte. Eine Spaltung des Esters während der säulenchromatographischen Reinigung würde jedoch die geringe Ausbeute von 23 % erklären. Auch die eher geringe Ausbeute von 21 % bei der Darstellung des *H*-Phosphonats ausgehend vom Acetylerster **117** könnte mit einer möglichen Spaltung des Acetylersters erklärt werden. Jedoch konnte der Geruch der freiwerdenden Essigsäure nicht direkt wahrgenommen werden, da im Laufmittel bereits Essigsäure enthalten war.

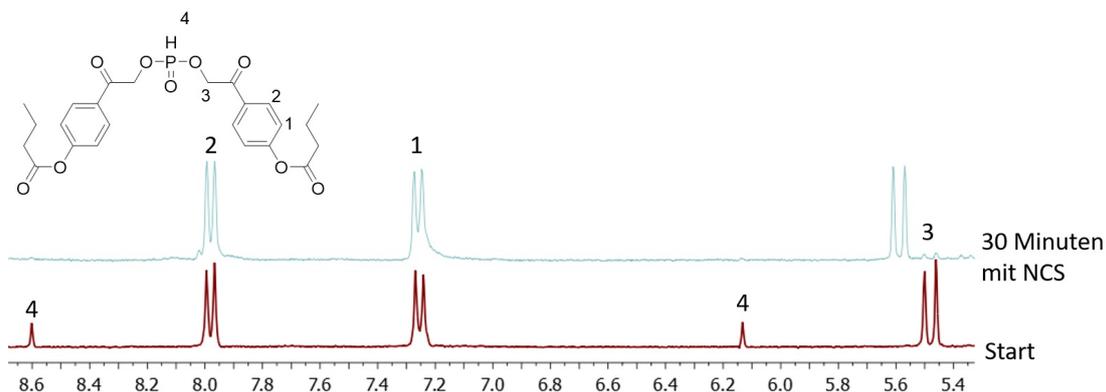
Nachdem die beiden *H*-Phosphonatediester **120** und **121** erhalten werden konnten, sollten diese durch eine oxidative Chlorierung mit *N*-Chlorsuccinimid aktiviert werden und mit ADP zum entsprechenden maskierten ATP gekuppelt werden. Das Syntheseprotokoll ist dabei identisch mit den bereits durchgeführten *H*-Phosphonat-Kupplungen und ist in Abbildung 80 dargestellt.



**Abbildung 80:** Syntheseversuch der symmetrischen pHP-ATP Derivate **122** und **123** ausgehend von den entsprechenden *H*-Phosphaten **120** und **121**.

Die gewünschten maskierten ATP Derivate **122** und **123** konnte trotz mehrerer Syntheseversuche nicht isoliert werden. Stattdessen wurde in fast allen Syntheseversuchen das eingesetzte ADP fast vollständig reisoliert. Die entsprechenden *H*-Phosphonate konnten nicht zurückgewonnen werden. Stattdessen konnten kleinere Mengen an verunreinigten Phosphaten erhalten werden, welche jedoch nur eine Rohausbeute von weniger als 10% aufwiesen. Zunächst wurde vermutet, dass die Aktivierung des *H*-Phosphonats eventuell nur teilweise oder gar nicht erfolgte, jedoch konnte dies durch eine Überprüfung der oxidativen Chlorierung per <sup>1</sup>H-NMR ausgeschlossen werden. Die entsprechenden <sup>1</sup>H-Spektren sind in Abbildung 81 gezeigt. Per <sup>1</sup>H-NMR-Kontrolle konnte für das *H*-Phosphonat **121** festgestellt werden, dass eine vollständige Aktivierung zum Chloridat bereits nach 30 Minuten Rühren bei Raumtemperatur mit zwei Äquivalenten NCS erreicht wurde. Die Aktivierung konnte dabei ohne Zweifel durch das Verschwinden des charakteristischen Dupletts des *H*-Phosphonat Wasserstoffatoms (in Abbildung 81 mit der Zahl 4 markiert) beobachtet werden. Durch die NMR-Kontrolle konnte eine unzureichende Aktivierung als Grund für die nicht ablaufende Reaktion ausgeschlossen werden. Zudem konnte eine Zersetzung des *H*-Phosphonats durch das zugegebene NCS ausgeschlossen werden.

Im Laufe der Zeit, in der diese Testansätze zur Darstellung der symmetrisch maskierten ATP-Derivate durchgeführt wurden, konnte zunehmend, trotz der Lagerung bei -20 °C, der Geruch von Buttersäure bzw. Essigsäure aus den Lagergefäßen der *H*-Phosphonate

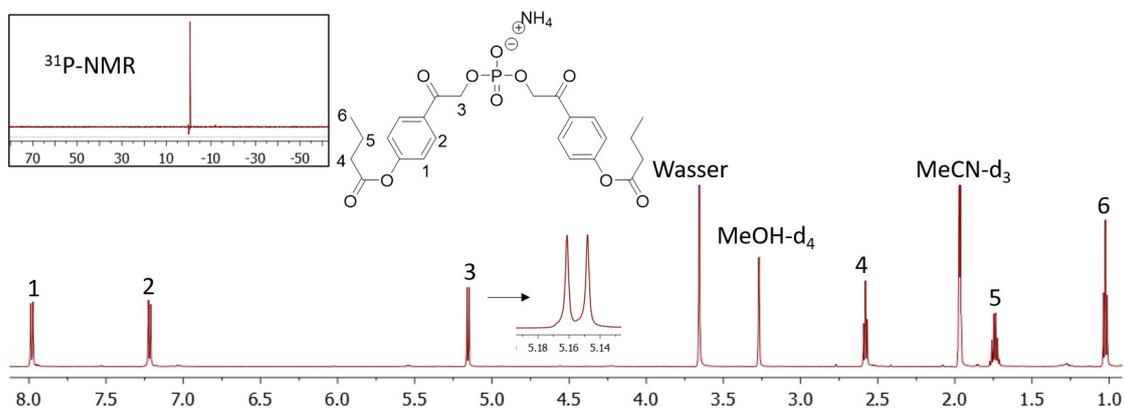


**Abbildung 81:** Aufgenommene <sup>1</sup>H-NMR Spektren zur Überprüfung der Aktivierung des *H*-Phosphonats **121** durch die Umsetzung mit *N*-Chlorsuccinimid. Die erfolgreiche Aktivierung wird durch die Abwesenheit des mit der Zahl 4 markierten Dubletts angezeigt (300 MHz, CH<sub>3</sub>CN-*d*<sub>3</sub>, rt).

**121** und **120** wahrgenommen werden. Der Geruch konnte zudem auch bei den Gebinden für die jeweiligen Ester **117** und **118** wahrgenommen werden, welche ebenfalls bei  $-20\text{ °C}$  gelagert wurden. Die Bildung der charakteristischen Gerüche nach Essigsäure und Buttersäure spricht für eine Labilität der entsprechenden phenolischen Ester. Diese Labilität kann vermutlich mit der sehr guten Abgangsgruppentendenz des Phenolats, ähnlich der eines Aktivesters, erklärt werden. Die entstehende negative Ladung des Phenols wird durch das in *para*-Stellung befindliche Keton mesomeriestabilisiert, wodurch eine Spaltung des Esters begünstigt ist. Dasselbe Prinzip wird bei 4-Nitrophenol-Aktivestern ausgenutzt, bei welchen das 4-Nitrophenolat ebenfalls eine sehr gute Ausgangsgruppe ist, um Ester durch das Prinzip der Umesterung darzustellen.<sup>[136]</sup> Ausgenutzt wird dabei der starke negative mesomere Effekt des Substituenten in der *para*-Position. Eventuell erfolgt daher eine Spaltung der phenolischen Ester während der Synthese zu den pHP-maskierten ATP-Derivaten durch das zugegebene nucleophile ADP unter Ausbildung eines entsprechenden gemischten Anhydrids, welches während der Reinigung mit Wasser zu ADP hydrolysiert wird.

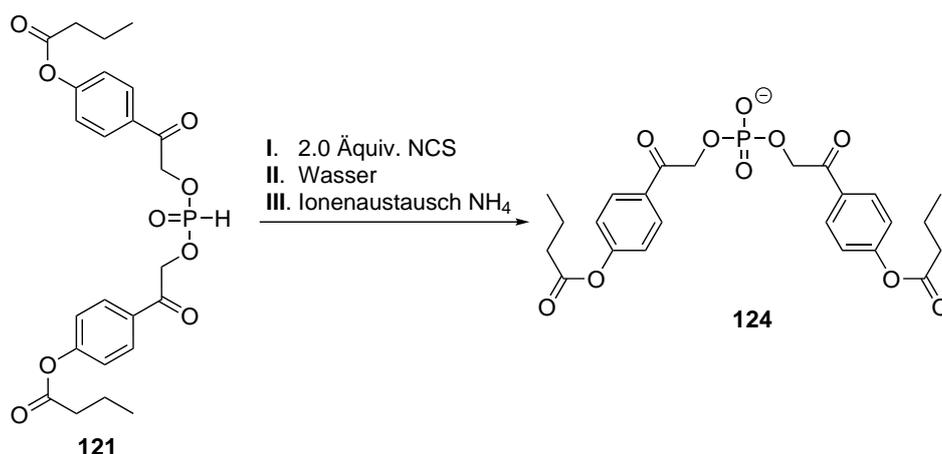
Während eines Syntheserversuches des pHP-ATPs **123** mit dem *H*-Phosphonat **121** konnte während der nachfolgenden Reinigung durch RP-Chromatographie eine bisher nicht beobachtete Verbindung isoliert werden. Die Fraktionen dieser Verbindung wurde vereint, vom Lösungsmittel befreit und nach Ionenaustauschchromatographie auf Am-

monium als entsprechendes Phosphat des eingesetzten *H*-Phosphonats identifiziert. Die Identifizierung gelang dabei durch  $^1\text{H}$ - und  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektroskopie. Die entsprechenden  $^1\text{H}$ - und  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren sind in Abbildung 82 dargestellt.



**Abbildung 82:** Aufgenommenes  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum der isolierten Verbindung und ein Ausschnitt des entsprechenden  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektrums.

Aus dem erhaltenen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum wird deutlich, dass die Verbindung keine Adenosin-Signale aufweist, jedoch alle Signale der mit Buttersäure veresterten pHP-Maske aufweist. Des Weiteren wurde für die Methylenprotonen, welche benachbart zum Keton sind, ein Dublett erhalten. Dies bedeutet, dass diese Protonen mit einem entsprechenden NMR-aktiven Kern koppeln, sodass am benachbarten Sauerstoffatom Phosphoratom vorhanden sein muss. Aus dem ebenfalls in Abbildung 82 gezeigten  $^{31}\text{P}$ -NMR wird bestätigt, dass es sich bei diesem Atom um ein Phosphoratom handelt. Anhand der chemischen Verschiebung von  $-0.55\text{ ppm}$  wird zudem deutlich, dass es sich um ein Phosphat handeln muss. Aufgrund dessen wurde als Struktur für die unbekannte Verbindung das in Abbildung 83 dargestellte Monophosphat **124** vorgeschlagen. Der Strukturvorschlag wurde anschließend durch Massenspektrometrie, sowohl im positiven wie auch im negativen Messmodus, bestätigt. Der erhaltene Phosphatdiester wurde dabei vermutlich durch eine Hydrolyse des aktivierten *H*-Phosphonats erhalten. In dieser Reaktion wurde im Unterschied zu den zuvor und später durchgeführten Reaktionen ADP verwendet, welches zuvor nicht ausgiebig im Vakuum getrocknet wurde und daher vermutlich noch Wasser enthält. Das somit der Reaktion zugefügte Wasser hat vermutlich, wie in Abbildung 83 dargestellt, das gebildete Chloridat zum Phosphat hydrolysiert.



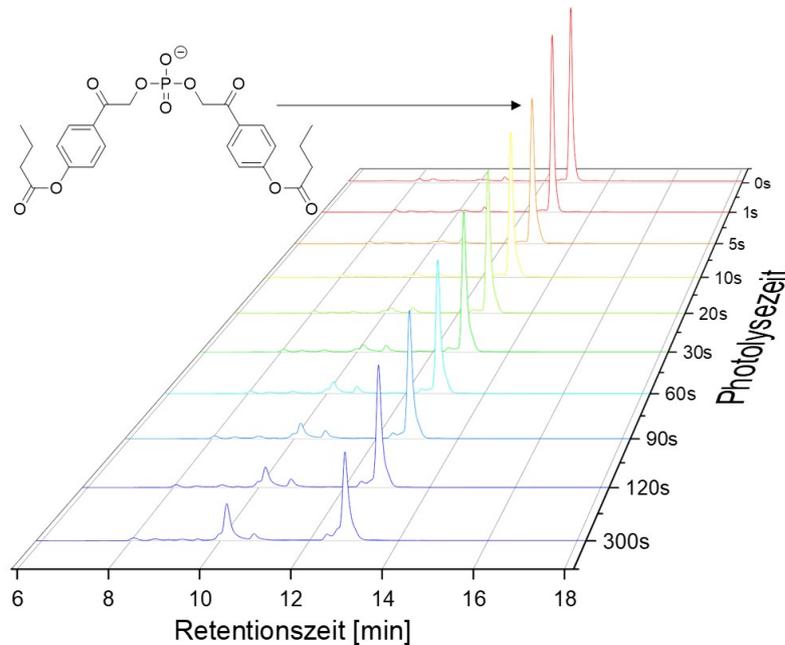
**Abbildung 83:** Bildung des Nebenprodukts **124** durch die Hydrolyse des NCS aktivierten *H*-Phosphonats **121**.

Die Darstellung der entsprechenden symmetrischen pHP-ATP-Derivate konnte trotz mehrerer Versuche nicht erfolgreich durchgeführt werden, weshalb das zuvor vorgestellte Konzept aus AB-Prinzip und pHP-Maske mit Hilfe des isoliertem Phosphats **124** getestet werden sollte. Sollte das entsprechende Experiment das gewünschte Resultat zeigen, könnte die Synthese des symmetrischen pHP-ATPs in weiteren bzw. späteren Arbeiten weiter erprobt werden. In dieser Arbeit sollte jedoch, bedingt durch die vielen Fehlschläge bei der Synthese des symmetrischen pHP-ATPs, zunächst nur die enzymatische und photoabhängige Abspaltung der veresterten pHP-Masken am isolierten Phosphat **124** untersucht werden.

#### 4.8.3 Photolytische Untersuchung der veresterten pHP-Maske

Als grundlegende Idee der Kombination von AB-Konzept und pHP-Maske galt es, dass der lipophile Ester vor der photoinduzierten Spaltung der pHP-Maske zwingend gespalten werden muss, um eine photolytische Spaltung der Maske zu ermöglichen. Um diese Idee zu überprüfen sollte das isolierte Phosphat **124** daher zunächst im zuvor vorgestellten Photolyseexperiment und unter den zuvor definierten Standardbedingungen untersucht werden. Im Unterschied zu den vorherigen Photolysen kann jedoch nicht die bisher verwendete 365 nm UV-Lampe verwendet werden. Stattdessen muss aufgrund des Absorptionsspektrums der pHP-Gruppe eine 310 nm UV-Lampe verwendet werden. In diesem ersten Photolyse-Experiment sollte jedoch theoretisch aufgrund der Esterfunkt-

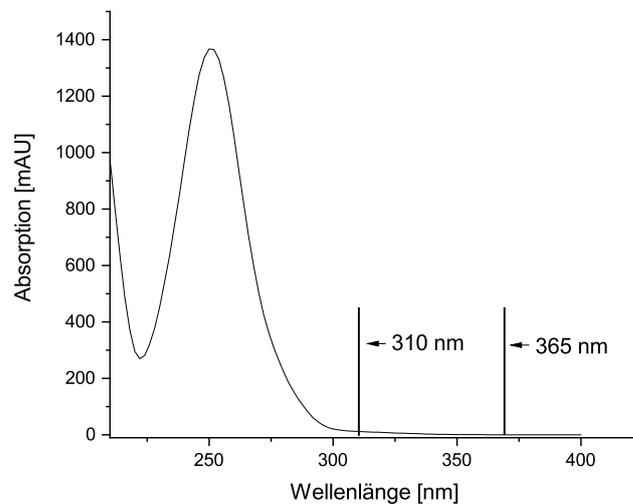
tionalität keine Spaltung der Maske beobachtet werden können, da die für die Spaltung notwendige Chinonstruktur nicht ausgebildet werden kann. Das entsprechende Wasserfalldiagramm ist in Abbildung 84 dargestellt.



**Abbildung 84:** Wasserfalldarstellung der erhaltenen Chromatogramme während der Photolyse des isolierten symmetrischen Butyl-pHP-Phosphats **124** (Bu-pHP) bei 310 nm in Phosphatpuffer (pH 7.4). Die Chromatogramme wurden bei einer Beobachtungswellenlänge von 254 nm erhalten.

Aus dem Wasserfalldiagramm in Abbildung 84 wird ersichtlich, dass durch die Bestrahlung mit 310 nm keine signifikante Spaltung der Butyl-veresterten pHP-Maske (Bu-pHP) nach 120 s zu beobachten ist. Nach diesem Zeitpunkt kann die verstärkte Bildung einer neuen weniger lipophilen Verbindung bei 10 min beobachtet werden. Durch eine Spaltung des Butylesters hätte im Absorptionsspektrum der neu entstandenen Verbindung ein bathochromer Shift beobachtet werden müssen, wie auch später in diesem Abschnitt noch gezeigt wird. Die neue gebildete Verbindung weist jedoch dasselbe Absorptionsspektrum wie das Edukt auf, wodurch ausgeschlossen werden kann, dass der Ester zum Beispiel durch Hydrolyse im verwendeten Puffer gespalten worden ist. Die Identität der gebildeten, weniger lipophilen Verbindung ist somit unbekannt. Bei der Bestrahlung des

Phosphats **124** mit UV-Licht des Wellenlänge 365 nm konnte ebenfalls keine signifikante Abspaltung der pHP-Maske beobachtet werden. Jedoch konnte ebenfalls die Bildung der unbekanntes Verbindung mit einer Retentionszeit von circa zehn Minuten beobachtet werden. Es kann nach diesem Experiment jedoch die Bildung dieser unbekanntes Verbindung durch photolytische Prozesse ausgeschlossen werden, da das verwendete Phosphat **124** keine Absorption bei 365 nm aufweist. Das Absorptionsspektrum des Phosphats **124** ist in Abbildung 85 dargestellt.

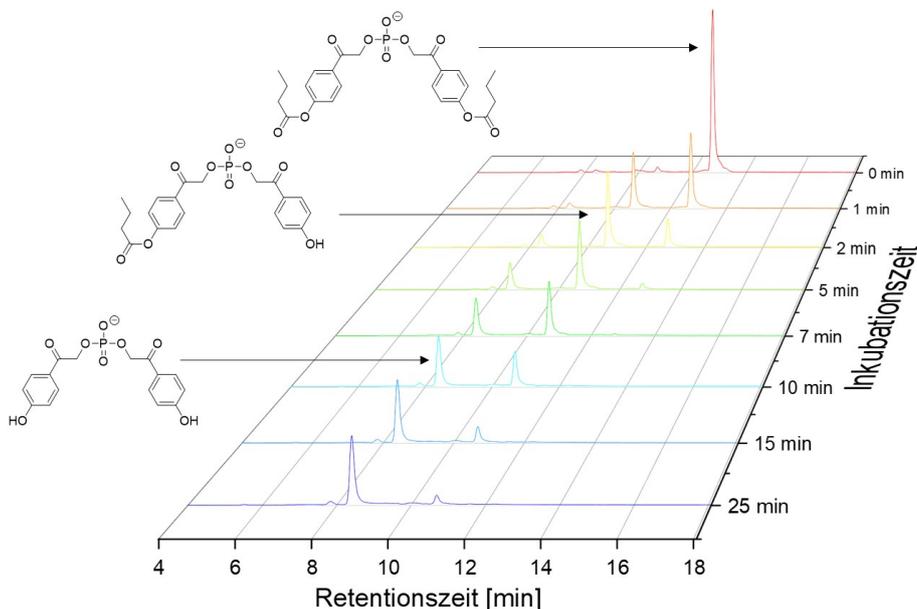


**Abbildung 85:** Darstellung des Absorptionsspektrum des isolierten symmetrischen Bu-pHP-Phosphats **124**. Mit senkrechten Linien sind die verwendeten Wellenlängen für die Photolyseexperimente markiert.

Aus Abbildung 85 ist zu erkennen, dass eine photoinduzierte Reaktion bei 365 nm ausgeschlossen werden kann, da das symmetrische Bu-pHP-Phosphat **124** bei dieser Wellenlänge keine Absorption aufweist. Bei der Verwendung von 310 nm ist eine geringe Absorption der Strahlung zwar möglich, aber es ist, wie bereits zuvor erwähnt, keine photoinduzierte Abspaltung aufgrund der Esterfunktionalität möglich. Das Absorptionsspektrum der gebildeten unbekanntes Verbindung ist in Abbildung 85 nicht mit eingezeichnet, da die beiden Spektren identisch sind und sich überlagern. Die Bildung der unbekanntes Verbindung ist somit ungeklärt, es kann jedoch ausgeschlossen werden, dass die Verbindung durch photolytische Prozesse gebildet wird, da das Phosphat keine

entsprechenden Absorptionsbanden aufweist. Durch diese Beobachtung wird deutlich, dass bei einer potentiellen zellulären Anwendung von lipophil veresterten pHP-Derivaten eine ausreichend lange Inkubationszeit gewählt werden muss, um sicherzustellen, dass die Ester vollständig gespalten sind und eine anschließende lichtinduzierte Freisetzung des Substrates erfolgen kann. Eine längere Inkubationszeit sollte dabei jedoch nicht störend sein, da die Verbindung vermutlich durch die Maskierung des  $\gamma$ -Phosphats durch zwei Masken biologisch inaktiv ist und durch die Spaltung des lipophilen Esters ein Wiederaustritt aus der Zelle unwahrscheinlich ist.

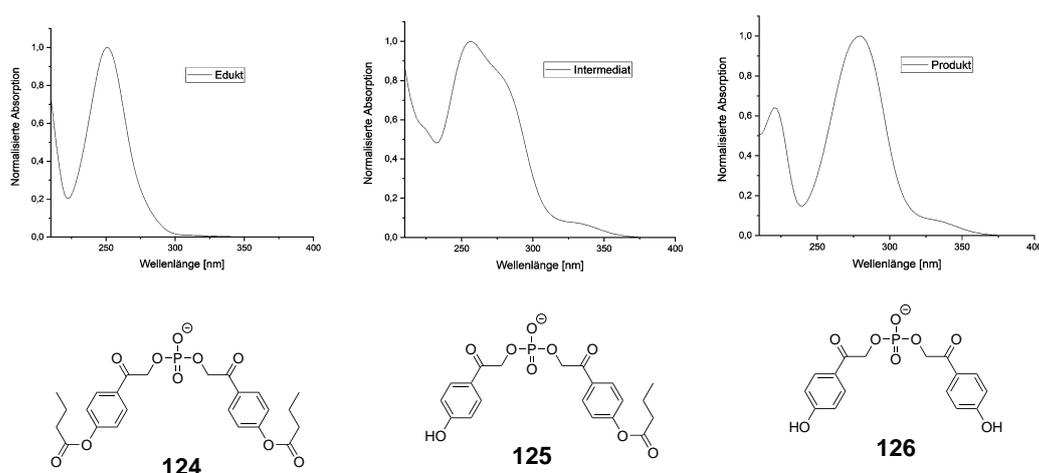
Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die Ester durch die Zugabe von PLE (*pig liver esterase*) gespalten werden und ob sich dadurch, wie zu erwarten, das Absorptionsspektrum der Verbindung ändert. Eine Veränderung des Spektrums wäre zu erwarten, da aus dem Ester, welcher in dieser Konfiguration ein schwacher Donor ist, ein Phenol gebildet wird, welches ein starker Elektronendonator ist. Für dieses Experiment wurde eine Lösung des symmetrischen pHP-Phosphats **124** mit einer PLE-Lösung bei 37 °C inkubiert und nach definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen. Die Proben wurden anschließend via HPLC-Analyse auf ihre Zusammensetzung untersucht. Zeitgleich konnten auch die entsprechenden UV-Absorptionsspektren erhalten werden. Der Verlauf der PLE-Hydrolyse ist in Form eines Wasserfalldiagramms in Abbildung 86 dargestellt.



**Abbildung 86:** Wasserfalldarstellung der erhaltenen HPLC-Chromatogramme während der PLE-Hydrolyse des symmetrischen Bu-pHP-Phosphats **124**. Die erhaltenen Signale sind mit den jeweiligen Strukturformeln der gebildeten Verbindungen markiert.

Wie in Abbildung 86 sehr gut zu erkennen ist, erfolgt eine schnelle Spaltung der Esterfunktionalität durch das zugegebene Enzym. Es ist weiterhin zu erkennen, dass die Spaltung der beiden vorhandenen Ester stufenweise erfolgt. Zunächst ist für die Bu-pHP-Ausgangsverbindung **124** eine rasante Abnahme der Intensität, sowie eine zeitgleiche Intensitätszunahme einer weniger lipophilen Verbindung bei circa 10.5 Minuten zu beobachten. Die durch das Auftragen der Peakfläche gegen die Inkubationszeit ermittelte Halbwertszeit  $t_{1/2}$  für die Startverbindung **124** beträgt 48 s. Aus dem gebildeten Intermediat mit nur noch einem Butylester wird anschließend vergleichsweise langsam das symmetrische Zielprodukt mit zwei pHP-Masken gebildet, indem der verbleibende Ester aus dem Intermediat durch das Enzym abgespalten wird. Die Abspaltung der Ester erfolgt dabei am Anfang sehr schnell, da alle Esterasen leere aktive Zentren aufweisen und somit direkt eine Vielzahl an Ester gespalten werden können. Anschließend wird die Spaltgeschwindigkeit aus diversen Gründen langsamer. Zum Einen muss die gerade gesplattene Verbindung aus dem aktiven Zentrum diffundieren, um die Spaltung eines

noch veresterten Moleküls zu ermöglichen und zum Anderen nimmt die Konzentration an veresterten Verbindungen über die Zeit ab. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit, dass eine solche Verbindung von einer Esterase gespalten wird, niedriger. Es kann jedoch festgehalten werden, dass nach 15 bis 25 Minuten eine fast vollständige Abspaltung der Ester stattgefunden hat. Die Spaltung der Ester kann zudem auch, wie bereits vermutet, durch einen bathochromen Shift im Absorptionsspektrum beobachtet werden. Die entsprechenden Spektren sind in Abbildung 87 dargestellt.

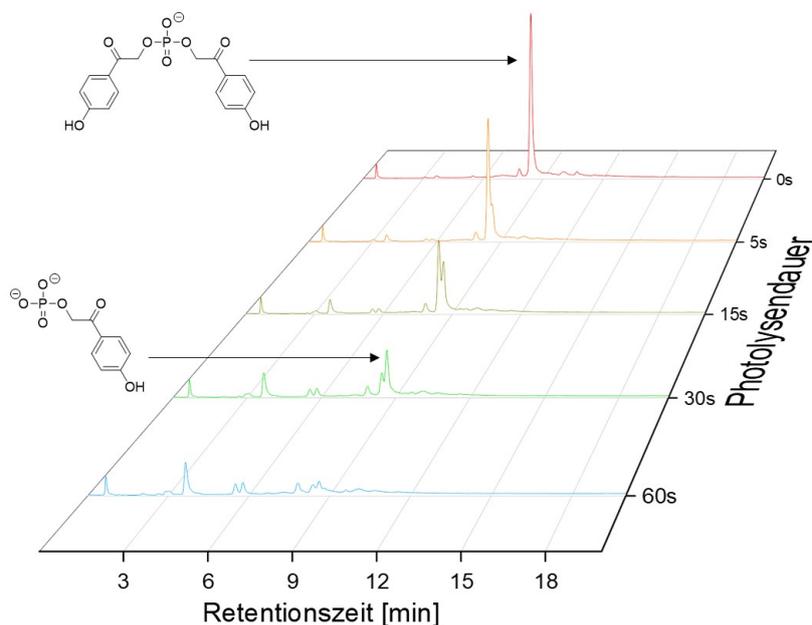


**Abbildung 87:** Aufgenommene UV-Spektren der während der PLE-Hydrolyse eingesetzten bzw. gebildeten Verbindungen. Links: Symmetrisches Bu-pHP-Phosphat **124**, Mitte: Intermediat **125**, Rechts: Symmetrisches pHP-Phosphat **126**.

Auf der linken Seite in Abbildung 87 ist das bereits in Abbildung 85 gezeigte Absorptionsspektrum des eingesetzten symmetrischen Bu-pHP-Phosphats **124** abgebildet. In dem in der Mitte dargestellten Absorptionsspektrum des erhaltenen Intermediats mit einer Bu-pHP-, und einer pHP-Gruppe ist der bereits erwartete bathochrome Shift eindeutig durch die Bildung eines neuen Absorptionsmaximums bei circa 280 nm zu erkennen. Des Weiteren weist die neu gebildete Verbindung auch eine Absorption bis circa 370 nm auf. Durch die Abspaltung des zweiten Esters wird anschließend das symmetrische pHP-Phosphat **126** erhalten. Diese neue Verbindung weist nur noch eine schwache Absorption bei dem ehemaligen Absorptionsmaximum von 250 nm auf, da dieses sich, wie bereits im Spektrum des Intermediats **125** optisch angedeutet, auf circa 280 nm verschoben hat. Durch diesen bathochromen Shift und der Phenolgruppe sollte, ausgehend von Ver-

bindung **126**, eine lichtinduzierte Spaltung möglich sein. Aufgrund der deutlich stärkeren Absorption bei 300 nm erfolgt die nachfolgende Photolyse mit Hilfe einer 310 nm-Lampe statt der bisher verwendeten 365 nm-Lampe.

Für die Photolyse wurde die in der PLE-Hydrolyse verwendete Lösung weiterverwendet. Die Lösung wurde dafür von dem verwendeten Eppendorf-Tube in ein kleines, transparentes Glasvial überführt und anschließend vor der entsprechenden Lampe platziert. Wie in den zuvor durchgeführten Photolysen wurden anschließend nach festen Zeitpunkten entsprechende Aliquote entnommen und via HPLC-Analyse auf die Zusammensetzung untersucht. Im Gegensatz zu den zuvor durchgeführten Photolysen wird neben dem Spaltprodukt und dem möglichen Intermediat mit nur einer Maske jedoch kein detektierbares Produkt freigesetzt. Das freigesetzte anorganische Phosphat, weist keine UV-Absorption auf und kann aufgrund dessen nicht detektiert werden. Es sollte jedoch eine Abnahme des eingesetzten Bis-pHP-Phosphats **126** festgestellt werden. Eventuell sollte darüber hinaus auch das freiwerdende Spaltprodukt beobachtet werden können. Das aus den entsprechenden Chromatogrammen erstellte Wasserfalldiagramm für die Photolyse des Bis-pHP-Phosphats **126** ist in Abbildung 88 dargestellt.



**Abbildung 88:** Wasserfalldarstellung der während der Photolyse erhaltenen HPLC-Chromatogramme. Die erhaltenen Signale sind mit den jeweiligen Strukturformeln der gebildeten Verbindungen markiert.

Anhand des Wasserfalldiagramms in Abbildung 88 kann direkt die schnelle Spaltung der bestrahlten Verbindung **126** beobachtet werden und eine Halbwertszeit für die eingesetzte Verbindung von 9.2 s berechnet werden. Ähnlich zu den in zuvor durchgeführten Photolysen von symmetrisch maskierten Verbindungen konnte auch in diesem Fall eine stufenweise Spaltung des eingesetzten Bis-pHP-Phosphats **126** beobachtet werden. Im Gegensatz zur stufenweisen Spaltung der Ester in der PLE-Hydrolyse erfolgt hier jedoch entgegen der Erwartung eine leichte Zunahme der Lipophilie, welche sich an Hand der etwas längeren Retentionszeit für das neu entstehende Signal beobachten lässt. Das neu gebildete Produkt mit nur noch einer verbleibenden Maske eluiert etwa 0.2 Minuten später als das eingesetzte Bis-pHP-Phosphat. Dieser Zugewinn an Lipophilie ist mit der entstehenden negativen Ladung zu erklären, welche nach Abspaltung einer Maske am Phosphoratom entsteht. Durch den verwendeten Tetrabutylammoniumacetat-Laufpuffer wird durch die zusätzliche negative Ladung ein weiteres Tetrabutylammonium-Kation ionisch gebunden, welches die Lipophilie des monomaskierten Phosphats stark erhöht,

wodurch die Retentionszeit entsprechend zunimmt. Bei weiterer Bestrahlung erfolgt anschließend die Abspaltung der verbleibenden Maske, wodurch kein Signal mehr detektiert werden kann. Auffällig ist zudem auch, dass das gebildete Intermediat im Vergleich zum Bis-pHP-Phosphat **126** eine schwächere Gesamtabsorption aufweist. Diese Beobachtung lässt sich jedoch mit der Anzahl der Chromophore erklären. Während das gebildete Intermediat nur noch eine Maske und somit eine absorbierende Einheit aufweist, weist das Edukt zwei Masken auf, wodurch die Gesamtabsorption verständlicherweise höher ist. Parallel zur Abnahme des Edukts und zur Bildung und Abnahme des Intermediats kann bei einer Retentionszeit von circa 3.2 min die Bildung einer neuen Verbindung beobachtet werden. Bei dieser Verbindung könnte es sich um das entsprechende Spaltprodukt der pHP-Maske handeln, sofern dieses im Vergleich zur pHP-Maske nur eine schwächere Absorption aufweisen sollte.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Kombination aus AB-Konzept und pHP-Maske erfolgreich an dem isolierten Bu-pHP-Phosphat **124** angewandt werden konnte. Nach den positiven Ergebnissen wäre es somit erstrebenswert das Konzept, wie bereits versucht, auf ATP oder andere Verbindungen zu übertragen. Sollte es in der Zukunft nicht möglich sein längere und somit lipophilere Ester von der pHP-Maske darzustellen, könnte auch ein asymmetrisches Derivat mit einer stark lipophilen AB-Maske und einer weniger lipophilen veresterten pHP-Maske dargestellt werden, um die Lipophilie der zu schützenden Verbindung entsprechend zu erhöhen. Durch die Modifikation mit nur noch einer lichtspaltbaren Maske würde, ähnlich zu dem orthogonal geschützten AB-MeNV-ATP **82** ein *trapping* innerhalb der Zelle erreicht werden, wenn die lipophilen Ester durch entsprechende Enzyme gespalten werden. Die finale Freisetzung des geschützten Substrats kann dann anschließend durch entsprechende Bestrahlung erfolgen. Im Gegensatz zu den Nitroaromaten werden dabei nur wasserlösliche und ungiftige Verbindungen freigesetzt. Als Nachteil der pHP-Gruppe lässt sich nur die niedrigere Spaltwellenlänge von 310 nm nennen, bei welcher Schädigungen der Zelle nicht kategorisch ausgeschlossen werden können. Eine Diskriminierung zwischen den verschiedenen Maskentypen (NB oder pHP) aufgrund der Halbwertszeiten ist nicht direkt möglich. Die MeNV-Gruppe wird aus dem AB-MeNV-ATP mit einer Halbwertszeit von circa drei Sekunden gespalten, während die pHP Maske eine Halbwertszeit von circa neun Sekunden aufweist. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die verwendete 310 nm-Lampe nur eine Leistung von

insgesamt 150 mW aufweist, während die 365 nm-Lampe eine Leistung von 3900 mW aufweist, sodass die beiden Halbwertszeiten nicht direkt miteinander verglichen werden können.

## 4.9 Synthese von photocaged-cyclischem Adenosinmonophosphat

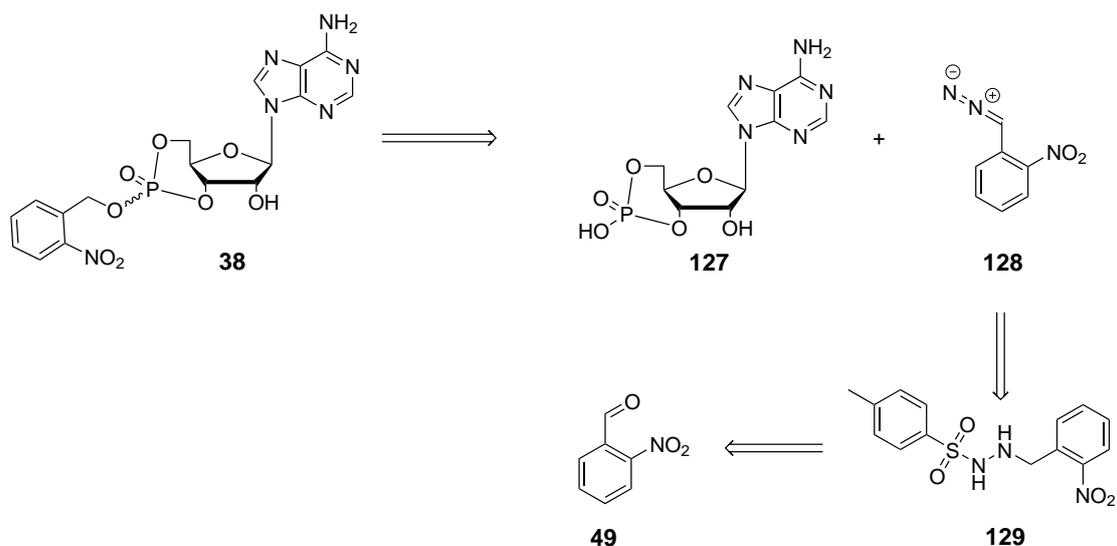
Der *secondary messenger* cyclisches 3',5'-Adenosinmonophosphat **12** (cAMP) dient bei der zellulären Signaltransduktion als essentielle Verbindung, um extrazelluläre Reize in das Zellinnere weiterzuleiten. Die intrazelluläre Konzentration von cAMP ist dabei von der extrazellulären Konzentration von ATP und Adenosin abhängig, da diese Verbindungen entsprechende membrangebundene P1- (Adenosin-abhängig) oder P2Y-Rezeptoren (ATP-abhängig) aktivieren, welche anschließend die Aktivität der Adenylcyclase steuern, welche intrazellulär an der Zellmembran gebunden ist. Bei Aktivierung der Adenylcyclase durch die Klasse der P1-Rezeptoren erfolgt die Umwandlung von intrazellulären ATP in cAMP unter Freisetzung von Pyrophosphat. Die Aktivierung der P2Y-Rezeptoren reguliert die Aktivität der Adenylcyclase entsprechend herab, wodurch die intrazelluläre Konzentration an cAMP sinkt.<sup>[137]</sup> Das gebildete cAMP kann anschließend direkt an entsprechenden CNG-Ionenkanäle (*cyclic-nucleotide-gated ion channel*) binden oder das cAMP aktiviert weitere Enzyme, wie bspw. Proteinkinasen. Durch die Aktivierung dieser Kinasen erfolgen posttranslationale Modifikationen von entsprechenden Proteinen, wodurch zum Beispiel metabolische Prozesse, Muskelkontraktionen oder Gentranskriptionen ausgelöst werden können.<sup>[138]</sup> Viele dieser ausgelösten Reaktionen sind jedoch noch ungeklärt und bis heute nicht vollständig verstanden. Die Untersuchung von intrazellulären cAMP-abhängigen Prozessen erfolgt zur Zeit überwiegend durch Mikroinjektion und Elektroporation, wodurch die zu untersuchende Zelle jedoch zusätzlichem Stress ausgesetzt wird, durch den die erzielten Ergebnisse verfälscht werden könnten. Um diese präparativ aufwendigen Methoden zu umgehen und um eine passive Zellaufnahme des cAMP durch die Zellmembran zu ermöglichen, muss die negative Ladung der cyclischen Phosphatgruppe chemisch maskiert werden. Eine Maskierung der Phosphatgruppe mit der bereits vorgestellten bioreversiblen AB-Gruppe wurde 2018 von MEIER veröffentlicht.<sup>[129]</sup> Es wurde gezeigt, dass das verwendete lipophile AB-geschützte cAMP durch die Zellmembran diffundiert und in der Zelle die Freisetzung von cAMP durch Esterasen erfolgte. Die rasche Freisetzung des cAMPs aus der inaktiven Vorläuferverbindung wurde durch den gemessenen und visualisierten Einstrom von Calciumionen in die Zelle bewiesen.<sup>[129]</sup> Ebenso wie bei den vorgestellten AB-geschützten Nucleosidtriphosphaten zeigt sich jedoch auch hier eine unkontrollierte schnelle enzymatische Freisetzung des gewünschten Produkts durch die entsprechenden zellulären

Esterasen. Durch die Verwendung eines entsprechenden nicht enzymatisch spaltbaren *caged*-cAMP Derivats könnte die Freisetzung von cAMP zeitlich wie auch lokal kontrolliert erfolgen. Zudem wäre eine Akkumulation des *caged*-cAMP bis zu einer beliebigen Konzentration in der Zelle möglich, da das *caged*-cAMP aufgrund der maskierten negativen Ladung vermutlich nicht für biologische Prozesse zur Verfügung steht und dementsprechend nicht verbraucht würde. Entsprechende cAMP-Derivate wurden bereits von ENGELS Mitte der 70iger Jahre publiziert.<sup>[108]</sup> Jedoch weisen die von ENGELS vorgestellten Derivate nur die nicht modifizierte Nitrobenzylgruppe (NB) als photolabile Schutzgruppe auf. Das entsprechend NV-geschützte Derivat wurde Mitte der 80iger Jahre von NERBONNE vorgestellt.<sup>[139]</sup> Ein entsprechend MeNV-geschütztes Derivat ist jedoch bisher nicht in der Literatur beschrieben. In den zuvor durchgeführten Untersuchungen über die Photolyse der verschiedenen *caged*-ATP Derivate hatte sich jedoch gezeigt, dass die MeNV-Gruppe eine signifikant schnellere Spaltgeschwindigkeit als die weiteren hergestellten *caged*-Gruppen aufweist. Für die kontrollierte intrazelluläre Freisetzung von cAMP könnte ein entsprechendes MeNV-geschütztes cAMP-Derivat somit Vorteile gegenüber den bereits publizierten NB und NV *caged*-Derivaten aufweisen, da die Freisetzung von cAMP schneller sein könnte und ein weniger reaktives Keton als Spaltprodukt freigesetzt werden würde.

### 4.9.1 Bekannte Retrosyntheseansätze zur Darstellung von *caged*-cAMP

Die Synthese der von ENGELS und NERBONNE vorgestellten *caged*-cAMP Derivate erfolgte durch die Kupplung von cAMP in der freien Säureform mit einer *in situ* dargestellten Diazoverbindung der entsprechenden Photogruppe. Das entsprechende Retrosyntheschema zur Darstellung des von Engels dargestellten NB-cAMPs **38** ist in Abbildung 89 abgebildet und wird im Folgenden als Syntheseroute A bezeichnet.

Die Synthese des gewünschten *caged*-cAMP Derivats erfolgt in dieser Syntheseroute durch die Kupplung des kommerziell erhältlichen cAMPs **127** in der protonierten mit einem *in situ* dargestellten Diazoderivat **128**. Die Darstellung des Diazoderivats sollte dabei ausgehend vom Tosylhydrazon **129** möglich sein, indem dieses in einem stark alkalischen Medium verkocht wird. Die Synthese des entsprechenden Tosylhydrazons sollte zuvor durch die Umsetzung des kommerziell erhältlichen 2-Nitrobenzylbenzaldehyds mit Tosylhydrazon möglich sein.

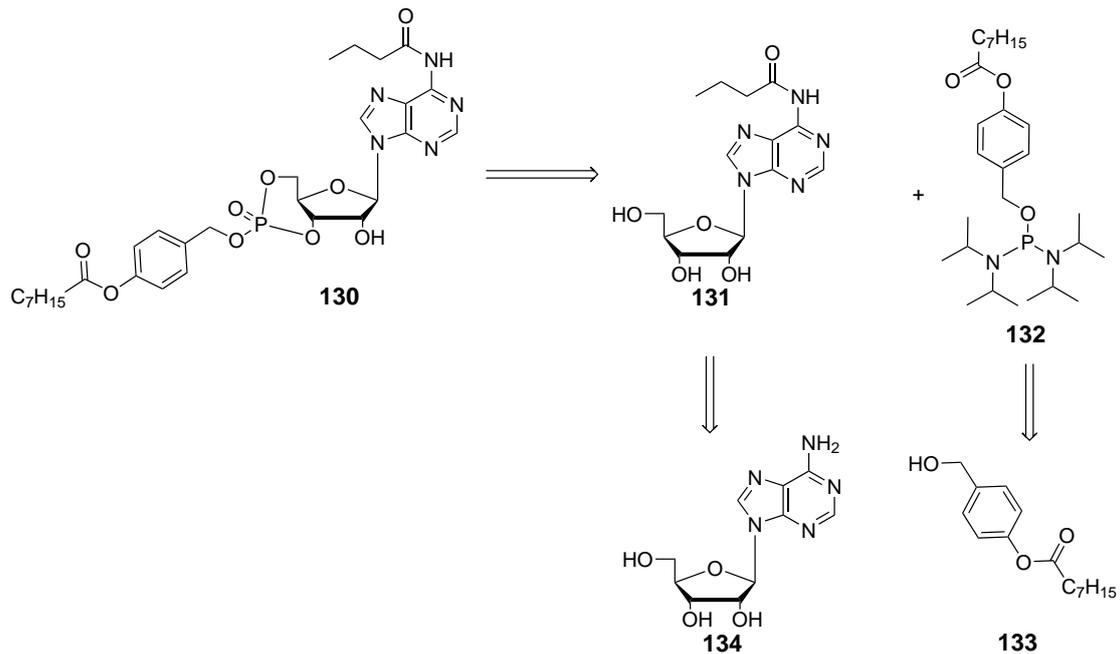


**Abbildung 89:** Retrosynthese des von ENGELS publizierten NB-cAMPs **38** (Syntheseroute A). Die Darstellung des NV-cAMP-Derivats von NERBONNE erfolgte analog, jedoch ausgehend von 2-Nitro-4,5-dimethoxybenzaldehyd.

Neben dieser bereits bekannten Syntheseroute für die Darstellung von *caged*-cAMP sollte auch die publizierte Syntheseroute von MEIER für die Darstellung von *caged*-cAMP erprobt werden.<sup>[129]</sup> Diese beruht auf einer Schützung der exocyclischen Aminogruppe, der anschließenden Kupplung eines Bis-Amidits an die 5'-Hydroxygruppe und der anschließenden Cyclisierung des erhaltenen Intermediats mit der 3'-Hydroxygruppe. Das gebildete cyclische Phosphit wird anschließend durch die Zugabe eines geeigneten Oxidationsmittels zum gewünschten Phosphattriester oxidiert. Die Retrosyntheseroute für diesen synthetischen Ansatz ist in Abbildung 90 auf Seite 137 dargestellt und wird im Folgenden als Syntheseroute B bezeichnet.

Die Synthese des AB-geschützten cAMP Derivats **130** konnte durch die Kupplung des *N*<sup>6</sup>-Butanoyl-geschützten Adenosin **131** mit dem Bis-Amidit **132** von MEIER realisiert werden. Die Darstellung des geschützten Adenosins **131** sollte aus kommerziell verfügbarem Adenosin erfolgen. Das Bis-Amidit **132** sollte durch die Kupplung des entsprechenden AB-Alkohols **133** an das kommerziell erhältliche Bis(*N,N*-diisopropylamino)chlorophosphoramidit erhältlich sein.

Durch die Verwendung dieser beiden Syntheserouten sollte das gewünschte MeNV-



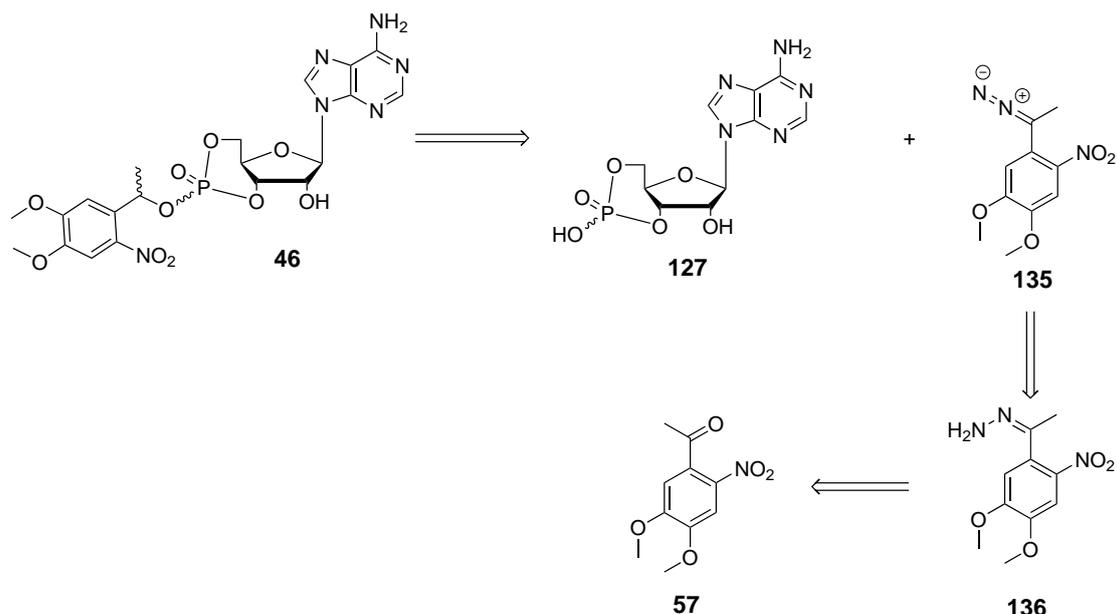
**Abbildung 90:** Retrosynthese der von MEIER vorgestellten Syntheseroute zur Darstellung des AB-geschützeten cAMPs (Syntheseroute B).

cAMP theoretisch durch eine der beiden Routen darstellbar sein. Zunächst sollte der bereits für *caged*-cAMP Derivate angewendete Syntheseweg A nach ENGELS und NERBONNE erprobt werden und die erzielten Ergebnisse anschließenden mit der Syntheseroute B von MEIER verglichen werden.

#### 4.9.2 Synthese von *caged*-cAMP über die Syntheserouten A und B

Die von ENGELS und NERBONNE vorgestellte Syntheseroute A weist zwei entscheidende potentielle Nachteile auf. Zum Einen wird in den publizierten Arbeiten für die Synthese auf das carcinogene und giftige HMPT (Hexamethylphosphorsäuretriamid) als Lösungsmittel zurückgegriffen, da das verwendete cAMP **127** in seiner freien Säureform in allen weiteren gängigen Lösungsmitteln unlöslich ist. Jedoch wurde in beiden Arbeiten selbst in dem hervorragendem Lösungsmittel HMPT nur eine schlechte Löslichkeit des cAMPs beschrieben, weshalb das Reaktionsgefäß regelmäßig in ein Ultraschallbad gehalten werden musste, um stets einen Teil des Edukts in Lösung zu halten. Darüber hinaus erfolgt die Kupplung mit ebenfalls toxischen Diazoverbindungen, welche als Feststoff

zudem auch explosiv sein können. Bei der vorgestellten Syntheseroute A erfolgte die Darstellung der Diazoverbindung **128** durch das Umsetzen des Tosylhydrazons **129** mit Natronlauge, wobei das Produkt anschließend als potentiell explosiver Feststoff isoliert wird.<sup>[140]</sup> Aus diesem Grund wurde die publizierte Syntheseroute leicht modifiziert, um diese potentiellen Gefahren möglichst zu umgehen. Die modifizierte Retrosyntheseroute ist in Abbildung 91 dargestellt.

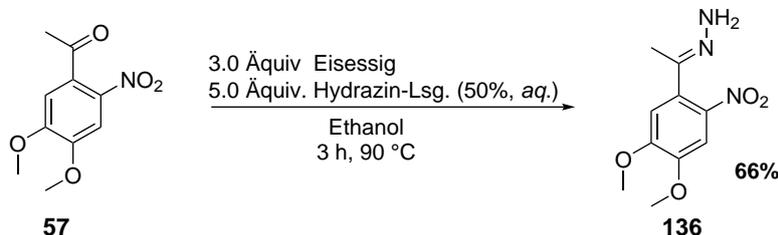


**Abbildung 91:** Retrosynthese der optimierten Syntheseroute A.

Am grundlegenden Synthesekonzept hat keine signifikante Änderung stattgefunden. Das gewünschte MeNV-cAMP sollte durch die Kupplung des cyclischen Adenosinmonophosphats **127** in der freien Säureform mit der Diazoverbindung **135** erhalten werden. Das zuvor verwendete carcinogene HMPT sollte jedoch durch das nicht toxische DMSO ersetzt werden. Die Diazoverbindung **135** sollte aus dem Hydrazon **136** durch eine Oxidation mit Braunstein erhalten werden, wobei während der Synthese auf eine Isolierung der Diazoverbindung **135** verzichtet werden sollte. Das Hydrazon **136** sollte zuvor durch die Umsetzung des Ketons **57** mit Hydrazin erhalten werden. Im Folgendem wird auf die einzelnen Reaktionen näher eingegangen.

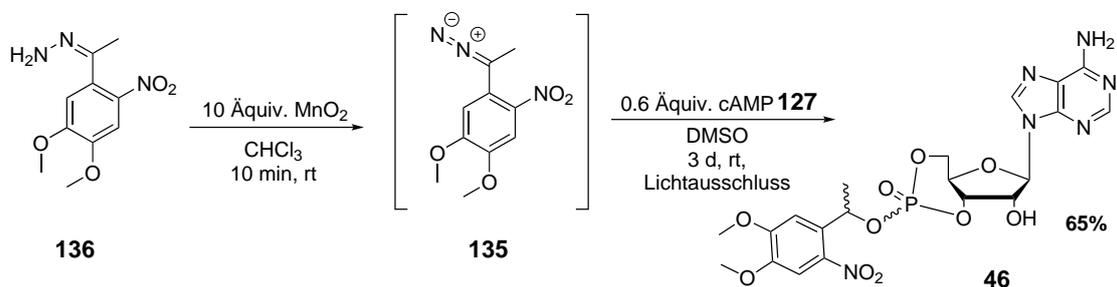
Die Synthese des Hydrazons **136** erfolgte durch die Umsetzung des Ketons **57** mit einer

wässrigen Hydrazin-Lösung. Die Synthese ist in Abbildung 92 dargestellt und erfolgte angelehnt an die Arbeiten von WALL.<sup>[141]</sup>



**Abbildung 92:** Synthese des Hydrazons **136** durch die Umsetzung des Ketons **57** mit einer wässrigen Hydrazin-Lösung (50 %).

Das Produkt konnte in einer zu den Arbeiten von WALL vergleichbaren Ausbeute von 66 % erhalten werden. Ausgehend von dem erhaltenen Hydrazone konnte *in situ* die gewünschte Diazoniumverbindung **135** hergestellt werden und diese anschließend direkt mit cAMP zum gewünschten MeNV-cAMP umgesetzt werden. Die Synthese der Diazoniumverbindung erfolgte ebenfalls angelehnt an die Arbeiten von WALL und ist in Abbildung 93 dargestellt.<sup>[141]</sup>

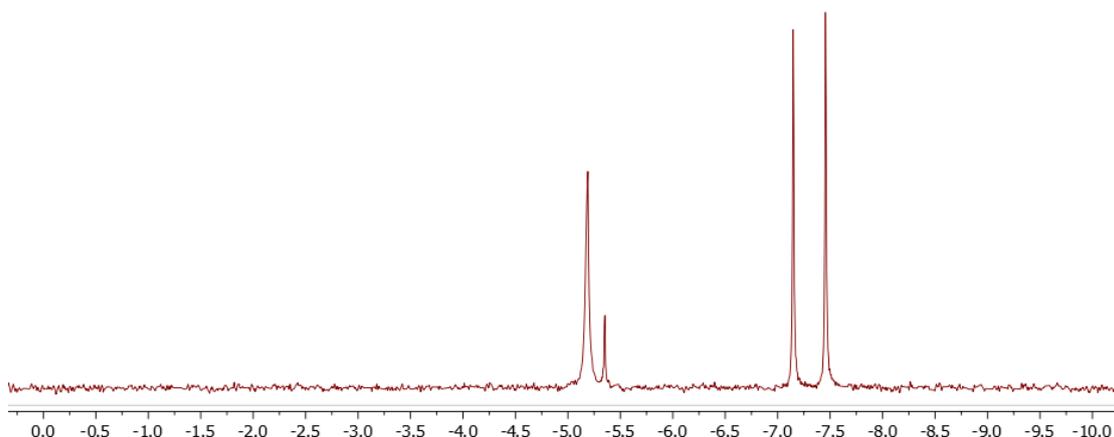


**Abbildung 93:** Synthese des MeNV-cAMP durch die Kupplung der *in situ* dargestellten Diazoverbindung **135** mit protoniertem cAMP **127**.

Im Unterschied zu den Arbeiten von ENGELS und NERBONNE erfolgte in diesem Fall keine Isolierung der dargestellten Diazoverbindung **135**. Stattdessen erfolgte die Synthese dieser reaktiven Spezies in Chloroform durch die Zugabe von Braunstein. Bereits bei der Zugabe des Braunsteins konnte ein intensiver Farbwechsel von gelb zu rot beobachtet werden, welche die Oxidation des Hydrazons zur Diazoverbindung anzeigt. Entscheidend bei dieser Reaktion ist jedoch die Güte des verwendeten Braunsteins, da die

hier durchgeführte Reaktion erst mit dem dritten verwendeten Braunsteingebinde gelang. Die Kristallmodifikation, Korngröße und Oberfläche des verwendeten Braunsteins scheint somit einen signifikanten Einfluss auf die Reaktion aufzuweisen. Aufgrund der Reaktivität der gebildeten Diazoverbindung **135** wurde neben dem optisch wahrzunehmenden Farbwechsel keinerlei weitere Analytik durchgeführt und angenommen, dass der Umsatz quantitativ verlaufen ist. Nach zehn Minuten wurde die Lösung aufgenommen und zur Abtrennung des Braunsteins filtriert. Anschließend wurden 5 mL DMSO zu der roten und klaren Lösung zugegeben und anschließend begonnen, dass Chloroform im Ölpumpenvakuum zu entfernen. Es wurde dabei drauf geachtet, dass der Reaktionsansatz nicht gänzlich vom Lösungsmittel befreit wurde. Der Tausch des Lösungsmittels war aufgrund der sehr schlechten Löslichkeit des protonierten cAMP **127** notwendig. Nachdem der Großteil des Chloroforms entfernt worden war, erfolgte die Zugabe des cAMP als Feststoff zur erhaltenen tiefroten Lösung. Es zeigte sich, dass das cAMP sich im DMSO geringfügig löste und dieser Prozess mit einem Ultraschallbad noch verstärkt werden konnte. Die Reaktionslösung wurde unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt, bis die tiefrote Farbe verschwunden war und die Lösung gelb erschien. Nach drei Tagen konnte eine klare gelbe Lösung erhalten werden und es wurde anschließend begonnen, das DMSO zunächst durch das Einleiten von Stickstoff zu entfernen und das verbleibende DMSO durch das Trocknen im Ölpumpenvakuum zu entfernen. Der erhaltene gelbe Rückstand wurde versucht durch automatisierte RP-Säulenchromatographie zu reinigen. Es zeigte sich jedoch, dass eine unbekannte Verunreinigung erst durch wiederholte Reinigungsversuche mit verschiedenen Säulengrößen, Flussraten und Gradienten abgetrennt werden konnte. Im  $^{31}\text{P}$ -NMR konnten die erwartenden Signale im negativen einstelligen Bereich beobachtet werden. Das Spektrum ist in Abbildung 94 dargestellt.

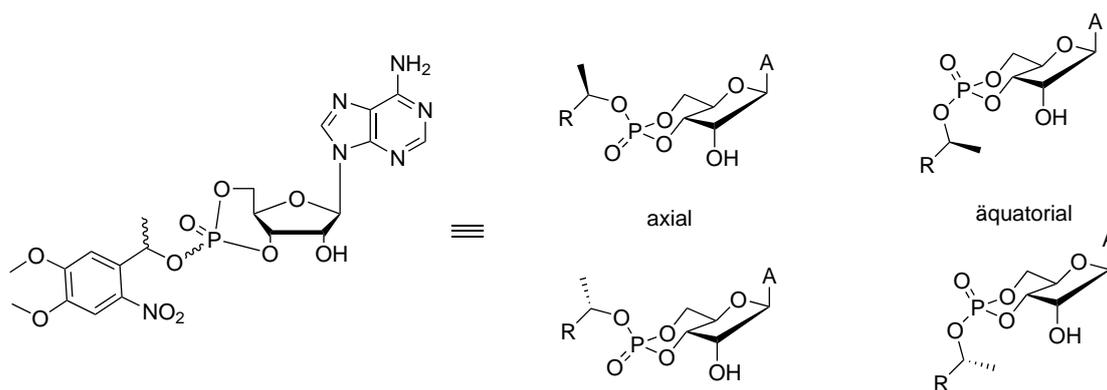
Im gezeigten  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum sind vier jeweils isolierte Singulets zu erkennen. Jedes dieser Singulets ist dabei vermutlich auf eines der vier möglichen Diastereomere zurückzuführen, welche sich bei der Verwendung der MeNV-Maske bilden können. ENGELS und seinen Mitarbeitern gelang es, die gebildeten axialen und äquatorialen Diastereomere der unterschiedlichen hergestellten Phosphatriester chromatographisch zu trennen und einzeln durch NMR-Spektroskopie und in einigen Fällen auch durch Kristallstrukturanalyse zu charakterisieren.<sup>[108, 142]</sup> Durch die erhaltenen Kristallstrukturanalysen konnte die absolute Konfiguration der axialen und äquatorialen Diastereomere zweifelsfrei von ENGELS aufgeklärt werden. Im Zusammenhang mit den jeweiligen Verschiebun-



**Abbildung 94:** Ausschnitt aus dem  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrums des erhaltenen MeNV-cAMP **46** über die optimierte Syntheseroute A (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , rt).

gen im  $^{31}\text{P}$ -NMR konnte bei anderen Derivaten auf die jeweilige axiale und äquatoriale Form geschlossen werden. Durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Hochfeld verschobenen Signale durch die axialen Verbindungen und die entsprechend tiefer verschobenen Signale durch die äquatorialen Diastereomere erzeugt werden. Die Deskriptoren *axial* und *äquatorial* beschreiben dabei die Position der Schutzgruppe relativ gesehen zum phosphorhaltigen Sechsring. Diese Aufspaltung in ein Set von Signalen, welches zu höheren ppm-Zahlen verschoben ist und in ein Set welches zu entsprechend niedrigeren Werten verschoben ist, konnte auch für das hergestellte MeNV-cAMP **46** beobachtet werden. Jedoch werden, bedingt durch das Stereozentrum der MeNV-Maske, in Summe die bereits erwähnten vier Stereoisomere erhalten. Zur besseren Übersicht sind die verschiedenen erhaltenen Diastereomere in Abbildung 95 in einer entsprechenden Darstellungsform abgebildet.

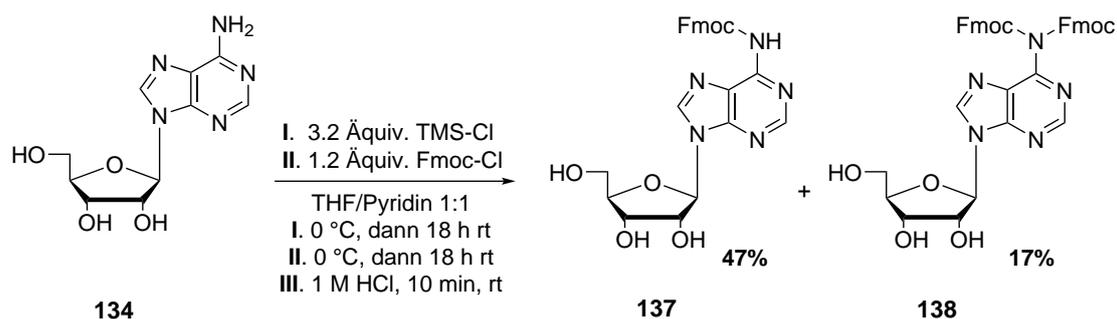
Eine exakte Zuordnung der vier Diastereomere zu den vier erhaltenen  $^{31}\text{P}$ -NMR Signalen, neben der Zuordnung von axial und äquatorial, kann aufgrund von fehlenden Kristallstrukturanalysen nicht erfolgen. Auffällig ist jedoch, dass die Ausbildung der beiden axialen Isomere zu gleichen Verhältnissen erfolgte, während es bei der Bildung der äquatorialen Isomere zu einer Diskriminierung eines einzelnen Isomers zu kommen scheint. Ebenso wie ENGELS konnte auch in dieser Arbeit festgestellt werden, dass die Bildung des axialen Isomers gegenüber der Bildung des äquatorialen Isomeres favorisiert ist. Tendenziell wäre es zu erwarten gewesen, dass die Isomere im genauen Gegenteil vor-



**Abbildung 95:** Übersicht über die erhaltenen vier verschiedenen Diastereomere, welche je nach Positionierung der Schutzgruppe in einer axialen oder äquatorialen Konformation vorliegen können.

liegen, da äquatoriale Substituenten in der Regel energetisch favorisiert sind. ENGELS begründet diesen Umstand mit dem *Gauche*-Effekt, bei welchem durch verschiedene elektronische oder sterische Wechselwirkungen die Anordnung in einer anderen als der energetisch niedrigsten favorisiert wird. Die erreichte Ausbeute von 65% liegt knapp 20% höher als für das entsprechend von ENGELS synthetisierte NB-Derivat, wodurch die erzielte Ausbeute positiv eingeordnet werden sollte. Mit der Arbeit von NERBONNE kann die Ausbeute nicht verglichen werden, da dort keine Ausbeute angegeben wurde. Nachdem die Synthese des MeNV-cAMP über die Syntheseroute A realisiert werden konnte, sollte im Anschluss die von MEIER vorgestellte Syntheseroute B erprobt werden. Bereits bei MEIER zeigte sich, dass die Butanoylschutzgruppe, welche die exocyclische Aminogruppe schützte, nach erfolgreicher Kupplung zum Phosphattriesternicht mehr chemisch gespalten werden konnte, ohne ungewollte Nebenreaktionen oder Zersetzungen in Kauf zu nehmen. Dieser Nachteil konnte jedoch bedingt durch den zellulären Einsatz verkraftet werden, da die Butanolygruppe nach erfolgter Aufnahme in die Zelle vermutlich von Enzymen gespalten werden würde. Für spezifische Verwendungen der hergestellten cAMP-Derivate könnte eine solche Gruppe jedoch störend sein oder nicht gespalten werden, wodurch die Ergebnisse verfälscht werden würden, da die Aminogruppe zum Beispiel für die Substraterkennung in Proteinen benötigt werden könnte. Ein weiterer Nachteil dieser Syntheseroute ist die ebenfalls schlechte Löslichkeit des Butanolygeschützten Adenosins **131**. Um diese Probleme zu umgehen, wurde beschlossen die Butanolygruppe durch eine Fmoc-Schutzgruppe auszutauschen. Die Fmoc-Gruppe

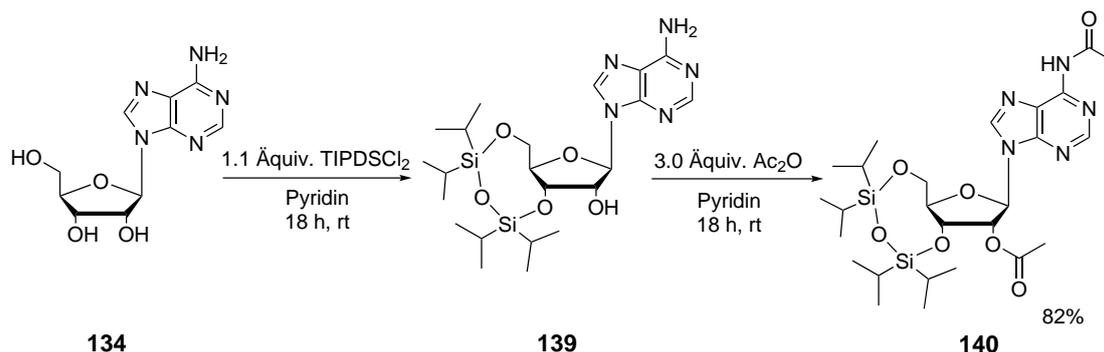
sollte im letzten Schritt unter nicht nucleophilen basischen Bedingungen abspaltbar sein, ohne eine Zersetzung des gebildeten Phosphatriesters zu riskieren. Darüber hinaus wird die Lipophilie durch die verwendete Fmoc-Gruppe stark gesteigert, wodurch die entsprechende Adenosinverbindung gut in gängigen organischen Lösungsmitteln löslich sein sollte. Die Synthese des Fmoc-geschützten Adenosins wurde dabei analog zur Darstellung des butanolygeschützten Adenosins durchgeführt.<sup>[129]</sup> Die Synthese ist in Abbildung 96 dargestellt.



**Abbildung 96:** Synthese des Fmoc-geschützten Adenosinderivats **137**.

Das einfach Fmoc-geschützte Derivat **137** konnte in einer Ausbeute von 47 % erhalten werden. Als Nebenprodukt wurde das doppelt geschützte Derivat **138** in einer Ausbeute von 17 % isoliert. In nachfolgenden Löslichkeitstests zeigte sich, dass das doppelt geschützte Adenosinderivat **138** eine bessere Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln aufweist als das monogeschützte Derivat **137**. Aus diesem Grund wurde in anschließenden Synthesen bevorzugt mit dem isolierten Nebenprodukt **138** gearbeitet und dieses nochmals gezielt hergestellt, indem die Synthese mit einem größeren Überschuss an Fmoc-Chlorid wiederholt wurde. Das gewünschte doppelt geschützte Derivat **138** konnte so in einer Ausbeute von 58 % erhalten werden. Für die Synthese dieser geschützten Derivate wurde die ebenfalls von MEIER angewandte temporäre TMS-Schätzung verwendet. Dazu wurden die hohe Oxophilie der TMS-Gruppen ausgenutzt, um im ersten Schritt die drei Hydroxygruppen zu schützen, um anschließend gezielt die Aminogruppe mit der entsprechenden Schutzgruppe zu schützen. Die TMS-Gruppen wurden nach der Carbamat-Synthese durch die Zugabe von verdünnter Salzsäure abgespalten, sodass das gewünschte Produkt nach einer automatisierten RP-Säulenchromatographie erhalten werden konnte.

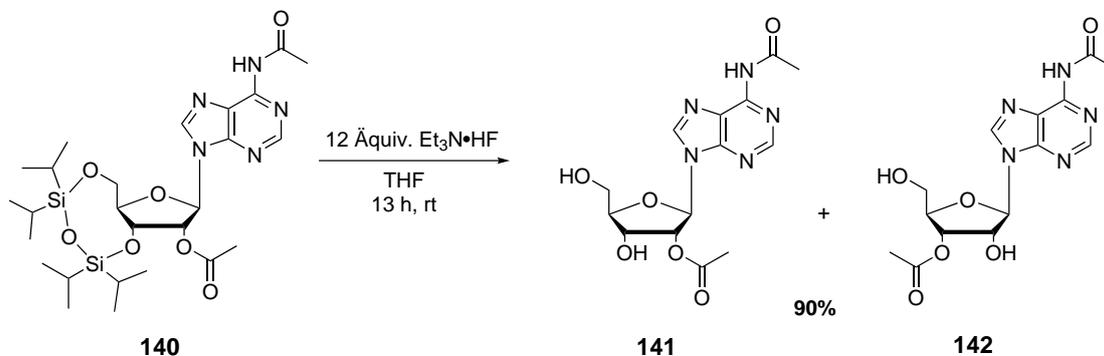
Als weitere Synthesealternative sollte neben der Schützung der exocyclischen Aminofunktion auch die simultane Schützung der 2'-Hydroxygruppe erprobt werden. Durch die Schützung der 2'-Position würden im anschließenden Kupplungs- und Cyclisierungsschritt potentielle Nebenreaktionen vermieden werden. Zum Einen kann damit das Amidit nicht von der ebenfalls nucleophilen 2'-Hydroxygruppe angegriffen werden und zum Anderen ist die Ausbildung eines Fünfrings und die Bildung des 2',3'-Phosphats nicht möglich, falls das Amidit zuerst von der 3'-Hydroxygruppe angegriffen werden sollte. Für diesen Ansatz sollten zunächst die 5'- und die 3'-Hydroxygruppen mit Hilfe der TIPDS-Klammer geschützt werden und anschließend die 2'-Hydroxygruppe und die Aminogruppe durch Acetylgruppen geschützt werden. Nach erfolgreicher Synthese eines entsprechenden Acetyl-geschützten cAMP-Derivats sollte getestet werden, ob die Acetylgruppe gegebenenfalls leichter gespalten werden kann, als die von MEIER verwendete Butanoylgruppe und ob die Schützung der 2'-Position einen Einfluss auf die Ausbeute aufweist. Die Synthese ist in Abbildung 97 dargestellt.



**Abbildung 97:** Synthese des vollständig geschützten Adenosinderivats **140**.

Nach der Zugabe des Silylierungsreagenzes wird dieses von der reaktiveren 5'-Hydroxygruppe angegriffen, bevor es anschließend, begründet durch die räumliche Nähe, bevorzugt mit der 3'-Hydroxygruppe cyclisiert. Eine Schützung der 2'-Position ist dabei ausgeschlossen, da der Abstand zwischen der 5'- und der 2'-Position zu groß ist. Im anschließenden Schritt konnten die verbleibenden, freien reaktiven funktionellen Gruppen durch die Zugabe von Essigsäureanhydrid acetyliert werden und das Produkt wurde in einer guten Ausbeute von 82% erhalten. Im nächsten Schritt sollte die Silylgruppe durch die

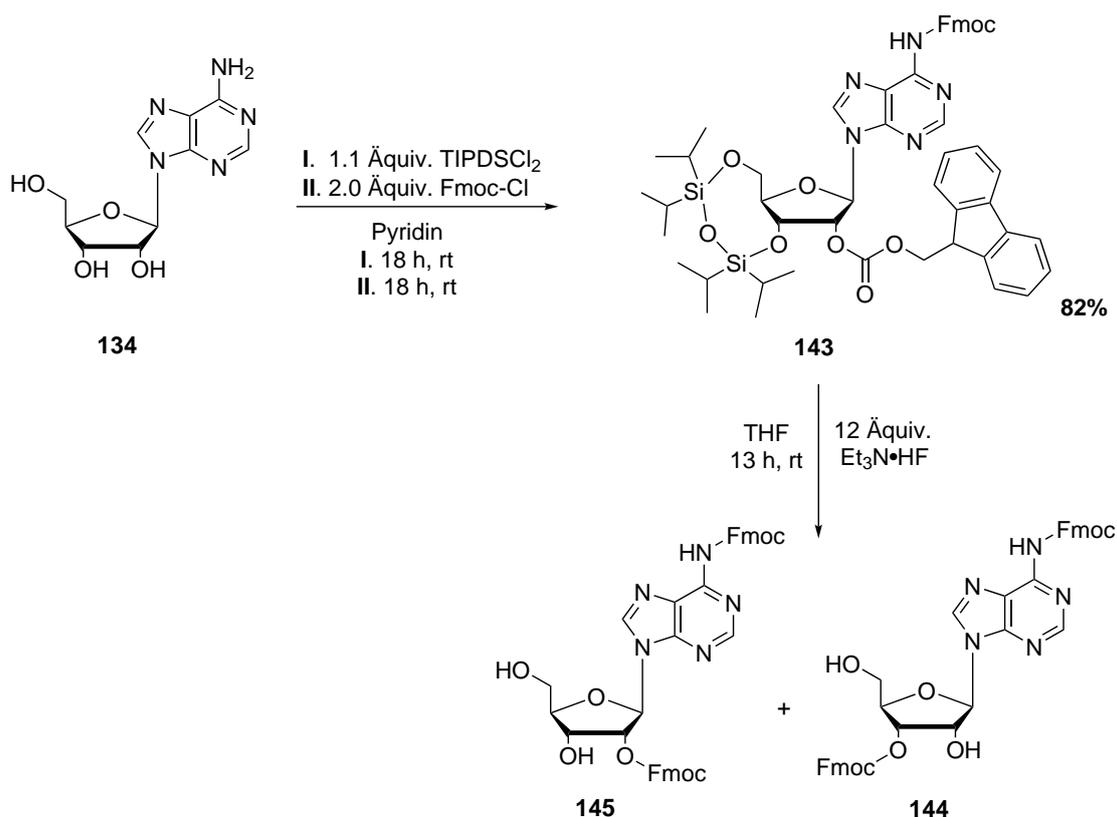
Zugabe von Fluoridionen abgespalten werden und das geschützte Derivat **141** erhalten werden. Die Entschützung ist in Abbildung 98 dargestellt.



**Abbildung 98:** Synthese des zweifach acetylierten Derivats **141**.

Es zeigte sich, dass die Silylklammer mit einer sehr guten Ausbeute von 90 % abgespalten werden konnte. Das Produkt konnte jedoch auch nach einer säulenchromatographischen Reinigung nur als Isomerengemisch erhalten werden. Durch  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie konnte festgestellt werden, dass die 2'-Acetylgruppe zwischen der 2' und 3'-Position wandert, sodass schließlich ein 1:1 Gemisch von beiden Isomeren vorlag. Selbst nach Separation der beiden Isomere per Säulenchromatographie stellte sich das Isomerengemisch wieder ein. Aus diesem Grund wurde beschlossen, die Reaktion mit dem bereits zuvor eingesetzten Fmoc-Chlorid zu wiederholen, da vermutet wurde, dass das gebildete Carbonat im Vergleich zum Acetylester weniger zur Isomerisierung neigt. Die Darstellung des selektiv an der 2'- und  $N^6$ -Position Fmoc-geschützten Derivats **145** ist in Abbildung 99 gezeigt.

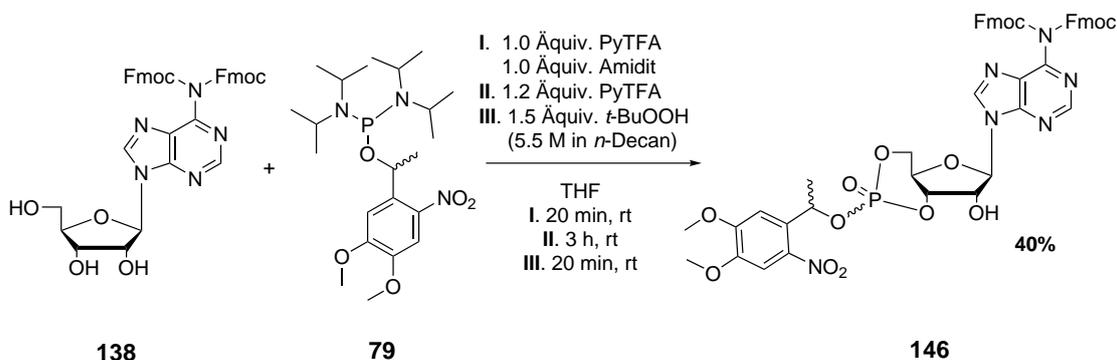
Das gewünschte vollständig geschützte Derivat **143** konnte in einer Ausbeute von 82 % isoliert werden. Im Gegensatz zum acetylgeschützten Derivat **140** musste die Reinigung hier mehrfach wiederholt werden, um den Überschuss an Silylierungsreagenz und Fmoc-Reagenz zu entfernen, da das dargestellte Derivat bedingt durch die Fmoc-Gruppen eine hohe Lipophilie aufweist und daher im Vergleich zum Derivat **140** schwieriger von den lipophilen Reagenzien zu trennen war. Nachdem das Produkt isoliert werden konnte, sollte die TIPDS-Klammer analog zum Acetylderivat **140** durch Zugabe von Triethylamin-Trihydrofluorid abgespalten werden. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass nach Abspaltung der Silylklammer auch in diesem Fall eine Isomerisierung statt-



**Abbildung 99:** Synthese des mit Fmoc selektiv an der 2'-Hydroxy-, und Aminogruppe geschützten Derivats **145**. Eine Trennung der Isomere durch Säulenchromatographie gelang nicht, wodurch keine Ausbeute für die Produkte **145** und **144** angegeben werden können.

findet und die Fmoc-Gruppe zwischen der 2' und 3'-Position migrierte. Darüber hinaus konnte im Roh-<sup>1</sup>H-NMR Benzofulven beobachtet werden, welches durch die Abspaltung der Fmoc-Gruppen gebildet wird. Durch den Verbrauch des Hydrofluorids durch die Abspaltung der TIPDS-Klammer könnte eine kleine Menge Triethylamin freigesetzt werden, welches anschließend bedingt durch die lange Reaktionsdauer die Fmoc-Gruppen gespalten haben könnte. Eine chromatographische Reinigung zeigte zudem auch keine Trennung des komplexen Gemisches in die einzelnen Isomere oder eine mögliche Abtrennung des Benzofulvens. Aufgrund der beobachteten Migration der Acetyl- wie auch Fmoc-Schutzgruppe wurde eine mögliche Nebenreaktion an der 2'-Position in Kauf genommen und mit der Syntheseroute B mit dem Bis-Fmoc-Adenosin **138** fortgefahren. Der Versuch der selektiven Schützung der 2'-Hydroxygruppe wurde nicht weiter verfolgt.

Die Kupplung zum Fmoc-geschützten MeNV-cAMP sollte durch die Kupplung des Bis-Fmoc-geschützten Adenosins **138** mit dem Bis-Amidit **79** realisierbar sein. Dazu sollten beide Ausgangsverbindungen zunächst in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst werden und durch die gezielte Zugabe einer äquimolaren Menge eines entsprechenden Aktivators umgesetzt werden. Dabei sollte zunächst die reaktivere 5'-Hydroxygruppe am Amidit angreifen und anschließend nach einer angemessenen Reaktionszeit durch die weitere Zugabe des Aktivators die weniger reaktive 3'-Hydroxygruppe. Das gewünschte Produkt sollte anschließend durch die Oxidation des gebildeten cyclischen Phosphits zum Phosphatriester erhalten werden. Aus den Vorarbeiten von MEIER war bekannt, dass der Angriff der 3'-Hydroxygruppe stark gehemmt erscheint und die Bildung bzw. anschließende Isolierung des Produkts nicht trivial ist. Auch in dieser Arbeit war die Cyclisierung zum cyclischen Phosphit das überwiegende Problem der Synthese. Durch die Variation des Aktivators von DCI und BTT (5-(Benzylthio)-1*H*-tetrazol) zu Pyridinium-Trifluoroacetat (PyTFA) konnte das Produkt **146** jedoch verlässlich in mehreren Versuchsansätzen in gleichbleibenden Ausbeuten erhalten werden. Dieser Aktivator wurde in der Literatur als Alternative zum standardmäßig verwendeten DCI beschrieben und erfolgreich für die Synthese von Oligonucleotiden angewendet.<sup>[123]</sup> Aufgrund der beschriebenen sehr guten Eigenschaften in Bezug auf Reaktivität, Toxizität, Preis und Löslichkeit wurde dieser Aktivator auch in dieser Arbeit getestet. Die Synthesebedingungen sind in Abbildung 100 dargestellt.

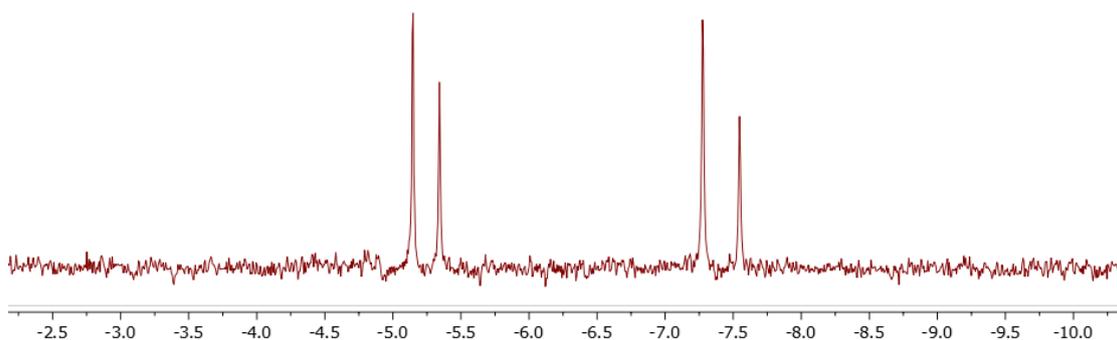


**Abbildung 100:** Synthese des Bis-Fmoc-geschützten MeNV-cAMP **146** mit Pyridinium-Trifluoroacetat (PyTFA) als Aktivator.

Nachdem alle Versuche der Kupplung zum gewünschten MeNV-cAMP mit den gängigen Aktivatoren DCI und BTT scheiterten, wurde die Reaktion ohne sonstige Änderung

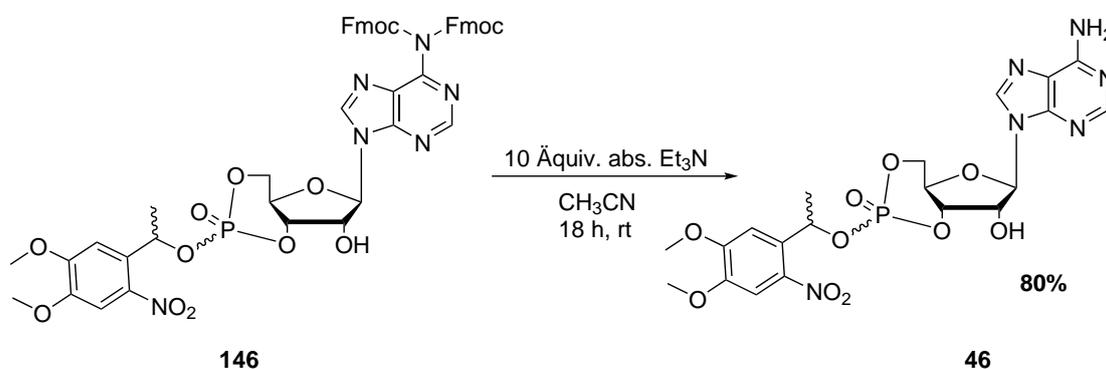
mit PyTFA als Aktivator erfolgreich durchgeführt. Das gewünschte Produkt **146** konnte in einer Ausbeute von 40 % erhalten werden. Das aufgenommene  $^{31}\text{P}$ -NMR ist in Abbildung 101 auf Seite 149 dargestellt. Beim direkten Vergleich mit dem aufgenommenen  $^{31}\text{P}$ -NMR aus der Syntheseroute A wird deutlich (vgl. Abbildung 94 S. 141), dass es in diesem Fall keine Favorisierung zwischen axialer und äquatorialer Form gibt, sondern beide Konfigurationen etwa gleich sind. Auffällig ist jedoch, dass jeweils ein Diastereomer aus jedem Set diskriminiert ist, da die erhaltenen Signale in den jeweiligen Sets für die axialen und äquatorialen Isomere nicht gleich groß sind. Dieser Trend konnte in jedem Syntheseansatz beobachtet werden.

Neben dem gewünschten Produkt konnte auch in diesem Fall das nicht cyclisierte Amidat isoliert werden, welches in den zuvor durchgeführten Syntheseversuchen mit DCI und BTT stets dominant erhalten wurde. Das isolierte Amidat wird vermutlich gebildet, wenn der Angriff der 5'-Hydroxygruppe erfolgt ist, jedoch die Cyclisierung durch den Angriff der 3'-Hydroxygruppe nicht erfolgt. Durch die stets im Anschluss durchgeführte Oxidation wird das 5'-Amidit zum 5'-Amidat oxidiert, sodass eine Cyclisierung nicht mehr möglich ist und das Amidat als Nebenprodukt erhalten wird. In einer durchgeführten Reaktionskontrolle per  $^{31}\text{P}$ -NMR konnte die Bildung des Amidats jedoch bereits vor der eigentlichen Oxidation beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde die Reaktion mit entgastem Lösungsmittel wiederholt, um eine Oxidation durch den im Lösungsmittel gelösten Sauerstoff auszuschließen. Das gewünschte Produkt konnte jedoch auch unter diesen Bedingungen nicht isoliert werden. Nachdem die Reaktion mit PyTFA als Aktivator erfolgreich durchgeführt werden konnte, sollte der Einfluss von gegebenenfalls vorhandenem gelöstem Sauerstoff im Lösungsmittel auf die Reaktion und Ausbeute erneut untersucht werden. Dafür wurde die Reaktion einmal, wie bereits in Abbildung 100 beschrieben, durchgeführt und parallel der exakt gleiche Ansatz mit zehn Äquivalenten Tributylphosphin versetzt. Tributylphosphin ist für seine hohe Oxophilie bekannt und bindet somit den gelösten Sauerstoff, indem das Phosphoratom oxidiert wird. Es konnte jedoch in beiden Fällen das Produkt **146** in vergleichbaren Ausbeuten isoliert werden. Es zeigte sich jedoch, dass das erhaltene Tributylphosphinoxid nur sehr schwierig bis gar nicht abtrennbar war. Zudem musste die Menge an zugegebenem Oxidationsmittel angepasst werden, um sicherzugehen, dass das gewünschte Produkt am Ende der Reaktion gebildet wurde. Auf eine standardmäßige Zugabe von Tributylphosphin sollte somit verzichtet werden, da keine signifikanten Vorteile gewonnen werden.



**Abbildung 101:** Ausschnitt aus dem  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum des erhaltenen Bis-Fmoc-MeNV-cAMP **146** über die optimierte Syntheseroute B (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ , rt).

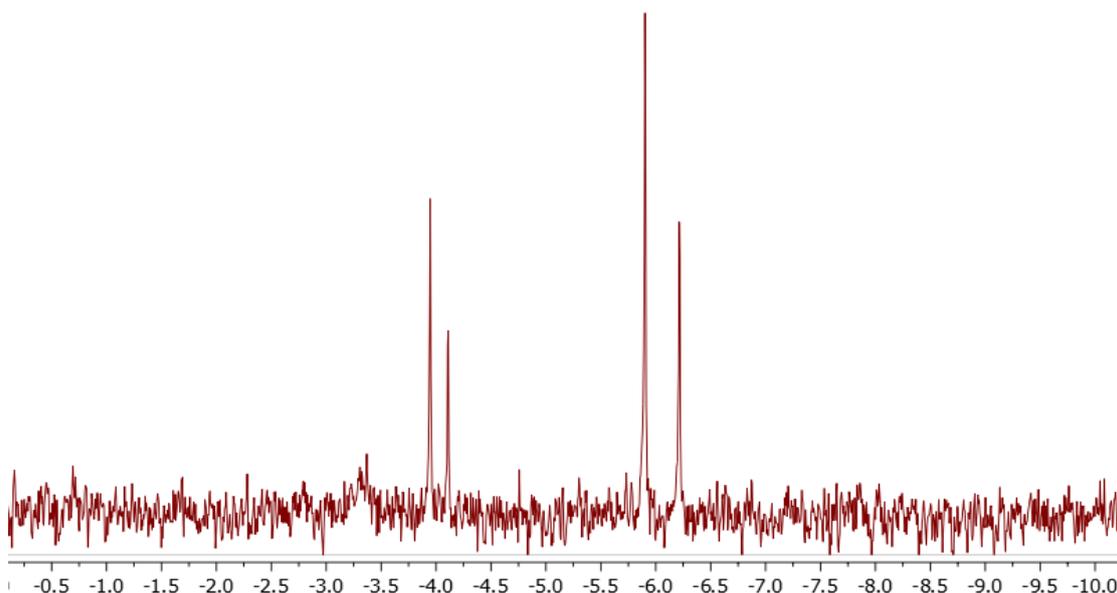
Nachdem das Bis-Fmoc-MeNV-cAMP **146** erfolgreich dargestellt werden konnte, mussten im nächsten Schritt die beiden Fmoc-Gruppen abgespalten werden. Für diesen Syntheseschritt wurde ausgenutzt, dass Fmoc-Gruppen von nicht-nucleophilen Basen gespalten werden können. Die Verwendung von nucleophilen Basen ist aufgrund der potentiellen Hydrolyse des Phosphatriesters nicht empfehlenswert. Um die ungewollte und nicht reversible Spaltung des Phosphatriesters zu vermeiden, wurde auf wasserfreies Triethylamin als nicht nucleophile Base zurückgegriffen. Die Synthese ist in Abbildung 102 dargestellt.



**Abbildung 102:** Synthese von MeNV-cAMP **46** durch die basische Abspaltung der Fmoc-Gruppen von Derivat **146** unter wasserfreien Bedingungen.

Das gewünschte Produkt **46** konnte in einer sehr guten Ausbeute von 80 % isoliert werden. Bei der anschließenden Charakterisierung per  $^{31}\text{P}$ -NMR zeigte sich jedoch, dass

sich das Verhältnis zwischen äquatorialen und axialen Isomeren von 1:1 zu 1:2 verändert hat (Abb. 103). Eine Isomerisierung des phosphorhaltigen Sechsrings ist aufgrund der stabilen Phosphor-Sauerstoff-Bindungen unwahrscheinlich, sodass ein Wechsel der einzelnen Formen ineinander nicht möglich sein sollte. Es ist eher wahrscheinlich, dass sich das äquatoriale Produkt oder bereits das entsprechende äquatoriale Edukt **146** zersetzt hat, da sich die äquatorialen Isomere bereits in der Arbeit von ENGELS als weniger stabil als die entsprechenden axialen Isomere herausgestellt haben.



**Abbildung 103:** Ausschnitt aus dem  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum des erhaltenen MeNV-cAMPs **46** über die optimierte Syntheseroute B (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ , rt).

Durch die Abspaltung der beiden Fmoc-Gruppen fand zudem eine Tieffeldverschiebung der erhaltenen  $^{31}\text{P}$ -NMR Signale um 1.5 ppm statt, sodass die erhaltenen Verschiebungen für die einzelnen Signale mit denen des Produkts aus Syntheseroute A identisch sind (Abb. 94 S. 141).

Es lässt sich somit festhalten, dass das gewünschte MeNV-geschützte cAMP Derivat **46** sowohl über Syntheseweg A durch die Kupplung der *in situ* dargestellten reaktiven Diazoverbindung mit dem cyclischen Adenosinmonophosphat hergestellt werden konnte, sowie auch durch die stufenweise Umsetzung mit einem Bis-Amidit in Syntheserou-

te B. Es ist jedoch schwierig auszusagen, welche Route final favorisiert werden sollte. Die Syntheseroute A liefert im Vergleich zur Route B im wichtigen Kupplungsschritt mit 65% die höhere Ausbeute als Route B (40%), jedoch ist diese Route unvorteilhaft für die Synthese größerer Mengen an MeNV-cAMP, da größere Mengen DMSO eingesetzt und anschließend entfernt werden müssten und die potentiell explosive Diazoverbindung in größeren Mengen dargestellt werden müsste. Syntheseroute B sollte dagegen auch in größeren Syntheseansätzen das gewünschte Produkt ohne größeren präparativen Mehraufwand liefern, wodurch diese Route bei einem *scale up* die bessere Alternative wäre. Dazu sollten zudem die kurzen Reaktionszeiten für Route B beachtet werden, in welcher der Kupplungsschritt inklusive Reinigung an einem Tag durchgeführt werden kann, während der Kupplungsschritt in Route A bis zu einer Woche mit der aufwendigen Reinigung dauern kann.

#### 4.9.3 Photolyse des MeNV-cAMPs 46

Nachdem das MeNV-cAMP **46** erfolgreich sowohl über die Syntheseroute A als auch B dargestellt werden konnte, sollte im Anschluss die lichtinduzierte Freisetzung des cAMPs untersucht werden. Die Photolyse erfolgte unter den zuvor definierten und angewendeten Standardbedingungen (1 mg/mL, 365 nm, PB/CH<sub>3</sub>CN 1:1, pH 7.4). Durch das Auftragen der entsprechend bestimmten Peakflächen der jeweiligen Signale gegen die Bestrahlungsdauer konnte die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  des MeNV-cAMPs **46** bestimmt werden. Es wurde ebenfalls eine Photolyse des doppelt Fmoc-geschützten cAMP-Derivats **146** durchgeführt. Jedoch musste diese Photolyse in einem Gemisch aus PB/CH<sub>3</sub>CN 1:4 durchgeführt werden, da sich das Derivat **146** aufgrund seiner hohen Lipophilie erst in diesem Gemisch vollständig gelöst hatte. Die berechneten Halbwertszeiten sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

**Tabelle 5:** Übersicht über die berechneten Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  des MeNV-cAMPs **46** und des Fmoc-geschützten cAMP-Derivats **146**.

#	Verbindung	Nummer	Lösungsmittel	$t_{1/2}$ [s]
1	MeNV-cAMP	<b>46</b>	PB/CH <sub>3</sub> CN 1:1	3.5
2	DiFmoc-MeNV-cAMP	<b>146</b>	PB/CH <sub>3</sub> CN 1:4*	2.4

\* Auf Grund der hohen Lipophilie war ein höher Anteil CH<sub>3</sub>CN notwendig.

Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse über den Einfluss des Lösungsmittels auf die Spaltgeschwindigkeit während der Photolyse (vgl. Abschnitt 4.6.2) ist ein direkter Vergleich der beiden erhaltenen Halbwertszeiten nicht möglich, da für die Photolyse des Fmoc-geschützten Derivates **146** ein erheblich größerer Anteil an Acetonitril verwendet werden musste, um eine vollständige Löslichkeit zu erreichen. Die erhaltene Halbwertszeit von 3.5 s für das MeNV-cAMP **46** lässt sich jedoch aufgrund der verwendeten Standardbedingungen mit der Photolyse weiterer MeNV-geschützter Derivate vergleichen. Im direkten Vergleich mit dem  $\gamma$ -Alkyl-MeNV-ATP **86** zeigt sich eine Halbierung der Halbwertszeit von 7.8 s auf 3.5 s für das MeNV-cAMP **46**. Beim Vergleich mit dem orthogonal geschützten AB-MeNV-ATP **82** konnte für beide Derivate eine ähnliche Halbwertszeit festgestellt werden (3.2 s **82** und 3.5 s **46**). Das ebenfalls photolysierte Fmoc-geschützte cAMP Derivat **146** weist mit 2.4 s eine noch schnellere Halbwertszeit auf, jedoch kann dieser Wert aufgrund des notwendigen hohen Anteils an Acetonitril nur bedingt mit den anderen Werten verglichen werden. Es lässt sich jedoch festhalten, dass die MeNV-Gruppe unter den gewählten Photolysebedingungen schnell abgespalten werden kann und dass das MeNV-cAMP **46** somit eine gute Ausgangsverbindung für potentielle zelluläre Assays wäre, um cAMP gezielt und kontrolliert freizusetzen.

## 4.10 Synthese und Untersuchung von 5'-NB-*N*<sup>6</sup>-cyclopentyladenosin **40**

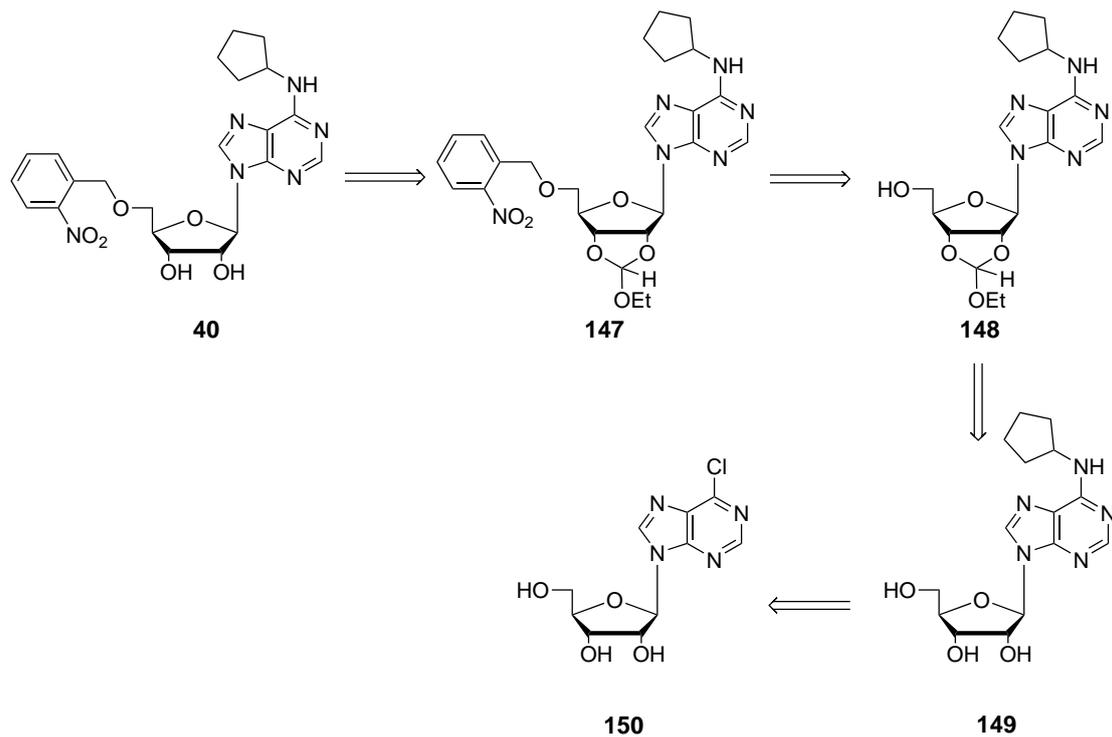
Bei *N*<sup>6</sup>-Cyclopentyladenosin handelt es sich um einen A<sub>1</sub>-Adenosin-Rezeptor Antagonisten. Der A<sub>1</sub>-Rezeptor gehört dabei zu der im Abschnitt 2.1.1 erläuterten P1-Rezeptoren und ist essentiell für verschiedenste immunregulatorische Prozesse.<sup>[15]</sup> Um die Klasse von P1-Rezeptoren und im besonderen die Wirkung und Funktion von A<sub>1</sub>-Rezeptor weiter zu untersuchen und zu verstehen, bieten sich aus den bereits erwähnten Gründen photolabilen Gruppen an. Die Arbeitsgruppe um JACOBS publizierte im Jahr 1991 die Synthese des an der 5'-Position mit einer 2-Nitrobenzylgruppe geschützten 5'-NB-*N*<sup>6</sup>-cyclopentyladenosin Verbindung **40**.<sup>[109]</sup> Jedoch gestaltete sich die Synthese und dabei im besonderen die Kupplung der NB-Maske an die 5'-Hydroxygruppe als nicht trivial, sodass das gewünschte Produkt nur in geringen Mengen hergestellt werden konnte. Die Untersuchung der photoinduzierten Abspaltung der NB-Maske wurde zudem nur qualitativ mit Hilfe einer Dünnschichtchromatographieplatte durchgeführt, auf welcher das Derivat **40** aufgetragen wurde. Die Platte wurde anschließend für 30 Minuten mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt und in einem geeigneten Laufmittel entwickelt. Die photolytische Spaltung wurde anschließend durch die Bildung mehrerer zuvor nicht beobachtet Spots qualitativ nachgewiesen.<sup>[109]</sup>

Nachdem alle bisher in dieser Arbeit verwendeten photolabilen Schutzgruppen eine sehr schnelle Spaltung zeigten und ohne Nebenreaktionen abliefen, wäre es erstrebenswert zu testen, ob die photolabilen Schutzgruppen auch ebenso effektiv für die Schützung von Hydroxygruppen eingesetzt werden können. Im Besonderen wäre dort der Einsatz an Nucleosiden wünschenswert, da diese abhängig von der verwendeten Nucleobase säure- oder basenlabil sein können, wodurch einige Schutzgruppen in der Synthese dieser Derivate keine Anwendung finden können. Die Spaltung von photolabilen Schutzgruppen erfolgt jedoch in der Regel bei neutralem pH-Wert und ohne den Zusatz von reaktiven Reagenzien, wodurch eine *caged*-Gruppe eine Alternative in diesen speziellen Fällen bieten könnte. Um die Verwendung von photospaltbaren Gruppen als Schutzgruppe für Hydroxygruppen zu testen, sollte daher aufbauend auf den Arbeiten von JACOBS und mit 5'-NB-*caged-N*<sup>6</sup>-Cyclopentyladenosin als Test- und Zielverbindung unterschiedliche Synthesemöglichkeiten für die Kupplung des 2-Nitrobenzylalkohols an die 5'-Position des Nucleosids erprobt werden. Wie bereits erwähnt, konnte die Kupplung

der NB-Maske an die 5'-Hydroxygruppe bereits von JACOBS nur in geringen Ausbeuten realisiert werden, weswegen der besonderer Fokus dieser Arbeit auf der Testung verschiedener Möglichkeiten zur Synthese dieses Ethers liegt. Des Weiteren könnte die dargestellte *caged*-Zielverbindung anschließend für weitere Untersuchungen der immunregulatorischen Wirkung der A<sub>1</sub>-Rezeptoren verwendet werden, da die Funktion der Klasse der P1-Rezeptoren bis heute nicht vollständig aufgeklärt ist.

#### 4.10.1 Retrosynthese

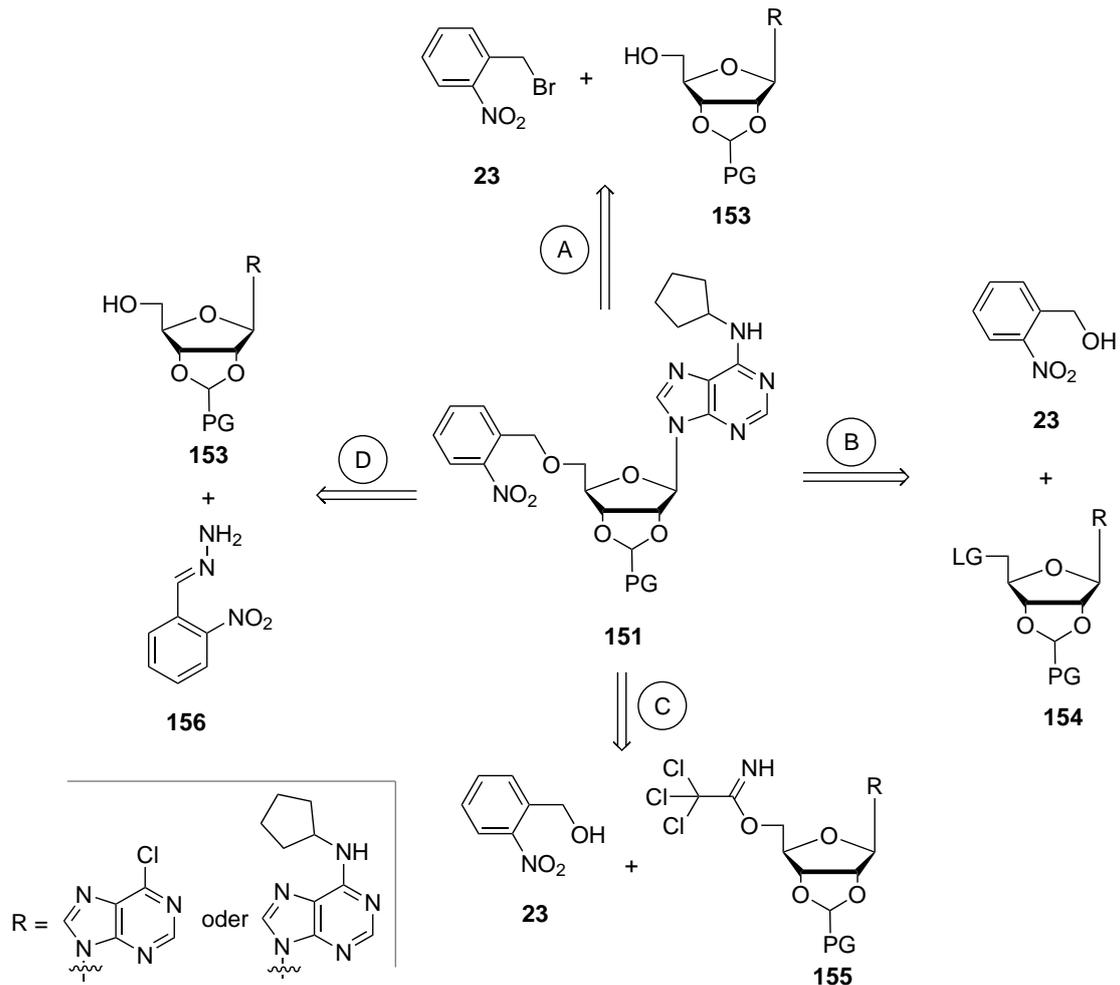
Im Folgenden soll das Synthesekonzept aus der Arbeit von JACOBS kurz vorgestellt werden und auf die bekannten Schwachpunkte der Synthese kurz eingegangen werden. Anschließend sollen die geplanten Optimierungsreaktionen kurz vorgestellt werden. Das Retrosyntheschema der von JACOBS verwendeten Syntheseroute ist in Abbildung 104 dargestellt.



**Abbildung 104:** Retrosyntheschema der von JACOBS verwendeten Syntheseroute zur Darstellung des 5'-NB-N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosins **40**.

Die Zielverbindung **40** wurde durch die säurekatalysierte Abspaltung des Orthoesters aus der Verbindung **147** hergestellt. Der Orthoester **147** wurde durch die Kupplung der freien 5'-Hydroxygruppe der Verbindung **148** mit 2-Nitrobenzylbromid dargestellt. Das Derivat **148** wurde zuvor durch die Schützung der 2'- und 3'-Hydroxygruppen von *N*<sup>6</sup>-Cyclopentyladenosin **149** erhalten. Die Cyclopentyl-substituierte Verbindung **149** wurde ausgehend von dem kommerziell erhältlichen Chlorribopurin **150** durch die Umsetzung mit Cyclopentylamin dargestellt.

Während die ersten beiden Syntheseschritte in guten Ausbeuten realisiert wurden, zeigten die Arbeiten von JACOBS die Probleme bei der Kupplung mit der NB-Maske im dritten Syntheseschritt auf. Auch die folgende säurekatalysierte Abspaltung der Orthoesters gestaltetet sich in der Arbeit von JACOBS entsprechend schwierig. Um diese Probleme zu umgehen, sollte für die Kupplung mit der NB-Maske im dritten Syntheseschritt auf verschiedene andere Synthesewege zurückgegriffen werden. Diese Ansätze sind in Abbildung 105 dargestellt.



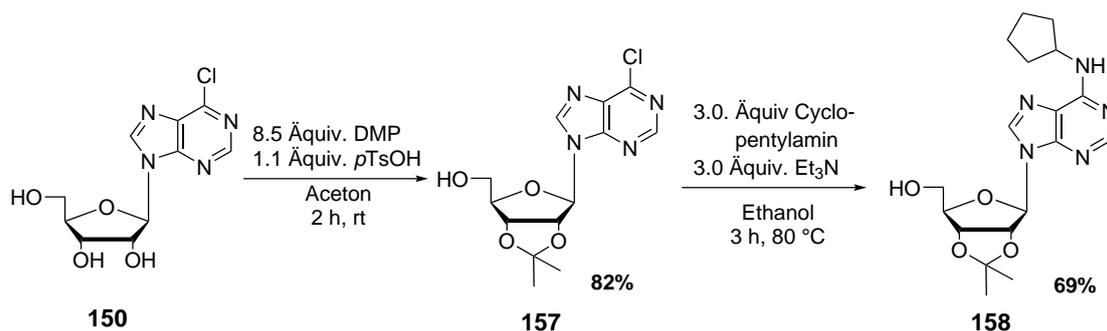
**Abbildung 105:** Mögliche Syntheserouten A-D zur Kuppung der NB-Gruppe an die 5'-Hydroxygruppe des Cyclopentyladenosins (PG: *engl.* Schutzgruppe; LG: *engl.* Abgangsgruppe).

Zunächst sollte die von JACOBS verwendete 2-Ethoxymethylen Schutzgruppe durch die *Isopropyliden* Schutzgruppe ausgetauscht werden, damit kein weiteres Sterozentrum in das Molekül eingeführt und die Bildung von Diastereomeren vermieden wird. Diastereomere könnten bei der Analytik und Reinigung der schwierig durchzuführenden Kuppungsreaktion hinderlich sein, da die Diastereomere unterschiedliche Retentionszeiten aufweisen könnten und sich die entsprechenden Signale im NMR-Spektrum überlagern könnten. Sollte sich in späteren Versuchen zeigen, dass die *Isopropyliden*klammer nach erfolgter Kuppung der NB-Maske nur schwierig zu spalten ist, könnte auch auf weitere

leichter zu spaltenden Acetalschutzgruppen zurückgegriffen werden, wenn eine verlässliche Synthesemethode zur Darstellung des NB-Ethers gefunden wurde. Milder zu spaltende Acetalschutzgruppen wären zum Beispiel die Benzylidenklammer oder die Anisaldehydgruppe. Jedoch weisen auch diese beiden Gruppen, nach der Acetalbildung, ein neues Stereozentrum auf, wodurch die zuvor erwähnten Probleme wieder in den Vordergrund rücken würden. Wie in Abbildung 105 dargestellt, sollte die Kupplung zur entsprechend Acetal-geschützten Verbindung **151** durch insgesamt vier verschiedene Syntheserouten (A-D) erprobt werden. Als Vergleichssynthese sollte dabei die bereits von JACOBS verwendete Route A sein, bei welcher das Acetal-geschützte Adenosinderivat **153** mit 2-Nitrobenzylbromid **152** umgesetzt wird. In Syntheseroute B sollen die Reaktivitäten der Reaktionspartner von Route A umgedreht werden, indem 2-Nitrobenzylalkohol **23** als Nucleophil eingesetzt und zuvor die 5'-Hydroxygruppe des Adenosinbausteins **154** in eine Abgangsgruppe überführt wurde. In der Route C sollte entweder wie abgebildet der Adenosinbaustein in das Trichloracetimidat **155** und mit 2-Nitrobenzylalkohol **23** substituiert werden oder aber die Reaktion umgedreht werden, indem das Trichloracetimidat des Alkohols **23** dargestellt wird. In der letzten Syntheseroute D sollte die Kupplung durch die Umsetzung des Hydrazonderivats **156** mit dem Adenosinbaustein **153** durchgeführt werden. Diese Art der Kupplung wurde bereits erfolgreich in dieser Arbeit für die Herstellung des MeNV-cAMPs **46** in Abschnitt 4.9.2 angewendet. Im folgenden Abschnitt werden die erzielten Ergebnisse der verschiedenen Syntheserouten A-D vorgestellt.

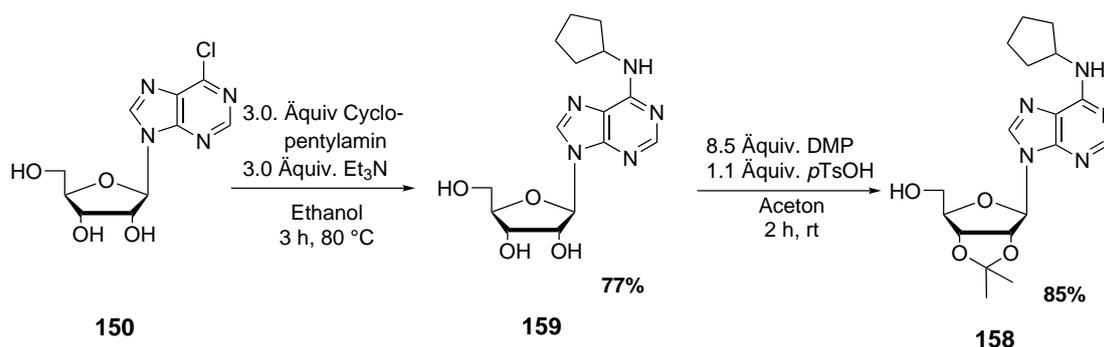
### 4.10.2 Synthese des 5'-NB-N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosin **40**

Bevor die eigentliche Kupplung zwischen der NB-Maske und dem Adenosinbaustein **158** getestet werden kann, muss zunächst der Adenosinbaustein hergestellt werden. Dazu wurde, in Analogie zu der Arbeit von JACOBS, zunächst eine Schutzgruppe eingeführt, um die 2'- und 3'-Hydroxygruppen der Ribose zu schützen. Anschließend musste die Cyclopentylgruppe in das Molekül eingeführt werden. Die entsprechenden Syntheseschritte sind in Abbildung 106 dargestellt.



**Abbildung 106:** Darstellung der *Isopropyliden*-geschützten und an der *N*<sup>6</sup>-Position Cyclopentyl-modifizierten Verbindung **158** (DMP: 2,2-Dimethoxypropan).

Die Acetalschützung konnte in einer guten Ausbeute von 82 % realisiert werden. Auffällig bei dieser Reaktion ist, dass die eigentlich nur katalytische notwendige Säure in äquimolaren Mengen zugegeben werden muss, da ansonsten kein Reaktionsumsatz zu beobachten war. Zudem wurde ein erheblicher Überschuss von 2,2-Dimethoxypropan für die Synthese verwendet, um das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite des Produkt zu verschieben. Jedoch konnte trotz des großen Überschusses nie eine vollständige Umsetzung des Edukts beobachtet werden, da die Rückreaktion nicht vollständig unterbunden werden konnte. Eine Acetalbildung zwischen der 5'- und 3'-Hydroxygruppe konnte aufgrund der zu großen Ringspannung des entstehenden Sechsrings nicht beobachtet werden. Im nächsten Schritt erfolgte die Substitution des Chlorsubstituenten durch die Umsetzung mit Cyclopentylamin. Durch die hohe Anzahl an Heteroatomen im aromatischen System ist eine nucleophile Substitution an der *N*<sup>6</sup>-Position verhältnismäßig leicht durchzuführen, sodass das gewünschte Produkt **158** in einer guten Ausbeuten von 69 % erhalten werden konnte. Das zugegebene Triethylamin fängt dabei durch die Bildung von Triethylammoniumchlorid den freiwerdenden Chlorwasserstoff ab und entfernt dieses aus der Reaktion. Um zu testen, ob die *Isopropyliden*klammer einen negativen Einfluss auf die Bildung der Verbindung **158** hat, wurden die Syntheseschritte im Folgenden einmal in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt. Die entsprechenden Synthesen sind in Abbildung 107 gezeigt.



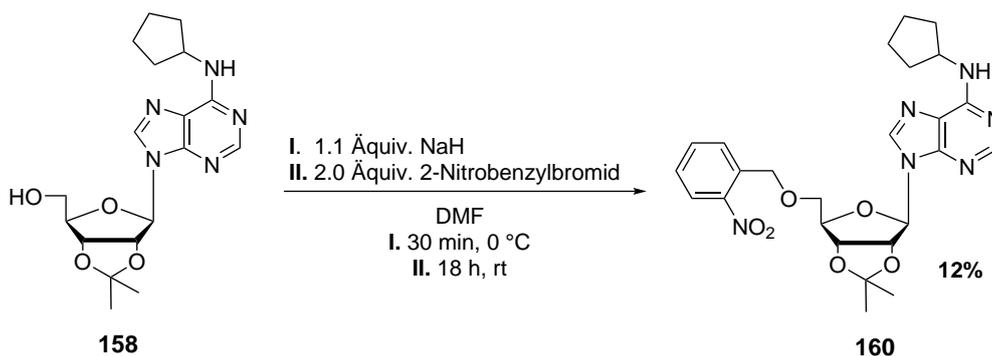
**Abbildung 107:** Darstellung des 2',3'-geschützten und Cyclopentyl-modifizierten Adenosin Derivats **158** durch die umgekehrte Reaktionsfolge als im Vergleich zu Abb. 106.

Es zeigte sich, dass eine Umkehr der Reaktionsfolge einen leicht positiven Einfluss auf die Gesamtausbeute aufweist. In der ersten Reaktionsfolge konnte das gewünschte Produkt **158** in einer Gesamtausbeute von 57 % erhalten werden, während bei der umgekehrten Reaktionsfolge eine Gesamtausbeute von 65 % erreicht wurde. Es ist somit zielführender erst die Cyclopentylgruppe und anschließend die Acetalschutzgruppe in das Molekül einzuführen.

Ausgehend von dem hergestellten Adenosin-Derivat **158** sollte im Anschluss die in Abbildung 105 gezeigten Syntheserouten A-D für die Synthese des Ethers zwischen der NB-Gruppe und dem Adenosinbaustein **158** getestet werden.

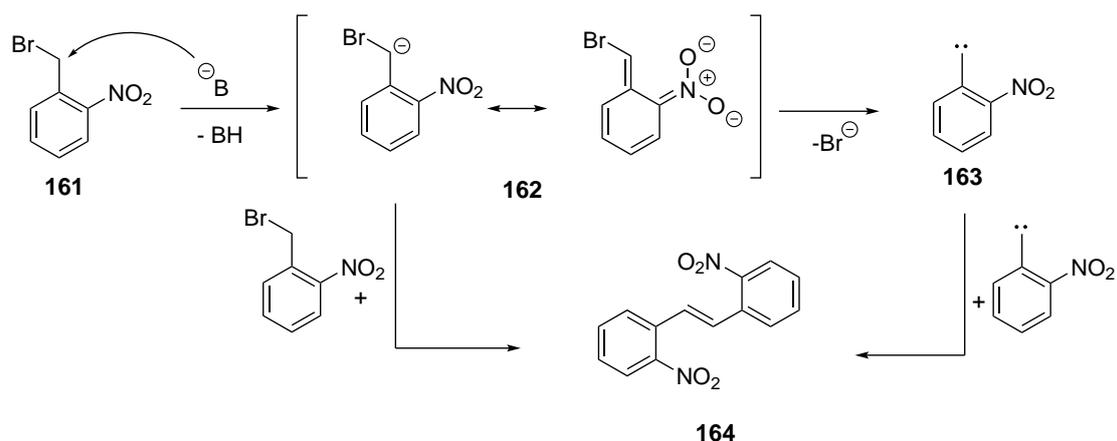
#### 4.10.2.1 Syntheseroute A

Bei Syntheseroute A handelt es sich um die Methode, welche ebenfalls von JACOBS angewandt wurde. Bei dieser Route wird der Ether durch eine klassische WILLIAMSON-Ethersynthese gebildet. Die Synthese ist in Abbildung 108 dargestellt.



**Abbildung 108:** Synthese der Verbindung **160** durch eine WILLIAMSONSCHE Ethersynthese über die Syntheseroute A.

Das gewünschte Produkt konnte nur in einer sehr geringen Ausbeute von 12 % isoliert werden. Bereits in den Arbeiten von JACOBS konnte bei dieser Reaktion nur eine Ausbeute von 28 % erreicht werden. Bei WILLIAMSONSchen Ethersynthesen ist in der Regel von deutlich höheren Ausbeuten auszugehen. Als Beispiel lassen sich dabei die Schützung von Alkoholen mit Benzylbromid angeben, welche in der Regel mit sehr guten Ausbeuten realisiert werden können.<sup>[143]</sup> Die Schützung mit Benzylbromid verläuft dabei mechanistisch äquivalent zu der hier durchgeführten Synthese mit 2-Nitrobenzylbromid. Der Alkohol, in diesem Fall die 5'-Hydroxygruppe der Adenosinverbindung **158**, wird in der Kälte durch die Umsetzung mit Natriumhydrid deprotoniert. Um eine möglichst vollständige Deprotonierung zu erreichen wird der Alkohol dabei mindestens eine halbe Stunde mit dem Natriumhydrid versetzt, bevor die elektrophile Halogenverbindung zugegeben wird. Nach Zugabe der Halogenverbindung erfolgt ein nucleophiler Angriff des Alkoholats nach einem  $S_N2$ -Mechanismus unter Abspaltung des Bromatoms als Bromid an dem entsprechendem Kohlenstoffatom, wodurch die gewünschte Etherbindung erhalten wird. Im Fall des eingesetzten 2-Nitrobenzylbromids **152** erfolgt jedoch eine ungewünschte Nebenreaktion, wodurch das Produkt nur in einem geringen Maße gebildet wird und die anschließende Reinigung der Reaktion erschwert wird. Durch die Zugabe des zuvor gelösten 2-Nitrobenzylbromids **152** zu der stark alkalischen Alkoholat-Lösung erfolgt nicht die gewünschte Etherbildung nach einem  $S_N2$ -Mechanismus, sondern es erfolgt eine Deprotonierung des 2-Nitrobenzylbromids an der Benzylposition, wie in Abbildung 109 dargestellt.



**Abbildung 109:** Vermutete Nebenreaktion bei der Darstellung der Verbindung **160** durch die WILLIAMSONSCHE Ethersynthese, welche zur Darstellung der Stilbenverbindung **164** führt.

Im Vergleich zu Benzylbromid ist eine Deprotonierung durch eine starke Base, wie Natriumhydrid oder einem Alkoholat, in der Benzyloposition der zugegebenen Nitroverbindung möglich, da die negative Ladung durch die Nitrogruppe in *ortho*-Position mesomerstabilisiert ist. Das gebildete Anion kann anschließend als Nucleophil reagieren und mit einem noch nicht deprotoniertem Molekül des 2-Nitrobenzylbromids **152** reagieren, um nach einer weiteren E2-Reaktion das in Abbildung 109 gezeigte Stilbenderivat **164** zu bilden. Es ist jedoch laut JACOBS auch möglich, dass sich das erhaltene Anion durch die Abspaltung des Bromatoms als Bromid zunächst als reaktives Carben **163** stabilisiert anstatt direkt ein weiteres Molekül nucleophil anzugreifen. Das reaktive Carben kann anschließend mit einem weiteren gebildeten Carben dimerisieren, wodurch ebenfalls das Stilbenderivat **164** erhalten werden würde. Welcher Mechanismus überwiegt oder ob beide Mechanismen gleichwertig ablaufen ist jedoch nicht abschließend geklärt. Die Bildung des Stilbenderivats konnte jedoch bereits durch die Zugabe des ersten Tropfens 2-Nitrobenzylbromids durch die sofortige intensive Lilafärbung der Lösung beobachtet werden und das Stilbenderivat wurde als dominantes Produkt mit einer Ausbeute von 50-60% nach Abschluss der Reaktion erhalten. Das gewünschte Produkt **160** konnte daher erst nach einer zweiten säulenchromatographischen Reinigung erhalten werden, da im ersten Reinigungsschritt zunächst das Stilbenderivat abgetrennt werden musste. Das isolierte Nebenprodukt konnte anschließend durch NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie charakterisiert werden.

Nachdem die Reaktionsbedingungen zunächst von JACOBS übernommen worden sind, erfolgte im nächsten Schritt der Versuch die Reaktion zu optimieren, um die Bildung des Stilbenderivats nach Möglichkeit zu minimieren. Die durchgeführten Optimierungsversuche sind in Tabelle 6 dargestellt.

**Tabelle 6:** Übersicht über die durchgeführten Optimierungsversuche zur Darstellung der NB-geschützten Verbindung **160**.

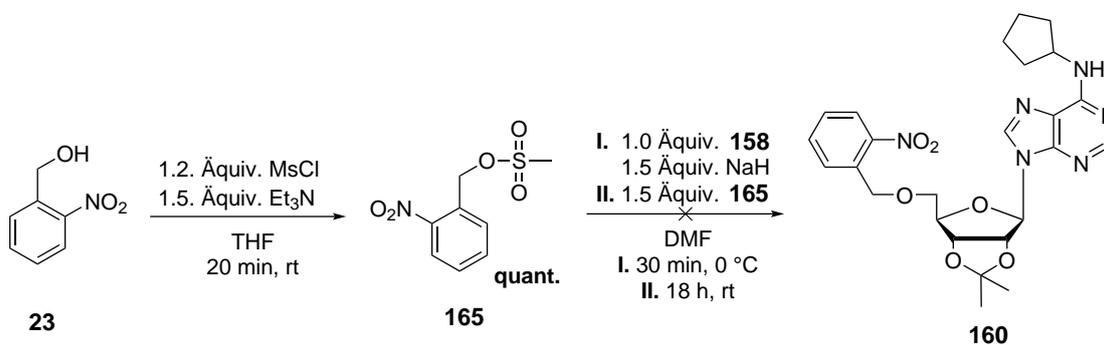
#	Lösungsmittel	Temperatur	Base	Ausbeute
1	DMF	Raumtemperatur	NaH	12 %
2	DMF	-30 °C	NaH	-
3	THF	Raumtemperatur	NaH	-
4	DMF	Raumtemperatur	Natrium	-
5	DMF	Raumtemperatur	Lithiumdiisopropylamin	-

Als Edukte dienten immer Verbindung **158** (1.0 Äquiv.) und 2-Nitrobenzylbromid **152** (2.0 Äquiv.).

Als Vergleich der unterschiedlichen Optimierungsversuche diente die bereits durchgeführte Reaktion, welche in Zeile 1 in Tabelle 6 dargestellt ist und in welcher das Produkt in einer Ausbeute von 12 % erhalten werden konnte. Im ersten Versuch der Optimierung wurde versucht die Reaktion bei tieferen Temperaturen durchzuführen in der Hoffnung, dass die Bildung des Ethers durch die Senkung der Temperatur bevorzugter abläuft als die Bildung des Stilbennebenprodukt. Das gewünschte Produkt konnte jedoch durch die Temperatursenkung nicht erhalten werden, stattdessen wurde wieder dominant das Stilbenprodukt erhalten. Im nächsten Optimierungsversuch wurde die Reaktion in THF statt in DMF durchgeführt, um zu überprüfen, ob das Lösungsmittel einen Einfluss auf die Reaktion aufweist. In diesem Reaktionsansatz konnte das Produkt jedoch ebenfalls nicht isoliert werden, stattdessen wurde erneut dominant das Stilbenprodukt gebildet. Darüber hinaus konnte zudem keine Wasserstoffentwicklung bei der Umsetzung des Adenosinbausteins **158** mit Natriumhydrid beobachtet werden, da das entstehende Alkoholat vermutlich durch das THF nicht ausreichend stabilisiert wird oder sich das Natriumhydrid nicht ausreichend im verwendeten THF löst, um das Adenosinderivat zu deprotonieren. In den letzten beiden Reaktionsansätzen wurde aus diesem Grund erneut auf DMF als Lösungsmittel zurückgegriffen, jedoch die Base von Natriumhydrid zu elementaren Na-

trium und LDA getauscht. Bei der Verwendung von Natrium sollte sichergestellt werden, dass eine Deprotonierung der 5'-Hydroxygruppe vollständig stattfindet. Es zeigte sich jedoch bereits eine Zersetzung des Adenosinbausteins während der halbstündigen Deprotonierung bei 0 °C durch eine schwarze Färbung der Reaktionslösung und bei der durchgeführten Reaktionskontrolle.

Als letzter Schritt zur Optimierung der Syntheseroute A sollte die Abgangsgruppe am 2-Nitrobenzylbaustein durch eine mit einer besseren Abgangsgruppentendenz getauscht werden. Dazu sollte eine Mesylgruppe in das Molekül eingebracht werden. Die entsprechende Reaktion ist in Abbildung 110 dargestellt.

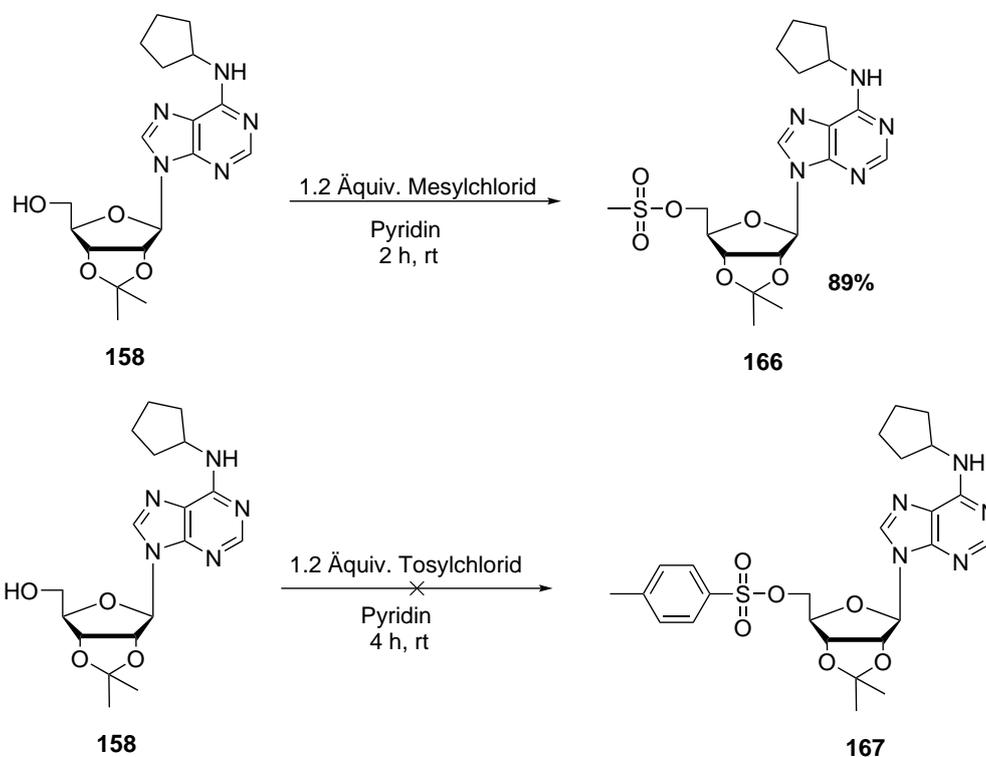


**Abbildung 110:** Synthese des 2-Nitrobenzylmethansulfonats **165** zur anschließenden Darstellung der NB-geschützten Verbindung **160**.

Die Darstellung der Mesylverbindung **165** ausgehend vom 2-Nitrobenzylalkohol **23** konnte in einer quantitativen Ausbeute realisiert werden. Eine weitere Reinigung neben dem Entfernen der entstandenen Salze durch das Waschen mit Wasser war nicht notwendig. Die anschließende Kupplung mit dem Adenosinbaustein **158** zeigte jedoch erneut die Bildung des Stilbenderivats **164**. Das gewünschte Produkt **160** konnte dagegen nicht isoliert werden. Vermutlich erfolgt durch die sehr gute Abgangsgruppe eine favorisierte Bildung der Stilbenverbindung, wodurch der Ether nicht gebildet wird. Aufgrund der Anzahl an Fehlschlägen bei den verschiedenen Optimierungsversuchen wurde die hier getestete Syntheseroute A nicht weiter verfolgt. Es kann jedoch festgehalten werden, dass das gewünschte Produkt **160** in einer geringen Ausbeute von 12 % über diese Syntheseroute erhalten werden konnte.

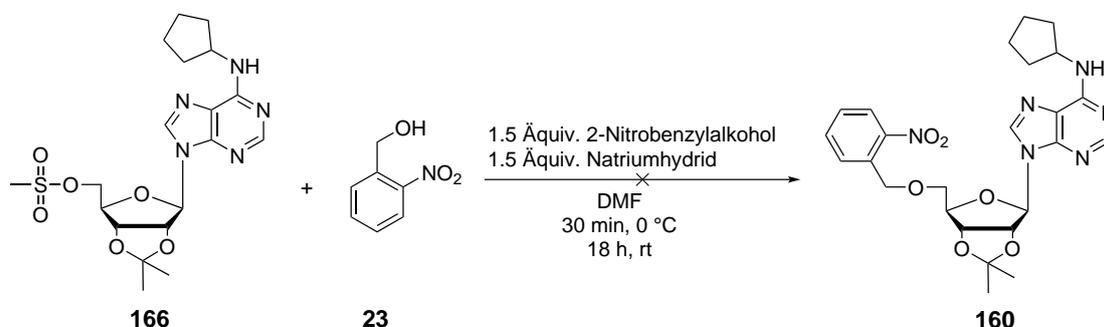
#### 4.10.2.2 Syntheseroute B

Um das Problem der Nebenreaktion zum Stilbenderivat **164** zu vermeiden, sollte die Synthese der Etherbindung in Syntheseroute B durch die Umpolung der Reaktionspartner erfolgen. Dazu wurde in dieser Syntheseroute nicht das 2-Nitrobenzylbromid **152** eingesetzt, sondern der entsprechende 2-Nitrobenzylalkohol **23** verwendet. Dadurch wird das ehemalige Nucleofug **152** zum Nucleophil, welches am entsprechend elektrophil modifizierten Adenosinbaustein **158** angreifen soll. Für diese Syntheseroute ist es somit notwendig die 5'-Hydroxygruppe in eine Abgangsgruppe zu überführen. Die entsprechenden durchgeführten Reaktionen sind in Abbildung 111 dargestellt.



**Abbildung 111:** Synthese der Mesyl- und Tosyl-modifizierten Adenosinderivate **166** und **167**.

Das Mesylderivat **166** konnte in einer guten Ausbeute von 89 % erhalten werden. Nach der Reaktion wurde das Lösungsmittel entfernt und die gebildeten Pyridiniumsalze und der leichte Überschuss an Mesylchlorid wurden durch das Waschen der Reaktionslösung mit Wasser entfernt. Von dem erhaltenen Rohprodukt wurde ein  $^1\text{H-NMR}$  aufgenommen und festgestellt, dass eine weitere Reinigung nicht notwendig war. Die Reinigung des Tosylderivats **167** erfolgte analog zu der des Mesylderivats **166**, jedoch konnte bereits während der Reaktionsverfolgung die Bildung verschiedener Nebenprodukte festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde versucht, das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch zu reinigen. Das gewünschte Produkt konnte jedoch nicht isoliert werden. Die Syntheseroute B sollte somit im Anschluss mit dem Mesylderivat **166** getestet werden. Die entsprechende Reaktion ist in Abbildung 112 dargestellt.



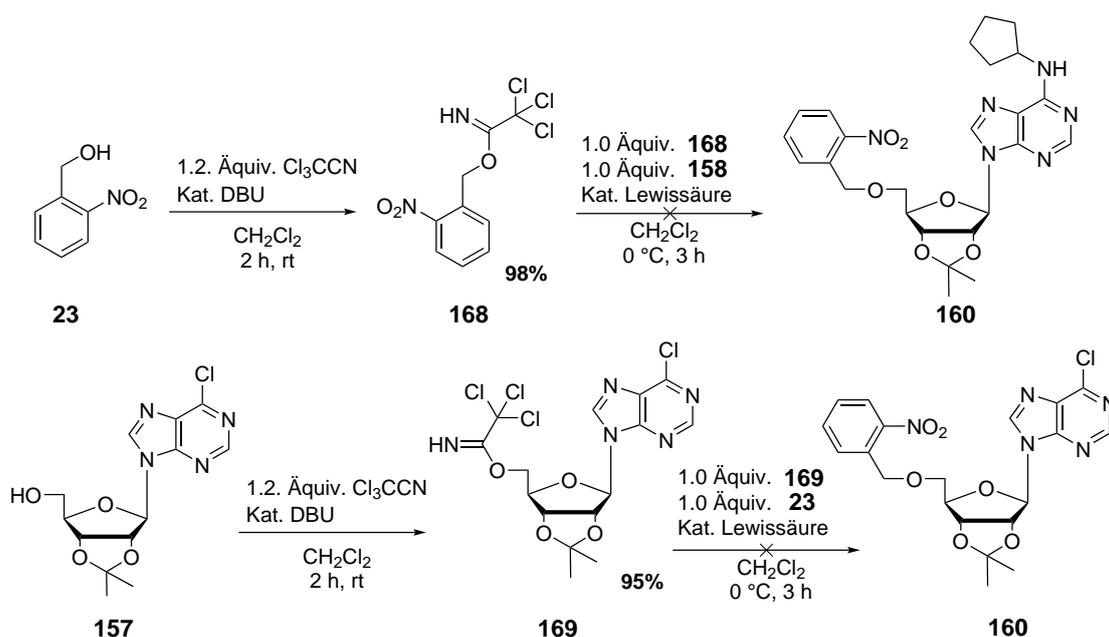
**Abbildung 112:** Darstellungsversuch des NB-geschützten Adenosinderivats **160** durch die Umsetzung der Mesylverbindung **166** mit 2-Nitrobenzylalkohol **23**.

Bei der Umsetzung des 2-Nitrobenzylalkohols **23** mit Natriumhydrid konnte die charakteristische Lilafärbung, welche bei der Verwendung des 2-Nitrobenzylbromids immer beobachtet werden konnte und mit der Bildung des Stilbenderivats assoziiert wurde, nicht beobachtet werden. Nach der halbstündigen Deprotonierung mit Natriumhydrid wurde eine leicht trübe und farblose Reaktionslösung erhalten. Zu dieser Lösung wurde anschließend das in DMF gelöste Mesylderivat **166** zugegeben. Nach 18 Stunden Reaktionszeit konnte jedoch keine Bildung von neuen Verbindungen durch eine Reaktionskontrolle mittels Dünnschichtchromatographie festgestellt werden. Die Reaktionslösung wurde daher anschließend auf 80 °C erwärmt, sodass für die Etherbildung mehr Energie zur Verfügung steht. Nach einer Stunde Reaktionszeit konnte jedoch nur eine Zersetzung der Edukte festgestellt werden. Vermutlich ist die Nucleophilie des verwendeten

2-Nitrobenzylalkohols für die Reaktion zum gewünschten Ether **160** nicht ausreichend hoch. Eventuell ist jedoch auch die Elektrophilie der Verbindung **166** nicht ausreichend, um die gewünschte Reaktion einzugehen. Es wäre denkbar, dass die Reaktion mit einer besseren Abgangsgruppe funktionieren könnte, jedoch konnte das Tosylderivat **167** trotz mehrfacher Syntheseversuche nicht isoliert werden. Die Darstellung des NB-geschützten Derivats **160** konnte somit über Syntheseroute B nicht realisiert werden.

### 4.10.2.3 Syntheseroute C

In Syntheseroute C sollte die Etherbindung durch die Kupplung eines Alkohols mit einem entsprechenden Trichloracetimidat realisiert werden. Trichloracetimide finden bevorzugt Anwendung bei der Synthese von glycosidischen Bindungen, da bei der Darstellung von entsprechenden Trichloracetimidaten durch die Wahl der verwendeten Base und Temperatur selektiv das  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Anomer erhalten werden kann. Durch die Umsetzung mit einem entsprechenden Nucleophil können im Anschluss durch eine Inversion der Konfiguration selektiv entsprechende  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Produkte erhalten werden.<sup>[144]</sup> Die Trichloracetimidat-Kupplung findet durch die einfache Synthese der Trichloracetimide nicht nur Anwendung bei der Knüpfung von glycosidischen Bindungen, sondern auch bei der Synthese von Ethern.<sup>[145]</sup> Die Darstellung der Trichloracetimide erfolgt dabei ausgehend von dem entsprechenden Alkohol durch die Umsetzung mit Trichloracetonitril in Anwesenheit einer katalytischen Menge der starken, nicht nucleophilen Base DBU (Diazabicycloundecen). Die entsprechende Synthese zur Darstellung der Trichloracetimide ist in Abbildung 113 abgebildet.



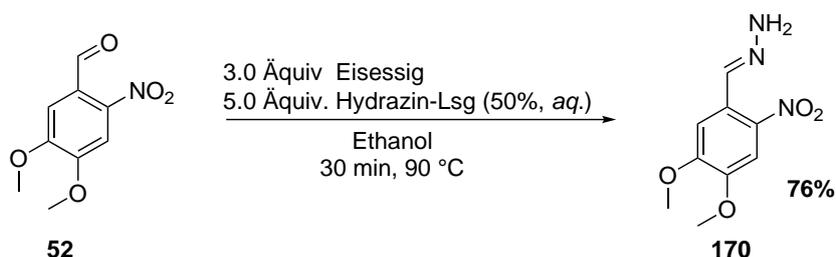
**Abbildung 113:** Darstellung der Trichloroacetimide **168** und **169** durch die Umsetzung der entsprechenden Alkohole **23** und **157** mit Trichloroacetonitril und der anschließenden Kupplungsversuche zu der NB-geschützten Verbindung **160**.

Die Darstellung der Trichloroacetimide erfolgte in beiden Fällen in fast quantitativen Ausbeuten von 98 % für das entsprechende 2-Nitroderivat **168** und mit 95 % für das Adenosinderivat **169**. Die Synthese der Trichloroacetimide verläuft dabei durch eine basenkatalysierte, reversible Addition des Alkohols an das elektronenarme Dreifachbindungssystem des Trichloroacetonitrils.<sup>[144]</sup> Die Trichloroacetimide zeichnen sich dabei durch ihre relativ hohe Stabilität und leichte Reinigung aus. Die hier erhaltenen Rohprodukte konnten ebenfalls ohne weitere Reinigung durch Säulenchromatographie für den nächsten Syntheseschritt verwendet werden. Im nächsten Reaktionsschritt erfolgte bereits die Kupplung mit dem entsprechenden Nucleophil. Es sollten dabei erneut beide Möglichkeiten der Kupplung getestet werden, weshalb sowohl das Trichloroacetimidat des 2-Nitrobenzalkohols **23** als auch der Adenosinverbindung **157** hergestellt wurden. Es wurde dabei bewusst auf das Adenosinderivat **157** ohne Cyclopentylamin-Gruppe zurückgegriffen, um einen Einfluss des Amins auf die Reaktion auszuschließen, sodass potentielle Nebenreaktionen vermieden werden. Die anschließende Kupplung des Trichloroacetimidats erfolgt durch die Zugabe einer Lewis-Säure, welche an das Stickstoffatom des Trichloroacetimidats koordiniert und mit dem freien Elektronenpaar des Stick-

stoffatoms wechselwirkt. Durch die Koordination der Lewis-Säure wird die Bindung zwischen dem Sauerstoffatom und dem Kohlenstoffatom des entsprechenden Bausteins (2-Nitrobenzyl- oder Adenosinbaustein) aktiviert, wodurch ein Nucleophil an dieser Position angreifen kann. Durch den Angriff wird die aktivierte Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindung gespalten und eine neue Bindung zum angreifenden Nucleophil ausgebildet. Als Nebenprodukt wird dabei Trichloracetamin gebildet.<sup>[144]</sup> Im ersten Versuch zur Darstellung des NB-geschützten Derivats **160** wurde als Lewissäure das in der Literatur häufig für diese Reaktionen eingesetzte Bortrifluorid-Etherat verwendet. Das gewünschte Produkt konnte jedoch in beiden der in Abbildung 113 gezeigten Reaktionen nicht erhalten werden. Ein <sup>1</sup>H-NMR des erhaltenen Rohprodukts zeigte in beiden Reaktionsversuchen eine vollständige Zersetzung der Edukte. Auch der Einsatz verschiedener weiterer Lewissäuren wie Trimethylsilyltriflat, Silbertriflat oder der Brønstedt-Säure Trifluormethansulfonsäure, zeigte keine Änderung des Reaktionsverlaufs, stets konnte eine Zersetzung der Edukte beobachtet werden. Als Grund für diese Zersetzung könnte die Nitrogruppe verantwortlich sein, da diese aufgrund ihrer elektronischen Struktur ebenfalls mit der zugegebenen Lewissäure wechselwirken könnte, wodurch eventuelle weitere Reaktionen möglich wären. Die Nitrogruppe ist zudem der einzige Unterschied zu dem kommerziell erhältlichen Trichloracetimidat des Benzylalkohols, welcher für Benzylierungen eingesetzt werden kann.<sup>[145]</sup> Es ließe sich somit schlussfolgern, dass die Reaktion vermutlich aufgrund des Einflusses der Nitrogruppe nicht wie gewünscht abläuft und dass das NB-geschützte Adenosinderivat **160** somit nicht durch die Syntheseroute C darstellbar ist.

#### 4.10.2.4 Syntheseroute D

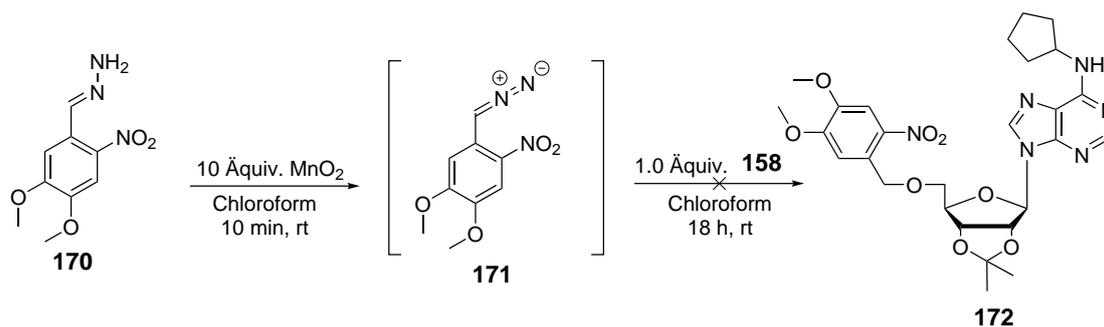
Im letzten Optimierungsversuch sollte das NB-geschützte Adenosinderivat **160** durch die Kupplung eines Hydrazons mit der 5'-Hydroxygruppe des Adenosinbausteins **158** hergestellt werden. Die Reaktion sollte dabei analog zu der bereits erfolgreich durchgeführten Kupplung des Hydrazons **136** mit dem cAMP in der freien Säureform **127** durchgeführt werden. Die Synthese des Hydrazons ist in Abbildung 114 dargestellt.



**Abbildung 114:** Synthese des Hydrazons **170** durch die Umsetzung des Aldehyds **52** mit einer wässrigen Hydrazin-Lösung (50 %).

Das entsprechende Nitroveratrylderivat **170** konnte in einer guten Ausbeute von 76 % erhalten werden. Im Vergleich zum zuvor hergestellten Hydrazone **136** ausgehend von einem Keton zeigte sich die erhöhte Reaktivität des Aldehyds in der schnellen Reaktionszeit von nur einer halben Stunde bis zu einem vollständigen Umsatz, während das entsprechende Hydrazone **136** drei Stunden bis zum vollständigen Umsatz benötigte. Es zeigte sich bereits bei der Darstellung des Hydrazons **136**, welches für die Kupplung zum MeNV-cAMPs **46** verwendet wurde, dass die Verbindung mit zwei Methoxygruppen sich leicht durch Kristallisieren reinigen lässt. Aus diesem Grund wurde zunächst das Hydrazone ausgehend vom Aldehyd **52** dargestellt und nicht das NB-Hydrazone hergestellt. Auf die Verwendung des zuvor eingesetzten Hydrazons **136** wurde aufgrund der Bildung von Diastereomeren verzichtet, da die MeNV-Maske ein Stereozentrum in der Benzylposition aufweist. Sollte jedoch ausgehend von dem NV-Hydrazone **170** das gewünschte *caged*-Adenosinderivat darstellbar sein, sollte die Reaktion mit dem NB-Alkohol **23** wiederholt werden.

Ausgehend vom erhaltenen Hydrazone **170** sollte anschließend die entsprechende Diazoverbindung erhalten werden, um diese mit dem Adenosinbaustein **158** zu koppeln. Die Synthese ist in Abbildung 115 dargestellt.

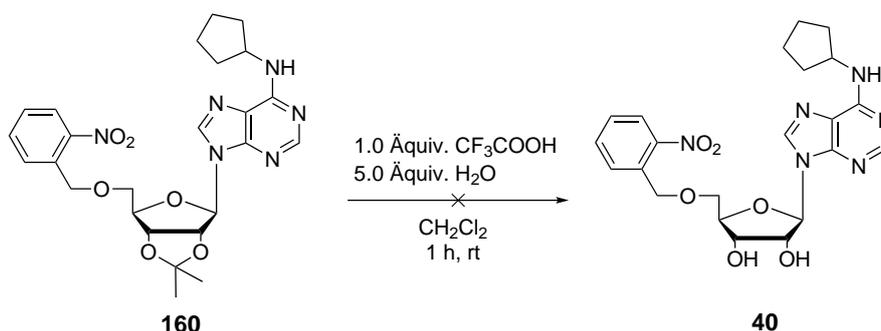


**Abbildung 115:** Synthese der Diazoverbindung **171** ausgehend vom Hydrazon **170** und der anschließenden Kupplung mit dem Adenosinbaustein **158** zur Darstellung des NV-geschützten Adenosinderivats **172**.

Die Bildung der Diazoverbindung **171** konnte, wie bereits bei der Darstellung des MeNV-cAMPs **46**, durch die intensive Rotfärbung der Reaktionslösung nach der Zugabe des Braunsteins beobachtet werden. Nach zehn Minuten wurde die Diazoverbindung **171** analog zu der zuvor dargestellten MeNV-Diazoverbindung **135** durch eine schnelle Filtration vom Braunstein befreit und tropfenweise zu einer Lösung des Adenosinbausteins **158** in Chloroform zugetropft. Nach 18 Stunden konnte ein vollständiges Verschwinden der roten Farbe beobachtet werden und es wurde eine klare gelbe Lösung erhalten. Nach Aufarbeitung der Reaktion konnte das gewünschte Produkt jedoch nicht isoliert werden, stattdessen wurde der Adenosinbaustein **158** fast vollständig reisoliert. Das Zerfallsprodukt der *in situ* gebildeten Diazoverbindung **171** konnte dagegen nicht durch NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie charakterisiert werden. Es ist zu vermuten, dass die Acidität der 5'-Hydroxygruppe nicht ausreichend hoch war, um die Reaktion stattfinden zu lassen. Bei der Darstellung des MeNV-cAMPs **46** war der Einsatz des protonierten cyclischen Phosphats essentiell, da vor dem nucleophilen Angriff des Phosphats das Proton auf die Benzylposition der eingesetzten Azoverbindung übertragen wird, um die Abspaltung von molekularem Stickstoff als hervorragende Abgangsgruppe zu ermöglichen. Vermutlich kann daher aufgrund der zu geringen Acidität des Alkohols die Reaktion nicht stattfinden, wodurch das gewünschte Derivat auch auf Syntheseroute D nicht darstellbar war.

Abschließend lässt sich somit festhalten, dass die Darstellung des NB-geschützten Adenosinderivats **160** nur durch die bereits von JACOBS vorgestellte Kupplung des Adeno-

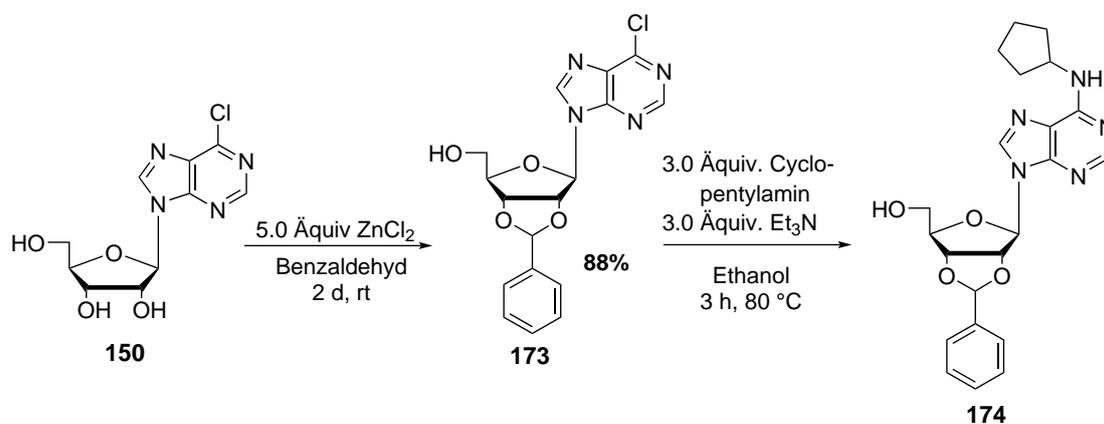
sinbausteins **158** in Form des Alkoholats mit 2-Nitrobenzylbromid möglich ist. Die dabei dominant gebildete Stilbenverbindung **164** muss bei dieser Reaktionsroute jedoch in Kauf genommen werden, wodurch das gewünschte Produkt nur in einer geringen Ausbeute isoliert werden kann. Da eine Darstellung der NB-geschützten Verbindung jedoch auf keinen anderen Wege möglich scheint, ist die erreichte Ausbeute von 12% jedoch als ausreichend aufzufassen. Im letzten Schritt zur Synthese des NB-geschützten Adenosinderivats **160** sollte abschließend die *Isopropyliden*klammer abgespalten werden. Die Synthese ist in Abbildung 116 dargestellt.



**Abbildung 116:** Syntheserversuch des NB-geschützten Adenosinderivats **40** durch die säurekatalysierte Abspaltung der Acetalschutzgruppe.

Das gewünschte Zielprodukt **40** konnte in der in Abbildung 116 dargestellten Reaktion nicht erhalten werden. Nach einer Stunde Reaktionszeit konnte durch eine Reaktionskontrolle mittels Dünnschichtchromatographie kein Reaktionsfortschritt festgestellt werden. Es wurde vermutet, dass die zugegebene Trifluoressigsäure durch die Protonierung des exocyclischen Amins gebunden wurde, sodass zunächst ein weiteres Äquivalent Säure zugegeben worden ist. Es konnte jedoch erneut nach einer Stunde kein Umsatz beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde die Reaktion im nächsten Schritt zum Rückfluss erhitzt. Durch das Erhitzen konnte jedoch eine Zersetzung des Edukts in mehrere unbekannte Verbindungen festgestellt werden. Nach einer im Anschluss durchgeführten säulenchromatographischen Reinigung konnten keine identifizierbaren Verbindungen erhalten werden. Auch der Wechsel der verwendeten Säure in weiteren Syntheserversuchen zu *p*-Toluolsulfonsäure oder Salzsäure führte zu keiner Bildung des Produkts. In jedem Syntheserversuch konnte nur die Zersetzung des Edukts festgestellt werden. Es gelang jedoch bei der Verwendung der *p*-Toluolsulfonsäure in einer weiterhin

verunreinigten Fraktion die Verbindung **158** zu charakterisieren. Bei dieser Verbindung handelt es sich um das Cyclopentyl-modifizierte und *Isopropyliden*-geschützte Adenosin. Folglich wurde durch die Säure die zuvor eingeführte NB-Gruppe gespalten. Es ist dabei nicht auszuschließen, dass die Spaltung des Nitroaromaten auch in den anderen Syntheserversuchen stattgefunden hat. Aus diesem Grund wurde die Synthese mit der leichter spaltbaren Benzyliden-Schutzgruppe wiederholt. Durch die Verwendung der Benzyliden-Gruppe sollte die Abspaltung der Acetalgruppe idealerweise bevorzugt bei Raumtemperatur ablaufen, sodass der eingeführte Ether an der 5'-Position nicht gespalten wird. Die Synthese der Benzylidenschützung ist in Abbildung 117 dargestellt. Die Synthese erfolgte dabei nach einem Protokoll von REDWAN.<sup>[146]</sup>

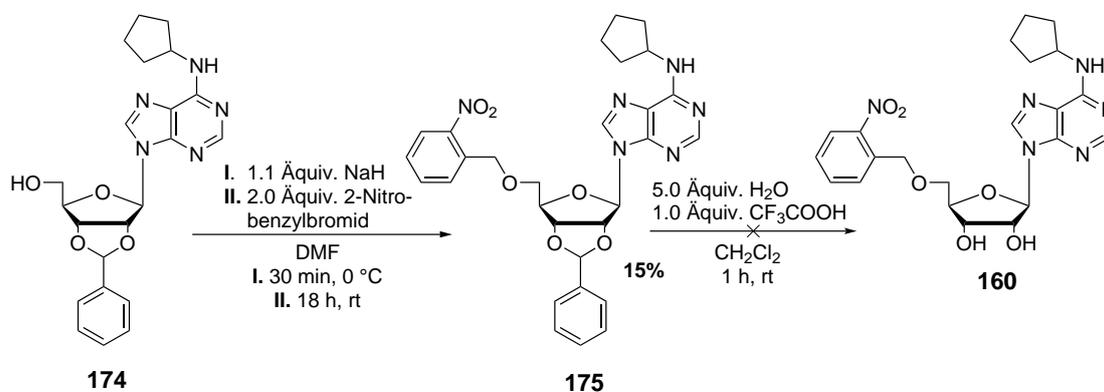


**Abbildung 117:** Synthese des Benzyliden-geschützten Derivats **173** und der anschließenden Umsetzung zur N<sup>6</sup>-modifizierten Verbindungen **174**.

Das Benzyliden-geschützte Derivat **173** konnte in einer Ausbeute von 88% erhalten werden und lag zunächst im Rohprodukt, wie zu erwarten, als ein 1:1 Gemisch von zwei Diastereomere vor. Nach mehreren chromatographischen Reinigungen, welche notwendig waren um das eingesetzte Benzaldehyd abzutrennen, konnte jedoch schließlich ein 2:1 Gemisch der beiden Diastereomeren erhalten werden, da bei jedem Reinigungsschritt ein Teil eines Diastereomeres mit dem Benzaldehyd abgetrennt wurde. Die Synthese des Derivats **173** wurde zuerst durch die säurekatalysierte Umsetzung des Benzaldehyddimethylacetals mit dem Adenosinderivat **150** versucht. In diesem Syntheseansatz konnte jedoch nur das Edukt **173** und Benzaldehyd reisoliert werden, sodass auf die Synthesevorschrift von REDWAN zurückgegriffen werden musste. Dieser beschreibt die

hier durchgeführte Synthese mit Benzaldehyd als Lösungsmittel, um die Reaktion auf die Seite des Produkts zu verschieben. Als Lewisäure dient das zugegebene Zink(II)chlorid, welches vor der Verwendung gründlich im Vakuum bei 600 °C getrocknet wurde. Ausgehend von der geschützten Verbindung **173** konnte anschließend die Cyclopentylgruppe in einer vergleichbaren Ausbeute von 67% zu den zuvor durchgeführten Synthesen mit der *Isopropylidengruppe* durchgeführt werden.

Im nächsten Schritt sollte anschließend die NB-Gruppe mit Hilfe der zuvor erfolgreich durchgeführten Syntheseroute A an der 5'-Position des zuvor hergestellten Benzylidengeschützten Derivats **174** angeknüpft werden. Die entsprechende Synthese ist in Abbildung 118 dargestellt.

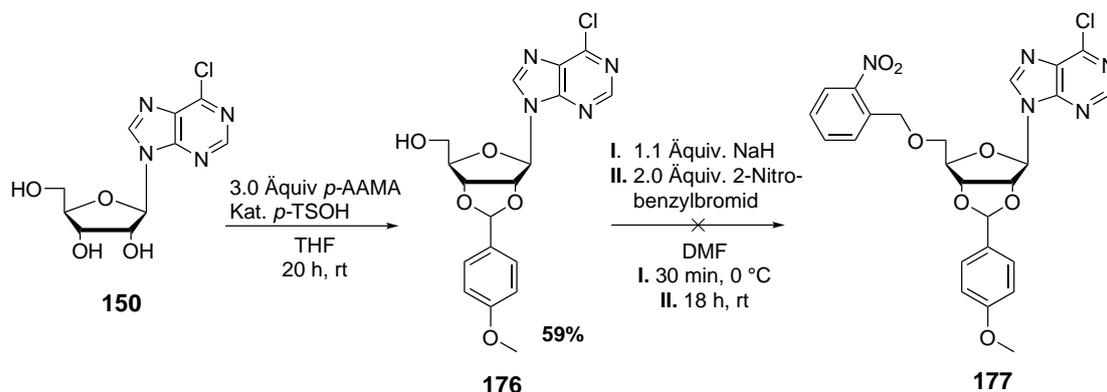


**Abbildung 118:** Synthese des NB-geschützten Derivats **175** durch die Umsetzung des Alkohols **174** mit Natriumhydrid und 2-Nitrobenzylbromid. Anschließend erfolgte der Versuch der Abspaltung der Benzylidengruppe durch die Umsetzung mit Trifluoressigsäure und Wasser.

Die Kupplung des Alkohols **174** mit Natriumhydrid und 2-Nitrobenzylbromid nach der WILLIAMSONSCHEN-Ethersynthese konnte in einer vergleichbaren Ausbeute von 15% mit der *Isopropylidenklammer* durchgeführt werden. Es konnte ebenfalls wie zuvor die Bildung der Stilbenverbindung **164** beobachtet werden, welche wieder deutlich an der Lilafärbung der Reaktionslösung beobachtet werden konnte. Die Anwesenheit der beiden Diastereomere in verschiedenen Verhältnissen erschwerte, wie bereits zuvor vermutet, die Analytik und Reinigung der Verbindung. Die erreichte Ausbeute von 15% ist somit und mit Rückblick auf die zuvor versuchten Optimierungsversuche als zufriedenstellend einzuordnen. Jedoch konnte erneut bei der anschließenden Abspaltung der Acetalschutzgruppe die Spaltung des Nitroaromaten beobachtet werden. Es gelang zwar

die Spaltung des Acetals, bedingt durch die leichtere Spaltung der Benzylidengruppe im Vergleich zur *Isopropyliden*klammer, bei Raumtemperatur durchzuführen, jedoch lies sich das erhaltene Gemisch aus dem gewünschten Produkt **160** und dem erhaltenen Nebenprodukt ohne NB-Gruppe trotz mehrfacher säulenchromatographischer Reinigungen nicht von einander trennen, da die  $R_F$ -Werte der beiden Verbindungen annähernd identisch sind. Das Produkt konnte somit nicht rein isoliert werden.

Als abschließender Versuch sollte die Darstellung der gewünschten Zielverbindung durch die Verwendung der noch labilieren Acetalschutzgruppe 4-Methoxybenzyliden getestet werden. Die Schutzgruppe basierend auf *p*-Anisaldehyd, wird bereits durch Kieselgel gespalten, wodurch die Reinigung an Kieselgel erschwert ist, da dieses vorher entsäuert werden muss und dem Laufmittel stets Triethylamin zugesetzt werden sollte. Aus diesem Grunde wurde beschlossen die Cyclopentylgruppe als letzte funktionale Gruppe in das Zielmolekül einzufügen und zunächst mit dem Chlorpurin zu arbeiten, um einen Reaktionsschritt mit der labilen 4-Methoxybenzyliden-Gruppe weniger durchzuführen. Die Synthese der 4-Methoxybenzyliden geschützten Verbindung **176** ist in Abbildung 119 dargestellt.



**Abbildung 119:** Darstellung der 4-Methoxybenzyliden geschützten Verbindung **176** und dem anschließenden Versuch zur Darstellung der NB-geschützten Verbindung **177** (*p*-AAMA: *p*-Methoxybenzaldehyddimethylacetal).

Die Darstellung der 4-Methoxybenzyliden geschützten Verbindung **176** konnte in einer Ausbeute von 59 % ausgehend von der kommerziell erhältlichen Verbindung **150**, durch die säurekatalysierte Umsetzung mit *p*-Methoxybenzaldehyddimethylacetal erhalten werden. Ebenso wie die Benzylidenverbindung **173** wurde auch diese Verbindung zunächst in einem Verhältnis der beiden Diastereomere von 1:1 erhalten. Jedoch konnte bedingt durch eine Vielzahl an chromatographischen Reinigungen, um den Überschuss an Acetalisierungsreagenz zu entfernen, das Produkt am Ende nur in einem Verhältnis von 1:0.4 erhalten werden. Die erreichte Ausbeute von 59 % ist vermutlich auch auf die hohe Anzahl an Reinigungsschritten zurückzuführen, da das Produkt nur schwierig zu reinigen war und trotz des Zusatzes von Triethylamin eine leichte Zersetzung bei der säulenchromatographischen Reinigung zeigte. Die Kupplung zum NB-geschützten Derivat **177** konnte jedoch im Anschluss nicht erfolgreich durchgeführt werden. Es konnte zwar zunächst die geringe Bildung des Produkts, neben der erneuten starken Bildung des Stilbenderivats, per DC-Reaktionskontrolle beobachtet werden, jedoch konnte das gewünschte Produkt nicht isoliert werden. Aufgrund der hohen Labilität der verwendeten Acetalschutzgruppe ist davon auszugehen, dass das Produkt, bedingt durch die hohe Anzahl an Reinigungsschritten, schließlich trotz des Zusatzes an Triethylamin zum Laufmittelgemisch zersetzt wurde.

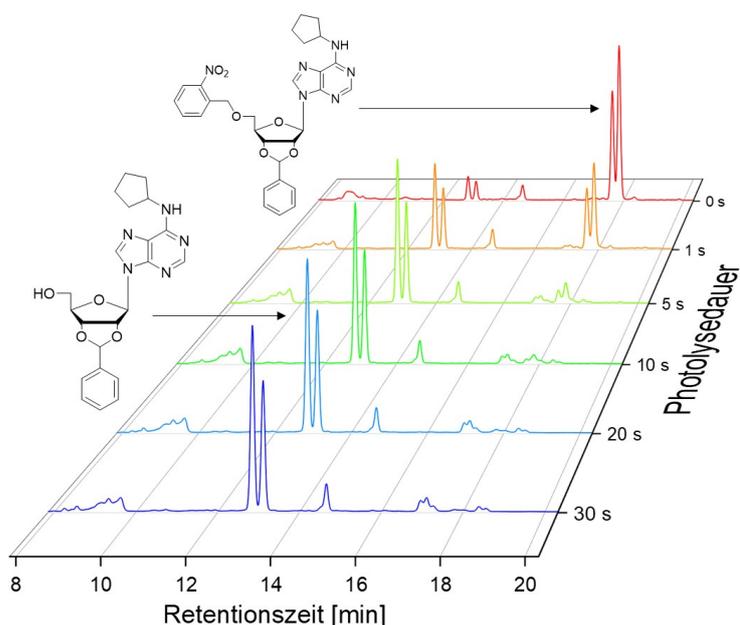
Abschließend lässt sich somit festhalten, dass die Synthese der Zielverbindung **40** nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte. Trotz einer Vielzahl an Optimierungsversuchen gelang es nicht die Kupplung der NB-Gruppe an die 5'-Hydroxygruppe in zufriedenstellenden hohen Ausbeuten ohne die Bildung des Stilbennebenprodukts **164** durchzuführen. Stattdessen war die Isolierung des entsprechend geschützten Produkts nur im niedrigen zweistelligen Prozentbereich von 11 % und 15 % möglich. Nachdem der gewünschte Ether **160** jedoch erhalten werden konnte, gelang es nicht die Acetalschutzgruppe ohne eine Zersetzung des Moleküls abzuspalten. Der Tausch der Acetalschutzgruppe von der relativ stabilen *Isopropylidengruppe* zur labileren Benzylidengruppe bietet zwar die Möglichkeit das Acetal bei Raumtemperatur zu spalten, jedoch konnte immer noch eine zeitgleiche Abspaltung der NB-Maske beobachtet werden. Das erhaltene Rohprodukt konnte in anschließenden mehrmals wiederholten Reinigungsschritten aufgrund zu ähnlicher Retentionszeiten nicht in die einzelnen Bestandteile getrennt werden, wodurch das Produkt auch bei der Verwendung der Benzylidenklammer nicht isoliert werden konnte.

Die NB-Gruppe stellt somit nur bedingt einen synthetischen Ersatz für mögliche andere Schutzgruppen für Hydroxygruppen dar, da die NB-Gruppe sowohl schwierig und in schlechten Ausbeuten in Form von Ethern in das Molekül eingebracht werden kann. Darüber hinaus weisen die NB-Ether eine gewisse Labilität gegenüber Säuren auf, so dass die Verwendung orthogonaler durch Säure spaltbarer Schutzgruppen erschwert sein kann. Die photoinduzierte Abspaltung der NB-Gruppe von der 5'-Hydroxygruppe der Verbindung **160** sollte jedoch im Folgenden trotzdem getestet werden, um zu testen, ob der synthetische Aufwand zur Schützung eines Alkohols mit der NB-Gruppe überhaupt notwendig ist oder ob die NB-Gruppe von dem Alkohol nur in einer unzureichenden Geschwindigkeit abgespalten werden kann. Trotz der Schwierigkeiten, die NB-Gruppe durch eine Ethersynthese in das zu schützende Molekül einzuführen, kann die Verwendung dieser Gruppe in Ausnahmefällen sinnvoll sein, falls keine weitere Schutzgruppe verwendet werden kann, jedoch sollte die Abspaltung der NB-Gruppe durch UV-Licht in diesem Fall zufriedenstellend durchgeführt werden können. Dies soll mit der im Folgenden durchgeführten Photolyse überprüft werden.

### **4.10.3 Photolyse des erhaltenen NB-geschützten Adenosinderivats 160**

Ausgehend von der isolierten Verbindung **175**, welche eine NB-Gruppe an der 5'-Position der Ribose aufweist und noch Benzyliden-geschützt ist, soll die photoinduzierte Abspaltung der 2-Nitrobenzylgruppe von Hydroxygruppen erprobt werden. Dabei soll im Besonderen getestet werden, ob die Abspaltung der NB-Gruppe, im Vergleich zum maskierten Bis-NB-ATP **71**, langsamer oder schneller erfolgt. Theoretisch sollte die Güte der Abgangsgruppe, beziehungsweise der Gruppe welche freigesetzt wird, einen Einfluss auf die Spaltgeschwindigkeit aufweisen. Die Freisetzung des Phosphats aus dem Bis-NB-ATP **71** sollte somit theoretisch schneller erfolgen als die formale Freisetzung des Alkohols der 5'-Hydroxygruppe, da die negative Ladung am Phosphat besser stabilisiert ist als im entsprechenden Alkoholat der Verbindung **175**. Die Tendenz von verschiedenen Abgangsgruppen und die Tatsache, dass Alkohole tendenziell schlechte Abgangsgruppen in Photolysen darstellen ist dabei in der Literatur beschrieben.<sup>[147]</sup> Jedoch sei dazu angemerkt, dass die dazu stattgefundenen Untersuchungen mit Lasern und Blitzlicht-photolysen im Femtosekundenbereich stattgefunden haben und nicht mit den in dieser Arbeit durchgeführten Photolysen mit einer UV-LED Lichtquelle und der anschließenden

Quantifizierung durch HPLC-Analysen vergleichbar sind. Die Photolyse der Verbindung **175** wurde mit der 365 nm UV-LED durchgeführt, welche eine kumulierte Leistung von 3.9 W aufweist. Bei der Untersuchung des symmetrischen NB-ATP Derivats **71** konnte beobachtet werden, dass, obwohl die NB-Maske keine signifikante Absorptionsbanden bei dieser Wellenlänge aufweist, die Spaltung der NB-Gruppen in vergleichbaren Zeiten zu den donorsubstituierten 2-Nitrogruppen durchgeführt werden konnte (vgl. Abschnitt 4.4). Das durch die Photolyse und anschließender HPLC-Analyse erhaltene Wasserfalldiagramm ist in Abbildung 120 dargestellt.



**Abbildung 120:** Wasserfalldarstellung der erhaltenen Chromatogramme, welche während der Photolyse der Verbindung **175** erhalten wurde. Die erhaltenen Signale sind mit den entsprechenden Strukturformeln markiert. Bedingungen: 365 nm UV-Licht ; 3.9 W Leistung; 1 mg/ml in DMSO.

In dem Wasserfalldiagramm können die beiden erhaltenen Diastereomere, sowohl in der eingesetzten Verbindung **175** als auch in der gebildeten Verbindung **174**, durch die Anwesenheit der fast Basislinien getrennten Signale beobachtet werden. Die hohe Lipophilie der Verbindung **175** kann zudem an der späten Retentionszeit von 17.7 min beobachtet werden. Die schnelle Spaltung der NB-Gruppe kann sehr gut in dem in Abbildung 120 dargestellten Wasserfalldiagramm erkannt werden. Bereits nach einer Sekunde Be-

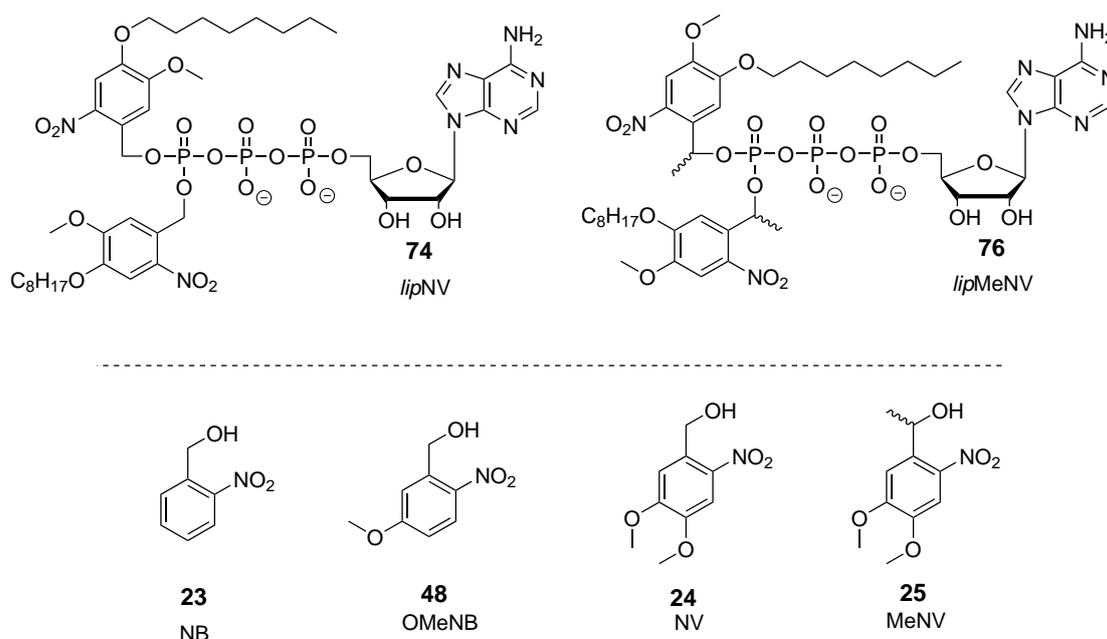
strahlung ist circa die Hälfte der Ausgangsverbindung **175** gespalten worden. Diese qualitative Beobachtung deckt sich auch mit der berechnete Halbwertszeit mit einem Wert von 1.0 s. Die ermittelte Halbwertszeit ist somit die bisher in dieser Arbeit niedrigste Halbwertszeit von allen hergestellten und untersuchten photospaltbaren Gruppen. Es sei jedoch angemerkt, dass die Photolyse aufgrund des unpolaren Charakters der Verbindung **175** in DMSO durchgeführt werden musste. Bereits bei dem  $\gamma$ -Alkyl-modifizierten ATP-Derivat **86** konnte eine schnellere Spaltung der MeNV-Gruppe in DMSO als in Phosphatpuffer beobachtet werden (vgl. Abbildung 55, Seite 87). Jedoch selbst mit einer hypothetisch doppelt so hohen Halbwertszeit von 2.0 s in Phosphatpuffer weist die hier photolysierte Verbindung **175** immer noch die schnellste Spaltgeschwindigkeit auf. Die hier beobachtete Spaltgeschwindigkeit deckt sich somit nicht mit der allgemeinen Aussage in der Literatur über die Spaltgeschwindigkeit der NB-Maske in Abhängigkeit der Güte der Abgangsgruppe.

Es lässt sich somit festhalten, dass die Darstellung von NB-maskierten Alkoholen nur in geringen Ausbeuten und mit der Bildung eines dominanten Nebenprodukts möglich ist, die NB-Maske jedoch unter geeigneten Bedingungen schnell und ohne Nebenreaktionen auch von Hydroxygruppen abgespalten werden kann. Der Einsatz von NB-Gruppen als Schutzgruppe könnten somit in Ausnahmefälle sinnvoll sein, falls die Anwendung von gängigeren Schutzgruppen, zum Beispiel aufgrund von Säure- oder Basenlabilität, nicht möglich sein könnte.

## 5 Fazit

Für zelluläre Signaltransduktion bei der Aktivierung bzw. Desaktivierung von Immunreaktionen sind endokrine Purinverbindungen essenziell. Eine besondere Rolle nehmen in diesem komplexen System das Adenosintriphosphat (ATP), das cyclische 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) sowie Adenosin ein. Es konnte beobachtet werden, dass Zellen bei Verletzungen, der Anwesenheit von Pathogene oder bei Zellstress intrazelluläres ATP in den extrazellulären Raum ausschütten. Es kann dabei ein zehnfacher Anstieg der extrazellulären ATP-Konzentration beobachtet werden, weswegen geschlossen wurde, dass dieser Anstieg die erste Reaktion des Immunsystems darstellt. Um der einsetzenden Entzündungsreaktion entgegenzuwirken wird das extrazelluläre ATP durch das Ectoenzym CD39/73 über Adenosinmonophosphat zu Adenosin abgebaut, welches als extrazellulärer Gegenspieler von ATP dient, da es dem von ATP ausgelösten, entzündungsfreundlichen Milieu entgegenwirkt. Eine Störung dieses Gleichgewichts zwischen ATP und Adenosin wird mit verschiedenen Krankheiten wie AIDS, Alzheimer und weiteren chronischen Entzündungserkrankungen in Verbindung gebracht. Das freiwerdende ATP und Adenosin beeinflussen auch die Aktivität der zellulären Adenylcyclase, wodurch die Konzentration des *second messenger* cAMP in der Zelle direkt durch diese beiden Verbindungen beeinflusst wird. Das in der Zelle gebildete cAMP kann weitere immunregulatorische Aktionen der Zelle auslösen, wie zum Beispiel die Öffnung von Ionenkanälen, um das eintreffende Signal weiter zu amplifizieren oder aber es können spezifische posttranslative Modifikationen an Enzymen ausgelöst werden. Um diese komplexen Immunreaktionen besser zu verstehen und untersuchen zu können, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, diese Verbindungen so darzustellen, dass sie gezielt durch die Bestrahlung mit Licht in zellulären Assays freigesetzt werden können, sodass die ausgelösten zellulären Reaktionen direkt beobachtet werden können. Es sollten dabei jedoch nicht nur Verbindungen hergestellt werden, welche im extrazellulären Bereich freigesetzt werden können, sondern auch lipophile Verbindungen, damit intrazelluläre Untersuchungen durchgeführt werden können. Durch die Verwendung von lipophilen lichtlabilen Schutzgruppen sollte die Lipophilie des ATPs soweit gesteigert werden, dass eine passive Diffusion durch die Zellmembran ermöglicht wird. Dabei wird das verwendete ATP bei der lipophilen Maskierung auch als Testsubstrat verwendet, da nach erfolgreicher Synthese und Photolyse eines lipophilen und photola-

bilen ATP-Derivats dieses Konzept auch auf antivirale Nucleosidtriphosphate übertragen werden könnte, um mit diesen Verbindungen die antivirale Aktivität der entsprechenden Nucleosidtriphosphate weiter zu untersuchen. Die in dieser Arbeit hergestellten lipophilen ATP-Derivate und die für Vergleichszwecke dargestellten nicht-lipophilen Masken sind in Abbildung 121 dargestellt.



**Abbildung 121:** Abbildung der in dieser Arbeit dargestellten symmetrischen *caged*-ATP Derivate **74** und **76**. Ebenfalls abgebildet sind die dargestellten nicht-lipophilen lichtspaltbaren Masken **23**, **48**, **24** und **25**. Diese wurden ebenfalls für die Synthese von *caged*-ATP Derivaten verwendet. Unter den Strukturformeln ist die in der Arbeit verwendete Kurzbezeichnung für die jeweilige Schutzgruppe angeführt. (NB: Nitrobenzyl; NV: Nitroveratryl; MeNV: Methyl-Nitroveratryl; *lip*: lipophil).

Die beiden lipophilen ATP-Derivate **74** und **76** konnten, im Vergleich zu den nicht-lipophilen ATP-Derivaten, in geringen Ausbeuten von 38 % (*lipNV*) bzw. 23 % (*lipMeNV*) hergestellt werden. Die nicht-lipophilen ATP-Derivate konnten dagegen durchschnittlich in einer Ausbeute von 50 % dargestellt werden. Für die Synthese der symmetrischen ATP-Derivate musste, abhängig von der verwendeten photolabilen Gruppe, auf zwei verschiedene Synthesemethoden zurückgegriffen werden. Während die symmetrischen ATP-Derivate basierend auf den 2-Nitrobenzylalkoholen **23**, **48**, **24** und der lipophilen

*lipNV*-Gruppe **43** durch die Reaktion eines symmetrischen Amidits mit Adenosindiphosphat (ADP) hergestellt werden konnten, erfolgte die Synthese der ATP-Derivate, basierend auf den sekundären Alkoholen **25** und dem lipophilen **44**, über die Kupplung von entsprechenden H-Phosphonaten an ADP. Nachdem die gewünschten Derivate dargestellt werden konnten, wurden diese in Photolyseexperimenten unter standardisierten Bedingungen untersucht. Dazu wurden Lösungen der ATP-Derivate für bestimmte Zeitintervalle mit Licht einer Wellenlänge von 365 nm bestrahlt und anschließend wurde die Zusammensetzung der Lösung nach den jeweiligen Zeitintervallen per HPLC-Analyse ermittelt. Aus den gemessenen Peakflächen konnte anschließend durch das Auftragen gegen die Photolysezeit die Halbwertszeit für jedes ATP-Derivat bestimmt werden. Es zeigte sich, dass das hergestellte *lipMeNV*-ATP **76** mit einer Halbwertszeit von sechs Sekunden mit Abstand am schnellsten gespalten werden konnte. Wie erwartet konnte das nicht-substituierte NB-Derivat **71** mit einer Halbwertszeit von 36 s bei dieser Wellenlänge am langsamsten gespalten werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Spaltung der NB- NV- und MeNV-Gruppe bei 405 nm signifikant um den Faktor drei bis vier langsamer abläuft als bei 365 nm. Trotz der langsamen Spaltung konnte jedoch eine vollständige Abspaltung ohne die Bildung von störenden Nebenprodukten beobachtet werden.

Neben den symmetrischen *caged*-ATP Verbindungen wurden auch asymmetrisch-maskeierte ATP Derivate hergestellt, wie zum Beispiel das AB-MeNV-ATP **82** mit einer lipophilen Acyloxybenzyl-Maske (AB-Maske) und einer photolabilen MeNV-Maske. Bei dem AB-MeNV-ATP wird durch die verwendete AB-Maske die Lipophilie des Derivats erhöht und mit der MeNV-Gruppe werden die Vorteile der photolabilen Gruppen beibehalten. Dieser Schritt war nötig, da beobachtet werden konnte, dass die abgespaltenen lipophilen Photogruppen nur gering in dem verwendeten wässrigen Medium löslich waren und somit vermutlich auch im zellulären Bereich nicht eingesetzt werden können. Um zu zeigen, dass beide Masken orthogonal zueinander abgespalten werden können, wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Das bei diesen Experimenten jeweils gebildete monomaskierte ATP-Derivat wurde anschließend durch die ermittelte HPLC-Retentionszeit und dem aufgenommenen UV-Vis-Spektrum identifiziert. Dazu wurde das asymmetrische AB-MeNV-ATP zunächst photolysiert und in einem weiteren Experiment mit einer Enzymlösung hydrolysiert. Aus den Ergebnissen konnte ohne Zweifel geschlossen werden, dass beide Masken orthogonal gespalten werden können und die jeweiligen

Spaltprodukte über einen längeren Zeitraum unter den jeweiligen Bedingungen stabil sind. Die selben Ergebnisse wurden im Anschluss auch in einem kombinierten Experiment validiert, in welchem die enzymatische Hydrolyse und Photolyse direkt nacheinander in demselben Medium durchgeführt wurde, ohne das das zugegebene Enzym vor der Photolyse entfernt wurde.

Bei dem zweiten dargestellten asymmetrischen Derivat handelt es sich um ein  $\gamma$ -Alkyl-ATP-Derivat **86**, welches zusätzlich mit der MeNV-Gruppe maskiert wurde. Das Derivat weist aufgrund der Alkylkette eine besondere Stabilität auf, wodurch mit dieser Verbindung die Abspaltung der MeNV-Gruppe unter verschiedenen Bedingungen untersucht wurde. Während die bestimmten Halbwertszeiten in verschiedenen Lösungsmitteln wie Acetonitril, Dimethylsulfoxid, Phosphatpuffer (pH 7.4) oder einem Gemisch aus Puffer und Acetonitril nur maginal voneinander abweichen, konnte bei den Photolysen mit unterschiedlichen pH-Werten eine Abhängigkeit der Halbwertszeit vom pH-Wert festgestellt werden. Bei einem pH-Wert von 7-8 konnte eine schnelle Spaltung beobachtet werden (Halbwertszeit: 8 s), während im sauren oder basischen Milieu dagegen fast eine Verdopplung der Spaltgeschwindigkeit beobachtet werden konnte.

Um das unvermeidbar bei der Photolyse gebildete reaktive Nitroso-Spaltprodukt gänzlich zu vermeiden, wurde neben den bislang eingesetzten Schutzgruppen basierend auf dem 2-Nitrobenzyl-Grundgerüst auch die *para*-Hydroxyphenylacetyl (pHP) Schutzgruppe verwendet. Eine entsprechende lipophil veresterte pHP-Schutzgruppe konnte über insgesamt fünf Syntheseschritte dargestellt werden. Es zeigte sich jedoch, dass diese veresterte pHP-Maske anschließend nur in Form eines H-Phosphonats als phosphorhaltiger Precursor für die Kupplung zum *caged*-ATP dargestellt werden konnte, da während der Synthese zum Amidit immer eine Zersetzung der Reaktionspartner beobachtet werden konnte. Ausgehend vom H-Phosphonat konnte die Kupplung zum *caged*-pHP-ATP jedoch anschließend trotz mehrerer Syntheseveruche nicht realisiert werden, da stets eine Zersetzung des H-Phosphonats während der Reaktion festgestellt wurde. In einem Reaktionsversuch gelang es jedoch ein symmetrisches Butyl-verestertes pHP-Monophosphat zu isolieren, mit welchem die Abspaltung der Maske erprobt werden konnte. Es zeigte sich, dass die zunächst notwendige vollständige Spaltung des Esters durch die Hydrolyse mit *pig-liver-esterases* (PLE) nach circa zwanzig Minuten beobachtet werden konnte. Anschließend wurde die erhaltene Lösung mit Licht einer Wellenlänge

von 310 nm bestrahlt und es konnte eine vollständige stufenweise Abspaltung der pHP-Maske nach circa dreißig Sekunden beobachtet werden. Eine photolytische Spaltung der noch Butyl-veresterten pHP-Maske gelang wie erwartet nicht. Die Kombination aus enzymspaltbarem Ester und der anschließenden lichtinduzierten Abspaltung des erhaltenen Phenols konnte somit erfolgreich aufgezeigt werden.

Ebenfalls konnte die Synthese von MeNV-geschützten cAMP **46** auf zwei verschiedenen Syntheserouten erfolgreich abgeschlossen werden. Das MeNV-cAMP wurde dabei zunächst durch die Kupplung einer *in situ* dargestellten Diazoverbindung an das protonierte cAMP dargestellt und anschließend erfolgte eine weitere Darstellung des Derivats über die von MEIER publizierte stufenweise Kupplung eines Diamidits an die 5'- und 3'-Hydroxygruppen eines an der  $N^6$ -Position doppelt Fmoc-geschützten Adenosinderivats. Es zeigte sich, dass die Fmoc-Gruppen unter wasserfreien Bedingungen mit Triethylamin vom erhaltenen *caged*-cAMP in sehr guten Ausbeuten abgespalten werden konnten. Der Syntheseschritt zum MeNV-cAMP konnte in der Syntheseroute mit der Diazoverbindung in einer Ausbeute von 60 % durchgeführt werden und in der Route mit dem Diamidit in einer Ausbeute von 40 %. Es zeigte sich im anschließenden Photolyseexperiment, dass die MeNV-Gruppe mit einer Halbwertszeit von 3.5 Sekunden abgespalten wurde und dass das cAMP quantitativ freigesetzt wurde.

Im letzten Abschnitt dieser Arbeit wurde versucht, die NB-Schutzgruppe als effektive Schutzgruppe für die Synthese von  $N^6$ -Cyclopentyl-5-NB-adenosin **40** zu verwenden. Es zeigte sich jedoch, dass die Kupplung zum NB-Ether nur in extrem schlechten Ausbeuten von 12 % realisiert werden konnte, da sich unter den notwendigen basischen Bedingungen nicht der NB-Ether bildete, sondern dominant ein Stilbenderivat erhalten wurde. Um die Bildung des Stilbennebenprodukts zu vermeiden, wurden weitere verschiedene Ethersynthesen erprobt. Darunter die Kupplung über Trichloracetimidate und die zuvor beim cAMP durchgeführte Kupplung über eine Diazoverbindung, jedoch konnte der gewünschte NB-Ether in keinem Fall erhalten werden. Es zeigte sich bei der anschließenden Abspaltung der Acetalschutzgruppe von der 2',3'-Position, dass der NB-Ether durch Säuren leicht gespalten wird, wodurch das gewünschte Produkt **40** nicht dargestellt werden konnte. Ausgehend von dem noch acetalgeschützten NB-Derivat wurde jedoch festgestellt, dass die NB-Gruppe mit einer Halbwertszeit von nur einer Sekunde lichtinduziert abgespalten werden konnte. Somit ist die NB-Gruppe zwar nur in schlechten Ausbeuten in das Molekül einzubringen aber sehr schnell wieder abspaltbar, wodurch der Einsatz

in spezifischen Fällen lohnenswert sein könnte.

Abschließend lässt sich somit festhalten, dass die Synthese von verschiedenen symmetrisch photolabil maskierten ATP-Derivaten auf Basis des 2-Nitrobenzyl-Strukturmotivs realisiert werden konnte und das ATP aus allen diesen Derivaten durch die Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm quantitativ freigesetzt werden konnte. Ebenso gelang es, zwei asymmetrisch geschützte Derivate darzustellen, welche eine MeNV-Gruppe und entweder eine AB-Gruppe oder eine Alkylkette aufwiesen. Weiterhin konnte auch das antivirale d4T-Triphosphat mit zwei NV-Gruppen photolabil maskiert werden und die anschließende Freisetzung von d4T-Triphosphat durch Bestrahlung gezeigt werden, sodass das neuartige Themenfeld der photolabil maskierten antiviralen Nucleosidtriphosphate für spätere Untersuchungen erschlossen wurde. Neben der Schützung von Nucleosidtriphosphaten gelang auch die erfolgreiche Darstellung des MeNV-geschützten cAMPs und es konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von cAMP zügig und quantitativ erfolgte. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass der Einsatz dieser photolabil maskierten Adenosinderivate in zellulären Assays erstrebenswert wäre, um die ausgelösten (Immun)-Reaktionen der Zelle nach der gezielten Freisetzung dieser Verbindungen zu beobachten.

## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Verwendete Geräte und Chemikalien

- **Chemikalien**

Die meisten Ausgangsverbindungen und Reagenzien wurden ohne weitere Reinigung, wie vom Hersteller bezogen, verwendet. Die Chemikalien wurden von den Firmen ABCR, Acros Organics, Alfa Aesar, Fluka, Fluorochem, Grüssing, Merck, Sigma Aldrich, TCI oder VWR in Reinheiten von mindestens 95 % bezogen. Folgende Reagenzien wurden vor ihrer Verwendung wie folgt gereinigt beziehungsweise absolutiert.

*Kaliumcarbonat* wurde für Synthesen unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss bei 600 °C im Vakuum getrocknet.

*Triethylamin* wurde für zwei Tage über Calciumhydrid zum Rückfluss erhitzt und anschließend unter Inertgas destilliert und über Molsieb 4 Å und unter Lichtausschluss gelagert.

*Phosphor(III)chlorid* und *Phosphoroxychlorid* wurden unter Inertgas destilliert und anschließend unter Inertgas gelagert.

- **Lösungsmittel**

Die verwendeten technischen Lösungsmittel wurden vor ihrer Verwendung, wie nachfolgend aufgelistet, gereinigt. Nicht aufgeführte Lösungsmittel wurden wie vom Hersteller geliefert verwendet.

*Acetonitril* (CH<sub>3</sub>CN, HPLC grade): Ohne weitere Reinigung eingesetzt

*Dichlormethan* (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): Wurde unter Normaldruck destilliert.

*Ethylacetat* (EE): Wurde unter Normaldruck destilliert.

*Methanol* (MeOH): Wurde unter Normaldruck destilliert.

*Petrolether 50-70* (PE): Wurde unter Normaldruck destilliert.

• **Absolute Lösungsmittel**

Für Reaktionen unter Sauerstoff-, und Feuchtigkeitsausschluss wurden folgende Lösungsmittel verwendet und entsprechend getrocknet bzw. bereits getrocknet vom entsprechenden Hersteller erworben.

*Acetonitril*, *Dichlormethan*, *Diethylether*, *Pyridin* und *Tetrahydrofuran* wurde bei Sigma Aldrich in HPLC-Qualität erworben und anschließend durch die Lösungsmittel-Trocknungsanlage SPS-800 der Firma MBraun getrocknet und über Inertgas und Molekularsieb aufbewahrt.

*Ethanol* (EtOH): Von Acros Organics (Extra Dry,  $\leq 0.005\%$  Wasser) über Molekularsieb erworben.

*N,N-Dimethylformamid* (DMF): Von Acros Organics (Extra Dry,  $\leq 0.005\%$  Wasser) über Molekularsieb erworben.

*Methanol*: Von Acros Organics (Extra Dry,  $\leq 0.005\%$  Wasser) über Molekularsieb erworben.

*Toluol*: Von Acros Organics (Extra Dry,  $\leq 0.005\%$  Wasser) über Molekularsieb erworben.

• **Verwendete Pufferlösungen**

– Phosphatpuffer (PB)

Für die Herstellung des Phosphatpuffers wurden 5.5 g Dinatriumhydrogenphosphat und 1.6 g Kaliumdihydrogenphosphat in einem Liter Reinstwasser gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert durch Zugabe von verdünnter Phosphorsäure oder Natronlauge entsprechend eingestellt.

– HPLC-Laufpuffer

Als Ionenpaarpuffer wurde für eine optimale Trennung bei HPLC-Läufen ein

Tetrabutylammoniumacetat-Puffer (2 mM) verwendet. Dieser wurde hergestellt in dem zu einer Mischung aus Reinstwasser (2.4 L) und einer Tetrabutylammoniumhydroxid-Lösung (10 % in Wasser, 12.7 mL, 4.9 mol) solange Essigsäure (1 M, ~6 mL) titriert wurde bis ein pH-Wert von 6.0 erreicht wurde

- **Chromatographie**

- Dünnschichtchromatographie

- Für die Reaktionsverfolgung und der Kontrolle der säulenchromatographischen Reinigungen wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien (Macherey-Nagel ALUGRAM® Xtra SIL G/UV254 Nr. 818333; Schichtdicke 0.2 mm) verwendet. Das Kieselgel ist mit einem Fluoreszenzindikator versetzt. Die Laufstrecke betrug 4-5 cm. Die Dünnschichtchromatographien wurden bei Kammerfüllung durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei UV-aktiven Substanzen mit Hilfe einer UV-Lampe bei 254 nm. Nicht UV-aktive Substanzen wurden mit Hilfe einer schwefelsauren Vanillinlösung oder einer alkalischen Kaliumpermanganatlösung sichtbar gemacht.

- Säulenchromatographie

- Gemische verschiedener Substanzen wurden mit Hilfe einer Säule aus Kieselgel (Macherey-Nagel 60, 70-230 mesh ASTM) aufgetrennt bzw. gereinigt.

- Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC)

- Zur Überprüfung von Reaktionsansätzen, zur Reinheitsbestimmung und zur Verfolgung von Photolyse Experimenten wurden HPLC-Analysen an einer Agilent 1260 Infinity II mit den folgenden Komponenten durchgeführt: Vialsampler G7129A, Quat Pump G7111A, G7116A MCT, G7117C DAD HS. Die Detektion der Verbindungen erfolgte bei 254 nm mit der folgenden Methode: 0-25 min 5 % CH<sub>3</sub>CN in 2 mM aq. Tetrabutylammoniumacetat Puffer (pH 6.0) zu 100 %, 1 mL/min.

- **Photolysen**

- Die zu untersuchende Substanz wurde in einem 1:1 Gemisch aus PB (pH 7.4) und Acetonitril gelöst, sodass eine 1 mg/mL Lösung erhalten wurde. Die Lösung wurde in ein kleines transparentes HPLC-Vial überführt und mit Hilfe eines klei-

nen Teflonrührstäbchen auf einer Magnetplatte gerührt. Die UV-Quelle wurde anschließend direkt vor der Lösung platziert. Nach bestimmten Intervallen wurden Aliquote von 20  $\mu\text{L}$  entnommen und per HPLC-Analyse auf die Zusammensetzung untersucht (Injektionsvolumen: 7  $\mu\text{L}$ ). Die folgenden UV-Lampen fanden in dieser Arbeit Anwendung:

– 365 nm-UV-LED

Bei der LED-Lampe handelt es sich um drei einzelne LEDs, welche in einem Dreieck auf einem passiven Kühlkörper angeordnet sind. Jede LED weist dabei eine Einzelleistung von 1300 mW auf, sodass kumuliert eine Gesamtleistung von 3.9 W erreicht wird. Bei den LEDs handelt es sich um den Typ NVSU233A-U365. Die UV-Quelle wurde von der Firma Sahlmann Photochemical Solutions bezogen.

– 310 nm-UV-LED

Bei der LED-Lampe handelt es sich um drei einzelne LEDs, welche übereinander auf einem passiven Kühlkörper angeordnet sind. Jede LED weist dabei eine Einzelleistung von 50 mW auf, sodass kumuliert eine Gesamtleistung von 150 mW erreicht wird. Bei den LEDs handelt es sich um den Typ NVSU233A-U310. Die UV-Quelle wurde von der Firma Sahlmann Photochemical Solutions bezogen.

• **PLE-Hydrolyse**

Zu einer Lösung aus 60  $\mu\text{L}$  DMSO und 400  $\mu\text{L}$  PBS (pH 7.4) wurden 40  $\mu\text{L}$  einer 50  $\mu\text{L}$  Stammlösung in DMSO der zu untersuchenden Substanz gegeben. Zu der erhaltenen Lösung wurden 30  $\mu\text{L}$  einer PLE-Stammlösung (100 U/mL) gegeben, sodass eine 6 mM Lösung der zu untersuchenden Verbindung erhalten wurden mit einem Gesamtvolumen von 530  $\mu\text{L}$ . Die Lösung wurde bei 37 °C inkubiert und nach festen Zeitintervallen wurden Aliquote von 35  $\mu\text{L}$  abgenommen und per HPLC-Analyse auf die Zusammensetzung untersucht (Injektionsvolumen: 30  $\mu\text{L}$ ).

• **NMR-Spektroskopie**

Alle NMR-Spektren wurden bei Raumtemperatur mit dem AV-400 oder AV-600 NMR-Spektrometer der Firma Bruker gemessen. Die Standardisierung der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektren erfolgte gegen Chloroform ( $\delta = 7.26$  ppm bzw.  $\delta = 77.16$  ppm), Di-

methyloxid ( $\delta = 2.50$  ppm bzw.  $\delta = 39.52$  ppm), Acetonitril ( $\delta = 1.94$  ppm bzw.  $\delta = 118.26$  ppm), Methanol ( $\delta = 3.31$  ppm bzw.  $\delta = 49.00$  ppm) oder Wasser ( $\delta = 4.79$  ppm). Der Messbereich lag bei 0-14 ppm bzw. bei  $^{13}\text{C}$ -Spektren zwischen 0-200 ppm. Der Messbereich bei  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren lag zwischen -200-200 ppm. Die Standardisierung erfolgte gegen einen externen Phosphorsäurestandard.

- **Massenspektrometrie**

ESI-MS-Spektren wurden am VG/70-250S Spektrometer der Firma VG Analytical aufgenommen. Angegeben wurde jeweils das Masse-Ladungsverhältnis der Molekülonen.

- **Infrarotspektroskopie**

Die IR-Spektren wurden mit dem ALPHA Platinum ATR-IR-Spektrometer der Firma Bruker aufgenommen. Der Messbereich lag im Bereich von 4000 bis 400 Wellenzahlen.

- **Schmelzpunkte**

Die Bestimmung der Schmelztemperatur erfolgte mittels Schmelzpunkt-Bestimmer apotec der Firma Otto Stein.

## 6.2 Allgemeine Arbeitsanweisung (AAV)

### AAV1: Reduktion von Aldehyden und Ketonen

- **Variante 1: Aldehyd**

Unter Umgebungsatmosphäre wurden ein Äquivalent des entsprechenden Aldehyds in einem Gemisch aus gleichen Teilen Tetrahydrofuran und Methanol vollständig gelöst. Die erhaltene Lösung wurde auf 0 °C gekühlt, langsam mit insgesamt 1.5 Äquivalenten Natriumborhydrid versetzt und für 30 Minuten bei 0 °C bis zu einem vollständigen Umsatz gerührt, welcher durch ein Ausbleiben der Gasentwicklung und durch eine dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle festgestellt wurde. Anschließend wurde das Lösungsmittelgemisch unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in einem Gemisch aus gleichen Teilen Wasser und Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen, die vereinten wässrigen Phasen mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen abschließend mit einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Eine weitere Reinigung war nicht notwendig.

- **Variante 2: Keton**

Unter Umgebungsatmosphäre wurden ein Äquivalent des entsprechenden Ketons in einem Gemisch aus gleichen Teilen Tetrahydrofuran und Methanol vollständig gelöst. Die erhaltene Lösung wurde auf 0 °C gekühlt, langsam mit insgesamt 3.0 Äquivalenten Natriumborhydrid versetzt und für 30 Minuten bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde bei Raumtemperatur für weitere 2-3 Stunden bis zu einem vollständigen Umsatz gerührt, welcher durch ein Ausbleiben der Gasentwicklung und auch durch eine dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle festgestellt wurde. Anschließend wurde das Lösungsmittelgemisch unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in einem Gemisch aus gleichen Teilen Wasser und Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen, die vereinten wässrigen Phasen mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen abschließend mit einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und unter ver-

mindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Eine weitere Reinigung war nicht notwendig.

#### **AAV2: Synthese symmetrischer Phosphoramidite**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.0 Äquivalente Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit **61** in abs. Tetrahydrofuran gelöst und zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung aus 2.1 Äquivalenten des entsprechenden Alkohols und 3.0 Äquivalenten Triethylamin in abs. Tetrahydrofuran langsam zu getropft. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für 18 Stunden gerührt und der entstandene Feststoff abfiltriert. Der Filterkuchen wurde mit Ethylacetat gewaschen und das Filtrat unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

#### **AAV3: Synthese symmetrischer H-Phosphonate**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.0 Äquivalente Diphenylphosphit in abs. Pyridin gelöst und mit 2.1 Äquivalenten des entsprechenden Alkohols versetzt. Die erhaltene Reaktionslösung wurde für 2-3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend unter vermindertem Druck im Ölpumpenvakuum vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand wurde jeweils dreimal mit Toluol und Dichlormethan coevaporiert und anschließend säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

#### **AAV4: Synthese von *caged*-Adenosintriphosphat**

- **Variante 1: Phosphoramidit-Route**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.0 Äquivalente Adenosindiphosphat als Tetrabutylammoniumsalz und 1.5 Äquivalente des entsprechenden Phosphoramidits in abs. Acetonitril coevaporiert und anschließend für drei Stunden im Vakuum getrocknet. Die getrockneten Reaktionspartner wurden in 5-10 mL abs. Acetonitril gelöst und mit dem entsprechendem Aktivator versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 5-30 Minuten wurden 2.0 Äquivalente *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M in *n*-Decan) tropfenweise zugegeben und die Reaktion wurde für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt, bevor das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt wurde. Der erhaltene Rückstand wurde durch automatisierte RP<sub>18</sub>-Chromato-

graphie gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereint und das Lösungsmittel mittels Gefriertrocknung an der Lyophile entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde durch Ionenaustauschchromatographie in das entsprechende Ammoniumsalz umgesalzen und nach wiederholter Entfernung des Lösungsmittel an der Lyophile erneut durch automatisierte RP<sub>18</sub>-Chromatographie gereinigt.

- **Variante 2: H-Phosphonat-Route**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.0 Äquivalente des entsprechenden H-Phosphonats in abs. Acetonitril coevaporiert und für eine Stunde im Vakuum getrocknet. Anschließend wurde das H-Phosphonat in 10 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 2.0 Äquivalenten *N*-Chlorsuccinimid versetzt. Die Reaktionslösung wurde für eine Stunde bei 50 °C gerührt. Anschließend wurden 0.8 Äquivalente Adenosindiphosphat als Tetrabutylammoniumsalz gelöst in 5 mL abs. Acetonitril langsam bei Raumtemperatur zugetropft und die Lösung anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, bevor das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt wurde. Der erhaltene Rückstand wurde durch automatisierte RP<sub>18</sub>-Chromatographie gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereint und das Lösungsmittel mittels Gefriertrocknung an der Lyophile entfernt. Der Rückstand wurde durch Ionenaustauschchromatographie in das entsprechende Ammoniumsalz überführt und nach Entfernung des Lösungsmittel an der Lyophile erneut durch automatisierte RP<sub>18</sub>-Chromatographie gereinigt.

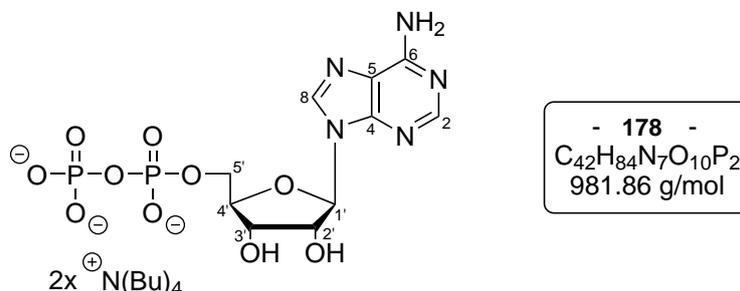
## 6.3 Synthesen

### 6.3.1 Synthesen von Reagenzien

#### **Adenosindiphosphat Tetrabutylammoniumsalz 178**

Es wurde 815 mg (1.73 mmol 1.0 Äquiv.) Adenosindiphosphat als Natriumsalz in 5 mL Wasser gelöst und durch eine Ionenaustauschchromatographie in die protonierte Form überführt. Zu der erhaltenen Lösung wurden tropfenweise 12.2 mL einer Tetrabutylammoniumhydroxid-Lösung (10 % in Wasser, 4.3 mmol, 2.5 Äquiv.) zugetropft. Alle flüchtigen Bestandteile wurde durch Gefriertrocknung an der Lyophile entfernt und das erhaltene Harz wurde durch automatisierte RP<sub>18</sub>-Chromatographie gereinigt. Nach erneuter

Gefriertrocknung und konsequenter weiterer Trocknung wurde ein hellgelber, stark hygroskopischer Feststoff erhalten, welcher über Stickstoff gelagert wurde.

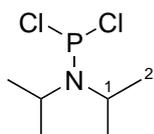


Ausbeute: Es wurden 1.66 g (1.73 mmol, 98%) eines gelben Feststoffes erhalten. Das Produkt wies 2.0 Gegenionen auf.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ[ppm] = 8.53 (s, 1 H, H-8), 8.19 (s, 1 H, H-2), 6.09 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.8 Hz, 1 H, H-1'), 4.75–4.70 (m, 1 H, H-2'), 4.58 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.8 Hz, 1 H, H-3'), 4.37–4.33 (m, 1 H, H-4'), 4.28–4.20 (m, 1 H, H-5a'), 4.19–4.12 (m, 1 H, H-5b'), 3.22–3.04 (m, 16 H, CH<sub>2</sub>-Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 1.67–1.52 (m, 16 H, CH<sub>2</sub>-Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 1.39–1.24 (m, 16 H, CH<sub>2</sub>-Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 0.90 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, 24 H, CH<sub>3</sub>-Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>). **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ[ppm] = 155.5 (C-6), 152.7 (C-2), 148.9 (C-4), 139.9 (C-8), 118.4 (C-5), 86.8 (C-1'), 84.0 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 9.1 Hz, C-4'), 74.4 (C-2'), 70.1 (C-3'), 64.6 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 5.4 Hz, C-5'), 58.0 (CH<sub>2</sub>-Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 23.0 (CH<sub>2</sub>-Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 19.1 (CH<sub>2</sub>-Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>), 12.8 (CH<sub>3</sub>-Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>). **<sup>31</sup>P-NMR** (201 MHz, D<sub>2</sub>O): δ[ppm] = -8.23 (d, <sup>2</sup>J<sub>P,P</sub> = 22.1 Hz), -11.2 (d, <sup>2</sup>J<sub>P,P</sub> = 22.1 Hz).

### Synthese von Dichlor-*N,N*-diisopropylaminophosphoramidit 61

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 5.0 mL (7.9 g, 57 mmol, 1.0 Äquiv.) frisch destilliertes Phosphortrichlorid in 35 mL abs. Diethylether gelöst, auf -10 °C gekühlt und tropfenweise mit 16.9 mL (12.1 g, 120 mmol, 2.1 Äquiv.) abs. Diisopropylamin gelöst in 15 mL abs. Diethylether versetzt. Die erhaltene Lösung wurde für eine Stunde bei -10 °C und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde unter Schutzgas abfiltriert und der resultierende Filterkuchen mit abs. Diethylether gewaschen. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand bei -20 °C unter Schutzgas gelagert. Auf eine weitere Reinigung wurde aufgrund der Instabilität des Produktes verzichtet.



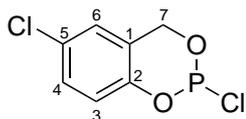
-61-  
 $C_6H_{14}Cl_2NP$   
 202.06 g/mol

Ausbeute: Es wurden 7.38 g (36.5 mmol, 64%) eines gelben Öls erhalten.

**$^1H$ -NMR** (600 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$ [ppm] = 3.94–3.76 (m, 2 H, H-1), 1.21 (d,  $^3J_{H,H} = 6.9$  Hz, 12 H, H-2).  **$^{31}P$ -NMR** (162 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$ [ppm] = 169.6.

### Synthese von 5-Chlorsaligenylchlorphosphit 92

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 2.00 g (12.6 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Chlorsaligenylalkohol in 30 mL abs. Diethylether gelöst, auf  $-20$  °C gekühlt und mit 1.32 mL Phosphor(III)-chlorid (2.07 g, 15.1 mmol, 1.2 Äquiv.) versetzt. Es wurde für zehn Minuten bei  $-20$  °C gerührt bevor anschließend 2.34 mL abs. Pyridin (2.30 g, 29.0 mmol, 2.3 Äquiv.) gelöst in 10 mL abs. Diethylether langsam über einen Zeitraum von dreißig Minuten zugetropft wurden. Nach vollständiger Zugabe wurde für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und der Reaktionskolben anschließend für 18 Stunden bei  $-20$  °C gelagert um eine vollständige Fällung des entstandenen Pyridiniumsalzes zu erreichen. Der gebildete Feststoff wurde unter Inertgas filtriert und das Filtrat wurde im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Aufgrund der hohen Reaktivität wurde auf eine weitere Reinigung des erhaltenen gelben Feststoffes verzichtet.



-92-  
 $C_7H_5Cl_2O_2P$   
 222.99 g/mol

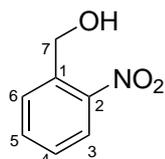
Ausbeute: Es wurden 1.63 g (6.81 mmol, 54%) eines gelben Feststoffs als Gemisch von zwei Enantiomeren erhalten.

**$^1H$ -NMR** (400 MHz) [ $CDCl_3$ ]:  $\delta$  [ppm] = 8.17 (dd,  $^3J_{H,H} = 8.9$  Hz,  $^4J_{H,H} = 2.8$  Hz, 1 H, H-4), 7.97 (d,  $^3J_{H,H} = 2.6$  Hz, 1 H, H-6), 7.13 (d,  $^3J_{H,H} = 9.0$  Hz, 1 H, H-3), 5.58–5.45 (m, 1 H, H-7a), 5.17–5.07 (m, 1 H, H-7b).  **$^{31}P$ -NMR** (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$ [ppm] = 139.3.

### 6.3.2 Synthesen der Photogruppen mit *ortho*-Nitro-Funktionalität

#### Synthese von 2-Nitrobenzylalkohol **23**

Die Synthese wurde nach AAV-1 Variante 1 durchgeführt. Es wurden 1.59 g (10.5 mmol, 1.0 Äquiv.) 2-Nitrobenzaldehyd in 30 mL Methanol gelöst und mit 605 mg (15.8 mmol, 1.5 Äquiv.) Natriumborhydrid versetzt.



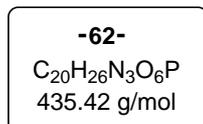
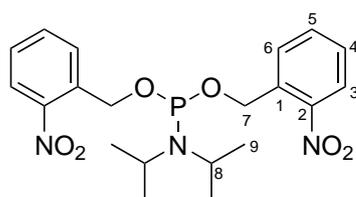
**-23-**  
 $C_7H_7NO_3$   
 153.14 g/mol

Ausbeute: Es wurden 1.52 g (9.93 mmol, 95%) eines gelben Feststoffs erhalten.

**$^1H$ -NMR** (500 MHz) [DMSO- $d_6$ ]:  $\delta$  [ppm] = 8.03 (dd,  $^3J_{H,H} = 8.1$  Hz,  $^4J_{H,H} = 1.2$  Hz, 1 H, H-3), 7.83 (dd,  $^3J_{H,H} = 7.8$  Hz,  $^4J_{H,H} = 1.4$  Hz, 1 H, H-6), 7.76 (dt,  $^3J_{H,H} = 7.6$  Hz,  $^4J_{H,H} = 1.3$  Hz, 1 H, H-5), 7.52 (dt,  $^3J_{H,H} = 7.7$  Hz,  $^4J_{H,H} = 1.5$  Hz, 1 H, H-4), 5.53 (t,  $^3J_{H,H} = 5.6$  Hz, 1 H, OH), 4.82 (d,  $^3J_{H,H} = 5.5$  Hz, 2 H, H-7).  **$^{13}C$ -NMR** (125 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 146.9 (C-2), 138.1 (C-1), 133.7 (C-5), 128.4 (C-6), 127.9 (C-4), 124.2 (C-3), 59.8 (C-7). **IR**:  $\tilde{\nu}$  [ $cm^{-1}$ ] = 3252, 2914, 2846, 1611, 1573, 1512, 1446, 1365, 1303, 1248, 1166, 1144, 957, 856, 790, 603, 553, 401. **HRMS**: Das Molekül konnte weder im EI noch im ESI Spektrum gefunden werden. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.8 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v).

#### Synthese von Bis-(2-Nitrobenzyl)phosphoramidit **62**

Die Synthese erfolgte nach AAV 2. Es wurden 0.27 mL (1.3 mmol, 0.27 g, 1.0 Äquiv.) des Dichlorphosphoramidits **61** in 4 mL abs. THF gelöst und zu einer Lösung aus 0.43 g (2.8 mmol, 2.1 Äquiv.) des sekundären Alkohols **44** und 0.42 mL (3.1 mmol, 0.31 g, 2.5 Äquiv.) abs. Triethylamin in 15 mL abs. Tetrahydrofuran getropft. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 10:1 + 5 % Triethylamin).

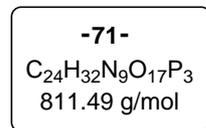
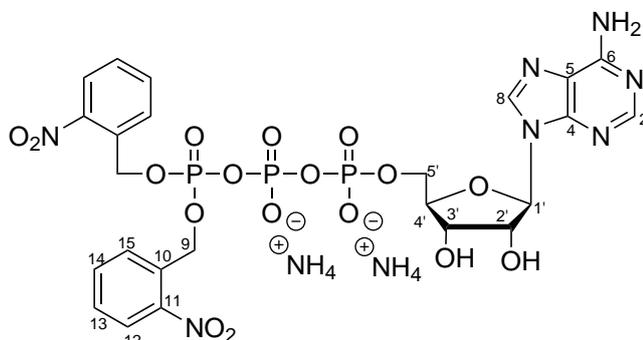


Ausbeute: Es wurden 0.48 g (1.1 mmol, 83%) eines gelben Feststoffs erhalten.

**$^1H$ -NMR** (400 MHz) [ $CDCl_3$ ]:  $\delta$  [ppm] = 8.10 (dd,  $^3J_{H,H} = 8.1$  Hz,  $^4J_{H,H} = 1.3$  Hz, 2 H, H-3), 7.87 (dd,  $^3J_{H,H} = 7.8$  Hz,  $^4J_{H,H} = 1.4$  Hz, 2 H, H-6), 7.69–7.63 (m, 2 H, H-5), 7.47–7.42 (m, 2 H, H-4), 5.24–5.07 (m, 4 H, H-7), 3.74 (hepd,  $^3J_{H,P} = 10.0$  Hz,  $^3J_{H,H} = 6.8$  Hz, 2 H, H-8), 1.25 (d,  $^3J_{H,H} = 6.8$  Hz, 12 H, H-9).  **$^{13}C$ -NMR** (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 147.0 (C-2), 136.2 (C-1), 133.9 (C-5), 128.7 (C-6), 128.6 (C-4), 124.8 (C-3), 62.6 ( $^2J_{H,P} = 20.8$  Hz, C-7), 43.5 ( $^2J_{H,P} = 12.5$  Hz, C-8), 24.8 ( $^3J_{H,P} = 7.2$  Hz, C-9).  **$^{31}P$ -NMR** (162 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 148.9. **IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $cm^{-1}$ ] = 3081, 2946, 2868, 1611, 1576, 1517, 1459, 1444, 1364, 1336, 1305, 1277, 1185, 1127, 1084, 1024, 1003, 975, 876, 813, 769, 718, 673, 640, 517. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 474.1196 [M+K]<sup>+</sup>, gef: 474.1419 [M+K]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert:** 0.8 (PE/EE 10:1 + 5% Triethylamin v/v).

### Synthese von $\gamma$ -Bis-(2-nitrobenzyl)ATP 71

Die Synthese erfolgte nach AAV4-Variante 1. Es wurden 0.13 g (0.30 mmol, 1.3 Äquiv.) des Amidits **62** mit 0.24 g (0.23 mmol, 1.0 Äquiv.) ADP (als. Tetrabutylammoniumsalz) **178** in 10 mL Acetonitril umgesetzt. Als Aktivator wurden 0.08 g (0.35 mmol, 1.5 Äquiv.) Pyridinium-Trifluoroacetat verwendet und als Oxidationsmittel wurden 0.64  $\mu$ L (0.35 mmol, 1.5 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M, in *n*-Decan) verwendet.

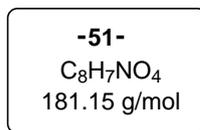
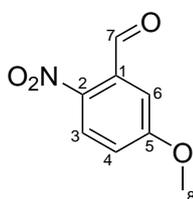


Ausbeute: Es wurden 0.13 g (0.16 mmol, 72%) eines gelben Feststoffs erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz) [D<sub>2</sub>O]: δ [ppm] = 8.40 (s, 1 H, H-8), 8.11 (s, 1 H, H-2), 7.98–7.93 (m, 2 H, H-12), 7.56–7.53 (m, 2 H, H-15), 7.53–7.48 (m, 2 H, H-14), 7.44–7.41 (m, 2 H, H-13), 5.89 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.5 Hz, 1 H, H-1'), 5.41 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,P</sub> = 8.3 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.2 Hz, 2 H, H-9), 5.37 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,P</sub> = 8.3 Hz, 2 H, H-9'), 4.60–4.57 (m, 1 H, H-2'), 4.46 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.2 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.7 Hz, 1 H, H-3'), 4.33–4.28 (m, 2 H, H-4', 5'a), 4.26–4.20 (m, 1 H, H-5'b).  
**<sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = 148.9 (C-2), 146.0 (C-11), 140.5 (C-8), 134.4 (C-15), 130.6 (m, C-10), 129.3 (C-13), 128.6 (C-14), 124.7 (C-12), 87.2 (C-1'), 83.6 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 9.4 Hz, C-4'), 74.6 (C-2'), 70.0 (C-3'), 66.9 (m, C-9), 65.9 (m, C-5').  
**<sup>31</sup>P-NMR** (242 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = -10.5 (d, <sup>2</sup>J<sub>P,P</sub> = 20.5 Hz, P-α), -11.9 (d, <sup>2</sup>J<sub>P,P</sub> = 17.0 Hz, P-γ), -23.0 (dd, <sup>2</sup>J<sub>P,P</sub> = 20.6 Hz, <sup>2</sup>J<sub>P,P</sub> = 16.9 Hz, P-β).  
**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3047, 1689, 1641, 1608, 1523, 1445, 1340, 1237, 1127, 1080, 1020, 993, 921, 815, 726, 462.  
**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 778.0676 [M+H]<sup>+</sup>, gef: 778.0714 [M+H]<sup>+</sup>.

### Synthese von 5-Methoxy-2-nitrobenzaldehyd 51

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.02 g (6.10 mmol, 1.0 Äquiv.) 5-Hydroxy-2-nitrobenzaldehyd und 2.53 g (18.3 mmol, 3.0 Äquiv.) getrocknetes Kaliumcarbonat in 25 mL abs. DMF suspendiert. Die erhaltene Suspension wurde mit 0.46 mL (1.04 g, 7.32 mmol, 1.2 Äquiv.) Methyljodid versetzt und für zwei Stunden bei 100 °C gerührt. Nach einem vollständigem Umsatz (DC in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) wurden 40 mL einer 1-molaren Natronlauge zugegeben und das Reaktionsgemisch dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und abschließend mit einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Es wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

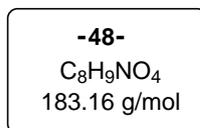
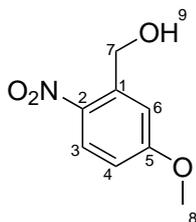


Ausbeute: Es wurden 1.02 g (5.62 mmol, 92%) eines hellgrünen Feststoffs erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz) [CDCl<sub>3</sub>]: δ [ppm] = 10.48 (s, 1 H, H-7), 8.16 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.0 Hz, 1 H, H-3), 7.32 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.9 Hz, 1 H, H-6), 7.15 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.0 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.9 Hz, 1 H, H-4), 3.95 (s, 1 H, H-8). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 188.6 (C-7), 164.2 (C-1), 142.5 (C-2), 134.5 (C-5), 147.4 (C-3), 118.8 (C-4), 113.4 (C-6), 56.5 (C-8). **IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3361, 3100, 2942, 1689, 1580, 1499, 1390, 1326, 1286, 1232, 1078, 1023, 999, 929, 891, 833, 770, 687, 618, 536, 440. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 182.0453 [M+H]<sup>+</sup>, gef: 182.0446 [M+H]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert:** 0.50 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> v/v).

### Synthese von 5-Methoxy-2-nitrobenzlalkohol 48

Die Synthese wurde angelehnt an AAV 1 Variante 1 durchgeführt. Es wurden 0.91 g (5.0 mmol, 1.0 Äquiv.) des Aldehyds **51** in einem Gemisch aus 15 mL Methanol und 15 mL Tetrahydrofuran gelöst und mit 0.28 g (7.5 mmol, 1.5 Äquiv.) Natriumborhydrid versetzt.

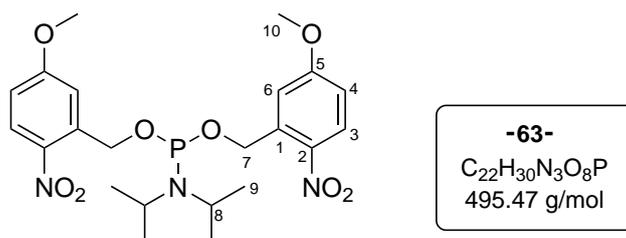


Ausbeute: Es wurden 0.91 g (5.0 mmol, quant.) eines gelben Feststoffs erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz) [DMSO-*d*<sub>6</sub>]: δ [ppm] = 8.14 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.1 Hz, 1 H, H-3), 7.35 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.8 Hz, 1 H, H-6), 7.03 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.1 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.0 Hz, 1 H, H-4), 5.62–5.56 (m, 1 H, H-9), 4.85 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.3 Hz, 2 H, H-7), 3.89 (s, 3 H, H-8). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 163.6 (C-5), 142.3 (C-2), 139.9 (C-1), 127.5 (C-3), 112.7 (C-6), 112.4 (C-4), 60.2 (C-7), 56.0 (C-8). **IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3532, 2917, 1612, 1572, 1493, 1446, 1287, 1215, 1087, 1044, 1019, 922, 863, 845, 822, 753, 690, 635, 474. **HRMS:** Das Produkt konnte weder im ESI noch im EI gefunden werden. **R<sub>f</sub>-Wert:** 0.20 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

### Synthese von Bis-(5-methoxy-2-nitrobenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **63**

Die Synthese erfolgte nach AAV 2. Es wurden 0.40 g (2.2 mmol, 2.2 Äquiv.) des Alkohols **48** und 0.34 mL (2.5 mmol, 2.5 Äquiv.) Triethylamin in 10 mL abs. Tetrahydrofuran mit 0.20 mL (0.99 mmol, 1.0 Äquiv.) Dichlorophosphoramidit **61**, gelöst in 2 mL abs. Tetrahydrofuran, zur Reaktion gebracht. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 1:1 + 5% Triethylamin).

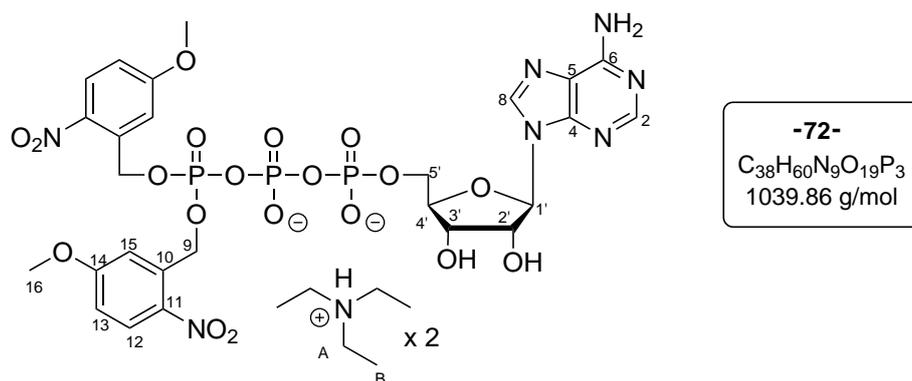


Ausbeute: Es wurden 0.44 g (0.89 mmol, 90%) eines gelben Feststoffs erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz) [CDCl<sub>3</sub>]: δ [ppm] = 8.19 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.1 Hz, 2 H, H-3), 7.42 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.8 Hz, 2 H, H-6), 6.87 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 9.1 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.9 Hz, 2 H, H-4), 5.31–5.10 (m, 4 H, H-7), 3.83–3.72 (m, 2 H, H-8), 3.90 (s, 6 H, H-10), 1.28 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.9 Hz, 12 H, H-9). **<sup>13</sup>C-NMR** (201 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 164.3 (C-5), 139.9 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 9.1 Hz, C-1), 139.7 (C-2), 127.8 (C-3), 113.2 (C-4), 112.5 (C-6), 62.9 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 20.8 Hz, C-7), 56.0 (C-10), 43.6 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 13.0 Hz, C-8), 24.9 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 8.2 Hz, C-9). **<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 149.4. **IR**:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2966, 1588, 1512, 1484, 1365, 1281, 1240, 1180, 1159, 1080, 1050, 1017, 975, 854, 822, 754, 719. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 496.1849 [M+H]<sup>+</sup>, gef: 496.1845 [M+H]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.9 (PE/EE + 5% Triethylamin 1:1 v/v).

### Synthese von $\gamma$ -Bis-(5-methoxy-2-nitrobenzyl)ATP **72**

Die Synthese erfolgte nach AAV4-Variante 1. Es wurden 60 mg (0.12 mmol, 1.3 Äquiv.) des Amidits **63** mit 0.10 g (0.09 mmol, 1.0 Äquiv.) ADP (als. Tetrabutylammoniumsalz) **178** in 10 mL Acetonitril umgesetzt. Als Aktivator wurden 32 mg (0.14 mmol, 1.5 Äquiv.) Pyridinium-Trifluoroacetat verwendet und als Oxidationsmittel wurden 0.25  $\mu$ L (0.14 mmol, 1.5 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M, in *n*-Decan) verwendet.

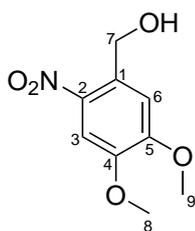


Ausbeute: Es wurden 49 mg (47  $\mu$ mol, 52%) eines gelben Feststoffs erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz) [ $\text{D}_2\text{O}$ ]:  $\delta$  [ppm] = 8.35 (s, 1 H, H-8), 8.04 (s, 1 H, H-2), 7.86 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.2$  Hz, 1 H, H-12), 7.83 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 9.2$  Hz, 1 H, H-12'), 6.80–6.65 (m, 4 H, H-13/15), 5.80 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 5.0$  Hz, 1 H, H-1'), 5.32 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.3$  Hz, 2 H, H-9), 5.28 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.0$  Hz, 2 H, H-9'), 4.50–4.47 (m, 1 H, H-2'), 4.47–4.43 (m, 1 H, H-3'), 4.37–4.43 (m, 1 H, H-5'a), 4.30–4.23 (m, 2 H, H-4', 5'b), 3.73 (s, 6 H, H-OMe), 3.19 (q,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz, 12 H, H-CH<sub>2</sub>), 1.27 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz, 18 H, H-CH<sub>3</sub>).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (150 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 163.7 (C-14), 163.7 (C-14'), 153.6 (C-6), 150.4 (C-2), 147.8 (C-11), 139.7 (C-8), 138.4 (C-5), 138.2 (C-4), 134.2–134.0 (m, C-10), 127.9 (C-12), 117.9, 113.2, 113.1, 112.9 (C-13/15), 87.2 (C-1'), 83.3 (d,  $^4J_{\text{C,P}} = 9.5$  Hz, C-4'), 74.7 (C-2'), 69.7 (C-3'), 67.0–66.8 (m, C-9), 65.2 (d,  $^3J_{\text{C,P}} = 5.7$  Hz, C-5'), 56.0 (OMe), 46.6 (CH<sub>2</sub>), 8.2 (CH<sub>3</sub>).  **$^{31}\text{P-NMR}$**  (242 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = -11.4 (d,  $^2J_{\text{P,P}} = 20.1$  Hz, P- $\alpha$ ), -13.1 (d,  $^2J_{\text{P,P}} = 17.4$  Hz, P- $\gamma$ ), -24.2 (dd,  $^2J_{\text{P,P}} = 20.2$  Hz,  $^2J_{\text{P,P}} = 16.1$  Hz, P- $\beta$ ). **IR**:  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3328, 3168, 2985, 2945, 2613, 2498, 1670, 1605, 1579, 1508, 1456, 1338, 1326, 1289, 1164, 1130, 1082, 992, 926, 901, 838, 819, 753, 632, 455. **HRMS** (ESI<sup>-</sup>, m/z): ber: 836.0737 [M]<sup>-</sup>, gef: 836.0607 [M]<sup>-</sup>.

### Synthese von 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzylalkohol 24

Die Synthese wurde angelehnt an AAV 1 Variante 1 durchgeführt. Es wurden 1.45 g (6.8 mmol, 1.0 Äquiv.) 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzaldehyd in einem Gemisch aus 50 mL Methanol und 10 mL Tetrahydrofuran gelöst und mit 780 mg (20.6 mmol, 3.0 Äquiv.) Natriumborhydrid versetzt.



**-24-**

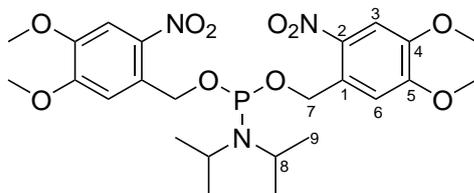
$C_9H_{11}NO_5$   
213.19 g/mol

Ausbeute: Es wurden 1.46 g (6.83 mmol, 99%) eines gelben Feststoffs erhalten.

**$^1H$ -NMR** (400 MHz) [DMSO- $d_6$ ]:  $\delta$  [ppm] = 7.66 (s, 1 H, H-3), 7.38 (s, 1 H, H-6), 5.57 (t,  $^3J_{H,H}$  = 5.4 Hz, 1 H, H-OH), 4.83 (d,  $^3J_{H,H}$  = 5.5 Hz, 2 H, H-7), 3.90 (s, 3 H, H-8), 3.85 (s, 3 H, H-9).  **$^{13}C$ -NMR** (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 153.5 (C-5), 146.9 (C-4), 138.4 (C-2), 134.2 (C-1), 109.5 (C-6), 107.8 (C-3), 60.1 (C-7), 56.0 (C-8, C-9). **IR**:  $\tilde{\nu}$  [ $cm^{-1}$ ] = 3492, 3013, 2981, 1497, 1465, 1432, 1265, 1154, 1023, 870, 753, 531. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 196.0604 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, gef: 196.0646 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>. **MS** (EI<sup>+</sup>, m/z): ber: 213.06 [M]<sup>+</sup>, gef: 213.13 [M]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.20 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

### Synthese von Bis-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **69**

Die Synthese erfolgte nach AAV 2. Es wurden 0.40 g (1.9 mmol, 2.1 Äquiv.) des Alkohols **24** und 0.35 mL (2.7 mmol, 3.0 Äquiv.) Triethylamin in 10 mL abs. Tetrahydrofuran mit 0.18 mL (0.89 mmol, 1.0 Äquiv.) Dichlorophosphoramidit **61**, gelöst in 2 mL abs. Tetrahydrofuran, zur Reaktion gebracht. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 1:1 + 5% Triethylamin).



**-69-**

$C_{24}H_{34}N_3O_{10}P$   
555.52 g/mol

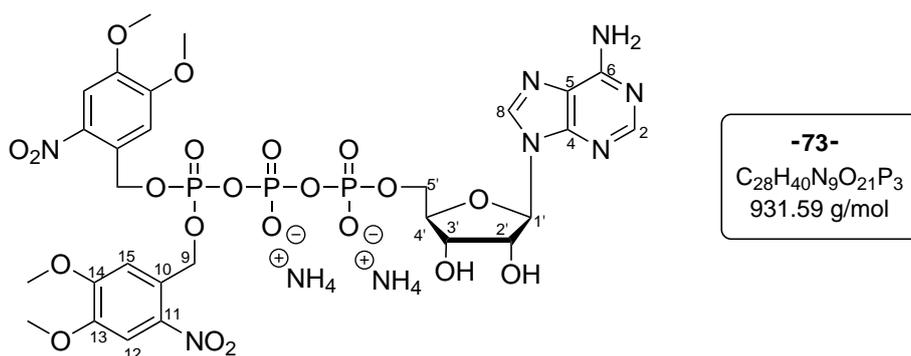
Ausbeute: Es wurden 0.46 g (0.82 mmol, 92%) eines gelben Feststoffs erhalten.

**$^1H$ -NMR** (400 MHz) [CDCl<sub>3</sub>]:  $\delta$  [ppm] = 7.73 (s, 2 H, H-3), 7.41 (s, 2 H, H-6), 5.30–5.11

(m, 4 H, H-7), 3.97 (s, 6 H, OMe), 3.96 (s, 6 H, OMe), 3.84–3.71 (m, 2 H, H-8), 1.29 (d,  $^3J_{H,H} = 6.9$  Hz, 12 H, H-9).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ [ppm] = 154.1 (C-5), 147.7 (C-4), 138.9 (C-2), 131.9 (d,  $^3J_{C,P} = 8.4$  Hz, C-1), 109.4 (C-6), 108.0 (C-3), 62.6 (d,  $^2J_{C,P} = 19.7$  Hz, C-7), 56.5 (OMe), 56.6 (OMe), 43.6 (d,  $^2J_{C,P} = 12.7$  Hz, C-8), 24.9 (d,  $^3J_{C,P} = 7.0$  Hz, C-9).  **$^{31}\text{P-NMR}$**  (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ [ppm] = 147.4. **HRMS**: Das Molekül konnte nicht per Massenspektrometrie detektiert werden. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.9 (PE/EE + 5% Triethylamin 1:1 v/v).

### Synthese von $\gamma$ -Bis-(4,5-dimethoxy-2-nitrobenzyl)ATP **73**

Die Synthese erfolgte nach AAV4-Variante 1. Es wurden 0.13 g (0.23 mmol, 1.5 Äquiv.) des Amidits **69** mit 0.15 g (0.16 mmol, 1.0 Äquiv.) ADP (als. Tetrabutylammoniumsalz) **178** in 10 mL Acetonitril umgesetzt. Als Aktivator wurden 0.94 mL (0.23 mmol, 1.5 Äquiv.) DCI-Aktivatorlösung (0.25 M in Acetonitril) verwendet und als Oxidationsmittel wurden 0.48  $\mu\text{L}$  (0.27 mmol, 1.7 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M, in *n*-Decan) verwendet.



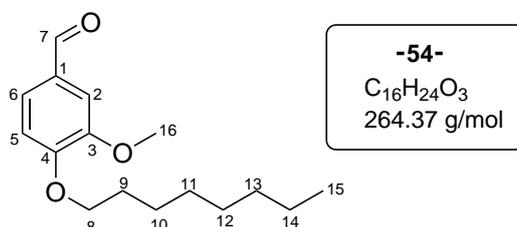
Ausbeute: Es wurden 89 mg (96  $\mu\text{mol}$ , 60%) eines gelben Feststoffs erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz) [ $\text{D}_2\text{O}$ ]:  $\delta$  [ppm] = 8.40 (s, 1 H, H-8), 8.14 (s, 1 H, H-2), 7.40, 7.38, (s, 1 H, H-12), 6.80, 6.73, (s, 1 H, H-15), 5.86 (d,  $^3J_{H,H} = 3.4$  Hz, 1 H, H-1'), 5.27–5.18 (m, 4 H, H-9), 4.54 (*pt*,  $^3J_{H,H} = 3.4$  Hz, 1 H, H-2'), 4.46 (*pt*,  $^3J_{H,H} = 3.4$  Hz, 1 H, H-3'), 4.38–4.33 (m, 1 H, H-5'a), 4.33–4.30 (m, 1 H, H-4'), 4.28–4.22 (m, 1 H, H-5'b), 3.82, 3.82, 3.77, 3.77, (s, 3 H, H-OMe).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (150 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$ [ppm] = 152.7 (C-13/14), 152.6 (C-13/14), 152.1 (C-2), 148.4 (C-8), 147.4 (C-6), 138.5 (d,  $^3J_{C,P} = 3.4$  Hz, C-10), 119.1 (C-11), 117.8 (C-11), 110.5 (C-15), 110.4 (C-15), 107.5 (C-12), 107.5 (C-12), 87.1

(C-1'), 83.6 (C-4'), 74.5 (C-2'), 69.3 (C-3'), 66.8 (m, C-9), 64.8 (m, C-5'), 56.2, 56.2, 55.9 (OMe). **<sup>31</sup>P-NMR** (242 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$ [ppm] = -11.9 (d,  $^2J_{P,P} = 20.5$  Hz, P- $\alpha$ ), -13.3 (d,  $^2J_{P,P} = 16.9$  Hz, P- $\gamma$ ), -23.6 (dd,  $^2J_{P,P} = 17.2$  Hz,  $^2J_{P,P} = 17.2$  Hz, P- $\beta$ ). **IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3141, 1679, 1521, 1327, 1218, 1169, 1127, 1066, 1019, 924, 813, 753, 710, 604. **HRMS** (ESI<sup>-</sup>, m/z): ber: 896.0948[M]<sup>-</sup>, gef: 896.0648 [M]<sup>-</sup>.

### Synthese von 3-Methoxy-4-octanoxybenzaldehyd 54

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 3.00 g (19.7 mmol, 1.0 Äquiv.) Vanillin und 8.35 g (59.2 mmol, 3.0 Äquiv.) getrocknetes Kaliumcarbonat in 50 mL abs. DMF suspendiert. Die erhaltene Suspension wurde mit 5.2 mL (5.8 g, 30 mmol, 1.5 Äquiv.) *n*-Bromooctan versetzt und für 18 Stunden bei 50 °C gerührt. Nach einem vollständigem Umsatz (DC in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) wurden 50 mL Natronlauge (1 M) zugegeben und das Reaktionsgemisch dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten Etherextrakte wurde mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und mit einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Es wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EE 1:1).



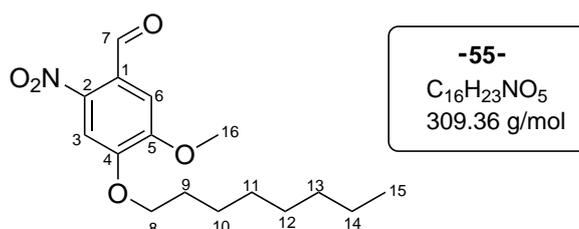
Ausbeute: Es wurden 5.0 g (19 mmol, 96%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz) [CDCl<sub>3</sub>]:  $\delta$  [ppm] = 9.84 (s, 1 H, H-7), 7.43 (dd,  $^3J_{H,H} = 8.1$  Hz,  $^4J_{H,H} = 1.9$  Hz, 1 H, H-6), 7.40 (d,  $^3J_{H,H} = 1.9$  Hz, 1 H, H-2), 6.96 (d,  $^3J_{H,H} = 8.2$  Hz, 1 H, H-5), 4.10 (t,  $^3J_{H,H} = 6.9$  Hz, 2 H, H-8), 3.92 (s, 3 H, H-16), 1.88 (qui,  $^3J_{H,H} = 7.3$  Hz, 2 H, H-9), 1.50–1.43 (m, 2 H, H-10), 1.40–1.28 (m, 8 H, H-11-14), 0.88 (t,  $^3J_{H,H} = 6.8$  Hz, 3 H, H-15). **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ [ppm] = 191.7 (C-7), 154.4 (C-4), 150.0 (C-3), 130.0 (C-1), 127.0 (C-6), 111.5 (C-5), 109.4 (C-2), 69.3 (C-8), 56.2 (C-16), 31.9, 29.4, 29.3, 22.8 (C-11-14), 29.0 (C-9), 26.0 (C-10), 14.2 (C-15). **IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3338,

3080, 3005, 2964, 2766, 1681, 1669, 1583, 1507, 1464, 1405, 1390, 1266, 1197, 1132, 1065, 1011, 958, 790, 657, 571. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 265.1798 [M+H]<sup>+</sup>, gef: 265.1808 [M+H]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.4 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EE 1:1 v/v).

### Synthese von 5-Methoxy-2-nitro-4-octanoxybenzaldehyd 55

Es wurden 45 mL konz. Salpetersäure auf 0 °C gekühlt und portionsweise mit 1.77 g (6.70 mmol, 1.0 Äquiv.) des Ethers **54** versetzt. Die farblose Suspension wurde für zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsansatz wurde auf 200 mL Eiswasser gegossen und anschließend zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. Natriumhydrogencarbonat Lösung und ges. Natriumchlorid Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und anschließend unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch mit einem Gradienten von PE/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1 nach CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gereinigt.

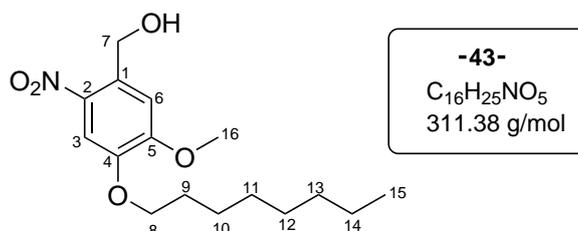


Ausbeute: Es wurden 1.19 g (3.85 mmol, 58%) eines gelben Feststoffs erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz) [CDCl<sub>3</sub>]: δ [ppm] = 10.43 (s, 1 H, H-7), 7.59 (s, 1 H, H-3), 7.41 (s, 1 H, H-6), 4.14 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 2 H, H-8), 4.00 (s, 3 H, H-16), 1.90 (qui, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.1 Hz, 2 H, H-9), 1.51–1.45 (m, 2 H, H-10), 1.40–1.25 (m, 8 H, H-11-14), 0.88 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.9 Hz, 3 H, H-15). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 187.9 (C-7), 153.6 (C-5), 152.2 (C-4), 144.0 (C-2), 125.3 (C-1), 110.0 (C-6), 108.1 (C-3), 70.1 (C-8), 56.8 (C-16), 31.9, 29.4, 29.3, 22.8 (C-11-14), 28.9 (C-9), 26.0 (C-10), 14.2 (C-15). **IR**:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3013, 2960, 2914, 2852, 1685, 1602, 1570, 1513, 1481, 1408, 1378, 1330, 1222, 1170, 1084, 1058, 1036, 1027, 983, 810, 756, 719, 607. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 310.1649 [M+H]<sup>+</sup>, gef: 310.1656 [M+H]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.3 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> v/v).

### Synthese von 5-Methoxy-2-nitro-4-octanoxybenzylalkohol **43**

Die Synthese wurde nach AAV1 Variante 1 durchgeführt. Es wurden 750 mg (2.42 mmol, 1.0 Äquiv.) des Aldehyds **55** in einem Gemisch aus 20 mL Methanol und 10 mL Tetrahydrofuran gelöst und mit 140 mg (3.62 mmol, 1.5 Äquiv.) Natriumborhydrid versetzt.



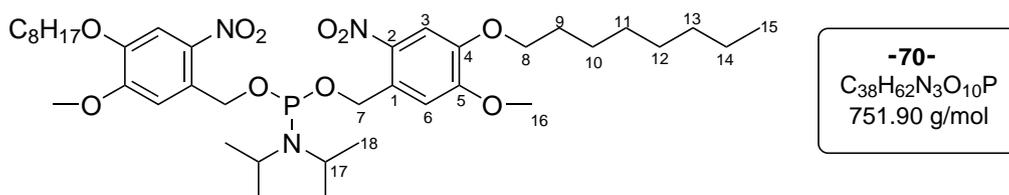
Ausbeute: Es wurden 0.72 g (2.3 mmol, 96%) eines gelben Feststoffs erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz) [CDCl<sub>3</sub>]:  $\delta$  [ppm] = 7.69 (s, 1 H, H-3), 7.14 (s, 1 H, H-6), 4.94 (s, 2 H, H-7), 4.07 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 2 H, H-8), 3.98 (s, 3 H, H-16), 2.65 (s, 1 H, OH), 1.87 (qui, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.2 Hz, 2 H, H-9), 1.50–1.44 (m, 2 H, H-10), 1.39–1.25 (m, 8 H, H-11–14), 0.88 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.9 Hz, 3 H, H-15). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ [ppm] = 154.4 (C-5), 147.7 (C-4), 139.9 (C-2), 132.0 (C-1), 111.4 (C-6), 109.4 (C-3), 69.7 (C-8), 63.1 (C-7), 56.6 (C-16), 31.9, 29.4, 29.3, 22.8 (C-11–14), 29.0 (C-9), 26.0 (C-10), 14.2 (C-15). **IR**:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3538, 3103, 3013, 2951, 2923, 2853, 1577, 1513, 1503, 1468, 1440, 1400, 1347, 1324, 1209, 1155, 1069, 1045, 975, 878, 810, 736, 716, 683, 506. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 294.1705 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, gef: 294.1378 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.1 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/PE 1:1 v/v).

### Synthese von

#### Bis-(5-methoxy-2-nitro-4-octanoxybenzyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit **70**

Die Synthese erfolgte nach AAV 2. Es wurden 0.60 g (1.9 mmol, 2.1 Äquiv.) des Alkohols **43** und 0.38 mL (0.28 g, 2.8 mmol, 3.0 Äquiv.) abs. Triethylamin in 10 mL abs. Tetrahydrofuran gelöst und mit 0.19 g (0.92 mmol, 1.0 Äquiv.) des Dichlorphosphoramidits **61** gelöst in 2 mL abs. Tetrahydrofuran zur Reaktion gebracht. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 10:1 + 5% Triethylamin).

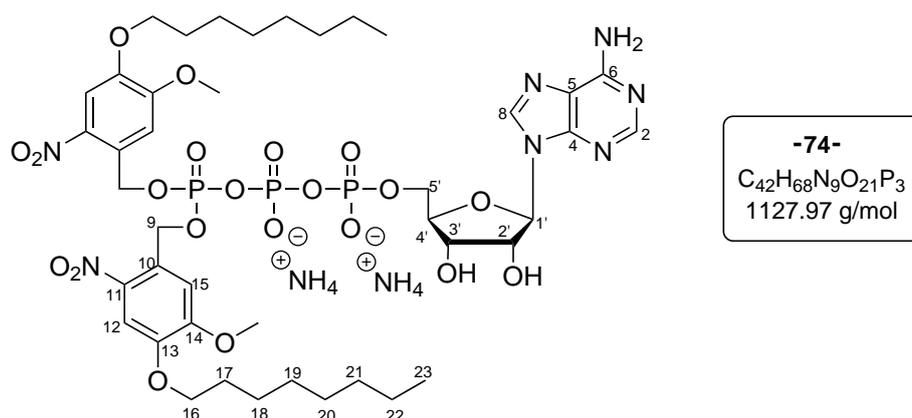


Ausbeute: Es wurden 0.64 g (0.90 mmol, 88%) eines gelben Öls erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz) [CDCl<sub>3</sub>]: δ [ppm] = 7.72 (s, 2 H, H-3), 7.39 (s, 2 H, H-6), 5.24 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,P</sub> = 6.8 Hz, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 16.3 Hz, 2 H, H-7a), 5.15 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,P</sub> = 6.9 Hz, <sup>2</sup>J<sub>H,H</sub> = 16.4 Hz, 2 H, H-7b), 4.06 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 4 H, H-9), 3.94 (s, 6 H, H-16), 3.82–3.74 (m, 2 H, H-17), 1.86 (qui, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.2 Hz, 4 H, H-9), 1.50–1.44 (m, 4 H, H-10), 1.39–1.25 (m, 16 H, H-11-14), 1.27 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.9 Hz, 12 H, H-18), 0.88 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.9 Hz, 6 H, H-15). **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 154.4 (C-5), 147.2 (C-4), 138.8 (C-2), 131.6 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 8.1 Hz, C-1), 109.5 (C-6), 109.2 (C-3), 69.7 (C-8), 62.7 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 19.5 Hz, C-7), 56.5 (C-16), 43.7 (d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 12.2 Hz, C-17), 31.9, 29.4, 29.3, 22.8 (C-11-14), 29.0 (C-9), 26.0 (C-10), 24.9 (d, <sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 7.2 Hz, C-18), 14.2 (C-15). **<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 147.3. **IR**:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3106, 2961, 2925, 2855, 1576, 1516, 1462, 1432, 1399, 1370, 1323, 1125, 1020, 996, 976, 870, 818, 750, 724, 668. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 790.4020 [Amidat+Na]<sup>+</sup>, gef: 790.4021 [Amidat+Na]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.7 (PE/EE + 5% Triethylamin 10:1 v/v).

### Synthese von $\gamma$ -Bis-(5-methoxy-2-nitro-4-octanoyloxybenzyl)-ATP 74

Die Synthese erfolgte nach AAV4 Variante 1. Es wurden 0.16 g (0.21 mmol, 1.5 Äquiv.) des Amidits **70** mit 0.13 g (0.14 mmol, 1.0 Äquiv.) ADP **178** (als Tetrabutylammoniumsalz) in 10 mL abs. Acetonitril umgesetzt. Als Aktivator wurden 0.85 mL (0.21 mmol, 1.5 Äquiv.) DCI-Aktivatorlösung (0.25 M in Acetonitril) verwendet und als Oxidationsmittel wurden 0.44  $\mu$ L (0.24 mmol, 1.7 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid-Lösung (5.5 M, in *n*-Decan) verwendet.



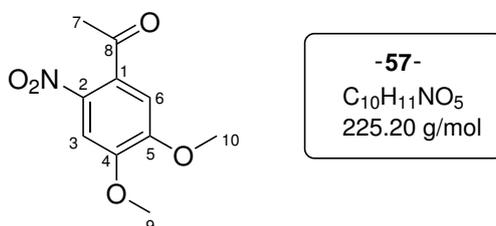
Ausbeute: Es wurden 50 mg (45  $\mu$ mol, 38%) eines gelben Feststoffs erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz) [MeOH- $d_4$ ]:  $\delta$  [ppm] = 8.65 (s, 1 H, H-8), 8.20 (s, 1 H, H-2), 7.55, 7.54, (s, 1 H, H-12, 12', *Rotamere*), 7.25, 7.24, (s, 1 H, H-15, 15', *Rotamere*), 5.99 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 4.2$  Hz, 1 H, H-1'), 5.57–5.46 (m, 4 H, H-9), 4.50–4.45 (m, 2 H, H-2', 3'), 4.40–4.36 (m, 1 H, H-5'a), 4.30 (ddd,  $^3J_{\text{H,H}} = 11.5$  Hz,  $^2J_{\text{H,P}} = 6.0$  Hz,  $^2J_{\text{H,H}} = 2.4$  Hz, 1 H, H-5'b), 4.24–4.21 (m, 1 H, H-4'), 4.00–3.97 (m, 4 H, H-16), 3.91, 3.90 (s, 3 H, OMe, OMe', *Rotamere*), 1.80 (p,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$  Hz, 4 H, H-17), 1.49 (p,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$  Hz, 4 H, H-18), 1.42–1.27 (m, 16 H, H-19-22), 0.91 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$  Hz, 6 H, H-23).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (150 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  [ppm] = 155.5 (C-13/14), 153.6 (C-13/14), 149.2 (C-2), 147.6 (C-8), 140.7 (C-6), 138.7 (d,  $^3J_{\text{C,P}} = 3.4$  Hz, C-10), 126.8 (C-11), 111.8 (C-15), 111.7 (C-15), 110.8 (C-12), 110.0 (C-12), 90.0 (C-1'), 85.4 (d,  $^3J_{\text{C,P}} = 9.6$  Hz, C-4'), 76.6 (C-2'), 71.1 (C-3'), 70.5 (d,  $^2J_{\text{C,P}} = 12.1$  Hz, C-9), 68.0 (C-16) 64.8 (d,  $^2J_{\text{C,P}} = 4.1$  Hz, C-5'), 57.2, 56.8 (OMe), 33.0, 30.5, 30.4, 30.1, 27.1, 23.7 C-17-22, 14.5 (C-23).  **$^{31}\text{P-NMR}$**  (242 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  [ppm] = –11.8 (d,  $^2J_{\text{P,P}} = 20.4$  Hz, P- $\alpha$ ), –13.3 (d,  $^2J_{\text{P,P}} = 16.8$  Hz, P- $\gamma$ ), –20.4 (dd,  $^2J_{\text{P,P}} = 20.4$  Hz,  $^2J_{\text{P,P}} = 16.5$  Hz, P- $\beta$ ). **IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3191, 2924, 2854, 1578, 1520, 1463, 1326, 1275, 1217, 1128, 1067, 991, 872, 811, 754, 639. **HRMS** (ESI $^-$ , m/z): ber: 1092.3139 [M] $^-$ , gef: 1092.3075 [M] $^-$ .

### Synthese von 4,5-Dimethoxy-2-nitroacetophenon 57

Es wurden 10.18 g 3,4-Dimethoxyacetophenon (56.49 mmol, 1.0 Äquiv.) in 30 mL Essigsäureanhydrid gelöst und langsam unter Eiskühlung zu einer Lösung aus 60 mL Salpe-

tersäure (65%) und 1.5 mL Essigsäureanhydrid getropft. Die Zugabe erfolgte über circa eine Stunde und die Reaktionstemperatur wurde unter 10 °C gehalten. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktionslösung für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf 300 mL Eiswasser gegossen. Der entstandene Feststoff wurde mit einer Fritte abgetrennt und der Filterkuchen mehrfach mit Eiswasser gewaschen bis das Waschwasser nicht mehr gelblich verfärbt war. Der Filterkuchen wurde mit Dichlormethan aus der Fritte gelöst und anschließend unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene gelbe Rückstand wurde mit 70 mL Wasser versetzt und in der Siedehitze solange mit Ethanol versetzt bis eine klare Lösung erhalten wurde. Das Produkt konnte in Form von feinen gelben Nadeln gewonnen werden.

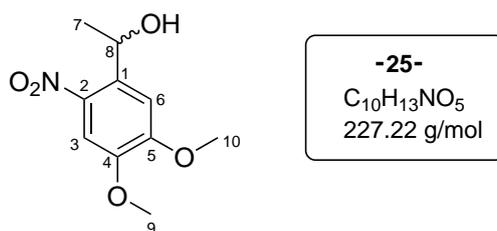


Ausbeute: Es wurden 8.19 g (36.4 mmol, 64%) feiner gelber Nadeln erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz) [DMSO-*d*<sub>6</sub>]: δ [ppm] = 7.64 (s, 1 H, H-3), 7.22 (s, 1 H, H-6), 3.92 (s, 3 H, H-10), 3.90 (s, 3 H, H-9), 2.52 (s, 3 H, H-7). **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 199.3 (C-8), 153.2 (C-5), 149.4 (C-4), 138.4 (C-2), 131.1 (C-1), 109.7 (C-6), 107.1 (C-3), 56.6 (C-10), 56.3 (C-9), 30.0 (C-7). **IR**:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2973, 2931, 2842, 1699, 1619, 1574, 1508, 1462, 1421, 1394, 1345, 1322, 1181, 1113, 1043, 1020, 953, 881, 788, 697, 666, 599, 536. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 226.0715 [M+H]<sup>+</sup>, gef: 226.0707 [M+H]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.45 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

### Synthese von *rac*-1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)ethan-1-ol 25

Die Synthese wurde nach AAV1 Var. 2 durchgeführt. Es wurden 950 mg (4.20 mmol, 1.0 Äquiv.) des Ketons **57** in einem Gemisch aus 30 mL Methanol und 10 mL Tetrahydrofuran gelöst und mit 0.61 g (12.6 mmol, 3.0 Äquiv.) Natriumborhydrid versetzt.

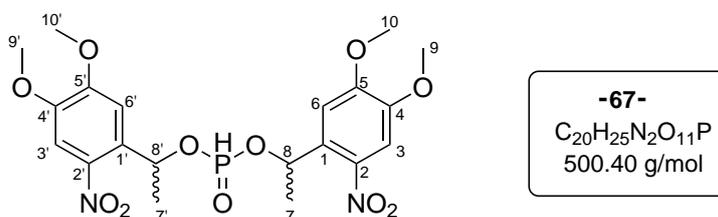


Ausbeute: Es wurden 0.94 g (4.1 mmol, 99%) eines gelben Feststoffs erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz) [DMSO- $d_6$ ]:  $\delta$  [ppm] = 7.53 (s, 1 H, H-3), 7.36 (s, 1 H, H-6), 5.47 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 4.7$  Hz, 1 H, OH), 5.26 (dt,  $^3J_{\text{H,H}} = 4.4$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 6.2$  Hz, 1 H, H-8), 3.90 (s, 3 H, H-9), 3.84 (s, 3 H, H-10), 1.37 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$  Hz, 3 H, H-7).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$ [ppm] = 153.2 (C-5), 147.1 (C-4), 138.9 (C-2), 137.9 (C-1), 108.9 (C-6), 107.3 (C-3), 63.9 (C-8), 56.0 (C-9,10), 25.1 (C-7). **IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3287, 3113, 2965, 2928, 2897, 1614, 1580, 1523, 1499, 1466, 1439, 1362, 1220, 1190, 1164, 1037, 1019, 970, 867, 796, 758, 659, 592. **HRMS** (ESI $^+$ , m/z): ber: 210.0766 [M-H $_2$ O] $^+$ , gef: 210.0755 [M-H $_2$ O] $^+$ . **R $_f$ -Wert:** 0.1 (CH $_2$ Cl $_2$ ).

### Synthese von Bis-(1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethyl)phosphonat **67**

Die Synthese wurde nach AAV3 durchgeführt. Es wurden 412 mg (1.80 mmol, 2.1 Äquiv.) des sekundären Alkohols **25** in 10 mL abs. Pyridin gelöst und tropfenweise mit 0.17 mL Diphenylphosphit (0.21 g, 0.90 mmol, 1.0 Äquiv.) versetzt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 2:1 nach EE). Das erhaltene gelbe Öl wurde mit Dichlormethan coevaporiert, wodurch ein gelber amorpher Schaum erhalten wurde.



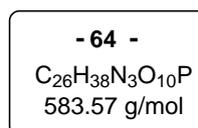
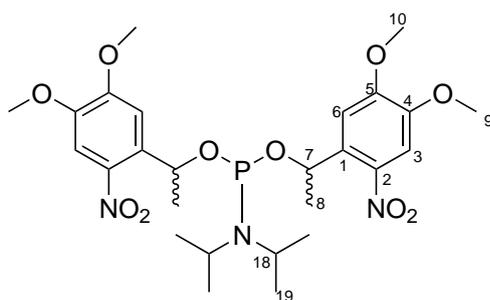
Ausbeute: Es wurden 0.14 g (0.32 mmol, 31%) eines gelben Feststoffs erhalten. Das Produkt liegt als Gemisch aus vier Diastereomeren vor. Während der Säulenchromatographie gelang es ein Diastereomer rein zu isolieren. Die angegebenen NMR-Daten ent-

sprechen diesem Diastereomer.

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz) [CDCl<sub>3</sub>]: δ [ppm] = 7.46 (s, 1 H, H-3'), 7.42 (s, 1 H, H-3), 7.04 (s, 1 H, H-6'), 6.96 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 703 Hz, 1 H, P-H), 6.94 (s, 1 H, H-6), 6.27 (dq, <sup>3</sup>J<sub>H,P</sub> = 9.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.3 Hz, 1 H, H-8), 6.13 (dq, <sup>3</sup>J<sub>H,P</sub> = 10.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.3 Hz, 1 H, H-8'), 3.96–3.88 (m, 12 H, H-9/9', 10/10'), 1.66 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.3 Hz, 3 H, H-7), 1.62 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.3 Hz, 3 H, H-7'). **<sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 154.1 (C-5), 153.9 (C-5'), 148.3 (C-4), 148.3 (C-4'), 138.7 (C-2), 138.6 (C-2'), 132.4 (<sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 3.9 Hz, C-1'), 132.2 (<sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 5.2 Hz, C-1), 107.5 (C-3'), 107.5 (C-3), 108.1 (C-6'), 108.1 (C-6), 71.0 (<sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 4.0 Hz, C-8'), 70.5 (<sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 5.0 Hz, C-8), 56.7, 56.6, 56.5, 56.4 (C-9/9', 10/10'), 25.0 (<sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 3.4 Hz, C-7), 24.7 (<sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 4.8 Hz, C-7'). **<sup>31</sup>P-NMR** (242 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 5.1. **IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2976, 2938, 2849, 1615, 1581, 1519, 1461, 1378, 1330, 1273, 1172, 1105, 1041, 1000, 951, 873, 647, 599. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 523.1049 [M+Na]<sup>+</sup>, gef: 523.1053 [M+Na]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert:** 0.52 (EE).

#### Synthese von Bis-(1-(4,5-dimethoxy-2-nitro)ethyl)phosphoramidit **64**

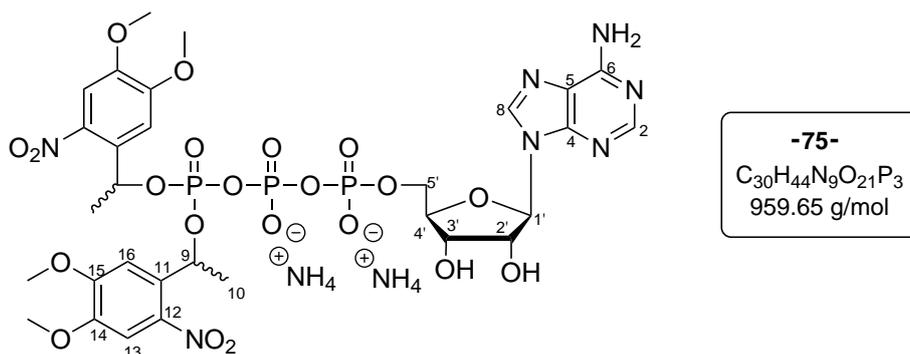
Die Synthese erfolgte nach AAV 2. Es wurden 0.17 mL (0.83 mmol, 0.17 g, 1.0 Äquiv.) Dichlorphosphoramidits **61** in 4 mL abs. THF gelöst und zu einer Lösung aus 0.40 g (1.7 mmol, 2.1 Äquiv.) des Alkohols **25** und 0.26 mL (0.19 g, 1.9 mmol, 3.0 Äquiv.) abs. Triethylamin in 15 mL abs. Tetrahydrofuran getropft. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 10:1 + 5% Triethylamin).



Ausbeute: Das gewünschte Produkt konnte nicht isoliert werden.

### Synthese von $\gamma$ -Bis-O-(1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethyl)-ATP 75

Die Synthese erfolgte nach AAV-4 Variante 2. Es wurden 0.20 g (0.40 mmol, 1.0 Äquiv.) des H-Phosphonats **67** in 10 mL abs. Acetonitril gelöst, mit 0.11 g (0.80 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid oxidativ chloriert und anschließend mit 0.31 g (0.30 mmol, 0.8 Äquiv.) ADP **178** (als Tetrabutylammoniumsalz) gekuppelt.



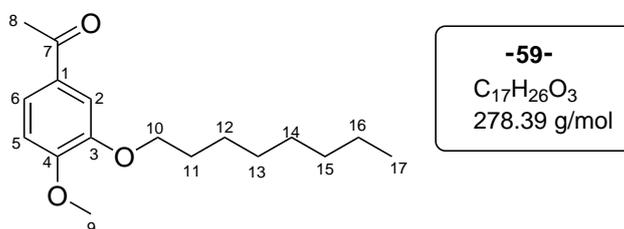
Ausbeute: Es wurden 0.14 g (15  $\mu$ mol, 49%) eines gelben Feststoffs als Gemisch von vier Diastereomeren erhalten. Aufgrund des komplizierten Diastereomerengemisches und wegen überlagernden Signalen war es im  $^1\text{H-NMR}$  nicht möglich jedes Signal exakt mit einem passendem Integral zuzuordnen. Es erfolgte daher nur eine Zusammenfassung der entsprechenden Signale zu dem jeweiligen Atom, aber nicht zu dem entsprechenden Diastereomer. Die verschiedenen Signale für die Diastereomere konnten im  $^{31}\text{P-NMR}$  und für das  $^1\text{H}$ -Signal der Methylgruppe 10 beobachtet werden. Eine exakte Zuordnung aller aromatischen  $^{13}\text{C}$ -Signale konnte aufgrund des Diastereomerengemisches nicht folgen.

**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz) [ $\text{MeOH-}d_4$ ]:  $\delta$  [ppm] = 8.65, 8.64, 8.63 8.61, (s, 1 H, H-8), 8.20, 8.19, 8.19 (s, 1 H, H-2), 7.43–7.29 (m, 2 H, H-13/16), 7.16–7.04 (m, 2 H, H-13/16), 6.15–6.02 (m, 2 H, H-1', 9), 4.65–4.59 (m, 1 H, H-2'), 4.53–4.49 (m, 1 H, H-4'), 4.36–4.30 (m, 2 H, H-3', 5'a), 4.29–4.21 (m, 1 H, H-5'b), 3.90, 3.88, 3.87, 3.83 (s, 12 H, OMe), 1.66–1.51 (m, 6 H, H-10).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (150 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ):  $\delta$ [ppm] = 154.1, 153.9, 153.7 (C-2), 148.2, 148.2, 148.0, 147.9 (C-8) 138.3, 138.1, 137.9 (Aryl, *ds*), 132.7–132.6, 132.5–132.4, 132.1–131.9 (m, C-11), 108.7, 108.7, 108.3 (C-13), 107.2, 107.1, 107.1 (C-16), 88.1, 88.0, 87.9 (C-1'), 84.1, 84.1 (m, C-4'), 75.2, 75.1, 75.1 (C-2'), 73.6–73.4, 73.0–72.8,

72.8–72.7 (m, C-9), 70.3, 70.2, 70.1 (C-3'), 65.0–64.9 (C-5'), 23.4–22.9 (C-10). **<sup>31</sup>P-NMR** (242 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>):  $\delta$ [ppm] = -11.6 (d,  $^2J_{P,P}$  = 19.2 Hz, P- $\alpha$ ), -11.7 (d,  $^2J_{P,P}$  = 20.8 Hz, P- $\alpha$ ), -14.1 (d,  $^2J_{P,P}$  = 17.9 Hz, P- $\gamma$ ), -15.5 (d,  $^2J_{P,P}$  = 16.9 Hz, P- $\gamma$ ), -23.3 - -23.8 (m, P- $\beta$ ). **IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3175, 1642, 1580, 1518, 1453, 1379, 1272, 1218, 1172, 1127, 1077, 922, 874, 816, 794, 711, 642. **HRMS** (ESI<sup>-</sup>, m/z): ber: 926.1412 [M]<sup>-</sup>, gef: 926.1443 [M]<sup>-</sup>.

### Synthese von 4-Methoxy-3-octanoxyacetophenon 59

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 971 mg (5.84 mmol, 1.0 Äquiv.) 3-Hydroxy-4-methoxyacetophenon und 2.67 g (21.7 mmol, 3.0 Äquiv.) trockenes Kaliumcarbonat in 50 mL abs. DMF suspendiert. Die Suspension wurde mit 2.7 mL (1.7 g, 8.6 mmol, 1.5 Äquiv.) *n*-Bromooctan versetzt und für 18 Stunden bei 50 °C gerührt. Nach einem vollständigem Umsatz wurden 40 mL Natronlauge (1 M) zugegeben und das Reaktionsgemisch dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten Etherextrakte wurde mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und mit einer gesättigten Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Es wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EE 1:1) gereinigt.



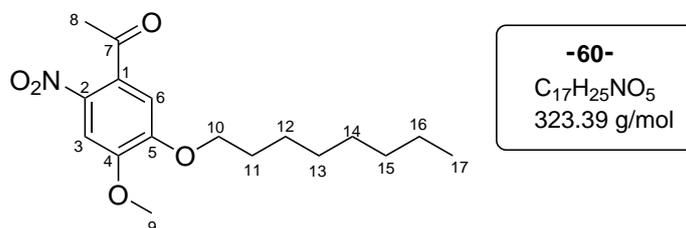
Ausbeute: Es wurden 1.45 g (0.523 mmol, 89%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz) [CDCl<sub>3</sub>]:  $\delta$  [ppm] = 7.55 (dd,  $^3J_{H,H}$  = 8.4 Hz,  $^4J_{H,H}$  = 2.0 Hz, 1 H, H-6), 7.51 (d,  $^3J_{H,H}$  = 2.0 Hz, 1 H, H-2), 6.88 (d,  $^3J_{H,H}$  = 8.2 Hz, 1 H, H-5), 4.06 (t,  $^3J_{H,H}$  = 6.9 Hz, 2 H, H-10), 3.93 (s, 3 H, H-9), 2.56 (s, 3 H, H-8), 1.85 (qui,  $^3J_{H,H}$  = 7.2 Hz, 2 H, H-11), 1.49–1.43 (m, 2 H, H-12), 1.38–1.25 (m, 8 H, H-13-16), 0.88 (t,  $^3J_{H,H}$  = 7.1 Hz, 3 H, H-17). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ [ppm] = 197.0 (C-7), 153.8 (C-4), 148.7 (C-3), 130.6 (C-1), 123.2 (C-6), 111.7 (C-2), 110.3 (C-5), 69.2 (C-10), 56.2 (C-9), 31.9, 29.5, 29.3, 22.8 (C-13-16), 29.2 (C-11), 26.4 (C-8), 26.1 (C-12), 14.2 (C-17). **IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] =

2962, 2940, 2921, 2851, 1671, 1583, 1507, 1464, 1444, 1424, 1344, 1286, 1215, 1185, 1143, 1072, 1003, 977, 877, 723, 642, 591. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 279.1950 [M+H]<sup>+</sup>, gef: 279.1960 [M+H]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.4 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EE 1:1 v/v).

### Synthese von 4-Methoxy-2-nitro-5-octanoxyacetophenon **60**

Unter Umgebungsatmosphäre wurden 1.26 g (4.53 mmol, 1.0 Äquiv.) des Ethers **59** in 23 mL Essigsäureanhydrid gelöst und langsam unter Eiskühlung zu einer Lösung aus 30 mL Salpetersäure (65%) und 1.5 mL Essigsäureanhydrid getropft. Die Zugabe erfolgte über circa eine halbe Stunde und die Reaktionstemperatur wurde unter 10 °C gehalten. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktionslösung für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf 200 mL Eiswasser gegossen. Die gebildete Suspension wurde, nachdem das Eis vollständig geschmolzen war, zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit ges. Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) gereinigt.



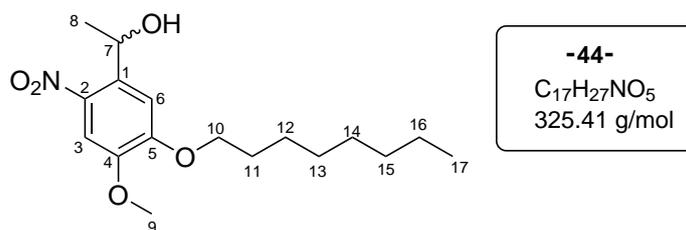
Ausbeute: Es wurden 0.83 g (2.60 mmol, 56%) eines gelben Feststoffs erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz) [CDCl<sub>3</sub>]: δ [ppm] = 7.60 (s, 1 H, H-3), 6.73 (s, 1 H, H-6), 4.09 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 2 H, H-10), 3.96 (s, 3 H, H-9), 2.49 (s, 3 H, H-8), 1.87 (qui, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.1 Hz, 2 H, H-11), 1.49–1.42 (m, 2 H, H-12), 1.39–1.25 (m, 8 H, H-13-16), 0.88 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.0 Hz, 3 H, H-17). **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 200.3 (C-7), 153.9 (C-5), 150.0 (C-4), 138.3 (C-2), 133.0 (C-1), 109.6 (C-6), 107.1 (C-3), 70.0 (C-10), 56.7 (C-9), 36.5 (C-8), 31.9, 29.4, 29.3, 22.8 (C-13-16), 28.9 (C-11), 25.9 (C-12), 14.7 (C-17). **IR**:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3095, 3001, 2919, 2852, 1697, 1574, 1517, 1503, 1471, 1442, 1394, 1352, 1284, 1220,

1184, 1120, 1050, 1004, 981, 957, 881, 794, 760, 547. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 324.1805 [M+H]<sup>+</sup>, gef: 324.1810 [M+H]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.47 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

### Synthese von *rac*-1-(4-Methoxy-2-nitro-5-octanoxyphenyl)ethan-1-ol **44**

Die Synthese wurde nach AAV1 Var. 2 durchgeführt. Es wurden 790 mg (2.46 mmol, 1.0 Äquiv.) des Ketons **60** in einem Gemisch aus 20 mL Methanol und 20 mL Tetrahydrofuran gelöst und mit 330 mg (8.60 mmol, 3.5 Äquiv.) Natriumborhydrid versetzt.

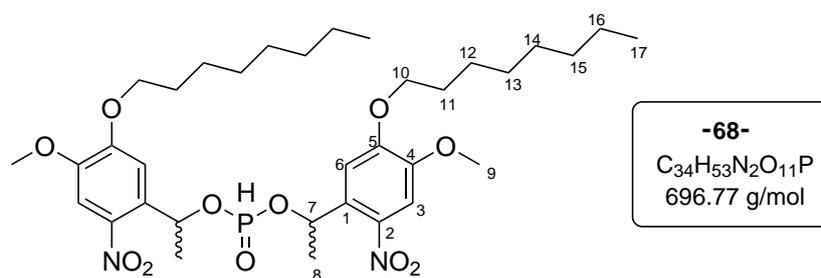


Ausbeute: Es wurden 780 mg (2.40 mmol, 98%) eines gelben Feststoffs erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz) [DMSO-*d*<sub>6</sub>]: δ [ppm] = 7.52 (s, 1 H, H-3), 7.34 (s, 1 H, H-6), 5.44 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.5 Hz, 1 H, OH), 5.26 (dq, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.2 Hz, 1 H, H-7), 4.12–4.06 (m, 2 H, H-10), 3.84 (s, 3 H, H-9), 1.75 (qui, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.0 Hz, 2 H, H-11), 1.45–1.38 (m, 2 H, H-12), 1.36 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.2 Hz, 3 H, H-8), 1.31–1.26 (m, 8 H, H-13-16), 0.86 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 3 H, H-17). **<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 152.7 (C-5), 147.2 (C-4), 138.7 (C-1), 137.9 (C-2), 109.7 (C-6), 107.4 (C-3), 68.6 (C-10), 63.9 (C-7), 56.0 (C-9), 31.2, 28.7, 28.6, 22.0 (C-13-16), 28.4 (C-11), 25.3 (C-12), 25.1 (C-8), 13.9 (C-17). **IR**:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3301, 2926, 2854, 1613, 1579, 1513, 1465, 1445, 1388, 1366, 1329, 1264, 1214, 1166, 1094, 1031, 1012, 896, 797, 723, 658. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 308.1862 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, gef: 308.1858 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.32 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

### Synthese von Bis-(1-(4-methoxy-2-nitro-5-octanoxyphenyl)ethyl)phosphonat **68**

Die Synthese wurde nach AAV3 durchgeführt. Es wurden 432 mg (1.31 mmol, 2.1 Äquiv.) des sekundären Alkohols **44** in 10 mL abs. Pyridin gelöst und tropfenweise mit 0.12 mL Diphenylphosphit (0.65 mmol, 0.15 g, 1.0 Äquiv.) versetzt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 3:1 nach PE/EE 2:1 v/v).

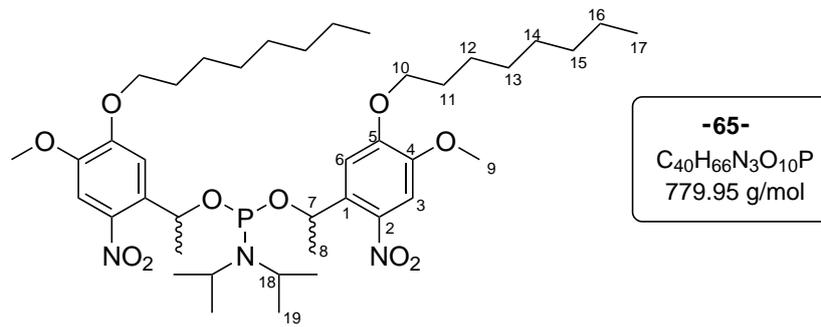


Ausbeute: Es wurden 0.33 g (0.51 mmol, 58%) eines gelben Öls erhalten. Das Produkt liegt als Gemisch aus vier Diastereomeren vor.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz) [CDCl<sub>3</sub>]: δ [ppm] = 7.57 (s, 2 H, H-3, 4 x ds), 7.11 (s, 2 H, H-6, 4 x ds), 6.37 (d, <sup>1</sup>J<sub>H,P</sub> = 703 Hz, 1 H, P-H, 2 x ds), 6.29–6.11 (m, 2 H, H-7), 4.06–3.96 (m, 8 H, H-10), 3.93 (s, 3 H, H-9, 4 x ds), 1.90–1.83 (m, 8 H, H-11), 1.66 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.1 Hz, 3 H, H-8, 4 x ds), 1.52–1.44 (m, 8 H, H-12), 1.41–1.26 (m, 32 H, H-13-16), 0.90–0.87 (m, 12 H, H-17). **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 153.8, 153.6 (C-5), 148.6, 148.5, 148.3, , 148.2 (C-4), 138.7, 138.5, 138.2, 138.1 (C-2), 132.2, 132.1, 132.0, 132.0, (C-1), 108.7, 108.7, (C-1), 107.8, 107.8, (C-3), 70.9 (C-9), 69.7 ((d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 2.8 Hz ,C-7), 69.6 ((d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 4.6 Hz ,C-7), 56.4, 56.3, 56.3, 56.2, (C-10), 29.4–29.3 (m, C-8), 28.9 ((d, <sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 3 Hz ,C-8), 29.2 (C-11), 25.9 (C-12), 24.9, 24.8, 24.6, 24.6, (C-13-16), 14.2, 14.1, (C-17). **<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 7.62. **IR**:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2926, 2854, 1579, 1515, 1465, 1442, 1376, 1268, 1173, 1104, 1036, 944, 797, 722, 624, 522. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 719.3285 [M+Na]<sup>+</sup>, gef: 719.3377 [M+Na]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.3 (PE/EE 1:1 v/v).

### Synthese von Bis-(1-(4-methoxy-2-nitro-5-octanoxyphenyl)ethyl)phosphoramidit **65**

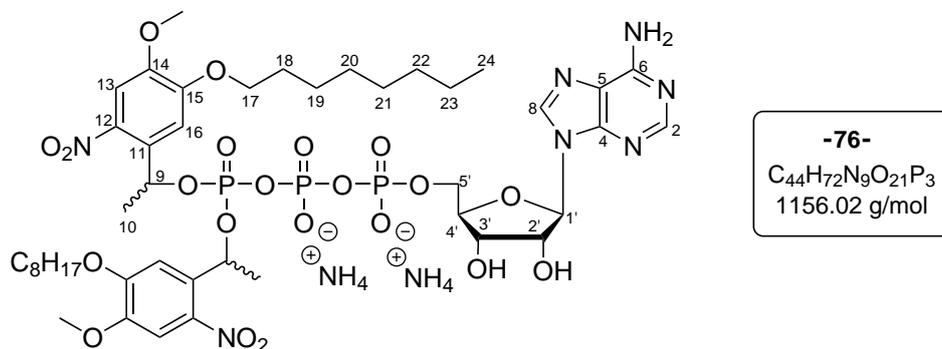
Die Synthese erfolgte nach AAV 2. Es wurden 0.17 mL (0.83 mmol, 0.17 g, 1.0 Äquiv.) Dichlorophosphoramidits **61** in 4 mL abs. THF gelöst und zu einer Lösung aus 0.57 g (1.7 mmol, 2.1 Äquiv.) des Alkohols **44** und 0.26 mL (0.19 g, 1.9 mmol, 3.0 Äquiv.) abs. Triethylamin in 15 mL abs. Tetrahydrofuran getropft. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 10:1 + 5 % Triethylamin).



Ausbeute: Das gewünschte Produkt konnte nicht isoliert werden.

### Synthese von $\gamma$ -Bis-O-(1-(4-methoxy-2-nitro-5-octanoxyphenyl)ethyl)-ATP 76

Die Synthese erfolgte nach AAV-4 Variante 2. Es wurden 0.16 g (0.23 mmol, 1.0 Äquiv.) des H-Phosphonats **68** in 10 mL abs. Acetonitril gelöst, mit 62 mg (0.46 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid oxidativ chloriert und anschließend mit 0.23 g (0.20 mmol 0.8 Äquiv.) ADP **178** (als Tetrabutylammoniumsalz) gekuppelt.

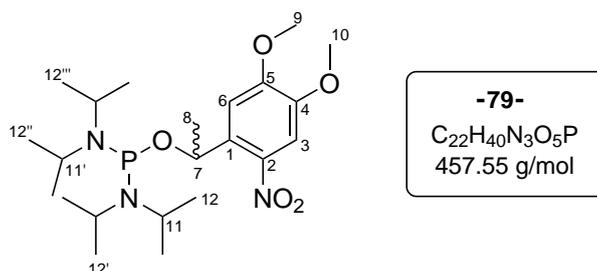


Ausbeute: Es wurden 53 mg (46  $\mu$ mol, 23%) eines gelben Feststoffs als Gemisch von vier Diastereomeren erhalten. Aufgrund des komplizierten Diastereomeregemisches und wegen überlagernden Signalen war es im  $^1H$ -NMR nicht möglich jedes Signal exakt mit einem passendem Integral zuzuordnen. Es erfolgte daher nur eine Zusammenfassung der entsprechenden Signale zu dem jeweiligen Atom, aber nicht zu dem entsprechenden Diastereomer. Die verschiedenen Signale für die Diastereomere konnten im  $^{31}P$ -NMR und für das  $^1H$ -Signal der Methylgruppe 10 beobachtet werden.

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz) [MeOH-*d*<sub>4</sub>]:  $\delta$  [ppm] = 8.63, 8.62, 8.62, 8.60 (s, 1 H, H-8), 8.19, 8.18 (s, 1 H, H-2), 7.40–7.36 (m, 2 H, H-13/16), 7.06–6.93 (m, 2 H, H-13/16), 6.16–6.06 (m, 2 H, H-1', 9), 4.69–4.64 (m, 1 H, H-2'), 4.55–4.51 (m, 1 H, H-4'), 7.35–4.23 (m, 3 H, H-3', 5'), 4.00–3.91 (m, 4 H, H-17), 3.91, 3.89, 3.87 (s, 6 H, H-OMe), 1.85–1.77 (m, 4 H, H-18), 1.64–1.53 (m, 6 H, H-10), 1.52–1.44 (m, 4 H, H-19), 1.42–1.27 (m, 16 H, H-20-23), 0.94–0.88 (m, 6 H, H-24). **<sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>):  $\delta$ [ppm] = 155.1, 155.1, 154.9 (C-2), 153.4 (Aryl, *ds*) 149.6, 149.2, 148.0 (C-8) 137.9 (Aryl, *ds*), 131.9 (C-11, *ds*), 110.5, 110.1, 110.1 (C-13), 108.6, 108.3 (C-16), 91.2 (C-1'), 83.7 (m, C-4'), 76.5 (C-2'), 79.9 (m, C-9), 71.0 (C-3'), 70.0–69.9 (C-5'), 65.9 (C-17), 56.7, 56.6, 56.5 (OMe), 33.0, 30.6–30.1, 27.3–27.0, 23.7 (C-18-22), 24.7 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>C,P</sub> = 4.5 Hz, C-10), 24.6 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>C,P</sub> = 4.4 Hz, C-10), 23.8 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>C,P</sub> = 4.5 Hz, C-10), 14.5 (C-23). **<sup>31</sup>P-NMR** (242 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>):  $\delta$ [ppm] = -11.5 - -11.9 (m, P- $\alpha$ ), -13.5 - -13.6 (m, P- $\gamma$ ), -15.5 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>P,P</sub> = 15.4 Hz, P- $\gamma$ ), -17.2 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>P,P</sub> = 16.5 Hz, P- $\gamma$ ), -23.4 - -23.9 (m, P- $\beta$ ). **IR**:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3191, 2926, 2854, 1580, 1519, 1442, 1329, 1271, 1175, 1104, 1079, 994, 871, 818, 757, 720, 624, 492. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): ber: 1120.3452 [M]<sup>+</sup>, gef: 1120.3397 [M]<sup>+</sup>.

#### Synthese von *O*-(1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)ethyl)-bis-(*N,N*-diisopropylamin)phosphoramidit **79**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 0.29 g (1.1 mmol, 1.0 Äquiv) Bis-(*N,N*-diisopropylamino)chlorophosphoramidit in 10 mL abs. Tetrahydrofuran gelöst und auf 0 °C gekühlt. Über zwanzig Minuten wurde anschließend eine Lösung aus 0.30 g (1.3 mmol, 1.2 Äquiv.) des sekundären Alkohols **25** und 0.45 mL (0.33 g, 3.3 mmol, 3.0 Äquiv.) abs. Triethylamin gelöst in 10 mL abs. Tetrahydrofuran zu getropft. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für 18 Stunden gerührt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert, der Filterkuchen mit Ethylacetat gewaschen und alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 5:1 + 5% Triethylamin) und das erhaltene gelbe Öl wurde zweimal mit Petrolether coevaporiert um einen gelben Feststoff zu erhalten.



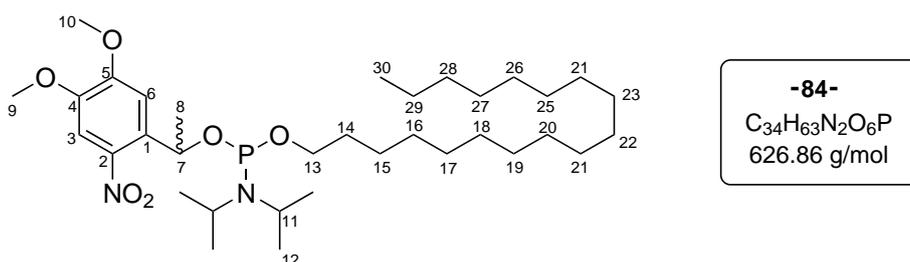
Ausbeute: Es wurden 0.44 g (0.97 mmol, 88%) eines gelben Feststoffs erhalten.

**$^1H$ -NMR** (400 MHz) [ $CDCl_3$ ]:  $\delta$  [ppm] = 7.56 (s, 1 H, H-3), 7.39 (s, 1 H, H-6), 5.51 (dq,  $^3J_{H,P} = 12.4$  Hz,  $^3J_{H,H} = 6.2$  Hz, 1 H, H-7), 3.96 (s, 3 H, H-4), 3.93 (s, 3 H, H-5), 3.63–3.39 (m, 4 H, H-11), 1.53 (d,  $^3J_{H,H} = 6.2$  Hz, 3 H, H-8), 1.20 (4x d,  $^3J_{H,H} = 6.6$  Hz, 6 H, H-12, 12', 12'', 12''').  **$^{13}C$ -NMR** (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$ [ppm] = 153.7 (C-9), 147.5 (C-10), 139.4 (C-2), 138.1 (d,  $^3J_{C,P} = 2.1$  Hz, C-1), 109.6 (C-6), 107.4 (C-3), 66.9 (d,  $^2J_{C,P} = 17.7$  Hz, C-7), 56.4 (C-5), 56.3 (C-4), 44.9 (d,  $^2J_{C,P} = 12.6$  Hz, C-11), 44.7 (d,  $^2J_{C,P} = 12.6$  Hz, C-11'), 25.2 (d,  $^3J_{C,P} = 3.6$  Hz, C-8), 24.5–24.3 (m, C-12, 12', 12'', 12''').  **$^{31}P$ -NMR** (162 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$ [ppm] = 148.8. **IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $cm^{-1}$ ] = 2966, 2929, 2868, 1519, 1497, 1462, 1452, 1438, 1319, 1272, 1219, 1184, 1114, 1099, 1051, 951, 916, 873, 794, 759, 672, 525. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 474.2733 [M+H]<sup>+</sup>, gef: 474.2730 [M+H]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert:** 0.52 (PE/EE 5:1 + 5% Triethylamin).

### Synthese von

#### 1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)ethyl-octadecyl-diisopropylphosphoramidit **84**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 94 mg (0.35 mmol, 1.0 Äquiv.) 1-Octadecanol und 0.21 g (0.46 mmol, 1.3 Äquiv.) des Diamidits **79** in 10 mL abs. Tetrahydrofuran gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es erfolgte die portionsweise Zugabe von 1.4 mL (0.35 mmol, 1.0 Äquiv.) DCI-Aktivatorlösung (0.25 mol/L). Die Zugabe erfolgte im folgendem Muster: 0.5 Äquiv., 5 min Rühren, 0.25 Äquiv., 5 min Rühren, 0.25 Äquiv. Nach der vollständigen Zugabe wurde der Reaktionsansatz für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden unter vermindertem Druck alle flüchtigen Bestandteile entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 5:1 + 5% Triethylamin).

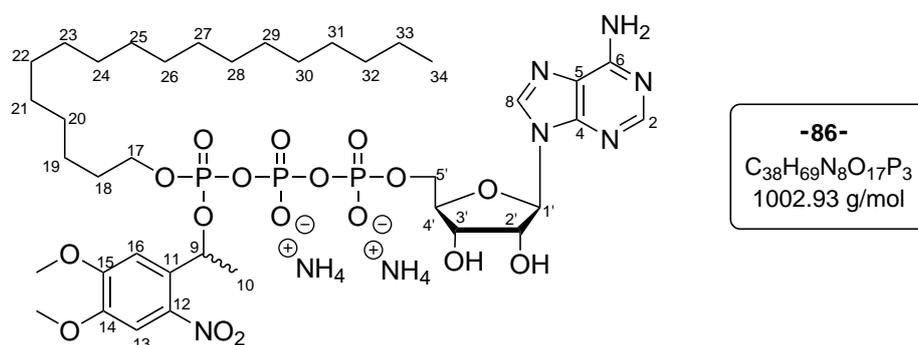


Ausbeute: Es wurden 0.15 g (0.23 mmol, 66%) eines gelben Öls erhalten. Das Produkt liegt als Gemisch aus vier Diastereomeren vor, von welchen zwei jeweils mit eigenen Signalen im <sup>1</sup>H-NMR und <sup>31</sup>P-NMR beobachtet werden konnten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz) [CDCl<sub>3</sub>]: δ [ppm] = 7.58 (s, 1 H, H-3), 7.56 (s, 1 H, H-3'), 7.37 (s, 1 H, H-6), 7.36 (s, 1 H, H-6'), 5.75–5.60 (m, 2 H, H-7, 7'), 3.97 (s, 6 H, H-9, 9'), 3.94–3.91 (m, 6 H, H-10, 10'), 3.69–3.45 (m, 8 H, H-11), 1.37–1.57 (m, 4 H, H-13), 1.57–1.54 (m, 4 H, H-14), 1.56–1.53 (m, 6 H, H-8), 1.30–1.21 (m, 60 H, H-16-29, 16'-29'), 1.20 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.9 Hz, 6 H, H-12), 1.16 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 6 H, H-12'), 1.14 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.9 Hz, 6 H, H-12''), 1.00 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 6 H, H-12'''), 0.87 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.7 Hz, 6 H, H-30). **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 152.8 (C-9), 147.4 (C-10), 138.1 (C-1), 137.9 (C-2), 109.7 (C-6), 109.6 (C-6'), 107.5 (C-3), 107.4 (C-3'), 67.6 (C-7, 7'), 56.5 (C-9/10), 56.4 (C-10/9), 43.1 (C-11), 42.9 (C-11'), 32.1 (C-13), 29.8 (C-14), 29.8 (C-15-29), 24.0 (C-12), 14.3 (C-30). **<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 145.2, 144.8. **IR**:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2962, 2922, 2852, 1519, 1462, 1363, 1333, 1270, 1218, 1199, 1167, 1080, 1056, 1021, 970, 920, 874, 793, 757, 719, 521. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 627.4497 [M+H]<sup>+</sup>, gef: 627.4500 [M+H]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.84 (PE/EE 5:1 + 5% Triethylamin v/v).

### Synthese von $\gamma$ -1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)ethyl-octadecyl-ATP 86

Die Synthese erfolgte nach AAV4-Variante 1. Es wurden 0.33 g (0.53 mmol, 1.25 mmol) des Amidits **84** mit 0.41 g (0.42 mmol, 1.0 Äquiv.) ADP (als Tetrabutylammoniumsalz) in 10 mL abs. Acetonitril umgesetzt. Als Aktivator wurden 0.15 g (0.80 mmol, 1.5 Äquiv.) Pyridinium-Trifluoroacetat verwendet und als Oxidationsmittel wurden 0.15 mL (0.80 mmol, 1.5 Äquiv.) *tert*-Butylhydroperoxid (5.5 M, in *n*-Decan) verwendet.



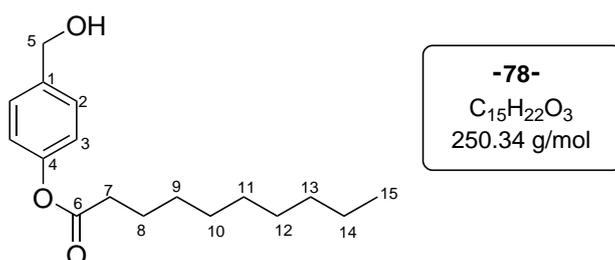
Ausbeute: Es wurden 0.26 g (0.26 mmol, 61%) eines gelben Feststoffs als Gemisch von vier Diastereomeren erhalten. Aufgrund des komplizierten Diastereomergemisches und wegen überlagernden Signalen war es im  $^1\text{H-NMR}$  nicht möglich jedes Signal exakt mit einem passendem Integral zuzuordnen. Es erfolgte daher nur eine Zusammenfassung der entsprechenden Signale zu dem jeweiligen Atom und die Summierung aller überlagernden Diastereomeresignale zu einem Integral. Eine Aufspaltung der Signale für die Diastereomere konnten im  $^{31}\text{P-NMR}$  und für das  $^1\text{H}$ -Signal der Methylgruppe 9 beobachtet werden.

**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz) [MeOH- $d_4$ ]:  $\delta$  [ppm] = 8.65, 8.65, 8.64, 8.623, (s, 1 H, H-8, *ds*), 8.20, 8.20, (s, 1 H, H-2, *ds*), 7.59, 7.59, 7.56, 7.53, (s, 1 H, H-13/16, *ds*), 7.39, 7.38, 7.56, 7.06, (s, 1 H, H-13/16, *ds*), 6.31–6.22 (m, 1 H, H-9, *ds*), 6.07–6.03 (m, 1 H, H-1', *ds*), 4.57–4.55 (m, 0.5 H, H-2'), 4.54–4.51 (m, 0.5 H, H-2'), 4.49–4.45 (m, 0.5 H, H-3'), 4.45–4.42 (m, 0.5 H, H-3'), 4.36–4.22 (m, 3 H, H-4', 5'), 4.19–4.02 (m, 2 H, H-17), 3.99, 3.98, 3.98, 3.94, 3.88, 3.87, 3.87, 3.81, 3.80, (s, 3 H, H-OMe), 1.72 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$  Hz,  $^4J_{\text{H,P}} = 2.2$  Hz, 1 H, H-10), 1.69 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$  Hz,  $^4J_{\text{H,P}} = 1.7$  Hz, 1 H, H-10), 1.64–1.54 (m, 2 H, H-18), 1.49 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$  Hz, 1 H, H-10), 1.31–1.21 (m, 28 H, H-19-33), 0.90 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz, 3 H, H-34).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (150 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  [ppm] = 147.2 (C-2), 140.1 (C-8), 108.9, 108.9, 107.1, 106.7 (C-13/16), 87.7 (C-1'), 83.9 (C-4'), 75.1 (C-2'), 72.8 (C-9), 69.8 (C-3'), 68.2 (C-17), 64.8 (C-5'), 55.5, 55.1, 55.1, 54.8 (C-OMe), 29.4 (C-18), 29.1 (m, C-19-33), 22.9, 20.6 (C-10), 12.6 (C-34).  **$^{31}\text{P-NMR}$**  (242 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  [ppm] = -11.5 - -11.7 (m, P- $\alpha$ ). -13.4 - -14.1 (m, P- $\gamma$ ). -23.5 - -23.9 (m, P- $\beta$ ). **IR**:  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3170, 2922, 2852, 1692, 1656, 1608, 1578, 1521, 1463, 1379, 1330, 1273, 1174, 1128, 1079, 1011, 926, 874, 818, 758, 643, 490. **HRMS** (ESI $^+$ ,  $m/z$ ): ber: 967.3390

[M]<sup>-</sup>, gef: 967.3337 [M]<sup>-</sup>.

### Synthese von 4-(Hydroxymethyl)-phenyldecanoat **78**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 4.05 g (32.6 mmol, 1.1 Äquiv.) 4-Hydroxybenzylalkohol in 30 mL abs. Tetrahydrofuran gelöst und mit 4.1 mL (3.0 g, 30 mmol, 1.0 Äquiv.) abs. Triethylamin versetzt. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und mit 6.1 mL (5.7 g, 30 mmol, 1.0 Äquiv.) Decansäurechlorid gelöst in 10 mL abs. Tetrahydrofuran versetzt. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktionslösung für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und der entstandene Feststoff wurde durch Filtration abgetrennt. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand mit Ethylacetat verdünnt. Die organische Phase wurde mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und anschließend mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 4:1) gereinigt.

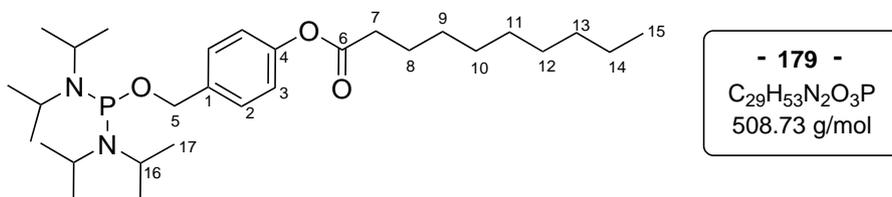


Ausbeute: Es wurden 4.28 g (15.4 mmol, 47%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz) [CDCl<sub>3</sub>]: δ [ppm] = 7.40–7.31 (m, 2 H, H-3), 7.09–7.01 (m, 2 H, H-2), 4.65 (s, 2 H, H-5), 2.55 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, 2 H, H-7), 1.75 (qui, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, 8 H, H-8), 1.48–1.17 (m, 12 H, H-9-14), 0.89 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.7 Hz, 3 H, H-15). **<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 172.6 (C-6), 150.2 (C-1), 138.9 (C-4), 128.1 (C-3), 121.7 (C-2), 64.7 (C-5), 34.4 (C-7), 31.9, 29.4, 29.3, 29.3, 29.1, 22.7 (C-9-14), 24.9 (C-8), 14.1 (C-15). **IR**:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3318, 2954, 2916, 2848, 1748, 1508, 1412, 1383, 1216, 1166, 1151, 1014, 818, 721, 514, **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 301.1774 [M+Na]<sup>+</sup>, gef: 301.1768 [M+Na]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.29 (PE/EE 4:1 v/v).

### Synthese von Bis-(*N,N*-diisopropylamino)-4-decanoyloxybenzylphosphoramidit 179

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 0.74 g (2.8 mmol, 1.0 Äquiv.) Bis(*N,N*-diisopropylamino)chlorophosphoramidits in 10 mL abs. Tetrahydrofuran gelöst und auf 0 °C gekühlt. Über zwanzig Minuten wurde anschließend eine Lösung aus 0.95 g (3.4 mmol, 1.2 Äquiv.) des Alkohols **78** und 1.2 mL (0.85 g, 8.4 mmol, 3.0 Äquiv.) abs. Triethylamin gelöst in 10 mL abs. Tetrahydrofuran zu getropft. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für 18 Stunden gerührt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert, der Filterkuchen mit Ethylacetat gewaschen und alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 5:1 + 5 % Triethylamin).

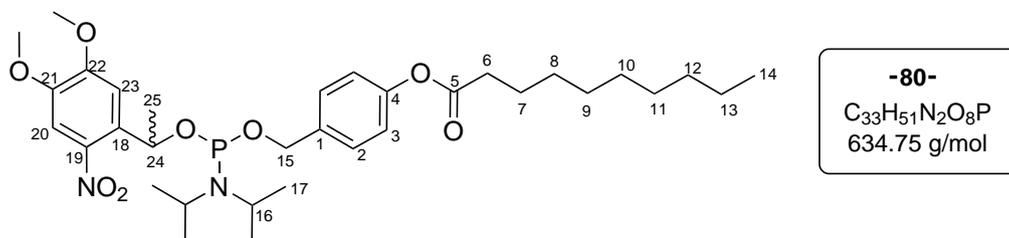


Ausbeute: Es wurden 1.3 g (2.5 mmol, 91%) eines farblosen Öls erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz) [CDCl<sub>3</sub>]: δ [ppm] = 7.39–7.31 (m, 2 H, H-3), 7.06–6.98 (m, 2 H, H-2), 4.63 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 2 H, H-5), 3.56 (dhept, <sup>3</sup>J<sub>H,P</sub> = 10.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, 4 H, H-16), 2.54 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, 2 H, H-7), 1.75 (qui, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, 2 H, H-8), 1.46–1.23 (m, 12 H, H-9-14), 1.18 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.8 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.9 Hz, 24 H, H-17), 0.88 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.6 Hz, 3 H, H-15). **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 172.6 (C-6), 149.7 (C-4), 138.2 (<sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 10.8 Hz, C-1), 127.9 (C-3), 121.3 (C-2), 65.7 (<sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 23.5 Hz, C-5), 44.6 (<sup>2</sup>J<sub>C,P</sub> = 12.5 Hz, C-16), 34.6 (C-7), 32.0, 29.6, 29.4, 29.4, 29.3, 22.8 (C-9-14), 25.1 (C-8), 24.8 (<sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 8.2 Hz C-17), 24.8 (<sup>3</sup>J<sub>C,P</sub> = 5.7 Hz C-17'), 14.2 (C-15). **<sup>31</sup>P-NMR** (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 124.7. **IR**:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2962, 2925, 2855, 1760, 1507, 1457, 1361, 1193, 1184, 1162, 1137, 1114, 1015, 951, 865, 748, 525. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 525.3816 [M+H]<sup>+</sup>, gef: 525.3870 [M+H]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.90 (PE/EE 10:1 + 5 % Triethylamin v/v).

### Synthese von (1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)ethyl)-(4-decanoyloxybenzyl)-diisopropylphosphoramidit **80**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 0.48 g (0.48 mmol, 1.0 Äquiv.) des Alkohols **78** und 0.33 g (0.72 mmol, 1.3 Äquiv.) des Diamidits **79** in 15 mL abs. Tetrahydrofuran gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es erfolgte die portionsweise Zugabe von 1.8 mL (0.48 mmol, 1.0 Äquiv.) DCI-Aktivatorlösung (0.25 mol/L). Die Zugabe erfolgte im folgendem Muster: 0.5 Äquiv., 5 min Rühren, 0.25 Äquiv., 5 min Rühren, 0.25 Äquiv. Nach der vollständigen Zugabe wurde der Reaktionsansatz für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden unter vermindertem Druck alle flüchtigen Bestandteile entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 5:1 + 5 % Triethylamin).



Ausbeute: Es wurden 0.29 g (0.45 mmol, 93%) eines gelben Öls erhalten. Das Produkt liegt als Gemisch aus vier Diastereomeren vor, von welchen zwei jeweils mit eigenen Signalen im  $^1H$ -NMR und  $^{31}P$ -NMR beobachtet werden konnten. Aufgrund der Komplexität des  $^1H$ -NMRs erfolgt nur die Zuordnung des dominanten Diastereomers.

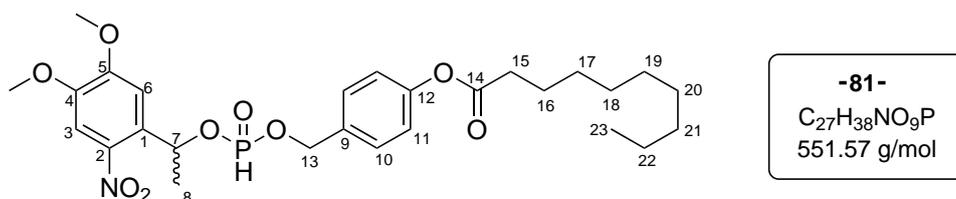
**$^1H$ -NMR** (400 MHz) [ $CDCl_3$ ]:  $\delta$  [ppm] = 7.56 (s, 1 H, H-20), 7.38–7.31 (m, 3 H, H-2, 23), 7.08–7.01 (m, 2 H, H-3), 5.80–5.67 (m, 1 H, H-24), 4.80–4.47 (m, 2 H, H-15), 3.95–3.90 (m, 6 H, OMe) 3.63–3.44 (m, 2 H, H-16), 2.59–2.48 (m, 2 H, H-6), 1.81–1.67 (m, 2 H, H-7), 1.67–1.49 (m, 5 H, H-8, 25), 1.47–1.24 (m, 10 H, H-9-13), 1.22–0.96 (m, 12 H, H-17), 0.91–0.81 (m, 2 H, H-14).  **$^{13}C$ -NMR** (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$ [ppm] = 172.5 (C-5), 153.7 (C-4), 150.0 (C-1), 147.7 (C-21/22), 139.0 (C-22/21), 137.0 (C-19), 128.8 (C-18), 128.1 (C-2), 121.6 (C-3), 109.5 (C-23), 107.4 (C-20), 67.8 (C-24), 65.2 (C-15), 56.5, 56.5 (OMe), 43.2 (d,  $^2J_{C,P}$  = 12.5 Hz, C-16), 34.5 (C-6), 24.8 (C-7), 24.8 (C-25), 29.6, 29.4, 29.3 (C-9-13), 25.1 (C-17), 14.3 (C-14).  **$^{31}P$ -NMR** (162 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$ [ppm] = 145.6, 144.5. **IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $cm^{-1}$ ] = 2964, 2927, 2854, 1758, 1580, 1518, 1460, 1394, 1364, 1332, 1271, 1198, 1183, 1164,

1103, 1012, 971, 919, 874, 793, 756, 597, 564, **HRMS**: Die Verbindung konnte weder im ESI noch im EI gefunden werden. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.5 (PE/EE 5:1 + 5 % Triethylamin v/v).

### Synthese von

#### (1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)ethyl)-(4-decanoyloxybenzyl)-phosphonat **81**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 0.34 mL (0.41 g, 1.8 mmol, 1.0 Äquiv.) Diphenylphosphonat in 20 mL Pyridin gelöst, auf  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt und mit 0.40 g (1.8 mmol, 1.0 Äquiv.) des sekundären Alkohols **44** versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 45 Minuten bei  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  gerührt bevor 0.73 g (2.6 mmol, 1.5 Äquiv.) des AB-Alkohols **78** portionsweise zugegeben wurden. Nach vollständiger Zugabe wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt bevor das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt wurde. Der erhaltene Rückstand wurde dreimal mit Toluol und dreimal mit Dichlormethan coevaporiert und anschließend säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 1:1).



Ausbeute: Es wurden 0.38 g (0.69 mmol, 40%) eines gelben Öls erhalten. Das Produkt liegt als Gemisch aus vier Diastereomeren vor, von welchen jeweils zwei mit eigenen Signalen im  $^1\text{H-NMR}$  und  $^{31}\text{P-NMR}$  beobachtet werden konnten. Aufgrund der Komplexität des  $^1\text{H-NMR}$ s erfolgt nur die Zuordnung des dominanten Diastereomers.

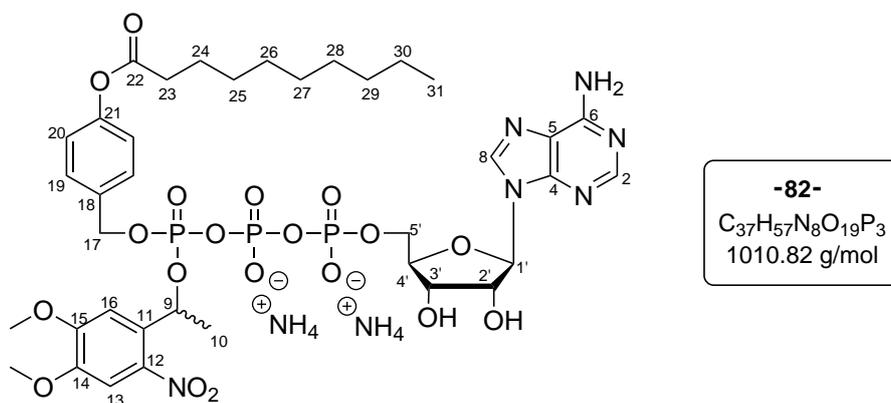
**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz) [ $\text{CDCl}_3$ ]:  $\delta$  [ppm] = 7.59 (s, 1 H, H-3), 7.34–7.28 (m, 2 H, H-11), 7.09–7.00 (m, 2 H, H-10), 7.14 (s, 1 H, H-6), 6.95 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 705\text{ Hz}$ , 1 H, P-H), 6.35–6.20 (m, 1 H, H-7), 5.08–4.98 (m, 2 H, H-13), 4.01–3.98 (m, 6 H, OMe), 2.55 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.5\text{ Hz}$ , 2 H, H-15), 1.74 (qui,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.4\text{ Hz}$ , 2 H, H-16), 1.65 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.2\text{ Hz}$ ,  $^4J_{\text{H,H}} = 1.4\text{ Hz}$ , 3 H, H-8), 1.45–1.11 (m, 12 H, H-17-22), 0.88 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.7\text{ Hz}$ , 3 H, H-23).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ [ppm] = 172.3 (C-14), 154.0 (C-4/5), 151.2 (C-9), 148.4 (C-5/4), 139.8 (C-2), 132.8 (C-1), 129.3 (C-11), 122.1 (C-10), 108.7 (C-6), 107.8 (C-3), 71.2 (C-7), 67.0 (d,  $^2J_{\text{C,P}} = 8.7\text{ Hz}$ , C-13), 56.5 (2 x OMe), 34.5 (C-15), 32.0 (C-17-22), 25.0

(C-16), 24.7 (d,  $^3J_{C,P} = 4.9$  Hz, C-8), 14.2 (C-23).  $^{31}\text{P-NMR}$  (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.9, 8.9. **IR**:  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2925, 2853, 1756, 1580, 1517, 1461, 1375, 1330, 1271, 1166, 1104, 1020, 947, 872, 815, 793, 758, 558. **HRMS** ( $\text{ESI}^+$ ,  $m/z$ ): ber: 574.2182 [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$ , gef: 574.2186 [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$ . **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.20 (PE/EE 1:1 v/v).

### Synthese von

#### $\gamma$ -(1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)ethyl)-(4-decanoyloxybenzyl)-ATP **82**

Die Synthese erfolgte nach AAV-4 Variante 2. Es wurden 55 mg (0.10 mmol, 1.0 Äquiv.) des H-Phosphonats **81** in 10 mL abs. Acetonitril gelöst, mit 27 mg (0.20 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*-Chlorsuccinimid oxidativ chloriert und anschließend mit 0.16 g (0.15 mmol, 0.8 Äquiv.) ADP **178** (als Tetrabutylammoniumsalz) gekuppelt.



Ausbeute: Es wurden 24 mg (20  $\mu\text{mol}$ , 26%) eines gelben Feststoffs als Gemisch von vier Diastereomeren erhalten. Aufgrund des komplizierten Diastereomergemisches und wegen überlagernden Signalen war es im  $^1\text{H-NMR}$  nicht möglich jedes Signal exakt mit einem passendem Integral zuzuordnen. Es erfolgte daher nur eine Zusammenfassung der entsprechenden Signale zu dem jeweiligen Atom, aber nicht zu dem entsprechendem Diastereomer. Aufgrund der geringen Substanzmenge und des gebildeten Diastereomerenverhältnisses konnte die Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ -Signale nur mit Hilfe der HSQC und HMBC Experimente erfolgen.

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz) [ $\text{MeOH-}d_4$ ]:  $\delta$  [ppm] = 8.64, 8.64, (s, 1 H, H-8), 8.18 (s, 1 H, H-2), 7.55–7.45 (m, 1 H, H-Aryl), 7.36–7.18 (m, 3 H, H-Aryl), 7.03–6.89 (m, 2 H, H-Aryl), 6.28–

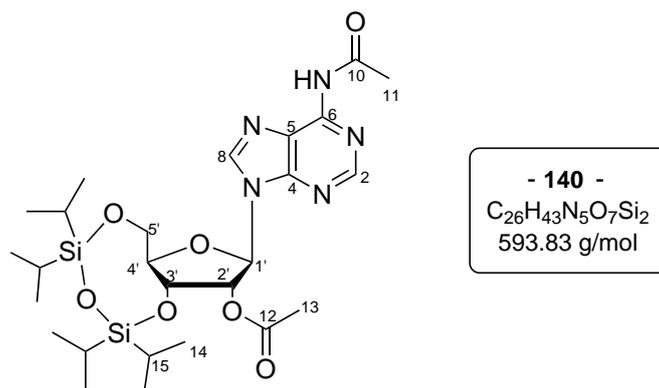
6.16 (m, 1 H, H-9), 6.07–6.02 (m, 1 H, H-1'), 5.20–5.07 (m, 2', 3' H, H-2), 4.60–4.52 (m, 1 H, H-4'), 4.49–4.40 (m, 1 H, H-5'a), 4.35–4.18 (m, 3 H, H-5'b, 17), 3.93 3.86, 3.81, (s, 1 H, OMe), 2.61–2.51 (m, 2 H, H-23), 1.77–1.70 (m, 2 H, H-24), 1.70–1.64 (m, 3 H, H-10), 1.63–1.57 (m, 3 H, H-10), 1.46–1.25 (m, 12 H, H-25-30), 0.90 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.2 \text{ Hz}$ , 3 H, H-31).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (150 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta[\text{ppm}] = 128.1$  (C-19/20, *ds*), 120.9 (C-19/20, *ds*), 108.0 (C-13/16, *ds*), 106.6 (C-13/16, *ds*), 87.6 (C-1'), 83.6 (m, C-4'), 74.9 (C-2'), 72.7 (m, C-9), 69.9 (C-3'), 64.8–64.7 (C-5'), 68.4 (C-23), 55.0 (OMe, *ds*), 33.5, 29.1, 29.1, 24.5, 22.2 (C-24-30), 24.6 (d,  $^3J_{\text{C,P}} = 4.4 \text{ Hz}$ , C-10), 24.6 (m, C-10), 14.5 (C-31).  **$^{31}\text{P-NMR}$**  (242 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta[\text{ppm}] = -11.0 - -11.3$  (m, P- $\alpha$ ),  $-13.3 - -14.0$  (m, P- $\gamma$ ),  $-22.7 - -23.1$  (m, P- $\beta$ ). **IR:**  $\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 3175, 2928, 2854, 2684, 1673, 1606, 1579, 1457, 1377, 1326, 1234, 1169, 1129, 1070, 1020, 991, 902, 810, 718$ . **HRMS** (ESI<sup>-</sup>, *m/z*): ber: 975.2349 [M]<sup>-</sup>, gef: 975.2280 [M]<sup>-</sup>.

### 6.3.3 Synthesen im Rahmen von *caged* cAMP

#### Synthese von

#### ***N*<sup>6</sup>-2'-Diacetyl-3',5'-*O*-(1,1,3,3-tetra*isopropyl*disiloxan-1,3-dily)adenosin 140**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.96 g (7.33 mmol, 1.0 Äquiv.) Adenosin in 30 mL abs. Pyridin suspendiert, auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit 2.5 mL (2.5 g, 7.7 mmol, 1.1 Äquiv.) TIPDSCl<sub>2</sub> versetzt und für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem ein vollständiger Umsatz per DC-Kontrolle (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1) festgestellt wurde, wurden 2.1 mL (2.3 g, 22 mmol, 3.0 Äquiv.) Essigsäureanhydrid zugegeben und die Reaktionslösung für weitere 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand jeweils dreimal mit Toluol und Dichlormethan coevaporiert. Der erhaltene Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und mit Wasser und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und anschließend im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Schaum wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (EE).

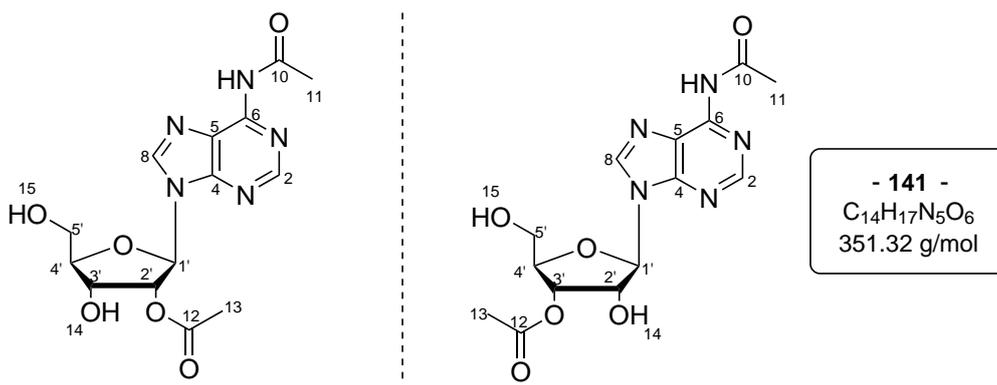


Ausbeute: Es wurden 3.59 g (6.01 mmol, 82%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

**$^1H$ -NMR** (500 MHz) [ $CDCl_3$ ]:  $\delta$  [ppm] = 8.78 (s, 1 H, H-NH), 8.63 (s, 1 H, H-8), 8.18 (s, 1 H, H-2), 6.06 (d,  $^3J_{H,H} = 1.2$  Hz, 1 H, H-1'), 5.79 (d,  $^3J_{H,H} = 5.3$  Hz, 1 H, H-2'), 5.05 (dd,  $^3J_{H,H} = 8.6$  Hz,  $^3J_{H,H} = 5.4$  Hz, 1 H, H-3'), 4.17 (dd,  $^3J_{H,H} = 12.6$  Hz,  $^3J_{H,H} = 2.5$  Hz, 1 H, H-5'a), 4.11–4.00 (m, 2 H, H-5'b, 4'), 2.62 (s, 3 H, H-11), 2.17 (s, 3 H, H-13), 1.13–0.91 (m, 28 H, H-14, 15).  **$^{13}C$ -NMR** (125 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$ [ppm] = 169.5 (C-10, 12), 150.5 (C-6), 149.4 (C-4), 122.4 (C-5), 152.6 (C-8), 141.6 (C-2), 87.8 (C-1'), 82.4 (C-4'), 75.7 (C-2'), 69.1 (C-3'), 60.6 (C-5'), 25.9 (C-11), 20.8 (C-13), 17.6, 17.5, 17.4, 17.4, 17.1, 17.0, 17.0, 17.0 (C-14), 13.5, 13.1, 12.9, 12.9 (C-15). **IR**:  $\tilde{\nu}$  [ $cm^{-1}$ ] = 3675, 2944, 2867, 1754, 1608, 1463, 1384, 1249, 1218, 1151, 1075, 1034, 883, 860, 757. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 594.2774 [M+H]<sup>+</sup>, gef: 594.2785 [M+H]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.2 (EE).

### Synthese von *N*<sup>6</sup>,2'-Diacetyladenosin 141

Unter Umgebungsatmosphäre wurden 0.46 g (0.77 mmol, 1.0 Äquiv.) des geschützten Adenosinderivats **140** in 8 mL Tetrahydrofuran gelöst und mit 1.5 mL (9.2 mmol, 12 Äquiv.) Triethylamin-Trihydrofluorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 13 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Überschuss an Fluorierungsreagenz wurde durch die vorsichtige, portionsweise Zugabe von Kieselgel entfernt. Im Vakuum wurden anschließend alle flüchtigen Bestandteile entfernt, der erhaltene Rückstand auf Celite aufgetragen und durch automatisierte RP<sub>18</sub>-Chromatographie gereinigt.



Ausbeute: Es wurden 0.24 g (0.69 mmol, 90%) eines farblosen Feststoffs erhalten. Per  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie konnte eine Migration der Acetylgruppe zwischen der 2' und 3' Position beobachtet werden. Aus diesem Grund werden nur die  $^1\text{H}$ -Signale der beiden Isomere angegeben, da die Signale im  $^{13}\text{C-NMR}$  nicht zugeordnet werden konnten.

• **2'-Acetyl-Isomer**

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) [ $\text{DMSO-}d_6$ ]:  $\delta$  [ppm] = 10.71 (s, 1 H, H-NH), 8.72 (s, 1 H, H-8), 8.67 (s, 1 H, H-2), 6.02 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$  Hz, 1 H, H-1'), 5.88 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.2$  Hz, 1 H, H-2'), 5.35–5.30 (m, 2 H, H-3', 15), 4.91 (dt,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.6$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 5.3$  Hz, 1 H, H-4'), 4.16 (dt,  $^3J_{\text{H,H}} = 3.8$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 2.5$  Hz, 1 H, H-14), 3.74–3.66 (m, 1 H, H-5'a), 3.65–3.56 (m, 1 H, H-5'b), 2.26 (s, 3 H, H-11), 2.13 (s, 3 H, H-13).

• **3'-Acetyl-Isomer**

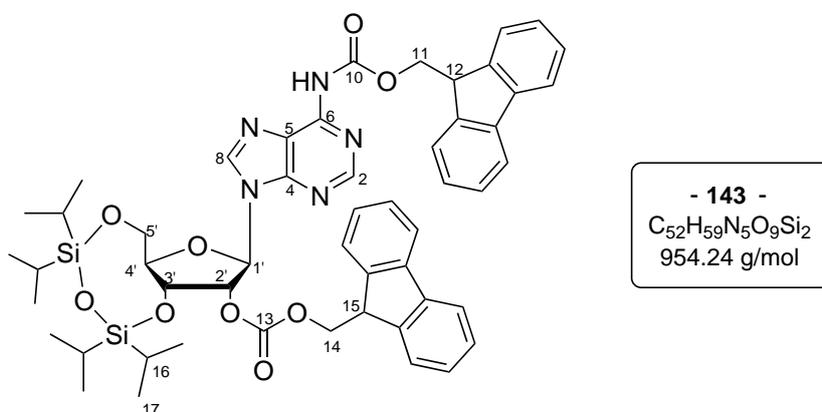
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz) [ $\text{DMSO-}d_6$ ]:  $\delta$  [ppm] = 10.71 (s, 1 H, H-NH), 8.71 (s, 1 H, H-8), 8.66 (s, 1 H, H-2), 6.26 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 5.8$  Hz, 1 H, H-1'), 5.67 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 5.3$  Hz, 1 H, H-15), 5.64 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 5.4$  Hz, 1 H, H-2'), 5.21 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 5.3$  Hz, 1 H, H-3'), 4.52–4.48 (m, 1 H, H-4'), 4.03–4.00 (m, 1 H, H-14), 3.75–3.67 (m, 1 H, H-5'a), 3.65–3.56 (m, 1 H, H-5'b), 2.25 (s, 3 H, H-11), 2.04 (s, 3 H, H-13).

**Synthese von**

***N*<sup>6</sup>-2'-*O*-di-Fmoc-3',5'-*O*-(1,1,3,3-tetra*i*sopropyldisiloxan-1,3-dily)adenosin 143**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.17 g (4.37 mmol, 1.0 Äquiv.) Adenosin in 30 mL abs. Pyridin suspendiert, auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit 1.5 mL (1.5 g, 4.6 mmol,

1.1 Äquiv.) TIPDSCl<sub>2</sub> versetzt und für 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem ein vollständiger Umsatz per DC-Kontrolle (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1) festgestellt wurde, wurden 2.26 g (8.74 mmol, 2.0 Äquiv.) Fmoc-Cl zugegeben und die Reaktionslösung für weitere 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand jeweils dreimal mit Toluol und Dichlormethan coevaporiert. Der erhaltene Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und mit Wasser und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und anschließend im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Schaum wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 2:1).



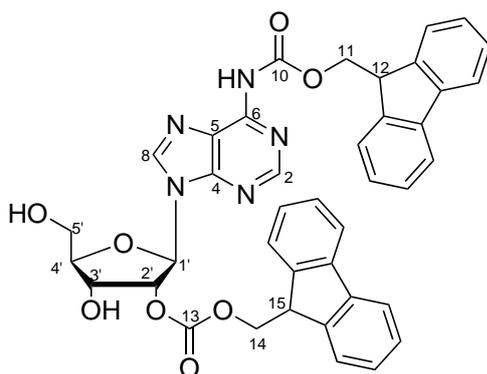
Ausbeute: Es wurden 3.59 g (6.01 mmol, 82%) eines farblosen Feststoffs in Form eines Schaums erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz) [CDCl<sub>3</sub>]: δ [ppm] = 8.74 (s, 1 H, H-8), 8.59 (s, 1 H, NH), 8.18 (s, 1 H, H-2), 7.79–7.74 (m, 4 H, H-Aryl), 7.68–7.60 (m, 4 H, H-Aryl), 7.44–7.38 (m, 4 H, H-Aryl), 7.35–7.28 (m, 4 H, H-Aryl), 6.13 (s, 1 H, H-1'), 5.73 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.2 Hz, 1 H, H-2'), 5.14 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.2 Hz, 1 H, H-3'), 4.64–4.61 (m, 2 H, H-11), 4.52–4.47 (m, 1 H, H-14a), 4.39–4.31 (m, 2 H, H-14b, 12), 4.30–4.26 (m, 1 H, H-15), 4.19–4.14 (m, 2 H, H-4', 5'a), 4.06 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 13.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.7 Hz, 1 H, H-5'b), 1.14–0.97 (m, 28 H, H-16, 17). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 154.2 (C-10, 13), 153.2 (C-8), 151.1 (C-Aryl (q)), 150.5 (C-Aryl (q)), 149.6 (C-Aryl (q)), 143.7 (C-Aryl (q)), 143.6 (C-Aryl (q)), 143.5 (C-Aryl (q)), 143.2 (C-Aryl (q)), 141.6 (C-Aryl (q)), 141.5 (C-2), 141.4 (C-Aryl (q)), 128.1 (C-Aryl), 128.0 (C-Aryl), 127.3 (C-Aryl), 125.4 (C-Aryl (q)), 125.2 (C-Aryl (q)), 122.5 (C-Aryl (q)), 120.2 (C-Aryl), 120.2 (C-Aryl), 87.7 (C-1'), 82.2 (C-4'), 79.1 (C-2'),

70.6 (C-14), 69.1 (C-3'), 68.0 (C-11), 60.3 (C-5'), 47.0 (C-12), 46.8 (C-15), 17.6, 17.5, 17.4, 17.4, 17.1, 17.0, 16.9 (C-17), 13.5, 13.1, 12.9, 12.8, (C-16). **IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2943, 2893, 2865, 1754, 1610, 1586, 1463, 1385, 1296, 1252, 1152, 1060, 1033, 883, 827, 781, 757, 694, 620, 553, 425. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 954.3930 [M+H]<sup>+</sup>, gef: 354.3951 [M+H]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert:** 0.20 (PE/EE 2:1 v/v).

### Synthese von N<sup>6</sup>,2'-O-Di-Fmocadenosin **145**

Unter Umgebungsatmosphäre wurden 0.43 g (0.75 mmol, 1.0 Äquiv.) des geschützten Adenosinderivats **143** in 15 mL Tetrahydrofuran gelöst und anschließend mit 0.88 mL (5.4 mmol, 12 Äquiv.) Triethylamin-Trihydrofluorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Überschuss an Fluorierungsreagenz wurde durch die vorsichtige, portionsweise Zugabe von Kieselgel entfernt. Im Vakuum wurden anschließend alle flüchtigen Bestandteile entfernt, der erhaltene Rückstand versucht säulenchromatographisch an Kieselgel zu reinigen (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1).

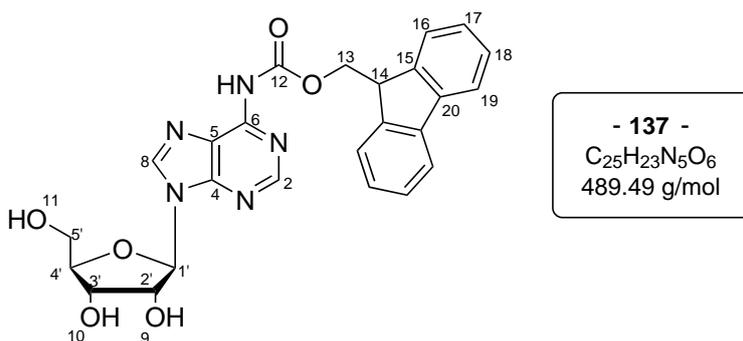


- **145** -  
 C<sub>40</sub>H<sub>33</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>  
 711.73 g/mol

Ausbeute: Das gewünschte Produkt konnte nicht rein isoliert werden. Es wurde stattdessen ein komplexes Gemisch aus monogeschütztem Fmoc-Adenosin, 2',N<sup>6</sup>-Di-Fmoc-Adenosin, 3',N<sup>6</sup>-Di-Fmoc-Adenosin und Dibenzofulven erhalten. Eine weitere Trennung dieses Gemisches gelang nicht.

**Synthese von *N*-[(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxy)carbonyl]adenosin (Fmoc-Adenosin) 137 und Bis(*N,N*-[(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxy)carbonyl])adenosin (Bis-Fmoc-Adenosin) 138**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.50 g (5.61 mmol, 1.0 Äquiv.) Adenosin in 30 mL eines 1:1 Gemisches aus abs. Tetrahydrofuran und abs. Pyridin suspendiert und nach Kühlung auf 0 °C tropfenweise mit 2.28 mL (1.96 g, 18.0 mmol, 3.2 Äquiv.) TMS-Chlorid versetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 18 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend, nach erneuter Kühlung auf 0 °C, portionsweise mit 1.74 g (6.73 mmol, 1.2 Äquiv.) Fmoc-Chlorid versetzt. Die Suspension wurde für weitere zwanzig Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend unter starken Rühren mit 1.5 mL Salzsäure (2 M) versetzt. Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum entfernt und der zurückbleibende Feststoff anschließend jeweils dreimal mit Toluol und CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> coevaporiert. Das erhaltene farblose Öl wurde mittels automatischer RP-Säulenchromatographie gereinigt und anschließend durch Gefriertrocknung vom Lösungsmittel befreit.

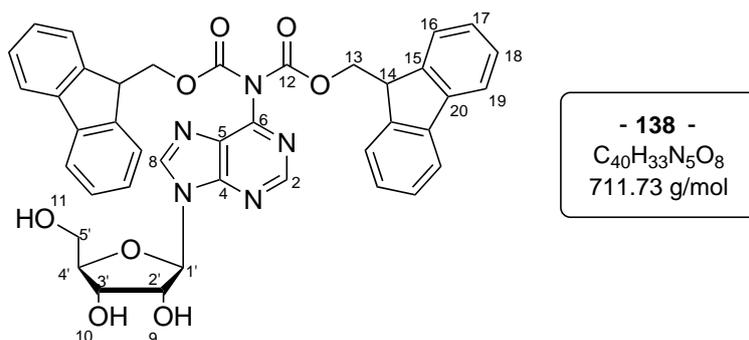


Ausbeute: Es wurden 1.29 g (2.64 mmol, 47%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz) [DMSO-*d*<sub>6</sub>]: δ [ppm] = 10.96 (s, 1 H, NH), 8.72 (s, 1 H, H-8), 8.67 (s, 1 H, H-2), 7.90 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.7 Hz, 2 H, H-16), 7.88–7.82 (m, 2 H, H-19), 7.43 (dt, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.6 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 1.2 Hz, 2 H, H-17), 7.35 (dt, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 1.2 Hz, 2 H, H-18), 6.03 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.7 Hz, 1 H, H-1'), 5.54 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.0 Hz, 1 H, H-9), 5.24 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 4.9 Hz, 1 H, H-10), 5.16–5.12 (m, 1 H, H-11), 4.67–4.61 (m, 1 H, H-2'), 4.45–4.39 (m, 2 H, H-13), 4.35–4.29 (m, 1 H, H-14), 4.22–4.17 (m, 1 H, H-3'), 4.02–3.95 (m, 1 H, H-4'), 3.74–3.65 (m, 1 H, H-5'a), 3.62–3.55 (m, 1 H, H-5'b). **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 152.1 (C-12), 151.7 (C-2), 151.7 (C-6), 149.8 (C-4), 149.1 (C-5), 143.7

(C-20), 142.8 (C-8), 140.7 (C-15), 127.7 (C-17), 127.1 (C-18), 125.5 (C-19), 120.1 (C-16), 87.7 (C-1'), 85.7 (C-4'), 73.7 (C-2'), 70.4 (C-3'), 66.7 (C-13), 61.3 (C-5'), 46.4 (C-14). **IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3279, 2945, 1750, 1530, 1306, 1210, 739, 512. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 490.3930 [M+H]<sup>+</sup>, gef: 490.1721 [M+H]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert:** 0.61 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v).

Analog zu der oben beschriebenen Synthese zum monogeschützten Fmoc-Adenosin wurde die Synthese mit mehr Äquivalenten Fmoc-Chlorid wiederholt um die exocyclische Aminofunktion des Adenosins doppelt zu schützen. Es wurden folgende Einwaagen verwendet: 1.51 g (5.65 mmol, 1.0 Äquiv.) Adenosin, 2.28 mL (1.96 g, 18.0 mmol, 3.2 Äquiv.) TMS-Chlorid, 3.23 g (12.5 mmol, 2.2 Äquiv.) Fmoc-Chlorid. Die Durchführung, die Menge an Lösungsmittel und die Reinigung entspricht der vorherigen Reaktion mit weniger Äquivalenten Fmoc-Chlorid.



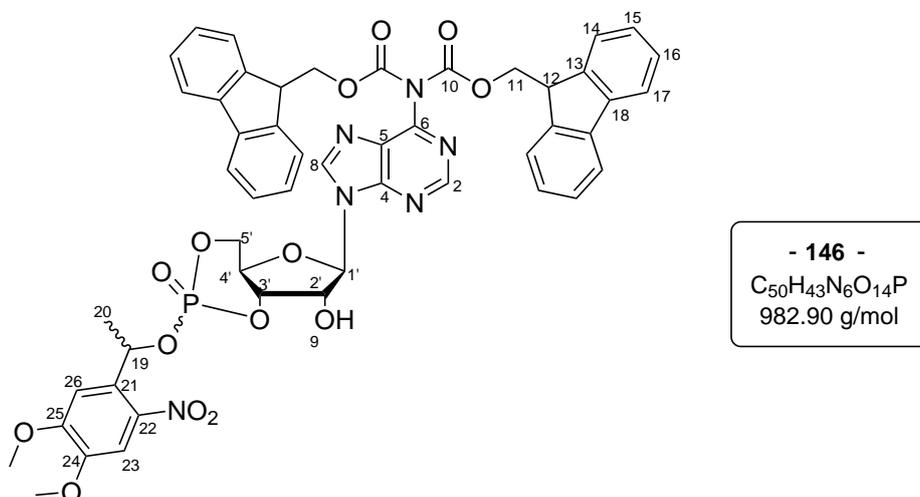
Ausbeute: Es wurden 2.32 g (3.26 mmol, 58%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz) [DMSO-*d*<sub>6</sub>]:  $\delta$  [ppm] = 8.77 (s, 1 H, H-8), 8.67 (s, 1 H, H-2), 7.70 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.7 Hz, 4 H, H-16), 7.35–7.14 (m, 12 H, H-17-19), 6.15 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.2 Hz, 1 H, H-1'), 5.68 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.3 Hz, 1 H, H-9), 5.38 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.2 Hz, 1 H, H-10), 5.15 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.2 Hz, 1 H, H-11), 4.76–4.70 (m, 1 H, H-2'), 4.48 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.2 Hz, 2 H, H-13), 4.31–4.24 (m, 1 H, H-3'), 4.13–4.08 (m, 1 H, H-4'), 4.07 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.5 Hz, 1 H, H-14), 3.74–3.65 (m, 1 H, H-5'a), 3.62–3.55 (m, 1 H, H-5'b). **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 153.1 (C-12), 151.7 (C-2), 151.6 (C-6), 150.1 (C-4), 149.1 (C-5), 143.7 (C-20), 140.7 (C-15), 140.5 (C-8), 129.3 (C-17), 126.8 (C-18), 124.5 (C-19), 119.9 (C-16), 88.0 (C-1'), 85.8 (C-4'), 73.9 (C-2'), 70.3 (C-3'), 68.5 (C-13), 61.3 (C-5'), 45.7 (C-14).

**IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3279, 2945, 1750, 1530, 1306, 1210, 739, 512. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 712.2407 [M+H]<sup>+</sup>, gef: 712.2413 [M+H]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert:** 0.86 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v).

**Synthese von *N,N*-Di-Fmoc-Adenosin-3',5'-[*O*-(1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)ethyl]cyclophosphat **146****

Für die Synthese wurden 0.16 g (0.22 mmol, 1.0 Äquiv.) des Di-Fmoc-Adenosins **138** und 0.11 g (0.24 mmol, 1.1 Äquiv.) des Amidits **79** für eine Stunde im Vakuum getrocknet und anschließend in 40 mL abs. Acetonitril gelöst. Zu der klaren Lösung wurden 46 mg (0.24 mmol, 1.1 Äquiv.) trockenes Pyridinium-Trifluoroacetat als Aktivator zugegeben. Die erhaltene Lösung wurde für zwanzig Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden weitere 64 mg (0.33 mmol, 1.5 Äquiv.) trockenes Pyridinium-Trifluoroacetat zugegeben, die Reaktion für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 60 µL (0.33 mmol, 1.5 Äquiv.) einer *tert*-Butylhydroperoxid-Lösung (5.5 M in *n*-Decan) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für weitere dreißig Minuten bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels automatischer RP-Säulenchromatographie gereinigt und anschließend durch Gefriertrocknung vom Lösungsmittel befreit.



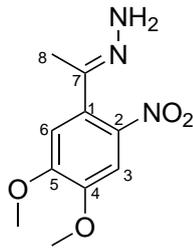
**Ausbeute:** Es wurden 86 mg (87 µmol, 40%) eines gelben Feststoffs als Gemisch von vier Diastereomeren im Verhältnis von 0.9/0.6/1.0/0.6 erhalten (ermittelt im <sup>31</sup>P-NMR).

Aufgrund des komplizierten Diastereomerengemisches und wegen überlagernden Signalen war es im  $^1\text{H-NMR}$  nicht möglich jedes Signal exakt mit einem passendem Integral zuzuordnen. Es erfolgte daher nur eine Zusammenfassung der entsprechenden Signale zu dem jeweiligen Atom, aber nicht zu dem entsprechendem Diastereomer. Eine Aufspaltung der Signale in vier Diastereomere konnte jedoch sehr gut im  $^{31}\text{P-NMR}$  und im  $^1\text{H-NMR}$  bei den Signalen des 1'-Protons und der Methylgruppe mit der Nummer 20 beobachtet werden. Eine Auswertung des  $^{13}\text{C-NMR}$  gelang aufgrund der Vielzahl an überlagernden Signalen in verschiedenen Intensitäten nicht.

**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz) [ $\text{DMSO-}d_6$ ]:  $\delta$  [ppm] = 8.63 (s, H-8), 8.63 (s, H-2), 7.71–7.60 (m, H-Aryl), 7.40–7.10 (m, H-Aryl), 6.68 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 4.9$  Hz, 1 H, H-1'), 6.62 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 4.8$  Hz, 1 H, H-1'), 6.58 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 4.6$  Hz, 1 H, H-1'), 6.57 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 4.7$  Hz, 1 H, H-1'), 6.28–6.12 (m, H-19), 5.26–5.21 (m, H-2'), 5.00–4.96 (m, H-3'), 4.85–4.69 (m, H-5'), 4.55–4.46 (m, H-11, 9), 4.47–4.42 (m, H-12), 4.08–3.81 (m, OMe), 2.52–2.51 (m, 1 H, H-4'), 1.84 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$  Hz, 3 H, H-20), 1.80 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$  Hz, 3 H, H-20), 1.74 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 4.8$  Hz, 3 H, H-20), 1.73 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 4.6$  Hz, 3 H, H-20).  **$^{31}\text{P-NMR}$**  (242 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = –5.15, –5.34, –7.27, –7.55. **IR**:  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3342, 2941, 2841, 1743, 1645, 1574, 1474, 1421, 1321, 1310, 1284, 1210, 1145, 1045, 981, 841, 741, 638. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 983.2648 [M+H]<sup>+</sup>, gef: 983.2651 [M+H]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.80 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1 v/v).

### Synthese von (1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)ethylidene)hydrazon 136

Unter Umgebungsatmosphäre wurden 981 mg (4.36 mmol, 1.0 Äquiv.) 4,5-Dimethoxy-2-nitroacetophenon **57** in 60 mL Ethanol suspendiert und mit 0.74 mL (0.78 g, 13 mmol, 3.0 Äquiv.) konz. Essigsäure versetzt. Die Reaktionslösung wurde für zehn Minuten gerührt, mit 1.4 mL (22 mmol, 5.0 Äquiv.) einer Hydrazin Lösung (51 %, aq) versetzt und anschließend für drei Stunden zum Rückfluss erhitzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Membranpumpenvakuum entfernt, der Rückstand in Chloroform aufgenommen, je zweimal mit ges. Natriumhydrogencarbonat- und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und erneut im Membranpumpenvakuum vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand wurde aus möglichst wenig Toluol umkristallisiert.



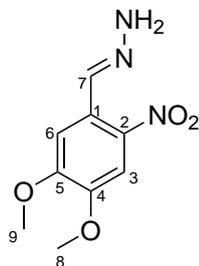
- 136 -  
 $C_{10}H_{13}N_3O_4$   
 239.23 g/mol

Ausbeute: Es wurden 691 mg (2.89 mmol, 66%) eines gelben Feststoffs erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz) [ $\text{CDCl}_3$ ]:  $\delta$  [ppm] = 7.60 (s, 1 H, H-3), 6.86 (s, 1 H, H-6), 5.38 (s, 2 H,  $\text{NH}_2$ ), 3.97 (s, 3 H, OMe), 3.95 (s, 3 H, OMe), 2.03 (s, 3 H, H-8).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ [ppm] = 153.3 (C-4/5), 148.6 (C-5/4), 147.5 (C-7, 2), 131.6 (C-1), 112.3 (C-6), 107.7 (C-3), 56.7 (OMe), 56.6 (OMe), 15.8 (C-8). **IR**:  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3099, 2847, 1573, 1517, 1217, 954, 754, 621, 520. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): Das Molekül konnte nicht im ESI oder EI gefunden werden.

### Synthese von 4,5-Dimethoxy-2-nitrophenylhydrazon 170

Unter Umgebungsatmosphäre wurden 1.03 g (4.88 mmol, 1.0 Äquiv.) 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzaldehyd in 50 mL Ethanol und 10 mL Tetrahydrofuran suspendiert und anschließend mit 0.84 mL (15 mmol, 0.88 g, 3.0 Äquiv.) konz. Essigsäure versetzt. Die Reaktionslösung wurde für zehn Minuten gerührt, mit 1.5 mL (24 mmol, 5.0 Äquiv.) einer Hydrazin Lösung (51 %, aq) versetzt und anschließend für dreißig Minuten zum Rückfluss erhitzt. Alle flüchtigen Bestandteile wurden im Membranpumpenvakuum entfernt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen, je zweimal mit ges. Natriumhydrogencarbonat- und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und erneut im Membranpumpenvakuum vom Lösungsmittel befreit. Eine weitere Reinigung war nicht nötig.



- 170 -  
 $C_9H_{11}N_3O_4$   
 225.20 g/mol

Ausbeute: Es wurden 0.84 g (3.7 mmol, 76%) eines gelben Feststoffs erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz) [CDCl<sub>3</sub>]:  $\delta$  [ppm] = 8.43 (s, 1 H, H-7), 7.57 (s, 1 H, H-3), 7.48 (s, 1 H, H-6), 5.83 (s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 3.99 (s, 3 H, H-8), 3.95 (s, 3 H, H-9). **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ [ppm] = 153.3 (C-4), 149.0 (C-5), 140.7 (C-2), 138.4 (C-7), 125.7 (C-1), 108.5 (C-6), 107.4 (C-3), 56.6 (C-8), 56.5 (C-9). **IR**:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3081, 2813, 1513, 1501, 1221, 967, 741, 631, 519. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): Das Molekül konnte nicht im ESI oder EI gefunden werden.

### Synthese von

#### Adenosin-3',5'-[O-(1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)ethoxy)cyclophosphat 46

Die Darstellung des *caged*-cAMPs erfolgte durch zwei verschiedene Synthesewege, welche nachfolgend beschrieben sind. Bei Variante A handelte es sich um die Darstellung ausgehend von protoniertem cyclischem Adenosinmonophosphat mit der *in-situ* erzeugten reaktiven Azoverbindung **135**. In Variante B wird das *caged*-cAMP durch die basische Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen aus dem Phosphattriester **146** gewonnen.

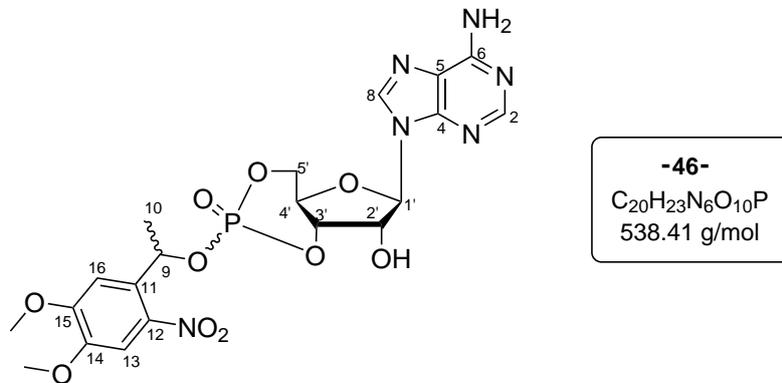
#### Variante A:

Unter Umgebungsatmosphäre wurden 114 mg (0.477 mmol, 1.0 Äquiv.) des Hydrazons **136** in 6 mL Chloroform gelöst und mit 449 mg (5.16 mmol, 10 Äquiv.) Mangandioxid versetzt. Die sich sofort rotfärbende Lösung wurde für zehn Minuten bei Raumtemperatur gerührt, bevor der Überstand der Lösung vorsichtig abgenommen wurde und über eine kleine Stück Watte filtiert wurde. Das Filtrat wurde mit 4 mL DMSO verdünnt und das Chloroform anschließend im Ölpumpenvakuum entfernt (Hinweis: Azoverbindungen niemals bis zur Trockne einengen). Nach vollständigem Entfernen des Chloroforms wurden 100 mg (0.374 mmol, 0.6 Äquiv.) cyclisches Adenosinmonophosphat in der freien Säureform zugegeben und der Reaktionsansatz für drei Tage unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Das erhaltene farblose Öl wurde mittels automatischer RP-Säulenchromatographie gereinigt und anschließend durch Gefriertrocknung vom Lösungsmittel befreit. Ausbeute: Es wurden 131 mg (0.243 mmol, 65%) eines gelben Feststoffs als Gemisch von vier Diastereomeren im Verhältnis von 0.5/0.1/1.0/1.0 er-

halten (ermittelt im  $^{31}\text{P}$ -NMR).

**Variante B:**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 35 mg (0.04 mmol, 1.0 Äquiv.) des doppelt Fmoc-geschützten Phosphatriester **146** in 10 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 55  $\mu\text{L}$  (40 mg, 0.40 mmol, 10 Äquiv.) abs. Triethylamin versetzt. Nach 18 Stunden konnte dünnschichtchromatographisch ein vollständiger Umsatz beobachtet werden. Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum entfernt und der erhaltene Rückstand wurde mittels automatischer RP-Säulenchromatographie gereinigt und anschließend durch Gefriertrocknung vom Lösungsmittel befreit.



Ausbeute: Es wurden 17 mg (32  $\mu\text{mol}$ , 80%) eines gelben Feststoffs als Gemisch von vier Diastereomeren im Verhältnis von 0.5/0.3/1.0/0.6 erhalten (ermittelt im  $^{31}\text{P}$ -NMR).

Aufgrund des komplizierten Diastereomerengemisches und wegen überlagernden Signalen war es im  $^1\text{H}$ -NMR nicht möglich jedes Signal exakt mit einem passendem Integral einem Atom zuzuordnen. Es war darüberhinaus auch nicht möglich sinnvolle Integrale zu bestimmen, wodurch nur eine Auflistung der Signale ohne Integrale erfolgt. Eine Aufspaltung der Signale in vier Diastereomere konnte jedoch sehr gut im  $^{31}\text{P}$ -NMR und im  $^1\text{H}$ -NMR bei den Signalen der Methylgruppe mit der Nummer 10 beobachtet werden. Eine Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ -Signale konnte aufgrund der zu geringen Signalintensität nur durch das HSQC-Spektrum erfolgen.

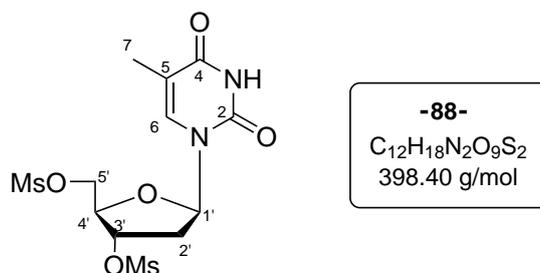
**$^1\text{H}$ -NMR** (600 MHz) [ $\text{DMSO}-d_6$ ]:  $\delta$  [ppm] = 8.37, 8.34, 8.30, 8.29 (s, H-8), 8.16, 8.11,

(s, H-2), 7.61, 7.51, 7.33, 7.32 (s, H-13/16), 6.34 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 4.8$  Hz, H-1'), 6.30–6.26 (m, H-1'), 6.12–6.06 (m, H-9), 5.41–5.37 (m, H-2'), 5.29–5.23, 5.14–5.10, 4.94–4.90, 4.83–4.80, 4.75–4.54, 4.26–4.07 (m, Ribose), 3.91–3.86 (m, OMe), 1.81 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$  Hz, H-10), 1.78 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$  Hz, H-10), 1.70 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 4.8$  Hz, H-10), 1.37 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 4.6$  Hz, H-10).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (150 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$ [ppm] = 151.9 (C-2), 140.8 (C-8), 110.2, 108.8 (C-13/16), 92.7 (C-1'), 79.2, 79.2, 77.6, 77.5, 71.9, 71.1, 69.9, 68.2 (Ribose), 56.7 (m, OMe), 25.8, 24.0 (C-10).  **$^{31}\text{P-NMR}$**  (242 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$ [ppm] = -3.95, -4.11, -5.90, -6.21. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 539.1292 [M+H]<sup>+</sup>, gef: 539.1298 [M+H]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.15 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1 v/v).

### 6.3.4 Synthese von Bis-NV-caged-d4T-Triphosphat 96

#### Synthese von 3',5'-Di-O-mesylthymidin 88

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 11.4 g (47.1 mmol, 1.0 Äquiv.) Thymidin in 40 mL abs. Pyridin suspendiert, auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit 9.8 mL (15 g, 0.13 mol, 2.7 Äquiv.) Methansulfonylchlorid versetzt. Die Suspension wurde für dreißig Minuten bei 0 °C und anschließend für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltene klare Lösung wurde auf 200 mL Eiswasser gegossen und für dreißig Minuten hydrolysiert. Der ausgefallene Niederschlag wurde durch Filtration abgetrennt und anschließend aus Aceton umkristallisiert.



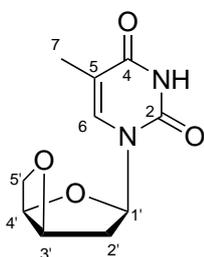
Ausbeute: Es wurden 15.9 g (40.0 mmol, 85%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz) [ $\text{DMSO-}d_6$ ]:  $\delta$  [ppm] = 11.41 (s, 1 H, NH), 7.51 (d,  $^4J_{\text{H,H}} = 1.1$  Hz, 1 H, H-6), 6.22 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$  Hz, 1 H, H-1'), 5.30 (q,  $^3J_{\text{H,H}} = 4.7$  Hz, 1 H, H-3'), 4.51–4.41 (m, 2 H, H-5'), 4.40–4.34 (m, 1 H, H-4'), 3.32 (s, 3 H, Mesyl), 3.25 (s, 3 H, Mesyl),

2.55–2.50 (m, 2 H, H-2'), 1.79 (d,  $^4J_{\text{H,H}} = 1.2$  Hz, 3 H, H-7).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$ [ppm] = 163.6 (C-4), 150.4 (C-2), 135.8 (C-6), 110.1 (C-5), 84.0 (C-1'), 80.5 (C-4'), 79.4 (C-3'), 68.5 (C-5'), 37.7 (Mesityl), 36.8 (Mesityl), 36.0 (C-2'), 12.0 (C-7). **IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3166, 2936, 1718, 1688, 1354, 1167, 1092, 984, 958, 935, 912, 837, 822, 774, 690, 522. **HRMS** (ESI $^+$ , m/z): ber: 399.0531 [M+H] $^+$ , gef: 399.0521 [M+H] $^+$ .

### Synthese von 3',5'-Anhydrothymidin **89**

Es wurden 4.75 g (119 mmol, 3.0 Äquiv.) Natriumhydroxid in 100 mL demi. Wasser gelöst und portionsweise mit 15.8 g (39.6 mmol, 1.0 Äquiv.) 3',5'-Di-*O*-mesylthymidin **88** versetzt und für zwei Stunden zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der pH-Wert durch Zugabe von konz. Salzsäure auf circa pH 5 eingestellt. Circa die Hälfte des Wassers wurde unter vermindertem Druck entfernt und die erhaltene Suspension wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden anschließend mit ges. Natriumchloridlösung gewaschen über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Eine weitere Reinigung war nicht nötig.



**-89-**

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$   
224.22 g/mol

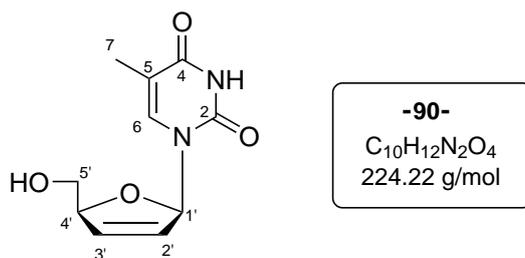
Ausbeute: Es wurden 7.74 g (34.5 mmol, 87%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz) [DMSO- $d_6$ ]:  $\delta$  [ppm] = 11.35 (s, 1 H, NH), 8.02 (d,  $^4J_{\text{H,H}} = 1.2$  Hz, 1 H, H-6), 6.54–6.48 (m, 1 H, H-1'), 5.53–5.44 (m, 1 H, H-3'), 4.90 (dt,  $^3J_{\text{H,H}} = 4.1$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 2.0$  Hz, 1 H, H-4'), 4.69 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.1$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 4.1$  Hz, 1 H, H-5'a), 4.03 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.1$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 1.5$  Hz, 1 H, H-5'b), 2.49–2.45 (m, 2 H, H-2'), 1.79 (d,  $^4J_{\text{H,H}} = 1.2$  Hz, 3 H, H-7).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$ [ppm] = 163.7 (C-4), 151.2 (C-2), 136.7 (C-6), 109.7 (C-5), 88.4 (C-1'), 87.0 (C-3'), 79.9 (C-4'), 75.2 (C-5'), 37.2 (C-2'), 12.4 (C-7). **IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3164, 3040, 2876, 2819, 1678, 1464, 1419, 1269, 1088,

985, 968, 856, 757, 684, 555, 486, 423. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 247.0695 [M+Na]<sup>+</sup>, gef: 247.0691 [M+Na]<sup>+</sup>.

### Synthese von 3'-Desoxy-2',3'-dihydrothymidin (d4T) **90**

Es wurden 7.54 g (33.6 mmol, 1.0 Äquiv.) 3',5'-Anhydrothymidin **89** in 200 mL *tert*-Butanol gelöst und auf 65 °C erwärmt. Zu der warmen Lösung wurden portionsweise 7.55 g (135 mmol, 4.0 Äquiv.) Kaliumhydroxid zugegeben und für drei Stunden bei 65 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 60 mL Methanol zugegeben und der pH-Wert durch Zugabe von konz. Salzsäure auf pH 5 eingestellt. Der gebildete Feststoff wurde durch Filtration entfernt und das Filtrat im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene gelbe Rückstand wurde auf *dry-load*-Kieselgel aufgetragen und säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Gradient: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 nach CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v).

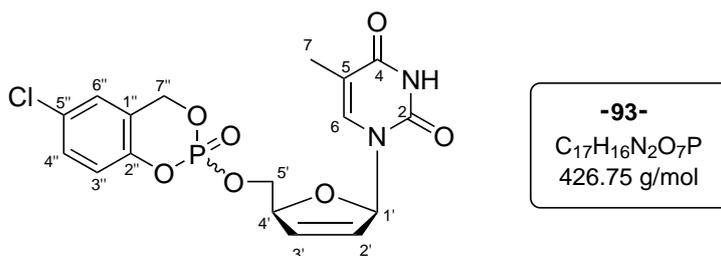


Ausbeute: Es wurden 4.35 g (19.4 mmol, 58%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz) [DMSO-*d*<sub>6</sub>]: δ [ppm] = 11.29 (s, 1 H, NH), 7.64 (d, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.2 Hz, 1 H, H-6), 6.82 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.4 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.7 Hz, 1 H, H-1'), 6.39 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.7 Hz, 1 H, H-3'), 5.91 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.4 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.4 Hz, 1 H, H-2'), 5.01 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.1 Hz, 1 H, H-OH), 4.80–4.73 (m, 1 H, H-4'), 3.64–3.56 (m, 2 H, H-5'), 1.72 (d, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.2 Hz, 3 H, H-7). **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 163.9 (C-4), 150.8 (C-2), 136.8 (C-6), 134.8 (C-3'), 126.0 (C-2'), 109.0 (C-5), 88.9 (C-1'), 87.3 (C-4'), 62.3 (C-5'), 12.2 (C-7). **IR**:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3447, 3152, 3095, 2931, 2822, 1681, 1455, 1342, 1285, 1251, 1225, 1141, 1113, 1071, 974, 902, 877, 779, 742, 660, 644, 580, 427. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 247.0689 [M+Na]<sup>+</sup>, gef: 247.0692 [M+Na]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.48 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v).

### Synthese von 5-Chlor-cycloSal-d4TMP-Triester **93**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 0.30 g (1.3 mmol, 1.0 Äquiv.) d4T **90** in 15 mL abs. Acetonitril suspendiert und mit 0.33 mL (1.8 mmol, 1.3 Äquiv.) Diisopropylethylamin versetzt und auf 0 °C gekühlt. Zu der Suspension wurden 2.6 mL (3.4 mmol, 2.5 Äquiv.) einer 1.3 M 5-Chlorsaligenylchlorphosphit-Lösung zugetropft und die Reaktionslösung anschließend für drei Stunden bei 0 °C gerührt. Es wurden 0.54 mL (2.9 mmol, 2.2 Äquiv.) einer *tert*-Butylhydroperoxid-Lösung (5.5 M in *n*-Decan) zugegeben und für weitere zwanzig Minuten bei 0 °C gerührt. Anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt, der Rückstand in 50 mL Dichlormethan suspendiert, mit einer 1 M Ammoniumacetat Lösung gewaschen und abschließend über Natriumsulfat getrocknet. Eine weitere Reinigung konnte nicht durchgeführt werden, da beobachtet wurde das sich das Produkt bereits auf der DC-Platte zersetzte. Das Produkt wurde für die weitere Reaktion verunreinigt eingesetzt.

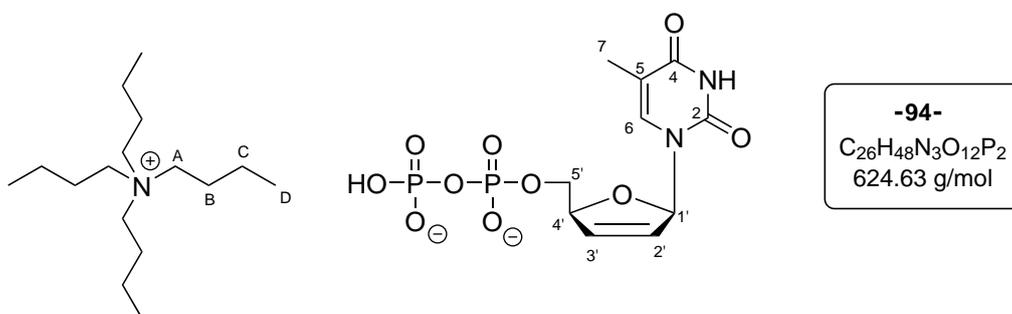


Ausbeute: Es wurden 0.94 g (Rohausbeute: 165 %) eines verunreinigten gelben Feststoffes in Form von zwei Diastereomeren (Verhältnis: 1:1) erhalten. Aufgrund der Verunreinigungen konnten die Signale im  $^{13}C$ -NMR nicht zugeordnet werden.

$^1H$ -NMR (400 MHz) [ $CDCl_3$ ]:  $\delta$  [ppm] = 8.33 (s, 1 H, H-NH), 7.31–7.27 (m, 1 H, H-4''), 7.21–7.19 (m, 1 H, H-6), 7.12–7.09 (m, 1 H, H-6''), 7.03–6.95 (m, 2 H, H-3'', 1'), 6.40–6.33 (m, 1 H, H-3'), 5.97–5.92 (m, 1 H, H-2'), 5.42–5.18 (m, 2 H, H-7''), 5.04–4.99 (m, 1 H, H-4'), 4.41–4.36 (m, 2 H, H-5'), 1.83, 1.74 (d,  $^3J_{H,H} = 1.2$  Hz, 3 H, H-7, ds).  $^{31}P$ -NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$ [ppm] = –8.97, –9.00. IR:  $\tilde{\nu}$  [ $cm^{-1}$ ] = 3180, 3067, 2978, 1685, 1479, 1244, 1186, 1171, 1111, 1085, 1027, 992, 944, 869, 781, 572, 421. HRMS (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 449.0281 [ $M+Na$ ]<sup>+</sup>, gef: 449.0258 [ $M+Na$ ]<sup>+</sup>.

### Synthese von 3'-Desoxy-2',3'-dihydrothymidindiphosphat (d4TDP) **94**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 0.295 g (0.691 mmol, 1.0 Äquiv.) des Phosphat-triesters **93** in 20 mL abs. *N,N*-Dimethylformamid gelöst und unter Rühren mit 4.3 mL (1.7 mmol, 2.5 Äquiv.) einer Tetrabutylammoniumphosphat (0.4 M in Acetonitril) versetzt. Die erhaltene Reaktionslösung wurde für zwanzig Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Ölpumpenvakuum vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand wurde in einem Gemisch aus Wasser und Ethylacetat aufgenommen und die Phasen mit Hilfe einer Zentrifuge getrennt. Die wässrige Phase wurde abgenommen und durch Gefriertrocknung getrocknet. Der erhaltene Rückstand wurde mittels automatischer RP-Säulenchromatographie gereinigt und die entsprechende Fraktion anschließend durch Gefriertrocknung vom Lösungsmittel befreit.



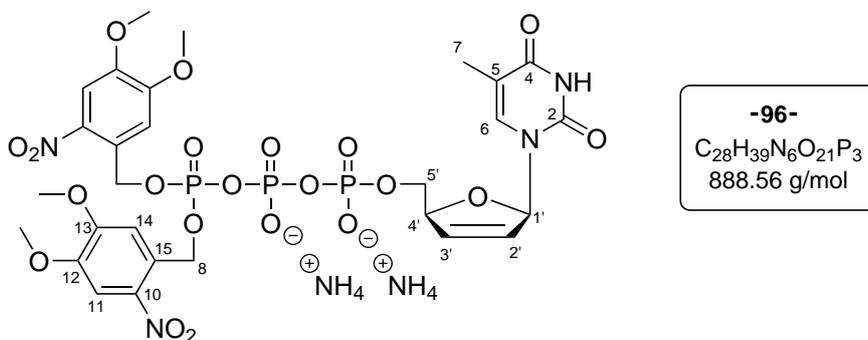
Ausbeute: Es wurden 55 mg (57  $\mu$ mol, 8%) eines farblosen Feststoffs erhalten. Die Anzahl der Gegenionen wurde im  $^1\text{H-NMR}$  bestimmt und beträgt 2.4.

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz) [ $\text{D}_2\text{O}$ ]:  $\delta$  [ppm] = 7.62–7.59 (m, 1 H, H-6), 6.93 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 3.2$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 1.7$  Hz, 1 H, H-1'), 6.53–6.48 (m, 1 H, H-3'), 5.93 (dt,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 2.0$  Hz, 1 H, H-2'), 5.10–5.04 (m, 1 H, H-4'), 4.11 (dt,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.2$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 3.3$  Hz, 2 H, H-5'), 3.25–3.05 (m, 16 H, H-A), 1.86 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 1.3$  Hz, 3 H, H-7), 1.73–1.49 (m, 16 H, H-B), 1.22 (sext,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$  Hz, 16 H, H-C), 0.91 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz, 24 H, H-D).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 166.8 (C-4), 152.2 (C-2), 138.1 (C-6), 134.2 (C-3'), 125.1 (C-2'), 111.2 (C-5), 89.8 (C-1'), 85.8 (d,  $^3J_{\text{C,P}} = 8.5$  Hz, C-4'), 66.2 (d,  $^2J_{\text{H,H}} = 5.6$  Hz, C-5'), 58.0 (C-A), 23.0 (C-B), 19.0 (C-C), 12.8 (C-D), 11.4 (C-7).  **$^{31}\text{P-NMR}$**  (162 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = -8.32 (d,  $^2J_{\text{P,P}} = 21.7$  Hz, P- $\alpha$ ), -11.23 (d,  $^2J_{\text{P,P}} = 21.7$  Hz, P- $\beta$ ). **IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3333, 3220, 2971, 2929, 1705, 1688, 1645, 1622, 1498, 1486, 1439, 1314, 1297, 1169,

1099, 1039, 938, 851, 784, 691, 638, 535. **HRMS** (ESI<sup>-</sup>, m/z): ber: 383.0051 [M]<sup>-</sup>, gef: 383.0039 [M]<sup>-</sup>.

### Synthese von $\gamma$ -Bis(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl)-d4TTP **96**

unter Stickstoff als Inertgas wurden 55 mg (57  $\mu$ mol, 1.0 Äquiv.) d4TDP **94** in 1.5 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 48 mg (86  $\mu$ mol, 1.5 Äquiv.) Bis(4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl)-diisopropylphosphoramidit **69** versetzt. Zu der Lösung wurden 0.11 mL (28  $\mu$ mol, 0.5 Äquiv.) einer DCI-Aktivatorlösung (0.25 M, in Acetonitril) zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wurde die Lösung für fünf Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden dreimal zusätzliche 0.25 Äquiv. DCI-Aktivatorlösung zugegeben und zwischen den Zugaben immer fünf Minuten gewartet. Nach vollständiger Zugabe von insgesamt 1.25 Äquiv. DCI-Aktivator-Lösung wurde die Reaktionslösung für weitere dreißig Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf  $-10$  °C gekühlt. Es wurden 16  $\mu$ L (86  $\mu$ mol, 1.5 Äquiv.) einer *tert*-Butylhydroperoxid-Lösung (5.5 M, in *n*-Decan) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für dreißig Minuten bei  $-10$  °C gerührt und anschließend im Vakuum von allen flüchtigen Bestandteilen befreit. Der erhaltene Rückstand wurde mittels automatischer RP-Säulenchromatographie gereinigt, gefriergetrocknet, mit einem DOWEX-Ionenaustauscher auf Ammoniumgegenionen umgesalzen und erneut durch automatischer RP-Säulenchromatographie gereinigt.



Ausbeute: Es wurden 31 mg (35  $\mu$ mol, 61%) eines braunen Feststoffs erhalten. Aufgrund der geringen Signalintensität konnten die <sup>13</sup>C-Signale nur mit Hilfe des HSQC Spektrums zugeordnet werden.

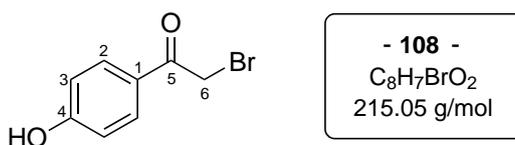
**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz) [MeOH-*d*<sub>4</sub>]:  $\delta$  [ppm] = 7.65 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 0.9 Hz, 1 H, H-6), 7.65 (s,

2 H, H-11), 7.40–7.37 (m, 2 H, H-14), 6.53 (dt,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.1 \text{ Hz}$ ,  $^4J_{\text{H,H}} = 1.7 \text{ Hz}$ , 1 H, H-1'), 5.9 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.1 \text{ Hz}$ ,  $^4J_{\text{H,H}} = 1.4 \text{ Hz}$ , 1 H, H-2'), 5.87–5.83 (m, 1 H, H-3'), 5.48 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.9 \text{ Hz}$ , 4 H, H-8), 4.23–4.06 (m, 2 H, H-5'), 3.96–3.73 (m, 13 H, OMe, 4'), 1.23–1.18 (m, 3 H, H-7).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (150 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta[\text{ppm}] = 136.6$  (C-6), 134.7 (C-3'), 125.6 (C-2'), 110.6 (C-14/11), 107.1 (C-14/11), 86.5 (C-1'), 85.3 (C-4'), 67.0 (C-5'), 66.5 (C-8), 56.1 (OMe), 48.5 (C-7).  **$^{31}\text{P-NMR}$**  (242 MHz, MeOH- $d_4$ ):  $\delta[\text{ppm}] = -11.8$  (d,  $^2J_{\text{P,P}} = 20.5 \text{ Hz}$ , P- $\alpha$ ),  $-13.3$  (d,  $^2J_{\text{P,P}} = 17.5 \text{ Hz}$ , P- $\gamma$ ),  $-23.5$  -  $-23.9$  (m, P- $\beta$ ). **IR**:  $\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 3184, 3018, 2840, 2230, 1683, 1579, 1519, 1455, 1434, 1326, 1273, 1102, 1018, 983, 906, 871, 754$ . **HRMS** (ESI $^-$ , m/z): ber: 853.0777 [M] $^-$ , gef: 853.0704 [M] $^-$ .

### 6.3.5 Synthesen im Rahmen der pHP-Photoschutzgruppe

#### Synthese von 2-Brom-1-(4-Hydroxyphenyl)ethan-1-on 108

Unter Normalatmosphäre wurden 3.01 g (22.0 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-Hydroxyacetophenon in 30 mL Chloroform gelöst, auf 0 °C gekühlt und tropfenweise bei dieser Temperatur über einen Zeitraum von 1.5 h mit 1.24 mL (3.87 g, 24.2 mmol, 1.1 Äquiv.) Brom, gelöst in 15 mL Chloroform, versetzt. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktionslösung für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt, der entstandene Feststoff durch Filtration entfernt, der Filterkuchen mit Chloroform gewaschen und die vereinigten organischen Phasen wurden je zweimal mit ges. Natriumthiosulfat-, Natriumhydrogencarbonat- und Natriumchloridlösung gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Membranpumpenvakuum entfernt und der erhaltene Feststoff wurde ohne weitere Reinigung verwendet.



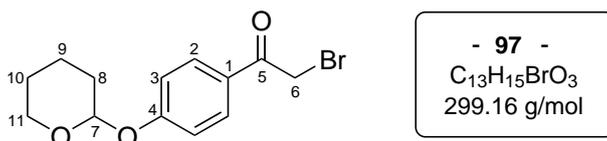
Ausbeute: Es wurden 3.47 g (16.2 mmol, 73%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz) [MeCN- $d_3$ ]:  $\delta [\text{ppm}] = 7.91$ – $7.87$  (m, 2 H, H-2), 7.77 (s, 1 H, OH), 6.93–6.89 (m, 2 H, H-3), 4.56 (s, 2 H, H-6).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz, MeCN- $d_3$ ):  $\delta[\text{ppm}] = 190.96$  (C-5), 163.0 (C-4), 132.4 (C-2), 127.5 (C-1), 116.4 (C-3), 33.4 (C-6). **IR**:  $\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}]$

= 3328, 3259, 3059, 2989, 2934, 1675, 1658, 1571, 1512, 1317, 1280, 1221, 1194, 1171, 989, 835, 809, 680, 633, 588, 490. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 214.9708 [M+H]<sup>+</sup>, gef: 214.9710 [M+H]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.67 (EE).

### Synthese von 2-Brom-1-(4-(O-THP)phenyl)ethan1-on **97**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 2.97 g (13.8 mmol, 1.0 Äquiv.) der bromierten Acetophenon-Verbindung **108** in 20 mL abs. Dichlormethan suspendiert und mit 1.90 mL (1.8 g, 20.9 mmol, 1.5 Äquiv.) Dihydropyran und einer katalytischen Menge Pyridinium-*p*-toluolsulfonat (PPTS) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend je zweimal mit 1 M Natronlauge und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene gelbe Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 3:1).



Ausbeute: Es wurden 3.63 g (12.1 mmol, 88%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

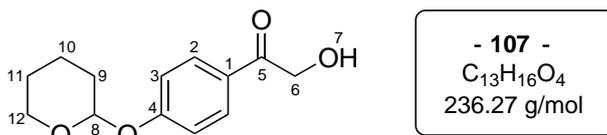
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz) [MeCN-*d*<sub>3</sub>]:  $\delta$  [ppm] = 7.97–7.93 (m, 2 H, H-2), 7.14–7.11 (m, 2 H, H-3), 5.57 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 3.3 Hz, 1 H, H-7), 4.58 (s, 2 H, H-6), 3.82–3.76 (m, 1 H, H-11), 3.62–3.56 (m, 1 H, H-11'), 1.91–1.53 (m, 6 H, H-8-10). **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, MeCN-*d*<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 190.2 (C-5), 162.5 (C-4), 132.0 (C-2), 128.7 (C-1), 117.3 (C-3), 97.2 (C-7), 63.0 (C-11), 33.4 (C-6), 30.8, 25.8, 19.5 (C-8-10). **IR**:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2999, 2974, 2943, 2905, 2887, 1926, 1684, 1595, 1507, 1391, 1248, 1202, 1167, 1111, 1021, 949, 917, 867. **HRMS**: Die Verbindung konnte aufgrund der Säurelabilität der THP-Schutzgruppe nicht im Massenspektrum gefunden werden. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.64 (PE/EE 3:1 v/v).

### Synthese von 2-Hydroxy-1-(4-(O-THP)phenyl)ethan1-on **107**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 4.24 g (22.1 mmol, 3.0 Äquiv.) trockenes Cäsiumformiat in 50 mL abs. Methanol suspendiert und mit 2.20 g (7.35 mmol, 1.0 Äquiv.) der THP

geschützten Verbindung **97** versetzt. Der Reaktionsansatz wurde für zwei Stunden zum Rückfluss erhitzt. Ein vollständiger Umsatz konnte dünnschichtchromatographisch festgestellt werden ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Nach dem Abkühlen wurde der Reaktionsansatz mit Ethylacetat verdünnt, mit Wasser und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  99:1).

**Anmerkung:** Die zuvor durchgeführte THP-Schützung des Acetophenon-Derivats **97** und die hier durchgeführte Hydroxylierung können auch im *one-pot*-Verfahren erfolgen. Dazu wird wie zuvor beschrieben die THP-Schützung durchgeführt und nach einem vollständigem Umsatz das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt und der erhaltene Rückstand in abs. Methanol aufgenommen. Es erfolgt die Zugabe des Cäsiumformiats und das Erhitzen zum Rückfluss. Die Reinigung erfolgt Äquivalent zur schrittweisen Darstellung der Verbindung.

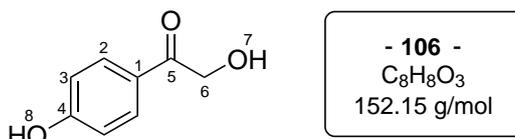


Ausbeute: Es wurden 1.57 g (6.64 mmol, 90%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz) [ $\text{DMSO-}d_6$ ]:  $\delta$  [ppm] = 7.91–7.88 (m, 2 H, H-2), 7.13–7.10 (m, 2 H, H-3), 5.62 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 3.3$  Hz, 1 H, H-8), 4.96 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 5.8$  Hz, 1 H, H-7), 4.73 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 5.8$  Hz, 2 H, H-6), 3.73–3.69 (m, 1 H, H-12), 3.59–3.55 (m, 1 H, H-12'), 1.91–1.50 (m, 6 H, H-9-11).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (150 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$ [ppm] = 197.0 (C-5), 160.0 (C-4), 127.6 (C-1), 129.2 (C-2), 95.0 (C-8), 64.5 (C-6), 29.7, 24.1, 17.9 (C-9-11). **IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3426, 2941, 2874, 2849, 1675, 1599, 1508, 1423, 1356, 1228, 1200, 11723, 1106, 1036, 951, 916, 819, 637, 561. **HRMS:** Die Verbindung konnte aufgrund der Säurelabilität der THP-Schutzgruppe nicht im Massenspektrum gefunden werden.  **$R_f$ -Wert:** 0.28 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  99:1 v/v).

### Synthese von 2-Hydroxy-1-(4-hydroxyphenyl)ethan-1-on **106**

Unter Umgebungsatmosphäre wurden 5.24 g (22.2 mmol, 1.0 Äquiv.) der THP-Verbindung **107** in 100 mL Methanol gelöst und mit einer katalytischen Menge PPTS für zwei Tage im Dunkeln gerührt. Anschließend wurde *dry-load*-Kieselgel zugegeben, alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und der erhaltene Rückstand somit auf Kieselgel aufrotiert. Die Reinigung erfolgte anschließend säulenchromatographisch an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 30:1).



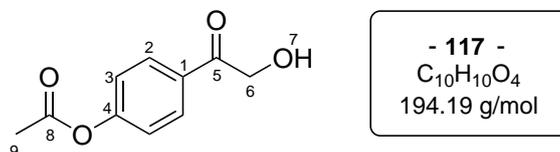
Ausbeute: Es wurden 2.99 g (19.7 mmol, 86%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz) [DMSO-*d*<sub>6</sub>]: δ [ppm] = 10.4 (s, 1 H, H-8), 7.83–7.79 (m, 2 H, H-2), 6.86–6.83 (m, 2 H, H-3), 4.88 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.7 Hz, 1 H, H-7), 4.69 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.7 Hz, 2 H, H-6). **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 197.1 (C-5), 162.2 (C-4), 130.1 (C-2), 126.0 (C-1), 115.7 (C-3), 64.8 (C-6). **IR**:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3411, 3236, 3038, 2866, 1906, 1670, 1603, 1590, 1517, 1444, 1258, 1223, 1166, 1114, 974, 929, 792, 686, 562, 520. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 153.0552 [M+H]<sup>+</sup>, gef: 153.0521 [M+H]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.25 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 30:1 v/v).

### Synthese von 2-Hydroxy-1-(4-acyloxyphenyl)ethan-1-on **117**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 0.95 g (6.2 mmol, 1.0 Äquiv.) des Phenols **106** in 25 mL abs. Tetrahydrofuran gelöst, auf –30 °C gekühlt, mit einer katalytischen Menge DMAP versetzt und anschließend tropfenweise mit 0.60 mL (0.65 g, 6.2 mmol, 1.0 Äquiv.) Essigsäureanhydrid versetzt. Der Reaktionsansatz wurde für zwei Stunden bei –30 °C gerührt und trotz eines nicht vollständigen Umsatzes (DC-Kontrolle CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 30:1) wurde die Reaktion durch die Zugabe von Wasser und Ethylacetat beendet. Die erhaltenen Phasen wurden anschließend getrennt und die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. Natriumhydrogencarbonat- und Natriumchlorid-Lösung gewaschen und abschließend über Natriumsulfat getrocknet.

Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99:1).

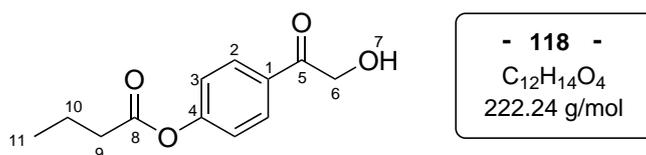


Ausbeute: Es wurden 0.85 g (4.5 mmol, 79%) eines farblosen Feststoffs erhalten. Des Weiteren konnte das zweifach veresterte Produkt in einer Ausbeute von 9% erhalten werden.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz) [DMSO-*d*<sub>6</sub>]: δ [ppm] = 8.00–7.97 (m, 2 H, H-2), 7.30–7.27 (m, 2 H, H-3), 5.11 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.9 Hz, 1 H, H-7), 4.79 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.9 Hz, 2 H, H-6), 2.30 (s, 3 H, H-9). **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 198.2 (C-5), 168.9 (C-8), 154.2 (C-4), 132.2 (C-1), 129.3 (C-2), 122.3 (C-3), 65.3 (C-6), 20.9 (C-9). **IR**:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3420, 3371, 3064, 2933, 1748, 1679, 1598, 1506, 1417, 1298, 1196, 1103, 1015, 977, 915, 851, 813, 722, 594, 407. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): ber: 195.0657 [M+H]<sup>+</sup>, gef: 195.0651 [M+H]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.24 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99:1 v/v).

### Synthese von 2-Hydroxy-1-(4-butoxyphenyl)ethan-1-on 118

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.60 g (10.5 mmol, 1.0 Äquiv.) des Phenols **106** in 30 mL abs. Tetrahydrofuran gelöst, auf –30 °C gekühlt, mit einer katalytischen Menge DMAP versetzt und anschließend tropfenweise mit 1.70 mL (1.6 g, 10.5 mmol, 1.0 Äquiv.) Buttersäureanhydrid versetzt. Der Reaktionsansatz wurde für zwei Stunden bei –30 °C gerührt und trotz eines nicht vollständigen Umsatzes (DC-Kontrolle CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 30:1) wurde die Reaktion durch die Zugabe von Wasser und Ethylacetat beendet. Die Phasen wurden anschließend getrennt, die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. Natriumhydrogencarbonat- und Natriumchlorid-Lösung gewaschen und abschließend über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99:1).

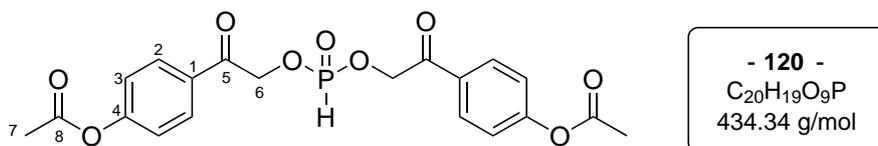


Ausbeute: Es wurden 1.51 g (6.78 mmol, 65%) eines farblosen Feststoffs erhalten. Des Weiteren konnte das zweifach veresterte Produkt in einer Ausbeute von 11% erhalten werden.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz) [MeCN-*d*<sub>3</sub>]:  $\delta$  [ppm] = 8.01–7.94 (m, 2 H, H-2), 7.27–7.20 (m, 2 H, H-3), 4.83 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.3 Hz, 2 H, H-6), 3.41 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.3 Hz, 1 H, H-7), 2.57 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, 3 H, H-9), 1.73 (qui, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, 2 H, H-10), 1.01 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.5 Hz, 3 H, H-11). **<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, MeCN-*d*<sub>3</sub>):  $\delta$ [ppm] = 198.9 (C-5), 172.7 (C-8), 156.1 (C-4), 132.6 (C-1), 130.3 (C-2), 123.4 (C-3), 66.4 (C-6), 36.6 (C-8), 19.0 (C-10), 13.8 (C-11). **IR**:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3428, 3365, 3185, 2955, 2869, 2851, 1753, 1680, 1599, 1465, 1419, 1376, 1303, 1233, 1155, 1108, 981, 844, 568. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): ber: 223.0970 [M+H]<sup>+</sup>, gef: 223.0619 [M+H]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.40 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 99:1 v/v).

### Synthese von Bis-(2-(4-acyloxyphenyl)ethan-1-on)phosphonat 120

Die Synthese wurde nach AAV-3 durchgeführt. Es wurden 0.48 g (2.5 mmol, 2.1 Äquiv.) des acetylierten Alkohols **117** in 10 mL abs. Pyridin gelöst und tropfenweise mit 0.23 mL Diphenylphosphit (0.21 g, 1.2 mmol, 1.0 Äquiv.) versetzt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 3:1 + 0.5% Essigsäure v/v). Es wurde ein farblos-er Feststoff erhalten.



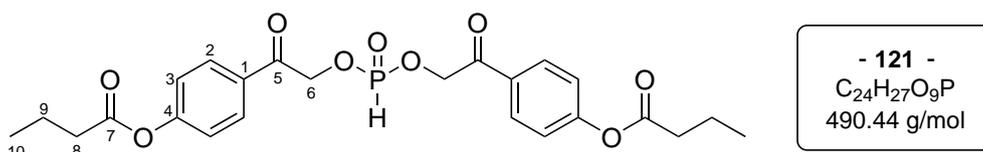
Ausbeute: Es wurden 0.11 g (0.25 mmol, 21%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz) [CDCl<sub>3</sub>]:  $\delta$  [ppm] = 8.00–7.91 (m, 4 H, H-2), 7.54 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 759 Hz, 1 H, P-H), 7.29–7.20 (m, 4 H, H-3), 5.62–5.30 (m, 4 H, H-6), 2.33 (s, 6 H, H-8). **<sup>13</sup>C-NMR**

(100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ [ppm] = 197.8 (C-5), 168.0 (C-7), 154.6 (C-4), 129.1 (C-2), 128.9 (C-1), 121.7 (C-3), 67.0 (C-6), 19.9 (C-8).  **$^{31}\text{P-NMR}$**  (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ [ppm] = 8.7. **IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3425, 2926, 2853, 2484, 1753, 1685, 1597, 1369, 1233, 1189, 1163, 1013, 981, 954, 912, 850, 673, 586, 512. **HRMS** ( $\text{ESI}^+$ , m/z): ber: 457.0664  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , gef: 457.0651  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .  **$R_f$ -Wert:** 0.20 (PE/EE 3:1 v/v).

### Synthese von Bis-(2-(4-butanoyloxyphenyl)ethan-1-on)phosphonat 121

Die Synthese wurde nach AAV-3 durchgeführt. Es wurden 0.48 g (2.2 mmol, 2.1 Äquiv.) des Alkohols **117** in 10 mL abs. Pyridin gelöst und tropfenweise mit 0.29 mL (0.35 g, 1.1 mmol, 1.0 Äquiv.) Diphenylphosphit versetzt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 1:1 + 0.5 % Essigsäure nach PE/EE 1:2 + 0.5 % Essigsäure).



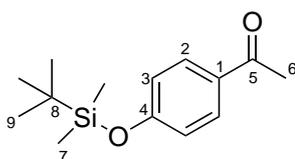
Ausbeute: Es wurden 0.14 g (0.25 mmol, 23%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz) [ $\text{CDCl}_3$ ]:  $\delta$  [ppm] = 7.96–7.92 (m, 4 H, H-2), 7.50 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 758$  Hz, 1 H, P-H), 7.25–7.21 (m, 4 H, H-3), 5.57–5.40 (m, 4 H, H-6), 2.57 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz, 4 H, H-8), 1.79 (qui,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$  Hz, 4 H, H-9), 1.05 (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$  Hz, 6 H, H-10).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ [ppm] = 191.7 (C-5), 171.5 (C-7), 155.4 (C-4), 131.1 (C-1), 129.5 (C-2), 122.4 (C-3), 68.2 (C-6), 36.3 (C-8), 18.5 (C-9), 13.4 (C-10).  **$^{31}\text{P-NMR}$**  (162 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ [ppm] = 8.8. **IR:**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2954, 2921, 2852, 1760, 1660, 1632, 1600, 1264, 1208, 1165, 1043, 976, 889, 846, 703. **HRMS** ( $\text{ESI}^+$ , m/z): ber: 491.1465  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , gef: 491.1425  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  **$R_f$ -Wert:** 0.35 (PE/EE 1:2 + 0.5 % Essigsäure v/v).

### Synthese von 1-(4-(*O*-TBDMS)phenyl)ethan-1-on 113

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 5.01 g (36.8 mmol, 1.0 Äquiv.) 4-Hydroxyacetophenon in 100 mL abs. Dichlormethan gelöst, mit 6.26 g (92.0 mmol, 2.5 Äquiv.) Imidazol versetzt und auf 0 °C gekühlt. Es wurden anschließend portionsweise 6.61 g (44.2 mmol,

1.2 Äquiv.) TBDMS-Chlorid zugegeben und nach vollständiger Zugabe für 15 Minuten bei 0 °C und anschließend für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden 100 mL Wasser zugegeben um die Reaktion zu beenden. Anschließend wurden die Phasen getrennt, die wässrige Phase mit Dichlormethan extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der erhaltene Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).



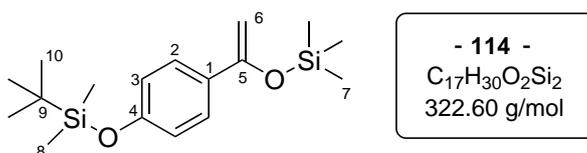
- 113 -  
C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>Si  
250.41 g/mol

Ausbeute: Es wurden 8.99 g (35.9 mmol, 98%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz) [CDCl<sub>3</sub>]: δ [ppm] = 7.90–7.86 (m, 2 H, H-2), 6.89–6.85 (m, 2 H, H-3), 2.55 (s, 3 H, H-6), 0.99 (s, 9 H, H-9), 0.23 (s, 6 H, H-7). **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 197.0 (C-5), 160.4 (C-4), 131.0 (C-1), 130.6 (C-2), 120.0 (C-3), 26.5 (C-6), 25.7 (C-9), 18.4 (C-8), –4.2 (C-7). **IR**:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2956, 2928, 2856, 1673, 1592, 1504, 1469, 1410, 1354, 1293, 1251, 1173, 1106, 1075, 959, 909, 779, 646, 589, 501. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 251.1467 [M+H]<sup>+</sup>, gef: 521.1470 [M+H]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.43 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

#### Synthese von *tert*-Butyl-dimethyl(4-(1-(*O*-TMS)vinyl)phenoxy)silan **114**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 2.4 mL (4.8 mmol, 1.2 Äquiv.) LDA-Lösung (2M in THF) mit 10 mL abs. Tetrahydrofuran verdünnt, auf –78 °C gekühlt und über 30 Minuten tropfenweise mit einer Lösung aus 1.0 g (4.0 mmol, 1.0 Äquiv.) des TBDMS-geschützten Acetophenon-Derivats **113**, gelöst in 2 mL abs. Tetrahydrofuran, versetzt. Nach vollständiger Zugabe und zusätzlichen zwanzig Minuten Rühren bei –78 °C wurden 0.63 mL (0.54 g, 4.8 mmol, 1.2 Äquiv.) TMS-Chlorid tropfenweise zugegeben. Die Reaktionslösung wurde anschließend für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Der gebildete Feststoff wurde durch eine Filtration unter Schutzgas entfernt, das Lösungsmittel des Filtrats unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Rückstand unter Stickstoff gelagert. Auf eine weitere Reinigung wurde aufgrund der Instabilität der Verbindung verzichtet.

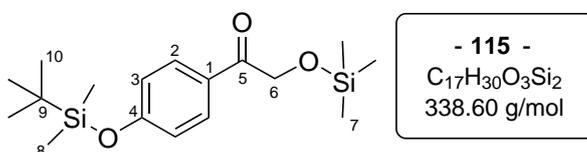


Ausbeute: Es wurden 1.28 g (3.96 mmol, 99%) eines gelben Öls erhalten, welches noch circa 5% Edukt enthält. Aufgrund der Instabilität wurde auf eine weitere Analytik neben der NMR-Spektroskopie verzichtet. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Verunreinigung durch das Edukt durch eine Zersetzung im NMR-Rohr erfolgte.

**$^1H$ -NMR** (400 MHz) [ $CDCl_3$ ]:  $\delta$  [ppm] = 7.47–7.44 (m, 2 H, H-2), 6.80–6.76 (m, 2 H, H-3), 4.78 (d,  $^3J_{H,H} = 1.6$  Hz, 1 H, H-6), 4.32 (d,  $^3J_{H,H} = 1.6$  Hz, 1 H, H-6'), 0.98 (s, 9 H, H-10), 0.26 (s, 9 H, H-7), 0.19 (s, 6 H, H-8).  **$^{13}C$ -NMR** (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$ [ppm] = 156.0 (C-4), 155.6 (C-5), 130.7 (C-1), 126.6 (C-2), 119.7 (C-3), 89.6 (C-6), 25.8 (C-10), 18.4 (C-9), 0.2 (C-7), –4.3 (C-8).

#### Syntheseversuch von 1-(4-(*O*-TBDMS)phenyl)-2-(*O*-TMS)ethan-1-on 115

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.26 g (3.92 mmol, 1.0 Äquiv.) des TMS-Enolethers **114** in 20 mL abs. Dichlormethan gelöst und mit 0.80 g (9.6 mmol, 2.5 Äquiv.) Natriumhydrogencarbonat versetzt. Anschließend wurden 1.14 g (4.31 mmol, 1.1 Äquiv.) *m*-Chlorperbenzoesäure (65% Reinheit) portionsweise zugegeben und die Reaktionslösung für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Zur Reinigung wurde die Reaktionslösung mit ges. Natriumhydrogencarbonat, und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wurde ein gelbes Öl erhalten und ein Roh-NMR angefertigt.

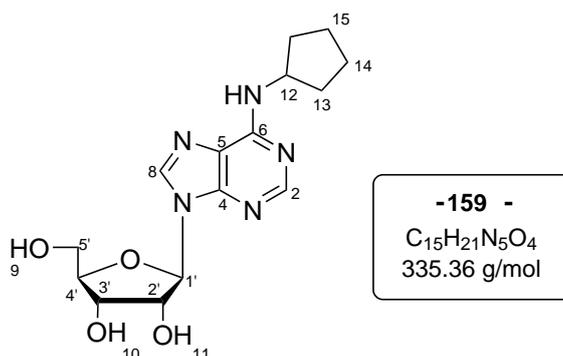


Ausbeute: Das gewünschte Produkt konnte nicht isoliert werden. Eine NMR-Charakterisierung des erhaltenen gelben Öls war nicht möglich.

### 6.3.6 Synthesen im Rahmen des 5'-caged-Adenosins

#### Synthese von N<sup>6</sup>-Cyclopentyladenosin 159

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.45 g (5.06 mmol, 1.0 Äquiv.) 6-Chloradenosin in 30 mL abs. Ethanol suspendiert, mit 1.50 mL (1.29 g, 15.2 mmol, 3.0 Äquiv.) Cyclopentylamin sowie 2.10 mL (1.54 g, 15.2 mmol, 3.0 Äquiv.) abs. Triethylamin versetzt und für drei Stunden zum Rückfluss erhitzt. Die erhaltene klare Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in einem Minimum Wasser aufgenommen und durch automatisierte RP<sub>18</sub>-Chromatographie gereinigt.



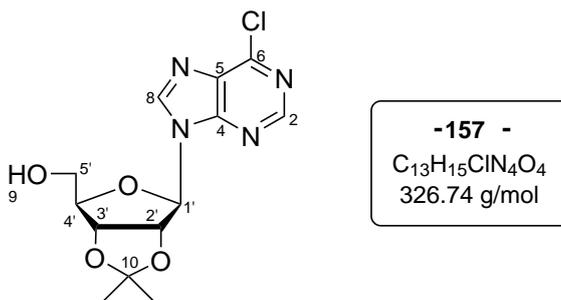
Ausbeute: Es wurden 1.30 g (3.88 mmol, 77%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz) [DMSO-*d*<sub>6</sub>]:  $\delta$  [ppm] = 8.34 (s, 1 H, H-8), 8.20 (s, 1 H, H-2), 7.78 (d,  $^3J_{H,H}$  = 7.6 Hz, 1 H, NH), 5.88 (d,  $^3J_{H,H}$  = 6.1 Hz, 1 H, H-1'), 5.46–5.40 (m, 2 H, H-9, 11), 5.18 (d,  $^3J_{H,H}$  = 4.6 Hz, 1 H, H-10), 4.63–5.59 (m, 1 H, H-2'), 4.51 (s, 1 H, H-12), 4.17–4.11 (m, 1 H, H-3'), 3.99–3.93 (m, 1 H, H-4'), 3.71–3.63 (m, 1 H, H-5'a), 3.60–3.51 (m, 1 H, H-5'b), 1.99–1.86 (m, 2 H, Cyclopentyl), 1.77–1.65 (m, 2 H, Cyclopentyl), 1.65–1.48 (m, 4 H, Cyclopentyl). **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ [ppm] = 152.3 (C-2), 152.3 (C-6), 139.6 (C-8), 120.3 (C-4, 5), 87.9 (C-1'), 85.9 (C-4'), 73.6 (C-2'), 70.7 (C-3'), 61.7 (C-5'), 51.7 (C-12), 31.2 (C-13), 23.5 (C-14). **IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3675, 3317, 3146, 3121, 2943, 1621, 1375, 1216, 1199, 1141, 1099, 1053, 959, 845, 824, 791, 666, 613, 525,

435. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 336.1672 [M+H]<sup>+</sup>, gef: 336.1673 [M+H]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.30 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v).

### Synthese von 6-Chlor-2',3'-isopropylidenadenosin 157

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 2.94 g (10.3 mmol, 1.0 Äquiv.) 6-Chlorpurinribosid in 50 mL abs. Aceton suspendiert, mit 10.7 mL (9.08 g, 87.2 mmol, 8.5 Äquiv.) Dimethoxypropan sowie 2.15 g (11.3 mmol, 1.1 Äquiv.) *p*-Toluolsulfonsäure versetzt und anschließend für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene rote Öl in 100 mL Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit Natriumhydrogencarbonat,- und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und erneut unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1).



Ausbeute: Es wurden 2.75 g (8.40 mmol, 82%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz) [DMSO-*d*<sub>6</sub>]: δ [ppm] = 8.86 (s, 1 H, H-8), 8.82 (s, 1 H, H-2), 6.27 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.4 Hz, 1 H, H-1'), 5.41 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.4 Hz, 1 H, H-2'), 5.10 (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.2 Hz, 1 H, H-9), 4.98 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.4 Hz, 1 H, H-3'), 4.33–4.28 (m, 1 H, H-4'), 3.60–3.50 (m, 2 H, H-5'), 1.55 (s, 3 H, Me), 1.33 (s, 3 H, Me'). **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 151.8 (C-2), 151.3 (C-6), 149.3 (C-4), 145.8 (C-8), 131.4 (C-5), 113.0 (C-10), 90.5 (C-1'), 87.5 (C-4'), 82.8 (C-2'), 81.3 (C-3'), 61.4 (C-5'), 26.9 (Me), 25.1 (Me'). **IR**:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3315, 3121, 2985, 2935, 1591, 1560, 1334, 1213, 1199, 1073, 958, 845, 785, 761, 649, 634, 545, 511. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 349.0680 [M+Na]<sup>+</sup>, gef: 349.0711 [M+Na]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.48 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1 v/v).

### Synthese von 2',3'-Isopropyliden-N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosin **158**

Die Verbindung **158** wurde auf zwei unterschiedlichen Wegen dargestellt. Es erfolgte die Synthese ausgehend von der bereits Isopropyliden geschützte Verbindung **157** durch Einführung der Cyclopentylgruppe (Route I) und einmal ausgehend von Verbindung **159** durch die Einführung der Isopropylidengruppe (Route II).

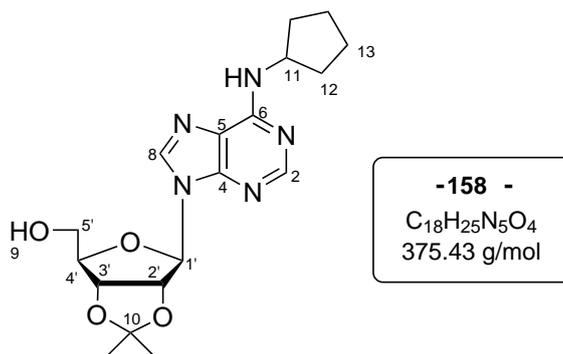
- Route I

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 2.31 g (7.07 mmol, 1.0 Äquiv.) der Verbindung **157** in 40 mL abs. Ethanol suspendiert, mit 2.10 mL (1.81 g, 21.2 mmol, 3.0 Äquiv.) Cyclopentylamin sowie 2.90 mL (2.15 g, 21.2 mmol, 3.0 Äquiv.) abs. Triethylamin versetzt und für drei Stunden zum Rückfluss erhitzt. Die erhaltene klare Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und im Ölpumpenvakuum vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand wurde in einem 1:1 Gemisch aus Wasser und Ethylacetat aufgenommen. Die Phasen wurden getrennt, die organische Phase mit Wasser und anschließend mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1).

Ausbeute: Es wurden 1.83 g (4.87 mmol, 69%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

- Route II

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 0.44 g (1.3 mmol, 1.0 Äquiv.) der Verbindung **159** in 40 mL abs. Aceton suspendiert, mit 1.36 mL (1.16 g, 11.1 mmol, 8.5 Äquiv.) Dimethoxypropan sowie 0.27 g (1.4 mmol, 1.1 Äquiv.) *p*-Toluolsulfonsäure versetzt und anschließend für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene rote Öl in 100 mL Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit Natriumhydrogencarbonat,- und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und erneut unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1).



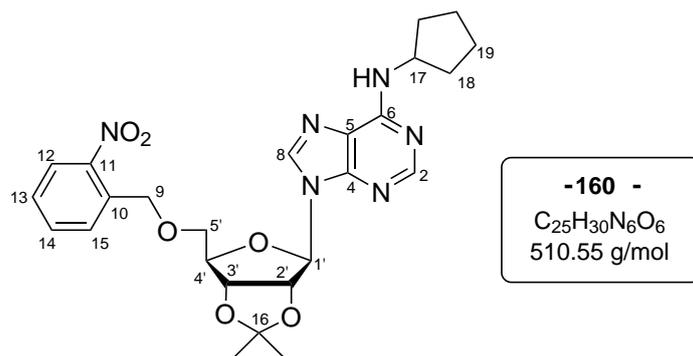
Ausbeute: Es wurden 0.42 g (1.1 mmol, 85%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz) [DMSO-*d*<sub>6</sub>]: δ [ppm] = 8.33 (s, 1 H, H-8), 8.22 (s, 1 H, H-2), 7.79 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.3 Hz, 1 H, NH), 6.12 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 3.0 Hz, 1 H, H-1'), 5.33 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.2 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 3.1 Hz, 1 H, H-2'), 5.25 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.4 Hz, 1 H, H-9), 4.96 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.1 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.5 Hz, 1 H, H-3'), 4.51 (s, 1 H, H-11), 4.21 (dt, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 4.8 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.5 Hz, 1 H, H-4'), 3.61–3.45 (m, 2 H, H-5'), 1.97–1.85 (m, 2 H, cyclopentyl), 1.76–1.65 (m, 2 H, Cyclopentyl), 1.63–1.49 (m, 4 H, Cyclopentyl), 1.54 (s, 3 H, Me), 1.32 (s, 3 H, Me'). **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 153.4 (C-2), 151.4 (C-6), 149.3 (C-4), 139.4 (C-8), 131.7 (C-5), 113.1 (C-10), 89.7 (C-1'), 86.4 (C-4'), 83.3 (C-2'), 81.4 (C-3'), 61.6 (C-5'), 60.6 (C-11), 31.8 (C-12), 27.1 (C-Me), 25.2 (C-Me'), 23.5 (C-13). **IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3288, 2937, 2864, 1613, 1582, 1475, 1373, 1331, 1294, 1154, 1074, 848, 743, 645, 554, 437. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): ber: 376.1985 [M+H]<sup>+</sup>, gef: 376.1987 [M+H]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert:** 0.50 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v).

### Synthese von 2',3'-Isopropyliden-5'-(2-nitrobenzyl)-N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosin 160

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 41 mg (1.7 mmol, 2.0 Äquiv.) Natriumhydrid in 4 mL abs. Dimethylformamid suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Zu der Suspension wurde 0.32 g (0.85 mmol, 1.0 Äquiv.) des Adenosinderivat **158**, gelöst in 4 mL abs. Dimethylformamid, sehr langsam über einen Zeitraum von zehn Minuten zugetropft und nach vollständiger Zugabe für weitere 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurden 0.37 g (1.7 mmol, 2.0 Äquiv.) 2-Nitrobenzylbromid, gelöst in 6 mL Dimethylformamid, über einen Zeitraum von dreißig Minuten zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wurde die erhaltene Reaktionslösung für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Überschuss Natriumhydrid

wurde durch die Zugabe von 2 mL *Isopropanol* vernichtet und anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile im Ölpumpenvakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen, mit Wasser und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und erneut im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 2:1 nach PE/EE 1:1)

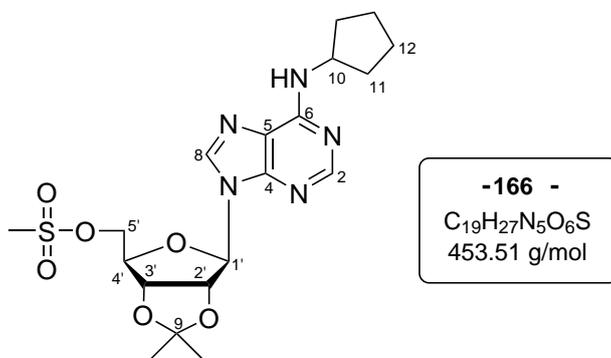


Ausbeute: Es wurden 52 mg (0.10 mmol, 12%) eines leicht gelben Feststoffs erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz) [ $\text{CDCl}_3$ ]:  $\delta$  [ppm] = 8.33 (s, 1 H, H-8), 7.98 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.0$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 1.3$  Hz, 1 H, H-12), 7.86 (s, 1 H, H-2), 7.47–7.37 (m, 3 H, H-13-15), 6.12 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 2.2$  Hz, 1 H, H-1'), 5.46 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.2$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 2.2$  Hz, 1 H, H-2'), 5.04 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.2$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 2.6$  Hz, 1 H, H-3'), 4.87–4.76 (m, 2 H, H-9), 4.56 (dt,  $^3J_{\text{H,H}} = 4.7$  Hz,  $^3J_{\text{H,H}} = 3.1$  Hz, 1 H, H-4'), 3.83–3.73 (m, 2 H, H-5'), 2.18–2.06 (m, 1 H, Cyclopentyl), 1.81–1.72 (m, 2 H, Cyclopentyl), 1.72–1.65 (m, 2 H, Cyclopentyl), 1.63 (s, 3 H, Me), 1.59–1.49 (m, 2 H, Cyclopentyl), 1.42 (s, 3 H, Me'),  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 153.4 (C-8), 147.6 (C-11), 138.8 (C-2), 134.3 (C-10), 133.8, 128.9, 128.6 (C-13-15), 125.0 (C-12), 114.6 (C-16), 92.2 (C-1'), 86.5 (C-4'), 85.0 (C-2'), 82.2 (C-3'), 70.4 (C-9), 63.9 (C-5'), 33.8, 28.1, 24.1 (Cyclopentyl), 27.5 (Me), 25.8 (Me'). **IR**:  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3350, 2953, 2868, 1614, 1580, 1525, 1474, 1372, 1340, 1296, 1213, 1077, 858, 754, 730, 510. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 511.2305 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>, gef: 511.2306 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.36 (PE/EE 1:1 v/v).

### Synthese von 2',3'-Isopropyliden-5'-mesyl-N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosin **166**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 2.05 g (5.46 mmol, 1.0 Äquiv.) des Adenosinderivats **158** in 20 mL abs. Pyridin gelöst und tropfenweise mit 0.51 mL (0.75 g, 6.6 mmol, 1.2 Äquiv.) Mesylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Ölpumpenvakuum vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde je dreimal mit Toluol und Dichlormethan coevaporiert und anschließend in Ethylacetat aufgenommen. Die vereinten organischen Phasen wurden anschließend mit ges. Natriumchloridlösung gewaschen über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Auf eine säulenchromatographische Reinigung wurde aufgrund der Instabilität der Verbindung verzichtet.

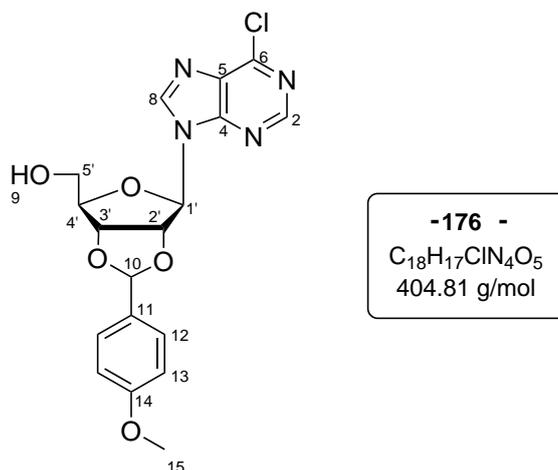


Ausbeute: Es wurden 2.21 g (4.86 mmol, 89%) eines leicht verunreinigten farblosen Feststoffs erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz) [CDCl<sub>3</sub>]:  $\delta$  [ppm] = 8.36 (s, 1 H, H-8), 7.82 (s, 1 H, H-2), 6.10 (d,  $^3J_{H,H} = 3.0$  Hz, 1 H, H-1'), 5.47 (dd,  $^3J_{H,H} = 6.3$  Hz,  $^3J_{H,H} = 2.1$  Hz, 1 H, H-2'), 5.16 (dd,  $^3J_{H,H} = 5.2$  Hz,  $^3J_{H,H} = 2.1$  Hz, 1 H, H-3'), 4.54–4.38 (m, 3 H, H-4', 5'), 2.90 (s, 3 H, Mesyl), 2.20–2.09 (m, 1 H, H-10), 1.84–1.63 (m, 6 H, Cyclopentyl), 1.61 (s, 3 H, Me), 1.59–1.54 (m, 2 H, Cyclopentyl), 1.39 (s, 3 H, Me'). **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 152.6 (C-8), 151.3 (C-6), 149.1 (C-4), 139.1 (C-2), 131.1 (C-5), 114.7 (C-9), 91.0 (C-1'), 84.9 (C-4'), 84.1 (C-2'), 81.4 (C-3'), 68.6 (C-5'), 37.6 (Mesyl), 33.4 (Cyclopentyl), 27.1 (Me), 25.3 (Me'), 23.7 (Cyclopentyl). **IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2950, 1636, 1614, 1474, 1377, 1350, 1206, 1172, 1152, 1038, 968, 834, 767, 650, 601, 523. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 454.1760 [M+H]<sup>+</sup>, gef: 454.1752 [M+H]<sup>+</sup>.

### Synthese von 6-Chlor-2',3'-4-methoxybenzylidenadenosin 176

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 2.18 g (7.60 mmol, 1.0 Äquiv.) 6-Chloradenosin in abs. Tetrahydrofuran suspendiert und mit 3.9 mL (4.2 g, 23 mmol, 3.0 Äquiv.) *p*-Anisaldehyddimethylacetal sowie einer katalytischen Menge *p*-Toluolsulfonsäure versetzt. Die Reaktion wurde für 20 h bei Raumtemperatur gerührt, bis ein fast vollständiger Umsatz per DC-Kontrolle (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 + 5% Et<sub>3</sub>N) beobachtet werden konnte. Die Reaktionslösung wurde mit Wasser und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck von allen flüchtigen Bestandteilen befreit. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 + 5% Et<sub>3</sub>N). Es waren mehrere säulenchromatographische Reinigungen notwendig um das Produkt rein zu erhalten.



Ausbeute: Es wurden 1.80 g (4.45 mmol, 59%) eines farblosen Feststoffs erhalten. Das Produkt liegt als Diastereomergemisch im Verhältnis 1:0.4 vor.

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz) [DMSO-*d*<sub>6</sub>]: δ [ppm] = 8.91 (s, 1 H, H-8), 8.90 (s, 0.4 H, H-8), 8.83 (s, 1 H, H-2), 8.83 (s, 0.4 H, H-2), 7.53–7.48 (m, 0.8 H, H-12), 7.46–7.42 (m, 2 H, H-12), 7.03–6.99 (m, 0.8 H, H-13), 6.99–6.95 (m, 2 H, H-13), 6.45–6.42 (m, 1.4 H, H-1'), 6.20 (s, 1 H, H-10), 5.98 (s, 0.4 H, H-10), 5.54 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.4 Hz, 0.4 H, H-2'), 5.52 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.3 Hz, 1 H, H-2'), 5.15–5.05 (m, 3 H, H-3', 9), 4.48 (dt, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.1 Hz, 0.4 H, H-4'), 4.37 (dt, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 4.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.1 Hz, 1 H, H-4'), 3.79 (s, 3 H, H-15), 3.77 (s, 3 H, H-15), 3.66–3.60 (m, 2 H, H-5'), 3.60–3.56

(m, 0.8 H, H-5'). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ[ppm] = 160.8 (C-14), 160.7 (C-14'), 152.2 (C-2), 152.1 (C-2), 149.7 (C-4), 149.6 (C-4), 146.3 (C-8), 146.3 (C-8), 131.8 (C-11), 131.7 (C-11), 128.4 (C-6), 121.4 (C-5), 128.8 (C-12), 114.2 (C-13), 114.1 (C-13), 106.7 (C-10), 103.4 (C-10), 97.4 (C-1'), 90.8 (C-1'), 87.6 (C-4'), 85.7 (C-4'), 84.5 (C-2'), 83.4 (C-2'), 82.9 (C-3'), 80.9 (C-3'), 61.8 (C-5'), 61.7 (C-5'), 55.6 (C-15). **IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3316, 2931, 2836, 1613, 1590, 1561, 1517, 1490, 1437, 1201, 1171, 1029, 952, 865, 777, 588. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 405.0966 [M+H]<sup>+</sup>, gef: 405.0950 [M+H]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert:** 0.47 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v).

### Syntheseversuch von

#### 6-Chlor-2',3'-(4-methoxybenzyliden)-5'-(2-nitrobenzyl)-adenosin **180**

Die Darstellung der Verbindung **180** ausgehend von dem Adenosinderivat **176** sollte auf zwei verschiedenen Synthesewegen erprobt werden.

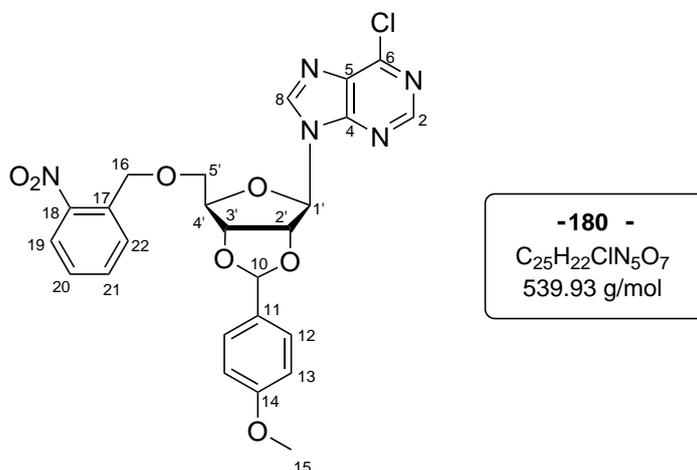
- Variante I

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 88 mg (0.27 mmol, 3.0 Äquiv.) frisch getrocknetes Cäsiumcarbonat in 6 mL abs. Dimethylformamid suspendiert und mit 17 mg (1.1 mmol, 1.2 Äquiv.) 2-Nitrobenzylalkohol **23** versetzt. Zu der erhaltenen gelben Suspension wurden 47 mg (0.09 mmol, 1.0 Äquiv.) des Adenosinderivats **176** portionsweise zugegeben und die Lösung zunächst für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem per DC-Kontrolle kein Umsatz beobachtet werden konnte, wurde die Reaktion für eine Stunde zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und der erhaltene Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde anschließend mit ges. Natriumchloridlösung gewaschen über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Das gemessene <sup>1</sup>H-NMR zeigt ein komplexes Gemisch an nicht zuordnungsbaeren Signalen. Der Ansatz wurde verworfen.

- Variante II

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 6 mg (0.2 mmol, 3.0 Äquiv.) Natriumhydrid in 6 mL Dimethylformamid suspendiert, auf 0 °C gekühlt und mit 25 mg (0.16 mmol, 2.0 Äquiv.)

2-Nitrobenzylalkohol **23** versetzt. Die erhaltene gelbe Suspension wurde für 30 min bei 0 °C gerührt und anschließend mit 43 mg (0.08 mmol, 1.0 Äquiv.) des Adenosinderivats ?? versetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 18 h bei Raumtemperatur gerührt und der Überschuss Natriumhydrid durch die Zugabe von *iso*-Propanol gequenchet. Das Lösungsmittel wurde im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde anschließend mit ges. Natriumchloridlösung gewaschen über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Das gemessene <sup>1</sup>H-NMR zeigt ein komplexes Gemisch an nicht zuordnungsba- ren Signalen. Der Ansatz wurde verworfen.

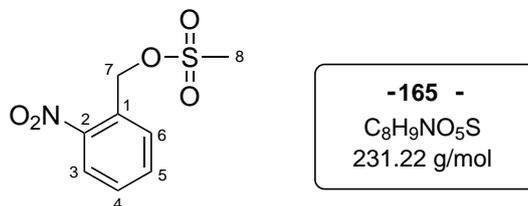


Ausbeute: Es konnte kein Produkt oder Edukt isoliert werden. Das <sup>1</sup>H-NMR zeigt eine Zersetzung in beiden Synthesevarianten.

### Synthese von 2-Nitrobenzylmethansulfonat **165**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 0.22 g (1.4 mmol, 1.0 Äquiv.) 2-Nitrobenzylalkohol **23** in 10 mL abs. Tetrahydrofuran gelöst und mit 0.30 mL (0.22 g, 2.2 mmol, 1.5 Äquiv.) abs. Triethylamin versetzt. Zu der erhaltenen klaren Lösung wurden 0.13 mL (0.20 g, 1.7 mmol, 1.2 Äquiv.) Methansulfonylchlorid langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wurde für zwanzig Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Ölpumpenvakuum von alle flüchtigen Bestandteilen befreit. Der Rückstand wurde in Dichlor-

methan aufgenommen, mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Eine weitere Reinigung war nicht nötig.

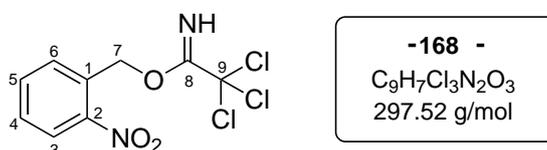


Ausbeute: Es wurden 0.33 g (1.4 mmol, quant.) eines leicht gelben Feststoffs erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz) [DMSO-*d*<sub>6</sub>]: δ [ppm] = 8.17 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.2 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.3 Hz, 1 H, H-3), 7.85 (dt, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.9 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.3 Hz, 1 H, H-5), 7.78 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.8 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.2 Hz, 1 H, H-6), 7.68 (dt, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.3 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H,H</sub> = 1.6 Hz, 1 H, H-4), 5.63 (s, 2 H, H-7), 3.30 (s, 3 H, H-8). **<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 147.1 (C-2), 134.4 (C-5), 129.9 (C-4), 129.5 (C-6), 125.4 (C-1), 125.0 (C-3), 67.9 (C-7), 37.0 (C-8). **HRMS**: Das Produkt konnte weder im ESI noch im EI gefunden werden. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.56 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

### Synthese von 2-Nitrobenzyl-2,2,2-trichloroacetimidat 168

Unter Stickstoff als Intergas wurden 0.44 g (2.9 mmol, 1.0 Äquiv.) 2-Nitrobenzylalkohol **23** in 20 mL Dichlormethan gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit drei Tropfen DBU versetzt. Zu der klaren Reaktionslösung wurden 0.35 mL (0.51 g, 3.5 mmol, 1.2 Äquiv.) Trichloroacetonitril zugegeben und die Lösung wurde anschließend für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit ges. Natriumhydrogencarbonat-, und Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck von allen flüchtigen Bestandteilen befreit. Eine weitere Reinigung war nicht nötig.

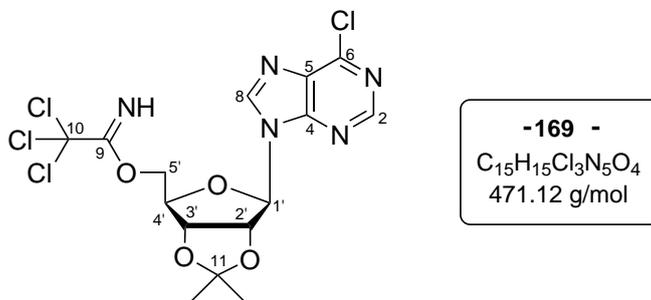


Ausbeute: Es wurden 0.85 g (2.8 mmol, 98%) eines gelben Öls erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz) [DMSO-*d*<sub>6</sub>]: δ [ppm] = 9.60 (s, 1 H, NH), 8.14 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.1 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 1.3 Hz, 1 H, H-3), 7.89–7.72 (m, 2 H, H-5, 6), 7.65 (dt, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.7 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 1.3 Hz, 1 H, H-4), 5.63 (s, 2 H, H-7). **<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 159.4 (C-8), 147.5 (C-2), 134.1 (C-5/6), 131.1 (C-1), 129.5 (C-4), 129.3 (C-5/6), 90.6 (C-9), 66.6 (C-7). **IR**:  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3339, 1666, 1522, 1446, 1376, 1341, 1299, 1066, 1002, 859, 787, 727, 667, 592, **HRMS**: Das Molekül konnte nicht im ESI wie auch im EI gefunden werden. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.20 (PE/EE 9:1 + 2% Triethylamin v/v).

### Synthese von 6-Chlor-2',3'-isopropyliden-5'-(2,2,2-trichloracetimidat)adenosin 169

Unter Stickstoff als Intergas wurden 0.48 g (1.5 mmol, 1.0 Äquiv.) des Adenosinderivats **157** in 10 mL Dichlormethan gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit drei Tropfen DBU versetzt. Zu der klaren Reaktionslösung wurden 0.17 mL (0.25 g, 1.8 mmol, 1.2 Äquiv.) Trichloracetnitril zugegeben und die Lösung wurde anschließend für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit ges. Natriumhydrogencarbonat-, und Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck von allen flüchtigen Bestandteilen befreit. Eine weitere Reinigung war nicht nötig.



Ausbeute: Es wurden 0.67 g (1.4 mmol, 95%) eines farblosen Feststoffs erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz) [DMSO-*d*<sub>6</sub>]: δ [ppm] = 9.45 (s, 1 H, NH), 8.83 (s, 1 H, H-8), 8.81 (s, 1 H, H-2), 6.36 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.0 Hz, 1 H, H-1'), 5.53 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.2 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.0 Hz, 1 H, H-2'), 5.10 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 6.1 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.9 Hz, 1 H, H-3'), 4.02 (dt, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.0 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 3.7 Hz, 1 H, H-4'), 4.53–4.31 (m, 2 H, H-5'), 1.56 (s, 3 H, Me), 1.34 (s, 3 H, Me'). **<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 159.7 (C-9), 151.8 (C-8), 151.1 (C-6), 149.4 (C-

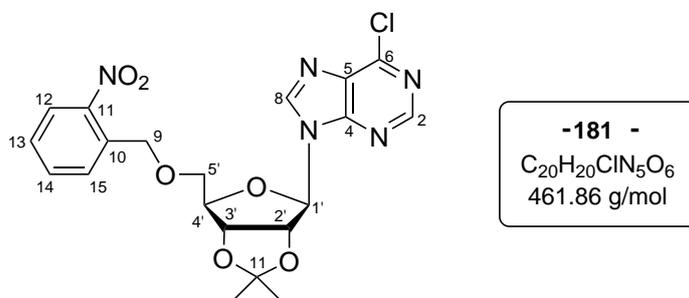
4), 145.7 (C-2), 131.6 (C-5), 113.5 (C-11), 90.6 (C-1'), 90.4 (C-10), 84.1 (C-4'), 83.6 (C-2'), 81.0 (C-3'), 68.1 (C-5'), 26.9 (Me), 25.1 (Me'). **IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 1, 1, 3338, 2987, 2938, 1667, 1590, 1559, 1383, 1336, 1298, 1156, 1137, 1070, 951, 935, 855, 827, 635. **HRMS:** Das Molekül konnte nicht im ESI und EI gefunden werden. **R<sub>f</sub>-Wert:** 0.50 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 30:1 v/v).

### Syntheseversuch von 6-Chlor-2',3'-isopropyliden)-5'-(2-nitrobenzyl)-adenosin **181** via Trichloracetimidate

Die Synthese der Verbindung **181** erfolgte ausgehend von den Trichloracetimidaten **168** und **169** mit den entsprechenden Alkoholen **157** und **23**. Beide Syntheseverfahren wurden mit verschiedenen Lewis-, und Brønstedt-Säuren erprobt. Es konnte in keinem Fall eine Produktbildung beobachtet werden.

- Allgemeine Vorschrift:

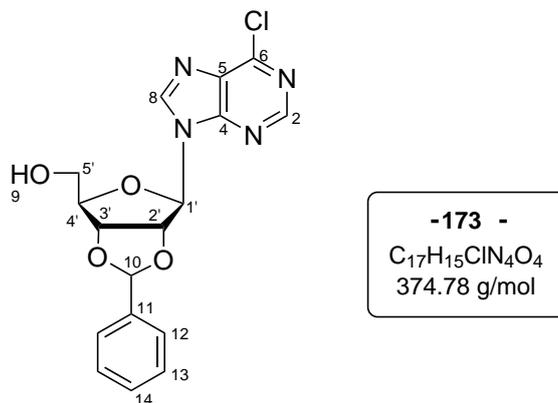
Unter Stickstoff als Inertgas wurden 1.0 Äquiv. des Trichloracetimidats (**168** oder **169**) in 10 mL abs. Dichlormethan gelöst, mit 1.0 Äquiv. des entsprechenden Alkohols (**157** oder **23**) versetzt und auf 0 °C gekühlt. Zu der erhaltenen klaren Lösung wurde jeweils eine katalytische Menge einer Lewis-, oder Brønstedt-Säure zugegeben. Es wurden dabei folgende Säuren erprobt: Trifluormethansulfonsäure, Bortrifluorid·Etherat, Trimethylsilyl-Triflat. Die sich sofort schwarz verfärbte Lösung wurde für drei Stunden gerührt. Die Reaktion wurde durch die vorsichtige Zugabe von Wasser beendet. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase mit ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und anschließend im Vakuum von allen flüchtigen Bestandteilen befreit. Ein gemessenes <sup>1</sup>H-NMR des erhaltenen Rohproduktes zeigte daraufhin immer eine Zersetzung in nicht weiter identifizierbare Substanzen.



Ausbeute: Es konnte kein Produkt erhalten werden.

### Synthese von 2',3'-Benzyliden-6-chloradenosin 173

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 2.0 g (7.0 mmol, 1.0 Äquiv) 6-Chloradenosin und 4.8 g (35 mmol, 5.0 Äquiv) frisch getrocknetes Zink(II)chlorid vermengt und mit 10.0 mL (10.5 g, 98.9 mmol, 14 Äquiv) frisch destillierte Benzaldehyd versetzt. Die Reaktionslösung wurde für zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 50 mL Wasser versetzt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltenen Rückstand wurde durch automatisierte Säulenchromatographie am Puriflash gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> nach CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 4:1). Das erhaltene Rohrprodukt wurde anschließend erneut säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1) gereinigt.



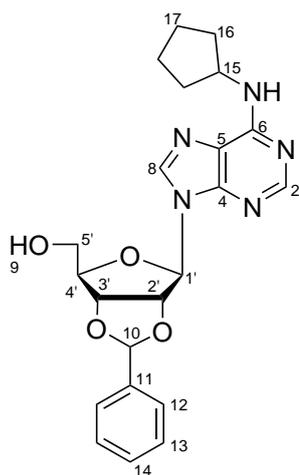
Ausbeute: Es wurden 2.30 g (6.15 mmol, 88%) eines farblosen Feststoffs erhalten. Das Produkt liegt als ein Gemisch von zwei Diastereomeren im Verhältnis von 1:0.5 vor.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz) [DMSO-*d*<sub>6</sub>]: δ [ppm] = 8.91 (s, 1 H, H-8), 8.90 (s, 0.5 H, H-8), 8.84 (s, 1 H, H-2), 8.83 (s, 0.5 H, H-2), 7.53–7.48 (m, 7.5 H, Benzyliden), 6.46 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.9 Hz, 1 H, H-1'), 6.44 (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.9 Hz, 0.5 H, H-1'), 6.27 (s, 1 H, H-10), 6.03 (s, 0.5 H, H-10), 5.58 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 2.0 Hz, 0.5 H, H-2'), 5.55 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.1 Hz,

$^3J_{\text{H,H}} = 2.9 \text{ Hz}$ , 1 H, H-2'), 5.18–5.08 (m, 3 H, H-3', 9), 4.51–4.45 (m, 0.5 H, H-4'), 4.43–4.36 (m, 1 H, H-4'), 3.66–3.56 (m, 3 H, H-5').  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$ [ppm] = 152.6 (C-4), 152.3 (C-2), 152.2 (C-2), 151.3 (C-5), 130.6 (C-6), 129.7, 129.0, 129.0, 128.9, 127.7, 127.4, (C-Benzyliden), 106.9 (C-10), 103.9 (C-10), 89.5 (C-1'), 89.5 (C-1), 87.8 (C-4'), 85.9 (C-4'), 84.8 (C-2'), 83.7 (C-2'), 83.1 (C-3'), 81.2 (C-3'), 61.7 (C-5'). **IR**:  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3283, 3115, 2926, 2900, 2363, 2337, 2161, 2029, 1701, 1592, 1562, 1399, 1335, 1201, 1137, 1068, 1026, 954, 763, 741, 646, 551. **HRMS** (ESI $^+$ , m/z): ber: 375.0860 [M+H] $^+$ , gef: 375.0865 [M+H] $^+$ . **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.61 (CH $_2$ Cl $_2$ /MeOH 9:1 v/v).

### Synthese von 2',3'-Benzyliden-*N*<sup>6</sup>-cyclopentylamin-adenosin 174

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 0.92 g (2.5 mmol, 1.0 Äquiv.) der Benzyliden geschützten Adenosinverbindung **173**, 0.73 mL (0.63 g, 7.4 mmol, 3.0 Äquiv.) Cyclopentylamin und 1.0 mL (0.74 g, 7.4 mmol, 3.0 Äquiv.) Triethylamin in 40 mL trockenem Ethanol suspendiert und anschließend für drei Stunden zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wurden alle flüchtigen Bestandteile im Ölpumpenvakuum entfernt und der erhaltenen Rückstand in einem 1:1 Gemisch aus Wasser und Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wurde mit Wasser und ges. Natriumchlorid Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und anschließend im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand wurde zunächst säulenchromatographisch an Kieselgel (CH $_2$ Cl $_2$ /MeOH 19:1) gereinigt und anschließend noch als durch automatisierte RP-Chromatographie am Puriflash gereinigt.



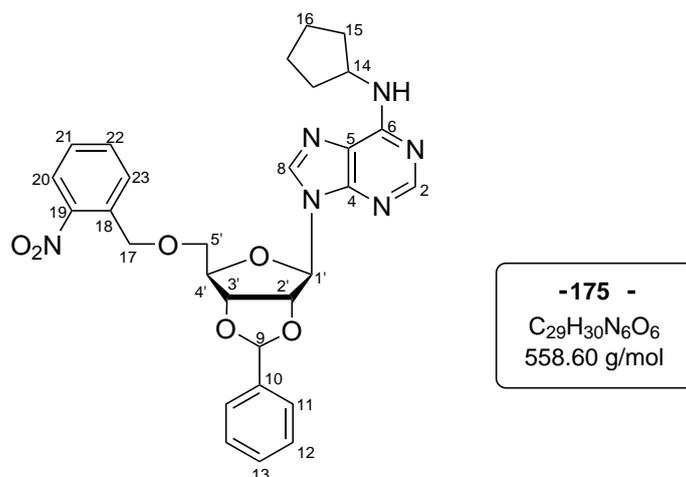
**-174 -**  
 C $_{22}$ H $_{25}$ N $_5$ O $_4$   
 423.47 g/mol

Ausbeute: Es wurden 0.69 g (1.6 mmol, 67%) eines farblosen Feststoffs erhalten. Das Produkt liegt als ein Gemisch von zwei Diastereomeren im Verhältnis von 1:0.7 vor.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz) [DMSO-*d*<sub>6</sub>]:  $\delta$  [ppm] = 8.38 (s, 0.7 H, H-8), 8.37 (s, 1 H, H-8), 8.23 (s, 1.7 H, H-2), 7.80 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 1.7 H, H-NH), 7.62–7.38 (m, 8.5 H, Benzyliden), 6.32–6.29 (m, 1.7 H, H-1'), 6.25 (s, 1 H, H-10), 6.03 (s, 0.7 H, H-10), 5.54–5.46 (m, 1.7 H, H-2'), 5.27 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.3 Hz, 0.7 H, H-OH), 5.16 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.7 Hz, 1 H, H-9), 5.13–5.07 (m, 1.7 H, H-3'), 4.53 (s, 1.7 H, Cyclopentyl), 4.38 (dt, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 5.0 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 2.2 Hz, 1 H, H-4'), 4.33–4.26 (m, 0.7 H, H-4'), 3.68–3.50 (m, 3.4 H, H-5'), 2.01–1.85 (m, 3.4 H, Cyclopentyl), 1.78–1.66 (m, 3.4 H, Cyclopentyl), 1.66–1.48 (m, 6.8 H, Cyclopentyl). **<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = 153.2 (C-2), 140.9 (C-8), 130.3, 130.2, 128.9, 128.9, 128.8, 127.5, 127.3 (Benzyliden), 107.0 (C-10), 103.5 (C-10), 90.1 (C-1'), 88.6 (C-1'), 86.9 (C-4'), 84.9 (C-4'), 84.3 (C-2'), 83.5 (C-2'), 83.2 (C-3'), 81.2 (C-3'), 62.0 (C-5'), 51.7 (Cyclopentyl), 32.5 (Cyclopentyl), 24.1 (Cyclopentyl). **IR:**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3327, 2955, 2868, 1616, 1584, 1475, 1411, 1377, 1332, 1295, 1219, 1093, 1071, 1028, 759, 698. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 424.1985 [M+H]<sup>+</sup>, gef: 424.1974 [M+H]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert:** 0.30 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 19:1 v/v).

### Synthese von 2',3'-Benzyliden-*N*<sup>6</sup>-cyclopentylamin-5'-(2-nitrobenzyl)adenosin **175**

Unter Stickstoff als Inertgas wurden 31 mg (1.3 mmol, 2.0 Äquiv) Natriumhydrid in 4 mL DMF suspendiert und bei 0 °C mit 0.27 g (0.64 mmol, 1.0 Äquiv) der Adenosinverbindung **174**, gelöst in 4 mL DMF, versetzt. Die Suspension wurde für 30 min bei 0 °C gerührt und anschließend wurde über einen Zeitraum von 30 min ebenfalls bei 0 °C 0.28 g (1.3 mmol, 2.0 Äquiv) 2-Nitrobenzylbromid gelöst in 4 mL DMF zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktionslösung langsam auf Raumtemperatur erwärmt und für 18 h gerührt. Der Überschuss an Natriumhydrid wurde durch die Zugabe von *Isopropanol* vernichtet und alle flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen, mit Wasser und ges. Natriumchlorid Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und erneut im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/EE 2:1 nach PE/EE 1:1)



Ausbeute: Es wurden 53 mg (0.10 mmol, 15%) eines leicht gelben Feststoffs erhalten. Das Produkt liegt als ein Gemisch von zwei Diastereomeren im Verhältnis von 1:0.7 vor.

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz) [ $\text{CDCl}_3$ ]:  $\delta$  [ppm] = 8.32 (s, 1.7 H, H-8), 7.62–7.38 (m, 1.7 H, Aryl), 7.88 (s, 1 H, H-2), 7.87 (s, 0.7 H, H-2), 7.60–7.33 (m, 13.6 H, Aryl), 6.26 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 2.9$  Hz, 0.7 H, H-1'), 6.23 (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 2.9$  Hz, 1 H, H-1'), 6.21 (s, 1 H, H-9), 6.03 (s, 0.7 H, H-9), 5.70 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.5$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 2.0$  Hz, 0.7 H, H-2'), 5.63 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.3$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 2.3$  Hz, 1 H, H-2'), 5.27 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.2$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 3.4$  Hz, 0.7 H, H-3'), 5.17 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.4$  Hz,  $^4J_{\text{H,H}} = 2.5$  Hz, 1 H, H-3'), 4.86 (s, 3.4 H, H-17), 4.66–4.52 (m, 1.7 H, H-4'), 4.51–4.49 (m, 1.7 H, Cyclopentyl), 3.88–3.75 (m, 3.4 H, H-5'), 2.20–2.04 (m, 3.4 H, Cyclopentyl), 1.85–1.62 (m, 3.4 H, Cyclopentyl), 1.62–1.47 (m, 6.8 H, Cyclopentyl).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ [ppm] = 154.5 (C-8), 138.4 (C-2), 128.7, 128.6, 128.6, 128.5, 128.3, 127.0, 126.8, 124.8, 124.7 (Aryl), 107.6 (C-9), 105.0 (C-9), 91.6 (C-1'), 90.6 (C-1'), 86.0 (C-4'), 84.1 (C-4'), 84.9 (C-2'), 84.6 (C-2'), 82.8 (C-3'), 81.6 (C-3'), 71.4 (C-5'), 69.9 (C-17), 53.7 (Cyclopentyl), 33.6 (Cyclopentyl), 20.9 (Cyclopentyl). **IR**:  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3310, 3284, 3234, 2956, 2868, 2363, 2161, 2028, 1679, 1617, 1527, 1475, 1460, 1404, 1376, 1295, 1219, 1093, 796, 698, 528. **HRMS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): ber: 559.2305 [M+H]<sup>+</sup>, gef: 559.2306 [M+H]<sup>+</sup>. **R<sub>f</sub>-Wert**: 0.41 (EE).

## 7 Literatur

- [1] F. Lipmann, "Metabolic Generation and Utilization of Phosphate Bond Energy", *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, Advances in Enzymology - and Related Areas of Molecular Biology **1941**, 99–162.
- [2] Z. Lu, Z. Cheng, Y. Zhao, S. L. Volchenbom, "Bioinformatic Analysis and Post-Translational Modification Crosstalk Prediction of Lysine Acetylation", *PLOS ONE* **2011**, 6.
- [3] P. Vlastaridis, P. Kyriakidou, A. Chaliotis, Y. Van de Peer, S. G. Oliver, G. D. Amoutzias, "Estimating the total number of phosphoproteins and phosphorylation sites in eukaryotic proteomes", *GigaScience* **2017**, 6.
- [4] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. jr. Gregory J., L. Stryer, *Stryer Biochemie*, 8. Auflage, Springer Verlag, Berlin, **2018**.
- [5] L. A. Fothergill-Gilmore, P. A. M. Michels, "Evolution of glycolysis", *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **1993**, 59, 105–235.
- [6] Heinrich, Müller, Graeve, *Biochemie und Pathobiochemie*, 9. Auflage, Wiley, Berlin, **2014**.
- [7] J. D. Watson, F. H. C. Crick, "Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid", *Nature* **1953**, 171, 737–738.
- [8] W. H. Prusoff, "Synthesis and biological activities of iododeoxyuridine, an analog of thymidine", *Biochimica et Biophysica Acta* **1959**, 32, 295–296.
- [9] R. E. Haynes, E. S. Sherard, H. G. Cramblett, P. H. Azimi, M. D. Hilty, "Treatment of herpesvirus encephalitis with iododeoxyuridine", *The Journal of Pediatrics* **1973**, 83, 102–105.
- [10] G. B. Elion, P. A. Furman, J. A. Fyfe, P. de Miranda, L. Beauchamp, H. J. Schaeffer, "Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1977**, 74, 5716–5720.
- [11] D. J. Coster, K. R. Wilhelmus, R. Michaud, B. R. Jones, "A comparison of acyclovir and idoxuridine as treatment for ulcerative herpetic keratitis", *The British journal of ophthalmology* **1980**, 64, 763–765.

- [12] K. R. Wilhelmus, “Antiviral treatment and other therapeutic interventions for herpes simplex virus epithelial keratitis”, *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2015**, 4.
- [13] J. Köhrle, *Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen*, (Hrsg.: Springer-Verlag), Berlin-Heidelberg, **2006**, S. 3.
- [14] R. Fliegert, J. Heeren, F. Koch-Nolte, V. O. Nikolaev, C. Lohr, C. Meier, A. H. Guse, “Adenine nucleotides as paracrine mediators and intracellular second messengers in immunity and inflammation”, *Biochemical Society Transactions* **2019**, 47, 329–337.
- [15] M. M. Faas, T. Sáez, P. de Vos, “Extracellular ATP and adenosine: The Yin and Yang in immune responses?”, *Molecular Aspects of Medicine* **2017**, 55, 9–19.
- [16] S. B. Coade, J. D. Pearson, “Metabolism of adenine nucleotides in human blood.”, *Circulation Research* **1989**, 65, 531–537.
- [17] L. Ryan, J. Rachow, B. McCarty, D. McCarty, “Adenosine triphosphate levels in human plasma”, *J Rheumatol.* **1996**, 23, 214.
- [18] S. Gallucci, P. Matzinger, “Danger signals: SOS to the immune system”, *Current Opinion in Immunology* **2001**, 13, 114–119.
- [19] P. Bodin, G. Burnstock, “Increased release of ATP from endothelial cells during acute inflammation”, *Inflammation Research* **1998**, 47, 351–354.
- [20] M. J. Bours, E. L. Swennen, F. Di Virgilio, B. N. Cronstein, P. C. Dagnelie, “Adenosine 5-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation”, *Pharmacology and Therapeutics* **2006**, 112, 358–404.
- [21] J. Juho, Y. G. G., H. Maija, A. Kristiina, K. Tuomas, S. Veikko, J. Sirpa, H. Harri, “Aberrant Circulating Levels of Purinergic Signaling Markers Are Associated With Several Key Aspects of Peripheral Atherosclerosis and Thrombosis”, *Circulation Research* **2015**, 116, 1206–1215.
- [22] C. El-Moatassim, J. Dornand, J.-C. Mani, “Extracellular ATP and cell signalling”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1992**, 1134, 31–45.

- [23] S. Mihm, "Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs): Molecular Triggers for Sterile Inflammation in the Liver", *International journal of molecular sciences* **2018**, *19*, 3104.
- [24] M. P. Abbracchio, G. Burnstock, J.-M. Boeynaems, E. A. Barnard, J. L. Boyer, C. Kennedy, G. E. Knight, M. Fumagalli, C. Gachet, K. A. Jacobson, G. A. Weisman, "International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy", *Pharmacological Reviews* **2006**, *58*, 281 LP –341.
- [25] F. Jacob, C. P. Novo, C. Bachert, K. Van Crombruggen, "Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses", *Purinergic Signalling* **2013**, *9*, 285–306.
- [26] J. L. Boyer, E. R. Lazarowski, X. H. Chen, T. K. Harden, "Identification of a P2Y-purinergic receptor that inhibits adenylyl cyclase.", *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1993**, *267*, 1140 LP –1146.
- [27] M. Idzko, E. Panther, H. C. Bremer, S. Sorichter, W. Luttmann, C. J. Virchow, F. Di Virgilio, Y. Herouy, J. Norgauer, D. Ferrari, "Stimulation of P2 purinergic receptors induces the release of eosinophil cationic protein and interleukin-8 from human eosinophils", *British Journal of Pharmacology* **2003**, *138*, 1244–1250.
- [28] J. Meshki, F. Tuluc, O. Bredeteau, Z. Ding, S. P. Kunapuli, "Molecular mechanism of nucleotide-induced primary granule release in human neutrophils: role for the P2Y2 receptor", *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2004**, *286*, C264–C271.
- [29] G. Martel-Gallegos, M. T. Rosales-Saavedra, J. P. Reyes, G. Casas-Pruneda, C. Toro-Castillo, P. Pérez-Cornejo, J. Arreola, "Human neutrophils do not express purinergic P2X7 receptors", *Purinergic signalling* **2010**, *6*, 297–306.
- [30] R. A. North, "P2X receptors", *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2016**, *371*, 20150427.
- [31] L. Antonioli, P. Pacher, E. S. Vizi, G. Haskó, "CD39 and CD73 in immunity and inflammation", *Trends in Molecular Medicine* **2013**, *19*, 355–367.
- [32] E. Ferrero, A. C. Faini, F. Malavasi, "A phylogenetic view of the leukocyte ectonucleotidases", *Immunology Letters* **2019**, *205*, 51–58.

- [33] S. Deaglio, S. C. Robson *Pharmacology of Purine and Pyrimidine Receptors*, Bd. 61, (Hrsg.: K. A. Jacobson, J. B. T. A. i. P. Linden), Academic Press, **2011**, S. 301–332.
- [34] F. Bönner, N. Borg, S. Burghoff, J. Schrader, “Resident Cardiac Immune Cells and Expression of the Ectonucleotidase Enzymes CD39 and CD73 after Ischemic Injury”, *PLOS ONE* **2012**, 7.
- [35] M. Nikolova, M. Carriere, M.-A. Jenabian, S. Limou, M. Younas, A. Kök, S. Huë, N. Seddiki, A. Hulin, O. Delaneau, H. Schuitemaker, J. T. Herbeck, J. I. Mullins, M. Muhtarova, A. Bensussan, J.-F. Zagury, J.-D. Lelievre, Y. Lévy, “CD39/Adenosine Pathway Is Involved in AIDS Progression”, *PLOS Pathogens* **2011**, 7.
- [36] B. B. Fredholm, A. P. IJzerman, K. A. Jacobson, K.-N. Klotz, J. Linden, “International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors”, *Pharmacological Reviews* **2001**, 53, 527–552.
- [37] H. R. Bourne, Y. Weinstein, K. L. Melmon, L. M. Lichtenstein, C. S. Henney, G. M. Shearer, “Modulation of Inflammation and Immunity by Cyclic AMP”, *Science* **1974**, 184, 19–28.
- [38] A. E. Bugrim, “Regulation of Ca<sup>2+</sup>-release by cAMP-dependent protein kinase A mechanism for agonist-specific calcium signaling?”, *Cell Calcium* **1999**, 25, 219–226.
- [39] K. W. Yau, “Cyclic nucleotide-gated channels: an expanding new family of ion channels”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, 91, 3481–3483.
- [40] Y. Su, X. Huang, T. Raskovalova, L. Zacharia, A. Lokshin, E. Jackson, E. Gorelik, “Cooperation of adenosine and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) in amplification of cAMP–PKA signaling and immunosuppression”, *Cancer Immunology Immunotherapy* **2008**, 57, 1611–1623.
- [41] T. Bopp, N. Dehzad, S. Reuter, M. Klein, N. Ullrich, M. Stassen, H. Schild, R. Buhl, E. Schmitt, C. Taube, “Inhibition of cAMP Degradation Improves Regulatory T Cell-Mediated Suppression”, *The Journal of Immunology* **2009**, 182, 4017 LP–4024.

- [42] V. B. Arumugham, C. T. Baldari, "cAMP: a multifaceted modulator of immune synapse assembly and T cell activation", *Journal of Leukocyte Biology* **2017**, *101*, 1301–1316.
- [43] C. M. Rueda, C. M. Jackson, C. A. Chougnet, Regulatory T-Cell-Mediated Suppression of Conventional T-Cells and Dendritic Cells by Different cAMP Intracellular Pathways, **2016**.
- [44] J. Lee, T. Aoki, D. Thumkeo, R. Siriwach, C. Yao, S. Narumiya, "T cell–intrinsic prostaglandin E2-EP2/EP4 signaling is critical in pathogenic TH17 cell–driven inflammation", *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2019**, *143*, 631–643.
- [45] A. R. MOORE, D. A. WILLOUGHBY, "The role of cAMP regulation in controlling inflammation", *Clinical & Experimental Immunology* **2008**, *101*, 387–389.
- [46] R. B. Silverman, *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Elsevier Inc., **2004**, S. 497–557.
- [47] A. Albert, *Selective toxicity with special reference to chemotherapy* Title, Methuen & CO. Ltd., London, **1951**, 228 pp.
- [48] A. ALBERT, "Chemical Aspects of Selective Toxicity", *Nature* **1958**, *182*, 421–423.
- [49] P. E. Marik, Propofol: Therapeutic Indications and Side-Effects, **2004**.
- [50] C. Vanlersberghe, F. Camu, (Hrsg.: J. Schüttler, H. Schwilden), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2008**, S. 227–252.
- [51] M. G. Banaszczyk, A. T. Carlo, V. Millan, A. Lindsey, R. Moss, D. J. Carlo, S. S. Hendler, "Propofol Phosphate, a Water-Soluble Propofol Prodrug: In Vivo Evaluation", *Anesthesia & Analgesia* **2002**, *95*.
- [52] B. Jalling, A. S. Malmborg, A. Lindman, L. O. Boréus, "Evaluation of a micromethod for determination of antibiotic concentration in plasma", *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1972**, *4*.
- [53] C. Simon, R. Nehls, V. Malerczyk, W. Toeller, G. Zierott, K. Lehmann, "Pivampicillin, ein neues Ampicillin-Derivat TT - Pivampicillin, a new ampicillin derivative", *Dtsch med Wochenschr* **1974**, *99*, 137–141.

- [54] J. F. Fisher, S. O. Meroueh, S. Mobashery, "Bacterial Resistance to  $\beta$ -Lactam Antibiotics: Compelling Opportunism, Compelling Opportunity", *Chemical Reviews* **2005**, *105*, 395–424.
- [55] J. P. Horwitz, J. Chua, M. Noel, "Nucleosides. V. The Monomesylates of 1-(2'-Deoxy- $\beta$ -D-lyxofuranosyl)thymine<sub>1,2</sub>", *The Journal of Organic Chemistry* **1964**, *29*, 2076–2078.
- [56] S. Broder, "The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic", *Antiviral Research* **2010**, *85*, 1–18.
- [57] H. Mitsuya, K. J. Weinhold, P. A. Furman, M. H. St Clair, S. N. Lehrman, R. C. Gallo, D. Bolognesi, D. W. Barry, S. Broder, "3-Azidothymidin: an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro", *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1985**, *82*, 7096 LP –7100.
- [58] C. McGuigan, R. N. Pathirana, N. Mahmood, K. G. Devine, A. J. Hay, "Aryl phosphate derivatives of AZT retain activity against HIV1 in cell lines which are resistant to the action of AZT", *Antiviral Research* **1992**, *17*, 311–321.
- [59] I. M. Jacobson, S. C. Gordon, K. V. Kowdley, E. M. Yoshida, M. Rodriguez-Torres, M. S. Sulkowski, M. L. Shiffman, E. Lawitz, G. Everson, M. Bennett, E. Schiff, M. T. Al-Assi, G. M. Subramanian, D. An, M. Lin, J. McNally, D. Brainard, W. T. Symonds, J. G. McHutchison, K. Patel, J. Feld, S. Pianko, D. R. Nelson, "Sofosbuvir for Hepatitis C Genotype 2 or 3 in Patients without Treatment Options", *New England Journal of Medicine* **2013**, *368*, 1867–1877.
- [60] A. S. Alanazi, E. James, Y. Mehellou, "The ProTide Prodrug Technology: Where Next?", *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2019**, *10*, 2–5.
- [61] R. Z. Sabirov, Y. Okada, "ATP release via anion channels", *Purinergic Signalling* **2005**, *1*, 311–328.
- [62] R. Z. Sabirov, A. K. Dutta, Y. Okada, "Volume-Dependent ATP-Conductive Large-Conductance Anion Channel as a Pathway for Swelling-Induced ATP Release", *Journal of General Physiology* **2001**, *118*, 251–266.

- [63] Y. Quan, L. Rong, C. Liang, M. A. Wainberg, "Reverse transcriptase inhibitors can selectively block the synthesis of differently sized viral DNA transcripts in cells acutely infected with human immunodeficiency virus type 1", *Journal of virology* **1999**, *73*, 6700–6707.
- [64] P. A. Furman, J. A. Fyfe, M. H. St Clair, K. Weinhold, J. L. Rideout, G. A. Freeman, S. N. Lehrman, D. P. Bolognesi, S. Broder, H. Mitsuya, E. Al., "Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1986**, *83*, 8333–8337.
- [65] W. Ostertag, G. Roesler, C. J. Krieg, J. Kind, T. Cole, T. Crozier, G. Gaedicke, G. Steinheider, N. Kluge, S. Dube, "Induction of Endogenous Virus and of Thymidine Kinase by Bromodeoxyuridine in Cell Cultures Transformed by Friend Virus", *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1974**, *71*, 4980–4985.
- [66] F. Pertusat, M. Serpi, C. McGuigan, "Medicinal Chemistry of Nucleoside Phosphonate Prodrugs for Antiviral Therapy", *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* **2012**, *22*, 181–203.
- [67] C. Meier, "cycloSal Phosphates as Chemical Trojan Horses for Intracellular Nucleotide and Glycosylmonophosphate Delivery — Chemistry Meets Biology", *European Journal of Organic Chemistry* **2006**, *2006*, 1081–1102.
- [68] C. Meier, E. De Clercq, J. Balzarini, "Nucleotide Delivery from cycloSaligenyl-3'-azido-3'-deoxythymidine Monophosphates (cycloSal-AZTMP)", *European Journal of Organic Chemistry* **1998**, *1998*, 837–846.
- [69] S. Warnecke, C. Meier, "Synthesis of Nucleoside Di- and Triphosphates and Dinucleoside Polyphosphates with cycloSal-Nucleotides", *The Journal of Organic Chemistry* **2009**, *74*, 3024–3030.
- [70] S. Wolf, T. Zismann, N. Lunau, C. Meier, "Reliable Synthesis of Various Nucleoside Diphosphate Glycopyranoses", *Chemistry – A European Journal* **2009**, *15*, 7656–7664.
- [71] S. Wendicke, S. Warnecke, C. Meier, "Efficient Synthesis of Nucleoside Diphosphate Glycopyranoses", *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 1500–1502.

- [72] V. C. Tonn, C. Meier, "Solid-Phase Synthesis of (Poly)phosphorylated Nucleosides and Conjugates", *Chemistry – A European Journal* **2011**, *17*, 9832–9842.
- [73] W. Thomson, D. Nicholls, W. J. Irwin, J. S. Al-Mushadani, S. Freeman, A. Karpas, J. Petrik, N. Mahmood, A. J. Hay, "Synthesis, bioactivation and anti-HIV activity of the bis(4-acyloxybenzyl) and mono(4-acyloxybenzyl) esters of the 5'-monophosphate of AZT", *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 1* **1993**, 1239–1245.
- [74] H. J. Jessen, T. Schulz, J. Balzarini, C. Meier, "Bioreversible Protection of Nucleoside Diphosphates", *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 8719–8722.
- [75] T. Schulz, H. J. Jessen, J. Balzarini, C. Meier, "Bioreversible Protection of Nucleosidediphosphates—Synthesis and Properties", *Antiviral Research* **2009**, *82*, A63.
- [76] L. Weinschenk, T. Gollnest, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier, "Bis(benzoyloxybenzyl)-DiPPro Nucleoside Diphosphates of Anti-HIV Active Nucleoside Analogues", *Chem-MedChem* **2015**, *10*, 891–900.
- [77] T. Gollnest, T. D. de Oliveira, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier, "Lipophilic prodrugs of nucleoside triphosphates as biochemical probes and potential antivirals", *Nature Communications* **2015**, *6*, 8716.
- [78] I. Reimer, *3'-S-Phosphorthiolat verbrückte Oligonucleotide und Fluoreszierende Nucleotid-Prodrugs für Zellaufnahmestudien*, Universität Hamburg, Dissertation, **2017**.
- [79] T. Gollnest, *Das TriPPPPro-Konzept: Entwicklung und Charakterisierung von antiviralen Nucleosidtriphosphat-Prodrugs*, Universität Hamburg, Dissertation, **2015**.
- [80] R. S. Givens, M. Goeldner, *Dynamic Studies in Biology: Phototriggers, Photoswitches and Caged Biomolecules*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- [81] R. H. Kramer, J. J. Chambers, D. Trauner, "Photochemical tools for remote control of ion channels in excitable cells", *Nature Chemical Biology* **2005**, *1*, 360–365.
- [82] A. Herrmann, "Controlled Release of Volatiles under Mild Reaction Conditions: From Nature to Everyday Products", *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 5836–5863.

- [83] H. Zhao, E. S. Sterner, E. B. Coughlin, P. Theato, "o-Nitrobenzyl Alcohol Derivatives: Opportunities in Polymer and Materials Science", *Macromolecules* **2012**, *45*, 1723–1736.
- [84] J. A. McCray, L. Herbette, T. Kihara, D. R. Trentham, "A new approach to time-resolved studies of ATP-requiring biological systems; laser flash photolysis of caged ATP", *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1980**, *77*, 7237 LP –7241.
- [85] G. Ciamician, P. Silber, "Chemische Lichtwirkungen", *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1901**, *34*, 2040–2046.
- [86] L. Salassa, C. Garino, G. Salassa, R. Gobetto, C. Nervi, "Mechanism of Ligand Photodissociation in Photoactivable [Ru(bpy)<sub>2</sub>L<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> Complexes: A Density Functional Theory Study", *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 9590–9597.
- [87] R. Schmidt, D. Geissler, V. Hagen, J. Bendig, "Mechanism of Photocleavage of (Coumarin-4-yl)methyl Esters", *The Journal of Physical Chemistry A* **2007**, *111*, 5768–5774.
- [88] J. W. Chamberlin, "Use of the 3,5-Dimethoxybenzyloxycarbonyl Group as a Photosensitive N-Protecting Group", *The Journal of Organic Chemistry* **1966**, *31*, 1658–1660.
- [89] R. S. Givens, J. F. W. Weber, A. H. Jung, C.-H. B. T. M. i. E. Park *Caged Compounds, Bd. 291*, Academic Press, **1998**, S. 1–29.
- [90] P. W. Atkins, J. de Paula, *Physikalische Chemie*, 5. Auflage, Wiley-VCH, **2015**.
- [91] P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, "Photoremovable Protecting Groups in Chemistry and Biology: Reaction Mechanisms and Efficacy", *Chemical Reviews* **2013**, *113*, 119–191.
- [92] A. Patchornik, B. Amit, R. B. Woodward, "Photosensitive protecting groups", *Journal of the American Chemical Society* **1970**, *92*, 6333–6335.
- [93] C. G. Bochet, "Wavelength-selective cleavage of photolabile protecting groups", *Tetrahedron Letters* **2000**, *41*, 6341–6346.

- [94] E. Reichmanis, R. Gooden, C. W. Wilkins Jr., H. Schonhorn, "A study of the photochemical response of o-nitrobenzyl cholate derivatives in P(MMA-MAA) matrices", *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition* **1983**, *21*, 1075–1083.
- [95] J. A. McCray, D. R. Trentham, "Properties and Uses of Photoreactive Caged Compounds", *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* **1989**, *18*, 239–270.
- [96] T. Schmierer, S. Laimgruber, K. Haiser, K. Kiewisch, J. Neugebauer, P. Gilch, "Femtosecond spectroscopy on the photochemistry of ortho-nitrotoluene", *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, *12*, 15653–15664.
- [97] Y. V. Il'ichev, J. Wirz, "Rearrangements of 2-Nitrobenzyl Compounds. 1. Potential Energy Surface of 2-Nitrotoluene and Its Isomers Explored with ab Initio and Density Functional Theory Methods", *The Journal of Physical Chemistry A* **2000**, *104*, 7856–7870.
- [98] Y. Gareau, R. Zamboni, A. W. Wong, "Total synthesis of N-methyl LTC<sub>4</sub>: a novel methodology for the monomethylation of amines", *The Journal of Organic Chemistry* **1993**, *58*, 1582–1585.
- [99] Á. Somoza, "Protecting groups for RNA synthesis: an increasing need for selective preparative methods", *Chemical Society Reviews* **2008**, *37*, 2668–2675.
- [100] H. Yamamoto, N. Momiyama, "Rich chemistry of nitroso compounds", *Chemical Communications* **2005**, 3514–3525.
- [101] H. Low, "Nitroso Compounds", *Archives of Environmental Health: An International Journal* **1974**, *29*, 256–260.
- [102] R. S. Givens, C.-H. Park, "p-Hydroxyphenacyl ATP: A new phototrigger", *Tetrahedron Letters* **1996**, *37*, 6259–6262.
- [103] R. S. Givens, P. Conrad, A. L. Yousef, J. Lee, *Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*, 2nd ed., CRC, Boca Raton, FL, **2004**.
- [104] R. S. Givens, J.-I. Lee, "The p-Hydroxyphenacyl Photoremovable Protecting Group", *ChemInform* **2004**, *35*, DOI 10.1002/chin.200423262.

- [105] T. W. Green, P. G. M. Wutts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley-Interscience, New York, **2006**.
- [106] P. G. Conrad, R. S. Givens, B. Hellrung, C. S. Rajesh, M. Ramseier, J. Wirz, "p-Hydroxyphenacyl Phototriggers: The Reactive Excited State of Phosphate Photorelease", *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 9346–9347.
- [107] J. H. Kaplan, B. Forbush, J. F. Hoffman, "Rapid photolytic release of adenosine 5'-triphosphate from a protected analog: utilization by the sodium:potassium pump of human red blood cell ghosts", *Biochemistry* **1978**, *17*, 1929–1935.
- [108] J. Engels, E. J. Schlaeger, "Synthesis, structure, and reactivity of adenosine cyclic 3',5'-phosphate-benzyltriesters", *Journal of Medicinal Chemistry* **1977**, *20*, 907–911.
- [109] M. C. Maillard, L. Arlinghaus, M. Glashofer, K. S. Lee, K. A. Jacobson, "Photolabile A1-Adenosine Receptor Agonist As Caged Electrophysiological Probes", *Medicinal chemistry research : an international journal for rapid communications on design and mechanisms of action of biologically active agents* **1991**, *1*, 322–329.
- [110] J. E. Corrie, T. Furuta, R. S. Givens, A. L. Yousef, M. Goeldner, *Photoremovable Protecting Groups Used for the Caging of Biomolecules, Bd. 1999*, **2005**, S. 1–94.
- [111] R. Louw, "Acetyl Nitrate", *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, Major Reference Works **2001**, *3*.
- [112] M. Kneeteman, A. Baena, C. Rosa, P. Mancini, "Polar Diels-Alder Reactions Using Heterocycles as Electrophiles. Influence of Microwave Irradiation", *International Research Journal of Pure and Applied Chemistry* **2015**, *8*, 229–235.
- [113] E. J. Corey, S. Shibata, R. K. Bakshi, "An efficient and catalytically enantioselective route to (S)-(-)-phenyloxirane", *The Journal of Organic Chemistry* **1988**, *53*, 2861–2863.
- [114] T. Gollnest, T. Dinis de Oliveira, A. Rath, I. Hauber, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier, "Membrane-permeable Triphosphate Prodrugs of Nucleoside Analogues", *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55*, 5255–5258.

- [115] J. F. Teichert, B. L. Feringa, "Phosphoramidites: Privileged Ligands in Asymmetric Catalysis", *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 2486–2528.
- [116] I. Sarac, C. Meier, "Efficient Automated Solid-Phase Synthesis of DNA and RNA 5'-Triphosphates", *Chemistry – A European Journal* **2015**, *21*, 16421–16426.
- [117] S. L. Beaucage, R. P. Iyer, "The Functionalization of Oligonucleotides Via Phosphoramidite Derivatives", *Tetrahedron* **1993**, *49*, 1925–1963.
- [118] E. Nurminen, H. Lönnberg, "Mechanisms of the substitution reactions of phosphoramidites and their congeners", *Journal of Physical Organic Chemistry* **2004**, *17*, 1–17.
- [119] A. H. Krotz, P. G. Klopchin, K. L. Walker, G. Srivatsa, D. L. Cole, V. T. Ravikumar, "On the formation of longmers in phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide synthesis", *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 3875–3878.
- [120] S. Weising, V. Sterrenberg, D. Schols, C. Meier, "Synthesis and Antiviral Evaluation of TriPPPPro-AbacavirTP, TriPPPPro-CarbovirTP, and Their 1',2'-cis-Disubstituted Analogues", *ChemMedChem* **2018**, *13*, 1771–1778.
- [121] C. Meier, C. Zhao, S. Weber, D. Schols, J. Balzarini, "Prodrugs of  $\gamma$ -Alkyl-modified Nucleoside Triphosphates - improved Inhibition of HIV Reverse Transcriptase", *Angewandte Chemie International Edition* **2020**.
- [122] X. Jia, D. Schols, C. Meier, "Anti-HIV-Active Nucleoside Triphosphate Prodrugs", *Journal of Medicinal Chemistry* **2020**, *63*, 6003–6027.
- [123] Y. S. Sanghvi, Z. Guo, H. M. Pfundheller, A. Converso, "Improved Process for the Preparation of Nucleosidic Phosphoramidites Using a Safer and Cheaper Activator", *Organic Process Research & Development* **2000**, *4*, 175–181.
- [124] Y. V. Il'ichev, M. A. Schwörer, J. Wirz, "Photochemical Reaction Mechanisms of 2-Nitrobenzyl Compounds: Methyl Ethers and Caged ATP", *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 4581–4595.
- [125] Y. Zhou, V. Bharadwaj, M. S. Rahman, P. Sampson, N. E. Brasch, A. J. Seed, "Synthesis and photochemical studies of 2-nitrobenzyl-N-hydroxysulfonamides", *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2019**, *384*, 112033.

- [126] J. P. Horwitz, J. Chua, M. A. D. Rooze, M. Noel, I. L. Klundt, "The Formation of 2',3'-Unsaturated Pyrimidine Nucleosides via a Novel  $\beta$ -Elimination Reaction", *The Journal of Organic Chemistry* **1966**, *31*, 205–211.
- [127] M. J. M. Hitchcock, "2',3'-Didehydro-2',3'-dideoxythymidine (D4T), an anti-HIV Agent", *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* **1991**, *2*, 125–132.
- [128] T. Sowa, S. Ouchi, "The Facile Synthesis of 5'-Nucleotides by the Selective Phosphorylation of a Primary Hydroxyl Group of Nucleosides with Phosphoryl Chloride", *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1975**, *48*, 2084–2090.
- [129] A. Ruthenbeck, E. Marangoni, B. Diercks, A. Krüger, A. Froese, N. Bork, V. Nikolaev, A. Guse, C. Meier, "Membrane-Permeable Octanoyloxybenzyl-Masked cNMPs As Novel Tools for Non-Invasive Cell Assays", *Molecules* **2018**, *23*, 2960.
- [130] R. S. Givens, K. F. Stensrud,  $\alpha$ -Bromo-p-Hydroxyacetophenone, **2009**.
- [131] R. Appel, "Tertiary Phosphane/Tetrachloromethane, a Versatile Reagent for Chlorination, Dehydration, and P-N Linkage", *Angewandte Chemie International Edition in English* **1975**, *14*, 801–811.
- [132] F. F. Wong, P.-W. Chang, H.-C. Lin, B.-J. You, J.-J. Huang, S.-K. Lin, "An efficient and convenient transformation of  $\alpha$ -haloketones to  $\alpha$ -hydroxyketones using cesium formate", *Journal of Organometallic Chemistry* **2009**, *694*, 3452–3455.
- [133] A. Hassner, R. H. Reuss, H. W. Pinnick, "Synthetic methods: Hydroxylation of carbonyl compounds via silyl enol ethers", *The Journal of Organic Chemistry* **1975**, *40*, 3427–3429.
- [134] J. Eames, G. S. Coumbarides, M. J. Suggate, N. Weerasooriya, "Investigations into the Regioselective C-Deuteration of Acyclic and Exocyclic Enolates", *European Journal of Organic Chemistry* **2003**, *2003*, 634–641.
- [135] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, (Hrsg.: M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2005**.
- [136] J. B. Christensen, "A Simple Method for Synthesis of Active Esters of Isonicotinic and Picolinic Acids", *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry* **2001**, *6*, 47.

- [137] K. A. Jacobson, Z.-G. Gao, A. P. Ijzerman, "Allosteric modulation of purine and pyrimidine receptors", *Advances in pharmacology (San Diego Calif.)* **2011**, *61*, 187–220.
- [138] D. A. Walsh, S. M. Van Patten, "Multiple pathway signal transduction by the cAMP-dependent protein kinase", *The FASEB Journal* **1994**, *8*, 1227–1236.
- [139] J. M. Nerbonne, S. Richard, J. Nargeot, H. A. Lester, "New photoactivatable cyclic nucleotides produce intracellular jumps in cyclic AMP and cyclic GMP concentrations", *Nature* **1984**, *310*, 74–76.
- [140] W. Ried, M. Ritz, "Reaktionen mit Diazocarbonylverbindungen, XXII1). Über die Reaktion von Anilen mit Tosylhydrazid", *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1966**, *691*, 50–54.
- [141] R. A. Ali, T. Zhelay, C. J. Trabbic, T. F. Walseth, J. T. Slama, D. R. Giovannucci, K. A. Wall, "Activity of nicotinic acid substituted nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) analogs in a human cell line: Difference in specificity between human and sea urchin NAADP receptors", *Cell Calcium* **2014**, *55*, 93–103.
- [142] W. Depmeier, J. Engels, K. Klaska, "The crystal and molecular structure of 2'-acetyluridine-3',5'-cyclophosphate benzyl triester, a pyrimidine nucleotide with syn conformation", *Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry* **1977**, *33*, 2436–2440.
- [143] O. J. Plante, S. L. Buchwald, P. H. Seeberger, "Halobenzyl Ethers as Protecting Groups for Organic Synthesis", *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 7148–7149.
- [144] R. R. Schmidt, "New Methods for the Synthesis of Glycosides and Oligosaccharides. Are There Alternatives to the Koenigs-Knorr Method?", *Angewandte Chemie International Edition in English* **1986**, *25*, 212–235.
- [145] P. Eckenberg, U. Groth, T. Huhn, N. Richter, C. Schmeck, "A useful application of benzyl trichloroacetimidate for the benzylation of alcohols", *Tetrahedron* **1993**, *49*, 1619–1624.

- [146] I. N. Redwan, H. J. Ingemyr, T. Ljungdahl, C. P. Lawson, M. Griotli, "Solid-Phase Synthesis of 5'-O-[N-(Acyl)sulfamoyl]adenosine Derivatives", *European Journal of Organic Chemistry* **2012**, *5*, 3665–3669.
- [147] P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, "Photoremovable protecting groups in chemistry and biology: Reaction mechanisms and efficacy", *Chemical Reviews* **2013**, *113*, 119–191.

## Anhang

## Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Gefahrstoffsymbol	H-Sätze	P-Sätze
Aceton		225, 319, 336, EUH066	210, 233, 305+351+338
Acetonitril		225, 302, 312, 319, 332	305+351+338, 403+235 210, 280,
Acetonitril-d <sub>3</sub>		225, 302+312+332 319	301+312+330, 305+351+338, 403+235
Adenosin	Kein Gefahrstoff nach der Richtlinie 1272/2008 EG		
Adenosin- diphosphat	Kein Gefahrstoff nach der Richtlinie 1272/2008 EG		
3,5-cylisches- Adenosin- monophosphat	Kein Gefahrstoff nach der Richtlinie 1272/2008 EG		
Ammoniumacetat	Kein Gefahrstoff nach der Richtlinie 1272/2008 EG		
Ammonium- hydrogencarbonat		302	301+312+330
<i>p</i> -Anisaldehyd- dimethylacetal	Kein Gefahrstoff nach der Richtlinie 1272/2008 EG		
Bis(diisoproylamino)- chloro- phosphoramidit		314	260, 280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351,338+310
Bortrifluorid- Diethyletherat		226, 314, 332, 372	210, 280, 301+331+331, 305+351+338, 308+310

Anhang

Substanz	Gefahrstoffsymbol	H-Sätze	P-Sätze
Brom		314, 330, 400	273, 280, 301+330+331, 303+361+353, 304+340+310, 305+351,338
<i>n</i> -Bromoctan		410	273, 501
Buttersäureanhydrid		314, EUH014	280, 305+351+338, 351
<i>tert</i> -Butyldi- methylsilylchlorid		228, 314, 411	210, 260, 273, 280, 303+361+353, 305+351+338+310
<i>tert</i> -Butylhydro- peroxid (5.5 M in <i>n</i> -Decan)		226, 242, 302, 304, 311, 314, 317, 330, 341, 411	210, 301+310+331, 301+330+331, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338+310, 370+378
<i>n</i> -Butyllithium (2.5 M in <i>n</i> -Hexan)		225, 250, 260, 304, 314, 336, 361f, 373, 411	201, 231+232, 280, 305+351+338, 370+378
2,6- <i>tert</i> -Butyl-4- methylpyridin		302, 315, 319, 335	261, 305+351+338
Cäsiumcarbonat		318, 335	280, 305+351+338+310
Cäsiumformiat		302, 319, 371, 373	301+312+330, 305+351+338, 308+311

Anhang

Substanz	Gefahrstoffsymbol	H-Sätze	P-Sätze
Chloroform	 	302, 315, 319, 331, 336, 351, 361d, 372, 412	201, 273, 301+312+330, 302+352, 304+340+311, 308+313
Chloroform- <i>d</i>	 	302, 315, 319, 331, 336, 351, 361d, 372, 412	201, 273, 301+312+330, 302+352, 304+340+311, 308+313
<i>m</i> -Chlorper- benzoesäure	 	242, 315, 317, 319, 335	220, 261, 280, 305+351+338, 410, 411+235
6- Chloropurinribosid	Kein Gefahrstoff nach der Richtlinie 1272/2008 EG		
Cyclopentylamin	  	225, 300, 315, 317, 318, 332	210, 264, 208, 301+310, 305+351+338 301+330+331,
Decansäurechlorid		314, 290	305+351+338, 310, 280, 260, 303+361+353 273, 280,
1,8- Diazabicyclo[5.4.0]undec- 7-en	 	290, 301, 314, 412	301+310+330, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338
Dichlormethan	 	315, 319, 336, 351	201, 302+352, 305+351+338, 308+313

Anhang

Substanz	Gefahrstoffsymbol	H-Sätze	P-Sätze
4,5-Dicyanoimidazol (0.25 M in Acetonitril)		225, 302+312+332, 315, 318,335	210, 233, 261, 280,303+361+353, 305+351+338+310
Diethylether		224, 302, 336, EUH019, EUH066	210, 240, 403+235
3,4-Dihydro-2H-pyran		225, 315, 319, 335	210, 261, 305+351+338
Diisopropylamin		225, 302, 314, 331, 335	210, 280, 301+330+331, 304+340, 305+351+338, 308+310, 403+233
N,N-Diisopropylethylamin		225, 302, 318, 331, 335	210, 261, 280, 305+351+338, 311
4,5-Dimethoxy-2-nitroacetophenon	Kein Gefahrstoff nach der Richtlinie 1272/2008 EG		
4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzaldehyd	Kein Gefahrstoff nach der Richtlinie 1272/2008 EG		
2,2-Dimethoxypropan		225, 319	210, 305+351+338
4-Dimethylaminopyridin		301, 310, 331, 315, 318, 370, 411	310, 304+340, 302+352, 305+351+338, 308+313, 280
Dimethylendioxy2-nitrobenzaldehyd	Kein Gefahrstoff nach der Richtlinie 1272/2008 EG		
N,N-Dimethylformamid		226, 312, 319, 360D	201, 210, 208, 302+352+312, 305+351+338, 308+313
Dimethylsulfoxid	Kein Gefahrstoff nach der Richtlinie 1272/2008 EG		

Anhang

Substanz	Gefahrstoffsymbol	H-Sätze	P-Sätze
Dimethylsulfoxid- $d_6$		Kein Gefahrstoff nach der Richtlinie 1272/2008 EG	
Dinatriumhydrogenphosphat		Kein Gefahrstoff nach der Richtlinie 1272/2008 EG	
Diphenylphosphit		302, 315, 318, 335	280, 301+312+330, 302+352, 305+351+338+310 210, 280,
Essigsäure		226, 314	301+330+331, 303+361+353, 305+351+338+310 210, 280,
Essigsäureanhydrid		226, 302, 314, 330	301+330+331, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338+310 210, 260, 280,
Essigsäurechlorid		225, 314	305+351+338, 370+378, 403+235
Ethanol		225, 319	210, 305+351+338
Ethylacetat		225, 319, 336	210, 305+351+338
(9-Fluorenylmethyl)-chloroformiat		314	260, 280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310
Hydrazin (51 % in Wasser)		301, 311, 314, 317, 331, 350, 410	280, 301+330+331, 302+352, 305+351+338, 304+340, 310

Anhang

Substanz	Gefahrstoffsymbol	H-Sätze	P-Sätze
3-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd	Kein Gefahrstoff nach der Richtlinie 1272/2008 EG		
4-Hydroxyacetophenon		319, 412	305+351+338
4-Hydroxybenzylalkohol		319	305+351+338
Imidazol		302, 314, 360D	201, 260, 2180, 303+361+353, 305+351+338+310, 308+313
Kaliumcarbonat		315, 319, 335	305+351+338
Kaliumdihydrogenphosphat	Kein Gefahrstoff nach der Richtlinie 1272/2008 EG		
Kaliumhydroxid		290, 302, 314	260, 280, 301+312+330, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338+310
Kieselgel	Kein Gefahrstoff nach der Richtlinie 1272/2008 EG		
Lithiumdiisopropylamin (2.0 M in Tetrahydrofuran)		225, 304, 314, 335, 336, 351, 373, 410	210, 280, 301+310+331, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338+310
Mangandioxid		302+332, 373	260, 264, 270, 304+340+312, 314, 501

Anhang

Substanz	Gefahrstoffsymbol	H-Sätze	P-Sätze
Mesylchlorid	 	301+311, 314, 317, 330, 335	280, 301+310+330, 301+330+331, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338 210, 280,
Methanol	  	225, 301+311+331, 370	301+310+330, 302+352+312, 304+340+311 210, 280,
Methanol- <i>d</i> <sub>4</sub>	  	225, 301+311+331, 370	301+310+330, 302+352+312, 304+340+311
Natriumborhydrid	   	260, 301, 314, 360F	201, 231+232, 280, 308+313, 370+378, 402+404
Natriumchlorid	Kein Gefahrstoff nach der Richtlinie 1272/2008 EG		
Natriumhydrid	 	228, 260, 290, 314	210, 231+232, 260, 280, 303+361+353 260, 280, 301+312+330,
Natriumhydroxid		290, 314	301+330+331, 303+361+353, 305+351+338+310
Natriumsulfat	Kein Gefahrstoff nach der Richtlinie 1272/2008 EG		
Natriumthiosulfat	Kein Gefahrstoff nach der Richtlinie 1272/2008 EG		
2-Nitro-4-hydroxy- benzaldehyd	Kein Gefahrstoff nach der Richtlinie 1272/2008 EG		
2-Nitrobenzaldehyd		302, 315, 319, 335, 412	273, 301+312+330, 302+352, 305+351+338

Anhang

Substanz	Gefahrstoffsymbol	H-Sätze	P-Sätze
1-Octadecanol	Kein Gefahrstoff nach der Richtlinie 1272/2008 EG		
Ocansäurechlorid		317, 318, 315, 330, 290	208, 302+352, 305+351+338, 310, 402+404
Petrolether 50-70		225, 304, 315, 336, 411	210, 273, 301+310+331, 302+352
Phosphoroxychlorid		302, 314, 330, 372	280, 301+330+331, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338, 314
Phosphorsäure (85 %)		290, 314	280, 305+351+338, 310
Phosphortrichlorid		300+330, 314, 373	20, 301+310+330, 301+330+331, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
2-Propanol		225, 319, 336	210, 305+351+338
Pyridin		225, 302+312+332, 315, 319	210, 280, 305+351+338
Pyridinium-Trifluoroacetat		315, 319, 335	302+352, 305+351+338
Salpetersäure (65 %)		272, 290, 314, 331	210, 220, 261, 280, 370+378, 403+233
Salzsäure (37 %)		290, 314, 335	260, 280, 303+361+353, 303+340+310, 305+351+338

Anhang

Substanz	Gefahrstoffsymbol	H-Sätze	P-Sätze
Schwefelsäure (98 %)		290, 314	280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338+310
Tetrabutylammonium- hydroxid (10 % in Wasser)		314	303+361+353, 305+351+338  201, 210,
Tetrahydrofuran	  	225, 302, 319, 335, 351	301+312+330, 305+351+338, 308+313
Thymidin	Kein Gefahrstoff nach der Richtlinie 1272/2008 EG		
Toluol	  	225, 304, 315, 336, 361d, 373, 412	201, 210, 273, 301+310+331, 302+352, 308+313 260, 280,
<i>p</i> -Toluolsulfonsäure	 	290, 314, 335	303+361+353, 304+340+310, 305+351+338+310 261, 280, 301+330+331+310,
Trichloracetonitril	  	301+311+331, 411	302+352+312, 304+340+311, 403+233 210, 280,
Triethylamin	  	225, 302, 311+331, 314	301+330+331, 303+361+353, 304+340+311, 305+351+338+310

Anhang

Substanz	Gefahrstoffsymbol	H-Sätze	P-Sätze
Triethylamin- Trihydrodfluorid	 	300+310+330, 314	280, 301+310+330, 301+330+331, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338 273, 280,
Trifluoressigsäure	 	314, 332, 412	301+330+331, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338
Trifluormethan- sulfonsäure	 	290, 302, 314, 335	280, 301+330+331, 305+351+338, 308+310
Trifluormethansulfon- säureanhydrid	 	302, 314	280, 305+351+338, 310
Trimethylsilylchlorid	  	225, 301+331, 312, 314	210, 233, 261, 301+310+330, 370+378, 403+233
Trimethylsilyl- trifluormethan- sulfonoat	 	226, 314	280, 305+351+338, 310
Vanilin		319	305+351+338

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Chris Meier möchte ich für die Vergabe der sehr interessanten Themenstellung und den zur Bearbeitung zur Verfügung gestellten wissenschaftlichen Freiraum danken. Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ralph Holl für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Weiterhin möchte ich mich bei dem technischen Personal der NMR-Abteilung unter Leitung von Herrn Dr. Thomas Hackl und der MS-Abteilung unter der Leitung von Frau Dr. Maria Riedner für die Vermessungen unzähliger Proben bedanken.

Dem gesamten Arbeitskreis *AckerMeier* danke ich für die unzähligen Fachgespräche, Ratschläge und für das freundliche Miteinander! Mein besonderer Dank gilt der elitären 8:30 Kaffeerunde und den fleißigen Kaffeekochern Jesus und Sarah II, sodass einem unterhaltsamen Arbeitsbeginn nichts im Wege stand. Mein Dank gilt auch Typ I und Typ II für das Auslösen von Lachanfällen und für ihre Fähigkeit als Partykanonen. Ganz herzlich möchte ich mich zudem bei Conny bedanken! Sie hat mich und meine Musikauswahl knapp vier Jahre im Labor tapfer ertragen und dabei nur geringfügigen Widerstand geleistet. 518 verbindet und ich bin mir sicher, dass es keine bessere Laborpartnerin hätte geben können. Ebenfalls möchte ich Tobi bedanken, dessen Aufstieg ich vom *ISP-Schneider* über den *Praktikanten-Schneider* bis zum *Lord Schneider* begleiten durfte. Tobi stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite, hat einen Großteil der Fehler in dieser Arbeit ausgemerzt und ich bin mir sicher, dass auch *Dr. Schneider* bald das Licht der Welt erblicken wird!

Mein besonderer Dank gilt zudem Katha, welche mich immer unterstützt hat und mir ebenfalls stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Dein Arbeitseifer war stets auch eine Motivation für mich und ich hoffe, dass dein Schweinchen noch lange am Abzug in 518 hängen bleibt!

Schlussendlich möchte ich mich natürlich noch meiner Familie für ihre bedingungslose Unterstützung bedanken, welche bereits am ersten Tag des Studiums begonnen hat und mich bis zum Abschluss der Promotion gestärkt und begleitet hat. Diese Arbeit wäre ohne euch nicht möglich gewesen!

**Vielen Dank!**

## Betreute Praktika und Abschlussarbeiten

Die Folgenden chronologisch aufgeführten Masterpraktika und Bachelorarbeiten wurden unter meiner Betreuung angefertigt. Allen Studierenden sei an dieser Stelle für ihre tolle Arbeit gedankt.

- Tobias Schneider; Synthese photolabiler Masken für ATP, **2017**, Mastermodul: Naturstoffe
- Marie Bode; Synthese einer *caged*-ATP-Verbindung mit *p*-Hydroxyphenylacetyl-Gruppen, **2018**, Bachelorarbeit Studiengang Chemie
- Jelena Berl; Synthese und Untersuchung von *photocaged* d4T-Triphosphat, **2018**, Bachelorarbeit Studiengang Chemie
- Jannik Kessler; Synthese von *p*-Hydroxyphenylacylester zur Maskierung von ATP; **2019**, Mastermodul: Naturstoffe
- Jana Landich; Beiträge zur Synthese einer *caged*-ATP-Verbindung mit *p*-Hydroxyphenylacetyl-Gruppen; **2019**, Integriertes Fortgeschrittenen Praktikum, B.Sc. Gymnasiallehramt Chemie;
- Sarah Claas; Synthese von *caged* cyclischem Adenosinmonophosphat, **2019**, Mastermodul: Naturstoffe

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation 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.

---

Datum, Ort

---

Unterschrift